

**Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**II Wydział Lekarski**

Mariola Krzyścin

**Wpływ palenia papierosów  
oraz narażenia na wdychanie dymu tytoniowego  
w aspekcie stanu noworodka po urodzeniu**

*Rozprawa na stopień  
doktora nauk medycznych*

*Promotor:  
Prof. UM dr hab. med. Wiesław Markwitz*

*Klinika Perinatologii i Ginekologii*

*Poznań 2013*

*Niniejszą rozprawę doktorską  
dedykuję  
mojemu mężowi i dzieciom.*

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi Prof. dr hab. med. Wiesławowi Markwitzowi  
za opiekę i pomoc podczas realizacji tego projektu badawczego;

Panu Prof. dr hab. n. med. Grzegorzowi Bręborowiczowi  
za cenne konsultacje i pomoc w realizacji doświadczenia;

Pracownikom Katedry i Zakładu Toksykologii  
za poświęcony czas oraz pomoc w wykonaniu oznaczeń.

## Spis treści

1. Spis skrótów .....	6
2. Wstęp.....	9
2.1 Palenie tytoniu .....	11
2.1.1 Palenie tytoniu w aspekcie historycznym.....	11
2.1.2 Palenie tytoniu w aspekcie epidemiologicznym.....	14
2.1.3 Bierne palenie tytoniu.....	15
2.2 Dym tytoniowy .....	16
2.3 Efekty zdrowotne narażenia na dym tytoniowy.....	21
2.3.1 Wpływ dymu tytoniowego na organizm kobiety .....	22
2.3.2 Wpływ dymu tytoniowego na rozwój ciąży .....	23
2.3.3 Wpływ dymu tytoniowego na stan noworodka .....	26
2.4 Stres oksydacyjny .....	27
2.4.1 Stres oksydacyjny - wywoływane patologie .....	32
2.4.2 Stres oksydacyjny w czasie ciąży .....	34
2.4.3 Stres oksydacyjny a palenie papierosów .....	35
2.5 Metody określenia narażenia na dym tytoniowy .....	36
2.5.1 Kwestionariusz ankiety.....	36
2.5.2 Biomarkery narażenia na dym tytoniowy.....	36
2.5.3 Nikotyna i kotynina .....	37
3. Cel pracy .....	41
4. Materiał i metodyka .....	42
4.1 Materiał.....	42
4.1.1 Grupa badana.....	42
4.1.2 Ankieta.....	42
4.1.3 Materiał biologiczny.....	43
4.2 Metodyka .....	44
4.2.1 Poziom kotyniny w surowicy krwi.....	44
4.2.2 Stężenie białka całkowitego .....	48
4.2.3 Peroksydacja lipidów (TBARS).....	50
4.2.4 Zaawansowane produkty utleniania białek (AOPP).....	51
4.2.5 Zaawansowane końcowe produkty glikacji białek (AGEs) .....	52

4.2.6	Zredukowany glutationu (GSH) .....	53
4.2.7	Aktywność katalazy (CAT) .....	56
4.2.8	Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) .....	56
4.2.9	Zdolność antyoksydacyjna ekwiwalentów troloxu (TEAC) .....	58
4.2.10	Białko nitrozylowane.....	60
4.2.11	Azotyny .....	62
4.2.12.	Gazometria krwi pępowinowej.....	64
4.3	Obliczenia statystyczne.....	64
5	Wyniki i ich omówienie .....	65
6	Dyskusja.....	92
7	Wnioski .....	116
8	Abstrakt.....	117
9	Piśmiennictwo .....	119

## 1. Spis skrótów

ABTS - 2,2'-azynodi [sulfonian 3-etylbentiazoliny]

AGE-RAGE - receptor dla końcowych produktów glikacji białek

AGEs - (ang. *advanced glycation end-products*) zaawansowane produkty glikacji białek

Al-MCM-41 - (ang. *mesoporous aluminosilicate catalyst*) - katalizator mezoporowaty glinokrzemianem

AOPP - (ang. *advanced oxidation protein product*) zaawansowane produkty utleniania białek

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

AU – (ang. *absorbation unit*) jednostka absorbancji

BA – (ang. *antioxidant barrier*) bariera antyoksydacyjna

BE – (ang. *base excess*) deficyt zasad

BSA - (ang. *bovine serum albumin*) albuminy surowicy bydłowej

Ca<sup>2+</sup> - jon wapnia +2

CAT - (ang. *catalase*) katalaza

CDNB - 20 mM roztwór 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu

CO - (ang. *carbon monoxide*) tlenek węgla

COHb - (ang. *carboxyhemoglobin*) karboksyhemoglobina

DNA - (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

DTNB - kwas 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowy)

EDRF - (ang. *endothelial-derived relaxing factor*) - śródbłonkowy czynnik wzrostu

EDTA – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas etylenodiaminotetraoctowy

ET-1 - (ang. *endothelin 1*) endotelina 1

ETS - (ang. *Environmental Tobacco Smoke*) środowiskowe palenie tytoniu

GC/MS – (ang. *gas chromatography - mass spectrometry*) chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas

GPSK - Ginekologiczno - Położniczy Szpital Kliniczny

GSH - (ang. *reduced glutathione*) zredukowany glutation

GSNO - (ang. *S-nitrosoglutathione*) S-nitrozoglutation

GSSG - (ang. *oxidized glutathion*) forma utleniania glutationu

GST - (ang. *glutathione S-transferase*) S-transferaza glutationowa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - (ang. *hydrogen peroxide*) nadtlenuk wodoru

HCN - (ang. *hydrogen cyanide*) cyjanowodór

HO<sub>2</sub>• - rodnik wodoronadtlenkowy

HPLC - (ang. *high-performance liquid chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa

IL-1 - (ang. *interleukin-1*) interleukina 1

IL-6 - (ang. *interleukin-6*) interleukina 6

IUGR - (ang. *intrauterine growth restriction*) wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu

LOD - (ang. *limit of detection*) granica wykrywalności

LOQ - (ang. *limit of quantitation*) granica oznaczalności

MAS - (ang. *meconium aspiration syndrom*) zespół aspiracji smółki

MDA - (ang. *malondialdehyde*) aldehyd di malonowy

MES - 50 mM kwas 2-[N-morfolino]etanosulfonowy

MS - (ang. *main stream*) strumień główny

NADH - (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADPH - (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NH<sub>3</sub> - (ang. *ammonia*) amoniak

NO - (ang. *sodium oxide*) tlenek azotu

NO<sub>2</sub> - (ang. *sodium dioxide*) dwutlenek azotu

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - (ang. *singlet oxygen*) tlen singletowy

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> - (ang. *superoxide anion radical*) rodnik ponadtlenkowy

O<sub>3</sub> - (ang. *ozone*) ozon

OH• - (ang. *hydroxyl radical*) rodnik hydroksylowy

ONOO - (ang. *peroxynitrite*) anion kwasu azotowego III

OR - (ang. *odd ratio*) – iloraz szans

PBS - (ang. *phosphate buffered saline*) bufor fosforanowy

PCO<sub>2</sub> - (ang. *partial pressure of carbon dioxide*) prężność dwutlenku węgla

PE - (ang. *preeklampsia*) stan przedrzucawkowy

pH - ujemny logarytm dziesiętny aktywności jonów hydroniowych wyrażonych w molach na decymetr sześcienny

PIH - (ang. *pregnancy induced hypertension*) nadciśnienie ciążowe

PIGF - (ang. *placental growth factor*) łożyskowy czynnik wzrostu

PO<sub>2</sub> - (ang. *partial pressure of oxygen*) prężność tlenu

PPROM - (ang. *premature preterm rupture of membrans*) przedwczesne pęknięcie błon płodowych w ciąży niedonoszonej

PROM - (ang. *preterm rupture of membrans*) przedwczesne pęknięcie błon płodowych

RFT - reaktywne formy tlenu

RO• - rodnik alkoksyłowy

ROO• - rodnik nadtlenkowy

ROOR - nadtlenki organiczne

sFlt-1 - (ang. *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) rozpuszczalna forma receptora dla naczyniowego czynnika wzrostu VEGFR-1

SGA - (ang. *small for gestational age*) noworodek z małą masą urodzeniową

SIDS - (ang. *sudden infant death syndrome*) zespół nagłej śmierci łóżeczkowej niemowląt

SS - (ang. *said stream*) strumień boczny

$t_{1/2}$  - czas półtrwania

t.c. - tydzień ciąży

TBARS - (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) produkty reagujące z kwasem tiobarbiturowym

TEAC - (ang. *trolox-equivalent antioxidant capacity*) zdolność antyoksydacyjna ekwiwalentów troloxu

TF - (ang. *tissue factor*) czynnik tkankowy

TNF $\alpha$  - (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów

TRAP - (ang. *total redox antioxidant potential*) całkowita zdolność przeciwutleniająca układu

VCAM 1 - (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) cząsteczka adhezyjna komórek śródbłónka

VEGFR - (ang. *receptor for vascular endothelial growth factor*) receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego

WHO - (ang. *World Health Organization*) Światowa Organizacja Zdrowia

WRA - wolne rodniki azotowe

WWA - wielonienasycone węglowodory aromatyczne

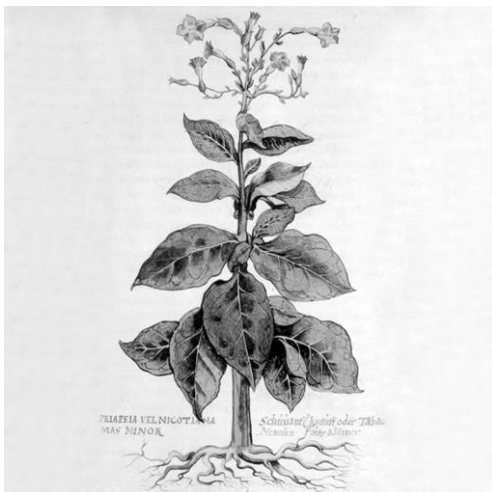
$\chi^2$  - (ang. *Chi-squared test*) - test Chi kwadrat



## 2. Wstęp

Szacuje się, że choroby odtytoniowe stanowią obecnie przyczynę co dziesiątego zgonu na świecie. Nie znany jest żaden inny, pojedynczy, równie śmiertelny czynnik, wirus, bakteria ani defekt genetyczny, będący przyczyną tak wielu zachorowań i zgonów (1).

Podstawowymi surowcami wykorzystywanymi w przemyśle tytoniowym są rośliny z rodzaju *Nicotiana*, należące do rodziny psiankowatych. Gatunkiem typowym i najczęściej wykorzystywanym w przemyśle jest *Nicotiana Tabacum*, do którego należy 67 podgatunków pochodzących z obu Ameryk oraz z Australii. Obecnie rośliny te uprawiane są w wielu innych rejonach świata (2). W przemyśle na szeroką skalę znalazły zastosowanie liście tej rośliny.



Rycina 1. Krzew tytoniu

Obecnie najbardziej popularną formą spożywania tytoniu jest papieros, czyli wyrób składający się z rurki obłożonej cienką bibułą (gilzą) o średnicy do 1 cm i długości do 12 cm (zwykle 85 mm). We wnętrzu bibuły znajduje się mieszanka zawierająca spreparowane liście różnych odmian tytoniu (lub rzadziej marihuany, cracku czy innych substancji działających narkotycznie) z dodatkiem związków konserwujących i poprawiających smakową, a przy tym rynkową wartość produktu. Obecnie najbardziej popularne są papierosy z filtrem węglowym lub acetatowo-węglowym, który częściowo zatrzymuje cząsteczki dymu. Do liści tytoniu często dodawane są substancje poprawiające cechy fizyczne papierosa, tzw. sosy oraz

substancje aromatyzujące. Przykładowo dodawane są różnego typu sole, które ułatwiają ciągłe tlenie się papierosa, cukry i wyciąg z lukrecji, które zmieniają smak papierosa na słodki oraz gliceryna, która zachowuje na dłużej uczucie świeżości tytoniu w ustach. Część producentów wzbogaca swoje wyroby dodatkową porcją nikotyny lub amoniakiem, który poprzez zmianę pH żarzącego się papierosa uaktywnia zawartą w nim nikotynę (3; 4; 5; 6). W Polsce dopuszczonych do stosowania jest ok. 600 takich substancji (3).

Innymi formami konsumpcji tytoniu są: fajka (spreparowane liście tytoniu umieszczane są w niepalnym, najczęściej drewnianym cybuchu), tytoń do żucia, tabaka mokra i sucha, fajka wodna, pałeczki, a także cygaro (rozdrobniiony tytoń zawijany jest w pojedynczy, wysuszony liść tytoniu) i cygaretki (potoczna nazwa małego cygara).

Zgodnie z obowiązującym polskim prawem zabrania się sprzedaży wyrobów tytoniowych (papierosów) młodzieży do lat 18. Sprzedaż papierosów osobom niepełnoletnim jest zakazana i grozi grzywną od 20 do 5000 złotych (7). Dodatkowo wprowadzono obowiązek umieszczania na opakowaniu napisu dotyczącego potencjalnych zdrowotnych skutków palenia tytoniu. Zakazana jest sprzedaż papierosów w paczkach zawierających mniej niż 20 sztuk, papierosów bez opakowania oraz na sztuki. Nielegalny jest także handel papierosami zawierającymi marihuanę lub inne substancje odurzające (7). Obostrzeniu uległy także przepisy dotyczące reklamy oraz promocji wyrobów tytoniowych (8).

Od kilku lat co raz większą popularność, również w Polsce, zdobywa papieros elektroniczny (tzw. e-papieros). Jest to nowoczesne urządzenie elektryczne wykorzystujące element grzewczy do ogrzania substancji (e-liquid) i podawania niewielkich ilości nikotyny metodą inhalacji. Wizualna i zmysłowa stymulacja oraz behawioralne aspekty palenia są zaspakajane przy braku spalania liści tytoniu. Podkreślanymi, przez producentów, zaletami stosowania e-papierosa w stosunku do papierosów tradycyjnych jest niższy koszt oraz mniej szkodliwy wpływ na zdrowie palacza i otoczenia. Oszacowano, że palenie papierosa elektronicznego jest tańsze od tradycyjnego odpowiednika, nawet o 50%. Argumenty zdrowotne są kwestią zdecydowanie bardziej kontrowersyjną. Większość osób korzystających z e-papierosa odczuwa subiektywną poprawę stanu zdrowia, swobodniejsze oddychanie, lepszą kondycję fizyczną itp. Faktem jest, że organizm osoby palącej papierosa elektronicznego nie jest narażony na wdychanie tlenu węgla oraz substancji smolistych. Brakuje jednak wiarygodnych badań i opracowań określających rzeczywiste ryzyko zdrowotne dla palaczy e-papierosów, w szczególności wpływ spalanej zawartości kartridżów na układ oddechowy palacza (9). Na dzień dzisiejszy w Polsce sprzedaż e-papierosów nie

podlega żadnym obostrzeniom prawnym. Nie ma także zakazu korzystania z e-papierosów w miejscach publicznych, w przeciwieństwie palenia papierosów standardowych (8).

## **2.1 Palenie tytoniu**

### **2.1.1 Palenie tytoniu w aspekcie historycznym**

Historia palenia tytoniu datuje się na 5000 roku p.n.e. i związana jest ściśle z rytuałami szamańskimi (10). Istnieją przypuszczenia, że hodowlę tytoniu rozpoczęli rdzenni Amerykanie, oni też jako pierwsi suszyli i wypalali liście tej rośliny. Starożytne cywilizacje takie jak Babilonia, Indie, Chiny, Izrael, a później także katolicy i wyznawcy Kościołów ortodoksyjnych wykorzystywali tytoń jako część obrządków religijnych do palenia kadzideł (11). Plemiona indiańskie obu Ameryk stosowały tytoń w celu osiągnięcia duchowego oczyszczenia uzyskując zmianę stanu umysłu a także jako ofiarę składaną bóstwom. Na terenach Azji i Afryki Subsaharyjskiej palenie tytoniu połączone było z praktykami palenia innych substancji, głównie konopi. Wierzono, że tytoń był darem od bogów, mającym zdolność zabierania trosk i modlitw do Nieba (12). W medycynie tytoń znalazł szerokie zastosowanie. Stosowany był jako lekarstwo na różne przypadłości, głównie jako środek przeciwbólowy, w leczeniu chorób ucha, zębów, jako składnik kompresów i lekarstwo na przeziębienie, tym skuteczniejsze jeśli był wymieszany z liśćmi szalwii bądź korzeniem drzewa balsamicznego. Różnego typu mieszanki były szczególnie polecane w leczeniu objawów astmy oskrzelowej i gruźlicy (10).

Do Europy tytoń trafił za sprawą Krzysztofa Kolumba w 1492 roku, który otrzymał suszone liście tytoniu w podarunku od ludności zamieszkującej wyspy Nowego Łądu. Załoga Kolumba szybko nauczyła się naśladować tubylców i palić tytoń, a potem sprowadziła go na Stary Kontynent. Z początku palenie liści tytoniu uważano za rytuał pogański, który był karano więzieniem. Stopniowo wzrastała jednak jego popularność i akceptowalność wśród społeczeństwa europejskiego (13). Zwyczaj palenia tytoniu zapoczątkował w Europie nowy typ aktywności społecznej, spożywanie środków o działaniu narkotycznym - aktywność, która wcześniej nie była znana. Kilkadziesiąt lat po odkryciu Kolumba, w 1560 roku, ambasador francuski w Portugalii, lekarz z zawodu *Jean Nicot*, sprowadził z Ameryki nasiona tytoniu i zapoczątkował jego uprawę. Sproszkowane liście tytoniu zastosował jako lek przeciwko

bólom migrenowym. Od tamtej pory rozpoczęły się liczne eksperymenty medyczne, różnego rodzaju badania ogarnęły całą Europę i trwały kilka stuleci. Szybko tytoń został szeroko rozreklamowany w bogatszych warstwach społeczeństwa, również na dworze królewskim. Trend ten zaczął się powoli rozpowszechniać pomimo braku jego legalizacji. Również Bliski Wschód został ogarnięty przez ten zwyczaj, jednak wielu tamtejszych władców podjęło stosowne kroki, aby ograniczyć społeczny zasięg tego zjawiska. W 1614 roku król *Jakub I* wydał dekret zabraniający palenia tytoniu w Wielkiej Brytanii, natomiast 10 lat później papież *Urban I* zakazał palenia cygar hiszpańskim księżom.

Amerykańska kariera tytoniu rozpoczęła się w 1612 roku w Jamestown, gdzie powstała pierwsza plantacja z przeznaczeniem na eksport. Plantatorem, który wprowadził tytoń do Virginii był Anglik *John Rolfe* - mąż indiańskiej księżniczki *Pocahontas*. W 1613 roku grupa kolonizatorów angielskich w południowej części kontynentu północno - amerykańskiego, na terenach dzisiejszej Wirginii wysiała tytoń, który wkrótce był hodowany na masową skalę i szybko stał się jedną z podstaw handlu z Nowym Światem. Tak zaczęła się historia amerykańskiego Południa, związana z handlem niewolnikami pracującymi na plantacjach, przywożonymi z Afryki a wymienianych właśnie za uprawiane wyroby, również tytoń. W czasie prezydentury *Abrahama Lincolna* wielką popularność osiągnął kolejny wyrób tytoniowy - cygara (12).

Masowa produkcja cygar rozpoczęła się w Hiszpanii w Sewilli, gdzie w 1731 roku wybudowano pierwsze królewskie fabryki. Sto lat później król Hiszpanii *Ferdynand VII* przyznał Kubie, ówczesnej kolonii hiszpańskiej, prawo do samodzielnej produkcji i sprzedaży cygar. Wkrótce kubańscy wytwórcy zaopatrywali w ten produkt całą Koronę hiszpańską. Do dzisiaj, co roku Kubańczycy przesyłają królowi Hiszpanii symboliczną partię cygar Cohiba, natomiast Hiszpania stała się największym importerem na świecie kubańskich cygar (12).

Jednym z pierwszych wątków historii tytoniu w Polsce jest korespondencja króla *Jana III Sobieskiego* z dworem francuskim ujawniająca eksport polskiego tytoniu do Francji, w ilościach wskazujących na masową produkcję, najprawdopodobniej na południu ówczesnej Polski. Przed rozbiorami Polski istniały fabryki pokrywające masowe zapotrzebowanie na wyroby tytoniowe. Według analiz zawartych w dokumentach ujawnionych w Minnesocie, Kraków zawdzięcza zaopatrzenie w tytoń kontaktom z Wiedniem. Układy polityczne Habsburgów ułatwiły kontakty handlowe z Hiszpanią. Z trzech zaborców, tylko Austriacy wprowadzili państwowy monopol na produkcję wyrobów tytoniowych. Rosjanie i Prusacy zadowolili się wysoką akcyzą, pozostawiając produkcję w rękach prywatnych (13).

Od momentu pojawienia się tytoniu w Europie przez cztery stulecia był on używką i środkiem stosowanym wyłącznie przez ludzi zamożnych. Dopiero w 1881 roku masowa produkcja papierosów w USA, która była możliwa dzięki opracowaniu technologii i wynalezieniu maszyn produkujących papierosy na szeroką skalę ułatwiła dostęp tytoniu do szerszych sfer społecznych. Fakt ten znacznie zwiększył dostępność i atrakcyjność tytoniu. Zautomatyzowana metoda zwijania cygaretek w papier zastąpiła ręczne zwijanie liści tytoniu, co pozwoliło na dziesięciokrotne zwiększenie produkcji. Przy tak masowej produkcji, dzięki jej ciągłemu unowocześnianiu, podaż towaru na rynek była większa od popytu, co mogło zagrozić zwolnieniami z pracy i osiągnięciem mniejszych zysków. Przełom nastąpił za sprawą *Buchanana Duke* syn handlarza tytoniem z Wirginii, który stworzył otworzył rynek dla papierosów dzięki zastosowaniu wielu nowatorskich metod marketingowych (popularnych i stosowanych do dzisiaj). *Duke* umieścił wiele kontrowersyjnych elementów w swoich reklamach, również seks, które są opisywane w podręcznikach historii marketingu (10).

Przełom XIX i XX wieku można uznać za początek światowej pandemii palenia tytoniu, która do dziś nie została opanowana. W czasie I wojny światowej nastąpił wyraźny wzrost konsumpcji papierosów. W latach międzywojennych roczna konsumpcja papierosów wzrastała jeszcze bardziej, z wyjątkiem jedynie okresu wielkiego kryzysu. Pod koniec II wojny światowej obserwowano niewielkie zmniejszenie liczby wypalanych papierosów, między innymi z powodu odstąpienia od wydawania przydziału dziennego paczki papierosów wszystkim żołnierzom amerykańskim (13).

W 1964 roku naczelny lekarz Stanów Zjednoczonych opublikował raport, w którym po raz pierwszy zawarto dowody, że palenie tytoniu jest powodem wielu chorób i przyczyną przedwczesnej śmierci. W ciągu następnych 30 lat w Stanach Zjednoczonych i w krajach rozwiniętych, w których intensywnie prowadzono działania antytytoniowe, konsumpcja papierosów znacznie się obniżyła. Jednakże globalna liczba wypalanych papierosów nie naśladowała tych tendencji. Potężne koncerny tytoniowe, tracąc zyski w rozwiniętych krajach świata, ruszyły na podbój nowych rynków w Azji, Afryce, byłych komunistycznych krajach Europy i Ameryce Południowej (13; 14).

### 2.1.2 Palenie tytoniu w aspekcie epidemiologicznym

Palenie tytoniu należy do najpoważniejszych współczesnych zagrożeń cywilizacyjnych. Wynika to zarówno z rozpowszechnienia tego zjawiska, jak i strat ponoszonych z tego powodu przez społeczeństwo i gospodarkę światową. Obecnie na świecie pali około 1,2 miliarda ludzi, czyli 1/3 ludności powyżej piętnastego roku życia. Szacuje się, że rocznie wypalanych jest około sześć trylionów sztuk papierosów. Chociaż w krajach rozwiniętych w ciągu ostatnich 20 lat obserwuje się tendencję malejącą (średnio o ok. 20 %), to globalna liczba wypalanych papierosów jest wciąż ogromna. Około 80% ludzi palących papierosy żyje w krajach rozwijających się, z tego 360 milionów w Chinach. Chiny są obecnie największym producentem papierosów na świecie, a konsumpcja tytoniu w tym kraju systematycznie zwiększa się o około 3% rocznie (15). Pomimo starań nakierowanych na ograniczenie nałogu, wciąż wzrasta liczba palaczy, głównie w krajach rozwijających się, szczególnie w grupach społecznych o niskim i średnim dochodzie w gospodarstwie domowym. Również prognozy na najbliższe dekady są pesymistyczne. Uważa się, że zdrowotne, ekonomiczne i społeczne skutki palenia tytoniu będą w najbliższych 15 latach jeszcze bardziej się potęgowały (13). Szacuje się, że do 2025 roku liczba palaczy na świecie będzie wynosić około 1,6 miliarda (1; 16; 17). Porównując dochód z podatku akcyzowego za papierosy dla rządu Chin w 2005 roku, który dostarczył 32,5 miliarda dolarów zysku z wydatkami na kampanie antynikotynowe, na które przeznaczono zaledwie 31 miliona dolarów, pesymizm ten jest w pełni uzasadniony (18).

W Polsce pali papierosy obecnie około 29% dorosłej populacji, czyli około 9 mln ludzi. Wyniki ogólnopolskich badań ankietowych przeprowadzonych w 2007 roku pokazują, że codziennie pali papierosy ok. 34% mężczyzn i 23% kobiet (1; 19). W ciągu ostatnich 30 lat w Polsce obserwowano stopniowe ograniczenie liczby wypalanych papierosów, jednak w ostatnich latach zaznaczyło się zmniejszenie tempa spadku częstości palenia wśród mężczyzn oraz zahamowanie trendu spadkowego u młodych, dorosłych kobiet. Analizując strukturę populacji osób palących pod kątem wykształcenia i statusu ekonomicznego wynika, że w krajach wysoko rozwiniętych, również w Polsce, ludzie ubodzy i niewykształceni wypalają więcej papierosów w stosunku do ludzi bardziej zamożnych i lepiej wykształconych. Cecha ta jest znacznie silniej zaznaczona wśród mężczyzn. Chociaż koszty nałogu wydają się być dość wysokie, w Polsce jest dwa razy mniej palaczy w grupie osób osiągających wysokie dochody miesięczne (27%), w stosunku do najbiedniejszych (55%) (17; 20; 21). Niepokojącym jest

fakt, że co raz młodsze osoby sięgają i w efekcie uzależniają się od palenia papierosów. Szacuje się, że w Polsce każdego dnia około 500 młodych ludzi rozpoczyna palenie papierosów. Wiek inicjacji nałogu tytoniowego jest nieco odmienny dla obu płci. Ze statystyk przeprowadzonych w 2003 roku wynika, że 64% chłopców i 53% dziewcząt w wieku 13–15 lat i odpowiednio 30% i 21% dzieci przed ukończeniem dziesiątego roku życia podjęło próbę palenia papierosów (1; 20).

Bardzo ważnym i zarazem dramatycznym zjawiskiem okazało się narażenie płodu ludzkiego na wpływ cząstek dymu tytoniowego. Według danych Ośrodka Europejskiego WHO, każdego roku w Polsce rodzi się około sto tysięcy dzieci, narażonych na składniki dymu tytoniowego w trakcie życia płodowego z powodu aktywnego palenia przez kobiety w ciąży. Z pozostałej puli ciężarnych połowa, niebędąca czynnymi palaczkami, narażona jest na bierne wdychanie dymu. Szacuje się, że w Polsce, tylko niespełna połowa palących przed ciążą kobiet, rzuca nałóg w czasie jej trwania (21; 19). Skutkiem narażenia na wdychanie dymu papierosowego dla powstającego płodu jest spowolnienie jego wzrastania, niedorozwój niektórych narządów (np. układu oddechowego), zmniejszona odporność, większa zachorowalność na zapalenia płuc, częstsze występowanie astmy oskrzelowej, a także poporodowe objawy głodu nikotynowego, zwiększona tolerancja nikotyny i łatwość uzależnienia się od nikotyny w przyszłości (1; 21).

### **2.1.3 Bierne palenie tytoniu**

Bierne palenie tytoniu to problem tak poważny, że doczekał się angielskiego terminu naukowego "*second hand smoker*", co dosłownie oznacza "palacz z drugiej ręki" lub *Environmental Tobacco Smoke* (ETS) czyli środowiskowe palenie tytoniu.

Podczas palenia papierosa, w zależności od chwilowej temperatury spalania tytoniu, powstają dwie, jakościowo różne komponenty dymu: strumień główny (MS – *ang. main stream*), powstający w temperaturze 800 – 900°C oraz strumień boczny (SS – *ang. said stream*), który generowany jest w temperaturze ok. 600°C. MS wdychany jest jedynie przez 20-30 sekund w trakcie zaciągania się papierosem. Jest on wciągany ustami palacza, przechodzi przez gęsty filtr włókna szklanego, który wychwytuje większość cząsteczek fazy cząsteczkowej, i trafia do układu oddechowego. SS natomiast, wytwarzany jest w przerwach pomiędzy zaciąganiem się. Niemal w całości jest on wydalany do otaczającego powietrza i

nie jest filtrowany przez filtr papierosowy. MS różni się składem chemicznym od SS wypalanego papierosa głównie ilością cząstek i ich średnicą (ilość cząstek w  $\text{cm}^3$  odpowiednio:  $5 \times 10^9$  vs  $10^5$ - $10^6$  oraz średnica cząstek ( $\mu\text{m}$ ) 0,2 (0,1-1,0) vs 0,5 (0,1-1,5) ) (dane dotyczą palenia papierosów bez filtra) (22).

Palenie bierne jest trzecią po picciu alkoholu i aktywnym paleniu papierosów przyczyną zgonów możliwych do uniknięcia. Głównym miejscem narażenia na bierne wdychanie dymu tytoniowego jest środowisko domowe. Szacuje się, że liczba zgonów spowodowanych ekspozycją na dym tytoniowy w domach jest około dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu do narażenia na ETS jedynie w miejscu pracy. Człowiek niepalący, przebywając godzinę w zadymionym przez palaczy pomieszczeniu, przyswaja taką ilość nitrozoamin, jaka znajduje się w strumieniu głównym papierosów z filtrem. a benzopirenu, tyle, ile pochłonąłby wypalając 4 papierosy. Osoba narażona na codzienne wdychanie dymu tytoniowego ma wyższe o 15% ryzyko zgonu w porównaniu do osoby bez takiej ekspozycji (23).

W zależności od rejonu uprawy, sposobu nawożenia i technologii wytwarzania papierosów, dym zawiera różne, zmienne ilości związków metali ciężkich i pierwiastków radioaktywnych. Trudno więc określić, jaką dawkę promieniowania wdychają bierni palacze. Dwaj amerykańscy lekarze obliczyli, że człowiek palący półtorej paczki papierosów dziennie przez rok napromieniowuje się w dawce odpowiadającej 300 zdjęciom rentgenowskim (24). Tytoń podobnie jak inne rośliny uprawiane na dużą skalę, jest nawożony - na przykład fosfatami zawierającymi uran. W wyniku rozpadu uranu powstają: rad-226, radon-222, ołów-210 i polon-210. Osoby oddychające powietrzem zanieczyszczonym dymem tytoniowym zawsze otrzymują pewną dawkę promieniowania, gdyż co najmniej połowa izotopów promieniotwórczych zawartych w dymie tytoniowym przedostaje się do otoczenia (25).

## **2.2 Dym tytoniowy**

Pojęcie „dym tytoniowy”, obok typowego dymu papierosowego, obejmuje także dym ze spalanych innych produktów tytoniowych: cygar, cygaretek i fajek. Często terminy te stosuje się zamiennie, chociaż ze względu na różne dodatki, skład papierosa zazwyczaj jest o wiele bogatszy w porównaniu do czystego tytoniu.



Dotychczas zidentyfikowano ok. 4300 związków chemicznych wchodzących w skład dymu tytoniowego. Pozostałe kilkaset substancji pozostaje nadal nieznanymi. Pod względem fizycznym dym papierosowy jest aerozolem. W żarzącym się papierosie na skutek gradientu temperatury ma miejsce stan pewnej fizykochemicznej równowagi dynamicznej pomiędzy fazami: gazową i stałą, a fazą, która w normalnych warunkach jest fazą ciekłą. Z tego powodu określa się ją jako fazę stało-ciekłą i ciekło-gazową. Dla uproszczenia można posłużyć się pojęciami: faza gazowa i faza cząsteczkowa, które powstają w strefie żarzenia się wałka tytoniowego przy temperaturze spalania osiągającej 900° Celsjusza (26). Wyróżnia się odpowiednio 400-500 składników chemicznych w fazie gazowej oraz 3500 w fazie cząsteczkowej dymu tytoniowego.

Okolo 70 %, z 500 mg dymu wchłanianego z jednego papierosa przez palacza, stanowi azot z tlenem. Pozostałe 30% to w olbrzymiej większości substancje nieobojętne biologicznie. Okolo 22% z tych substancji stanowią: tlenek węgla, tlenek azotu, cyjanowodór i akroleina, natomiast pozostałe 8% faza cząsteczkowa (26).

Skład chemiczny dymu tytoniowego uzależniony jest m.in. od:

- rodzaju tytoniu (nie tylko jego gatunku, odmiany i jakości, lecz także długości oraz szerokości włókna krajanki tytoniowej);
- temperatury żarzenia (temperatura ma największy wpływ na skład chemiczny dymu. Wzrost temperatury powoduje zwiększenie emisji substancji szkodliwych);
- typu papierosa (obecności ustnika, grubości papierosa, zawartości bibułki barwionej, bądź nie. Liczba oraz skład chemiczny generowanych cząsteczek uzależniony jest od rodzaju opakowania tzw. wałka tytoniowego papierosa. Użycie przepuszczalnych dla powietrza bibulek i filtrów powoduje obniżenie ilości emitowanych substancji szkodliwych);
- sposobu palenia (podczas szybkiego zaciągania się temperatura ognika może przekraczać 900°C. Temperatura spalania tytoniu w fajce osiąga niewiele ponad 600°C);
- wilgotności (suche papierosy emitują okolo dwukrotnie więcej nikotyny w stosunku do wilgotnych);
- dodatków chemicznych.

Struktura cząsteczek dymu tytoniowego, a w szczególności jego fazy cząsteczkowej, jest niezwykle labilna. W wyniku różnych procesów (koagulacji mniejszych cząsteczek w większe, kondensacji z parą wodną, reakcji chemicznych między wolnymi rodnikami poszczególnych cząsteczek) aerozol bardzo szybko zmienia swoje właściwości chemiczne. Zmieniające się wymiary cząsteczek znacznie wpływają na sposób osadzania się ich w filtrze,

a także nabłonku dróg oddechowych. Wraz ze wzrostem masy cząsteczki, zwiększa się zdolność jej osadzania. Dlatego wraz z wydechem najłatwiej wydostają się cząstki najmniejsze. Osadzone na filtrze z włókna szklanego składniki dymu, po odjęciu wody i nikotyny stanowią tzw. suchy kondensat, nazywany smołą. Substancje szkodliwe zawarte w dymie tytoniowym zwyczajowo dzieli się w zależności od sposobu oddziaływania na organizm żywy:

- substancje toksyczne - np.: tlenek węgla, cyjanowodór, amoniak, tlenki azotu;
- substancje drażniące - np.: akroleina, tlenek siarki, amoniak, formaldehyd;
- substancje ciliotoksyczne (blokujące aktywność szeregu enzymów oddechowych, a także ruch rzęsek wyściełających drogi oddechowe) - np.: cyjanowodór, akroleina, aldehyd octowy, formaldehyd;
- kokancerogeny (substancje nie mające właściwości rakotwórczych, lecz wzmacniające ten proces w przypadku obecności śladowych ilości właściwych karcynogenów) - np.: formaldehyd, piren, fluoranten, naftaleny, katechol;
- karcynogeny (substancje bezpośrednio rakotwórcze) - np.: benzen, dwumetylonitrozoamina, etylometylonitrozoamina, dwuetylonitrozoamina, nitrozopirolidyna, hydrazyna, chlorek winylu;
- inicjatory karcynogenezy (substancje odpowiedzialne za wywołanie mutacji DNA komórki.) - np.: toluen, fenol, uretan.

Toksyczne składniki dymu tytoniowego:

#### 1. Alkaloidy:

- nikotyna - ( $C_{10}H_{14}N_2$ ) z fizjologicznego punktu widzenia jest najbardziej czynnym składnikiem dymu tytoniowego. Stanowi ona około 97% wszystkich alkaloidów tytoniu. Zawartość nikotyny w dymie polskich papierosów, wraz z zawartością substancji smolistych, zmniejszała od ok. 3 mg w latach 50-tych do ok. 0,8 mg obecnie. Od dn. 1 stycznia 2004 r. Unia Europejska ustaliła maksymalny limit 1 mg nikotyny na papieros. Od 1 stycznia 2007 r. przepisy te dotyczą również papierosów produkowanych w Unii Europejskiej i eksportowanych do krajów „Trzeciego Świata”. Także w ustawodawstwie Polskim w 2004 roku powstało odpowiednie Rozporządzenie Ministra Zdrowia, które określa dopuszczalną zawartość substancji smolistych, nikotyny i tlenku węgla w dymie papierosowym. Cytując § 2.1: „Zawartość substancji szkodliwych dla zdrowia w dymie papierosowym papierosów

wprowadzanych do obrotu handlowego na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej nie może przekraczać następujących wielkości w przeliczeniu na 1 papieros:

- 1) substancji smolistych - 10 mg;
  - 2) nikotyny - 1 mg;
  - 3) tlenku węgla - 10 mg.” (27)
- nikoteina - stanowi ok. 2% wszystkich alkaloidów tytoniu;
  - nikotamina - stanowi 0,5% wszystkich alkaloidów tytoniu;
  - nikotelina;
  - anabazyna;
  - anatabina;
  - nikotyryna;
  - kotynina - metabolit nikotyny.

## 2. Składniki fazy gazowej:

- tlenek węgla (CO)- dym tytoniowy zawiera od 1 do 5% CO uważanego za jeden ze znanych bardzo niebezpiecznych składników dla organizmu ludzkiego. Duże powinowactwo CO do hemoglobiny powoduje powstanie karboksyhemoglobiny (COHb), która w dużym stopniu obniża skuteczność utlenowania tkanek. U nałogowych palaczy stężenie COHb we krwi dochodzi do 15%, co może prowadzić do niedotlenienia wielu tkanek i narządów wrażliwych na niedobory tlenu (serce, ośrodkowy układ nerwowy);

- tlenki azotu - powstają z azotanu obecnego w surowym tytoniu w trakcie jego spalania. Tlenek azotu (NO) jest wolnym rodnikiem szybko metabolizowany w żywym organizmie, natomiast dwutlenek azotu (NO<sub>2</sub> lub N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) jest trującym gazem, który po przedostaniu się do płuc uszkadza błony wyściełające drogi oddechowe. Aż 99% dwutlenku azotu zatrzymywane jest w płucach. W połączeniu z aminami, tlenki azotu są źródłem rakotwórczych nitrozo amin;

- cyjanowódz - (HCN - związek wodoru, węgla i azotu), potocznie zwany kwasem pruskim. Jego źródłem są białka i aminokwasy pochodzące ze spalanych liści tytoniu. Jest bardzo toksyczny, łatwo wchłanianym przez śluzówki i skórę. Blokują aktywność szeregu enzymów oddechowych, a także ruch rzęsek wyściełających drogi oddechowe, czyli wykazuje działanie ciliotoksyczne;

- akroleina - (aldehyd akrylowy  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ ), czyli propenal o właściwościach szczególnie drażniących. Wraz z aldehydem octowym, formaldehydem i cyjanowodorem stanowi skuteczny czynnik ciliotoksyczny;

- amoniak - ( $\text{NH}_3$ , bezbarwny gaz o ostrym, charakterystycznym zapachu), pochodzi głównie z białek i azotanów liści tytoniowych. Drażni nieprzyjemnie receptory górnych i dolnych dróg oddechowych i razem z akroleiną jest uznany za wyznacznik smakowego odczucia ostrości dymu tytoniowego.

3. Składniki fazy cząstkowej czyli tzw. substancje smoliste – obejmują szereg związków chemicznych:

- węglowodory alifatyczne
- węglowodory aromatyczne (klasyczne kancerogeny: benzo/a/piren, dwubenzo/a,h/antracen)
- fenole i ich estry - np. fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ , hydroksybenzen, o charakterystycznym ostrym zapachu, trujący)
  - katechol
  - kwasy
  - aldehydy - np. akroleina (najprostszy aldehyd alifatyczny nienasycony, ma ostry duszący zapach, działa drażniąco na oczy, jest trucizną wykorzystywaną do produkcji bojowych środków trujących)
- ketony
- alkohole
- estry alifatyczne
- związki azotu i siarki - np. tlenki azotu.

Faza cząstkowa tworzy się w termicznym procesie spalania tytoniu. Na proces ten składają się reakcje i zjawiska fizykochemiczne:

- piroliza - proces degradacji cząsteczki pod wpływem dostatecznie wysokiej temperatury,
- pirosynteza - reakcja chemiczna, w której powstaje związek chemiczny z substancji prostszych na drodze pirolizy,

- utlenianie - oksydacja, procesy chemiczne przebiegające z oddaniem elektronów przez atom lub jon, tzn. ze wzrostem wartościowości dodatniej lub zmniejszeniem wartościowości ujemnej pierwiastka,
- redukcja - procesy chemiczne przebiegające z pobraniem elektronów przez atom lub jon, tzn. ze zmniejszeniem wartościowości dodatniej lub wzrostem wartościowości ujemnej pierwiastka,
  - destylacja - metoda rozdzielania i oczyszczania ciekłych związków chemicznych,
  - sublimacja - parowanie substancji stałych,
  - dekarboksylacja - wyeliminowanie grupy karboksylowej z cząsteczki,
  - dehydratacja - odebranie wody lub wodoru i tlenu w stosunku atomowym 2:1 ze związku chemicznego.

Poza poziomem nikotyny, substancji smolistych i CO w papierosie, ilość innych substancji nie jest regulowana prawnie. Ilość tych związków znacznie różni się pomiędzy dostępnymi markami papierosów (28). W celu zmniejszenia efektów zdrowotnych wywoływanych przez toksyczne związki chemiczne, badacze opracowali katalizatory, na przykład Al-MCM-41, który redukuje wdychaną ilość CO o około 23% i nikotyny o ponad 40%. Struktura takiego katalizatora pozwala na powstawanie przestrzeni, w których długie łańcuchy pewnych związków chemicznych zostają zatrzymane (28).

### **2.3 Efekty zdrowotne narażenia na dym tytoniowy**

Negatywne skutki ekspozycji na dym tytoniowy zostały zauważone zarówno wśród osób aktywnie jak i biernie palących papierosy. Palenie tytoniu jest przyczyną wielu schorzeń. Na europejskiej liście dziesięciu najczęstszych przyczyn ciężkich zachorowań człowieka, palenie tytoniu znajduje się na miejscu drugim. Uważa się je za bezpośredni czynnik rozwoju 12,3% chorób (1).

Dym tytoniowy najczęściej powoduje schorzenia układu oddechowego w związku z koncentracją jego składników w rejonie dróg oddechowych u palaczy. Nie tylko aktywne ale również bierne palenie przyczynia się do wzrostu zachorowalności na choroby dróg oddechowych takich jak: astma oskrzelowa, ostre podrażnienie, czy przewlekłe stany zapalne dróg oddechowych. Rak płuc oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc jest przyczyną wielu

przedwczesnych zgonów. Korelacja zachorowalności na raka płuc i paleniem tytoniu osiąga 90% wśród mężczyzn i 79 % wśród kobiet. Na rozwój tej choroby ma wpływ szereg czynników, m.in. okres palenia tytoniu, intensywność nałogu, głębokość inhalacji dymu, czy rodzaj wypalanych papierosów (zawartość substancji toksycznych oraz obecność filtra).

Innym charakterystycznym efektem palenia tytoniu są zmiany ilości i aktywności komórek śródbłonna i płytek krwi oraz stężeń fibrynogeny i cholesterolu we krwi. Palenie tytoniu jest istotnym czynnikiem rozwoju zmian miażdżycowych i zakrzepowych w naczyniach ośrodkowych i obwodowych, nadciśnienia tętniczego, choroby wieńcowej, zawałów serca i udarów mózgu. Natomiast zaprzestanie palenia zmniejsza ryzyko zawału mięśnia sercowego każdego roku o 50%.

Substancje karcynogenne, będące komponentami dymu tytoniowego takie jak: formaldehyd, N-nitrozoaminy, akroleina, tlenki azotu i WWA: 3-metylocholanren, benzo(a)piren, 7,12-dimetylobenz(a)antracen, są inicjatorami wystąpienia wielu nowotworów: raka żołądka, trzustki, układu moczowego (nerek, pęcherza moczowego), szyjki macicy, jamy ustnej i gardła oraz krtani zwiększając kilka - do kilkunastu razy ryzyko wystąpienia tych chorób w stosunku do osób niepalących (29).

Dym tytoniowy jest również odpowiedzialny za wystąpienie schorzeń w obrębie jamy ustnej, zapalenia dziąseł, rozchwiania zębów, uszkodzenia narządu wzroku (łącznie z jaskrą, zmętnieniem soczewek, czy rozwojem zaćmy) oraz zmian dermatologicznych (szarzenie skóry, zażółcenie palców i paznokci) (29).

### **2.3.1 Wpływ dymu tytoniowego na organizm kobiety**

Relatywnie niewiele kobiet zdaje sobie sprawę ze specyficznych dla nich zagrożeń zdrowotnych związanych z paleniem tytoniu tj. raka szyjki macicy, przedwczesnej menopauzy, poszarzałej, przedwcześnie postarzałej cery wynikającej z zaburzenia produkcji estrogenów odpowiedzialnych są za odpowiednie nawilżenie skóry. Kobieta paląca papierosy jest bardziej narażona na wystąpienie nowotworów głowy i szyi w stosunku do mężczyzny. Uważa się, że odpowiednio 75 % i 45 % przypadków tych nowotworów jest związanych z nałogiem palenia (30).

Szkodliwe działanie dymu tytoniowego na płodność i rozrodczość jest wielokierunkowe. Palenie tytoniu wpływa wydzielanie hormonów płciowych kobiety a przez

to na cykl miesięczkowy, który staje się zwykle krótszy i znacznie mniej regularny (31). Bolesne miesiączkowanie czyli dysmenorrhea, także występuje dwa razy częściej u palaczek. Składniki dymu uszkadzają pęcherzyki jajnikowe, upośledzają dojrzewanie i żywotność oocytów przyspieszając ich zanik oraz zaburzają owulację co powoduje upośledzenie funkcji rozrodczych. Wśród palaczek tytoniu, wraz z ilością wypalanych papierosów, zwiększa się ryzyko wystąpienia ciąży pozamacicznej. Przyczyny upatruje się tu w niewydolności rzęsek i perystaltyki jajowodu. Następuje upośledzenie transportu blastocysty i opóźnienie zagnieżdżenia jaja płodowego w jamie macicy (32; 31; 33).

Obok wspomnianych powyżej niekorzystnych zdrowotnych zjawisk związanych z paleniem tytoniu, znane są pozytywne np. mniejsza o połowę zachorowalność na raka endometrium oraz mniejsza częstość występowania gładkokomórkowych mięśniaków macicy. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z zaburzeniami hormonalnymi powodowanymi przez nikotynę (32).

### **2.3.2 Wpływ dymu tytoniowego na rozwój ciąży**

Faktem jest, że w ciągu ostatnich dwóch dekad na nowo wzrosła konsumpcja wyrobów tytoniowych wśród młodych, wykształconych kobiet, szczególnie dbających o swoje zdrowie i urodę. Fakt palenia tytoniu przez młodą kobietę dotyczy nie tylko jej samej, ale również jej przyszłego potomstwa. Pomimo dobrze udokumentowanych efektów ubocznych palenia tytoniu, nałóg ten wciąż pozostaje bardzo popularnym również wśród kobiet ciężarnych. W przeprowadzanych badaniach ankietowych około 15 - 20% ciężarnych przyznaje się do aktywnego palenia papierosów (34) natomiast około 30% niepalących ciężarnych jest narażonych na bierne wdychanie dymu. Szacuje się, że w rzeczywistości problem ten jest jeszcze częstszy. Według danych Ośrodka Europejskiego Światowej Organizacji Zdrowia w Polsce ok. 20-30% kobiet pali papierosy w czasie ciąży, a połowa niebędących czynnymi palaczkami narażona jest na bierne wdychanie dymu (35). Szacuje się, że tylko co trzecia kobieta paląca w Polsce rzuca nałóg w czasie ciąży (21; 36).

Alkaloidy dymu tytoniowego zmniejszają produkcję progesteronu, który odgrywa kluczową rolę w podtrzymaniu ciąży. Ryzyko wystąpienia wczesnych poronień genetycznie zdrowych zarodków u kobiet palących jest 1,5 do 2 razy większe. Sugerowanym mechanizmem zwiększonego ogólnego odsetka poronień jest uszkadzające działanie

składników dymu na płód.

Pomimo tego w Polsce każdego roku rodzi się ponad 100 tys. dzieci, które podczas pierwszych dziewięć miesięcy życia są narażone na działanie setek niszczących zdrowie związków chemicznych zawartych w dymie tytoniowym.

Palenie papierosów w trakcie ciąży wiąże się z rozwojem wielu powikłań ciążowych. Łożysko przodujące spotyka się w tej grupie ok. dwa razy częściej i jest to związane najprawdopodobniej z przewlekłym niedotlenieniem mięśnia macicy. Przedwczesne oddzielenie się łożyska prawidłowo usadowionego częściej obserwuje się wśród kobiet, które paliły papierosy przez całą ciążę w porównaniu do tych, które rzuciły nałóg w czasie jej trwania. Do oddzielenia łożyska przed terminem może prowadzić ostre niedotlenienie związane z obecnością karboksyhemoglobiny oraz zwężeniem naczyń. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych w ciąży niedonoszonej (PPROM) jest powikłaniem również częściej spotykanym u kobiet palących wyroby tytoniowe w czasie ciąży. Gorszy stan odżywienia palących kobiet w ciąży, zaburzony metabolizm białek oraz obniżone poziomy aminokwasów, witaminy B<sub>12</sub> i witaminy C, a także obniżona odporność maciczna zwiększa podatność na infekcje dróg rodnych będące czynnikiem ryzyka PPRM (37; 38). W krajach rozwiniętych papierosy są najważniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR). Na wczesnym etapie ciąży nikotyna zaburza prawidłowy proces placentacji łożyska a następnie przenikając przez nie, powoduje uwalnianie adrenaliny, noradrenaliny i acetylocholino w zwojach układu wegetatywnego i rdzeniu nadnerczy. Substancje te obkurczają naczynia maciczne doprowadzające krew do łożyska w wyniku czego całkowity przepływ krwi w przestrzeni międzykosmkowej zmniejsza się o około 20%, ograniczona zostaje wymiana tlenu i substancji odżywczych. Palenie tytoniu powoduje także podwyższenie stężenia we krwi cyjanków, tiocyjanków, blokujących wiele enzymów cyklu oddechowego oraz unieczynnienie anhidrazy węglanowej zawartej w erytrocytach. Upośledzona zostaje zdolność krwi do przenoszenia gazów, co wzmaga niedotlenienie, a wynikiem tego są podwyższone poziomy wykładników stresu oksydacyjnego (39). Efektem powyższych mechanizmów jest częstsze występowanie u ciężarnych palących i narażonych na wdychanie dymu tytoniowego IUGR (40; 37).

Spalanie tytoniu w czasie ciąży jest czynnikiem ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego. Jeden papieros wypalany na dzień przeciętnie prowadzi do skrócenia czasu trwania ciąży o ok. 0,05 tygodnia, co stanowi 3,5 dnia u kobiet wypalających 10 papierosów



dziennie. Zaprzestanie palenia w czasie ciąży zmniejsza ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego do obserwowanego u kobiet niepalących. Wpływ palenia tytoniu na skrócenie czasu ciąży może wynikać z występowania częstszych krwawień z dróg rodnych, przodowania lub przedwczesnego oddzielenia się łożyska oraz przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Zwiększony poziom katecholamin w łożysku naczyniowym ciężarnej oraz skurcz naczyń krwionośnych może zapoczątkować poród (41; 37).

W przeprowadzonych dotychczas badaniach epidemiologicznych wykazano dodatnią korelację pomiędzy paleniem papierosów w ciąży a liczbą martwych urodzeń. Ryzyko urodzenia martwego płodu zmniejszało się wraz z wydłużeniem czasu trwania ciąży a zwiększało wraz z liczbą wypalanych papierosów. Za wystąpienie obumarcia wewnątrzmacicznego płodu obwinia się głównie zahamowanie wzrastania płodu i nieprawidłowości łożyska (41).

Wyniki badań określających wpływ palenia na rozwój wad płodu nie są jednoznaczne. W większości badań nie odnotowano zwiększonego odsetka wad wrodzonych u dzieci pochodzących od matek palących tytoń, jednak trzeba pamiętać o częściej występujących poronieniach samoistnych i obumarciach płodów w tej grupie, czyli możliwości występowania zjawiska selekcji naturalnej płodów nieprawidłowych. Sugerowanymi nieprawidłowościami rozwojowymi związanymi z paleniem tytoniu przez matkę są rozszczep wargi bez lub z rozszczepem podniebienia, wady rozwojowe ośrodkowego układu nerwowego oraz mikrocefalię. Nie odnotowano zależności między paleniem w czasie ciąży a zwiększonym ryzykiem wystąpienia: bezmózgowia, rozszczepu kręgosłupa i przepukliny mózgowej, wrodzonych wad rozwojowych układu moczowo – płciowego i układu krążenia oraz zespołu Downa (43).

Zaskakującym jest fakt, potwierdzony w wielu badaniach epidemiologicznych, że palenie papierosów zmniejsza ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego (PIH) oraz stanu przedrzucawkowego (PE) (44). Składniki dymu tytoniowego wpływają na stężenie czynników angiogennych we krwi ciężarnej i tkance łożyskowej w sposób odwrotny niż dzieje się to podczas rozwoju stanu przedrzucawkowego. U osób palących wyroby tytoniowe poziom sFlt-1 (rozpuszczalnej formy receptora dla naczyniowego czynnika wzrostu VEGFR-1, który jest syntetyzowany i uwalniany przez komórki nabłonkowe w łożysku) w surowicy krwi obniża się w stopniu zależnym od dawki, natomiast poziom PlGF (łożyskowego czynnika wzrostu) nie zmienia się (45; 46).

Palenie papierosów w okresie karmienia piersią wiąże się ze zmniejszoną ilością

produkowanego mleka oraz krótszym czasem laktacji. W badaniach prowadzonych w różnych krajach wykazano, że matki spożywające tytoń znacznie rzadziej decydują się na kontynuowanie laktacji w stosunku do kobiet niepalących. Składniki dymu tytoniowego negatywnie wpływają na podtrzymywanie produkcji mleka. Palenie tytoniu w okresie połogu i laktacji jest również związane z częstszymi ostrzejszymi epizodami depresyjnym i po porodzie (47).

### **2.3.3 Wpływ dymu tytoniowego na stan noworodka**

Dziecko kobiety palącej papierosy w czasie ciąży rodzi się zwykle mniejsze i bardziej podatne na choroby wieku niemowlęcego i wczesnodziecięcego w porównaniu z dziećmi, których mamy nie palą. Najbardziej negatywnie na rozwój płodu szczególnie niekorzystnie wpływa palenie w okresie 2 ostatnich miesięcy ciąży. Palenie przez matkę znacznie zwiększa ryzyko wczesnej śmierci noworodka oraz zespołu nagłej śmierci niemowlęcia (SIDS), który jest definiowany jako zgon dziecka między czwartym tygodniem a pierwszym rokiem życia bez uchwytej przyczyny. SIDS jest trzecią co do częstości przyczyną zgonów dzieci w tej grupie wiekowej (37). Wystąpienie SIDS związane jest z ilością wypalanych papierosów w obecności dziecka. Paląca tytoń matka w okresie laktacji przekazuje swemu dziecku z pokarmem nikotynę, która wywołuje u dziecka okresy niepokoju, bezsenność, wymioty, biegunki, a także нефизjologiczne przyspieszenie pracy serca i zaburzenia krążenia. Niemowlęta wdychające dym z papierosów wypalanych przez ich rodziców, dwa razy częściej zapadają na poważne choroby układu oddechowego (zapalenia płuc, oskrzeli, górnych dróg oddechowych). Poza tym palenie papierosów przez rodziców w istotny sposób zwiększa ryzyko wystąpienia astmy oskrzelowej u dziecka, a także przewlekłego zapalenia ucha środkowego, szczególnie przed skończonym drugim rokiem życia. Jest ono główną przyczyną głuchoty w wieku dziecięcym. Istnieją także dowody na rozwój zaburzeń neurologicznych i behawioralnych u dzieci narażonych na ETS, trudności w skupieniu uwagi u dzieci w wieku szkolnym, częstsze problemy z zachowaniem oraz gorsze wyniki w nauce. Udowodniono także związek palenia tytoniu z innymi poważnymi chorobami, np. białaczkami i guzami mózgu (33).

Palenie przez kobietę podczas ciąży prowadzi do kontaktu rozwijającego się mózgu nienarodzonego dziecka z nikotyną. Dlatego po porodzie u dziecka mogą wystąpić objawy

głodu nikotynowego takie jak u palaczy na odwyku. U noworodków mogą więc wystąpić objawy abstynencyjne: zwiększona płaczliwość, niepokój, zaburzenia snu i funkcji przewodu pokarmowego. Będą się one także charakteryzowały zwiększoną tolerancją nikotyny do końca życia, dlatego w przyszłości łatwiej same zaczną palić i uzależnią się od nikotyny. Niemalże wpływ na podjęcie palenia w przyszłości ma również mieszkanie oraz częste przebywanie z osobami dorosłymi uzależnionymi od tytoniu.

## 2.4 Stres oksydacyjny

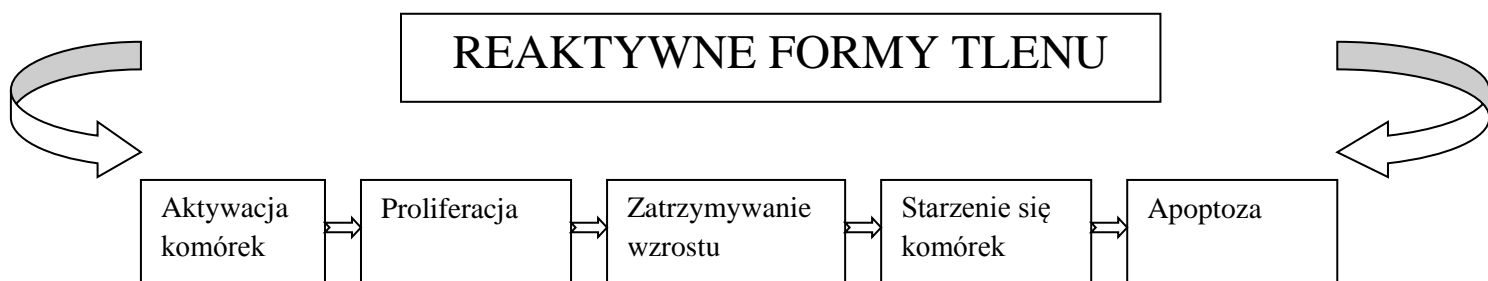
Zasada funkcjonowania układu żywego, rozumianego jako komórka, narząd czy cały organizm, opiera się na wypracowaniu pewnego stanu homeostazy procesów metabolicznych i oksydacyjnych (48). Równowaga ta może zostać zaburzona poprzez nieproporcjonalną produkcję tzw. reaktywnych form tlenu (RFT) czyli cząstek chemicznych zawierających atomy tlenu z niesparowanym elektronem, który czyni je niezwykle reaktywnymi.

RFT są wolnymi rodnikami i nadtlenkami a także innymi, mniej reaktywnymi cząstkami (np. ponadtlenkami), które mogą zostać zredukowane przez tzw. reduktory (np. chinony) do bardziej agresywnych form powodujących znaczne uszkodzenia w komórce. RFT można podzielić na te będące wolnymi rodnikami np. rodnik wodoronadtlenkowy ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), rodnik hydroksylowy ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), rodnik alkoksylowy ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), rodnik nadtlenkowy ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), tlenek azotu ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}^{2-\bullet}$ ) oraz na te nie będące wolnymi rodnikami czyli cząstki nie posiadające niesparowanego elektronu np. nadtlenki organiczne (ROOR), tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ) i nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (49).

W organizmie żywym odbywa się ciągła produkcja i eliminacja RFT. Najwięcej RFT powstaje w mitochondriach jako produkty uboczne szeregu reakcji łańcucha oddechowego podczas enzymatycznej redukcji tlenu atmosferycznego do cząsteczki wody. Produkcja RFT pobudzana jest przez działanie niektórych czynników zewnętrznych takich jak promieniowanie widzialne, słoneczne i jonizujące a także przez ultradźwięki, wysokie temperatury, niektóre substancje wdychane z powietrzem (np. składniki dymu papierosowego, tlenki azotu, ozon) oraz ksenobiotyki (środki ochrony roślin, konserwanty) (50; 51). Wolne rodniki bardzo łatwo wchodzi w reakcje chemiczne, w wyniku których dochodzi do utleniania różnych związków prowadząc do zmiany ich budowy oraz funkcji. Sumaryczny wpływ wolnych rodników tlenowych zależy w dużym stopniu od ich stężenia

oraz czasu oddziaływania. Zbyt intensywna produkcja lub niedostateczna eliminacja reaktywnych cząsteczek działa cytotoksycznie zarówno na poziomie molekularnym jak i na poziomie organelli komórkowych, prowadząc do destrukcji komórki. Dysharmonia i naruszenie równowagi pomiędzy działaniem RFT a biologiczną zdolnością organizmu do szybkiej ich detoksykacji lub naprawy wyrządzonych szkód, określono mianem „stresu oksydacyjnego”.

W warunkach fizjologicznych RFT uwalniane są w organizmie w ilościach bezpiecznych, regulują przebieg wielu procesów komórkowych, indukują różnicowanie się i apoptozę komórek. RFT wpływają na przebieg reakcji zapalnej poprzez aktywację limfocytów T oraz zwiększanie adhezji i przepuszczalności ścian naczyń włosowatych dla komórek leukocytarnych do miejsca reakcji zapalnej (48). Jedną z bardziej istotnych funkcji RFT jest regulacja procesów przekazywania sygnałów w obrębie oraz między komórkami (52). Komórki fagocytyczne (granulocyty, monocyty i makrofagi) wykorzystują wolne rodniki tlenowe w procesie eliminacji patogenów, tzw. reakcji "wybuchu tlenowego". Dochodzi wówczas do indukcji ekspresji cyklooksygenazy typu 2 w makrofagach a przez to do aktywacji ich potencjału zapalnego (53). RFT biorą także udział w szeregu zjawisk związanych z różnicowaniem się, starzeniem i eliminacją komórek decydując o ich śmierci lub przeżyciu. Losy komórki zależą od natężenia procesów redukcyjnych. Niższe stężenia RFT pobudzają komórki do różnicowania się, umożliwiają jej przystosowanie do zmieniających się warunków. Ekspozycja na wyższe stężenia wolnych rodników wprowadza komórkę na drogę apoptozy. Proces ten pozwala na eliminację komórek, które uległy dużemu uszkodzeniu i mogłyby stanowić zagrożenie dla funkcjonowania organizmu prowadząc do rozwoju choroby (54).



Rycina 2. Wpływ RFT na działanie komórki

Uszkodzeniu oksydacyjnemu ulega wiele związków, składowych komórki: tłuszcze, białka, kwasy nukleinowe oraz węglowodory.

Peroksydacja lipidów jest wolnorodnikową reakcją utleniania jedno- lub wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz innych lipidów w formie reakcji łańcuchowej. Reakcja taka składa się z trzech etapów: inicjacji, prolongacji i terminacji. Na początku pojedynczy atom wodoru zostaje odcepiony od wielonienasyconego kwasu tłuszczowego poprzez rodnik tlenowy lub organiczny, kompleks żelaza dwu- lub trójwartościowego, tlenek azotu albo tlenek siarki. W wyniku takiej reakcji powstaje rodnik alkilowy reagujący z tlenem przekształcając się w wolny rodnik nadtlenkowy, który posiada zdolność wielokrotnego odrywania atomów wodoru od następnych cząsteczek kwasów tłuszczowych promując, czyli rozszerzając przebieg reakcji. Gdy dwa podobne rodniki zareagują ze sobą dochodzi do zakończenia, czyli terminacji reakcji. Efektem biologicznym peroksydacji lipidów jest zmiana właściwości fizycznych błon komórkowych polegająca na zahamowaniu aktywności zarówno przekaźników błonowych jak i białek transportujących (55; 56).

Oksydacyjne uszkodzenie białek prowadzi do zmian w ich strukturze co może powodować znaczną zmianę ich aktywności i funkcji biologicznych. Na przykład uszkodzenie wolnorodnikowe białek obecnych w błonie komórkowej zaburza funkcje przekaźników białkowych, białek antygenowych i receptorów błonowych a uszkodzenie enzymów, utratę ich aktywności. Za oksydacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych, odpowiedzialne są przede wszystkim  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a także wolne rodniki azotowe (WRA), szczególnie  $\text{ONOO}^-$  (anion kwasu azotowego III). Aktywność utleniająca tych rodników może prowadzić do tworzenia mostków disiarczkowych, wiązań krzyżowych oraz grup karbonylowych a także do fragmentacji białek (57; 58; 59; 60; 61). RFT mogą indukować peroksydację białek i powstawanie ich nadtlenków (57). Poza utlenianiem aminokwasów, RFT wykazują również utleniające działanie w stosunku do niebiałkowych składników w cząsteczkach białka np. węglowodanów czy jonów metali, co często prowadzi do zaburzenia jego funkcji biologicznych np. utraty aktywności enzymatycznej, np. takich enzymów jak dehydrogenaza glicerolaldehidofosforanowa czy dehydrogenazaglukozo-6-fosforanowa (62; 63). Dobrze zostały poznane skutki wolnorodnikowego uszkodzenia białek w przypadku alfa-1-antyproteinazy, w rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc u palaczy papierosów oraz reumatoidalnego zapalenia stawów (48). Zmienione oksydacyjnie białka mogą tworzyć

agregaty odporne na degradację, co przy zmniejszonej wydajności działania mechanizmów naprawczych sprzyja gromadzeniu się zmienionych białek w komórkach i prowadzi do stopniowej utraty biochemicznych i fizjologicznych funkcji komórki (58; 63). Zmodyfikowane oksydacyjnie białka wykryto w licznych tkankach i wykazano, że odgrywają rolę w patogenezie wielu schorzeń, w tym w rozwoju choroby nowotworowej (49).

Kwasy nukleinowe, w przeciwieństwie do białek i lipidów charakteryzują się mniejszą wrażliwością na działanie RFT. Niemniej reakcje rodnika hydroksylowego oraz tlenu singletonowego z kwasami nukleinowymi mogą skutkować uszkodzeniem zasad purynowych i pirymidynowych, reszt cukrowych oraz rozerwaniem wiązań fosfodiesterowych łączących obie nici DNA. (48; 56).

Najważniejszymi skutkami naruszenia równowagi oksydacyjnej w organizmie są: dezaktywacja niektórych białek funkcjonalnych, wzmożony katabolizm nukleotydów adeninowych, uszkodzenie nici DNA, przyspieszenie peroksydacji lipidów, uszkodzenie mitochondriów, obniżenie poziomu ATP i glutationu, zaburzenie wewnątrzkomórkowej gospodarki wapniem ( $\text{Ca}^{2+}$ ), wzmożenie przepuszczalności i depolaryzacji błony komórkowej, a także rozpad krwinek czerwonych i zmiany własności antygenowych komórek (48).

Organizm żywy dysponuje szeregiem mechanizmów chroniących go przed atakiem strumienia wolnych rodników. Kompleksowy system obrony organizmów tlenowych przed niekorzystnym działaniem RFT został nazwany barierą antyoksydacyjną (BA) w skład której wchodzi enzymy oraz układy nieenzymatyczne.

1. Enzymy stanowiące BA katalizują reakcje dezaktywacji wolnych rodników tlenowych. Najważniejsze z nich to:

- dysmutaza ponadtlenkowa - katalizująca reakcje dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (rozdziela się trzy jej formy z różnymi jonami w centrach aktywnych: cytoplazmatyczną, mitochondrialną i pozakomórkową)
- peroksydaza glutationowa - dezaktywuje nadtlenek wodoru poddając go reakcji z glutationem
- reduktaza glutationu - katalizuje przemianę disulfidu glutationu w glutation kosztem utleniania NADPH (fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego)
- katalaza - rozkłada nadtlenek wodoru do cząsteczek wody.

Rzadziej wymieniane są enzymy utrzymujące niskocząsteczkowe antyoksydanty w formie zredukowanej, takie jak reduktaza glutationowa, reduktaza tioredoksyny oraz układ

dostarczający NADPH, który jest niezbędny w cyklu redoks glutationu (48). Istotne znaczenie mają także białka wiążące jony metali żelaza i miedzi, takie jak transferryna, laktoferryna (szczególnie aktywna w mleku), ceruloplazmina, metalotioneina, albumina i haptoglobina.

2. Jony metali przejściowych niezbędne do pracy niektórych enzymów:

- dysmutazy nadtlenkowej występującej w dwóch formach: cytoplazmatycznej wymagającej obecności cynku i miedzi oraz mitochondrialnej wymagającej manganu,

- katalazy zawierającej żelazo

- peroksydazy glutationowej współdziałającej z selenem.

3. Nieenzymatyczne składniki BA są substancjami antyoksydacyjnymi najczęściej dostarczonymi z pożywieniem. Substancje te mogą być jednokrotnego użytku, bądź też organizm może posiadać zdolność samodzielnej regeneracji ich postaci zredukowanych. Składniki te możemy podzielić ze względu na rozpuszczalność: w tłuszczach (hydrofobowe) oraz rozpuszczalne w wodzie (hydrofilowe).

Antyoksydanty rozpuszczalne w tłuszczach:

- alfa-tokoferol (witamina E)

- beta-karoten i trans – retinol (prowitamina i witamina A)

- koenzym Q (ubihydrochinon)

- cholesterol i jego pochodne (prowitamina i witamina D3)

- pochodne estronu i estradiolu żeńskie hormony płciowe.

Antyoksydanty rozpuszczalne w wodzie:

- witamina C (askorbinian)

- glutation

- cysteina

- kwas moczowy

- kreatynina

- neopteryna.

Stopień aktywności potencjału redukcyjnego systemu obrony antyoksydacyjnej w niwelowaniu RFT i unieczynnieniu czynników utleniających jest trudny do zmierzenia ze względu na bardzo krótki okres półtrwania wolnych rodników. Jedyną metodą umożliwiającą pomiar ich jest elektronowy rezonans spinowy. Dlatego w celu oceny sprawności potencjału antyoksydacyjnego organizmów wykorzystuje się ustalone metody analityczne np. oznaczenie stężenia poszczególnych antyoksydantów (np. witamin E, A, C i koenzymu Q10) lub

aktywności poszczególnych enzymów (np. peroksydazy glutationu i dysmutazy nadtlenkowej w surowicy). Pośrednim wskaźnikiem jest również stężenie dialdehydu malonowego (MDA) - końcowego produktu peroksydacji lipidów. Więcej informacji dostarcza jednak znajomość całkowitej zdolności zmiatania rodników przez dany układ biologiczny. Okazuje się, że współdziałanie między różnymi antyoksydantami daje większy potencjał antyoksydacyjny w porównaniu do związków tych działających osobno. Jako przykład wymienić tu można synergizm glutationu regenerującego kwas askorbinowy czy askorbinianu regenerującego  $\alpha$ -tokoferol. Z drugiej strony, niektóre antyoksydanty mogą reagować między sobą wzajemnie znosząc swoje działanie.

Inną metodą jest pomiar stężenia produktów wolnorodnikowych uszkodzeń białek (64), lipidów (65) czy DNA (66). Parametrami określającymi sumarycznie status antyoksydacyjny ustroju jest całkowita zdolność przeciwutleniająca - TRAP rozumiana jako wypadkowa zdolność antyoksydacyjna badanej próbki do przeciwdziałania określonego ładunku utleniającego (67).

#### **2.4.1 Stres oksydacyjny - wywoływane patologie**

W miarę rozwoju badań nad mechanizmami stresu oksydacyjnego, lista jednostek chorobowych, w których patogenezie udowodniono sprawczy, negatywny wpływ RFT wciąż się wydłuża. Wymienia się tu szereg chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera i choroba Huntingtona. Uważa się, że rozwój choroby sercowo-naczyniowej także jest powiązany z reakcjami stresu oksydacyjnego, gdzie wobec utleniania cholesterolu LDL w śródbłonku naczyniowym dochodzi do powstania prekursorów blaszki miażdżycowej. Stres oksydacyjny ma także znaczenie w uszkodzeniach związanych z kaskadą ischemiczną powstającą w wyniku reperfuzji następującej po hipoksji (68). Taka kaskada występuje zarówno w przypadku udaru mózgu jak i zawału serca. Pojawia się wciąż coraz więcej danych wskazujących na sprawczą rolę RFT w procesie transformacji nowotworowej komórek (56). Elementem zapoczątkowującym procesy nowotworowe mogą być modyfikacje DNA spowodowane utleniającym działaniem RFT (69). W tkance nowotworowej stwierdzono podwyższony poziom zmodyfikowanych zasad w porównaniu do zdrowych tkanek. Istnieje teoria, że takie zmiany w DNA są czynnikiem sprzyjającym złośliwieniu guza, a także wzmagającym potencjał przerzutowania (70). Mechanizmy



odpowiedzialne za indukcję procesu nowotworzenia nie są jeszcze do końca wyjaśnione. Wiadomo, że obok mutacji w komórkowym DNA, obejmują one szereg innych procesów m.in. rozwój stanu zapalnego, działanie cytokin, zmiany sygnałów onkogennych, intensywną proliferację i metabolizm komórek, mutacje w DNA mitochondrialnym i dysfunkcje w łańcuchu oddechowym. Wolne rodniki utleniają lipidy błon komórkowych warstwy skóry, białka strukturalne, zwłaszcza kolagen oraz białka enzymatyczne. Skutkiem jest osłabienie włókien kolagenu oraz zaburzenia jego wytwarzania, służące odtwarzaniu skóry oraz wzmacnianiu wielu innych tkanek i narządów. Zaburzenia w wytwarzaniu kolagenu powodują wolniejsze gojenie się ran, przyspieszony zanik tkanki skórnej i tworzenie się zmarszczek (68).

*Tabela 1. Choroby, w których etiopatogenezie postulowano udział RFT (wg Bartosza) (48)*

<b>Choroby, w których etiopatogenezie postulowano udział RFT</b>		
AIDS	Hemochromatoza samoistna	Rozedma płuc
Alkaptonuria	Jaskra	Schizofrenia
Anemia Fanconiego	Kardiomiopatia	Stan przedrzucawkowy
Anemia sierpowata	Kontaktowe zapalenie skóry	Stwardnienie rozsiane
Astma	Kwashiorkor	Talasemia
Choroba alkoholowa	Martwicze zapalenie jelit	Toczeń rumieniowaty
Choroba Alzheimerera	Miażdżyca	Zaćma
Choroba niedokrwienna serca	Nadczynność tarczycy	Zapalenie kłębków nerkowych
Choroba Parkinsona	Niedobór witaminy E	Zapalenie naczyń krwionośnych
Choroba popromienna	Nowotwory	Zapalenie opon mózgowych
Choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy	Oparzenia	Zatrucia chlorowcoalkanami, endotoksynami bakteryjnymi, metalami ciężkimi
Choroby autoimmunologiczne	Ostre zapalenie trzustki	Zawał serca
Cukrzyca	Porfiria	Zespół błon szklistych
Dystrofia mięśniowa	Retinopatia wcześniacza	Zespół Downa
Dysplazja oskrzelowo – płucna	Retinopatie	Zespoły starzenia się
Grypa	RZS	

## 2.4.2 Stres oksydacyjny w czasie ciąży

W przebiegu ciąży fizjologicznej, wszystkie tkanki i narządy rozwijającego się płodu, wymagają dostarczenia dużych ilości tlenu (71). RFT, generowane zarówno w organizmie matki, jak i płodu, promują replikację, różnicowanie i dojrzewanie powstających komórek (72). RFT działają dwukierunkowo, z jednej strony odpowiednia ich podaż jest niezbędna dla prawidłowej implantacji i rozwoju zarodka, obrony przeciwko matczynom infekcjom, prawidłowej steroidogenezy, z drugiej strony, niekontrolowana produkcja RFT może prowadzić do resorpcji zarodków na wczesnym etapie rozwoju, embriopatii, rozwoju stanu przedrzucawkowego, zwyrodnienia łożyska komplikującego wymianę matczyno-płodową i skutkującą zahamowaniem wzrastania płodu, porodu przedwczesnego i niskiej masy urodzeniowej dziecka. W pierwszym trymestrze prawidłowo rozwijającej się ciąży obserwuje się nasilenie procesów oksydacyjnych, później, dalsze stopniowe nasilenie reakcji stresu oksydacyjnego, które związane jest z intensyfikacją peroksydacji lipidów oraz intensywną produkcją wolnych rodników w mitochondriach (72; 71).

Żywieniowe i środowiskowe czynniki mogą się przyczyniać do powstawania wspomnianych powikłań ciąży i zwiększać podatność potomstwa na choroby. Unikanie dymu tytoniowego w czasie ciąży i laktacji ma istotne znaczenie w aspekcie zapobiegania niekorzystnemu wpływowi RFT na rozwijający się organizm w okresie pre- i postnatalnym (73; 71).

Jednoczesne palenie papierosów lub narażenie na wdychanie dymu tytoniowego powoduje dodatkowy wzrost procesów wolnorodnikowych, powodujących zmiany sygnalizacji wewnątrz i międzykomórkowej oraz uszkodzenie makrocząsteczka także obniżenie aktywności niektórych antyoksydantów we krwi (74). Przeprowadzona analiza zawartości markerów stresu oksydacyjnego w wydychanym powietrzu u ciężarnych i noworodków wykazała dodatnią korelację w stosunku do ilości wypalanych przez matkę papierosów (75). Wykazano wyższe stężenie produktów peroksydacji lipidów oraz niższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych i nieenzymatycznych antyoksydantów w łożyskach i krwi pępowinowej u palaczek tytoniu w porównaniu do kobiet niepalących (73; 76). W limfocytach noworodków palących matek stwierdza się nasilone uszkodzenia oksydacyjne DNA, proporcjonalne do liczby dziennie wypalanych papierosów oraz czasu ekspozycji (77).

Uszkodzenia oksydacyjne dotyczą również pokarmu kobiecego w okresie laktacji.

Wykazano niższe stężenia witaminy A i E oraz, mniejszą sumaryczną zdolność antyoksydacyjną mleka matek palących papierosy w stosunku do mleka kobiet niepalących (78).

### 2.4.3 Stres oksydacyjny a palenie papierosów

Dym tytoniowy zawiera szereg RFT, które odpowiedzialne są za nasilenie stresu oksydacyjnego i wystąpienie zmian patologicznych w organizmie. W surowicy osób palących papierosy obserwuje się podwyższony poziom produktów oksydacyjnego uszkodzenia białek, lipidów i DNA oraz obniżoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz nieenzymatycznych antyoksydantów, w wyniku czego zostaje upośledzona wydolność BA układu (32). Udowodniono istnienie wielu RFT fazy gazowej i frakcji smolistej dymu tytoniowego (79). Ocenia się, że w jednej porcji wdychanego przez palacza dymu znajduje się aż 1015 cząsteczek RFT. Większość rodników frakcji smolistej dymu stanowią rodniki semichinonowe (QH•), pozostające w równowadze z rodnikami chinonowymi (Q) i hydrochinonowymi (QH<sub>2</sub>). Substancje zawarte we frakcji smolistej mogą ulegać procesowi samoutleniania. W fazie gazowej dymu tytoniowego przeważają rodniki o czasie przeżycia krótszym niż 5 min. Wymienia się tu rodniki tlenowe, takie jak rodnik hydroksylowy (OH•), anionorodnik ponadtlenny (O<sub>2</sub>-•) oraz rodnik wodoronadtlenkowy (HO<sub>2</sub>•). W dymie papierosowym występuje również nadtlenny wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), który jest prekursorem powstawania reaktywnego rodnika hydroksylowego, posiadający zdolność utleniania jonów metali przejściowych, a także grup tiolowych białek i związków niskocząsteczkowych. W organizmie żywym stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utrzymywane jest na bardzo niskim poziomie dzięki aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej (79). Rodniki tlenowe fazy gazowej szybko wchodzi w reakcje z innymi substancjami znajdującymi się w dymie np. węglowodorami, tworząc rodniki alkilowe (R•) oraz alkoksyłowe (RO•). W dymie papierosowym obecny jest także tlenek azotu (II), który nie należy do wysoko reaktywnych rodników tlenowych. Źródłem tlenku azotu (II) są aminy oraz nadtlenoazotan (III) (O=N-OO-). Tlenek azotu (II) w niewielkich ilościach może powodować przerwanie wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast w większych stężeniach tworzy niebezpieczne rodniki nadtlenne i alkoksyłowe. Ma on zdolność tworzenia bardzo reaktywnych nitrozo węglowych rodników alkilowych (RCH•-CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>) oraz

nadtlenoazotynów (ONOO-), bezpośrednio uszkadzający mitochondria (80).

Organizm osoby narażonej na wdychanie dymu papierosowego stopniowo wytwarza mechanizmy adaptujące do reakcji ze składnikami dymu tytoniowego, które chronią go przed skutkami toksycznego działania dymu. Broniący się przed atakiem RFT organizm uwalnia większą ilość antyoksydantów, które częściowo niwelują utleniające właściwości RFT (80).

## **2.5 Metody określenia narażenia na dym tytoniowy**

### **2.5.1 Kwestionariusz ankiety**

Ankieta jest najprostszą metodą pozyskiwania informacji o nałogu i nawykach palenia tytoniu. Wnioski wyciągane na podstawie ankiety opierają się na samoocenie badanego. Tego typu badanie może zawierać wiele nieprawidłowości wynikających z ograniczonej ilości, bądź źle sformułowanych pytań, błędów w ocenie konsumpcji tytoniu przez osoby przebywające w najbliższym otoczeniu oraz zatajenia niektórych informacji. Odpowiednie przygotowanie i przeprowadzanie badań ankietowych oraz standaryzacja mogą w znacznym stopniu zminimalizować błędy. WHO zaproponowała podział osób palących na codziennych palaczy, okazjonalnych codziennych palaczy, byłych codziennych palaczy i osób nigdy nie palących tytoniu (81). W celu oceny stopnia uzależnienia od tytoniu i oszacowania wpływu na stan zdrowia, ważne jest określenie stopnia ekspozycji na dym oraz historii palenia tytoniu przez osobę poddawaną badaniu. Proces uwiarygodnienia podawanych informacji w ankiecie najczęściej polega na obiektywizacji wyników poprzez oznaczenia biologicznych markerów narażenia na dym tytoniowy metodami laboratoryjnymi (33).

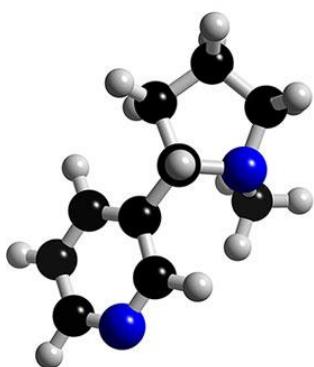
### **2.5.2 Biomarkery narażenia na dym tytoniowy**

Idealny marker oceny narażenia na dym tytoniowy powinien cechować się dużą specyficznością, prostotą oznaczenia, niską ceną, oraz stałym stosunkiem ilościowym do innych składników dymu. O przydatności takiego markera decyduje dokładność pomiaru analitycznego w danym materiale biologicznym, umożliwiającą ilościową ocenę przyswojonego przez organizm związku chemicznego. Poważnym ograniczeniem większości

biomarkerów stosowanych obecnie jest to, że pozwalają one oceniać narażenie na wdychanie dymu w stosunkowo krótkim okresie czasu, od kilku godzin do kilkunastu tygodni. Dlatego w ocenie zagrożenia na ETS najczęściej bazuje na informacjach z ankiet, ewentualnie poszerzonych o oznaczenia biomarkerów (22).

Najczęściej stosowanymi markerami dymu tytoniowego są niektóre jego składniki oraz metabolity poszczególnych jego składników powstające w ustroju. Częsteczkami dymu pełniącymi rolę markerów mogą być: metabolity WWA (najczęściej oznaczane to: 1-hydroksypiren, hysroksyfenantreny i hydroksynaftaleny), N-nitrozoaminy (najczęściej oznaczane to: N<sup>7</sup>-nitrozonornikotylna, 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-butanon, kwas trans, trans-mukonowy, kwas S-fenylomerkapturowy oraz addukty hemoglobiny z 4-aminobifenylu. Związki te nie znalazły jednak praktycznego zastosowania, ponieważ oznaczanie ich wiąże się z zastosowaniem bardzo zaawansowanych metod analitycznych. Nie są one również specyficzne dla dymu tytoniowego dlatego nie nadają się do oceny ETS. W praktyce stosuje się oznaczanie stężenia nikotyny, metabolitów nikotyny (kotyniny oraz trans 3'-hydroksykotyniny), wydychanego tlenu węgla (II), karboksyhemoglobiny i tiocyjanidów, związków, które nadają się do oceny zarówno aktywnego jak i biernego palenia tytoniu.

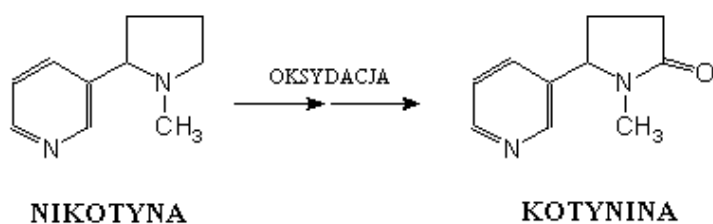
### 2.5.3 Nikotyna i kotynina



Rycina 3. Model przestrzenny cząsteczki nikotyny (źródło: [www.3dchem.com](http://www.3dchem.com))

Nikotyna jest organicznym związkiem chemicznym należącym do grupy alkaloidów pirydynowych, zbudowanym z dwóch pierścieni heterocyklicznych: pirydyny i pirolidyny.

Naturalnie występująca nikotyna jest enancjomerem o konfiguracji S. Jest to związek hydrofobowy przez co łatwo przenika przez błony komórkowe. Szybkość wchłaniania nikotyny jest uzależniona od pH. W kwaśnym pH wchłania się bardzo wolno ze względu na jonizację cząsteczki. W nabłonku płuc, w pH zbliżonym do fizjologicznego (7,35 -7,45), jest buforowana i bardzo łatwo przenika przez błony z szybkością porównywalną do iniekcji dożylnych (82; 83). Wchłonięta nikotyna bardzo szybko ulega dystrybucji (5-10 min.). Podczas spalania papierosa, już w ciągu 7 sekund pokonuje szlak: jama ustna – płuca – krew małego układu krążenia - serce - aorta - tętnice mózgu i zaczyna oddziaływać na komórki mózgowe. W naczyniach mózgowych stężenie nikotyny jest 3 do 6 razy wyższe w porównaniu ze stężeniem we krwi żyłnej a biologiczny okres półtrwania nikotyny w komórkach mózgowych wynosi ok. 2 godzin. Średnie stężenie nikotyny w osoczu krwi żyłnej u palaczy w ciągu dnia waha się od 20 do 40 ng/ml. Różnice mogą wynikać z liczby wypalanych papierosów, formy palenia i rodzaju stosowanego tytoniu a także ze zmiennej objętości zaciągania się oraz zawartości dymu w powietrzu. Faza eliminacji nikotyny jest zmienna osobniczo i może trwać ok. 70-140 min. Tak jak wchłanianie, również wydalanie nikotyny jest procesem pH – zależnym, wraz ze wzrostem pH zwiększa się jej retencja w organizmie. W około 90% nikotyna wydalana jest przez nerki, a w niewielkiej ilości również przez ślinę (84). Wydaje się, że w niewielkim stopniu poza wątrobą, jest również metabolizowana w płucach i nerkach. Nie ma konkretnych danych na temat biotransformacji mózgowej, które mogłyby być istotne ze względu na powstające w mózgu efekty po ekspozycji na nikotynę (85). Około 70-80% przyjętej dawki alkaloidu ulega przemianie do kotyniny, 4-7% dawki wydalane jest w formie N-tlenku nikotyny, a następnie 3-5 % w postaci glukuronianu (84; 85; 86).



Rycina 4. Powstawanie głównego metabolitu nikotyny – kotyniny

Kotynina jest głównym metabolitem nikotyny u ludzi. Znaczna część wchłoniętej nikotyny (ok. 80%) jest metabolizowana w wątrobie w NADPH zależnej reakcji C-oksydacji do kotyniny przy udziale enzymów z grupy cytochromu P450 (wiele badań wskazuje konkretnie na enzym CYP2A6) (84; 87). Szlaki biotransformacji kotyniny nie zostały jeszcze tak dobrze opisane jak w przypadku nikotyny. Z powstałej kotyniny około 10-15% przenika do moczu w postaci niezmienionej. Głównym metabolitem kotyniny jest 3'-hydroksykotynina, która w moczu, w formie glukuronianu 3'-hydroksykotyniny, stanowi metabolit około 40-60 % przyjętej dawki nikotyny (85). Innymi substancjami powstającymi w różnych proporcjach z kotyniny są 5'-hydroksykotynina pozostająca w równowadze tautomerycznej z 4-okso-4-(3-pirydylo)-N-metylobutanamidem, N-tlenek kotyniny, jon metoniowy kotyniny oraz glukuronid kotyniny i norkotynina. Zarówno kotynina jak i jej hydroksypochozna ze względu na znacznie dłuższy okres półtrwania ( $t_{1/2}$  = ok.17 godzin), eliminowane są z organizmu dużo wolniej w porównaniu do nikotyny.

W tabeli 2 zebrano podstawowe parametry farmakokinetyczne nikotyny i kotyniny.

*Tabela 2. Podstawowe parametry farmakokinetyczne nikotyny i kotyniny u osób palących papierosy (88)*

<b>Parametr</b>	<b>Nikotyna</b>	<b>Kotynina</b>
Biologiczny okres półtrwania $t_{1/2}$ (w minutach)	157 ± 78	1047 ± 304
Objętość dystrybucji ( $V_d$ ) (w litrach)	196 ± 74	54 ± 16
Klirens całkowity [ml/min]	1085 ± 282	40,6 ± 11,1

Nikotyna z kotyniną są najbardziej popularnymi związkami stosowanymi jako biomarkery narażenia środowiskowego na wdychanie dymu papierosowego. W celu oceny stopnia narażenia na dym często dokonuje się pomiaru stężenia nikotyny i/lub kotyniny w ślinie, krwi lub moczu. W celu ilościowej oceny najbardziej popularnym materiałem do badań jest krew, niemniej oznaczanie nikotyny i jej metabolitów w moczu i ślinie zostało zaproponowane jako metoda wygodna i nieinwazyjna (33; 89; 86). Oznaczanie poziomu nikotyny w płynach ustrojowych jest jednak znacznie ograniczone ze względu na dość krótki okres jej półtrwania (ok. 2,5 godziny). Stężenie kotyniny w ślinie jest wysoko skorelowane z jej stężeniem w surowicy natomiast w moczu poziom metabolitu jest nawet do 6 razy wyższy (90). W przypadku badania poziomu kotyniny w moczu, ważnym jest aby znormalizować wynik w stosunku do poziomu kreatyniny. Przy interpretacji wyniku należy wziąć pod uwagę

pleć osoby badanej ze względu na różnice masy ciała. Należy pamiętać, że niewielkie ilości nikotyny oprócz liści i korzeni tytoniu oraz preparatów nikotynozastępczych dostarczane są do organizmu ludzkiego z żywnością (m.in. herbata i niektóre warzywa). W zależności od czułości zastosowanej metody pomiaru poziom kotyniny w surowicy i ślinie u osób niepalących i nienarażonych na dym tytoniowy (czyli poziom fizjologiczny) może sięgać 15 ng/ml, a w moczu jej stężenie może dochodzić nawet do 50 ng/ml (90).

Ze względu na stosunkowo krótki biologiczny okres półtrwania nikotyny we krwi, moczu i ślinie oznaczanie jej i zastosowanie jako markera ma ograniczone znaczenie. Znana i stosowana obecnie na świecie jest metoda analizy włosów, w których inkorporowane są nikotyna i jej metabolity. Zastosowanie metody chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas (GC/MS) jest bardzo czuła i pozwala określić ilość rzędu kilku ng nikotyny/mg włosów. Poddane badaniu włosy noworodków mogą być wykorzystywane jako materiał biologiczny dostarczający informacji na temat historii palenia przez matkę w drugim i trzecim trymestrze ciąży (88).



### 3. Cel pracy

Głównym celem pracy była ocena wpływu aktywnego i biernego palenia tytoniu przez kobiety ciężarne na przebieg ciąży i wyniki położnicze.

Główny temat pracy został wykonany poprzez realizację wymienionych poniżej celów szczegółowych:

- Analizę badań ankietowych przeprowadzonych w okresie okołoporodowym oceniających status socjoekonomiczny pacjentek oraz rodzaj i stopień narażenia na dym tytoniowy, a także inne czynniki szkodliwe w czasie ciąży
- Korelację stężenia kotyniny w surowicy krwi kobiet ciężarnych ze stężeniem kotyniny we krwi pępowinowej
- Analizę dokumentacji medycznej pacjentek i ocenę parametrów klinicznych dotyczących matki i dziecka w okresie okołoporodowym:
  - urodzeniowej masy ciała
  - objawów zagrożenia życia płodu w KTG
  - równowagi kwasowo-zasadowej krwi pępowinowej
  - ryzyka rozwoju nadciśnienia i hipotrofii płodu
  - sposobu ukończenia porodu
- Ocenę stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi kobiet ciężarnych, we krwi pępowinowej oraz w części matczynej i płodowej łożyska:
  - poziom peroksydacji lipidów (TBARS)
  - poziom białka nitrozylowanego
  - poziom końcowych produktów utleniania białek (AOPP)
  - poziom końcowych produktów glikacji białek (AGEs)
  - poziom zredukowanego glutationu (GSH)
  - aktywność S-transferazy glutationu (GST)
  - aktywność katalazy (CAT)
  - zdolność antyoksydacyjną ekwiwalentów troloxu (TEAC)
  - poziom azotynów
- Korelację badanych parametrów stresu oksydacyjnego ze stężeniem kotyniny w surowicy krwi kobiet ciężarnych

## **4. Materiał i metodyka**

### **4.1 Materiał**

#### **4.1.1 Grupa badana**

Zgodę na przeprowadzenie badań nr 31/10 wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 7 stycznia 2010 roku.

Do badania włączono 106 ciężarnych w okresie okołoporodowym oraz ich dzieci. Rekrutację do badania przeprowadzono wśród kobiet w ciąży donoszonej pomiędzy 37 i 41+6 tygodniu ciąży, które zgłosiły się na Oddział Porodowy do Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu celem odbycia porodu. W badaniu zastosowano dobór losowy pacjentek. Informację na temat projektu przekazano matkom podczas procedury przyjęcia do Oddziału Porodowego. Udział w badaniu był dobrowolny, a pacjentki zostały poinformowane o istocie i celowości jego wykonania oraz wyraziły pisemną zgodę na wzięcie w nich udziału.

Elementami wykluczającymi udział w badaniu były wszelkie choroby przewlekłe rozpoznane przed obecną ciążą a także poród przedwczesny przed ukończonym 37 tygodniem ciąży oraz ciąża wielopłodowa.

Ostatecznie wyodrębniono:

- Grupę pierwszą (I) (n=27) - kobiety palące tytoń w okresie ciąży
- Grupę drugą (II) (n=32) - pacjentki narażone na bierne wdychanie dymu tytoniowego.
- Grupę kontrolną (III) (n=47) - ciężarne niepalące w czasie ciąży.

#### **4.1.2 Ankieta**

Po porodzie dziecka (aby wykluczyć element bólu i stresu porodowego) każdą z

pacjentek poproszono o wypełnienie ankiety określającej status socjoekonomiczny oraz zawierającej informacje na temat stosowania różnego typu używek i leków w okresie sprzed jak i w trakcie trwania ciąży. Zebrano również dane na temat narażenia na czynniki zewnętrzne, takie jak dym tytoniowy i substancje chemiczne.

Zgodnie ze złożonymi deklaracjami w ankiecie o paleniu bądź biernej ekspozycji na dym tytoniowy w okresie ciąży wyodrębniono:

- 24 osoby deklarujące aktywne palenie tytoniu w czasie ciąży
- 34 ciężarne deklarujące jedynie bierne narażenie na wdychanie dymu tytoniowego
- 48 kobiet negujących zarówno aktywne jak i bierne palenie tytoniu w okresie obecnej ciąży.

Ciężarne, które deklarowały zaprzestanie palenia tytoniu w czasie ciąży były traktowane jako kobiety niepalące. Dane na temat przebiegu ciąży, stwierdzonych powikłań i stosowanych leków zasięgnięto z wywiadu lekarskiego, natomiast informacje o przebiegu porodu i wynikach okołoporodowych zaczerpnięto z dokumentacji medycznej.

#### **4.1.3 Materiał biologiczny**

W trakcie trwania procedury przyjęcia pacjentki na Oddział Porodowy z objawami rozpoczynającego/rozpoczętego porodu, pobrano krew do probówek „na skrzep”, odwirowano i zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bezpośrednio po urodzeniu dziecka pobrano krew z żyły pępowinowej do probówki „na skrzep”, odwirowano i zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po urodzeniu łożyska pobrano dwa fragmenty płyty narządu wielkości ok.  $1,5\text{ cm}^3$  w następujący sposób: w odległości ok. 2 cm od przyczepu pępowinowego wycięto fragment płyty łożyska w kształcie walca przez całą jego szerokość. Następnie walec przecięto na dwie części tak aby oddzielić część łożyska od strony matczynej z częścią od strony płodowej. Obydwa fragmenty łożyska włożono do oddzielnych woreczków foliowych, podpisano i zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zamrożony materiał biologiczny przekazano do Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu gdzie wykonano wszystkie analizy toksykologiczne i biochemiczne: oznaczenie poziomu kotyniny w surowicy krwi pacjentki i krwi pępowinowej, oznaczenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi pacjentki i krwi pępowinowej (poziom białka całkowitego, TBARS, AOPP, AGEs, stopień nitrozytacji białek) oraz łożyska (TBARS, GSH, GST, CAT,

stopień nitrozylacji białek, TEAC oraz stężenie azotynów).

Z łożyska rozmrożono, pobrano 1g, a następnie dodano 2ml buforu fosforanowego w soli fizjologicznej pH=7,4 (PBS). Materiał poddano homogenizacji przy pomocy homogenizatora T25 Basic, firmy Kika Labortechnik i wirowano przez 10 minut przy 6000 obr/min. a następnie zebrano nadsącz do badań. Otrzymane homogenaty zamrożono w temperaturze - 80°C.

W wyniku przeprowadzonych badań toksykologicznych (pomiar stężenia kotyniny w surowicy) w grupie pacjentek niepalących zidentyfikowano trzy kobiety, u których wartości stężenia kotyniny w surowicy krwi matki oraz w surowicy krwi pępowinowej w istotnym stopniu były podwyższone. Stężenie kotyniny w surowicy krwi ciężarnych wynosił odpowiednio: 252,30, 162,01 (ng/ml) u trzeciej pacjentki ze względu na małą objętość pobranej krwi stężenia kotyniny nie oznaczono, natomiast stężenia kotyniny w surowicy krwi pępowinowej odpowiednio kształtowały się: 159,75, 198,22 oraz 92,57 ng/ml. Tak wysokie stężenia kotyniny wskazują na aktywne palenie. Konsekwencją tego, na potrzeby dalszych badań, było wyłączenie tych pacjentek z grup II i III i zakwalifikowanie do grupy I – kobiet palących tytoń w czasie ciąży.

## **4.2 Metodyka**

### **4.2.1 Poziom kotyniny w surowicy krwi**

Stężenie kotyniny w surowicy krwi kobiet ciężarnych oraz w surowicy krwi pępowinowej zostało oznaczone z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC) z użyciem norefedryny jako wzorca wewnętrznego. Analiza chromatograficzna została poprzedzona ekstrakcją badanego związku z surowicy z wykorzystaniem techniki ciec-z-ciecz.

#### **Parametry walidacyjne metody**

Przed rozpoczęciem oznaczeń dokonano walidacji metody. Wyznaczono:

- granicę wykrywalności
- granicę oznaczalności
- liniowość
- powtarzalność metody.

## Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ)

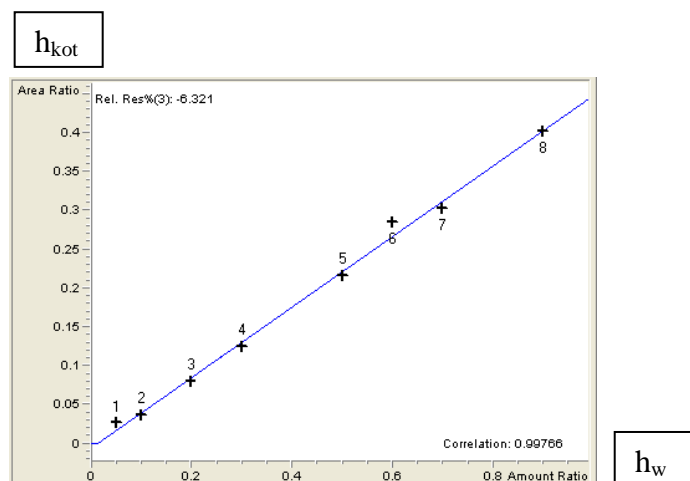
Granice wykrywalności i oznaczalności ustalono dla różnych stężeń kotyniny w surowicy. Granicę wykrywalności (LOD) zdefiniowano jako wartość stosunku sygnału do szumu  $S/N=3$ ; w omawianym badaniu LOD wynosiła 5 ng/ml.

Za granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto najniższe stężenie substancji możliwe do wykrycia i oznaczenia na akceptowalnym poziomie precyzji i poprawności; LOQ wynosiła 15 ng/ml.

### Liniowość metody

Określono zakres liniowości zastosowanej metody poprzez zastosowanie serii wzorców z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Wzorec wewnętrzny został przygotowany poprzez rozcieńczenie roztworu norefedryny (stężenie 1 mg/ml) metanolem do stężenia 10  $\mu\text{g/ml}$ . Odpowiednie stężenia roztworów kalibracyjnych (25, 50, 100, 150, 250, 300, 350 i 450 ng/ml) uzyskano poprzez dodawanie do surowicy odpowiedniej ilości substancji wzorcowych.

Krzywą kalibracyjną, przedstawiającą zależność stosunku pola powierzchni pików chromatograficznych kotyniny ( $h_{\text{kot}}$ ) do pola powierzchni wzorca wewnętrznego ( $h_{\text{w}}$ ) od stężenia kotyniny ( $c_{\text{kot}}$ ) opisano równaniem  $c_{\text{kot}} = 0,0042 \times (h_{\text{kot}}/h_{\text{w}})$ . Wartość współczynnika korelacji wynosiła 0,998.



Rycina 5. Krzywa kalibracyjna dla kotyniny

### Powtarzalność metody

Powtarzalność metody badano dla dwóch stężeń kotyniny. Każde stężenie przeanalizowano w trzelementowych seriach. Badano próby surowicy z dodatkiem wzorca w

danym dniu i w różnych dniach. Wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Powtarzalność wewnątrzgrupowa metody oznaczania kotyniny w surowicy

Parametr	Stężenie zadane [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	CV[%]
Powtarzalność oznaczania kotyniny w surowicy w danym dniu			
Kotynina	10	10,24	7,44
	300	285,86	0,32
Powtarzalność oznaczania kotyniny w surowicy pomiędzy dniami			
Kotynina	10	8,01	4,87
	300	214,95	3,73

### Przebieg badania

Surowicę przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . W przypadku widocznego zmętnienia próbek lub obecności strontów po odmrożeniu wirowano powtórnie.

### Przygotowanie wzorca wewnętrznego

Wzorzec wewnętrzny został przygotowany poprzez rozcieńczenie roztworu norefedryny o stężeniu 1 mg/ml metanolem do końcowego stężenia  $10\mu\text{g/ml}$ .

### Ustalenie czasów retencji

Przygotowano dwa roztwory wzorcowe dla kotyniny oraz norefedryny w fazie ruchomej o stężeniu  $1\mu\text{g/ml}$ , które wprowadzono na kolumnę chromatograficzną. Oznaczenia przeprowadzono w warunkach opisanych poniżej.

### Przygotowanie próbki - ekstrakcja kotyniny z surowicy techniką ciecz - ciecz.

#### *Aparatura i sprzęt*

Do pracy nad przygotowaniem próbek surowicy wykorzystano blok grzewczy TB-951U JW. Electronic, wirówkę MPW 220 (mechanika precyzyjna) oraz wytrząsarkę Vortex TH-3S (Techno Certel).

#### *Tok ekstrakcji*

Do 15 ml próbek typu Falcon wprowadzono 1 ml surowicy, którą doprowadzono do  $\text{pH}=8$  poprzez użycie  $0,1\text{ mol/l}$  roztworu wodorotlenku sodowego. Następnie dodano  $50\mu\text{l}$  roztworu norefedryny oraz 5 ml mieszaniny dichlorometan-n-propanolu w stosunku 9:1. Całość wytrząsano przez 15 minut a następnie wirowano przez 15 minut przy 5000 obr/min. W kolejnym etapie pobrano 4 ml warstwy dichlorometan-n-propanol i przeniesiono do

szklanych fiolek o pojemności 7 ml. Powstały ekstrakt z dodatkiem 100 µl 0,035 mol/l kwasu chlorowodorowego w metanolu, odparowano w strumieniu sprężonego powietrza w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 150 µl fazy ruchomej.

### **Analiza metodą HPLC**

#### *Aparatura i sprzęt*

Do analizy ilościowej wykorzystano chromatograf cieczowy HPLC Agilent 1200 RR,

#### *Warunki pracy chromatografu HPLC*

detektor diodowy - Diode Array Detector oraz kolumnę do HPLC RP-Select B, 105 mm x 4,6 mm, 5 µm (Merck).

#### *Faza ruchoma*

Fazę ruchomą stanowiły dwa roztwory A i B:

Roztwór A: 9,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 ml tri-etyloaminy rozpuszczonej w 1 litrze wody - pH=4,1 ustalono wykorzystując kwas ortofosforowy.

Roztwór B - acetonitryl.

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w warunkach gradientowych wykorzystując prekolumnę (3 cm) i kolumnę (25 cm) do HPLC RP-Select B, 105 mm x 4,6 mm, 5 µm firmy Merck. W trakcie analizy chromatograficznej przepływ fazy ruchomej był stały i wynosił 1 ml/min. Przebieg gradientu przedstawiono w tabeli 4.

*Tabela 4. Przebieg gradientu fazy ruchomej podczas analizy kotyniny*

<b>Czas [min.]</b>	<b>% roztworu B</b>
0	8
3	10
7	10
8	8
10	8

Objętość nastrzyku dozowanej próbki wynosiła 20 µl. Przed pobieraniem każdej następnej próbki igła była przemywana fazą ruchomą, szybkość pobierania próbki wynosiła 200 µl/min.

Rejestrowano widmo spektrofotometryczne a także dokonywano pomiaru absorbancji przy długość fali  $\lambda=260$  nm. W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano następujące czasy retencji oznaczanych substancji:

- Norefedryna - 3,1 min.
- Kotynina - 5,5 min.

#### 4.2.2 Stężenie białka całkowitego

##### Zasada metody

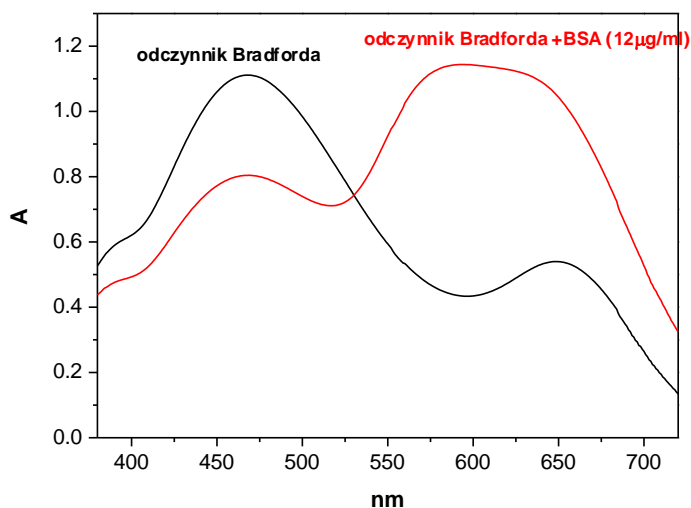
Aby określić poziomu aktywności różnych enzymów niezbędna jest znajomość stężenia białka całkowitego w układzie. Jest to badanie podstawowe, do którego odnoszone są inne oznaczenia. Większość metod analitycznych stosowanych w celu oznaczenia stężenia białka, również metoda Lowry'ego i Bradforda użyta w badaniach własnych, wykorzystuje reakcję barwnika z danym białkiem powodującą wzrost absorbancji przy określonej długości fali.

Ze względu na różnice w budowie aminokwasowej, białka mogą wykazywać pewne różnice w reakcjach z barwnikiem. Dlatego w każdej metodzie ważne jest określenie odpowiedniego białka referencyjnego w celu sporządzenia krzywej. Standardem do sporządzenia krzywej wzorcowej są BSA (albuminy surowicy bydlęcej), używane w metodzie Bradforda i Lowry'ego oraz IgG (immunoglobulina). Preferowanym standardem jest jednak oczyszczona próba oznaczanego białka bądź białko o bardzo podobnej budowie.

Test Bradforda wykorzystuje reakcję barwnika (błękitu brylantowego Coomassie Brilliant Blue G-250) z arginina oraz resztami hydrofobowymi innych aminokwasów zawartych w próbce badanej, powodując wzrost absorbancji przy określonej długości fali. W formie anionowej, związanej, barwnik jest niebieski i wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda=595$  nm. W formie kationowej, niezwiązanej, barwnik jest czerwono-brązowy a maksimum absorpcji wykazuje przy długości fali  $\lambda=465$  nm (*rycina 6*). Wzrost absorbancji mierzonej przy długości fali  $\lambda=595$  nm jest proporcjonalny do ilości związanego z białkami barwnika, a więc i do ilości białka w próbce.

Metoda Bradforda ma wiele zalet, jest łatwa, szybka i czuła; niestety wadą jest to, że niektóre związki mogą interferować z oznaczeniem poprzez interakcję z barwnikiem.





Rycina 6. Widmo absorpcji odczynnika Bradforda przed (\_\_\_) i po dodaniu BSA (12 µg/ml) (\_\_\_). Zaczepnięto z [www.bio.fuw.edu.pl/education/stuff/PracowniaBiochem.doc](http://www.bio.fuw.edu.pl/education/stuff/PracowniaBiochem.doc)

### **Sprzęt i aparatura:**

Do przeprowadzenia oznaczeń wykorzystano czytnik absorbancji mikroplatek- iMark Microplate Absorbance Reader, Bio. Rad Laboratories.

### **Odczynniki i roztwory:**

W badaniu wykorzystano barwnik Coomassie Brilliant Blue G 250, 98%, Sigma-Aldrich oraz standard albuminy surowicy bydlęcej (BSA), 96%, Sigma-Aldrich.

### **Tok analizy:**

Poziom białka w próbach badanych został oznaczony w sposób ilościowy z wykorzystaniem kolorymetrycznej metody Bradforda. Jako standard zastosowano roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA) o stężeniu 0,1 mg/ cm<sup>3</sup>. Próbkę rozcieńczono wodą destylowaną do 6 µl (w stosunku 1:133,3), a następnie dodano barwnik. Po 5 minutach odczytywano absorbancję przy długości fali  $\lambda=595$  nm. Każdą z analiz przeprowadzono dwukrotnie. Przy każdym oznaczeniu zmierzono tzw. „blank”, czyli próbę bez standardu.

### **Krzywa wzorcowa:**

W celu wyznaczenia stopnia w jakim absorbancja odnosi się do różnych stężeń białka, należy sporządzić roztwór wzorcowy, tzw. standard o znanym stężeniu oraz wyznaczyć krzywą wzorcową. Ustala się zależności pomiędzy stężeniem substancji (w określonych granicach) a zmianą absorbancji. Analizując jednakowe objętości standardu i próby, po odczytaniu absorbancji roztworu badanego, można określić zawartość protein w próbce

badanej. Stężenie białka w próbce oblicza się wykorzystując równanie krzywej wzorcowej skorygowane o rozcieńczenie analizowanej próbki.

Spektrofotometr dokonuje pomiaru natężenia światła przechodzącego przez próbkę. Przy wysokiej absorbancji przechodzi niewiele światła, co oznacza, że zawartość białka w badanej próbce jest bardzo wysoka. Przy niższych stężeniach białka absorbancja jest funkcją liniową stężenia i dla tych wartości można zastosować prawo Beer-Lamberta. W przypadku gdy absorbancja próbki jest wyższa niż 1,5 AU (jednostki absorbancji), istnieje prawdopodobieństwo, że oznaczenie nie jest liniowe, dlatego prawdopodobnie należy rozcieńczyć próbkę i dokonać ponownego pomiaru. Równanie krzywej wzorcowej nie odnosi się zatem do wysokich stężeń białka.

### **4.2.3 Peroksydacja lipidów (TBARS)**

#### **Zasada oznaczenia**

W wyniku oddziaływania stresu oksydacyjnego na komórkę powstaje szereg związków będących produktami rozkładu hydroperoksy kwasów tłuszczowych, wśród nich aldehyd dimalonowy (MDA). MDA w reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA) daje barwny związek, który oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=532$  nm. Również inne substancje takie jak białka oraz aldehydy reagują z TBA dając barwne kompleksy podczas ogrzewania próbek. Oznaczanym w badaniu parametrem jest TBARS, czyli parametr określający sumaryczne stężenie związków reagujących z TBA (91).

#### **Odczynniki**

Do przeprowadzenia reakcji użyto bufor TRIS 150 mM o pH=7,4 oraz roztwór TBA-TCA-HCl, zawierający: 0,375% kwasu tiobarbiturowego (TBA), 15 % kwas trichlorooctowego, 0,25 M HCl przygotowany bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

#### **Przebieg reakcji**

Przebieg oznaczenia złożony był z dwóch etapów: inkubacji oraz reakcji z TBA.

##### **1. Inkubacja:**

Wykonywano jednocześnie próbkę ślepą, gdzie umieszczono 1,3 cm<sup>3</sup> buforu TRIS wraz z 0,2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej (aq. pro inj.) oraz próbkę badaną, gdzie zmieszano 0,2 cm<sup>3</sup> cytozolu z 1,3 cm<sup>3</sup> buforu TRIS. Następnie umieszczono próbki w łaźni wodnej w 37°C przez 60 min celem inkubacji.

## **2. Reakcja z TBA:**

W kolejnym etapie zarówno do próby badanej, jak i próby ślepej dodano 1,5 cm<sup>3</sup> mieszaniny TBA-TCA-HCl przygotowanej bezpośrednio przed użyciem. Przeprowadzono 20min. inkubację w 95<sup>0</sup>C, a następnie schłodzono zawartość probówek i odwirowano przy obrotach 3000 obr/min przez 10min.

Ostatecznie, w akrylowych kuwetach o długości 10 mm drogi optycznej względem próby ślepej, dokonano odczytu absorbancji w nadsączu powstałego kompleksu barwnego, przy długości fali  $\lambda=532$  nm.

### **Obliczenia**

Obliczono stężenie TBARS na podstawie molowego współczynnika absorbancji (E) według równania:

$$\text{TBARS (ng)} = (\text{Abs.pr.} - \text{Abs.śl.}) / \text{Exd}$$

gdzie:

Abs.pr. - absorbancja przy  $\lambda=532$  nm próby badanej

Abs.śl. - absorbancja przy  $\lambda=532$  nm próby ślepej

d - długość drogi optycznej w cm,

E - molowy współczynnik absorbancji. Wartość E dla długości fali  $\lambda$  532 nm wynosi  $1,52 \times 10^5$ .

Otrzymane aktywności przeliczono w zależności od zawartości białka w badanych próbach

$$\text{TBARS (ng/L) / białko (mg/L) = TBARS (ng/mg białka)}$$

## **4.2.4 Zaawansowane produkty utleniania białek (AOPP)**

W warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego mogą powstawać tzw. zaawansowane produkty utleniania białek (AOPP). Mianem tym określa się utlenione pochodne albumin, fibrynogenu i lipoprotein. Główną rolę w powstawaniu AOPP odgrywa układ mieloperoksydaza/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halogenek. AOPP zostały uznane za markery stresu oksydacyjnego oraz nasilenia oksydacyjnego uszkodzenia białek, a także wskaźniki odzwierciedlające intensywność stanu zapalnego oraz stopień aktywacji monocytów i neutrofilów.

### **Zasada metody:**

Stężenie AOPP oznaczano spektrofotometrycznie według metody Witko-Sarsat et al. (92; 93), Kalousova et al. (94), Kayali et al. (95).

#### **Odczynniki i roztwory:**

Na potrzeby badania użyto: bufor fosforanowy o pH=7,4, 1,16 M wodny roztwór jodku potasufirmy Merck oraz 80% stężony kwas octowy firmy Merck.

#### **Aparatura i sprzęt:**

Wyniki odczytywano na spektrofotometrze Shimadzu UV, 1610.

#### **Tok analizy:**

150  $\mu$ l roztworu badanego rozcieńczono 1350  $\mu$ l buforu fosforanowego (0,01 M, pH=7,4). Odmierzano 750  $\mu$ l rozcieńczonej próbki i dodawano 37,5  $\mu$ l jodku potasu - KI (roztwór wodny 1,16 M). Po 2 minutach dodawano 75  $\mu$ l 80% kwasu octowego i mierzono absorbancję w kwarcowych kuwetach przy długości fali  $\lambda=340$  nm. Stężenie AOPP zostało wyrażone w milimolach chloraminy na gram białka (mmol chloraminy/g białka). Każdą próbkę analizowano dwukrotnie.

### **4.2.5 Zaawansowane końcowe produkty glikacji białek (AGEs)**

Końcowe produkty glikacji białek AGEs powstają w procesie nieenzymatycznej glikacji przy dłuższej ekspozycji białek na wysokie stężenia glukozy w organizmie. Proces ten jest spontaniczny, a jego produkty mają tendencję do kumulowania się w tkankach. Glikacja dotyczy w szczególności białek zawierających wolne grupy aminowe ( $-\text{NH}_2$ ), czyli zawierających lizynę i ornitynę. AGEs są związkami bardzo reaktywnymi, generują reaktywne formy tlenu bezpośrednio bądź pośrednio poprzez aktywację oksydazy NAD(P)H. Pośrednie produkty glikacji indukują reakcje stresu oksydacyjnego oraz apoptozę komórki. AGEs biorą udział w procesach migracji monocytów, wytwarzania cytokin i czynników wzrostu, a ich kumulacja jest związana ze starzeniem się organizmu. Połączenie się cząsteczki AGEs z receptorem błonowym różnych komórek: makrofagów, endotelium, miocytów, komórek mezangium nerkowego oraz neuronu, powoduje wzrost syntezy cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworów ( $\text{TNF}\alpha$ ), IL-1, IL-6; prozakrzepowych: czynnika tkankowego (TF), trombomoduliny; naczynioskurczowych: endoteliny (ET-1) oraz czynnika adhezji (VCAM 1). Istnieją specyficzne receptory dla AGEs tzw. AGE-RAGE, należące do nadrodziny IgG receptorów błonowych, występujące m.in. w błonach

plazmatycznych makrofagów, limfocytów T, komórek śródbłonna, mięśni gładkich, fibroblastów i neuronów. Aktywacja receptorów RAGE powoduje wtórne wytwarzanie RFT czyli nasilenia stresu oksydacyjnego. Powyższy mechanizm jest niezależny od stopnia hiperglikemii.

#### **Zasada metody:**

AGEs oznaczano bezpośrednio, metodą spektroskopii fluorescencyjnej, według metody Henle et al. (96) Głównym produktem glikacji białek (w 90%) jest pentozydyna, która dzięki obecności pierścienia imidazolo-(4,5b)-pirydynowego posiada właściwości fluoryzujące. Właściwość ta jest wykorzystywana w powyższym oznaczeniu.

#### **Sprzęt i aparatura:**

Do przeprowadzenia pomiaru zastosowano ultrawirówkę L8 - 80M firmy Beckman oraz spektrofluorometr RF-5000 firmy Shimadzu.

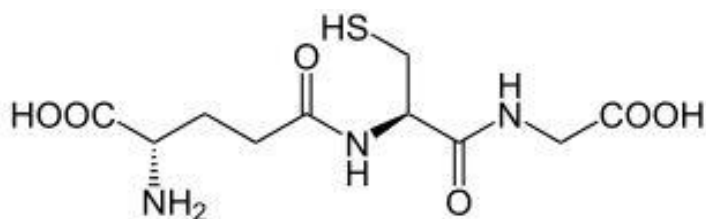
#### **Odczynniki i roztwory:**

Zastosowanym odczynnikiem był bufor fosforanowy o pH=7,4

#### **Tok analizy:**

10 µl próbki doprowadzono do temperatury 4°C i odwirowywano w tej temperaturze przez godzinę. W celu rozcieńczenia surowicy i izolacji rozpuszczalnych w wodzie form AGEs odmierzone 5 µl roztworu badanego i dodawano 45 µl buforu fosforanowego (pH=7,4). W wyniku tego działania rozpuszczalne w wodzie, drobnocząsteczkowe formy AGEs przechodzą do roztworu. Do oznaczania wykorzystywano ich właściwości fluorescencyjne. Pomiarów dokonywano przy długości fali światła wzbudzenia  $\lambda=350$  nm i światła emisji  $\lambda=440$  nm. Podane wyniki wyrażane są w umownych jednostkach fluorescencji, w przeliczeniu na gram białka [U Fl/g białka] i określają zmianę fluorescencji przypadającą na gram białka w 100 ml surowicy. Po przeliczeniu uzyskuje się jednostkę [U Fl/mg/ml]. Każdą próbkę analizowano dwukrotnie.

#### **4.2.6 Zredukowany glutationu (GSH)**



Rycina 7. *Glutation (GSH).*

### **Zasada metody**

Reakcja zredukowanego glutationu (GSH) z kwasem 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowym) (DTNB) powoduje powstanie barwnego kompleksu. W tworzeniu barwnego związku uczestniczą grupy sulfhydrylowe (-SH) glutationu. Przed przystąpieniem do oznaczenia kolorymetrycznego, należy wytrącić z osocza białka, przykładowo poprzez dodanie kwasu sulfosalicylowego. Jest to niezbędne, ponieważ reszty tiolowe w strukturze białek, mogą także reagować z DTNB dając barwny kompleks, który może zakłócać pomiary (48).

### **Odczynniki i roztwory**

- 4% roztwór kwasu sulfosalicylowego
- 0,1 M roztwór węglańu sodu
- 0,1 mM roztwór DTNB

### **Aparatura i sprzęt**

- Spektrofotometr UV – 160A, firma Shimadzu
- Wirówka – Multi-spin, typ MSC-6000, firma Biosan

### **Przygotowanie krzywej wzorcowej**

Z przygotowanego 15  $\mu\text{mol/ml}$  roztworu glutationu pobierano następujące objętości:

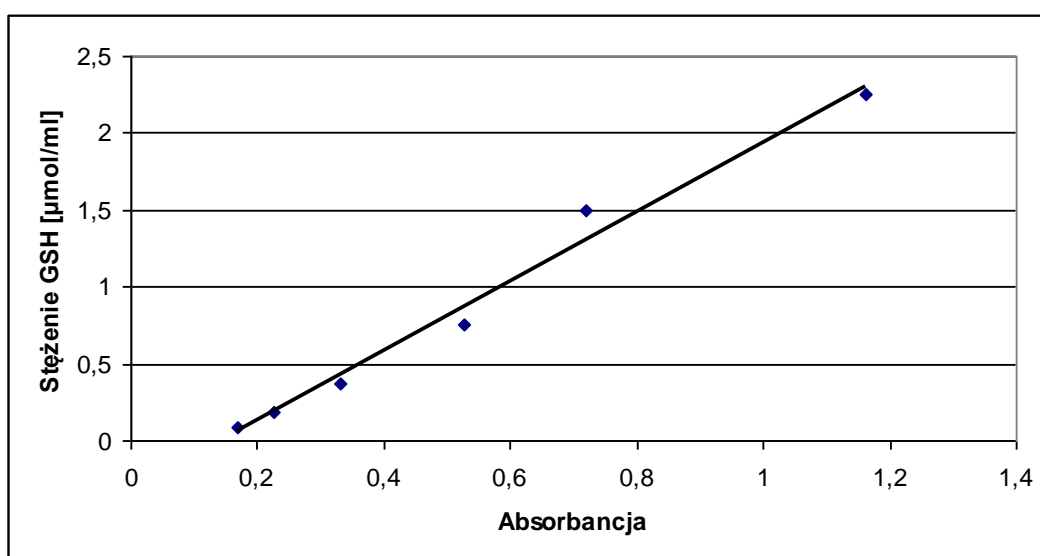
- 0,006 ml
- 0,012 ml
- 0,025 ml
- 0,05 ml
- 0,10 ml
- 0,15 ml

Następnie uzupełniano wodą redestylowaną do 1 ml. Z każdego rozcieńczonego roztworu pobierano 0,1 ml i dodawano kolejno: 0,1 ml 4% kwasu sulfosalicylowego, 0,2 ml 0,1 M węglańu sodu. Następnie z tak przygotowanych roztworów pobierano po 0,2 ml i dodawano 0,8 ml 0,1 mM DTNB.

Wykreślono krzywą wzorcową, której wartości znajdują się w tabeli 5.

Tabela 5. Wartości stężenia i absorbancji prób wzorcowych glutationu

Próba wzorcowa GSH	Stężenie [ $\mu\text{mol/ml}$ ]	Absorbancja
1	0,0900	0,169
2	0,1800	0,226
3	0,3750	0,331
4	0,7500	0,527
5	1,5000	0,720
6	2,2500	1,162



Rycina 8. Rycina krzywej wzorcowej glutationu,  $y = 2,2673 x - 0,3272$ ;

Współczynnik korelacji  $R^2 = 0,9839$

#### Przebieg oznaczenia

Pobrano 0,1 ml osocza, do którego dodano 0,1 ml 4% roztworu kwasu sulfosalicylowego i 0,2 ml roztworu węglańu sodu. Próbę wirowano przez 10 min. przy 3000 obrotów/min. Następnie pobrano 0,2 ml roztworu znad osadu i dodano 0,8 ml DTNB. Po upływie 20-60 minut zmierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=412$  nm. Stężenie GSH zostało wyrażone w  $\mu\text{M/mg}$  białka.

#### 4.2.7 Aktywność katalazy (CAT)

##### Zasada metody

Zasada oznaczenia polega na pomiarze szybkości rozkładu katalazy przez nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), poprzez pomiar stopnia obniżenia wartości absorbancji mierzonej przy długości fali  $\lambda=240$  nm.

##### Odczynniki

- 50 mM bufor fosforanowy ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o pH 7,0
- roztwór  $\text{H}_2\text{O}_2$  o stężeniu 54 mM w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7,0 przygotowany ex tempore.

##### Aparatura i sprzęt

- spektrofotometr UV – 160 A, firma Shimadzu
- ultratermostat uniwersalny, firma W.A.T. Horyzont

##### Przebieg oznaczenia

Do probówek dodano:

##### Próba badana:

- Roztwór nadtlenu wodoru w buforze fosforanowym przygotowany bezpośrednio przed użyciem termostатовano w łaźni wodnej w temperaturze  $37^\circ\text{C}$
- Homogenat 10  $\mu\text{l}$
- Buforowany  $\text{H}_2\text{O}_2$  54 mM 3 ml

Pomiary prowadzono w kuwetach kwarcowych, przy długości fali  $\lambda=240$  nm, w ciągu jednej minuty od dodania  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Jednostką aktywności katalazy jest ilość enzymu rozkładająca 1 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  w ciągu jednej minuty. Odpowiada to spadkowi absorbancji  $\text{H}_2\text{O}_2$  równemu 0,0145 jednostek w ciągu jednej minuty. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach  $\mu\text{U}/\text{mg}$  białka.

#### 4.2.8 Aktywność S-transferazy glutationowej (GST)

##### Zasada metody

GST jest enzymem katalizującym reakcję zachodzącą między 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem a glutationem. W wyniku tej reakcji powstaje barwny kompleks 1-chloro-2,4-dinitrofenyloglutation. Pomiarów dokonano przy użyciu metody spektrofotometrycznej.



### Odczynniki i roztwory

- 40 mM roztwór glutationu (GSH)
- 20 mM roztwór 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) w etanolu 95°
- 0,1 M bufor fosforanowy ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH=6,5

### Aparatura i sprzęt

- Spektrofotometr UV - 160A, firma Shimadzu
- Blok grzewczy - Sahara 320, firma Rocker

### Przebieg oznaczenia

Do próbek dodano kolejno: 1,7 ml buforu fosforanowego i 200  $\mu\text{l}$  roztworu GSH i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C w bloku grzewczym. Następnie dodano 100  $\mu\text{l}$  CDNB i 10  $\mu\text{l}$  homogenatu.

Pomiary aktywności przeprowadzono w kuwetach kwarcowych w ciągu 60 sekund, przy użyciu fali długości  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .

### Obliczenia

Do obliczenia aktywności S-transferazy glutationowej wykorzystano milimolowy współczynnik absorbancji powstającego barwnego kompleksu ( $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

$$\text{Akt. [mmol/min/L]} = (\Delta A / \text{min} * V_k) / (\epsilon * d * V_{pr.}),$$

$$\text{Akt.} = (\Delta A * 201) / 9,6,$$

$$1 \mu\text{mol/min.} = 1\text{U},$$

$$\text{Akt.} * 1000 = \text{Akt. [U/L]}$$

Otrzymane wyniki zostały przeliczone na zawartość białka obecnego w próbach badanych.

$$\text{Akt. [U/L]} / \text{Białko (mg/ml)} / 1000 = \text{Akt. [U/mg białka]}$$

**Akt.** – aktywność S-transferazy glutationowej

**V<sub>k</sub>** – końcowa objętość próby – 2,010  $\text{cm}^3$

**V<sub>pr.</sub>** – objętość dodanego materiału – 0,010  $\text{cm}^3$

**d** – długość drogi optycznej

**ε** – milimolowy współczynnik absorbancji barwnego kompleksu ( $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

## 4.2.9 Zdolność antyoksydacyjna ekwiwalentów troloxu (TEAC)

### Zasada metody

Test służy do oceny właściwości antyoksydacyjnych związków. Metoda opiera się na zdolności tych związków do redukcji stabilnego rodnika ABTS (2,2'-azynodi[sulfonian 3-etylbentziazoliny]) w stosunku do wzorca, którym jest trolox. Ilość zredukowanego ABTS została wyznaczona jako funkcja stężenia i czasu. Otrzymane wyniki przeliczono na reaktywność troloxu (97).

### Odczynniki i roztwory

- 4,3 mM roztwór nadsiarczanu potasu
- 1,7 mM roztwór ABTS (2,2'-Azyno-di[sulfonian 3-etylbentziazoliny])
- 12,5 mg troloxu w buforze fosforanowym o pH=7,4

### Aparatura i sprzęt

- Spektrofotometr UV – 160 A, firma Shimadzu

### Przygotowanie krzywej wzorcowej

12,5 mg troloxu rozpuszczono w 100 ml buforu fosforanowego o pH=7,4 i otrzymano roztwór o stężeniu 500  $\mu\text{M}$ . Następnie sporządzono rozcieńczenia: 0–250  $\mu\text{M}$ .

Odpipetowano po 0,5 ml wody redestylowanej do probówek typu Eppendorf (oprócz probówki nr 2), a następnie postępowano według schematu przedstawionego w tabeli 6. Po każdym dodaniu odczynnika mieszano zawartość probówki.

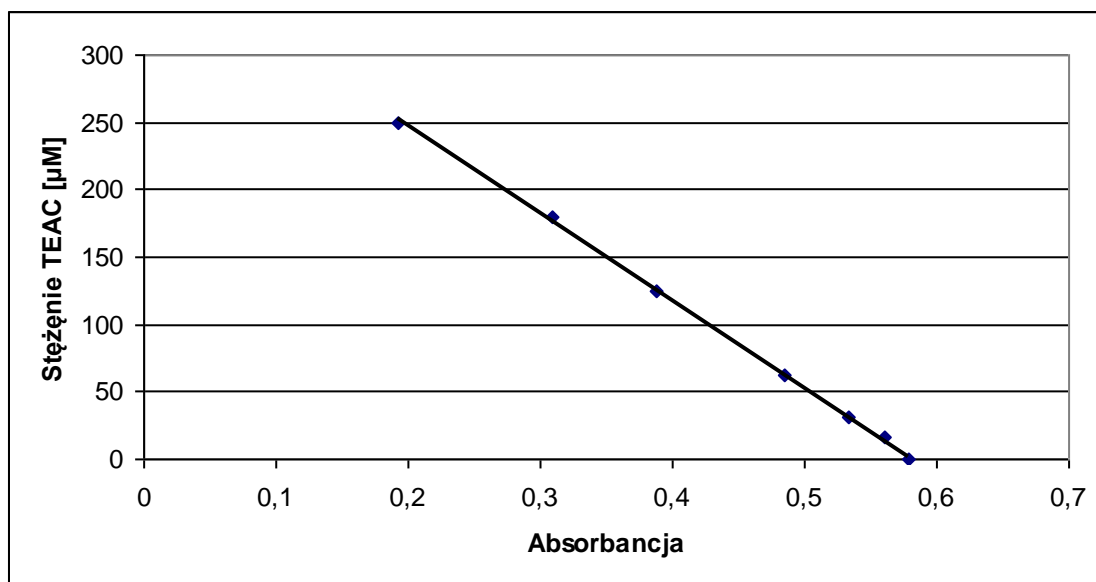
Tabela 6. Przygotowanie krzywej wzorcowej TEAC

Nr probówki	Rozcieńczenie	Wykonanie
1	250 $\mu\text{M}$	+ 0,5 ml troloxu
2	180 $\mu\text{M}$	180 $\mu\text{l}$ roztworu 500 $\mu\text{M}$ + 320 $\mu\text{l}$ wody redestylowanej
3	125 $\mu\text{M}$	pobrano 0,5 ml roztworu z probówki nr 1
4	62,5 $\mu\text{M}$	pobrano 0,5 ml roztworu z probówki nr 3
5	31,25 $\mu\text{M}$	pobrano 0,5 ml roztworu z probówki nr 4
6	15,625 $\mu\text{M}$	pobrano 0,5 ml roztworu z probówki nr 5
7	0 $\mu\text{M}$	+ 0,5 ml wody redestylowanej

Wykreślono krzywą wzorcową, której wartości są zaprezentowane w tabeli 7.

Tabela 7. Stężenia i absorbancje prób wzorcowych TEAC.

Nr próbki	Stężenie [ $\mu\text{M}$ ]	Absorbancja
1	250	0,193
2	180	0,309
3	125	0,388
4	62,5	0,485
5	31,25	0,533
6	15,625	0,561
7	0	0,579



Rycina 9. Rycina krzywej wzorcowej TEAC;  $y = - 647,58 x + 376,89$  ; współczynnik korelacji  $R^2 = 0,9996$

### Przebieg oznaczenia

Roztwór ABTS został wymieszany z roztworem nadsiarczanu potasów stosunku 5:1. Inkubowano mieszaninę przez 12-16 godzin w zaciemnionym miejscu, w temperaturze pokojowej. Przed wykonaniem pomiaru roztwór rozcieńczono wodą redestylowaną tak, żeby jego absorbancja mieściła się w zakresie 700~200, przy długości fali  $\lambda=734$  nm.

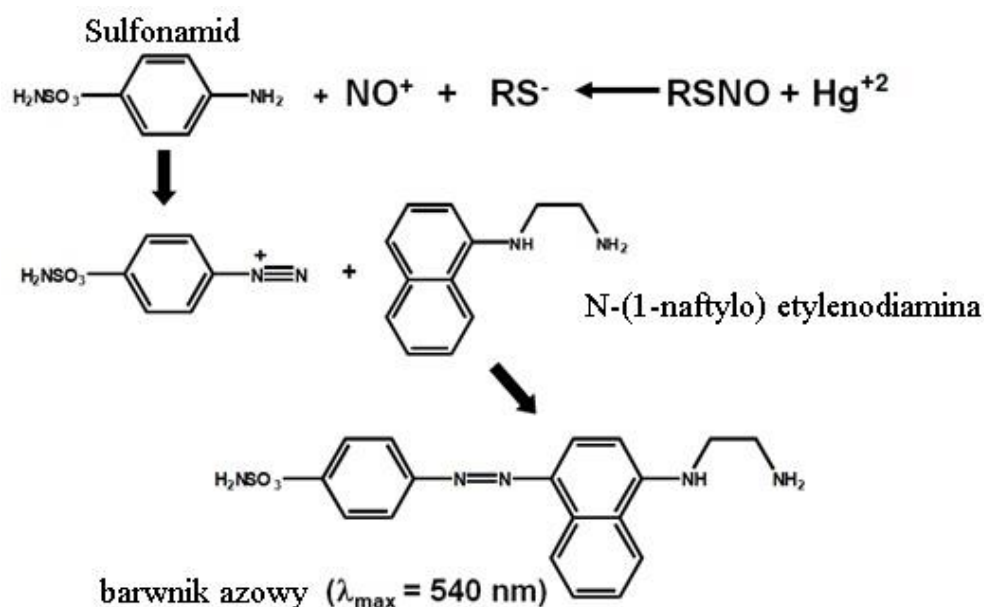
Zmieszano 50  $\mu\text{l}$  próby lub standardu z 1 ml roztworu mieszaniny i po upływie 6 minut w temperaturze 25° C dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda=734$  nm.

#### 4.2.10 Białko nitrozylowane

Nitrozyłacja grup tiolowych ( $-SH$ ) obecnych przede wszystkim w białkach została z powodzeniem wykorzystana jako biologiczny marker nasilenia stresu oksydacyjnego. Dzięki stosunkowo wysokiemu stężeniu białek we krwi oraz stabilności zmodyfikowanych łańcuchów polipeptydowych, pomiar stężenia nitrozylowanych białek jest oceniany jako bardzo przydatny marker stresu oksydacyjnego.

##### Zasada metody:

Reakcja Saville/Griess wykorzystuje reakcję barwną z barwnikiem azowym i zmianę absorbancji przy długości fali  $\lambda=540$  nm (*rycina 10*).



Rycina 10. Reakcja Saville/ Griess

##### Sprzęt i aparatura:

- wirówka, Heraeus Primo R Centrifuge, Thermo Scientific
- spektrofotometr, Shimadzu UV, 1610

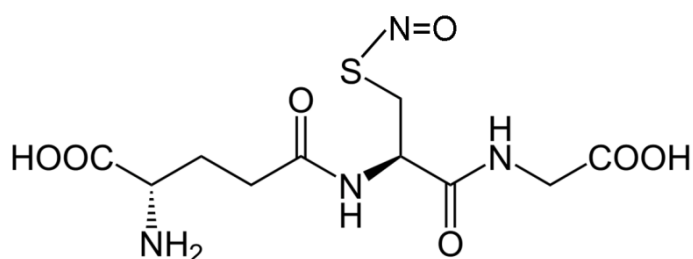
##### Odczynniki do syntezy S-nitrozoglutationu (GSNO), (*rycina 11*):

- 220 mM glutation (GSH) (*rycina 7*)
- 220 mM azotan(III) sodu
- 4 N kwas solny

- 4 N wodorotlenek sodu

#### Odczynniki do analizy:

- zsyntetyzowany GSNO jako standard, rozcieńczony 1:10 z wodą
- bufor fosforanowy (PBS), pH=7,4
- 0,4 M kwas solny
- 0,4 M kwas siarkowy(VI)
- 0,5% . sulfaminian amonu
- 0,38% N-naftyetylenodiamina
- 0,25% chlorek rtęci (II) + 2,55% sulfanilamid



Rycina 11. S-nitrozoglutation (GSNO)

#### Przygotowanie krzywej wzorcowej:

Odczytano długość fali przy pikie zsyntetyzowanego GSNO i odpowiadającą mu absorbancję. Korzystając z wartości absorbancji, używając molarnego współczynnika (= 15) obliczono stężenie GSNO. Przygotowano roztwór o stężeniu 2 mM, z którego pobrano kolejno: 0, 5, 10, 20  $\mu\text{l}$  i rozcieńczono wodą do objętości 400  $\mu\text{l}$ .

#### Tok analizy:

Białka S-nitrozylowane (98) zostały oznaczone ilościowo metodą Saville (99).

40  $\mu\text{L}$  surowicy zakwaszono przez dodanie 200  $\mu\text{L}$  0,2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Po 2 min. dodawano 200  $\mu\text{L}$  0,5% roztworu sulfaminianu amonu, po kolejnych 3 min. - mieszaninę 0,25%  $\text{HgCl}_2$  i sulfanilamidu 2,55% w 0,4N HCl w ilości 160  $\mu\text{L}$ , a następnie 160  $\mu\text{L}$  roztworu 0,38% N-1-naftyetylenodiaminy w 0,4N HCl. Po 5 min. mierzono absorbancję przy  $\lambda=540$  nm. Poziom białka nitrozylowanego wyznaczono przez ekstrapolację z krzywej wzorcowej (standard-GSNO), a wyniki zostały znormalizowane względem całkowitej ilości białka (dane z testu Bradforda) i wyrażone jako mikromole S-nitrozylowanego białka w mg białka całkowitego. Każdą próbkę analizowano dwukrotnie.

#### 4.2.11 Azotyny

##### Zasada metody

Tlenek azotu (NO) jest bardzo reaktywnym rodnikiem, który bierze udział w wielu ważnych procesach zachodzących w organizmie. NO powstaje jako wynik reakcji oksydacji argininy, katalizowanej przez syntetazę tlenku azotu. Bierze on udział w aktywacji białek regulacyjnych. Wykonując opisane oznaczenia przy zastosowaniu metody Griess, wykrywa się obecność związków organicznych zawierających azotyny (100).

##### Odczynniki

- 175 mM siarczan (VI) cynku
- 1 mM kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)
- 50 mM kwas 2-[N-morfolino]jetanosulfonowy (MES)
- 0,2 % sulfanilamid
- 0,2 % N-naftylenodiamina
- bufor fosforanowy (PBS) o pH=7,4

##### Przygotowanie krzywej wzorcowej

Rozpuszczono 0,69 g  $\text{NaNO}_2$  w 100 ml buforu fosforanowego. Z tego pobrano 1 ml roztworu i uzupełniono do 10 ml buforem PBS (roztwór azotynu 10 mM). Kolejne rozcieńczenia wykonano według schematu zaprezentowanego w tabeli 8.

Tabela 8. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu azotynu sodu.

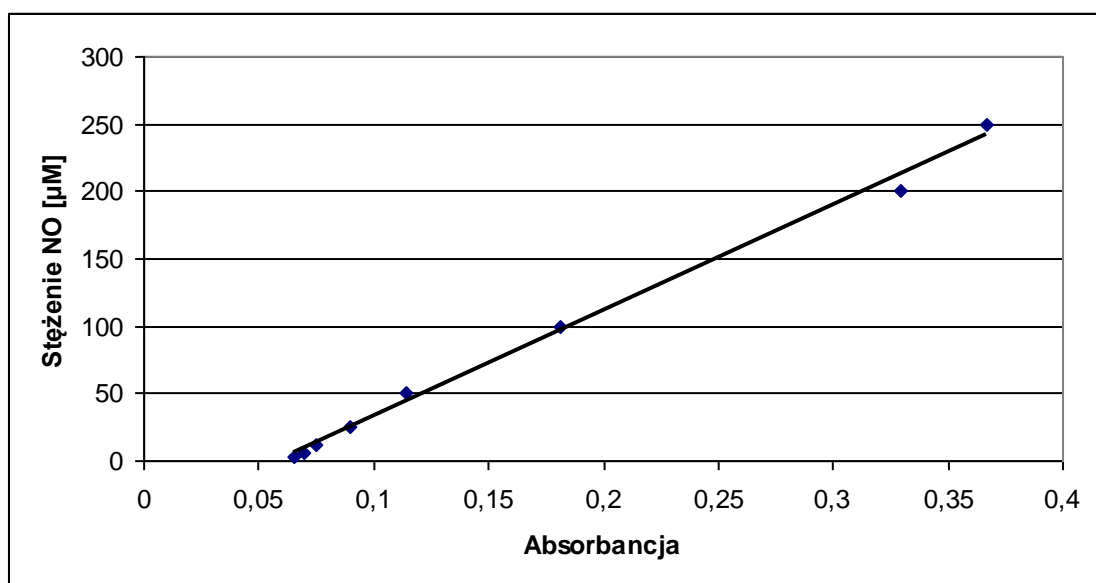
Rozcieńczenie	Przygotowanie	Otrzymane stężenie
1	1 ml roztworu (10 mM) + 9 ml PBS	1 mM
2	1 ml roztworu (1 mM) + 4 ml PBS	200 $\mu\text{M}$
3	1 ml roztworu (1 mM) + 3 ml PBS	250 $\mu\text{M}$
4	1 ml roztworu 200 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	100 $\mu\text{M}$
5	1 ml roztworu 100 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	50 $\mu\text{M}$
6	1 ml roztworu 50 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	25 $\mu\text{M}$
7	1 ml roztworu 25 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	12,5 $\mu\text{M}$
8	1 ml roztworu 12,5 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	6,25 $\mu\text{M}$
9	1 ml roztworu 6,25 $\mu\text{M}$ + 1 ml PBS	3,125 $\mu\text{M}$

W kolejnym etapie z każdego rozcieńczenia pobierano próbkę 200 µl, do której dodawano 40 µl ZnSO<sub>4</sub> i mieszano. Następnie pobierano 70 µl roztworu i postępowano według oznaczenia.

Wykreślono krzywą wzorcową (rycina 12), której wartości przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Wartości stężenia i absorbancji prób wzorcowych tlenku azotu

Wzorzec	Stężenie [µM]	Absorbancja
1	250,0	0,367
2	200,0	0,329
3	100,0	0,181
4	50,0	0,114
5	25,0	0,09
6	12,5	0,075
7	6,25	0,07
8	3,25	0,065



Rycina 12. Rycina krzywej wzorcowej tlenku azotu;  $y = 782,71 x - 45,434$ ; współczynnik korelacji  $R^2=0,09956$

### Przebieg oznaczenia

Pobrano 200 µl osocza i dodano 40 µl 175 mM ZnSO<sub>4</sub>. Wirowano przez 5 minut z szybkością 6000 obr./min. w celu odbiałczania próbki.

Pobrano 70  $\mu\text{l}$  nadsączu, do którego dodano kolejno 200  $\mu\text{l}$  roztworu EDTA oraz 200  $\mu\text{l}$  roztworu MES i wymieszano. Następnie dodano 300  $\mu\text{l}$  roztworu sulfanilamidu i 300  $\mu\text{l}$  roztworu N-naftylenodiaminy i dalej wymieszano. Absorbancję mierzono po upływie 5 minut przy długości fali  $\lambda=540$  nm.

#### **4.2.12. Gazometria krwi pępowinowej**

Do dwóch kapilar heparynizowanych pobrano osobno krew z żyły i tętnicy pępowinowej. Badanie gazometryczne wykonano na aparacie Ciba-Corning będącym na wyposażeniu Oddziału Porodowego GPSK.

### **4.3 Obliczenia statystyczne**

Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistical10 firmy StatSoft oraz StaXact9 firmy Cytel. Jako poziom istotności przyjęto  $\alpha=0,05$ . Wynik uznano za istotny statystycznie, gdy  $p<\alpha$ . Do porównania zmiennych zmierzonych na skali interwałowej, mających rozkład zgodny z rozkładem normalnym oraz równe wariancje zastosowano test t-Studenta lub test analizy wariancji dla prób niepowiązanych. Dla zmiennych zmierzonych na skali interwałowej, ale nie mających rozkładu zgodnego z normalnym lub zmierzonych na skali porządkowej zastosowano test Manna-Whitneya lub Kruskala-Walisa. Do porównania zmiennych powiązanych zastosowano test t-Studenta (dla zmiennych mających rozkład zgodny z normalnym) oraz test Wicoxona. Do zbadania zależności pomiędzy zmiennymi zmierzonymi na skali interwałowej zastosowano współczynnik korelacji liniowej r Pearsona (dla zmiennych mających rozkład zgodny z normalnym) oraz współczynnik korelacji rangowej  $r_s$  Spearmana. Dla zbadania zależności pomiędzy zmiennymi zmierzonymi na skali nominalnej zastosowano testy:  $\chi^2$ ,  $\chi^2$  z poprawką Yatesa oraz Fishera-Freemana-Haltona.



## 5 Wyniki i ich omówienie

Prezentowane badanie zostało przeprowadzone u 106 kobiet w wieku od 18 do 42 lat (średnia 30,1, mediana 30 lat). Wiek w poszczególnych grupach był porównywalny i przedstawiony został w tabeli 10.

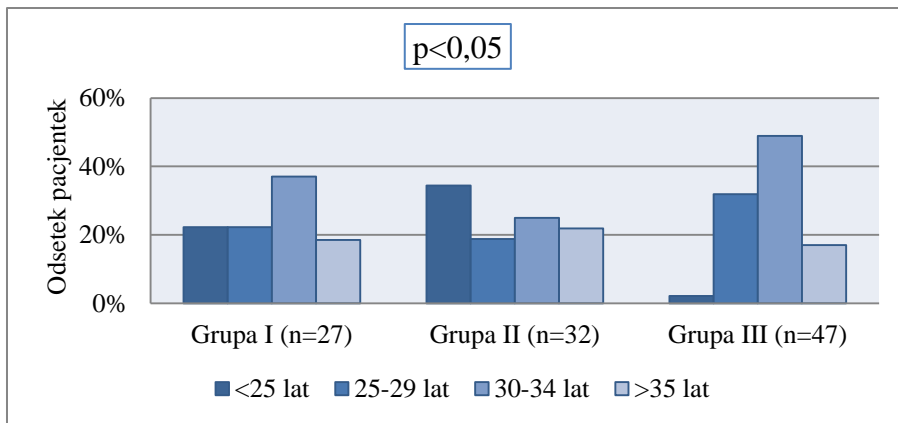
Tabela 10. Rozkład wieku pacjentek w poszczególnych grupach (p-ns)

		Wiek pacjentki w latach			
		Średnia	Mediana	Min	Maks
1	Grupa I (n=27)	29,4	30	20	39
2	Grupa II (n=32)	29,3	29	18	42
3	Grupa III (n=47)	31,1	31	24	41

Do badania włączono kobiety, które urodziły między 37 a 41+6 tygodniu ciąży, czyli porody w ciąży donoszonej. Średni czas trwania ciąży we wszystkich grupach badanych wynosił 39+2 tygodni (tabela 11). Zaobserwowałam jednak różnicę w częstości palenia pomiędzy 5-letnimi grupami wiekowymi pacjentek w poszczególnych grupach. Ciężarne narażone na dym tytoniowy najczęściej miały mniej niż 25 lub ponad 35 lat. Kobiety z grupy III najliczniej reprezentowały grupę wiekową pomiędzy 25 a 34 rokiem życia (rycina 13).

Tabela 11. Zaawansowanie wieku ciążowego u pacjentek w momencie (p-ns)

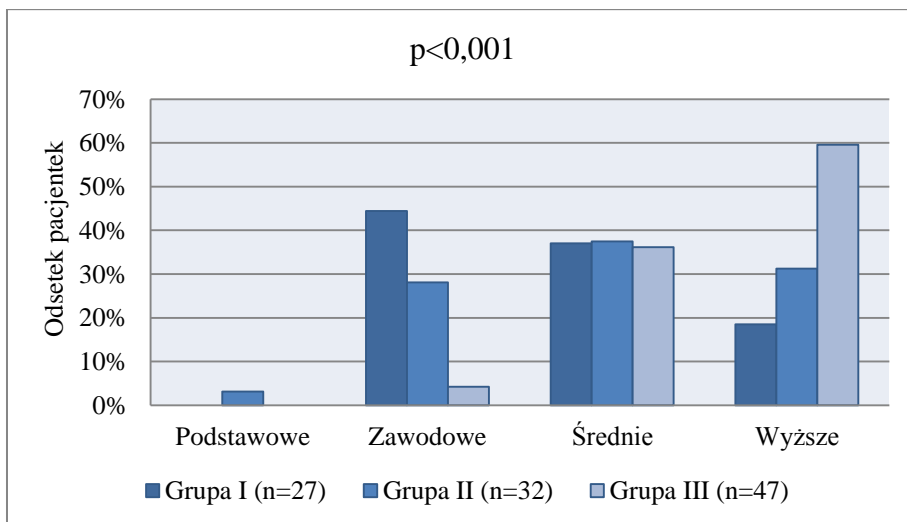
		Wiek ciążowy			
		Średnia	Mediana	Min	Maks
1	Grupa I (n=27)	39+2	39+4	37+2	41+5
2	Grupa II (n=32)	39+3	39+4	37+1	41+5
3	Grupa III (n=47)	39+1	39+3	37+0	41+6



Rycina 13. Rozkład wieku pacjentek w poszczególnych grupach badanych;  $p < 0,05$

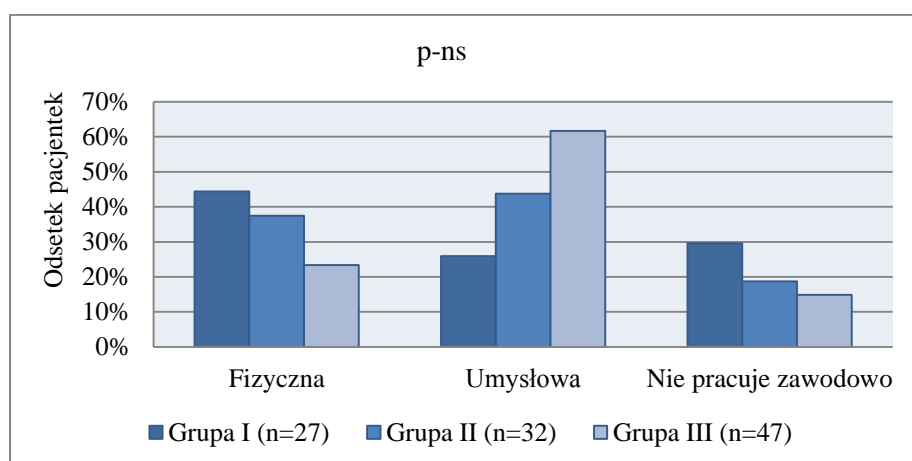
Analizując dane uzyskane z ankiety dotyczące statusu socjo-ekonomicznego pacjentek, podjęłam próbę scharakteryzowania każdej z grup badanych.

Ustaliłam, że wśród 106 kobiet poddanych badaniu wykształceniem wyższym legitymowało się 40% osób, średnim - 36,8%, podstawowym - 22,7%. Istotnie statystycznie więcej kobiet z wyższym wykształceniem deklarowało brak narażenia zarówno na aktywne jak i bierne palenie tytoniu w czasie ciąży ( $p < 0,001$ ) (rycina 14).



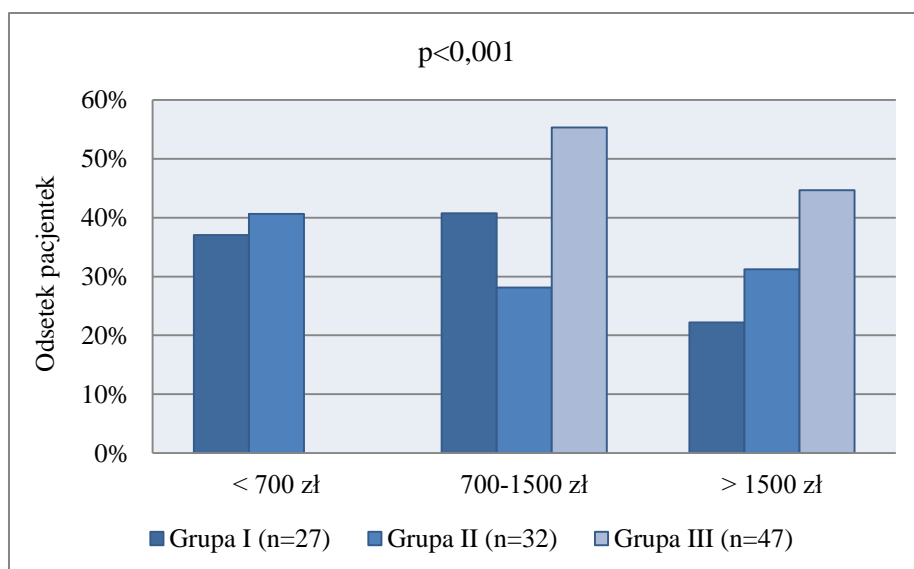
Rycina 14. Poziom wykształcenia ciężarnych w poszczególnych grupach ( $p < 0,001$ )

Rozpatrując charakter wykonywanej pracy zawodowej, zauważyłam, że kobiety niepalące w czasie ciąży najczęściej wykonywały pracę o charakterze umysłowym, natomiast kobiety czynnie palące w czasie ciąży - pracę fizyczną. Wśród badanych pacjentek 33,0% kobiet wykonywało pracę fizyczną, 47,2% umysłową, natomiast 19,9% ciężarnych nie pracowało zawodowo. Jednakże powyższa zależność nie była istotna statystycznie (rycina 15).



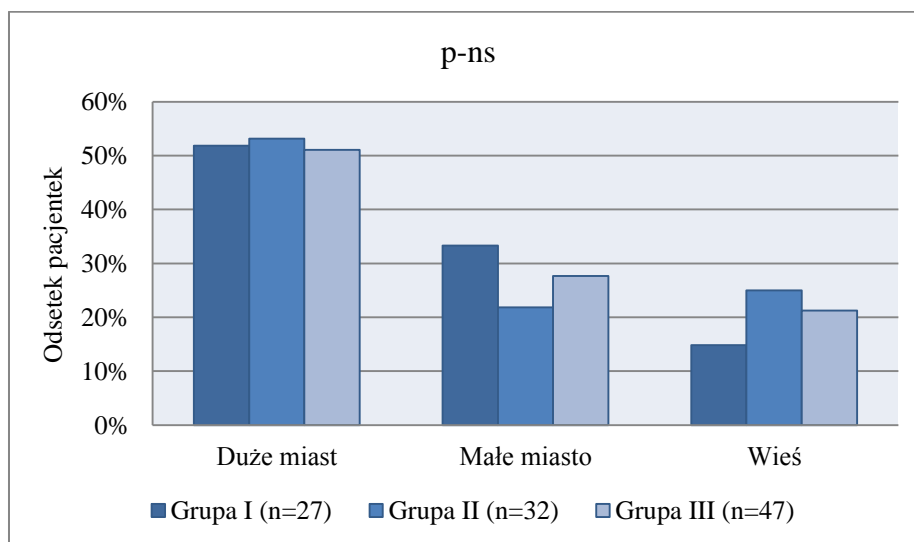
Rycina 15. Charakter wykonywanej pracy zawodowej w zależności od statusu tytoniowego (p-ns)

Na podstawie danych przedstawionych na Rycina 16., można poczynić ciekawą obserwację, dotyczącą sytuacji materialnej osób w poszczególnych grupach badanych. Narażenie na aktywne i bierne palenie papierosów w czasie ciąży, w podobnym odsetku, odnotowałam u kobiet pochodzących z rodzin bardziej i mniej zamożnych. Interesującym jest fakt, że kobiety nie narażone na wdychanie składników dymu w czasie ciąży, posiadały istotnie lepszy status ekonomiczny ( $p < 0,001$ ).



Rycina 16. Struktura narażenia na dym tytoniowy w zależności od dochodu przypadającego na jednego członka w rodzinie ( $p<0,001$ )

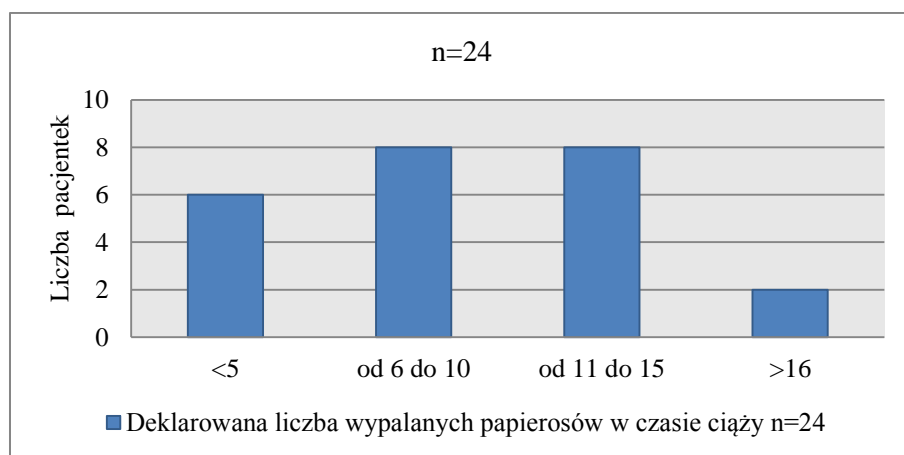
Poddałam również analizie charakter miejsca zamieszkania badanych kobiet ciężarnych. Odsetek pacjentek zamieszkujących tereny wiejskie i miejskie, był podobny i nie różnił się statystycznie pomiędzy grupami (rycina 17).



Rycina 17. Rodzaj miejsca zamieszkania pacjentek z podziałem na grupy badane ( $p-ns$ )

Bardzo istotną dla istoty przeprowadzonych badań, była deklaracja kobiet dotycząca ich aktywnego i biernego palenia papierosów przed obecną ciążą. W tym celu zebrałam z pacjentkami szczegółowy wywiad położniczy w aspekcie przeszłości położniczej. Opierając się na uzyskanych danych, podjęłam próbę oceny ewentualnego wpływu dymu tytoniowego na wystąpienie powyższych powikłań. Ustaliłam, że w całej grupie badanej, do regularnego palenia papierosów w przeszłości przyznawało się 35,8% kobiet, w tym 10 kobiet z grupy II i 2 kobiety z grupy kontrolnej. Na podstawie uzyskanych informacjach, obliczyłam, że wśród kobiet palących w przeszłości, odsetek poronień wynosił 28,9% vs 26,5% u kobiet niepalących (p-ns). Przeciwnie, do porodu przedwczesnego u palaczek dochodziło znacznie częściej [7,9% (3 razy u 38 pacjentek) vs 1,5% (1 raz w grupie 68 pacjentek) (p<0,01)].

W przeprowadzonej ankiecie wśród pacjentek rodzących, do aktywnego palenia w czasie całego okresu trwania obecnej ciąży, przyznały się 24 kobiety (22,6%). Spośród kobiet palących przed ciążą, około 1/3 (36,8%) aktywnych palaczek, zdecydowała się na zaprzestanie nałogu palenia papierosów w ciągu 40 tygodni ciąży. Kluczowym momentem, w którym badane pacjentki podejmowały decyzję o zerwaniu z nałogiem, najczęściej była pierwsza wizyta lekarska. Deklarowana średnia liczba dziennie wypalanych papierosów oscylowała wokół 10 sztuk (*rycina 18*).

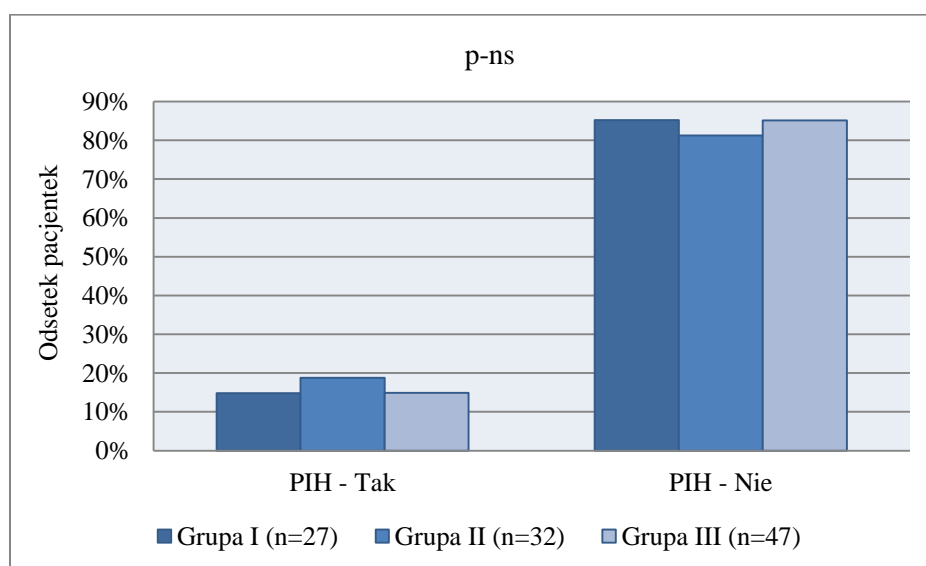


*Rycina 18. Deklarowana liczba dziennie wypalanych papierosów przez pacjentki w czasie obecnej ciąży*

Narażenie na bierne wdychanie dymu tytoniowego w czasie ciąży deklarowało 55 kobiet, co stanowi 51,9% wszystkich badanych kobiet, z czego 34 ciężarne wdychały dym wyłącznie z papierosów wypalanych przez inne osoby, natomiast 21 kobiet przyznawało się do biernego, obok aktywnego palenia tytoniu. Najczęściej podawanym miejscem ekspozycji na ETS było własne środowisko domowe.

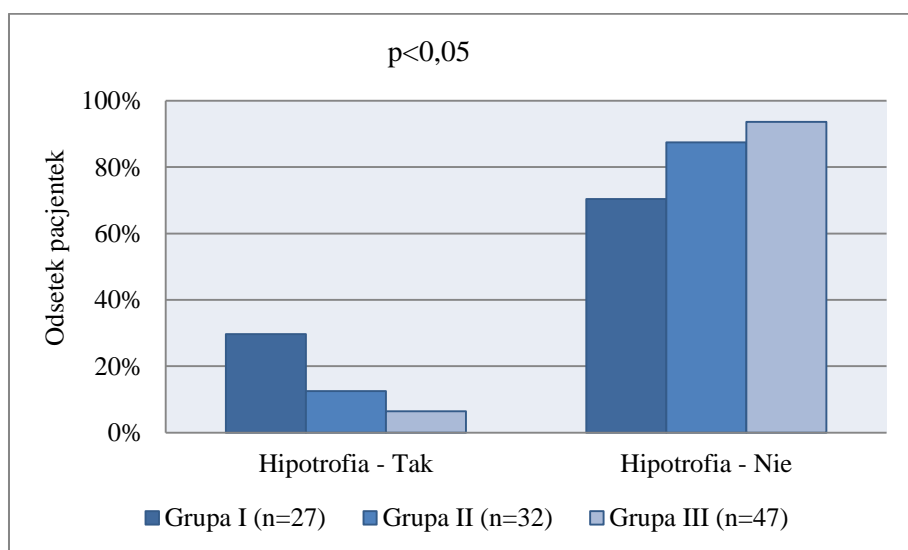
U 33,0% kobiet obserwowano wystąpienie różnego typu objawów i schorzeń wikłających przebieg ciąży. Najczęściej spotykanymi komplikacjami były plamienia i krwawienia z dróg rodnych, niedoczynność tarczycy, nadciśnienie ciążowe, cukrzyca ciążowa, przedwczesna czynność skurczowa macicy. Status nikotynowy badanych pacjentek nie miał związku z wystąpieniem powyższych powikłań.

Wśród 106 poddanych badaniu kobiet ciężarnych u 17 (16,0 %) zdiagnozowano nadciśnienie ciążowe (u czterech pacjentek z gr I – 14,8%; sześciu z gr II – 18,7%; siedmiu z gr III – 14,8%). Ryzyko rozwoju nadciśnienia w czasie ciąży nie było zależne od narażenia na składniki dymu tytoniowego (*rycina 19*). Spośród kobiet z nadciśnieniem, z powodu znamienego białkomoczu powyżej 300 mg/24 h, u trzech pacjentek, postawiono rozpoznanie PE (u dwóch kobiet narażonych na ETS w 21. i 24. t.c. oraz u jednej kobiety palącej papierosy w 35. t.c).



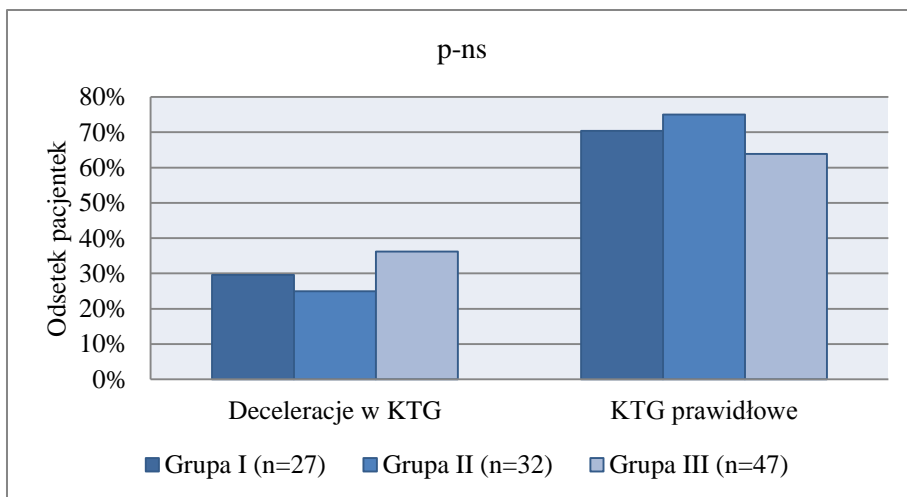
*Rycina 19. Rozwój nadciśnienia ciążowego w zależności od narażenia na dym tytoniowy w czasie ciąży (p=ns)*

Do powikłania przebiegu ciąży w postaci zaburzeń wzrastania płodu (IUGR) doszło u 15 (14,2%) kobiet. Wdychanie dymu papierosowego wiązało się z istotnym zwiększeniem ryzyka rozwoju hipotrofii u płodu ( $p < 0,05$ ). Na rozwój tej patologii najbardziej narażone były kobiety aktywnie palące papierosy w czasie ciąży (*rycina 20*). Hipotrofię rozpoznano u 35% (6 z 17) pacjentek, u których rozwinęło się nadciśnienie, natomiast tylko u 10% (9 z 89) pacjentek, u których ciśnienie tętnicze krwi było prawidłowe ( $p < 0,05$ ).



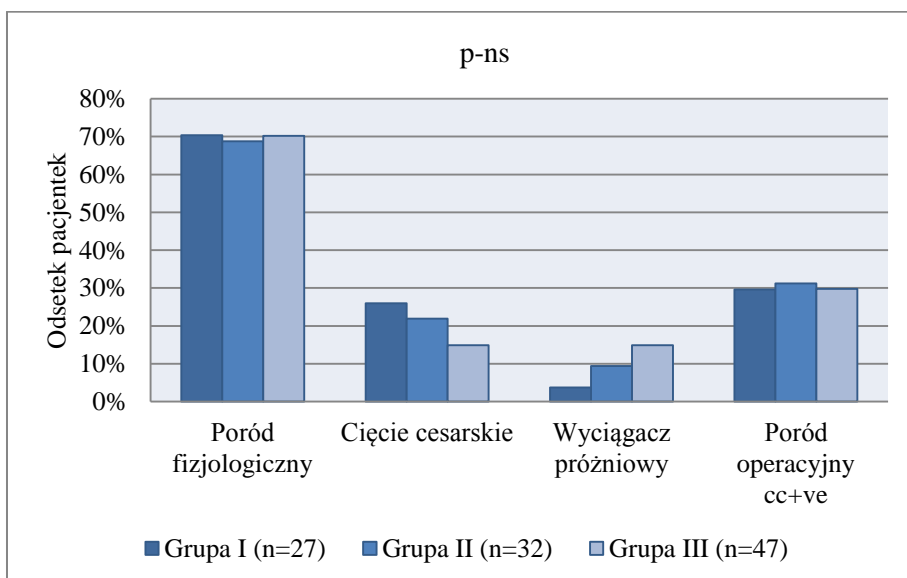
*Rycina 20. Rozpoznanie hipotrofii płodu w zależności od narażenia na dym tytoniowy w czasie ciąży (gr I vs gr III,  $p < 0,05$ )*

Jednym z wykładników prawidłowo przebiegającego porodu jest brak wykładników zagrożenia płodu w badaniu kardiokograficznym (KTG). U 32,1% pacjentek w śródporodowym zapisie KTG obserwowano deceleracje. Wystąpienie kardiokograficznych objawów zagrożenia życia płodu okazało się nie mieć związku z paleniem tytoniu przez pacjentki w czasie trwania ciąży ( $p$ -ns) (*rycina 21*).



Rycina 21. Odsetek pacjentek, u których zarejestrowano deceleracje w KTG w czasie porodu (p-ns)

W kolejnym etapie badań poddałam analizie dane dotyczące sposobu ukończenia porodu. U 69,8% pacjentek ciąża została zakończona porodem fizjologicznym, u 19,8% kobiet - cięciem cesarskim, natomiast u 10,4% porodem operacyjnym z zastosowaniem wyciągacza próżniowego. Charakter operacyjny porodu (cięcie cesarskie lub poród operacyjny drogą pochwową) odbył się u 32 (30,2%) kobiet ciężarnych. Metody operacyjne ukończenia porodu zastosowano równie często w poszczególnych grupach (p-ns) (rycina 22).



Rycina 22. Rodzaj porodu u pacjentek z poszczególnych grup (p-ns)

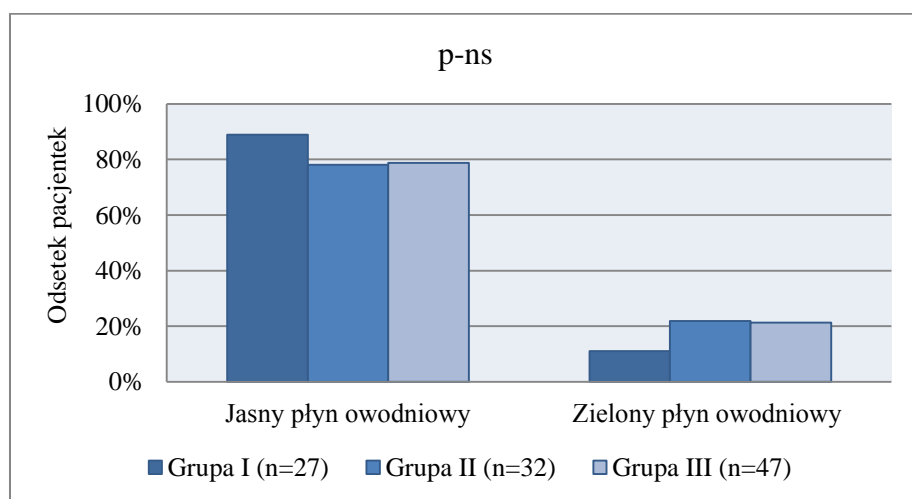


Dodatkowo, oceniłam charakter wskazań lekarskich do operacyjnego ukończenia porodu, ze względu na stopień pilności sytuacji klinicznej. Nie zaobserwowałam, aby palenie tytoniu zwiększało ryzyko operacyjnego ukończenia porodu ze wskazań nagłych (101) (tabela 12).

Tabela 12. Liczba porodów operacyjnych wykonanych w trybie nagłym w poszczególnych grupach (p-ns)

<b>Operacyjne ukończenie porodu ze wskazań nagłych</b>			
	TAK	NIE	%
<b>Grupa I (n=27)</b>	4	23	14,8%
<b>Grupa II (n=32)</b>	6	26	18,6%
<b>Grupa III (n=47)</b>	6	41	12,8%

Istotną informacją dla położnika i neonatologa, mogąca świadczyć o wewnątrzmacicznym niedotlenieniu płodu, jest ustalenie zabarwienia płynu owodniowego, w trakcie i po porodzie. Spośród 106 analizowanych porodów, obecność zielonego płynu owodniowego odnotowałam w 20 przypadkach. Ustaliłam, że palenie papierosów nie zwiększało ryzyka przedwczesnego wydalania smółki przez płód (p-ns) (rycina 23).

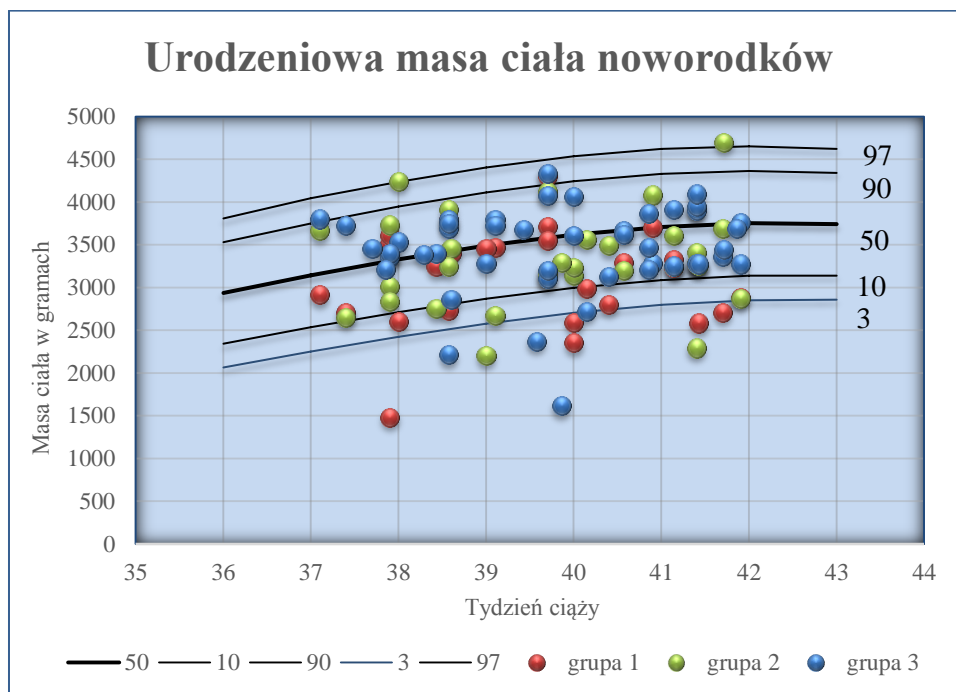


Rycina 23. Obecność zielonego płynu owodniowego w okresie okołoporodowym w poszczególnych grupach (p-ns)

W następnej części badań dokonałam oceny masy urodzeniowej dzieci. *Tabela 13* przedstawia rozkład masy urodzeniowej noworodków w poszczególnych grupach. Najmniejsze dzieci rodziły pacjentki aktywnie palące papierosy w czasie ciąży. Różnica masy ciała noworodków była statystycznie znamienne dla kobiet z grupy I w stosunku do pacjentek z grupy III ( $p < 0,05$ ). *Rycina 24* prezentuje wartości urodzeniowej masy ciała noworodków na tle siatki centylowej opracowanej dla regionu Wielkopolski i Ziemi Lubuskiej (42).

*Tabela 13. Rozkład masy urodzeniowej noworodków w poszczególnych grupach (gr I vs gr III;  $p < 0,05$ )*

		Urodzeniowa masa noworodków w gramach				
		Średnia	SD	Min	Maks	Mediana
1	Grupa I; n=27	3117	496	1480	4300	3240
2	Grupa II; n=32	3324	549	2200	4700	3250
3	Grupa III; n=47	3456	567	1610	4330	3470



*Rycina 24 Urodzeniowa masa ciała noworodków na tle siatki centylowej opracowanej dla regionu Wielkopolski i Ziemi Lubuskiej wg. Gadzinowskiego i wsp.(42)*

Według opublikowanych przez PTG zaleceń, standardowo w oddziałach porodowych, bezpośrednio po każdym odbytym porodzie, dokonuje się pomiaru parametrów równowagi kwasowo-zasadowej z krwi pobranej zarówno z tętnicy jak i z żyły pępowinowej (102). Wyniki przedstawiłam w tabeli 14.

Tabela 14. Parametry równowagi kwasowo-zasadowej tętnicznej i żylniej krwi pępowinowej w poszczególnych grupach (p-ns)

		Równowaga kwasowo-zasadowa				
		Tętnica pępowinowa		Żyła pępowinowa		
		pH	BE	pH	BE	
1	Grupa I (tętnica n=27; żyła n=25)	Średnia	7,27	-2,8	7,33	-3,4
		SD	0,09	3,20	0,09	4,67
		(min-maks)	(7,04-7,46)	(-11,3-2,0)	(7,08-7,51)	(-21,6-0,9)
2	Grupa II (tętnica n=32; żyła n=30)	Średnia	7,27	-4,54	7,35	-3,2
		SD	0,07	3,09	0,05	3,08
		(min-maks)	(7,09-7,40)	(-15,2-1,1)	(7,2-7,4)	(-11,6-0,9)
3	Grupa III (tętnica n=47; żyła n=44)	Średnia	7,26	-4,05	7,32	-3,62
		SD	0,07	3,12	0,08	2,73
		(min-maks)	(7,10-7,38)	(-11,3-1,5)	(7,14-7,45)	(-9,7-3,8)

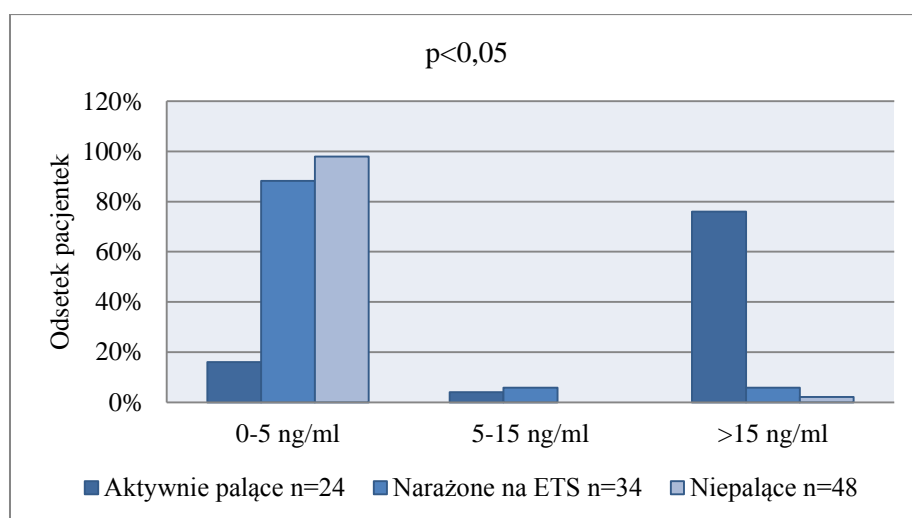
W siedmiu pobranych próbach nie udało się wykonać badania z przyczyn technicznych (skrzep w próbce).

Kwasicę okołoporodową, z pH 7,04 i BE -11,3 w tętnicy i pH 7,08 oraz BE -13,2 w żyły pępowinowej, obserwowano w jednym przypadku u pacjentki z grupy I, u której wykazano bardzo wysoki poziom kotyniny w surowicy.

Stan urodzeniowy noworodków oceniany w skali Apgar nie różnił się istotnie w poszczególnych grupach badanych. Średnia punktacja przyznawana zarówno w 1 jak i w 5 minucie życia dzieci wynosiła 10 punktów w każdej z grup. Nie stwierdziłam również aby liczba dziennie wypalanych papierosów miała wpływ na przyznawaną punktację w skali Apgar u noworodka.

Po dokonaniu oznaczeń stężenia kotyniny w surowicy kobiet ciężarnych oraz we krwi pępowinowej pobranej bezpośrednio po porodzie, dokonałam analizy wyników w poszczególnych grupach. Kotyninę wykryto w surowicy krwi 83,3% kobiet deklarujących

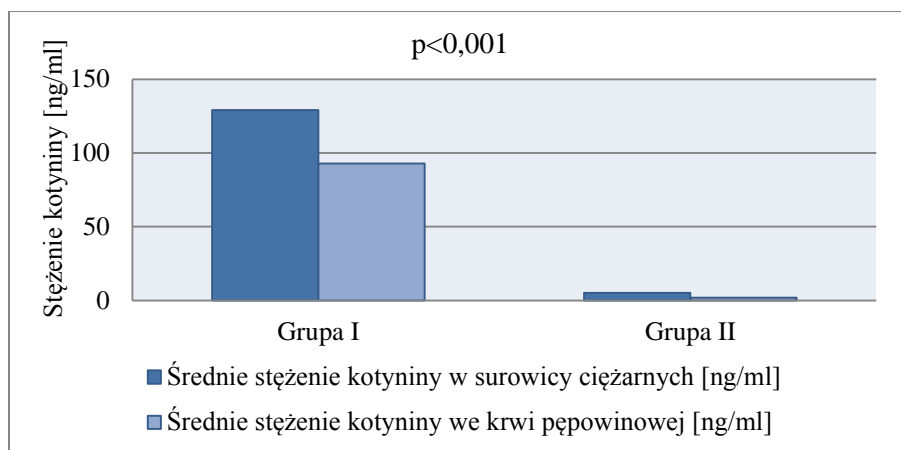
aktywne palenie papierosów w czasie ciąży (średnio 122,4 ng/ml; 0-391 ng/ml), u 12,1% kobiet deklarujących narażenie na ETS (średnio 17,5 ng/ml; 0-252 ng/ml) oraz u 2% kobiet negujących kontakt z dymem tytoniowym na poziomie 92 ng/ml. Stężenie kotyniny we krwi pępowinowej powyżej poziomu wykrywalności stwierdzono u 88% kobiet przyznających się do palenia papierosów (średnie stężenie 85,7 ng/ml; 0-299,5 ng/ml), u 17,6% biernych palaczek (średnie stężenie 12,1 ng/ml; 0-198,2 ng/ml) oraz u 4% kobiet negujących kontakt z dymem (rycina 25).



Rycina 25. Stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych w zależności od danych uzyskanych z ankiety

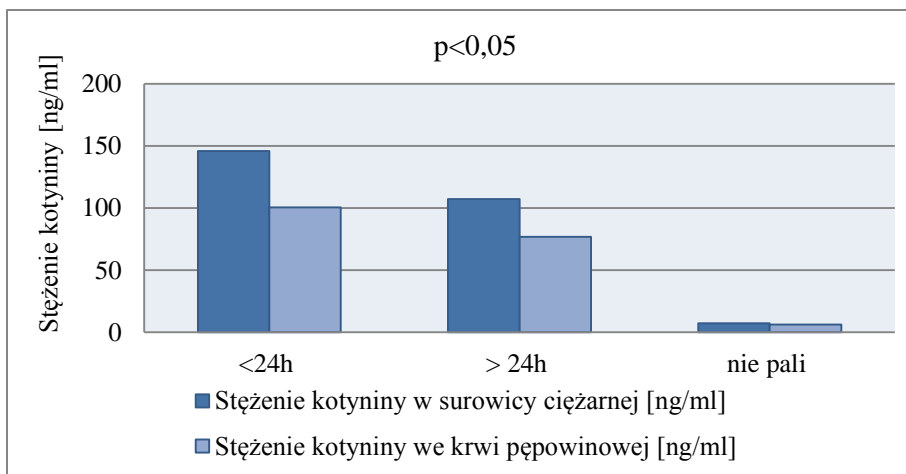
Porównałam zgodność informacji zebranych w ankiecie dotyczących palenia ze stężeniem kotyniny, czyli biomarkera narażenia na dym tytoniowy. Ze względu na znaczne stężenie kotyniny (>100ng/ml) w surowicy dwóch kobiet oraz >80 ng/ml we krwi pępowinowej w trzecim przypadku, zdecydowano o przeniesieniu i analizowaniu danych dwóch pacjentek deklarujących bierne narażenie na dym oraz jednej negującej kontakt z dymem, do grupy kobiet czynnie palących papierosy w trakcie obecnej ciąży. Rycina 26 przedstawia średnie stężenie kotyniny w surowicy matki oraz we krwi pępowinowej w grupie I i II. Różnice istotne statystycznie odnotowałam zarówno dla stężeń kotyniny w surowicy ciężarnych, jak i w surowicy krwi pępowinowej pomiędzy grupą I a grupą II a także pomiędzy grupą I a grupą III ( $p<0,001$ ). Zarejestrowałam również istotne statystycznie

różnice pomiędzy stężeniem kotyniny w surowicy matki w stosunku do jej stężenia we krwi pępowinowej w grupie kobiet aktywnie oraz biernie palących papierosy ( $p < 0,05$ ).



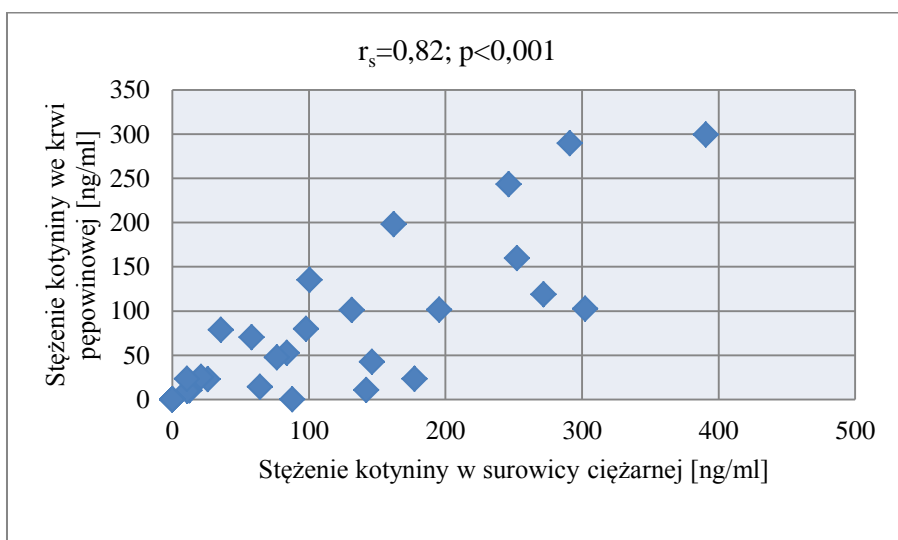
Rycina 246. Średnie stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej [ng/ml]; gr I vs gr II  $p < 0,001$ ; gr I vs gr III  $p < 0,001$ ; stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych vs stężenie kotyniny we krwi pępowinowej  $p < 0,05$

Podjęłam próbę ustalenia, czy deklarowany przez kobiety czas, jaki upłynął od wypalenia ostatniego papierosa, miał wpływ na poziom biomarkera tytoniu – kotyniny we krwi. Średnie stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych nie różniło się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentkami, które wypaliły ostatniego papierosa w ciągu ostatniej doby w porównaniu do tych, które ostatniego papierosa wypaliły dawniej niż przed 24 godzinami (rycina 27). Istotną różnicę zaobserwowałam dla obu tych grup w porównaniu z pacjentkami, które negowały palenie w ciąży  $p < 0,05$ .



Rycina 257. Średnie stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej w zależności od czasu jaki upłynął od wypalenia ostatniego papierosa ( grupa "<24h" (n=15) vs "nie pali" (n=81)  $p<0,05$ ; ">24h" (n=9) vs "nie pali"  $p<0,05$ ; "<24h" vs ">24h" p-ns)

Stwierdziłam obecność dodatniej ( $r_s=0,82$ ) korelacji pomiędzy stężeniem kotyniny we krwi pępowinowej w stosunku do stężenia kotyniny w surowicy kobiet ciężarnych w grupie kobiet aktywnie palących papierosy. Odpowiednie dane przedstawiłam na rycinie 28.



Rycina 268. Zależność stężenia kotyniny we krwi pępowinowej w stosunku do stężenia kotyniny w surowicy ciężarnej [ng/ml],  $r_s=0,82$ ,  $p<0,001$

W kolejnym etapie mojej pracy, w celu określenia wpływu palenia tytoniu na środowisko rozwijającego się płodu, podjęłam próbę zbadania równowagi redoks, ze szczególnym uwzględnieniem środowiska wewnątrzmacicznego. Stężenia wybranych parametrów określających nasilenie stresu oksydacyjnego zostały oznaczone w surowicy ciężarnych, we krwi pępowinowej oraz w części matczynej i płodowej łożyska. Stężenia wybranych związków przedstawiłam w *tabelach 15, 16, 17 i 18*.

Dla stężeń żadnego z badanych parametrów stresu oksydacyjnego, zarówno w surowicy ciężarnych, we krwi pępowinowej, jak i w łożysku, nie wykazałam istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (p-ns).

Tabela 15. Stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy ciężarnych

Grupa	Badany parametr	Wybrane parametry stresu oksydacyjnego w surowicy ciężarnych			
		Średnia	Min	Max	SD
<b>I</b>	TBARS [ng/mg białka] (n=15)	108,42	19,74	390,79	99,03
	AGEs [U/FI/mg białka](n=13)	3,07	1,61	4,64	1,11
	AOPP [μmol/mg białka] (n=13)	1,65	0,47	3,14	0,82
	Nitrozylacja białek [μmol/mg białka](n=9)	0,67	0,19	1,47	0,48
<b>II</b>	TBARS [ng/mg białka] (n=16)	90,13	11,85	376,32	96,77
	AGEs [U/FI/mg białka](n=18)	4,27	1,77	19,39	4,00
	AOPP [μmol/mg białka] (n=18)	2,01	0,58	3,93	1,02
	Nitrozylacja białek[μmol/mg białka](n=13)	0,90	0,08	2,23	0,64
<b>III</b>	TBARS [ng/mg białka] (n=16)	135,12	10,53	414,47	130,54
	AGEs [U/FI/mg białka](n=27)	3,78	1,66	10,93	2,18
	AOPP [μmol/mg białka] (n=25)	1,65	0,40	7,59	1,52
	Nitrozylacja białek[μmol/mg białka](n=22)	0,89	0,15	3,33	0,88



Tabela 16. Stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego we krwi pępowinowej

Grupa	Badany parametr	Wybrane parametry stresu oksydacyjnego we krwi pępowinowej			
		Średnia	Min	Max	SD
<b>I</b>	TBARS[ng/mg białka] (n=15)	101,32	26,32	369,74	94,37
	AGEs[U/FI/mg białka](n=12)	3,22	1,28	7,39	1,79
	AOPP[μmol/mg białka] (n=10)	0,56	0,14	1,14	0,29
	Nitrozylacja białek[μmol/mg białka](n=11)	0,25	0,09	0,69	0,22
<b>II</b>	TBARS[ng/mg białka] (n=16)	79,61	26,32	180,26	37,64
	AGEs[U/FI/mg białka](n=16)	3,11	1,24	6,79	1,64
	AOPP[μmol/mg białka] (n=15)	0,56	0,24	1,57	0,34
	Nitrozylacja białek[μmol/mg białka](n=12)	0,34	0,04	1,31	0,36
<b>III</b>	TBARS[ng/mg białka] (n=21)	104,70	43,42	334,21	78,98
	AGEs[U/FI/mg białka](n=30)	3,26	1,38	10,82	2,05
	AOPP[μmol/mg białka] (n=27)	0,78	0,16	6,11	1,13
	Nitrozylacja białek[μmol/mg białka](n=22)	0,55	0,08	2,64	0,58

Tabela 17. Stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w części matczynej łożyska

Grupa	Badany parametr	Wybrane parametry stresu oksydacyjnego w części matczynej łożyska			
		Średnia	Min	Max	SD
<b>Grupa I</b>	TBARS [ng/mg białka](n=26)	1,154	0,211	3,094	0,61
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=26)	0,058	0,012	0,124	0,026
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=26)	0,881	0,280	1,737	0,284
	GST [U/mg białka](n=26)	0,060	0,008	0,157	0,036
	Nitrozyłacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=26)	7,631	3,684	11,032	1,556
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=21)	2,278	0,235	19,849	4,614
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=26)	8,867	4,476	16,798	2,605
<b>Grupa II</b>	TBARS [ng/mg białka](n=30)	1,422	0,104	4,611	0,992
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=31)	0,058	0,002	0,132	0,028
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=31)	0,932	0,101	1,975	0,354
	GST [U/mg białka](n=31)	0,066	0,016	0,140	0,030
	Nitrozyłacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=31)	8,506	5,926	15,690	2,071
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=25)	8,290	0,575	21,435	5,435
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=31)	8,797	4,657	14,920	2,505
<b>Grupa III</b>	TBARS [ng/mg białka](n=46)	1,479	0,202	3,182	0,768
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=46)	0,060	0,017	0,128	0,024
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=46)	0,965	0,357	1,898	0,355
	GST [U/mg białka](n=46)	0,058	0,021	0,124	0,024
	Nitrozyłacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=46)	7,758	4,076	11,990	1,871
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=39)	6,024	0,668	21,505	4,194
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=46)	9,652	4,728	19,770	3,850

Tabela 18. Stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w części płodowej łożyska

Grupa	Badany parametr	Wybrane parametry stresu oksydacyjnego w części płodowej łożyska			
		Średnia	Min	Max	SD
<b>Grupa I</b>	TBARS [ng/mg białka](n=25)	0,795	0,140	2,081	0,442
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=25)	0,056	0,015	0,128	0,028
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=25)	0,870	0,285	2,513	0,562
	GST [U/mg białka](n=26)	0,044	0,014	0,100	0,025
	Nitrozylacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=25)	7,578	3,667	24,824	4,290
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=21)	3,671	0,382	13,540	2,969
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=25)	8,648	2,171	16,773	3,673
<b>Grupa II</b>	TBARS [ng/mg białka](n=30)	0,927	0,047	3,554	0,832
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=30)	0,054	0,010	0,117	0,029
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=30)	0,755	0,107	1,999	0,462
	GST [U/mg białka](n=30)	0,046	0,008	0,132	0,025
	Nitrozylacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=30)	7,408	2,628	16,159	3,357
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=24)	4,664	0,109	17,637	4,067
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=30)	8,700	2,790	15,495	3,577
<b>Grupa III</b>	TBARS [ng/mg białka](n=43)	0,880	0,099	2,207	0,506
	GSH [ $\mu$ mol/mg białka](n=43)	0,058	0,018	0,124	0,027
	CAT [ $\mu$ U/mg białka](n=43)	0,819	0,002	1,722	0,355
	GST [U/mg białka](n=43)	0,049	0,005	0,118	0,027
	Nitrozylacja białek [ $\mu$ mol/mg białka](n=43)	7,742	3,177	14,524	2,828
	TEAC [ $\mu$ mol/mg białka](n=33)	5,900	0,250	15,133	3,943
	Azotyny [ $\mu$ mol/mg białka](n=43)	9,719	3,672	19,511	3,413

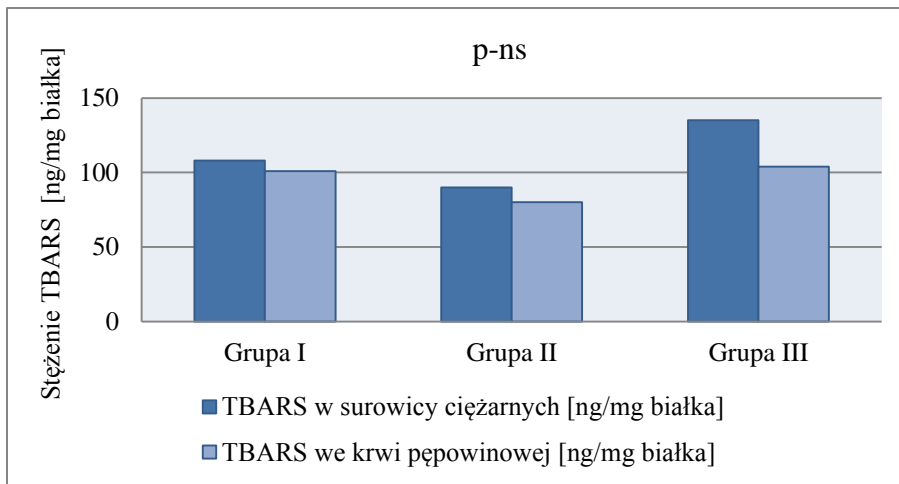
Podjęłam próbę określenia stopnia, w jakim wybrane substancje stresu oksydacyjnego przechodzą przez barierę łożyskową. Korelacje stężeń tych parametrów we krwi pępowinowej w stosunku do ich stężeń w surowicy ciężarnych przedstawiłam poniżej w tabeli 19. Analizując poniższe dane, stwierdziłam, że wraz ze wzrostem stężenia AGEs oraz białka nitrozylowanego w surowicy krwi matki, istotnie wzrastał ich poziom we krwi pępowinowej.

*Tabela 19. Korelacja pomiędzy stężeniami wybranych parametrów stresu oksydacyjnego we krwi pępowinowej w stosunku do ich stężenia w surowicy ciężarnych;  $r_s$  - rang Spearmana*

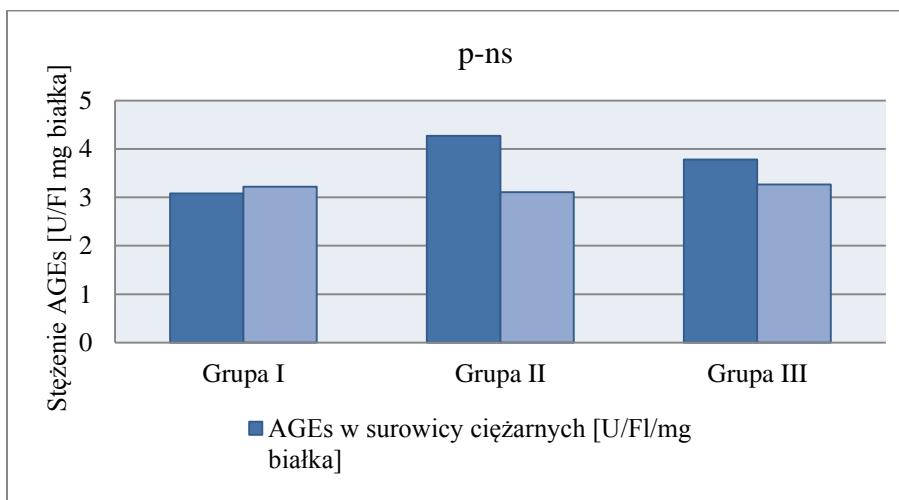
	<b>Badany parametr</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b><math>r_s</math> – rang Spearmana</b>
<b>1</b>	TBARS [ng/ml/mg białka]	29	p-ns	$r_s = 0,12$
<b>2</b>	Produkty utleniania białek [mmol/g białka]	31	p-ns	$r_s = 0,03$
<b>3</b>	Produkty glikacji białek [U/FI/mg białka]	37	<b>p&lt;0,05</b>	$r_s = 0,33$
<b>4</b>	Nitrozyłacja białek [ $\mu$ mol/mg białka]	40	<b>p&lt;0,01</b>	$r_s = 0,41$

Stężenie żadnego z badanych parametrów stresu oksydacyjnego zarówno w surowicy matki jak i we krwi pępowinowej (TBARS, AGEs, AOPP, białko nitrozylowane) nie różniło istotnie się pomiędzy grupami badanymi (*ryciny 29, 30, 31 i 32*).

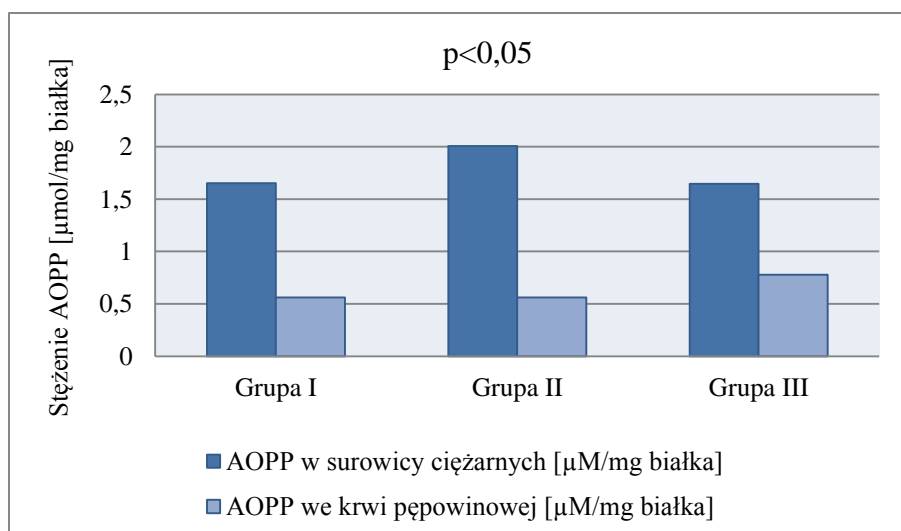
W kolejnym etapie zbadłam różnicę stężeń wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po obu stronach bariery łożyskowej. Analizując poziomy tych substancji w surowicy ciężarnej w stosunku do ich stężenia we krwi pępowinowej, stwierdziłam istotną różnicę w stężeniu AOPP w każdej z badanych grup (*rycina 31*) oraz w ilości białka nitrozylowanego szczególnie w analizowanych osobno grupach I i II (*rycina 32*). Poziomy obu tych substancji były istotnie niższe we krwi pępowinowej niż w surowicy ciężarnych. Stężenia TBARS oraz AGEs nie różniły się istotnie po obu stronach łożyska (*ryciny 29 i 30*).



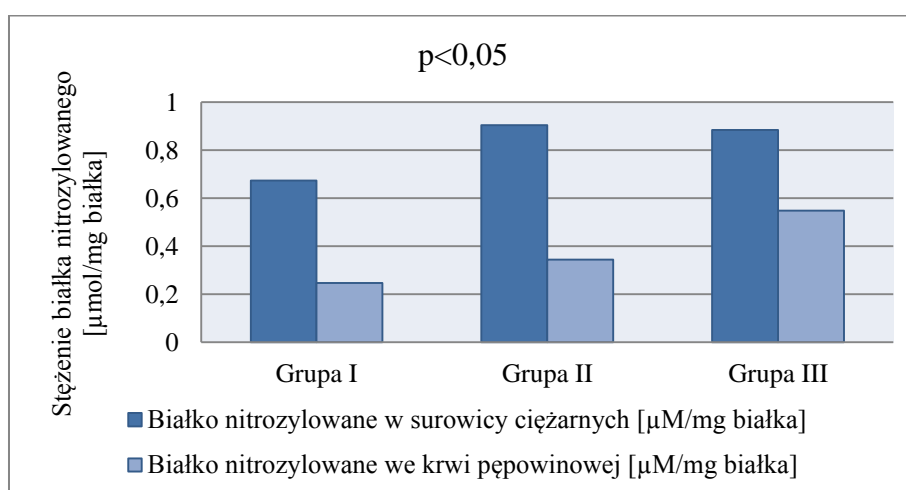
Rycina 279. Średnie stężenia TBARS w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej w poszczególnych grupach [ng/mg białka]



Rycina 30. Średnie stężenia AGEs w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej w poszczególnych grupach [U/FI/mg białka]



Rycina 31. Średnie stężenia AOPP w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej w poszczególnych grupach [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka]



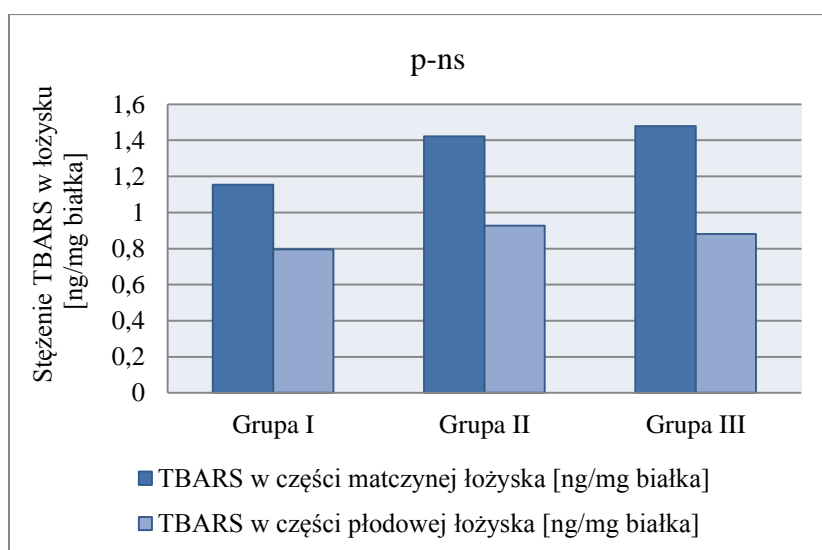
Rycina 282. Średnie stężenie białka nitrozylowanego w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej w poszczególnych grupach [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka]

Następnie podjęłam próbę analizy stężeń wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w łożyskach kobiet w poszczególnych grupach. Nie wykazałam różnic w stężeniu TBARS, GSH, CAT, GST, białka nitrozylowanego, TEAC oraz w łożysku pomiędzy grupami badanymi pacjentek (ryciny 33, 34, 35, 36, 37 i 38). Chociaż zaobserwowałam niższe stężenie azotynów zarówno u ciężarnych czynnie, jak i biernie palących papierosy, w

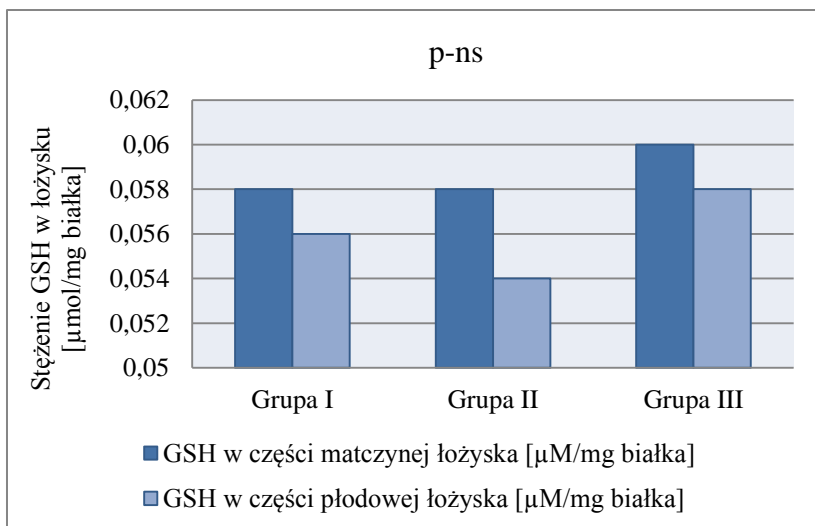
porównaniu do pacjentek nienarażonych na dym w czasie ciąży, to jednak różnica ta nie była istotna statystycznie (*rycina 39*).

Kolejnym krokiem było porównanie stężenia powyższych parametrów w części łożyska bliższej matce i bliższej dziecku. Nie wykazałam istotnych statystycznie różnic w stężeniu TBARS, GSH, CAT, białka nitrozylowanego oraz azotynów w części maczynej w stosunku do części płodowej w żadnej z badanych grup (*ryciny 33, 34, 35, 37, 39*).

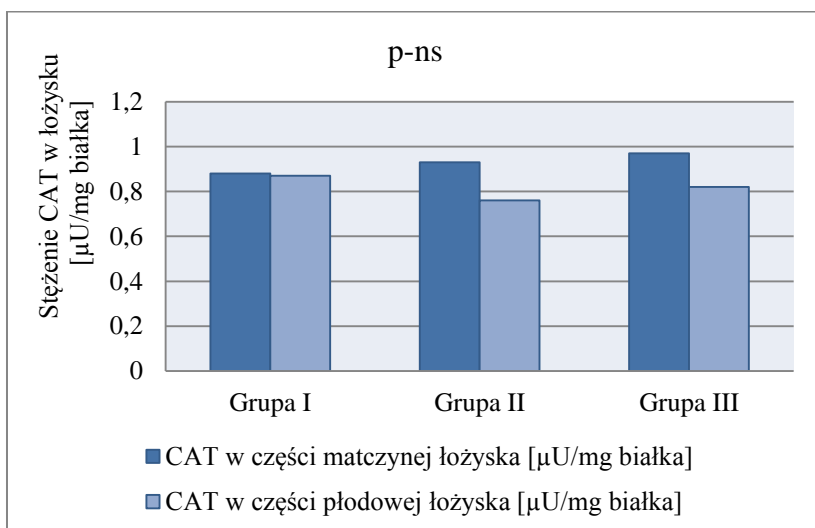
Stężenie GST oraz TEAC było istotnie wyższe w części maczynej łożyska niż w jego części płodowej, szczególnie w grupie pacjentek czynnie i biernie palących papierosy, natomiast różnica stężeń tych parametrów nie była znamienna w grupie pacjentek nienarażonych na dym (*ryciny 36 i 38*).



*Rycina 293. Średnie stężenia TBARS w części maczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [ng/mg białka]*

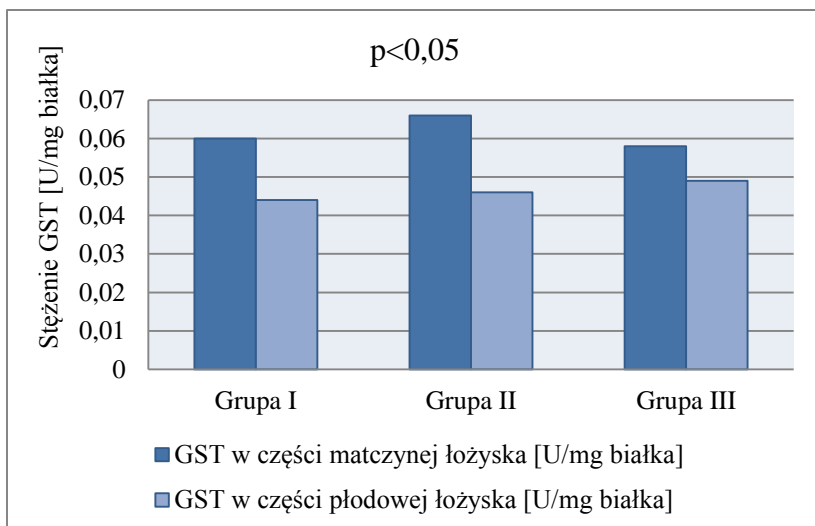


Rycina 304. Średnie stężenia GSH w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka]

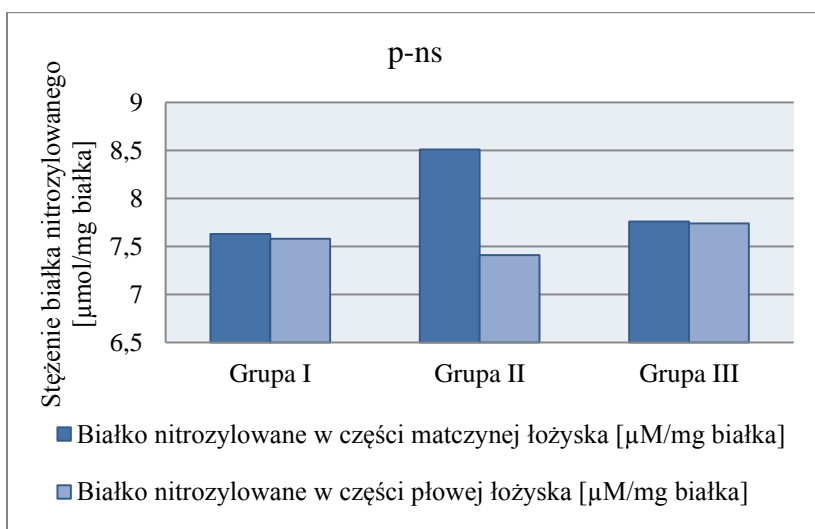


Rycina 315. Średnie stężenia CAT w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [ $\mu\text{U}/\text{mg}$  białka]

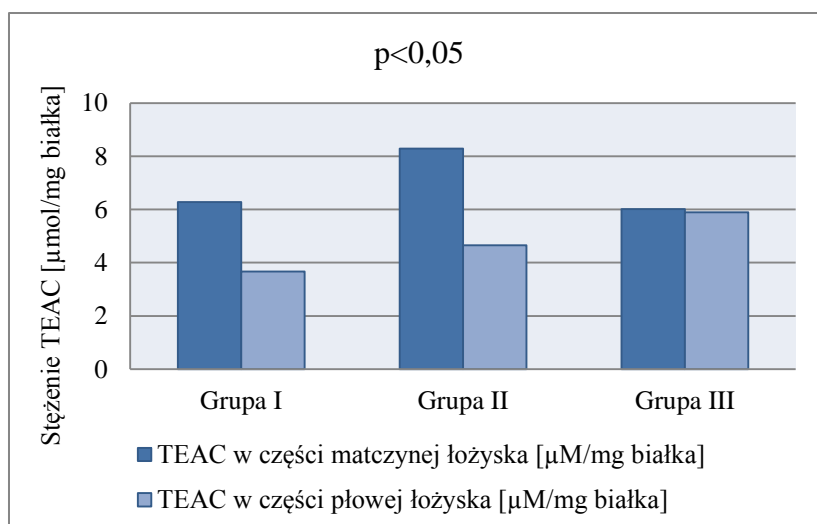




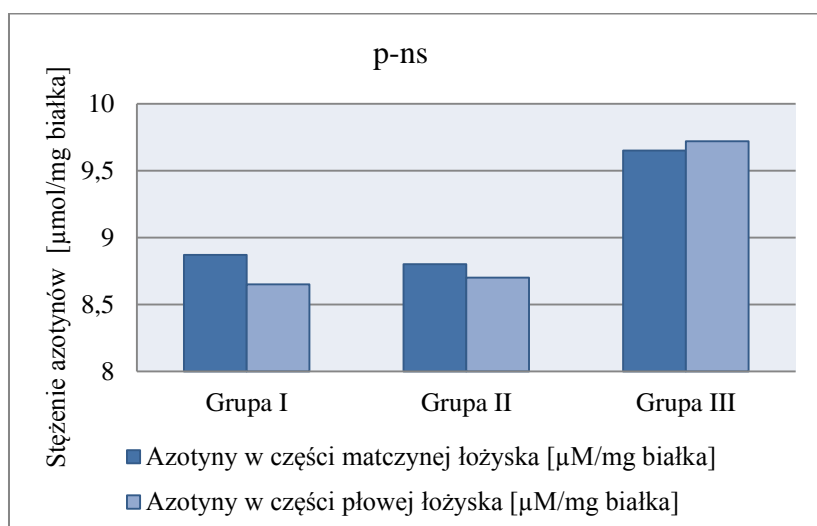
Rycina 326. Średnie stężenia GST w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [U/mg białka]



Rycina 337. Średnie stężenia białka nitrotylowanego w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [μmol/mg białka]



Rycina 348. Średnie stężenia TEAC w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka]



Rycina 359. Średnie stężenia azotynów w części matczynej i płodowej łożyska w poszczególnych grupach [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$  białka]

Ostatecznie podjęłam próbę analizy wpływu składników dymu tytoniowego na stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u kobiet palących papierosy, w zależności od intensywności palenia. W tym celu zbadalam korelacje pomiędzy stężeniem kotyniny w surowicy pacjentek palących tytoń w czasie ciąży a wybranymi parametrami równowagi redoks w surowicy matki, we krwi pępowinowej i łożysku (tabela 20). Stwierdziłam istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem kotyniny w surowicy

ciężarnych a poziomem AOPP w surowicy ciężarnej oraz stężeniem S-transferazy glutationu w łożysku.

*Tabela 20. Korelacje pomiędzy stężeniami kotyniny w surowicy ciężarnych lub we krwi pępowinowej a wybranymi parametrami stresu oksydacyjnego ( $r_s$  - rang Spearmana)*

	<b>Parametry</b>	<b>N</b>	<b><math>r_s</math></b>	<b>P</b>
<b>1</b>	Kotynina w surowicy vs TBARS w surowicy	15	-0,02	Ns
<b>2</b>	Kotynina w surowicy vs AOPP w surowicy	13	0,70	<0,05
<b>3</b>	Kotynina w surowicy vs AGEs w surowicy	13	0,26	Ns
<b>4</b>	Kotynina w surowicy vs nitrozylacja białek w surowicy	9	0,23	Ns
<b>5</b>	Kotynina w pępowinie vs TBARS w pępowinie	15	-0,45	Ns
<b>6</b>	Kotynina w pępowinie vs AOPP w pępowinie	10	0,08	Ns
<b>7</b>	Kotynina w pępowinie vs AGEs w pępowinie	12	-0,03	Ns
<b>8</b>	Kotynina w pępowinie vs nitrozylacja białek w pępowinie	11	0,27	Ns
<b>9</b>	Kotynina w surowicy vs TBARS w łożysku	24	-0,18	Ns
<b>10</b>	Kotynina w surowicy vs GSH w łożysku	24	0,31	Ns
<b>11</b>	Kotynina w surowicy vs CAT w łożysku	24	-0,15	Ns
<b>12</b>	Kotynina w surowicy vs GST w łożysku	23	0,44	<0,05
<b>13</b>	Kotynina w surowicy vs nitrozylacja białek w łożysku	23	-0,07	Ns
<b>14</b>	Kotynina w surowicy vs TEAC w łożysku	20	0,03	Ns
<b>15</b>	Kotynina w surowicy vs azotyny w łożysku	24	-0,22	Ns

## 6 Dyskusja

Według danych statystycznych w Polsce pali papierosy około 1/3 społeczeństwa. Wyniki badań przeprowadzonych przez Centrum Onkologii w Warszawie w 2007 roku wskazują na to, że 34% populacji męskiej i 23% kobiet pali papierosy codziennie. 12,4% uczniów polskich szkół w 15. roku życia regularnie spożywa wyroby tytoniowe, częściej palą chłopcy (14,9%) w porównaniu z dziewczętami (10,1%). Statystyczny Polak powyżej 7 roku życia wypala 20 papierosów na dobę (19).

Dane dotyczące częstości palenia przez kobiety ciężarne są nieco rozbieżne. Bazując na dostępnym piśmiennictwie, do czynnego palenia w czasie ciąży, przyznaje się od 15 do 30 % kobiet (103; 104). W badaniu ankietowym przeprowadzonym przez *Florek i wsp.* (104) w 2004 odsetek ciężarnych deklarujących czynne palenie papierosów w okresie okołoporodowym sięgał 23,7%. Ponieważ szacuje się, że część ciężarnych z różnych przyczyn nie ujawnia faktu palenia, w rzeczywistości częstość tego zjawiska może być jeszcze wyższa. Najczęstszą przyczyną zatajania tego faktu są obawy przed krytyką społeczeństwa, w szczególności personelu medycznego. W celu osiągnięcia wyższego odsetka prawdziwych wyników, ważnym jest dokładne poinformowanie pacjentki o korzyściach wynikających z udzielania rzetelnych odpowiedzi oraz to, aby wypełnienie kwestionariusza odbywało się w warunkach anonimowych i jak najbardziej intymnych. Weryfikacja danych ankietowych o oznaczenie markerów dymu tytoniowego zwykle pozwala na identyfikację kolejnych kilka procent osób aktywnie palących papierosy w czasie ciąży (34). Odsetek ciężarnych biernie narażonych na wdychanie dymu tytoniowego jest jeszcze wyższy i po weryfikacji biochemicznej sięga 70%.

W przeprowadzonym badaniu własnym palenie papierosów deklarowało 22,4% pacjentek ale po analizie poziomów kotyniny w surowicy ciężarnych (>100 ng/ml) u dwóch kobiet i krwi pępowinowej (>80 ng/ml) w trzecim przypadku, kolejne 3 osoby (2,8%) przesunięto z innych grup do grupy osób aktywnie palących papierosy. Dwie z omawianych pacjentek deklarowały bierne narażenie na wdychanie dymu a jedna negowała kontakt z tytoniem.

Pomimo silnej krytyki społecznej stosunkowo niewiele kobiet uzależnionych od tytoniu decyduje się na całkowite zaprzestanie palenia w czasie ciąży. Przeprowadzane kampanie antynikotynowe tylko w niewielkim stopniu wpłynęły na zmianę standardów postępowania palących kobiet w wieku rozrodczym. W zależności od źródła, odsetek kobiet

całkowicie rezygnujących z palenia w trakcie ciąży sięga od 5 do 30% (105). Więcej (około 60 %) pacjentek deklaruje zmniejszenie dziennej liczby wypalanych papierosów w czasie ciąży (106).

W moich badaniach do regularnego palenia papierosów przed ciążą przyznawało się 35,8% (38) kobiet. 12 z nich (czyli 31,6%), regularnie palących papierosy przed ciążą, deklarowało zaprzestanie palenia tytoniu w czasie jej trwania. Najczęściej decyzja o zaprzestaniu palenia była podejmowana na wczesnym etapie ciąży, po pierwszej wizycie lekarskiej. Z palenia zrezygnowało najwięcej kobiet, podających mniejszą liczbę wpalanych papierosów w ciągu dnia (5 – 9 sztuk), niemniej w grupie tej były też pacjentki, które przed ciążą wypalały ponad 15 papierosów dziennie.

Na początku lat 80-tych XX wieku, co druga Polka w przedziale wiekowym 20-39 lat, przyznawała się do aktywnego palenia papierosów. Wskaźnik ten należał wówczas do najwyższych w świecie. W latach 90-tych odsetek palaczek zmniejszył się do 23% kobiet i dorównał poziomowi rozwiniętym państwom Europy Zachodniej. 45% spadek palenia tytoniu wśród Polek zarejestrowano w latach 1982-2000 (107). Inne badania epidemiologiczne wskazują na to, że nałóg palenia jest najbardziej rozpowszechniony wśród kobiet młodych oraz w wieku bardziej zaawansowanym, mniej wykształconych, niepracujących lub pracujących fizycznie, gorzej sytuowanych, zamieszkujących duże miasta lub tereny wiejskie (21; 37; 103; 106). W prezentowanym badaniu wzięły udział pacjentki między 18. a 42. rokiem życia, średnia ich wieku wynosiła 30,1 lat (*tabela 10*), przy czym prawie wszystkie pacjentki poniżej 25 roku życia deklarowały czynny, bądź bierny kontakt z dymem tytoniowym. Palenie tytoniu było silnie związane z niższym wykształceniem (głównie zawodowym) (*rycina 14*) i fizycznym charakterem wykonywanej pracy zawodowej bądź brakiem zatrudnienia (*rycina 15*) oraz z niższym dochodem w rodzinie (*rycina 16*). Kobiety nienarażone na kontakt z dymem tytoniowym najczęściej reprezentowały grupę wiekową pomiędzy 30 a 34 rokiem życia (*rycina 13*), pochodziły z bogatszych rodzin (*rycina 16*), posiadały wyższe wykształcenie (*rycina 14*) i wykonywały pracę o charakterze umysłowym (*rycina 15*). Rodzaj miejsca zamieszkania pacjentek, typu duże miasto czy wieś, nie różnił się w poszczególnych grupach (*rycina 17*).

*Muramatsu i wsp.* (108) przeprowadzili pomiary stężenia nikotyny w pokoju, gdzie wypalano 28-48 papierosów dziennie. Stężenie nikotyny w takim pomieszczeniu osiągało wartość 31,5 - 43,2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a osoba tam przebywająca, w ciągu jednej godziny, przyswajała około 50  $\mu\text{g}$  nikotyny (czyli dawkę zawartą w 0,05 papierosa). Narażenie na wdychanie

wyższych stężeń nikotyny u biernych palaczy w warunkach ciągłego, intensywnego narażenia na dym, może odpowiadać dawce nikotyny wchłanianej przy wypaleniu nawet do 8 papierosów dziennie (109). Opisane doświadczenia dotyczyły przyswajania samej nikotyny, nie komentując wpływu wielu innych, szkodliwych substancji wdychanych z dymem papierosowym. Poprzez szeroko rozpowszechnione narażenie na wdychanie dymu tytoniowego, ofiarami papierosów na dużą skalę, stały się osoby niepalące ale przypadkowo inhalujące dym, często dzieci, poddawane ekspozycji na dym we własnym środowisku domowym.

W listopadzie 2010 roku znowelizowano ustawę antynikotynową w Polsce, w myśl której zakazuje się palenia tytoniu w środkach transportu publicznego, w ogólnodostępnych miejscach przeznaczonych do wypoczynku i zabawy dzieci oraz na przystankach komunikacji miejskiej. Zakazem zostały objęte również szkoły, zakłady opieki zdrowotnej, placówki oświaty i obiekty sportowe. Ustawa zakłada stworzenie w wyżej wymienionych miejscach specjalnych stref, tzw. palarni, odizolowanych od reszty lokalu i posiadających osobną wentylację. Za złamanie zakazu palenia grozi kara grzywny wysokości 500 zł (8). Według Polskiej Agencji Prasowej po wprowadzeniu w życie tej ustawy zmniejszyło się zanieczyszczenie powietrza w pubach i restauracjach. Na korzyść, zmieniły się opinie palaczy na temat szkodliwości biernie wdychanego dymu. Spadła również częstość palenia w obecności dzieci i kobiet ciężarnych, także w domach. Wzrosło również poparcie dla wprowadzenia całkowitego zakazu palenia w miejscach publicznych, przede wszystkim w lokalach gastronomicznych. Jednak z palących 32% Polaków w 2012 roku, wciąż prawie połowa przyznawała się do palenia tytoniu w obecności dzieci. (110). W moim badaniu biernie narażenie na wdychanie dymu tytoniowego deklarowało 52% ciężarnych, w tym 23 palaczki tytoniu i 32 kobiety niepalące papierosów. Osobą najczęściej narażającą pacjentki na ETS wymieniany był partner, a miejscem ekspozycji środowisko domowe.

W ostatnich latach nastąpił dynamiczny wzrost zainteresowania świata nauki wokół cząsteczek dymu tytoniowego, a także jego wpływu na funkcjonowanie organizmu żywego. Dotychczas nie ustalono żadnego bezpiecznego poziomu narażenia na dym. Dokładny skład dymu papierosowego wciąż nie jest poznany do końca, jednakże potwierdzono, że około 80 z rozpoznanych 4 tysięcy substancji i związków chemicznych, wywiera bezpośredni wpływ na powstawanie nowotworów (68). Negatywne działanie papierosów wykazano już niemal we wszystkich działach medycyny, chociaż znane są także choroby, w przypadku których papierosy poprawiają rokowanie. Najprawdopodobniej pojedyncze składniki dymu,

wywierają hamujący wpływ na rozwój danej patologii. Korzystne efekty zdrowotne wywoływane przez tytoń wiązane są głównie z układem nerwowym. Sugeruje się rzadsze występowanie choroby Alzheimera (najprawdopodobniej związane z późnym rozpoczęciem objawów chorobowych, w wieku, którego wiele palaczy nie dożyje), choroby Parkinsona (wynikające z trudności utrzymania papierosa w ręku), wrzodziejącego zapalenia jelit, mięsaka Kaposiego oraz włókniaków. Istnieją pewne dowody na rzadsze występowanie endometriozy u nieplodnych kobiet palących ale częstsze u kobiet płodnych. Badania epidemiologiczne wskazują, że palenie w ciąży zmniejsza ryzyko rozwoju nadciśnienia ciążowego, preeklampsji oraz w mniejszym stopniu cukrzycy ciążowej (44; 45), jednakże zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia wielu innych poważnych powikłań ciążowych.

W aspekcie medycyny matczyno- płodowej ważnym jest poznanie wpływu danej substancji na funkcjonowanie organizmów obojga partnerów, następnie okresu koncepcji, całego czasu trwania ciąży, okresu okołoporodowego i porodu, a w późniejszym etapie także na zdrowie noworodka i rozwój dziecka. Należy wyraźnie podkreślić, że palenie papierosów zostało uznane za najsilniejszą pojedynczą, modyfikowalną przyczynę zachorowalności i śmiertelności u ciężarnych i noworodków (45). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na to, że kobiety palące mają większe trudności z zajściem w ciążę (21). Meta-analiza 12 badań wykazała, że iloraz szans wystąpienia nieplodności u palaczek w stosunku do kobiet niepalących wynosi 1,42 (1,27-1,5) w ocenie 9 badań kohortowych (n=20059) i 2,27 (1,28-4,02) w 4 kontrolnych (n=10048) (32). Kobiety palące, które poddają się programowi zapłodnienia pozaustrojowego, gorzej reagują na kontrolowaną hiperstymulację jajników. Sugeruje się, że palenie tytoniu obniża ekspresję genu kodującego receptory dla folikulotropiny oraz zmniejsza ilość receptorów dla niej na komórkach ziarnistych jajnika. Efektem tego jest zmniejszone stężenie  $17\beta$ -estrediolu w surowicy, co z kolei osłabia reakcję jajników na ich stymulację. Wiąże się to ze zmniejszoną ilością uzyskanych pęcherzyków i komórek jajowych, natomiast sam płyn pęcherzykowy jest uboższy w komórki ziarniste (31; 111). W wielu badaniach potwierdzono wzrost ryzyka wystąpienia ciąży ektopowej u kobiet narażonych na dym tytoniowy. Ryzyko względne tego powikłania wzrasta wraz z liczbą wypalanych papierosów i zostało oszacowane na poziomie 1,7 u palaczek w stosunku do kobiet niezażywających wyrobów tytoniowych (112). Teorie na temat związku palenia z ciążą ektopową najczęściej zahaczają o zaburzenia transportu i opóźnienie implantacji jaja płodowego w jamie macicy. Wśród analizowanych pacjentek, opierając się na badaniu

podmiotowym, zidentyfikowano 2 kobiety, jedną palącą, drugą niepalącą papierosów, u których w przeszłości rozpoznano ciążę ekotopową.

Bazując na wynikach badań naukowych oraz licznych obserwacjach, wiadomo, że palenie we wczesnej ciąży powoduje wzrost liczby poronień samoistnych (3-8% ciąż). Mechanizm szkodliwego wpływu palenia na zwiększenie ryzyka poronienia prawidłowego płodu nie jest do końca poznany. Bierze się tu pod uwagę toksyczny wpływ nikotyny i tlenku węgla na rozwój zarodka (37). W analizowanej grupie 106 kobiet na podstawie danych uzyskanych z wywiadu lekarskiego (28,9% wśród kobiet palących w przeszłości vs. 26,5% wśród kobiet nigdy nie palących) stwierdzono, że palenie tytoniu przed ciążą nie miało wpływu na częstsze występowanie poronień, niemniej, należy pamiętać, że w grupie kobiet niepalących większy odsetek stanowiły kobiety powyżej 35. Roku życia, co mogło również mogło mieć wpływ na przedstawiony wynik. Do porodu przedwczesnego w przeszłości doszło u trzech kobiet palących tytoń (7,9%) i tylko u jednej nienarażonej na dym (1,5%).

Istnieje uzasadnione podejrzenie, że palenie tytoniu wpływa na zwiększone ryzyko wystąpienia krwawień w czasie ciąży: łożyska przodującego (OR 1,6) oraz przedwczesnego oddzielenia łożyska (OR 1,6 ) (112). Wykazano częstsze występowanie obu tych patologii zależności od liczby wypalanych papierosów. Teorie tłumaczące powstanie łożyska przodującego dotyczą przewlekłego niedotlenienia mięśnia macicy, natomiast przedwcześnie oddzielonego łożyska, wiązane są ze zwężeniem naczyń i lokalnym niedotlenieniem miejsca łożyskowego w macicy (37). W analizowanej grupie obu tych patologii nie obserwowano.

Kolejnym powikłaniem ciążowym, dla którego udowodniono silny związek z paleniem tytoniu jest PPRM. Ryzyko tego powikłania wzrasta około 1,7 razy u palaczek tytoniu (112). Mechanizm tego powikłania oraz związek z tytoniem nie został dotychczas zbadany. Rozważa się obniżenie odporności i wzrost podatności na zakażenia dróg rodnych a także zwężenie naczyń i niedożywienie (37). W badanej grupie PPRM rozpoznano w jednym przypadku. Powikłanie to wystąpiło w 32 tygodniu ciąży u kobiety palącej około 15 papierosów dziennie, która dodatkowo była narażona na ETS.

Istnieje szereg doniesień na temat zwiększonego ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego u kobiet palących tytoń. Oszacowano, że jeden papieros dziennie wypalany w czasie ciąży, powoduje skrócenie czasu jej trwania o ok. 0,05 tygodnia, a ciężarna wypalająca 10 papierosów w ciągu średnio rodzi o ok. 3,5 dnia wcześniej (113). Ryzyko porodu przedwczesnego wzrasta wraz z liczbą wypalanych papierosów oraz wiekiem matki, natomiast zaprzestanie palenia w czasie ciąży zmniejsza je do poziomu obserwowanego u



kobiet niepalących (113). W badaniu przeprowadzonym w Szczecinie, wykazano istotnie krótszy czas trwania ciąży u kobiet aktywnie palących w porównaniu do ciężarnych poddanych biernej ekspozycji oraz nieobciążonych dymem tytoniowym (114). Analiza 64 publikacji dotyczących oceny ryzyka porodu przedwczesnego u kobiet palących, potwierdziła istotny wpływ dymu na wcześniejsze zakończenie ciąży (115). W grupie kobiet palących częściej obserwowano krwawienie z dróg rodnych, łożysko przodujące, oddzielenie się łożyska oraz przedwczesne pęknięcie błon płodowych. Uważa się, że dym tytoniowy powoduje zwiększoną koncentrację katecholamin w łożysku naczyniowym ciężarnej, co może powodować skurcz naczyń krwionośnych i zapoczątkować poród (41; 37). Warunkiem rekrutacji pacjentek do mojego badania była ciąża donoszona (37. – 41.+6 tygodni) dlatego nie poddałam analizie ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego. Średni czas trwania ciąży we wszystkich grupach był porównywalny (grupa I 39+2; grupa II 39+3; grupa III 39+1) (tabela 11).

Fakt, że kobiety palące rodzą dzieci o mniejszej masie urodzeniowej, zaobserwowano dość wcześnie. Pierwsze doniesienie o zwiększonym ryzyku hipotrofii płodu zostało opublikowane w 1957 roku (116). Obecnie szacuje się, że w krajach rozwiniętych papierosy są najważniejszym pojedynczym czynnikiem ryzyka wystąpienia IUGR. Średnia różnica masy urodzeniowej dzieci matek palących i niepalących wynosi w przybliżeniu 250-370 gramów i wzrasta wraz ze zwiększeniem liczby dziennie wypalanych papierosów (117; 118), natomiast wśród kobiet biernie narażonych na ETS, masa urodzeniowa noworodków jest niższa o około 30 gramów (119). Mniejsza masa ciała dzieci matek palących papierosy jest spowodowana głównie zmniejszeniem ich beztłuszczowej masy ciała (115). Na podstawie przeprowadzonej metaanalizy *Kramer* (120) oszacował, że obniżenie masy urodzeniowej noworodka jest zależne od liczby papierosów dziennie wypalanych w czasie ciąży przez matkę i wynosi średnio 11,1 gramów na każdy papieros wypalany każdego dnia. Większość badań wskazuje, że zaprzestanie palenia w pierwszym trymestrze trwania ciąży nie wpływa na masę urodzeniową płodu (115; 114). W prezentowanym badaniu wykazałam istotne zmniejszenie ( $p < 0,05$ ) masy urodzeniowej ciała noworodków w grupie kobiet czynnie palących papierosy względem kobiet niepalących (3117g vs 3456g). Istotności statystycznej nie wykazano dla biernych palaczek w porównaniu innymi grupami, jednakże zaznaczała się wyraźna tendencja spadku masy ciała noworodków urodzonych przez kobiety narażone na ETS w stosunku do kobiet niepalących (3324g vs 3456g) (tabela 13).

W badaniach przeprowadzonych przez *Hanke i wsp.* (113) wykazano znaczny wzrost

przypadków IUGR u płodów matek palących. Względne ryzyko rozwoju IUGR oszacowano na poziomie 1,5 dla ciężarnych aktywnie palących od 1 do 5 papierosów dziennie i 3,7 dla kobiet palących ponad 5 papierosów dziennie. Składniki dymu tytoniowego wpływają wielokierunkowo na rozwój płodu: powodują gorsze utlenowanie tkanek płodu z powodu podwyższonego stężenia nieaktywnej karboksyhemoglobiny, zaburzają prawidłowy proces placentacji łożyska, powodują nadmierne uwalnianie katecholamin u matki, przez co dochodzi do obkurczenia naczyń macicznych, a także upośledzenia metabolizmu oksydacyjnego płodu oraz blokady wielu enzymów cyklu oddechowego i zwiększenia stresu oksydacyjnego. Całkowity przepływ krwi w przestrzeni międzykosmkowej łożyska zmniejsza się o około 20%, ograniczona zostaje wymiana substancji odżywczych i tlenu (40; 37; 39). W przebadanej grupie 106 pacjentek, hipotrofię płodu rozpoznano w 15 (14,2%) przypadkach. Narażenie na wdychanie dymu papierosowego, zarówno w sposób czynny jak i bierny, wiązało się z istotnym zwiększeniem ryzyka rozwoju hipotrofii u płodu ( $p < 0,05$ ). Najbardziej na rozwój tej patologii narażone były kobiety czynnie palące papierosy w czasie ciąży (Grupa I – 29,6 %; Grupa II – 12,5%; Grupa III – 6,4%) (*rycina 20*).

W wielu publikacjach potwierdzono istnienie niższego ryzyka wystąpienia PIH oraz PE u kobiet palących papierosy oraz łagodniejszy przebieg tych powikłań u kobiet wypalających większą liczbę papierosów (44). W badaniu przeprowadzonym przez *Wikström* (121) na dużej liczbie osób (ponad 612 tysięcy) w Szwecji, oszacowano, że względne ryzyko wystąpienia PE u kobiet palących od 1 do 9 papierosów dziennie wynosi 0,66, natomiast u ciężarnych palących bardziej intensywnie ( $>9$  papierosów/dzień) – 0,51. Silniejszą zależność wykazano w przypadku „późnej PE”, czyli rozpoczynającej się po 34 t.c. W przypadku zaprzestania palenia papierosów w pierwszym trymestrze ciąży, spadek zachorowalności na PIH oraz PE jest znacząco mniejszy (OR 0,94). Nieznana etiologia PIH i PE w znacznym stopniu ogranicza możliwości wykazania związku pomiędzy paleniem papierosów a wystąpieniem tych powikłań. Znane są teorie zaburzonej angiogenezy w łożysku, teoretycznie powodującej wystąpienie nadciśnienia. Wykazano, że składniki dymu tytoniowego wpływają na stężenie czynników angiogennych w tkance łożyskowej w sposób odwrotny niż dzieje się to podczas rozwoju PE. U osób palących wyroby tytoniowe poziom sFlt-1 (rozpuszczalnej formy receptora dla naczyniowego czynnika wzrostu VEGFR-1, który jest syntetyzowany i uwalniany przez komórki nabłonkowe w łożysku) w surowicy krwi obniża się proporcjonalnie do stopnia narażenia na dym, natomiast poziom PlGF (łożyskowego czynnika wzrostu) nie zmienia się (45; 46). Wciąż brakuje dostatecznych informacji potwierdzających,

które ze składników dymu tytoniowego i w jakim mechanizmie zmniejszają stężenie sFlt. Porównanie częstości rozwoju PIH i PE, przeprowadzone wśród ciężarnych palących papierosy i zażywających tytonie, wykazało mniejszą częstość wystąpienia tych powikłań jedynie u palaczek tytoniu. Zażywanie czystej nikotyny nieznacznie częściej wiązało się z rozwojem PE, natomiast istotnie zwiększało częstość IUGR i przypadków śmierci wewnątrzmacicznej. Dane te sugerują, że nie nikotyna, ale inne substancje dymu papierosowego wykazują efekt ochronny w stosunku do wystąpienia powikłań ciążyowych związanych z nadciśnieniem (121). Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że tlenek węgla zawarty w dymie zmniejsza produkcję sFlt w hodowli komórek śródbłonna, natomiast nikotyna nie wpływa na zmianę jego poziomu (121; 122). Dotychczasowe badania potwierdzają mniejsze ryzyko rozwoju PIH i PE przez kobiety ciężarne palące papierosy, jednak nie dają pełnej odpowiedzi na pytanie jakie mechanizmy patogenetyczne biorą udział w tym procesie. Również nie wiadomo jaki element we wczesnej ciąży determinuje późniejsze wystąpienie powikłań związanych z PIH lub IUGR. W przeprowadzonych badaniach własnych wśród 106 pacjentek PIH rozpoznano w 17 przypadkach (4 z gr I – 14,8%; 6 z gr II – 18,7%; 7 z gr III – 14,8%). Nie wykazałam zależności statystycznym. W trzech przypadkach rozpoznano PE (u dwóch kobiet narażonych na ETS w 21 i 24 t.c. a także u jednej kobiety czynnie palącej papierosy w 35 t.c) (rycina 19).

Znana jest zależność pomiędzy paleniem papierosów a zwiększonym ryzykiem zgonu wewnątrzmacicznego płodu. Ryzyko urodzenia martwego płodu u palaczek tytoniu zmniejsza się wraz z wydłużeniem czasu trwania ciąży i zwiększa wraz z intensywnością palenia, ale nigdy nie osiąga poziomu obserwowanego u kobiet nieobciążonych dymem (37). Uważa się, że wewnątrzmaciczne obumarcie płodu u kobiet palących najczęściej związane jest z zahamowaniem wzrastania płodu i nieprawidłowościami łożyska (41). W analizowanej grupie pacjentek nie obserwowano przypadku urodzenia martwego płodu, być może, ze względu na niewielką liczbę wypalanych papierosów.

Wyniki badań dotyczących wpływu palenia tytoniu na wystąpienie wad płodu nie są jednoznaczne. W części badań nie odnotowano zwiększonego ryzyka wad wrodzonych, w innych, stwierdzono 3 do 11 razy częstsze występowanie rozszczepów wargi i podniebienia, dwukrotnie zwiększone ryzyko wrodzonego ubytku przedniej ściany brzucha, 1,2 razy częstsze występowanie wielotorbielowości nerek oraz większą liczbą przypadków przedwcześnie zarośniętych szwów czaszki (123). Istotną rolę w rozwoju teratogennych powikłań przypisuje się tlenkowi węgla. Może brać on udział powstawaniu wad ośrodkowego

układu nerwowego, mikrocefalii, braku lub zniekształceniu kończyn, niedorozwoju płuc, wodogłowia oraz nieprawidłowości rozwojowych ucha (123). Nie odnotowano zależności między paleniem w czasie ciąży a zwiększonym ryzykiem wystąpienia u dzieci bezmózgowia, rozszczepu kręgosłupa i przepukliny mózgowej, wrodzonych wad rozwojowych układu moczowo-płciowego i układu krążenia oraz zespołu Downa (43). Należy jednak pamiętać o podwyższonym ryzyku poronienia samoistnego oraz obumarcia wewnątrzmacicznego płodu wśród palaczek tytoniu, czyli możliwości występowania zjawiska selekcji naturalnej płodów nieprawidłowych. Wśród analizowanych 106 przypadków w okresie okołoporodowym rozpoznano jeden przypadek wady serca u dziecka matki nienarażonej na dym, jeden przypadek zniekształcenia kończyny dolnej u dziecka pacjentki z grupy kontrolnej oraz jeden przypadek zastoju w układzie kielichowo-miedniczkowym płodu pochodzącego od kobiety palącej ponad 20 papierosów na dobę.

W większości badań zajmujących się paleniem papierosów przez ciężarne nie wykazano związku pomiędzy paleniem tytoniu a zwiększonym odsetkiem cięć cesarskich (114; 124). Jednakże *Habek i wsp.* (125) na podstawie analizy 87 porodów wykazali zwiększony odsetek cięć cesarskich u pacjentek uzależnionych od tytoniu i to bez względu na liczbę wypalanych dziennie papierosów. Autorzy ci zwracają jednak uwagę na fakt, że w grupie kobiet palących częściej dochodzi do rozwoju hipotrofii płodu oraz porodów przedwczesnych co może mieć wpływ na wydawanie odpowiednich decyzji. W analizowanym materiale własnym, wśród kobiet palących odsetek cięć cesarskich wynosił 25,9%, biernie narażonych na wdychanie dymu tytoniowego 21,9%, natomiast u kobiet nienarażonych na dym 14,8%. Odsetek kobiet rodzących w sposób naturalny był bardzo zbliżony we wszystkich grupach badanych (Grupa I - 29,7%; Grupa II - 31,3%, Grupa III - 29,9%) a palenie tytoniu w sposób aktywny i bierny w czasie ciąży nie miało wpływu na sposób ukończenia ciąży (*rycina 22*). Dodatkowo wykonałam analizę sytuacji klinicznych, w których poród zakończano w sposób operacyjny (drogą pochwową bądź drogą brzuszną) ze wskazań nagłych, definiowanych jako zaburzenia potencjalnie zagrażające życiu i zdrowiu matki oraz płodu, występujące i powtarzające się w krótkich odstępach czasu, gdzie bezpośrednie zagrożenie życia matki lub płodu może nastąpić w każdej chwili (101). Analizie poddałam częstość takich sytuacji w poszczególnych grupach i nie stwierdziłam zależności na poziomie statystycznym (*tabela 12*).

Zielone zabarwienie płynu owodniowego związane jest z przedwczesnym, wewnątrzmacicznym wydalaniem smółki przez płód, na skutek zaburzonych mechanizmów

porodowych. Związek pomiędzy obecnością zielonego płynu owodniowego a paleniem papierosów przez ciężarne był już podejmowany przez różnych autorów. *Meyes i wsp.* (126) w analizie 58 ciężarnych uznali, że fakt palenia papierosów przez matkę nie wpływa na częstość występowania zielonego płynu owodniowego. Przeciwnie *Habek i wsp.* (127) u 87 ciężarnych stwierdzili istotny wzrost ryzyka wystąpienia zielonego płynu u pacjentek, które wypalały powyżej 20 papierosów na dobę, pomimo istotnie krótszego średniego czasu trwania ciąży. *Usta i wsp.* (128) poddali analizie możliwe czynniki ryzyka oraz oszacowali moc każdego z tych czynników w kierunku wystąpienia zespołu aspiracji smółki (MAS). Autorzy ci stwierdzili mniejsze ryzyko wystąpienia MAS u płodów pochodzących z ciąż obarczonych szkodliwymi składnikami dymu papierosowego. Sugerowali oni negatywny wpływ składników dymu papierosowego na ruchy oddechowe płodu co przekłada się na efektywność oddychania rodzącego się płodu, a przez to rzadziej obserwowanej aspiracji cząstek smółki do drzewa oskrzelowego. Badania wskazują na upośledzenie ruchów oddechowych płodu matki palącej oraz wydłużenie epizodów bezdechu u płodu w stopniu zależnym od dawki zażytej nikotyny (129). W analizowanym materiale obecność zielonego płynu owodniowego stwierdzono w 20 przypadkach, w tym u 11,1% osób palących aktywnie, 21,8% biernie palących i 21,3% osób z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic statystycznych (*rycina 23*).

Standardem w oddziale porodowym jest ocena stanu urodzeniowego noworodka bezpośrednio po porodzie. Najczęściej wykorzystywanymi obecnie metodami w praktyce położniczej jest wizualna ocena płodu, punktacja w skali Apgar oraz pomiar parametrów równowagi kwasowo-zasadowej krwi z naczyń pępowinowych. Zmiany, jakie składniki dymu tytoniowego powodują w naczyniach łożyska kobiety uzależnionej od tytoniu, mogą być przyczyną upośledzonej wymiany gazowej, szczególnie w sytuacjach stresowych. W okresie okołoporodowym u palaczek może dochodzić do obniżenia wartości pH krwi w naczyniach pępowinowych, co świadczy o zaburzeniach w utlenowaniu płodu (130). Na ilość przyznanych punktów w skali Apgar oraz wartość pH krwi z naczyń pępowinowych może mieć wpływ rodzaj porodu. W każdej z grup odsetek porodów operacyjnych (cięcie cesarskie i wyciągacz próżniowy) w stosunku do porodów fizjologicznych był porównywalny. W prezentowanej pracy zostały ocenione punktacja w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia dziecka oraz parametry gazometryczne krwi pochodzącej z tętnicy i żyły pępowinowej (pH i BE).

Skala Apgar określa stan urodzeniowy noworodka i zazwyczaj jest stosowana w 1, 3, 5 i 10 minucie życia noworodka. Została ona zaproponowana w 1953 roku przez Virginie

Apgar (131) - absolwentkę Mount Holyoke College (Massachusetts, USA), akronim powstał zaś 10 lat później. Minimalnie wartością, jaką można przyznać dziecku jest 0, a maksymalną 10 punktów. Ocenie podlega pięć parametrów: wygląd skóry, puls, oddech, reakcja na cewnik oraz napięcie mięśniowe, za każdą cechę można przyznać od 0 do 2 punktów. Wynik 10 i 9 punktów oznacza poród noworodka w stanie dobrym, 8 i 7 punktów – zmęczenie akcją porodową, natomiast  $< 6$  – zamartwicę: średniego stopnia (6–4 pkt. – sinica) lub ciężkiego stopnia (3–0 pkt. – błądź powłok). Należy jednak podkreślić, że skala Apgar jest w znacznym stopniu subiektywna. Dodatkowo nie ma ona zastosowania w celu oceny zapotrzebowania na resuscytację noworodka (132). Dane na temat wpływu palenia papierosów przez ciężarne na punktację w skali Apgar nie są spójne. *Iwanowicz-Pulus i wsp.* (118) stwierdzili istotnie gorszy w 5. minucie, natomiast *Jagielska i wsp.* (133) w 3. minucie życia stan dzieci matek aktywnie palących tytoń w czasie ciąży. Spekuluje się związek pomiędzy liczbą wypalanych papierosów przez ciężarną a liczbą punktów. *Sochaczewska i wsp.* (114) nie obserwowali różnicy w punktacji Apgar w 1 i 5 minucie życia u ciężarnych wypalających mniej niż 15 sztuk papierosów dziennie. Związek taki został natomiast zaobserwowany w badaniu *Garn i wsp.* (130) w przypadku wypalania większej liczby papierosów w ciągu dnia, (41-60 sztuk), Autorzy ci stwierdzili zwiększone ryzyko niskiej punktacji Apgar u takich noworodków w 1 i 5 minucie ich życia. Nie stwierdziłam w moim badaniu istotnej różnicy pomiędzy stanem urodzeniowym ocenianym według skali Apgar dzieci matek czynnie oraz biernie palących w stosunku do kobiet niepalących w czasie ciąży, zarówno w 1., jak i 5. minucie życia dziecka. Nie wykazałam również, aby deklarowana liczba wypalanych papierosów, miała wpływ na liczbę przyznawanych punktów.

Ocena parametrów równowagi kwasowo-zasadowej krwi pochodzącej z naczyń pępowinowych pozwala na obiektywną ocenę utlenowania płodu, która jest wykładnikiem stanu urodzeniowego dziecka. Pobranie krwi oraz oznaczenie parametrów gazometrycznych jest wykonywane bezpośrednio po porodzie. Najdokładniej stan płodu odzwierciedla badanie gazometryczne krwi z tętnicy pępowinowej, natomiast badanie krwi z żyły pępowinowej, przedstawia raczej równowagę kwasowo-zasadową matki i efektywność łożyska. Bezcelowym jest oznaczanie gazometrii wyłącznie we krwi żyłnej pępowiny, ponieważ nawet w przypadku kwasicy u płodu może ona nie odbiegać od normy. W sytuacji nieprawidłowo funkcjonującego łożyska, uciśnięcia pępowiny lub występowania zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej u matki odchylenia stwierdza się zarówno we krwi tętniczej jak i żyłnej. Za dolną granicę prawidłowego pH we krwi pochodzącej z tętnicy pępowinowej uważa się

7,10 do 7,18 (134). Istotny wzrost ryzyka umieralności i zachorowalności stwierdzono jednak dopiero przy wartości pH poniżej 7,00 (134). Według Rekomendacji Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego z 2009 roku, pH krwi pobranej z pępowiny nie powinno być niższe niż 7,1 oraz 7,2 odpowiednio z tętnicy i żyły pępowinowej. Wartość pH < 7,0 w tętniczej krwi pępowinowej a także BE < -12 mmol/l świadczą o istotnej kwasicy u noworodka i potwierdzają narażenie płodu na niedotlenienie śródporodowe (102, 135). Zależny od liczby wypalanych papierosów przez kobietę ciężarną wzrost stężenia karboksyhemoglobiny oraz spadek wartości pH i pO<sub>2</sub> we krwi pępowinowej opisywany był w 1981 roku przez *Harrisona* (136). Natomiast *Oncken i wsp.* (137), *Ingvarsson i wsp.* (138), *Sochaczewska i wsp.* (114) oraz *Król i wsp.* (139) nie stwierdzili istotnych statystycznie różnic pH w tętnicy i żyły pępowinowej w stosunku do statusu nikotynowego pacjentek. Wśród 106 ciężarnych średnie wartości pH oraz BE zarówno z tętnicy jak i z żyły pępowinowej nie różniły się istotnie w poszczególnych grupach. W siedmiu próbkach nie udało się oznaczyć parametrów gazometrycznych z powodów technicznych (skrzep w kapilarze). Kwasicę okołoporodową, z pH 7,04 i BE -11,3 w tętnicy oraz pH 7,08 oraz BE -13,2 w żyły pępowinowej, obserwowano w jednym przypadku u pacjentki negującej palenie papierosów, u której wykazano jednak znaczne poziomy kotyniny zarówno w surowicy jak i krwi pępowinowej (*tabela 14*).

Aby ocenić wpływ danej substancji na funkcjonowanie organizmu należy najpierw ją zidentyfikować a potem oszacować przyswojoną dawkę. Dym papierosowy zawiera ponad 4 tysiące składników i szacuje się, że nie wszystkie substancje zostały dotychczas jeszcze zidentyfikowane i poznane. Wpływ dymu papierosowego na funkcjonowanie organizmu ludzkiego jest wypadkową oddziaływania wszystkich jego składowych. Najczęściej stosowaną, najłatwiejsza i najtańsza metodą oceny stopnia narażenia pacjenta na dym tytoniowy jest wywiad przeprowadzany w sposób bezpośredni lub za pomocą opracowanego wcześniej wzorca. Zebrane w ten sposób dane często mogą być zafałszowane ze względu na ich wybitnie subiektywny charakter. Przyczyną udzielenia nieprawdziwych informacji podczas wywiadu lub badania ankietowego może być brak zrozumienia pytania, niedostateczna ilość czasu albo chęć utajenia pewnych faktów. Kobieta ciężarna podlega szczególnej presji i ocenie otoczenia na prowadzenie zdrowego trybu życia, dlatego w tej grupie szczególnie wiele informacji może nie zostać ujawniona. W celu zdobycia jak najbardziej wiarygodnych informacji przed wypełnieniem ankiety należy dokładnie poinformować pacjenta o jej celowości i znaczeniu prawidłowości udzielanych informacji.

Ankiety należy przeprowadzić w jak najbardziej intymnych warunkach i w sposób anonimowy.

Rekrutacja do prezentowanego przeze mnie badania odbywała się wśród pacjentek z objawami rozpoczynającego się porodu podczas zbierania wywiadu lekarskiego, w oddzielnym pomieszczeniu. Po uzyskaniu zgody na przeprowadzenie badania, pobierano krew od pacjentki, natomiast krew pępowinową i łożysko pobierano bezpośrednio po urodzeniu dziecka. Po porodzie pacjentki były poproszone o wypełnienie kwestionariusza oceniającego ich status socjoekonomiczny oraz stopień narażenia na różne czynniki środowiskowe, między innymi aktywne i bierne palenie tytoniu. Dane na temat przebiegu ciąży, stwierdzonych powikłań i stosowanych leków zasięgnięto z wywiadu lekarskiego, natomiast informacje o przebiegu porodu i wynikach okołoporodowych zaczerpnięto z dokumentacji medycznej. Wiele dostępnych badań naukowych podejmujących powyższy tematykę kwalifikuje grupę palących i niepalących wyłączenie na podstawie ankiety (133; 106; 68).

Aby ocenić w jakim stopniu dym tytoniowy wpływa na funkcjonowanie organizmu stosuje się jakościowy i ilościowy ich pomiar związków zawartych w nim lub ich metabolitów. Ważne jest, aby stosowany biomarker narażenia na dym cechował się wysoką swoistością, czułością i specyficznością, a ponadto, jego stężenie powinno różnić się w zależności od stopnia narażenia. Najbardziej specyficznym składnikiem dymu tytoniowego i jednocześnie najaktywniejszym biologicznie, jest nikotyna. Obecność oraz stężenie nikotyny w organizmie jest wysoce specyficznym miernikiem stopnia narażenia na dym tytoniowy, a tym samym wszystkich zawartych w nim substancji (108). Problemem jest jednak niskie jej stężenie w tkankach oraz bardzo krótki biologiczny okres półtrwania nikotyny (1/2 do 2 godzin). Około 90% nikotyny jest metabolizowana do różnych związków. Praktyczne zastosowanie diagnostyczne znalazło dotychczas jedynie kilka związków, przede wszystkim nikotyna i jej metabolity, tlenek węgla, cyjanowodor i jego pochodne (tiocyjaniany) (140). Najważniejszym ilościowo oraz najbardziej stabilnym metabolitem nikotyny jest kotynina, której biologiczny okres półtrwania jest stosunkowo długi ( $t_{1/2}$  = od 10 do 27 godzin). Czyni to ją najlepszym z dotychczas poznanych i stosowanych biomarkerów służących ocenie narażenia na dym tytoniowy niezależnie od rodzaju badanego materiału biologicznego. Czułość dla kotyniny jako biomarkera dymu tytoniowego oznaczanej w surowicy wynosi 96-97%, a specyficzność około 99-100%, co stanowi o jej wysokiej wartości diagnostycznej (141; 142; 84). Stosunkowo wysokie stężenia kotyniny w płynach ustrojowych umożliwiają



weryfikację palenia papierosów oraz określenie ilościowego narażenia na dym również w formie biernej inhalacji (143). Wykazano zależność stężenia kotyniny w surowicy w stosunku do wieku, długości okresu palenia tytoniu, liczby i jakości wypalanych papierosów (144). Istnieje możliwość oznaczenia stężenia kotyniny w praktycznie każdym materiale biologicznym, niemniej obecnie najczęściej dokonuje się pomiaru jej stężenia w płynach ustrojowych: surowicy, moczu i ślinie. *Binini i wsp.* (90), ocenili przydatność materiałów biologicznych do oceny stężenia kotyniny spośród surowicy, moczu i śliny oraz śliny stymulowanej poprzez żucie waty wyprodukowanej przez firmę Sarsted. Za najlepszy materiał pod kątem czułości metody autorzy uznali stymulowaną ślinę oraz surowicę. Ze względu na nieinwazyjność pobrania próbek, najczęściej wybieranym materiałem do badań jest mocz. Z powodu rutynowego zakładania wenflonu u pacjentek przyjmowanych do oddziału porodowego, w prezentowanym badaniu, zdecydowano o wykorzystaniu surowicy krwi do oznaczeń.

W badaniu zaprezentowanym przez *Polańską i wsp.* (34) zweryfikowano informacje uzyskane przez pacjentki ciężarne dotyczące palenia papierosów poprzez oznaczenie stężenia kotyniny w surowicy ciężarnych metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową. Na podstawie danych literaturowych przyjęto, że u pacjentek niepalących stężenie kotyniny może osiągać do 2 ng/ml, u narażonych na ETS między 2 a 15 ng/ml, natomiast aktywnie palących powyżej 15 ng/ml. Oceniono, że informacja o paleniu papierosów uzyskana z wywiadu lekarskiego nie jest satysfakcjonująca i osiąga czułość 97,9% dla aktywnego i 50% dla biernego palenia papierosów (34; 36). Szczególnie często u pacjentek negujących kontakt z dymem tytoniowym wykryto kotyninę w osoczu w stężeniu odpowiadającym biernej ekspozycji. Podobne wyniki uzyskali *Binini i wsp.* (90), którzy za punkt odcięcia dla czynnych palaczy przyjęli stężenie 15 ng/ml kotyniny w surowicy.

Wchłonięta w drzewie oskrzelowym nikotyna jest bardzo szybko transportowana do wszystkich narządów. Również u ciężarnej, przez łożysko, jest transportowana się do krążenia płodowego. Łožysko jest narządem zawierającym enzymy metabolizujące składniki dymu tytoniowego, również nikotynę. W celu określenia stopnia przechodzenia składników dymu tytoniowego do płodu można dokonywać pomiarów stężenia substancji zawartych w dymie lub ich metabolitów w łożysku, krwi pępowinowej, płynie owodniowym oraz tkankach i płynach ustrojowych rodzącego się dziecka. Przenikanie nikotyny oraz jej metabolitów przez łożysko ludzkie było przebadane przez wielu autorów (145; 146; 143; 147). Niektórzy z nich twierdzą, że w czasie ciąży następuje szybszy katabolizm związków, również nikotyny i

kotyniny (148). Wykazano, że u kobiet palących tytoń dochodzi do nasilenia procesów metabolizmu fosfolipidów i zwiększenia syntezy prostaglandyny E<sub>2</sub>, która jest odpowiedzialna za wystąpienie wcześniejszych skurczy (145). *Lambers i Clark* (147) twierdzą, że nagromadzenie kotyniny w części płodowej łożyska, może aktywować produkcję prostaglandyn a przez to indukcję samoistnych poronień u palących ciężarnych. *Pichini i wsp.* (36) ocenili stopień zgodności deklarowanego narażenia na dym tytoniowy uzyskanego z przeprowadzonej ankiety w stosunku do stężenia metabolitów tytoniu w moczu ciężarnej, we krwi pępowinowej i moczu noworodka. Poziom kotyniny we krwi pępowinowej okazał się najdokładniej obrazować stopień narażenia ciężarnej na tytoń i pozwalał różnicować aktywne od biernego palenia oraz bierną ekspozycję od braku narażenia na dym. W badaniu tym ustalono stężenia kotyniny we krwi pępowinowej na poziomie >14 ng/ml dla aktywnie palących oraz 1,78 – 14 ng/ml dla ciężarnych narażonych na ETS.

Analizując dane z wywiadu w prezentowanym badaniu kotyninę wykryto w surowicy 83,3% kobiet deklarujących aktywne palenie papierosów w czasie ciąży, średnio w stężeniu 122,4 ng/ml (0-391 ng/ml) i było zbliżone do wartości podawanych przez innych autorów (34; 36). Jedynie u 12,1% kobiet deklarujących narażenie na ETS kotynina była wykrywalna, średnio w stężeniu 17,5 ng/ml (0–252 ng/ml). U jednej pacjentki negującej kontakt z dymem tytoniowym (2%) wykryto obecność kotyniny na poziomie 92 ng/ml. Stężenie kotyniny we krwi pępowinowej powyżej poziomu wykrywalności stwierdzono u 83,3% kobiet przyznających się do aktywnego palenia papierosów (średnie stężenie wynosiło 85,7ng/ml; 0-299,5 ng/ml) oraz u 17,6 % kobiet deklarujących narażenie na ETS (średnie stężenie 12,1 ng/ml; 0-198,2 ng/ml) oraz u 4% kobiet negujących kontakt z dymem (*rycina 25*). Porównano oraz przeprowadzono korelację stężenia kotyniny w surowicy matki do jej stężenia we krwi pępowinowej. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia kotyniny w surowicy, wzrastało stężenie we krwi pępowinowej (*rycina 28*). Na podstawie poziomów stężenia kotyniny oceniono zgodność samooceny pacjentek z rzeczywistym narażeniem na dym. Prawdopodobność pacjentek została oceniona bardzo wysoko. Zidentyfikowano jedynie jedną pacjentkę deklarującą bierne narażenia na ETS oraz dwie negujące kontakt z dymem tytoniowym, u których wykryto wysokie poziomy kotyniny (>100 ng/ml) silnie przemawiające za aktywnym paleniem papierosów. Czulość zaproponowanego kwestionariusza oszacowano na poziomie 88,9%.

Szacuje się, że w ciąży organizm kobiety pobiera o około 15% więcej tlenu, wzrasta intensywność przemian metabolicznych i produkcja RFT (149). W głównej mierze dochodzi

do produkcji anionów ponadtlenkowych ale również NO, CO i nadtlenu azotu, które wyraźnie wpływają na funkcjonowanie łożyska, w tym proliferację i różnicowanie trofoblastu oraz funkcjonowanie naczyń. Dotychczasowe badania wykazały, że we krwi zdrowych pacjentek w czasie ciąży, aktywność katalazy, reduktazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej wzrasta w niewielkim stopniu w porównaniu do zdrowych kobiet nieciążarnych, co może wiązać się z nasileniem procesów oksydacyjnych, związanych z indukcją proliferacji i różnicowaniem komórek łożyska i płodu (150; 151; 149). W pierwszym trymestrze ciąży, w czasie formowania się krążenia w przestrzeni międzykosmkowej w łożysku, zachodzi wiele procesów oksydacyjnych. Niezdolność organizmu do wytworzenia skutecznej obrony antyoksydacyjnej może skutkować utratą ciąży na wczesnym jej etapie. W drugiej połowie ciąży, znaczny wzrost parametrów stresu oksydacyjnego w łożysku obserwowany jest szczególnie w przypadku powikłań cukrzycowych, IUGR, PE, co przypisuje się wzmożonym procesom apoptozy komórek trofoblastu oraz zmienionej reaktywności naczyń krwionośnych. Dowodami na zaburzenia równowagi redoks jest wzrost peroksydacji lipidów i izoprostanów oraz spadek składowych obrony przeciwoksydacyjnej w przypadku tych powikłań. W wyniku interakcji NO z nadtlenukami dochodzi do wytwarzania silnie utleniających nadtlenuazotynów, które wywołują wiele szkodliwych efektów zaburzających funkcjonowanie białek, w tym nitrozylację reszt tyrozynowych. Uważa się, że nadmierna produkcja RFT może nastąpić w różnych okresach formowania się łożyska i może mieć związek z rozwojem niektórych patologii ciąży, takich jak PE, IUGR, w których obserwowane są zaburzenia mechanizmów antyoksydacyjnych (152). *Chelchowska i wsp.* (153) stwierdzili, że w ciąży fizjologicznej wzrasta intensywność procesów peroksydacji lipidów a potencjał antyoksydacyjny organizmu, wyrażony spadkiem stężenia substancji antyoksydacyjnych (witaminy A, witaminy E,  $\beta$ -karotenu, kwasu moczowego) oraz całkowitą zdolnością antyoksydacyjnej badanej próbki, zmniejsza się.

Palenie tytoniu przez kobiety ciężarne może w istotny sposób wpływać w rozwój i wzrastanie płodu oraz zaburzać naturalne procesy towarzyszące wzrostowi młodego organizmu w łonie matki. Dym tytoniowy dostarcza dodatkowy ładunek RFT (154), co może wiązać się z zaburzeniem równowagi redoks (48). Szacuje się, jedno zaciągnięcie dymem tytoniowym dostarcza ok.  $10^{15}$  RFT: anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylowego, tlenu singletonowego, nadtlenu wodoru i kwasu podchlorawego. Rodniki powstające aktywnie w zainhalowanym do płuc dymie, wykazują szczególnie szkodliwe działanie. Wykazano, że poziom substancji przeciwutleniających u osób palących jest

obniżony pomimo kompensacyjnego wzrostu stężenia glutationu i antyoksydantów enzymatycznych średnio o około 15% (155). RFT zawarte w dymie tytoniowym dodatkowo mogą wpływać na wartość ciśnienia krwi w różny sposób. Jedne powodują efekt wazodylatacyjny, inne efekt wazokonstrykcyjny. Przykładowo nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy poprzez bezpośrednie działanie na mięśniówkę gładką oraz za pośrednictwem NO powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych. Anionorodnik ponadtlenkowy natomiast poprzez inaktywację NO wykazuje odwrotny efekt – wazokonstrykcyjny (156). W prezentowanym badaniu w zależności od rodzaju markera i badanej tkanki wykazano niewielkie zmiany poziomów wybranych enzymów odpowiedzialnych za obronę organizmu przed RFT.

Dialdehyd malonowy – MDA jest produktem reakcji peroksydacji lipidów. W dużym stężeniu powoduje uszkodzenie nici DNA oraz lipidów błon komórkowych. W ciąży fizjologicznej opisywany jest podwyższony poziom produktów peroksydacji lipidów (149). Dane, co do wpływu dymu tytoniowego na stężenia MDA u ciężarnych są kontrowersyjne (149; 153). W badaniach porównawczych nad stężeniami MDA oraz TBARS w ciążach powikłanych nadciśnieniem, w stosunku do ciąż zdrowych, wykazano istotnie wyższe poziomy tych parametrów, szczególnie w trzecim trymestrze ciąży (157; 158). W prezentowanym badaniu dokonano oznaczenia TBARS, czyli grupy związków reagujących z TBA, z których związkiem wiodącym jest MDA. Nie zaobserwowałam różnic w stężeniu TBARS w poszczególnych grupach badanych (*ryciny 29 i 33*). Nie wykazałam także korelacji pomiędzy stężeniem kotyniny a TBARS, zarówno w surowicy matki, jak i krwi pępowinowej (*tabela 20*). Zgodnie z innymi autorami, stężenie TBARS w pępowinie było niższe, ale wykazywało dodatnią korelację w stosunku do z ich stężeń we krwi kobiet (149; 153; 73) (*tabela 19*).

Glikacja białek jest wieloetapowym, nieenzymatycznym procesem zachodzącym spontanicznie, którego produkty w warunkach fizjologicznych łatwo ulegają degradacji. W stanach patologicznych, przykładowo pod wpływem podwyższonego poziomu cukru we krwi lub ksenobiotyków (nieprawidłowa dieta, na przykład potrawy smażone, grillowane, pieczone, przekąski typu chipsy, frytki oraz płatki śniadaniowe, dym papierosowy, zanieczyszczenie środowiska) dochodzi do nasilenia procesów oksydacyjnych i wzmożonego powstawania AGEs, których kumulacja doprowadza do wystąpienia różnych powikłań (159). Niekorzystny wpływ AGEs na organizm nie ogranicza się wyłącznie do bezpośredniej modyfikacji białek ale dodatkowo polega na komórkowym oddziaływaniu za pomocą

receptorów RAGE, których udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego oraz niektórych jego powikłań, został dobrze udokumentowany. Proces powstawania AGEs jest bardzo długotrwały, dlatego poziom AGEs można traktować jako marker długoterminowego narażenia na stres oksydacyjny. Sugeruje się, że oznaczenie poziomu AGEs pomaga przewidzieć dynamikę rozwoju wielu jednostek chorobowych, u podstaw których leży narażenie na dym tytoniowy i stres oksydacyjny oraz pozwala określić tempo starzenia się organizmu (160). Badania przeprowadzone przez *Cerami i wsp.* (161) potwierdzają wpływ dymu tytoniowego na przyspieszenie procesu tworzenia AGEs. Dostępna literatura wskazuje na aktywację układu AGEs-RAGE w ciążach powikłanych PE. Badanie opublikowane przez *Chekir i wsp.* (162), wskazuje na podwyższenie poziomu AGEs oraz ekspresji genu RAGE u kobiet z preeklampsją w porównaniu do zdrowych nieciężarnych i zdrowych ciężarnych. W prezentowanym badaniu własnym nie obserwowaliśmy istotnych różnic pomiędzy poziomami AGEs zarówno we krwi matki jak i we krwi pępowinowej w zależności od narażenia na dym tytoniowy (*rycina 30*). Stężenie AGEs nie miało także związku ze stężeniem kotyniny (*tabela 20*). Wykazałam dodatnią korelację pomiędzy poziomem AGEs we krwi pępowinowej w stosunku do ich stężenia w surowicy ciężarnych ( $r_s = 0,330$ ;  $p < 0,05$ ) (*tabela 19*).

Określane jako AOPP, zmienione oksydacyjnie albuminy, ich agregaty lub fragmenty, oraz fibrynogen i lipoproteiny są zmienionymi oksydacyjnie cząsteczkami białek powstającymi w wyniku działania RFT. Na podstawie badań przeprowadzonych przez zespół *Witko-Sarsat i wsp.* (92), AOPP zostały uznane za markery stresu oksydacyjnego, tlenowego uszkodzenia białek, a także jako wskaźniki odzwierciedlające intensywność stanu zapalnego. AOPP mogą wiązać się z receptorami RAGE i przez to wywoływać podobne efekty biologiczne podobne do AGEs: indukują zmiany w układzie naczyniowym, nerkach i mózgu, biorą udział w powstawaniu i rozwoju cukrzycy oraz jej powikłań, pobudzają komórki fagocytujące i nasilają procesy zapalne u chorych z hiperglikemią. Poziom AOPP był przedmiotem badań różnych powikłań ciążowych. *Dane i wsp.* (163) określili poziom AOPP w surowicy kobiet w drugim trymestrze ciąży i wykazali istotnie zwiększone stężenie AOPP u ciężarnych w porównaniu z kobietami nieciężarnymi. W innym badaniu podwyższony poziom AOPP w surowicy okazał się nie być związany z rozwojem chorób nadciśnieniowych (164). Przeciwnie, wzrost stężenia AOPP w surowicy 83 ciężarnych z PE wykazali *Karacay i wsp.* (165). Nie znalazłam wielu publikacji oceniających wpływ dymu tytoniowego na stężenie AOPP w ciąży a dostępne dane zahaczające o to zagadnienie nie dają jednoznacznej odpowiedzi. (163; 165). W prezentowanym badaniu własnym nie wykazałam istotnych różnic

w stężeniu AOPP w zależności od statusu nikotynowego pacjentek. Niemniej u pacjentek palących zaobserwowałam dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kotyniny a AOPP w surowicy matki (*tabela 20*). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy stężeniami AOPP w surowicy ciężarnych a krwią pępowinową odnotowałam w każdej z analizowanych z grup (*rycina 31*) ale nie znalazłam korelacji w stężeniu AOPP we krwi pępowinowej w stosunku do ich stężenia we krwi pacjentki (*tabela 19*).

Glutation jest tripeptydem zbudowanym z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Występuje we wszystkich organizmach roślinnych i zwierzęcych (poza organizmem jest nietrwały) i uważany jest za jeden z ważniejszych endogennych antyoksydantów. Dzięki odwracalnej reakcji odrywania lub przyłączania elektronów, glutation działa w ustroju jako układ oksydo-redukcyjny przejawiający się w odtwarzaniu grup tiolowych -SH białek, które uległy utlenieniu do grup sulfonowych -SO<sub>3</sub>H lub wiązań disiarczkowych -S-S- i w ten sposób chroni białka przed utlenieniem. Bierze także udział w procesie oddychania jako koenzymem niektórych enzymów. Potencjał redoks układu GSSG/GSH umożliwia również reakcje między zredukowanym glutationem a utlenionymi postaciami innych antyoksydantów, co ma znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu, w procesach wzrostu i różnicowania się komórek oraz apoptozy (48). Dodatkowo uczestniczy on w odtwarzaniu uszkodzonych składników komórki, głównie białek i lipidów błon komórkowych oraz DNA. Obniżenie stężenia niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy jest dowodem na to, że w dany układ biologiczny odpowiedział na stres oksydacyjny (166), ale nie świadczy o uszkodzeniu komórkowych makrocząsteczek. Dotychczas nie ustalono jednoznacznie jaki wpływ dym tytoniowy wywiera na stężenie GSH (167; 166; 80). Sugeruje się, że zarówno intensywność palenia jak i długość ekspozycji dym ma wpływ na poziom drobnocząsteczkowych antyoksydantów. U osób intensywnie palących, więcej niż 20 papierosów dziennie, wykazano zwiększenie stężenie GSH (167). *Garg i wsp.* (168) oraz *Bizoń i wsp.* (167) stwierdzili brak wpływu palenia mniejszej (<20 sztuk/dzień) liczby papierosów na stężenie GSH we krwi i tkankach, co autorzy tłumaczyli faktem, że narażenie na niższą dawkę dymu tytoniowego nie zaburza równowagi pro/antyoksydacyjnej w organizmie. W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym *Kuipers i wsp.* (169) wykazali brak zmiany stężenia GSH w tkance płucnej myszy po 4 tygodniowej inhalacji dymu tytoniowego, natomiast *Woźniak i wsp.* (170) istotne obniżenie GSH w tkankach zwierząt poddanych takiej ekspozycji, szczególnie w tkance mózgowej. W moim badaniu nie wykazałam różnic w stężeniu GSH w łożysku pomiędzy grupami badanymi pacjentek,

najprawdopodobniej ze względu na dość małą liczbę wypalanych dziennie papierosów (*rycina 34*). Zmiana stężenia kotyniny we krwi pacjentek palących również nie wpływała na poziom GSH w łożysku (*tabela 20*). Nie obserwowałam także różnic w stężeniu GSH w części macznej w stosunku do części płodowej łożyska w żadnej z badanych grup (*rycina 34*).

GST jest jednym z enzymów II fazy detoksykacji, które chronią komórki przed działaniem wysoce reaktywnych związków o charakterze elektrofilowym, ksenobiotykami oraz substancjami endogennymi (48). S-transferaza glutationu katalizuje reakcję sprzęgania wymienionych związków toksycznych ze zredukowanym glutationem, a następnie transportuje powstałe produkty do moczu lub metabolizuje do nieszkodliwych kwasów merkapturowych (171). Bariera ochronna tworzona przez GST jest bardzo efektywna dzięki niskiej specyficzności substratowej enzymu, która umożliwia sprzęganie znacznej liczby związków. Enzym ten występuje w postaci kilku izoform. Obecnie znanych jest kilka klas izoenzymów cytozolowych (alfa, pi, mi, sigma, kapa, theta) oraz kilka klas izoenzymów błonowych (172). GST niewątpliwie bierze udział w metabolizmie związków zawartych w dymie tytoniowym (np. tlenków benzo(a)pirenu i WWA). W badaniach *Baskaran i wsp.* (173) oraz *Woźniak i wsp.* (170) przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wykazano zwiększoną aktywność S-transferazy glutationu w narządach szczurów poddanych wpływowi dymu tytoniowego. *Park i wsp.* stwierdzili brak istotnej zmiany stężenia GST we krwi kobiet narażonych na ETS w ciąży (174). Autorzy ci sugerują, że polimorfizm genetyczny w zakresie GST (GSTM1 i GSTT1) może mieć wpływ na nasilenie stresu oksydacyjnego u matek narażonych na ETS. W badaniu przeprowadzonym w 2010 roku *Obolenskaya i wsp.* (175) stwierdzili brak wpływu skażenia chemicznego (również dymem tytoniowym) i radiologicznego środowiska na poziom indukcji GST w łożyskach kobiet w ciążach donoszonych. Autorzy podkreślają jednak możliwość wpływu działania związków chemicznych i promieniowania na zwiększenie aktywności cytochromu P450 w powstawaniu reaktywnych metabolitów. Wobec niezwiększonej aktywności GST obserwowany jest brak równowagi zdolności detoksykacji wyrażony zwiększonym stężeniem WWA oraz zmniejszoną peroksydacją lipidów. W przeprowadzonym badaniu własnym nie wykazałam różnic w stężeniu GST w łożyskach ciąż narażonych bądź nie na składniki dymu tytoniowego (*rycina 36*). Istotne różnice zanotowano natomiast w stężeniach GST w części macznej łożyska w stosunku do części płodowej łożyska szczególnie u pacjentek aktywnie i biernie palących papierosy (*rycina 36*). Różnica nie była znamienna w grupie pacjentek

nienarażonych na dym. Wykazałam również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem kotyniny we krwi pacjentek palących w poziomym GST w łożysku (*tabela 20*). Odmienna indukcja enzymu GST może sugerować różne nasilenie procesów detoksykacji w określonych obszarach łożyska ludzkiego szczególnie u pacjentek zażywających wyroby tytoniowe.

Katalaza jest enzymem z grupy oksydoreduktaz katalizującym proces rozkładu nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ), który został wytworzony przez wolne rodniki lub przez dysmutazę ponadtlenkową do wody ( $H_2O$ ) i tlenu ( $O_2$ ) (48). W mniejszym stopniu bierze ona także udział w metabolizmie etanolu (170). Wykazano, że chroniczne spożywanie alkoholu etylowego znacząco zwiększa aktywność CAT w niektórych narządach (25; 170). Badano aktywność katalazy w przebiegu ciąży fizjologicznej (155; 73). Cytowani autorzy nie odnotowali istotnych różnic w aktywności CAT w poszczególnych trymestrach ciąży. Dane odnośnie zmiany aktywności CAT u ciężarnych narażonych na wdychanie dymu tytoniowego są rozbieżne. *Tabacova i wsp.* (176) wykazali podwyższenie aktywności CAT u kobiet aktywnie palących tytoń w czasie ciąży. Odwrotne zależności zaprezentowali *Chelchowska i wsp.* (177), którzy badali aktywność katalazy w erytrocytach ciężarnych. Autorzy ci wykazała istotne obniżenie aktywności CAT u kobiet palących w porównaniu z kobietami niepalącymi we wszystkich trymestrach ciąży. Badacze wyraźnie podkreślili istotę selekcji pacjentek a swoje badanie przeprowadzili wyłącznie wśród ciężarnych z niepowikłanym przebiegiem ciąży. *Sidle i wsp.* (178) przeprowadzili pomiary aktywności katalazy w łożyskach ciąż obciążonych tytoniem i nie wykazali istotnej różnicy w zależności od statusu nikotynowego ciężarnych. W przedstawionej pracy własnej nie wykazałam istotnych różnic aktywności katalazy w łożysku u pacjentek czynnie bądź biernie palących papierosy w porównaniu do nienarażonych na dym (*rycina 35*) ani wpływu stężenia kotyniny na aktywność tego enzymu (*tabela 20*). Nie obserwowałam również różnic w stężeniu CAT w matczynej w stosunku do płodowej części łożyska (*rycina 35*).

Trolox ( $C_{14}H_{18}O_4$ ) jest organicznym związkem chemicznym, rozpuszczalną w wodzie pochodną witaminy E, która jest stosowana w procesach biologicznych lub biochemicznych do redukcji stresu lub uszkodzeń spowodowanych przez utlenianie. Trolox jest nazwą handlową zarezerwowaną przez spółkę Hoffman-LaRoche dla kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowego. Ze względu na techniczną trudność pomiaru indywidualnej aktywności przeciwutleniającej mieszaniny antyoksydantów w produkcie (67) (np. w borówce czy pomidorze), powszechnie stosowany jest ekwiwalent Trolox (TE) dla pomiaru sumy potencjału antyoksydacyjnego takiej mieszaniny. Wskaźnik ten uważany jest



za czuły miernik zmian, zachodzących pod wpływem stresu oksydacyjnego *in vivo*. *Chelchowska i wsp.* (153) zbadali potencjał TRAP w surowicy ciężarnych aktywnie palących tytoń i nienarażonych na dym w poszczególnych trymestrach ciąży. Autorzy ci stwierdzili stopniowy wzrost TRAP w czasie trwania ciąży fizjologicznej, co świadczy o zmianie zdolności przeciwutleniającej organizmu ciężarnej. Ponadto wykazali oni istotne obniżenie parametru TRAP w grupie aktywnych palaczek w każdym trymestrze ciąży. *Aycicek i wsp.* (179; 180) zbadali natomiast zdolność antyoksydacyjną krwi pępowinowej w grupach aktywnie i biernie palących ciężarnych. Obniżenie TRAP wykazali jedynie w grupie czynnych palaczek tytoniu. *Şahinli i wsp.* (181) w badaniu wykonanym wśród 90 ciężarnych (30 osób aktywnie palących i 60 niepalących w czasie ciąży), również wykazali istotny spadek całkowitej zdolności przeciwutleniającej ustroju wyrażonej w ekwiwalentach troloxu. W przeciwieństwie do tego, *Fayol i wsp.* (182) odnotowali wyższe stężenia TRAP u biernych palaczek tytoniu, w porównaniu do kobiet, zachowujących abstynencję tytoniową. Wzrost poziomu TRAP u biernych palaczek tłumaczą oni kompensacją organizmu ciężarnej, w wyniku odpowiedzi na zwiększone obciążenie wolnymi rodnikami oraz nadtlenkami lipidów. W moim badaniu najwyższe stężenia TEAC obserwowałam w grupie biernych palaczek ale różnica nie była istotna statystycznie (*rycina 38*). Stężenie TEAC nie korelowało również ze stężeniem kotyniny wśród palaczek (*tabela 20*). Wykazałam natomiast istotne statystycznie różnice stężenia TEAC w części maczynej łożyska w stosunku do części płodowej łożyska w grupie pacjentek czynnie i biernie palących papierosy (*rycina 38*). Różnica nie była znamienna w grupie pacjentek nienarażonych na dym papierosowy.

Tlenek azotu, znany jako śródbłonkowy czynnik wzrostu – EDRF, pełni zasadniczą rolę w utrzymaniu prawidłowego napięcia i reaktywności naczyń krwionośnych. Jest on produkowany w sposób ciągły przeciwdziałając czynnikom silnie zwężającym naczynia takim jak endotelina-1, angiotensyna II a także hamuje adhezję, aktywację i agregację płytek krwi poprzez zmniejszenie produkcji czynnika aktywującego płytki w komórkach śródbłonka (183). NO zapobiega utlenianiu lipidów oraz inaktywuje wolne rodniki tlenowe. Istnieje hipoteza, że niekorzystne działanie dymu papierosowego może wynikać z kumulacji oksydacyjnego uszkodzenia komórek śródbłonka i upośledzenia produkcji NO. Przepływ krwi przez naczynia płodowo-łożyskowe oraz maciczno-łożyskowe także podlega kontroli przez NO (184). Przypuszcza się, że wystąpienie niektórych powikłań ciążyowych, takich jak IUGR może być związane z niedoborem NO (185) oraz upośledzeniem zdolności rozszerzania naczyń poprzez wpływ składników dymu tytoniowego. Wpływ palenia na

stężenie NO we krwi nie jest dokładnie określony. Niektóre badania, na przykład przeprowadzone przez *Node i wsp.* (186) oraz *Ozerol i wsp.* (187) sugerują obniżone stężenie NO wśród palaczy tytoniu. Autorzy ci twierdzą, że niskie stężenie NO jest wynikiem dysfunkcji śródbłonna i współistnieje z niską aktywnością przeciwutleniającą. Inne prace, na przykład autorstwa *Pach i wsp.* (188) oraz *Chambers i wsp.* (189) wykazują chwilowe zwiększenie stężenia NO u palaczy. Wydaje się jednak, że tymczasowy wzrost stężenia NO wynika z inhalacji egzogenego NO zawartego w dymie i odnosi się wyłącznie do dróg oddechowych aktywnych palaczy. Stwierdzono, że powiązania między stopniem ekspozycji na dym tytoniowy a poziomem NO są zależne od dawki oraz czasu ekspozycji. *Chelchowska i wsp.* (100) przeprowadzili badanie określające wpływ dymu tytoniowego na stężenie NO oznaczonego pośrednio poprzez stężenia azotynów w surowicy ciężarnych w I i III trymestrze ciąży u kobiet palących i niepalących tytoń. Zaobserwowali oni istotne obniżenie stężenia NO w III trymestrze ciąży w surowicy oraz w mniejszym stopniu we krwi pępowinowej u kobiet palących papierosy. Na podstawie otrzymanych wyników w moim badaniu, zaobserwowałam obniżone stężenie azotynów zarówno u pacjentek aktywnie jak i biernie palących papierosy, w porównaniu do kobiet nienarażonych na dym w czasie ciąży, jednak zależność ta nie była istotna statystycznie (*rycina 39*). Nie wykazałam różnic w stężeniu azotynów w części maczynej łożyska w stosunku do części płodowej łożyska w żadnej z badanych grup (*rycina 39*). Stopień korelacji pomiędzy stężeniem kotyniny w surowicy ciężarnych a stężeniem azotynów w łożysku okazał się nie być istotny statystycznie (tabela 20).

Tradycyjne markery stresu oksydacyjnego wykazują jedynie istnienie zaburzeń oksydo-redukcyjnych ale nie określają możliwych konsekwencji tego stanu dla organizmu. Nitrozylacja grup tiolowych (-SH) obecnych przede wszystkim w białkach, polega na odwracalnym dołączeniu cząsteczki NO do grupy tiolowej. Cechą charakterystyczną białek poddanych nitrozylacji jest względna ich stabilność (w porównaniu do NO, którego  $t_{1/2}$  wynosi 1-30 sekund, dla S-nitrozoalbuminy  $t_{1/2}$  - 40 minut, S-nitrozoglutationu  $t_{1/2}$  - 8 min, a S-nitrozohemoglobiny  $t_{1/2}$  - 1 minuta). Każde zmiany w konstelacji białek mogą wpływać na ich funkcjonalność, na przykład prowadzić do utraty aktywności lub zmiany ich funkcji. Dochodzi do kumulacji białek w komórce, powodując uszkodzenie tkanek. Ocena stopnia utraty funkcjonalności protein może być stosowana do monitorowania postępu choroby i wyników leczenia. Dzięki stosunkowo wysokiemu stężeniu białek we krwi oraz stabilności zmodyfikowanych łańcuchów polipeptydowych, pomiar stężenia nitrozylowanych białek jest uznawany za bardzo przydatny marker stresu oksydacyjnego i wskaźnik stopnia uszkodzenia

białek. *Kuipers i wsp.* (169) stwierdzili istotne obniżenie poziomu białka nitrozylowanego w tkance płucnej myszy po 4-tygodniowej ekspozycji na dym tytoniowy. W przeprowadzonym badaniu własnym nie wykazałam różnic w stężeniu białka nitrozylowanego we krwi pacjentek, krwi pępowinowej ani w łożysku pomiędzy grupami badanymi pacjentek (*ryciny 34 i 37*) oraz zależności pomiędzy stężeniem kotyniny a poziomem białka nitrozylowanego (*tabela 20*). Istotne statystycznie różnice pomiędzy poziomami białka nitrozylowanego w surowicy ciężarnych a krwią pępowinową odnotowałam w grupach pacjentek aktywnie oraz biernie palących papierosy (*rycina 32*). Wykazałam dodatnią korelację pomiędzy stężeniem białka nitrozylowanego we krwi pępowinowej w stosunku do jego stężenia w surowicy ciężarnych ( $r_s = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ) (*tabela 19*).

Reakcje stresu oksydacyjnego są częścią naturalnych procesów zachodzących w organizmach żywych, które nabierają szczególnego znaczenia w czasie ciąży. Pomiar stężenia wielu markerów stresu oksydacyjnego w różnych materiałach biologicznych pozwala na ocenę jego zróżnicowanego wpływu na ciężarną i rozwijający się płód. W analizowanej grupie pacjentek, fakt palenia niewielkiej liczby papierosów przez ciężarne mógł mieć istotne znaczenie na wykazane niewielkiego stopnia zaburzenia układu redoks. Należy jednak zdecydowanie podkreślić, że palenie papierosów zaburza równowagę redoks modulując przebieg reakcji wewnątrzkomórkowych i wywołuje niekorzystnie wpływa na środowisko rozwijającego się płodu.

## 7 Wnioski

1. Potwierdzono przydatność kotyniny – głównego metabolitu nikotyny jako biomarkera narażenia palącej kobiety ciężarnej na dym tytoniowy.
2. Wykazana dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem kotyniny we krwi pępowinowej a jej poziomem w surowicy matki, świadczy o bezpośrednim narażeniu płodu na składniki dymu tytoniowego w stopniu proporcjonalnym do ilości wypalanych papierosów przez ciężarną.
3. Palenie około 10 papierosów dziennie nie zmienia istotnie ryzyka rozwoju powikłań nadciśnieniowych, wystąpienia objawów zagrożenia życia płodu w KTG, obniżonych parametrów gazometrycznych we krwi pępowinowej w okresie okołoporodowym oraz konieczności częstszego ukończenia ciąży metodami operacyjnymi.
4. Aktywne palenie papierosów w czasie trwania całej ciąży wiąże się z istotnie mniejszą masą urodzeniową noworodków.
5. Nie wykazano, aby palenie papierosów w liczbie około 10 sztuk dziennie w czasie całej ciąży oraz narażenie na bierne wdychanie dymu tytoniowego, w istotny sposób zaburzało równowagę pro/antyoksydacyjną w surowicy kobiet ciężarnych, we krwi pępowinowej oraz w łożysku.
6. Zaobserwowana różnica w stężeniach niektórych parametrów stresu oksydacyjnego (AOPP, białko nitrozylowane, GST, TEAC) po obu stronach układu matka-płód u pacjentek w grupie I i II może świadczyć o szczególnej roli łożyska w regulacji równowagi redoks u kobiet narażonych na składniki dymu tytoniowego
7. Stężenie niektórych parametrów stresu oksydacyjnego (AOPP i GST) koreluje dodatnio ze stężeniem kotyniny w surowicy ciężarnych w grupie kobiet palących.

## 8 Abstrakt

W okresie życia wewnątrzmacicznego dziecko może być narażone na składniki dymu tytoniowego za sprawą aktywnego palenia papierosów oraz poprzez bierne wdychanie dymu papierosowego przez jego matkę. Udowodniono udział składników dymu tytoniowego w rozwoju wielu powikłań ciąży. Celem pracy była ocena zgodności deklarowanych danych dotyczących nałogu palenia tytoniu uzyskanych z ankiety, ze stężeniem metabolitu nikotyny - kotyniny oznaczonej w surowicy ciężarnych oraz we krwi pępowinowej, ocena wpływu nikotynizmu na przebieg ciąży i stan urodzeniowy dziecka, a także wpływu papierosów na stężenie wybranych parametrów równowagi redoks po stronie matczynej (surowica i część maczyna łożyska) i stronie płodowej (krew pępowinowa i strona płodowa łożyska). Bazując na danych ankietowych dokonano pewnej charakterystyki społecznej grupy kobiet aktywnie i biernie palących papierosy. Stężenie kotyniny oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną z użyciem norefedryny jako wzorca wewnętrznego, po uprzedniej ekstrakcji z wykorzystaniem techniki ciec - ciec. Badanie przeprowadzono na 106 kobietach ciężarnych, które na podstawie ankiety oraz stężenia kotyniny, przydzielono do trzech grup: grupa I - aktywnie palących papierosy (n=27), grupa II - narażonych na bierne wdychanie dymu tytoniowego (n=32) oraz grupa III - nie mających kontaktu z dymem tytoniowym (n=47). Średnie stężenie kotyniny w surowicy kobiet z grupy I wynosiło  $129,6 \pm \text{ng/ml}$ , grupy II -  $5,1 \text{ ng/ml}$ , natomiast we krwi pępowinowej odpowiednio  $92,9 \text{ ng/ml}$  i  $1,8 \text{ ng/ml}$ . U wszystkich pacjentek z grupy kontrolnej stężenie kotyniny było poniżej poziomu wykrywalności. Stwierdzono wyższe stężenie kotyniny w surowicy ciężarnych w stosunku do jej stężenia we krwi pępowinowej oraz wykazano dodatnią korelację pomiędzy tymi stężeniami. Nie wykazano istotnych różnic stężeń wybranych parametrów stresu oksydacyjnego pomiędzy grupami badanymi, niemniej poziom AOPP oraz GST dodatnio korelował ze stężeniem kotyniny w surowicy palących kobiet ciężarnych. U kobiet narażonych na dym zaobserwowano również istotną różnicę stężeń niektórych parametrów stresu oksydacyjnego (AOPP, białka nitrozylowanego, GST oraz TEAC) po stronie matczynej w stosunku do płodowej.

*Słowa kluczowe: tytoń, ciąża, kotynina, palenie papierosów*

## Abstrakt

The children in prenatal life might be exposed to components of tobacco smoke due to active and passive smoking by their mothers. It is also proved that tobacco smoke might be the cause of many antenatal complications. The goal of the study was to assess if the declared data derived from the questionnaire go along with the concentration of nicotine metabolite – cotinine in blood serum of pregnant women and in cord blood. The next step of the study was to estimate the possible influence of tobacco smoking on the birth condition of the newborn. The concentration of cotinine was analyzed by means of liquid chromatography with spectrophotometric detection, in which norephedrine was used as inner sample, after previous extraction and using technique liquid-liquid. The examination was carried out on 106 women, who were divided into three groups: I group - active smokers (n=27), II group – passive smokers (n=32) and group III – having no contact with smoke (n=47). Only in one case, in patient who denies having contact with smoke and in two women confessing only to being exposed to passive smoking (*ETS – Environmental Tobacco Smoke*) we showed high level of cotinine in blood and on this basis the women were classified to the group of active smokers. The average concentration of cotinine in blood serum of the women from group I was 129,6 +/- ng/ml, group II – 5,1 ng/ml, and in the cord blood it was 92,9 ng/ml and 1,8 ng/ml. In all patients of the control group the cotinine concentration was below the level of detection. On the basis of performed analysis I showed lower concentration of cotinine in cord blood in comparison to blood serum of pregnant women and positive correlation between these concentrations. I did not prove that there were any significant differences in the concentrations of selected parameters of oxidative stress between the study groups, but the level of AOPP and GST positively correlated with the concentration of serum cotinine in smoking pregnant women. However, the concentration of certain parameters of oxidative stress in women exposed to tobacco smoke was significantly higher in the maternal side in relation to the fetal side of placenta (AOPP, nitrosylated protein, GST and TEAC).

*Keywords: pregnancy, cotinine, tobacco smoking*

## 9 Piśmiennictwo

1. World Health Organization. (2009) *Stan zagrożenia epidemią palenia tytoniu w Polsce*. [www.euro.who.int/pubrequest](http://www.euro.who.int/pubrequest).
2. Rutkowski L. (2006) *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa.
3. Gaworski C.L., Oldham M.J., Wagner K.A. i wsp. (2011) *An evaluation of the toxicity of 95 ingredients added individually to experimental cigarettes approach and methods*. *Inhal Toxicol.* 23 Suppl 1: 1-12. .
4. Baker R.R., Massey E.D., Smith G. (2004) *An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity*. *Food Chem Toxicol.* 44 (11): 1799-822.
5. Baker R.R., Pereira da Silva J.R., Smith G. (2004) *The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry, part I: Flavours and additives*. *Food Chem Toxicol.* 42 Suppl: S3-37.
6. Baker R.R., Pereira da Silva J.R., Smith G. (2004) *The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry part II: Casing ingredients*. *Food Chem Toxicol.* 42 Suppl: S39-52.
7. Sejm PRL. (1971) *Dz. U. Nr 12, poz. 114. Kodeks wykroczeń art.6 ust.1.*
8. Sejm RP. (2010) *Ustawa z dnia 8 kwietnia 2010 r. o zmianie ustawy o ochronie zdrowia przed następstwami używania tytoniu i wyrobów tytoniowych oraz ustawy o Państwowej Inspekcji Sanitarnej.*
9. Vardavas C.I., Anagnostopoulos N., Kougias M., i wsp. (2012) *Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance, and exhaled nitric oxide*. *Chest.* 141(6): 1400-6.
10. Ronhovde M. (2002) *Criticism of Tom Houston's review of tobacco: A Cultural History of How an Exotic Plant Seduced Civilization*. *MedGenMed* 19;4(3):25.
11. Robicsek F. (1979) *The Smoking Gods: Tobacco in Maya Art, History, and Religion*. University of Oklahoma Press. Oklahoma.
12. Gottsegen J.J. (1940) *Tobacco A Study of Its consumption in the United States*. Pitman Publishing Corp. New York-Chicago.
13. Zieliński J. (2008) *Obciążenia wynikające z palenia tytoniu*. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 76: 170-173.
14. Gostin L.O. (2007) *The „Tobacco Wars” -- global litigation strategies*. *JAMA.* 298(21): 2537-2539.

15. Chen M.H. (2007) *Economic concerns hamper tobacco control in China*. Lancet. 370(9589): 729-730.
16. Peto R., Lopez A.D., Boreham J., Thun M. (1994) *Mortality from smoking in developed countries 1950-2000: indirect estimates from national vital statistics*. Oxford University Press. New York.
17. Seńczuk W. (2005) *Toksykologia współczesna*. PZWL. Warszawa.
18. Wright A.A., Katz I.T., (2007) *Tobacco tightrope - balancing disease prevention and economic development in China*. N. Engl. J. Med. 356: 1493–1496.
19. Ministerstwo Zdrowia; Główny Inspektorat Sanitarny. (2009) *Program ograniczania zdrowotnych następstw palenia tytoniu*. Warszawa.
20. Florek E., Marszałek A. (1999) *An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction*. Human Exp Toxicol. 18: 272-278.
21. Florek E., Marszałek A., Piekoszewski W. i wsp. (2001) *Występowanie narażenia na dym tytoniowy wśród kobiet w wieku prokreacyjnym*. Ginek Prakt. 9: 16-21.
22. Pieszkowski W., Florek E. (2006) *Tytoń w liczbach na początku nowego stulecia*. Przegl. Lek. 63: 823-826.
23. Glantz S.A., Palmrey W.W., (1991) *Passive smoking and heart disease*. Epidemiology, physiology and biochemistry. Circulation. 83: 1-12.
24. Papastefanou C. (2009) *Radioactivity of tobacco leaves and radiation dose induced from smoking*. Int J Environ Res Public Health. 6(2): 558-567.
25. Kulza M. (2011) *Interakcje metaboliczne pomiędzy dymem tytoniowym a alkoholem etylowym*. Rozprawa Doktorska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań.
26. Florek E., Piekoszewski W. (2006) *Interakcje leków z dymem tytoniowym*. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań.
27. Minister Zdrowia. (2004) *Rozporządzenie Ministra Zdrowia: w sprawie badania zawartości niektórych substancji w dymie papierosowym oraz informacji i ostrzeżeń zamieszczanych na opakowaniach wyrobów tytoniowych z dnia 24 lutego 2004*. Dz. U. z 1997 r. Warszawa.
28. Marcilla A., Martínez I., Berenguer D. i wsp. (2012) *Comparative study of the main characteristics and composition of the mainstream smoke of ten cigarette brands sold in Spain*. Food Chem Toxicol. 50(5): 1317-33.
29. US Department of Health and Human Service. (1989) *Report of the Surgeon General*. United States of America.



30. Sturgis E.M., Cinciripini P.M. (2007) *Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?* Cancer. 110(7): 1429-35.
31. Florek E., Janicki R., Pieszkowski W. i wsp. (2008) *Wpływ dymu tytoniowego na poziom hormonów płciowych – model zwierzęcy.* Przegląd Lekarski 65(10): 508-513.
32. Augood C., Duckitt K., Templeton A.A. (1998) *Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis.* Hum Reprod. 13(6):1532-1539.
33. Florescu A., Ferrence R., Einarson T. i wsp. (2009) *Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology.* Ther Drug Monit. 31(1): 14-30.
34. Polańska K., Hanke W., Laudański T., Kalinka J. (2007) *Serum cotinine level as a biomarker of tobacco smoke exposure during pregnancy.* Ginekol Pol. 78(10): 796-801.
35. Brynczka. O. (2003) *Exposure to environmental tobacco smoke in Euro: a review.* Technical report World Health Organisation Regional Office for Europe. WHO. Bonn
36. Pichini S., Basagaña X.B., Pacifici R. i wsp.(2000) *Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy.* Environ Health Perspect. 108(11): 1079-1083.
37. Polańska K., Hanke W. (2004) *Palenie papierosów przez kobiety ciężarne a przebieg i wynik ciąży – przegląd badań epidemiologicznych.* Przegl Epidemiol. 58: 683-691.
38. Ferraz E.M., Gray R.H., Cunha T.M. i wsp. (1990) *Determinants of preterm delivery and intrauterine growth retardation in north-east Brazil.* Int J Epidemiol. 19(1): 101-108.
39. Schellscheidt J., Jorch G., Menke J. (1998) *Effects of heavy maternal smoking of intrauterine growth patterns in sudden infant death victims and surviving infants.* Eur J Pediatr. 157(3): 246-251.
40. Spinillo A., Capuzzo E., Nicola S.E. i wsp. (1994) *Factors potentiating the smoking-related risk of fetal growth retardation.* Br J Obstet Gynaecol. 101(11): 954-958.
41. Simpson W.J. (1957) *A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity.* Am J Obstet Gynecol. 73(4): 807-815.
42. Gadzinowski J., Kaliszewska-Drozdowska M., Kosińska M. i wsp. (2003) *Urodzeniowa masa ciała a wiek płodowy noworodków regionu Wielkopolski i Ziemi Lubuskiej.* Ginek Pol. 74(3):186-192.
43. Van den Eeden S.K., Karagas M.R., Daling J.R., Vaughan T.L. (1990) *A case-control study of maternal smoking and congenital malformations.* Paediatr Perinat Epidemiol. 4(2): 147-155.

44. Cnattingius S. (2004) *The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes*. Nicotine Tob Res. 6 (Suppl 2): S125-S140.
45. Jeyabalan A., Powers R.W., Durica A.R., i wsp. *Cigarette smoke exposure and angiogenic factors in pregnancy and preeclampsia*. Am J Hypertens. 21(8): 943-947.
46. Mehendale R., Hibbard J., Fazleabas A., Leach R. (2007) *Placental angiogenesis markers sFlt-1 and PlGF: response to cigarette smoke*. Am J Obstet Gynecol. 197(4): 363.e1-5.
47. McLlnes R.J., Love J.G., Stone D.H. (2001) *Independent predictors of breastfeeding intention in a disadvantaged population of pregnant women*. BMC Public Health. 10(1): 118.
48. Bartosz G. (2003) *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.
49. Beal M.F. (2002) *Oxidatively modified proteins in aging and disease*. Free Radic Biol Med. 32(9): 797-803.
50. Jabłońska-Trypuć A., Czerpak R. (2007) *Rola nieenzymatycznej glikacji białek w procesie starzenia się organizmu i patogenezie wieku podeszłego*. Postępy Biol Kom. 34: 683-691.
51. Bloomer R.J., Fisher-Wellman K. (2009) *The role of exercise in minimizing postprandial oxidative stress in cigarette smokers*. Nicotine Tob. Res. 11(1): 3-11.
52. Ponczek M.B., Wachowicz B. (2005) *Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami*. Postępy Biochem. 51: 140-145.
53. Triggiani M., Granata F., Giannattasio G., Marone G. (2005) *Secretory phospholipase A2 in inflammatory and allergic diseases: Not just enzymes*. J Allergy. Clin. Immunol. 116(5): 1000-1006.
54. Townsend D.M., Manevich Y., He L. i wsp. (2009) *Novel role for glutathione-S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation Following oxidative and nitrosative stress*. J Biol Chem. 284(1): 436-445.
55. Minotti G., Aust S.D. (1992) *Redox cycling of iron and lipid peroxidation*. Lipids. 27(3): 219-226.
56. Sies H., de Groot H. (1992) *Role of reactive oxygen species in cell toxicity*. Toxicol Lett. . 64-65: 547-551.
57. Naskalski J.W., Bartosz G. (2000) *Oxidative modifications of protein structures*. Adv Clin Chem. 35: 161-253.
58. Alvarez B., Radi R. (2003) *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids. 25(3-4): 295-311.

59. Halliwell B., Zhao K., Whiteman M. (1999) *Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies.* Free Radic. Res. 31(6): 651–669.
60. Davies M.J. (2003) *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.* Biochem Biophys Res Commun. 6;305(3): 761–770.
61. Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D. (2003) *Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein.* J Clin Invest. 111(5): 583–593.
62. Ciolino H.P., Levine R.L. (1997) *Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress.* Free Radic Biol Med. 22(7): 1277-1282.
63. Sohal R.S. (2002) *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process.* Free Radic Biol Med. 33(1), 37-44.
64. Chevion M., Bereshtein E., Stadtman E.R. (2000) *Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage.* Free Radic Res. 33 Suppl: S99-108.
65. Romero F.J., Bosch-Morell F., Romero M.J. i wsp. (1998) *Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease.* Environ Health Perspect. 106 Suppl 5, 1229-1234.
66. Simic M.G. (1994) *DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis.* Cancer Res. 1;54(7 Suppl), 1918s-1923s.
67. Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. (2000) *Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data.* Free Radic Biol Med. 29(11): 1106-1114.
68. Martszałek A. (2007) *Choroby tytoniowe - rola lekarza (patologa) w działaniach diagnostycznych i prewencyjnych.* Przegl Lek. 64 (10): 889-891.
69. Nair U., Bartsch H., Nair J. (2007) *Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans.* Free Radic Biol Med. 15;43(8): 1109-1120.
70. Ścibior-Bentkowska D., Czczot H. (2009) *Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny.* Postepy Hig Med Dosw. 63, 58-72.
71. Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. (2010) *The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.* Int J Biochem Cell Biol. . 42(10): 1634-1650.
72. Mutinati M., Piccinno M., Roncetti M. i wsp. (2013) *Oxidative stress during pregnancy in the sheep.* Reprod Domest Anim. 48(3): 353-357.

73. Laskowska-Klita T., Szymborski J., Chełchowska M. i wsp. (2001) *Nadtlenki lipidowe i wybrane parametry obrony przeciwutleniającej w łożysku i krwi pępowinowej noworodków matek palących w przebiegu ciąży. Badania własne.* Med Wieku Rozw. 5: 35-42.
74. Chełchowska M., Laskowska-Klita T., Szymborski J. (2001) *Poziom retinolu i  $\beta$ -karotenu w osoczu krwi palących i niepalących kobiet ciężarnych.* Wiad. Lek. 54: 248-254.
75. Seidman D.S., Paz I., Merlet-Aharoni I. i wsp. (1999) *Noninvasive validation of tobacco smoke exposure in late pregnancy using endtidal carbon monoxide measurements.* J Perinatol. 19(5): 358-361.
76. Obwegeser R., Oguogho A., Ulm M. i wsp. (1999) *Maternal cigarette smoking increases F2-isoprostanes and reduces prostacyclin and nitric oxide in umbilical vessels.* Prostaglandins Other Lipid Mediat. 57(4): 269-279.
77. Sardas S., Walker D., Akyol D., Karakaya A.E. (1995) *Assessment of smoking induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique.* Mutat Res. 335(3): 213-217.
78. Zgierski M. (2008) *Wpływ palenia papierosów na równowagę antyoksydacyjno - peroksydacyjną w mleku kobiecym. Praca doktorska.* Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Gdańsku. Gdańsk.
79. Włodek L. (2002) *Beneficial and harmful effects of thiols.* Pol J Pharmacol. 54(3): 215-23.
80. Marszał M. (2007) *Ekspozycja na dym tytoniowy a poziom homocysteiny i jej kofaktorów we krwi i moczu u osób palących i niepalących. Praca doktorska.* Katedra i Zakład Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku. Gdańsk.
81. Russell V., Luepker MD. (1999) *WHO MONICA Project: what have we learned and where to go from here?* Public Health Reviews. 33(2): 337-396.
82. Russell M.A., Jarvis M.J., Devitt G., Feyerabend C. (1981) *Nicotine intake by snuff users.* Br Med J. 283(6295): 814-817.
83. Svensson C.K. (1987) *Clinical pharmacokinetics of nicotine.* Clin Pharmacokin 12(1): 30-40.
84. Benowitz N.L., Jacob P. 3rd, Fong I., Gupta S. (1994) *Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine.* J Pharmacol Exp Ther. 268(1): 296-303.
85. Hukkanen J., Jacob P. 3rd, Benowitz N.L. (2005) *Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine.* Pharmacol Rev. 57(1): 79-115.
86. Piekoszewski W., Florek E., Kulza M., i wsp. (2009) *Opracowanie metody oznaczanie metabolitów nikotyny w moczu.* Przegl Lek. 66(10): 593-597.

87. Messina E.S., Tyndale R.F., Sellers E.M. (1997) *A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes*. J Pharmacol Exp Ther. 282(3): 1608-1614.
88. Seńczuk M. (2007) *Oznaczanie nikotyny we włosach noworodków matek palących tytoń*. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań.
89. Zevin S., Jacob P 3rd., Geppetti P., Benowitz N.L. (2000) *Clinical pharmacology of oral cotinine*. Drug Alcohol Depend. 60: 13-18.
90. Binnie V., McHugh S., Macpherson L. i wsp. *The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine*. Oral Dis. 10(5): 287-293.
91. Fahlbusch S.A., Tsikas D., Mehls C. i wsp. (2004) *Effects of carvedilol on oxidative stress in human endothelial cells and healthy volunteers*. Eur J Clin Pharmacol. 60(2): 83-88.
92. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Nguyen Khoa T. (1998) *Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure*. J Immunol. 1;161(5):2524-2532.
93. Witko-Sarsat V., Gausson V., Nguyen A.T. (2003) *AOPP - induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients*. Kidney Int. 64(1): 82-91.
94. Kalousová M., Skrha J., Zima T. (2002) *Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus*. Physiol Res. 51(6): 597-604.
95. Kayali R., Cakatay U., Akçay T., Altuğ T. (2006) *Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat*. Cell Biochem Funct. 24(1): 79-85.
96. Henle T., Deppisch R., Beck W. i wsp. (1999) *Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds*. Nephrol Dial Transplant. 14(8): 1968-1975.
97. Harma M., Harma M., Erel O. (2005) *Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 118(1): 47-51.
98. Di Rosa A.E., Gangemi S., Cristani M., i wsp. (2009) *Serum levels of carbonylated and nitrosylated proteins in mobbing victims with workplace adjustment disorders*. Biol Psychol. 82(3): 308-311.
99. Saville B. (1958) *A Scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols*. Analyst. 83: 670-672.

100. Chelchowska M., Maciejewski T., Ambroszkiewicz J. i wsp. (2009) *The effect of tobacco smoking on nitric oxide serum concentration in pregnant women and umbilical cord blood*. *Przegl Lek.* 66(10): 648-651.
101. Poręba R., Jędrzejko M., Poręba A., Sioma-Markowska U. (2008) *Wskazania do cięcia cesarskiego*. *Perinat Neonat Ginekol.* 1(1): 11-18.
102. Polskie Towarzystwo Ginekologiczne (2009) *Rekomendacje zespołu ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące opieki okołoporodowej i prowadzenia porodu*. *Ginekol Pol.* 80; 548-557.
103. Polańska K., Hanke W., Sobala W., Jurewicz J. (2007) *Ekspozycja na dym tytoniowy kobiet w ciąży - wyniki badania prospektywnego w regionie Łódzkim*. *Przeg. Lek.* 64(10): 824-826.
104. Florek E., Pieszkowski W., Bręborowicz G.H. i wsp. (2004) *Ocena ankietowa i biochemiczna palenia tytoniu przez kobiety rodzące*. *Przegl Lek.* 61 (4): 345-347.
105. Biliński P. (2012) *Podręcznik dla funkcjonariuszy Państwowej Inspekcji Sanitarnej w zakresie stosowania Ustawy o Ochronie Zdrowia przed następstwami używania tytoniu i wyrobów tytoniowych*. Główny Inspektorat Sanitarny. Warszawa.
106. Florek E., Pieszkowski W., Rybakowski Ł., Moczko J. (2004) *Using a questionnaire and cotinine concentration in urine for study smoking habit and exposure to ETS fo pregnant women*. *Przegl Lek.* 61(10): 993-996.
107. Lach J., Kłyszajko C., Ziółkowski M. i wsp. (2001) *Parametry urodzeniowe noworodka w zależności od długości palenia papierosów w czasie ciąży*. Rozdział z książki: Florek E., Piekoszowski W., Wrzosek J. *Kobieta i tytoń : współczesne poglądy*. Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Poznań.
108. Muramatsu M., Umemura S., Fukui J. i wsp. (1987) *Estimation of personal exposure to ambient nicotine in daily environment*. *Int Arch Occup Environ Health.* 59(6): 545-550.
109. Szymańska J., Frydrych B., Bruchajzer E. (2007) *Nikotyna. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*. 2(52): 121-154.
110. Rozwód P.; Polska Agencja Prasowa. [www.PAP.pl](http://www.PAP.pl). 02 2013.
111. Jósiak M., Jędrzejczak P., Depa-Martynów M., Pawelczyk L. (2006) *Ekspresja genu receptora foli tropiny w komórkach ziarnistych u pacjentek palących i niepalących papierosów uczestniczących w programie zapłodnienia pozaustrojowego*. *Przegl Lek.* 63: 83-88.
112. Castles A., Adams E., Melvin C. i wsp. *Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses*. *Am J Prev Med.* 16(3): 208-215.

113. Hanke W. (1999) *Społeczne, zawodowe i środowiskowe czynniki ryzyka wcześniactwa i hipotrofii płodu w rejonie łódzkim*. Instytut Medycyny Pracy. Łódź.
114. Sochaczewska D., Czeszyńska M.B., Konefał H. i wsp. (2009) *Ocena zależności między stężeniem kotyniny we krwi pępowinowej a wybranymi wskaźnikami niedotlenienia okołoporodowego*. Ginekol Pol. 80(12): 920-926.
115. Baumert M. (2004) *Wpływ palenia papierosów przez ciężarną na rozwój płodu i noworodka*. Przegląd Pediatr. 34(2): 79-83.
116. Simpson WJ. (1957) *A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity*. Am J Obstet Gynecol. 73(4): 807-815.
117. Eskenazi B., Prehn A.W., Christianson R.E. (1995) *Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: the effect on birthweight*. Am J Public Health. 85(3): 395-398.
118. Iwanowicz-Palus G., Walentyn E., Wiktor H. i wsp. (2002) *Ocena masy urodzeniowej i stanu ogólnego noworodków matek palących i niepalących podczas ciąży*. Wiad Lek. 1: 153-156.
119. Adamek R., Florek E., Bręborowicz G.H. (2003) *Ekspozycja kobiet ciężarnych na dym tytoniowy a urodzeniowa masa ciała noworodków*. Rozdział z książki: Florek E., Piekoszowski W. *Tytoń a zdrowie: choroby odtytoniowe*. Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Poznań
120. Kramer M.S. (1987) *Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis*. Bull World Health Organ. 65(5): 663-737.
121. Wikström A.K., Stephansson O., Cnattingius S. (2010) *Tobacco use during pregnancy and preeclampsia risk effects of cigarette smoking and snuff*. Hypertension 55: 1254-1259.
122. Cudmore M., Ahmad S., Al-Ani B. i wsp. (2007) *Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by hemeoxygenase - 1*. Circulation. 115(13): 1789-1797.
123. Hausteil K.O. (1999) *Cigarette smoking, nicotine and pregnancy*. Int J Clin Pharmacol Ther. 37(9): 417-427.
124. Grangé G., Pannier E. (2005) *Effect of smoking on mode of delivery and per partum hypoxia and acidosis*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 34(1) Spec: 3S 146-151.
125. Habek D., Habek J.C., Ivanisević M., Djelmis J. (2002) *Fetal tobacco syndrome and perinatal outcome*. Fetal Diagn Ther. 17(6): 367-371.
126. Mayes T., Reid J. (1994) *Meconium staining: is it related to maternal smoking?* J Ky Med Assoc. 92(10): 401-405.

127. Leonardi-Bee J., Britton J., Venn A. (2011) *Secondhand smoke and adverse fetal outcomes in nonsmoking pregnant women: a meta-analysis*. Pediatrics. 127(4): 734-741.
128. Usta I.M., Mercer B.M., Sibai B.M. (1995) *Risk factors for meconium aspiration syndrome*. Obstet Gynecol. 86(2): 230-234.
129. Gennser G., Marssal K., Branmtmark B. (1975) *Maternal smoking and fetal breathing movements*. Am J Obstet Gynecol. 123: 861-867.
130. Garn S., Johnston M., Ridella S. i wsp. (1981) *Effect of maternal cigarette smoking on Apgar scores*. Am J Dis Child. 135: 503-506.
131. Apgar V. (1953) *A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant*. Current researches in anesthesia & analgesia. 4 (32): 260–7.
132. X (1989) *Is the Apgar score outmoded?* Lancet. 18;1(8638): 591–592.
133. Jagielska I., Kazdepka-Ziemińska A., Racinowski F. i wsp. (2007) *Zjawisko nikotynizmu wśród ciężarnych. Palenie papierosów w ciąży a stan noworodka*. Przegl Lek. 64: 618-621.
134. Low J.A. (1997) *Intrapartum fetal asphyxia: definition, diagnosis, and classification*. Am J Obstet Gynecol. 176(5): 957-959.
135. Skotnicki M.Z., Urban J. (2000) *Relationship between Doppler velocimetry at middle cerebral artery and umbilical artery and status of newborn*. Ginekol Pol. 71(4): 368-374.
136. Harrison K.L., Robinson A.G. (1981) *The effect of maternal smoking on carboxyhemoglobin levels and acid-base balance of the fetus*. Clin Toxicol. 18(2): 165-168.
137. Oncken C.A., Henry K.M., Campbell W.A. i wsp. (2003) *Effect of maternal smoking on fetal catecholamine concentrations at birth*. Pediatr. Res. 53: 119-124.
138. Ingvarsson R.F., Bjarnason A., Dagbjartsson A. i wsp. (2007) *The effects of smoking in pregnancy on factors influencing fetal growth*. Acta Paediatr. 96(3): 383-386.
139. Król M., Florek E., Kornacka M.K. i wsp. (2009) *Clinical condition of the newborn versus tobacco smoke exposure during fetal life*. Przegl Lek. 66(10): 548-553.
140. Sobczak A., Wardas W., Zielińska-Danch W. i wsp. (2005) *Biomarkery narażenia na dym tytoniowy*. Przedl Lek. 62(10): 1192-1199.
141. Laskowska-Klita T., Chełchowska M., Leibschang J. (2005) *Stężenie kotyniny w surowicy krwi i moczu palących kobiet ciężarnych oraz w łożysku i krwi pępowinowej noworodka*. Przedl Lek. 62(10): 1007-1009.
142. Waage H., Silsand T., Urdal P., Langård S. (1992) *Discrimination of smoking status by thiocyanate and cotinine in serum, and carbon monoxide in expired air*. Int J Epidemiol. 21(3): 488-493.



143. Berlin I., Heilbronner C., Georgieu S i wsp. (2010) *Newborns' cord blood plasma cotinine concentrations are similar to that of their delivering smoking mothers*. Drug Alcohol Depend. 1;107(2-3): 250-252.
144. Pojer R., Whitfield J.B., Poulos V. i wsp. (1984) *Carboxyhemoglobin, cotinine, and thiocyanate assay compared for distinguishing smokers from non-smokers*. Clin Chem. 30(8): 1377-1380.
145. Sastry B.V., Chance M.B., Hemontolor M.E. Goddijn-Wessel T.A. (1998) *Formation and retention of cotinine during placental transfer of nicotine in human placental cotyledon*. Pharmacology. 57(2): 104-16.
146. Pastrakuljic A., Schwartz R., Simone C. i wsp. (1998) *Transplacental transfer and biotransformation studies of nicotine in the human placental cotyledon perfused in vitro*. Life Sci. 63(26): 2333-2342.
147. Lambers D.S., Clark K.E. (1996) *The maternal and fetal physiologic effects of nicotine*. Semin Perinatol. 20(2): 115-126.
148. Laskowska-Klita T., Gajewska J., Chelchowska M. (2002) *Metaboliczne skutki toksycznego dzialania dymu tytoniowego u ludzi*. Brom Chem Toksykol. 25: 65.
149. Aarikan S., Konukoglu D., Ancan C. i wsp. *Lipid peroksydation and antioksydant status in maternal and cord blood*. Gynecol Obstet Invest. 51(3): 145-149.
150. Tortladze M. Kintraia N., Parkauli M., Sanikidze T. (2013) *Blood antioxidant enzyme activity during physiological and preeclampsia syndrome complicated pregnancy*. Georgian Med News. 215: 12-16.
151. Uotilo J., Tuimala R., Aarnio T. i wsp. (1991) *Lipid peroxydation products selenium dependent glutathione peroxidase and vitamine E in normal pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 26;42(2): 95-100.
152. Myatt L., Cui X. (2004) *Oxidative stress i placenta*. Histochem Cell Biol. 122(4), 369-382.
153. Chelchowska M., Ambroszkiewicz J., Gajewska J. i wsp. (2011) *The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn*. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol. 155: 132-136.
154. Orhon F.S., Ulukol B., Kahya D. i wsp. (2009) *The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status*. Eur J Pediatr. 168(8), 975-81.
155. Lovero G., Greco P., Capuano F. i wsp. (1996) *Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension*. Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol. 70(2): 123-127.

156. Kowalczyk E., Kopff A., Kopff M. (2005) *Tlenek azotu - oksydant czy antyoksydant?* Wiad Lek. 58: 540-543.
157. Patil S.B., Kodiwadmath M.V., Kodiwadmath S.M. (2007) *Role of lipid peroxidation and enzymatic antioxidants in preganacy induced hypertension.* Clin Exo Obstet Gynecol. 36(2): 110-112.
158. Al-Shelby M.M., Mansour M.A. (2012) *Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in diabetic and hypertensive women during labor.* Oxid Med Cell Longev. 2012:329743. doi: 10 1155/2012/329743, Epub 2012 Jul 24.
159. Zuwalla-Jagiełło J. (2009) *Terapia chorób z udziałem końcowych produktów zaawansowanej glikacji w ich patogenezie.* Pol Merk Lek. 27: 152-155.
160. Szumska M., Wielkoszyński T., Malcher I. i wsp. *Końcowe produkty zaawansowanej glikacji białek (AGEs) a palenie tytoniu i nawyki żywieniowe w grupie młodych osób dorosłych.* Przegl Lek. 68: 746-750.
161. Cerami C., Founds H., Nicholl I. i wsp. (1997) *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.* Proc Natl Acad Sci. 94(25): 13915-13920.
162. Chekir C., Nakatsuka M., Noguchi S. i wsp. (2006) *Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress.* Placenta. 27(2-3): 225-233.
163. Dane C., Buyukasik H., Dane B., Yayla M. (2009) *Maternal plasma fibronectin and advanced oxidative protein products for the prediction of preeclampsia in high risk pregnancies: a prospective cohort study.* Fetal Diagn Ther. 26(4): 189-94.
164. Noyan T., Güler A., Sekeroğlu M.R., Kamaci M. (2006) *Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia.* Aust N Z J Obstet Gynaecol. 46(6), 486-491.
165. Karacay O., Sepici-Dincel A., Karcaaltincaba D. i wsp. (2010) *A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation.* Diabetes Res Clin Pract. 89(3), 231-238.
166. Halliwell B.B., Poulsen H.E. (2006) *Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress, chapt. 2. ed.* Rozdział z książki: Wooten J.B., Chouchame S., McGrath T.E. *Cigarette smoke and oxidative stress.* Springer. Freiburg.
167. Bizoń A., Milnerowicz H. (2012) *Wpływ palenia papierosów na stężenie glutationu we krwi.* Przegl Lek. 69(10): 809-811.
168. Garg N., Singh R., Dixit J. i wsp. (2006) *Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers.* J Periodont Res. 41(5): 405-410.

169. Kuipers I., Bracke K.R., Brusselle G.G. i wsp. (2012) *Smoke decreases reversible oxidations S-glutathionylation and S-nitrosylation in mice*. Free Radic Res. 46(2): 164-173.
170. Woźniak A., Kulza M., Seńczuk-Przybyłowska M. i wsp. (2012) *Wybrane parametry biochemiczne stresu oksydacyjnego w wyniku ekspozycji na dym tytoniowy zwierząt uzależnionych od alkoholu etylowego*. Przegl Lek. 69(10): 824-832.
171. Listovsky I., Abramovitz M., Homma H., Niitsu Y. (1998) *Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotic by glutathione-S-transferases*. Drug Metabol Rev. 19(3-4): 305-318.
172. Gajewska B., Usarek E., Kaźmierczak B. i wsp. (2007) *Ekspresja izoenzymów transferazy S-glutationowej w płaskonabłonkowym raku języka i dna jamy ustnej*. Pol Merk Lek. 135: 196-199.
173. Baskaran S., Lakshmi S., Prasad P.R. (1999) *Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat*. Indian J Exp Biol. 37(12): 1196-1200.
174. Park E.Y., Hong Y.C., Lee K.H. i wsp. (2008) *Maternal exposure to environmental tobacco smoke, GSTM1/T1 polymorphisms and oxidative stress*. Reprod Toxicol. 26(3-4): 197-202.
175. Obolenskaya M.Y., Teplyuk N.M., Divi R.L. i wsp. (2010) *Pasanen MJ. Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions*. Toxicol Lett. 196(2): 80-86.
176. Tabacova S., Little R.E., Balabaeva L. i wsp. (1994) *Complications of pregnancy in relation to maternal lipid peroxides, glutathione, and exposure to metals*. Reprod Toxicol. 8(3): 217-224.
177. Chelchowska M., Laskowska-Klita T., Niemiec K.T. (2005) *Activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in erythrocytes of women smoking during pregnancy*. Przegl Lek. 62(10): 1039-1042.
178. Sidle E.H., Casselman R., Smith G.N. (2007) *Effect of cigarette smoke on placental antioxidant enzyme expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293(2): 754-758.
179. Aycicek A., Erel O., Kocyigit A. (2005) *Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers*. Pediatr Int. 47(6): 635-639.
180. Aycicek A., Ipek A. (2008) *Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood*. Eur J Pediatr. 167(1): 81-85.

181. Şahinli A.S., Marakoğlu K., Kiyici A. (2012) *Evaluation of the levels of oxidative stress factors and ischemia modified albumin in the cord blood of smoker and non-smoker pregnant women*. J Matern Fetal Neonatal Med. 25(7): 1064-1068.
182. Fayol L., Gulian J.M., Dalmasso C. i wsp. (2005) *Antioxidant status of neonates exposed in utero to tobacco smoke*. Biol Neonate. 87(2): 121-126.
183. Shaamash A.H., Elsnosy E.D., Makhoulouf A.M. i wsp. *Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eklampsia*. Int. J Gynecol Obstet. 68(3): 207-214.
184. Zdravkovic T., Genbacev O., McMaster M.T., Fisher S.J. (2005) *The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review*. Placenta. 26, Suppl A: S81-86.
185. Savvidou M.D., Hingorani A.D., Tsikas D. i wsp. (2003) *Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia*. Lancet. 3; 361(9368): 1511-1517.
186. Node K., Kitakaze M., Yoshikawa H. i wsp. (1997) *Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults*. Am J Cardiol. 79(11): 1538-1541.
187. Ozerol E., Ozerol I., Gökdeniz R. (2004) *Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine, folate, vitamin B12, and nitric oxide in pregnancy: a preliminary study*. Fetal Diagn Ther. 19(2): 145-148.
188. Pach D., Wilimowska J., Gomółka E., Targosz D. (2004) *The effect of smoking on serum nitric oxide (NO) in acutely carbon monoxide poisoned patients*. Przegl Lek. 61(10): 1073-1076.
189. Chambers D.C., Tunnicliffe W.S., Ayres J.G. (1998) *Acute inhalation of cigarette smoke increases lower respiratory tract nitric oxide concentrations*. Thorax. 53(8): 677-679.
190. Miller G.H., Golish J.A., Cox C.E., Chacko D.C. (1996) *Women and lung cancer: a comparison of active and passive smokers with nonexposed nonsmokers* Cancer Detect Prev. 18 (6): 421-430.
191. Cudmore M., Ahmad S., Al-Ani B. i wsp. (2007) *Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1*. Circulation. 115(13): 1789-97.
192. X. *Jak stworzyć miejsce pracy bez papierosa*. Przewodnik. (2001) Centrum Onkologii-Instytut w Warszawie. Warszawa.
193. James A.; Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. (2011) *Practice bulletin no. 123: thromboembolism in pregnancy*. Obstet Gynecol. 118(3): 718-729.
194. Rutherford S.E., Phelan J.P. (1991) *Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in pregnancy*. Obstet Gynecol Clin North Am. 18(2): 345-370.

195. Miranda Guisado M.L., Vallejo-Vaz A.J., Garcia Junco P.S. i wsp. *Abnormal levels of antioksidant defenses in a large sample of patients with hypertensive disorders in pregnancy.* Hypertens Res. 35(3): 274-278.

196. Raj D.S., Choudhury D., Welbourne T.C., Levi M. (2000) *Advanced glycation end products: a nephrologist's perspective.* Am J Kid Dis. 35(3): 365-380.