

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Nauk o Zdrowiu**

mgr Małgorzata Pięt

**Wpływ czynników środowiskowych na zawartość
wybranych metali w mleku kobiecym**

*Rozprawa na stopień
doktora nauk o zdrowiu*

*Promotor:
dr hab. n med. Paweł Rzymki*

*Katedra Zdrowia Matki i Dziecka
Poznań, 2017*

Spis treści

| | |
|--|----|
| Spis skrótów | 4 |
| 1. Wstęp | 6 |
| 1.1. Skład mleka kobiecego | 7 |
| 1.2. Właściwości mleka kobiecego | 10 |
| 1.2.1. Wydzielnicza immunoglobulina A | 11 |
| 1.2.2. Laktoferyna | 11 |
| 1.2.3. Lizozym | 13 |
| 1.2.4. Kompleks HAMLET | 14 |
| 1.2.5. Komórki macierzyste mleka kobiecego | 14 |
| 1.2.6. Antyoksydacyjne właściwości mleka kobiecego | 16 |
| 1.3. Szlaki metaboliczne biorące udział w powstawaniu mleka | 19 |
| 1.4. Występowanie i działanie biologiczne wybranych metali | 22 |
| 1.4.1. Glin | 23 |
| 1.4.2. Ołów | 25 |
| 1.4.3. Miedź | 27 |
| 1.4.4. Nikiel | 29 |
| 1.4.5. Cynk | 30 |
| 1.4.6. Żelazo | 33 |
| 1.5. Stres oksydacyjny w ciąży | 34 |
| 1.5.1. Dialdehyd malonowy | 36 |
| 1.6. Środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla niemowląt i małych dzieci | 38 |
| 2. Cel pracy | 41 |
| 3. Materiał i metodyka | 42 |
| 3.1. Grupa badana | 42 |
| 3.2. Procedura pobierania mleka | 43 |
| 3.2.1. Dane ankietowe | 44 |
| 3.3. Materiał biologiczny i oznaczenia analityczne | 45 |
| 3.4. Analiza statystyczna | 47 |
| 4. Wyniki | 48 |
| 4.1. Charakterystyka badanej grupy | 48 |
| 4.2. Steżenia wybranych metali i MDA w pokarmie kobiecym | 52 |
| 4.3. Wpływ palenia papierosów na zawartość metali i MDA w mleku | 53 |
| 4.4. Steżenia metali i MDA, a sposób ukończenia ciąży | 58 |
| 4.5. Wpływ posiadanych amalgamatowych wypełnień zębowych na steżenia badanych substancji | 59 |

| | |
|---|-----|
| 4.6. Zawartość metali i MDA a parametry antropometryczne noworodka i masa łożyska | 63 |
| 4.7. Wpływ wieku na zawartość metali i MDA | 64 |
| 4.8. Wpływ miejsca zamieszkania na stężenia metali i MDA | 65 |
| 4.9. Wpływ kontaktu z metalami na ich stężenia w mleku matki oraz zawartość MDA | 65 |
| 4.10. Choroby wikłające ciążę a stężenia badanych pierwiastków i MDA | 66 |
| 4.11. Wpływ metali i MDA na masę urodzeniową noworodka | 69 |
| 4.12. Wpływ metali i MDA na tydzień ukończenia ciąży | 70 |
| 4.13. Zawartość metali i MDA, a rodzaj diety | 71 |
| 4.14. Zawartość metali MDA, a występowanie żółtaczki u dziecka | 72 |
| 5. Dyskusja | 74 |
| 6. Wnioski | 91 |
| 7. Streszczenie | 92 |
| Abstract | 93 |
| 8. Piśmiennictwo | 94 |
| Załączniki | 112 |

Spis skrótów:

4-HNE – trans-4-hydroksynonenal

α -LA – (ang. α lactalbumin) α -laktoalbumina

As – arsen

BPA – bisfenol

CC – cięcie cesarskie

Cd – kadm

CMPA – (ang. Cow's Milk Protein Allergy) alergia białek mleka krowiego

CO – tlenek węgla

CO₂ – dwutlenek węgla

Cp – białko ceruloplazmina

Cr – chrom

CTR1. – białko wykazujące wysokie powinowactwo do jednowartościowych jonów miedzi

Cu – miedź

DHA – kwas dokozaheksaenowy

DNA – (ang. deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy

EDK – (ang. endocrine disrupting chemicals) związki endokrynne odpowiedzialne za naruszenie równowagi wydzielania wewnętrznego

ELISA – (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny lub

Fe – żelazo

FRAP – (ang. the ferric reducing ability of plasma) całkowita zdolność antyutleniająca osocza

HAMLET – (ang. human α lactalbumin made lethal to tumor cells) kompleks ludzkiej α -lactoalbuminy i kwasu oleinowego indukującego apoptozę komórek nowotworowych

IDA – (ang. iron deficiency anaemia) niedokrwistość związana z niedoborem żelaza

IGF – (ang. insulin-like growth factor) insulinopodobny czynnik wzrostu

K – potas

KL – poród kleszczowy

LC-PUFA – długołańcuchowych kwasów tłuszczowych

MDA – (ang. malondialdehyde) aldehyd dimalonowy

Mg – magnez
Mo – molibden
MT – metalotioneiny
MT – metalotioneina
Na – sól
Ni – nikiel
NK – (ang. natural killers) naturalni zabójcy, komórki układu odpornościowego
NO₂ – dwutlenek azotu
PM₁₀ – zanieczyszczenia pyłowe o średnicy 10 μm
PM_{2,5} – zanieczyszczenia pyłowe o średnicy 2,5 μm
PROM – (ang. preterm rupture of membrans) przedwczesne pęknięcie błon płodowych
PSN – poród siłami natury
PTWI – (ang. provisional tolerable weekly intake) tymczasowe tolerowane tygodniowe pobranie
RFT – reaktywne formy tlenu
S-IgA – (ang. secretory IgA) wydzielnicze IgA
SO₂ – dwutlenek siarki
TAS – całkowita zdolność antyoksydacyjna
TBARS – (ang. thiobarbituric reactive substances) związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym
immunoenzymosorpcyjny,
TWI – (ang. tolerable weekly intake) tolerowane tygodniowe pobranie
VE – wyciągacz próżniowy
WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
X (PXR/SXR) – receptor pregnanu (receptor nukleinowy receptora steroidowego i ksenobiotyku)
Zn – cynk

1. Wstęp

Karmienie pokarmem kobiecym jest zalecane przez wszystkie światowe organizacje zajmujące się zdrowiem matki i dziecka jako optymalny sposób odżywiania noworodka i niemowlęcia [1]. Mleko matki uznawane jest także za najlepszy pokarm zarówno dla noworodka donoszonego, jak i dla urodzonego przed czasem [2]. Przyjmuje się, że karmienie niemowlęcia piersią do szóstego miesiąca życia w pełni pokrywa jego potrzeby żywieniowe, a także zapewnia warunki prawidłowego rozwoju, chroni przed rozwojem wielu chorób, a w szczególności u dzieci tych rzadziej występują infekcje przewodu pokarmowego, dróg oddechowych, moczowych, zapalenia migdałków. Mniejsze jest ryzyko zachorowań na choroby nowotworowe czy cywilizacyjne. Prawidłowy jest również rozwój fizyczny dziecka, rzadko występują nieprawidłowości dotyczące wzrostu oraz wagi. Zauważona w 6 miesiącu życia nadwaga maleje wraz z wiekiem. Dlatego zalecane jest przedłużenie okresu karmienia piersią do 2 roku życia i dłużej, tak długo jak chce tego matka i dziecko [1]. Unikalna budowa większości składników mleka kobiecego, białek, tłuszczów, węglowodanów, składników mineralnych i witamin, odpowiednio przystosowanych do rozwoju funkcji trawiennych przewodu pokarmowego niemowlęcia powoduje, że jest on łatwo przyswajalny. Znajdujące się w mleku kobiety substancje i komórki powodują również bierną immunizację niedojrzałego immunologicznie organizmu dziecka [3]. Mleko kobiece oprócz składników odżywczych, zawiera także znaczną ilość innych cząsteczek, które to mogą pełnić funkcje bardzo różnorodne, stymulujące zarówno procesy odpornościowe jak i chroniące przed infekcjami wywołanymi przez wirusy, bakterie, grzyby, a w przypadku zachorowania dziecka wspomagające powrót do jego zdrowia [4-10]. Zawarta w mleku laktoferyna, białko wiążące żelazo komórki bakteryjnej, zapobiega zakażeniom *Escherichia coli*. Swoista immunoglobulina A-IgA, działa w jelicie niemowlęcia hamując wzrost bakterii i reprodukcję wirusów. Poza tym działają w mleku kobiecym, enzymy o właściwościach bakteriostatycznych, przeciwciała z krwi matczynej, leukocyty, neutrofile i makrofagi, a także niepatogenne bakterie. Wszystkie ww. składniki powodują biernie uodpornienie, a karmione piersią niemowlę wykazuje mniejszą zapadalność na ww. choroby. Stolce niemowląt karmionych piersią wykazują niższe pH niż karmionych sztucznie, co warunkuje m.in. utrzymywanie się w przewodzie pokarmowym niemowlęcia bakterii *Lactobacillus bifidus* [3,4]. Karmienie piersią sprzyja odpowiedniemu rozwojowi dziecka oraz wzmacnia więź między matką a dzieckiem [11-13]. Poprzez karmienie piersią zmniejsza się liczba zgonów dzieci a także liczba hospitalizacji i wizyt lekarskich. Dzieci karmione naturalnie jako osoby dorosłe rzadziej są otyłe i rzadziej

zapadają na cukrzycę [14-17]. Prawidłowa technika karmienia wpływa także na stymulację mięśni i narządów odpowiedzialnych za prawidłową artykulację, przeciwdziałając między innymi wadom wymowy. Ssanie piersi wspomaga rozwój jamy ustnej dziecka - dziąseł, kości policzkowych, mięśni twarzy. Stymuluje prawidłowy rozwój mięśni szczęki i zuchwy. Im dłużej dziecko jest karmione piersią, tym mniejsze jest ryzyko wystąpienia wad zgryzu. Jak wskazują badania, karmienie piersią może także redukować w późniejszych latach, ryzyko wystąpienia chrapania czy bezdechu sennego [18,19]. Karmienie piersią wpływa także na zmniejszenie ryzyka zachorowania na choroby alergiczne choć sam mechanizm nie jest dokładnie poznany. Wydaje się, że jest on przede wszystkim spowodowany obecnością w pokarmie kobiecym swoistego gatunkowo białka oraz obecnością probiotyków i prebiotyków, czynników o właściwościach immunologicznych chroniących noworodka przed obcymi antygenami [10,11].

Mleko matki to pierwsza żywność w życiu człowieka, która potencjalnie może zawierać związki toksyczne. Przez gruczoł piersiowy do mleka kobiecego może przedostawać się wiele zanieczyszczeń środowiskowych takich jak: polichlorowane bifenole, pestycydy, dioksyny, kadm, ołów, nikiel, glin, pierwiastki ziem rzadkich. Ich obecność w organizmie może wywierać negatywny wpływ na przebieg różnych procesów metabolicznych oraz reakcji układu odpornościowego w organizmie małego dziecka [20]. Podwyższony poziom toksycznych substancji we krwi i w pokarmie kobiet ma ścisły związek ze składem ich diety, stylem życia oraz ze środowiskiem w którym one przebywają [21]. Badania przeprowadzane na zwierzętach, wykazywały wczesne zagrożenia wieloma związkami chemicznymi, które to prowadziły do zmian w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka już od okresu życia płodowego aż do wieku dojrzałego [21].

1.1 Skład mleka kobiecego

Mleko kobiece jest roztworem koloidalnym, który zawiera idealne proporcje zarówno składników odżywczych jak i czynników niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju dziecka. Znaczące różnice w składzie pokarmu obserwowane są u matki noworodka urodzonego przed wyliczonym terminem, w stosunku do dziecka urodzonego o czasie. Odmienny jest także skład w zależności od etapu laktacji, pory dnia, fazy karmienia, diety matki, rodności kobiety czy czasu trwania pojedynczego karmienia. Ze względu na etapy laktacji wyróżniamy: mleko przedporodowe, siarę, mleko przejściowe

oraz mleko dojrzałe [11,23]. Światowa Organizacja Zdrowia [1] podaje, że siara wydzielana jest 0-5 dnia po porodzie, mleko niedojrzałe 6-14 dnia, natomiast mleko dojrzałe pomiędzy 15-30 dniem laktacji. Proces przejścia siary w mleko niedojrzałe, a następnie w mleko dojrzałe u każdej kobiety jest dość indywidualnym stanem, stąd niewielkie rozbieżności w określeniu przez badaczy okresu powstawania mleka niedojrzałego i dojrzałego [24-29] wahające się od 3 do 6 dni. Należy jednak podkreślić, że stężenia podstawowych składników, zawartych w mleku w każdym przypadku pozostają na charakterystycznym dla danego etapu laktacji poziomie. Mleko przedporodowe jest wydzielane w czasie laktogenezy I, a jego pojawienie się wynika z przechodzenia wydzieliny laktocytów do przestrzeni międzykomórkowych. Może się ono pojawiać w postaci skąpej wydzieliny już od 16. tygodnia ciąży [29]. Siara to wydzielina gruczołu mlecznego, która pojawia się w pierwszych dniach po porodzie. Jej ilość jest zróżnicowana i uzależniona głównie od liczby karmień, i waha się od 2 do 20 ml na karmienie. Średnio wynosi 100 ml na dobę. Siara jest gęstym, zazwyczaj żółtawym płynem. Skład jej znacząco różni się od składu dojrzałego mleka. W porównaniu z mlekiem dojrzałym przede wszystkim zawiera mniej tłuszczu a więcej laktozy, potasu, sodu, białka, laktoferyny, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, minerałów, immunoglobulin, a w szczególności immunoglobuliny A [29-31]. Siara ułatwia oddanie smółki przez noworodka oraz znacząco przyczynia się do rozwoju jego prawidłowej flory jelitowej. Przeciwciała zawarte w siarze chronią noworodka przed bakteriami i wirusami. Średnia kaloryczność 100 ml siary wynosi 67 kcal. Mleko przejściowe pojawia się w kolejnym etapie laktacji pomiędzy 7 a 14 dniem po porodzie. Stanowi etap pośredni pomiędzy siarą a mlekiem dojrzałym. W mleku przejściowym maleje stężenie immunoglobulin, witamin rozpuszczalnych w tłuszczu i białka. Natomiast wzrasta stężenie laktozy, tłuszczu oraz witamin rozpuszczalnych w wodzie. Mleko dojrzałe jest wydzielane przez gruczoły sutkowe zazwyczaj od 3. tygodnia po porodzie. Średnia kaloryczność 100 ml mleka dojrzałego wynosi 75 kcal. Natomiast pH wynosi 7.1. Jego głównym składnikiem (87%) jest woda. Tłuszcze stanowią ok 6% objętości mleka, są to przede wszystkim fosfolipidy, triacyloglicerole, kwasy tłuszczowe, sterole. Tłuszcze zawarte w mleku umożliwiają prawidłowy wzrost i rozwój dziecka, są łatwo przyswajalnym źródłem energii. Stężenie tłuszczu w mleku rośnie proporcjonalnie do czasu trwania pojedynczego karmienia. Białka stanowią 0,9% objętości mleka, zaliczamy do nich kazeinę, albuminę, α -laktoalbuminę, laktoferynę, immunoglobuliny, glikoproteiny, lizozym. Nie zawierają β -laktoglobulin, na które to składniki proteinowe uczulonych jest od 60% do 80% pacjentów, z rozpoznaną CMPA (ang. Cow's Milk

Protein Allergy) alergią białek mleka krowiego [22]. Węglowodany mleka ludzkiego to głównie laktoza oraz niewielkie ilości glukozy i galaktozy. Oligosacharydy zawarte w mleku sprzyjają rozwojowi *Lactobacillus bifidus*, tym samym warunkują powstanie prawidłowej flory jelitowej, która stanowi czynnik ochronny przed infekcjami układu pokarmowego. Natomiast glikoproteiny (do których zaliczamy m.in. immunoglobuliny) chronią organizm niemowlęcia przed wieloma różnymi patogenami. Ludzkie mleko zawiera również pierwiastki takie jak: potas, chlor, wapń, sód, magnez, cynk, fluor, chrom, selen, jod, żelazo, miedź, molibden, nikiel, fosfor, siarka. Są w nim także obecne witaminy B6, C, E, A, kwas foliowy K, B1, B2, B12, D, oraz biotyna i kwas pantotenowy[33-36]. Do hormonów zawartych w mleku ludzkim głównie zaliczamy tyroksynę, trójjodotyrozynę, kortyzol, estrogeny (E1,E2,E3) progesteron. W mleku znajdują się również sole żółci, prostaglandyny, erytropoetyna, insulina, naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor – EGF) oraz inne czynniki (np.TGF α , NGF, IGF1). Enzymy obecne w mleku (np. lipaza, amylaza, peroksydaza i inne) warunkują syntezę poszczególnych składników mleka wpływają na prawidłowy metabolizm oraz spełniają funkcje ochronne [32, 33].

Tabela 1. Średnie stężenie wybranych składników mleka dojrzałego. Opracowano na podstawie Lawrence R.A., Lawrence R.M., [32].

| Składnik | Stężenie |
|----------------------|-----------------|
| Laktoza g/L | 72 |
| Białko g/L | 10 |
| Tłuszcz g/L | 40 |
| Wapń mg/L | 280 |
| Magnez mg/L | 35 |
| Sód mg/L | 180 |
| Potas mg/L | 525 |
| Chlor mg/L | 420 |
| Żelazo mg/L | 0,3 |
| Cynk mg/L | 1,2 |
| Miedź mg/L | 0,25 |
| Witamina A μ g/L | 670 |
| Witamina D μ g/L | 0,55 |
| Witamina K μ g/L | 2,1 |
| Witamina E mg/L | 2,3 |

| | |
|-------------------|-----|
| Witamina C mg/L | 43 |
| Witamina B6 mg/L | 93 |
| Witamina B12 µg/L | 1 |
| Kwas foliowy µg/L | 85 |
| Jod µg/L | 110 |
| Selen µg/L | 20 |
| Mangan µg/L | 6 |
| Fluor µg/L | 16 |
| Chrom µg/L | 50 |

1.2 Właściwości mleka kobiecego

Właściwości i skład mleka ludzkiego są swoiste gatunkowo, jednakże nie są takie same u każdej kobiety. Ciągłym, dynamicznym zmianom jak już wcześniej opisano, podlega zawartość, ilość i proporcje składników mleka kobiecego, przystosowując się w sposób elastyczny do potrzeb zależnych od czasu trwania laktacji czy fazy i pory karmienia [39]. Dzięki takiemu swoistemu przystosowaniu swojego składu do etapu rozwoju dziecka, ludzkie mleko zapewnia całkowite pokrycie pierwszych potrzeb żywieniowych. Następnie w sposób ciągły stanowi cenne źródło składników odżywczych, czynników wzrostu, i wielu innych bioaktywnych składników które są zawarte w takim stężeniu i formie, aby były najlepiej przyswajalne dla niemowlęcia na każdym etapie jego wzrostu i rozwoju [37].

Rola składników odżywczych pozostaje nieprzeceniona, bo główną funkcją ludzkiego mleka jest żywienie, warto jednak pamiętać o mleku również jako substancji immunomodulującej [38]. Dzięki unikalnej kompozycji, od setek lat jest wykorzystywane w leczeniu ran, walce z zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi. Obecnie mleko kobiece ma zastosowanie, we wspomaganiu terapii w chorobach nowotworowych u osób dorosłych oraz profilaktyce i codziennej pielęgnacji. Odkrycie komórek macierzystych oraz kompleksu HAMLET (kompleks ludzkiej α -lactoalbuminy i kwasu oleinowego indukującego apoptozę komórek nowotworowych) w mleku kobiecym, dla wielu badaczy niesie ze sobą nowe nadzieje na wykorzystaniu mleka w leczeniu chorób z dotychczas ciężkim rokowaniem [40,41].

1.2.1 Wydzielnicza immunoglobulina A

Za najsilniejszy naturalny immunostymulant, uznana jest siara. Zawiera ona nawet 100-krotnie wyższe stężenie wydzielniczej immunoglobuliny S-IgA (12 g/L) aniżeli w mleku właściwym (0,5–1,0 g/L). Immunoglobulina S-IgA stanowi 80–90% wszystkich immunoglobulin zawartych w mleku. U matek dzieci urodzonych przedwcześnie jej stężenie jest dużo wyższe niż u matek dzieci urodzonych o czasie, aczkolwiek stężenie to wyrównuje się w mleku przejściowym [23]. Bierze ona udział w ochronie błon śluzowych układu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego. Immunoglobulina S-IgA w sianie matki jest swoista wobec mikroflory jej układu pokarmowego i dróg oddechowych. Bardzo ważną właściwością jest odporność S-IgA na enzymy trawienne. Przez układ trawienny przechodzi w niezmienionym stanie. Immunologiczne właściwości S-IgA dotyczą blokowania adhezji bakterii patogennych z gatunku *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae* do błon śluzowych gospodarza oraz utrudnienia ich penetracji, kolonizacji i neutralizacji wytwarzanych przez nie toksyn. Udokumentowano również istotną rolę S-IgA w walce z zapaleniem ucha środkowego i infekcjami górnych dróg oddechowych [39,41]. Metale mogą regulować odpowiedź immunologiczną organizmu na różnych jej etapach, modyfikując reakcje zapalne typu wczesnego i późnego, między innymi przez wpływ na liczbę krążących limfocytów T i B, komórek NK (natural killers) oraz komórek pamięci immunologicznej. Ołów może wpływać na odpowiedź immunologiczną humoralną, poprzez zmniejszanie wytwarzania IgA i IgG, predysponując tym samym osoby narażone do większej zapadalności na choroby o podłożu zapalnym oraz nowotworom [80].

1.2.2 Laktoferyna

Laktoferyna (LF) wchodzi w skład białek serwatkowych mleka kobiecego o właściwościach bioaktywnych. Produkowana jest przez komórki nabłonka wydzielniczego. Występuje także w takich wydzielinach jak ślina, łzy, nasienie, wydzielina w oskrzelach, pochwie i macicy [37]. Jest glikoproteina z rodziny transferyn, o właściwościach chelatujących czyli łączących się z jonami żelaza. W ten sposób posiada właściwości bakteriostatyczne, hamując wzrost patogenów. Posiada również cechy przeciwpasożytnicze, przeciwwirusowe, przeciwbólowe, reguluje metabolizm kości. Posiada odporność na enzymy proteolityczne. W sianie i mleku początkowym stężenie Laktoferyny (LF) jest znacząco wyższe (5–7g/L) niż w mleku dojrzałym (1–3g/L). Działanie bakteriostatyczne i antybakteryjne Laktoferyna (LF) może

być bezpośrednio związane z uszkodzeniem ściany komórkowej patogenu lub ze zmianą metabolizmu komórki, natomiast pośrednio, poprzez stymulację dojrzewania limfocytów T i B oraz stymulację syntezy immunoglobulin A i G. Ważną cechą Laktoferyny (LF) jest jej działanie wybiórcze. Hamuje ona wzrost *E. coli* i innych patogennych bakterii jelitowych, głównie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Nie hamuje natomiast wzrostu korzystnych bakterii jelitowych z rodzaju *Bifidobacterium*, dzięki czemu reguluje florę bakteryjną w układzie trawiennym. Laktoferyna (LF) zwiększa również wrażliwość bakterii na niektóre antybiotyki nawet 4-krotnie. Pozwala to obniżyć efektywną dawkę leku. W badaniach *in vitro* wykazano działanie antibakteryjne w stosunku do: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus mutans* [42]. Laktoferyna (LF) ma także działanie przeciwzapalne w mechanizmie modulacji układu immunologicznego, czyli redukcji stężenia cytokin prozapalnych (czynnik martwicy nowotworu a [TNF- α , *tumor necrosis factor* α] i interleukiny 1 [IL-1, *interleukin 1*]) oraz stymulacji wytwarzania cytokin przeciwzapalnych (IL-4 i IL-10). Infekcjom towarzyszy zwiększenie wytwarzania cytokin prozapalnych. Badania przeprowadzone na ciężarnych myszach wykazały, że w zakażeniach bakteryjnych drogą wstępującą przez szyjkę macicy, w których doszło do zapalenia błon płodowych (jest to częstą przyczyną poronień i porodów przedwczesnych), Laktoferyna (LF) podana *per os* obniżała stężenia IL-6 w surowicy zwierząt i przedłużała trwanie ciąży [9]. Poza szerokim spektrum działania antibakteryjnego Laktoferyny (LF), potwierdzono także jej działanie przeciwwirusowe w infekcjach wywołanych wirusem opryszczki (*Herpes*) typu 1 i 2, wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), ludzkim wirusem cytomegalii (CMV), rotawirusami, enterowirusami, wirusem grypy, zapalenia wątroby typu C (HCV) oraz wirusami zapalenia wątroby typu B (HBV) [23]. W przypadku zakażenia ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) działanie przeciwwirusowe polega na blokowaniu receptorów komórkowych wirusa, poprzez wiązanie się Laktoferyny (LF) do białek powierzchniowych. Hamuje również namnażanie się wirusa, blokując aktywność enzymów niezbędnych do replikacji [44]. Laktoferyna (LF) wykazuje działanie przeciwnowotworowe i chemioprewencyjne. Ważną funkcją Laktoferyny (LF) jest jej udział w transportowaniu żelaza, wynikającym ze zdolności tego białka do wiązania atomów pierwiastków z grupy metali, dlatego Laktoferyna (LF) wykazuje wysokie powinowactwo do ww. pierwiastka, co zwiększa jego przyswajalność z jelit. Oprócz roli w transporcie żelaza, bierze również udział w transporcie wapnia, miedzi, cynku, glinu i manganu. Przejawia także zdolności antyoksydacyjne (zapobiegając powstawaniu wolnych rodników) [44].

1.2.3. Lizozym

Lizozym (LY) jest aktywnym enzymem obecnym w ludzkim mleku w stężeniu 3000-krotnie wyższym niż w mleku krowim. Stanowi jedną z trzech substancji odpowiedzialnych za antibakteryjne i bakteriostatyczne działanie mleka ludzkiego. Wykazuje działanie antibakteryjne, rozszczepiając wiązania glikozydowe w ścianach komórkowych bakterii. Ścisłe współdziała z wcześniej omówioną Laktoferyną (LF), która oddziałuje z lipopolisacharydami błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, tworząc „luki”, przez które lizozym dostaje się do wnętrza komórki, skutecznie niszcząc patogeny [45]. Miejscowe podanie lizozymu na ranę łagodziło objawy bólowe i zmniejszało odczyn zapalny [42]. W świetle powyższego, interesujące wydaje się miejscowe stosowanie siary bezpośrednio po odciążeniu do wspomaganego gojenia się rany, na przykład na uszkodzoną skórę brodawek sutkowych podczas karmienia. Lizozym (LY) wykorzystywany jest obecnie w medycynie, kosmetologii i przemyśle spożywczym. W branży farmaceutycznej lizozym od wielu lat wykorzystuje się w produktach farmaceutycznych mających na celu leczenie zakażeń bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych, np. leczenie bólu gardła, zwiększających naturalną odporność organizmu, w terapii wspomagającej w chorobach nowotworowych (jako środek przeciwbólowy), w leczeniu paradontozy, w zapobieganiu próchnicy. Poza tym wykorzystuje się go w odżywkach dla niemowląt, w mleku przeznaczonym do karmienia wcześniaków cierpiących na różnego rodzaju infekcje, w terapii białaczki wywołanej promieniowaniem jonizującym czy też preparatach do czyszczenia soczewek. Lizozym w znaczący sposób wspomaga terapię antybiotykową, jak również leczenie z zastosowaniem antyseptyków, kortykosteroidów i enzymów proteolitycznych. Jest również wykorzystywany w testach immunologicznych typu ELISA [46-48]. W handlu dostępne są preparaty zawierające peptydy uzyskane z lizozymu, wykorzystywane jako naturalny środek konserwujący żywność. Wykazano, iż zastosowanie ich w stężeniu równym bądź większym niż 10 µg/ml działa inhibującą wobec zarówno wegetatywnych jak i przetrwalnikowych form *Bacillus subtilis*, które są uznawane za czynnik powodujący zatrucia pokarmowe [49]. Z kolei ocena samej aktywności lizozymu w organizmach ludzi i zwierząt może być wskaźnikiem występowania zmian patologicznych lub stanowić parametr pozwalający na ocenę zmian zachodzących w ich organizmach pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych. W badaniach nad karasiem złocistym (*Carassius auratus*) oceniano zmiany aktywności lizozymu w odpowiedzi na stan niedotlenienia u ryb. Aktywność lizozymu i enzymów antyoksydacyjnych mierzono w nerkach i wątrobie po ekspozycji na warunki niedotlenienia. Badania pozwoliły zaobserwować znaczący spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych i lizozymu przy poziomie tlenu rozpuszczonego równym 1 i 2 mg/L [50].

1.2.4. Kompleks HAMLET

Alfa-laktoalbumina (*a*-LA) jest dobrze poznaną metaloproteiną pochodzącą z mleka kobiecego o odczynie kwaśnym, zawierającą jony wapnia (Ca^{2+}). Jest to jedna z substancji odżywczych, która jak się uważa, odpowiada za funkcję neuroprotekcijną. Wiązania jonów wapnia w *a*-LA moduluje jej powinowactwo z kwasami tłuszczowymi oraz błonami lipidowymi. Może to mieć istotne znaczenie fizjologiczne. Stwierdzono również, że unikalna forma *a*-LA odizolowana od frakcji kazeiny mleka indukuje apoptozę komórek transformowanych, dzieje się tak przy jednoczesnym pominięciu zdrowych komórek. Forma ta przechodzi przez błonę komórkową następnie wchodzi do jądra komórkowego, gdzie powoduje fragmentację DNA- poprzez bezpośrednie działanie na poziomie jądrowym. Ponadto, współdziałając z mitochondriami, indukuje uwalnianie cytochromu C i aktywację kaskady kaspazy (proteazy asparaginianowej, będącej jednym z enzymów szlaku apoptozy). Stwierdzono także, że kompleks kwasu oleinowego z ludzką *a*-laktoalbuminą (HAMLET – ang. Human alfa-laktoalbumin made letal to tumor cells) wykazuje aktywność cytotoksyczną. Ponadto, kompleks HAMLET indukuje makroautofagię w komórkach nowotworowych który polega na usuwaniu z komórki jej fragmentów lub organelli, co prowadzi do śmierci komórki. Kompleks HAMLET przechodzi z cytoplazmy do jądra, gdzie jest akumulowany i współdziałając z białkami histonowymi zakłóca syntezę chromatyny, zapobiegając w ten sposób transkrypcji, replikacji oraz rekombinacji materiału genetycznego komórki [51]. Dlatego rozpatrywanie kompleksu HAMLET w stosunku do zawartości metali w mleku kobiecym oraz procesów powstawania wolnych rodników może być bardzo istotne w systemie ochrony rozwijającego się organizmu noworodka.

1.2.5. Komórki macierzyste mleka kobiecego

W ostatnich latach postęp technologiczny w dziedzinie mikroskopii, cytometrii przepływowej i biologii molekularnej wspomagał również badania komórek mleka matki, pokazując ich unikalne cechy i możliwości zastosowania. Według najnowszych badań większość komórek nie wywodzących się z układu immunologicznego, występujących w mleku kobiecym, jest pochodzenia nabłonkowego. Obejmują one dojrzałe komórki, takie jak komórki mioepitelialne - nabłonkowo mięśniowe, laktocyty - komórki wydzielnicze oraz pochodzące z pęcherzyków i przewodów mlecznych. Poza tymi komórkami, wykazano także obecność komórek macierzystych i progenitorowych [52]. W 2007 roku

zespół Petera Hartmanna stwierdził występowanie komórek macierzystych w mleku ludzkim. Po namnożeniu komórki te wykazywały właściwości pluripotencjalne, czyli posiadające zdolność różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych tzn. endodermy, mezodermy i ektodermy. Komórki macierzyste posiadają dwie unikalne cechy: zdolność samoodnawiania się tzn. kopiowania samych siebie, a także zdolność różnicowania w komórki dojrzałe poprzez odpowiednią stymulację. Pierwszy raport na temat komórek macierzystych opublikowano w 2012 roku. Wykazano w nim pluripotencjalne cechy populacji komórek wyizolowanych z mleka kobiecego, które następnie nazwano komórkami macierzystymi mleka kobiecego (ang. hBSCs, human Breast-milk Stem Cells) [52]. Analiza cytometrii przepływowej płynu z piersi kobiet podczas laktacji i w okresie spoczynku, wykazała, że tylko pierś podczas laktogenezy ma właściwość wytwarzania komórek macierzystych [53]. Jedno z przeprowadzonych doświadczeń dotyczyło takiej modyfikacji genetycznej u myszy-mamki. Badanie to umożliwiło śledzenie losów wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym komórek macierzystych po karmieniu, w organizmie potomstwa innej myszy. Następnie dokonana po okresie karmienia autopsja (narządy tych myszy ekstrahowano, utrwalano w formalinie i zatapiano w parafinie, następnie pocięto na skrawki i barwiono pod kątem immunologicznym z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej) wybranych organów mysich osesków, wykazała obecność komórek o właściwościach fluorescencyjnych w sercu, mózgu, wątrobie, trzustce, jamie żołądka, grasicy i śledzionie. Matki które powszechnie wydzielały geny TdTomato (TDT), karmiły oseski myszy, które poddano obrazowaniu w okresie karmienia piersią, ale także w życiu dorosłym. Analiza metodą cytometrii przepływu krwi pobranej od tych noworodków wykazała obecność komórek TDT+ pochodzących z mleka we krwi, co wskazuje na przeżycie niektórych komórek mleka i migrację do obiegu krwi. Niektóre z tych komórek TDT+ wydzielały markery komórek macierzystych - OCT4, NANOG, CD49f (rdzeniowe czynniki transkrypcyjne pluripotencji, obecne we wszystkich komórkach cechujących się pluripotencją), aktywne jedynie w komórkach na wczesnych etapach transdiferencjacji. Komórki posiadające te markery były zlokalizowane w układzie pokarmowym jeszcze kilka lat po zakończeniu karmienia [54]. Oznacza to, że nawet podczas długotrwałego procesu trawienia nie ulegają one dezaktywacji i usuwaniu z organizmu. Porównania dokonano pomiędzy embrionalnymi komórkami macierzystymi-hESCs, human Embryonic Stem Cells - i hBSCs, które to wykazało niezwykle podobieństwo, zarówno w ekspresji genów, jak i morfologii. W zakresie trzech listków zarodkowych różnicują oba typy komórek. Oznacza to, że sutek jest gruczołem wydzielającym

komórki mioepitelialne, laktocyty oraz jeszcze niezróżnicowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Natomiast te ostatnie mogą zostać przekształcone w komórki glejowe, neuronalne, osteoblasty, adipocyty, chondrocyty i kardiomiocyty, a także hepatocyty i komórki trzustki [55]. Dane te sugerują funkcjonalne różnicowanie komórek macierzystych mleka w narządach noworodka, w których to mogą zapewnić korzyści rozwojowe. Mogą one również brać udział w ich dojrzewaniu, utrzymaniu homeostazy, regeneracji organów dziecka (chronić przed negatywnym wpływem metali i stresem oksydacyjnym) na wczesnym etapie rozwoju.

1.2.6. Antyoksydacyjne właściwości mleka kobiecego

Mleko kobiece jako wydzielina gruczołów piersiowych o szczególnym znaczeniu ochronnym dla potomstwa posiada również, określoną zdolność antyoksydacyjną. Przejawia się to m.in. poprzez spontaniczną redukcję cytochromu c w mleku [58]. Nie jest znana jeszcze ostateczna lista antyoksydantów zawartych w mleku kobiecym stąd prowadzone są dalsze badania w tym kierunku. Ostatnio dla przykładu stwierdzono, że jeden wśród odkrytych składników mleka kobiecego, chinon pirochinoliny (PQQ), również posiada aktywność antyoksydacyjną [59]. Mleko zawiera długą listę uznanych antyoksydantów np.: cysteinę, kwas moczowy, kwas askorbinowy, b-karotenoidy, a-tokoferol i glutation [60,61]. Zawiera także laktoferynę – białko które jest katalizatorem reakcji utleniania w kontekście przeciwdziałania reaktywnym formom tlenu, a nie tylko białkiem wiążącym żelazo, które jest niezbędne w procesach rozmnażania bakterii. Stąd postulowane jest dodawanie rekombinowanej ludzkiej laktoferyny do mieszanek mlecznych zawierających znaczne ilości żelaza [62]. Korzystne działanie antyoksydacyjne laktoferyny potwierdzono w badaniach *in vitro* już po jej dodaniu do mieszanek mlecznych. Skutkowało to znacznym zmniejszeniem uszkodzeń oksydacyjnych w mieszankach [63]. Jednym z endogennych antyoksydantów w pokarmie kobiecym jest melatonina. Podstawową funkcją melatoniny jest koordynacja rytmów dobowych, okołodobowych i rocznych. Ponadto, w pracach doświadczalnych z ostatnich lat udowodniono, że melatonina jest antyoksydantem i zmiataczem (ang. scavengers) wolnych rodników tlenowych (ROS), a głównie rodnika wodorotlenowego (hydroksylogowego) HO° (najbardziej reaktywny spośród wszystkich rodników tlenowych) oraz rodnika nadotlenkowego ROO° (posiadającego istotne znaczenie w procesie peroksydacji lipidów). Wykazano również, że może ona neutralizować tlen singletowy, tlenek azotu i bardzo szkodliwy nadtlenoazotyn [64,65]. Te połączone działania melatoniny sprawiają, że jest ona zdolna do znacznej redukcji szkodliwych

procesów oksydacyjnych występujących w komórce i co za tym idzie w całym organizmie. Jest wysoce efektywna w zabezpieczeniu DNA, lipidów, błon komórkowych i białek przed oksydacyjnymi uszkodzeniami [66,67]. Melatonina, w odróżnieniu od wielu innych antyoksydantów (np. α -tokoferolu), bardzo łatwo przechodzi przez wszelkie błony biologiczne, w tym przez barierę krew-mózg, stąd też jej działanie ochronne nie ogranicza się do wybranego miejsca, ale jest wszechobecne w ustroju. Mimo wykazania różnych składników bariery antyoksydacyjnej w pokarmie naturalnym, ich stężenia różnią się znacząco i są zależne od takich czynników jak: tydzień ciąży w którym nastąpił poród, okresu trwania laktacji, diety matki karmiącej, przyjmowania przez nią preparatów witaminowych w ciąży i w czasie laktacji, oraz od regionu geograficznego, w którym zamieszkuje [61,65]. Największe stężenia takich antyoksydantów jak witamina A, α -tokoferol, karotenoidy i glutation są w siarze, a z czasem trwania karmienia piersią ich stężenia stopniowo obniżają się [68,69]. W pokarmie naturalnym ważnymi składnikami bariery antyoksydacyjnej są enzymy. Stwierdzono, że co najmniej trzy główne to znaczy katalaza, dysmutaza nadadtlenkowa i peroksydaza glutationowa są obecne w mleku kobiecym. Aktywność katalazy w mleku kobiecym jest 10- krotnie wyższa niż w mleku krowim [70] i maleje wraz z czasem trwania laktacji [71]. Natomiast aktywność dysmutazy nadadtlenkowej jest 10-25 - krotnie wyższa w mleku niż w surowicy krwi matki, a aktywność peroksydazy glutationowej 2-5 - krotnie wyższa [72]. Ważnym jest również to że, aktywność tych dwóch ostatnich enzymów rośnie wraz z czasem trwania laktacji, odmiennie niż jest to obserwowane w przypadku nieenzymatycznych składników bariery antyoksydacyjnej [72]. Sugerowałoby to znaczący wpływ nieenzymatycznych antyoksydantów i katalazy na całkowitą zdolność antyoksydacyjną w pokarmie naturalnym, szczególnie w siarze. Badania po raz kolejny wykazują, że pokarm naturalny zapewnia lepszą od pokarmu sztucznego ochronę przed niekorzystnym wpływem reaktywnych form tlenu, dzięki zawartości licznych antyoksydantów o zróżnicowanym mechanizmie działania [71]. Podobną ochronę zapewnia również pokarm matek dzieci urodzonych przedwcześnie [71]. Istotne znaczenie ma również to, że aktywność dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej jest wyższa w mleku matek dzieci urodzonych przedwcześnie [72]. Zdolność antyoksydacyjna mleka kobiecego ulega zmianie wraz z upływem czasu i sposobem jego przechowywania. Coraz częstsze staje się obecnie magazynowanie pokarmu naturalnego. Dzieje się tak wraz z szybszym podjęciem przez matki aktywności zawodowej, oraz w przypadku urodzenia dziecka przedwcześnie. Niestety, przechowywanie pokarmu obniża jego zdolność antyoksydacyjną. Stwierdzono,

że zmniejsza się zawartość aktywnej witaminy C w mleku. Już po 24 godzinach przechowywania mleka w lodówce poziom biodostępnej witaminy C zmniejsza się o 1/3. Natomiast w pokarmie przechowywanym przez 2 miesiące w zamrażarce, poziom witaminy C obniża się o 2/3 w stosunku do poziomu wykazanego w świeżym pokarmie [73]. Dlatego u dzieci karmionych głównie pokarmem przechowywanym, powinna być zalecana suplementacja witaminy C. Problem ten dotyczy w szczególności dzieci przedwcześnie urodzonych, czy też hospitalizowanych z innych powodów, takich jak np. infekcje, kiedy dostarczenie odpowiedniej ilości antyoksydantów wydaje się być szczególnie ważne. O nasileniu reakcji wolnorodnikowych u tych dzieci powstało wiele prac. Niedobory witamin o działaniu antyoksydacyjnym, w szczególności witamin A i E, spowodowały umieszczenie w standardach suplementacji tych substancji [74].

Zawartość licznych antyoksydantów o zróżnicowanym mechanizmie działania, powoduje, że pokarm naturalny zapewnia lepszą od pokarmu sztucznego ochronę przed niekorzystnym wpływem na organizm dziecka, reaktywnych form tlenu [71]. Mleko matek dzieci urodzonych przedwcześnie zapewnia podobną ochronę jak mleko matek dzieci urodzonych o czasie [71]. Aczkolwiek aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy glutationowej jest wyższa w mleku matek dzieci urodzonych przed terminem [72]. Tym bardziej interesujący wydaje się być wpływ naturalnego karmienia na nasilenie stresu oksydacyjnego u dzieci. Zawartość produktów peroksydacji lipidów w mleku kobiecym jest wyższa niż w pokarmach sztucznych [75], choć nie wpływa to na poziom całkowitej zdolności antyoksydacyjnej [93], a wydalanie z moczem produktów utleniania lipidów przez dzieci karmione naturalnie jest istotnie niższe w porównaniu ze stężeniem tych produktów obecnych w moczu dzieci karmionych sztucznie [94]. Ponad to badania ostatnich lat dostarczyły bezpośrednich dowodów na to, że zawarte w mleku kobiecym antyoksydanty zwiększają wydolność bariery antyoksydacyjnej w surowicy krwi u dzieci. Badana całkowita aktywność antyoksydacyjna u wcześniaków karmionych piersią w surowicy krwi, jest istotnie wyższa niż u dzieci karmionych sztucznie [92,95]. Stwierdzono także, że stężenie karotenoidów obecnych we krwi u dzieci karmionych naturalnie wzrasta systematycznie po porodzie, podczas gdy u dzieci karmionych sztucznie stopniowo się obniża [91]. Ochronnego wpływu karmienia naturalnego dowiedziono w grupie dzieci przedwcześnie urodzonych, u których stres oksydacyjny w dużym stopniu jest odpowiedzialny za powstawanie powikłań wcześniactwa takich jak: dysplazja oskrzelowo-płucna, retinopatia wcześniacza i martwicze zapalenie jelit [89,90]. Częstość występowania martwiczego zapalenia jelit jest 6-10 razy wyższa u noworodków i niemowląt karmio-

nych sztucznie w stosunku do dzieci karmionych naturalnie [88]. Natomiast wczesne wprowadzenie karmienia naturalnego u wcześniaków w znaczący sposób zmniejsza częstość występowania retinopatii wcześniaczej [96]. Istotne znaczenie ma także fakt, iż u dzieci szczególnego ryzyka rozwoju powikłań, z bardzo niską masą urodzeniową, wykazano korzystny wpływ pokarmu naturalnego na zmniejszenie nasilenia stresu oksydacyjnego. Miernikiem nasilenia reakcji wolnorodnikowych w tym badaniu było stężenie produktów oksydacji DNA [97]. Na zaburzenia równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej, i tak już przesuniętej w stronę reakcji utleniania w okresie ciąży, porodu i pòłogu, wpływają również czynniki zewnętrzne. Najsilniejszym i dość często występującym jest dym tytoniowy, który w jednej zaciągniętej porcji głównego strumienia dymu papierosowego (jednostka objętości to 35-55 cm³) zawiera aż 10¹⁵ cząsteczek reaktywnych form tlenu [98].

1.3. Szlaki metaboliczne biorące udział w powstawaniu mleka

Mleko jest wydzieliną powstającą w wyniku miejscowej syntezy przez komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego oraz przesączem rozpuszczalnych składników krwi i płynu śródmiąższowego, które zawiera wiele białek o różnorodnych funkcjach. W powstawanie mleka ludzkiego zaangażowanych jest kilka szlaków, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie niezwykle złożonej pod względem składu wydzieliny. Cztery, spośród pięciu szlaków, angażują komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego i obejmują: syntezę białek, ich transport wewnątrz komórek nabłonkowych, a następnie egzocytozę (I), powstawanie i wydzielanie lipidów (II), transport przez błonę (III) oraz transcytozę (IV). Piąta z kolei ścieżka jest szlakiem okołokomórkowym (ryc.1) [23,75]. W wyniku egzocytozy wydzielana jest większość składników mleka. Na rybosomach komórek pęcherzykowych gruczołu sutkowego (alveolar cell from lactating mammary gland) są syntetyzowane białka, które następnie przenoszone są do retikulum endoplazmatycznego, stąd do aparatu Golgiego, a po zapakowaniu do pęcherzyków wydzielniczych są wydzielane poza komórkę (ryc.1, droga I). W ten sposób uwalniane są m.in. laktoferyna, α -laktoalbumina, kwaśne białko serwatki oraz kazeina, która do mleka transportowana jest w postaci miceli kazeinowych zawierających jony wapnia [23,81]. Pęcherzyki wydzielnicze są również źródłem cytrynianu wapnia, fosforanu oraz glukozy.

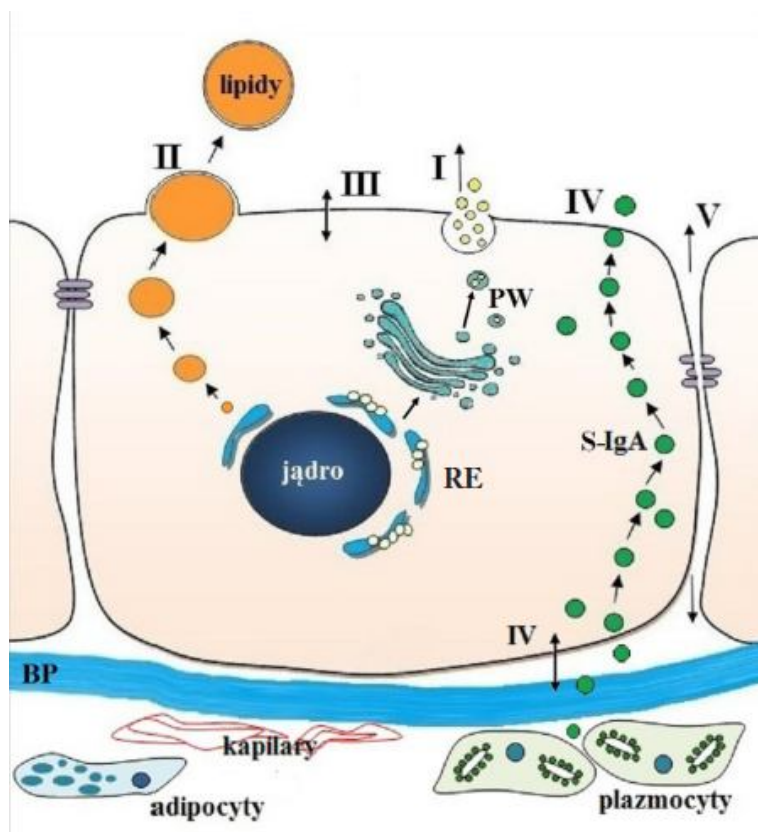
Wydzielanie trójacylogliceroli do mleka odbywa się poprzez szczytowe części komórek wydzielniczych (ryc.1, droga II). Trójacyloglicerole, powstałe z kwasów tłuszcz-

czowych i glicerolu w retikulum endoplazmatycznym, łączą się tworząc kuleczki tłuszczu, które po zbliżeniu się do szczytowych części komórki są wydzielane do mleka razem z otaczającym je fragmentem błony komórki gruczołu sutkowego. Błona otaczająca wydzielone kuleczki tłuszczu jest źródłem fosfolipidów oraz cholesterolu, a także zapobiega łączeniu się poszczególnych kuleczek ze sobą. W szczytowych fragmentach komórek wydzielniczych odbywa się transport przez błonę małych cząsteczek, takich jak woda, kationy sodowe i potasowe oraz chlorki i niektóre monosacharydy (ryc.1, droga III) [23].

W procesie tzw. transcytozy wytwarzane są m.in. wydzielnicze IgA (S-IgA - sekretory IgA). W procesie tym zsyntetyzowane przez plazmocyty IgA są wiązane przez odpowiednie receptory na jednym biegunie komórek nabłonkowych, a następnie w postaci pęcherzyków wewnątrzcytoplazmatycznych są transportowane na ich drugi koniec. Po połączeniu się pęcherzyka z błoną komórki transportowane S-IgA są uwalniane do mleka (ryc. 1, droga IV) [23]. W podobny sposób mogą z osocza do mleka przedostawać się inne białka, hormony oraz czynniki wzrostu. Szlak okołokomórkowy umożliwia bezpośrednią wymianę składników między przestrzenią śródmiąższową, osoczem, a mlekiem. Droga ta odgrywa istotną rolę w pierwszych dniach po porodzie, bowiem wówczas do mleka w ten sposób mogą przedostawać się niektóre składniki osoczowe, głównie albumina oraz immunoglobuliny. W 2-3 tygodniu laktacji dochodzi do uszczelnienia przestrzeni międzykomórkowej, co prowadzi do zamknięcia drogi (ryc.1, szlak V) [23,75].

Sam mechanizm przedostawania się pierwiastków toksycznych do mleka jest wciąż niedokładnie poznany. Uważa się, że może on polegać na łączeniu się metali z nieswoistymi lub swoistymi nośnikami białek w osoczu krwi – metalotioneinami. Miedź podlega selektywnej przepuszczalności błony komórkowej pęcherzyka mlekowego. Występująca „naturalnie”, czyli w żywności, łączy się z tłuszczami, a „dodana” (np. w formie suplementu) – z białkami. Przenikanie kadmu do mleka zachodzi na drodze transportu ułatwionego dzięki wiązaniu się z różnymi białkami. Ołów najpierw jest deponowany w tkankach (np. kości 90-95%, wątroba), a dopiero później przenikać może do mleka. Mechanizm uwalniania ołowiu z kości, jest zależny między innymi od objętości i składu płynu śródtkankowego, który to regulowany jest przez komórki powierzchni kości - prowadzą one aktywną wymianę składników z krwią. Zależnie od składu krwi (w tym stężenia poszczególnych pierwiastków) jest możliwe przedostawanie się składników do kości i z kości (osteoliza osteocytarna) [79]. Zdaniem wielu autorów wzrost zawartości ołowiu w krwi kobiet ciężarnych, jest skutkiem mobilizacji tego metalu z kości matki, spowodowanej wzrostem zapotrzebowania na wapń u rozwijającego się płodu.

Uważa się, że gruczoł mlekowy dla tego metalu jest dość skutecznym filtrem. Nie ma natomiast dokładnych danych na temat mechanizmu warunkującego przechodzenie do mleka niklu [77,78]. Na podstawie wyników wielu badań stwierdzono, że zawartość kadmu i ołowiu wzrasta na terenach uprzemysłowionych, natomiast samego ołowiu – w pobliżu dużych szlaków komunikacyjnych [79].



Rys 1. Schemat procesu wydzielania i wytwarzania mleka przez nabłonkowe komórki gruczołu sutkowego. Liczby rzymskie oznaczają poszczególne szlaki biorące udział w procesie wytwarzania mleka: I – egzocytoza; II – wydzielanie trójacylogliceroli; III – transport związków niskocząstkowych; IV – transcytoza; V – szlak okołokomórkowy; BP – błona podstawna; RE – retikulum endoplazmatyczne; PW – pęcherzyk wydzielniczy [56,57].

1.4. Występowanie i działanie biologiczne wybranych metali

Wybrane metale należą do jednych z najgroźniejszych zanieczyszczeń środowiska, choć wiele z nich przy odpowiednich stężeniach i warunkach pełni rolę biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, jak np. cynk, żelazo, miedź. Dotychczas nie wykazano żadnej roli biologicznej, jaką mogłyby pełnić rtęć, kadm, arsen i ołów, przez co uważa się je za substancje całkowicie obce dla organizmu i szkodliwe, nawet przy bardzo małych stężeniach. Pierwiastki te należą do grupy o najwyższym współczynniku kumulacji, wynoszącym 10–600%, przy czym należy zaznaczyć, że współczynnik kumulacji metali to miara intensywności gromadzenia się pierwiastka w narządach i jest on odwrotnie proporcjonalny do stężenia tych metali w środowisku. Do cech wspólnych rtęci, ołowiu i kadmu zalicza się łatwość absorpcji z powietrza atmosferycznego i przewodu pokarmowego, łatwość przechodzenia przez łożysko, barierę biologiczną krew-mózg (rtęć, ołów), zdolność tworzenia połączeń z makrocząsteczkami, a także uszkodzanie budowy łańcucha kwasów nukleinowych (kadm, rtęć) [80,81]. Pierwiastki szkodliwe, jak np. kadm, pobierane są z pożywieniem i wodą pitną. Mogą więc ulegać bioakumulacji w produktach pochodzenia zwierzęcego po włączeniu ich do łańcucha pokarmowego człowieka [81]. Długotrwałe narażenie ustroju na małe nawet dawki metali, wynikające ze stałego przebywania w skażonym środowisku, może być przyczyną subklinicznych zmian w organizmie, często nieodwracalnych, ujawniających się po wielu latach, jak np. białaczka [82]. Objawy chorobowe pojawiają się dopiero, gdy stan zmian jest już zaawansowany i są charakterystyczne dla poszczególnych szkodliwych pierwiastków [83]. Aby przeciwdziałać bioakumulacji metali ciężkich w tkankach, podejmuje się próby wykorzystania różnego rodzaju interakcji zachodzących pomiędzy nimi. Są to interakcje typu antagonistycznego i synergistycznego pomiędzy składnikami dawki pokarmowej. Dlatego też równoległe prowadzone są badania nad wykorzystaniem właściwości kompleksotwórczych, sorpcyjnych i jonowymiennych glinokrzemianów, kwasów huminowych i flawonoidów [84]. Metale, np. nikiel mogą przedostawać się do organizmu również poprzez skórę [85]. Na podstawie licznych badań stwierdzono jednak, że metale do organizmu człowieka przedostają się głównie drogą pokarmową, w wyniku spożywania żywności która je zawiera. Na obszarach o zanieczyszczonej glebie, od 9 do 80% ołowiu i 34–90% arsenu zostaje wprowadzone do organizmu tą drogą. Wiele metali wykazuje dodatnią zależność liniową pomiędzy zawartością w glebie a w ziarnie zbóż [85]. Po strawieniu żywności związki mineralne są wchłaniane przez śluzówkę jelita, a następnie wraz z krwią dostają się do gruczołu mlekowego, dlatego osocze krwi

i surowica są najczęściej badane w celu określenia stężenia tych pierwiastków zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Mleko zarówno kobyce jak i innych ssaków, jest pokarmem, który pełni najważniejszą rolę w dostarczaniu białka do organizmu niemowląt. Następnie mleko krowie jest podstawą dla produkcji przetworów takich jak np. sery, kefir, masło itd., będąc równocześnie głównym źródłem metali. Dlatego powinno być objęte stałą kontrolą ich stężenia [86]. Badania monitorujące produkty pochodzenia zwierzęcego (mleko, jaja) wskazują na znaczne zróżnicowanie koncentracji kadmu, rtęci, ołowiu oraz innych metali, od śladowego do wielokrotnie przekraczającego wartości fizjologiczne [87]. W mleku występuje około 25 pierwiastków śladowych. Ich koncentracja jest zmienna i zależy od wielu czynników, głównie od zawartości danego pierwiastka w glebie, żywności, wodzie i powietrzu, stopnia ich bioprzyswajalności, a także zjawiska interakcji międzypierwiastkowej [78,84]. Składniki mineralne, a w tym pierwiastki śladowe, wywierają istotny wpływ na właściwości fizyczne, stabilność białek oraz kształtowanie się smaku mleka, a także katalizę niektórych reakcji chemicznych zachodzących w mleku [86]. Trudno ustalić, które z pierwiastków śladowych i w jakich ilościach są naturalnymi składnikami mleka, a które pochodzą z zanieczyszczeń. Spośród pierwiastków występujących w mleku można wyróżnić takie, które mają znaczenie fizjologiczne (żelazo i kobalt), technologiczne (żelazo, miedź) i toksykologiczne (fluor, kadm, ołów). Pierwiastkami szczególnie niepożądanymi w mleku są: arsen, fluor, ołów i rtęć. Przechodzenie do mleka różnych pierwiastków oraz substancji zależy w dużym stopniu od selektywnej przepuszczalności błony komórkowej pęcherzyka mlekowego. Utrata tej cechy wskutek działania czynników biologicznych, takich jak stan zapalny gruczołu mlekowego, albo chemicznych (alkohol, benzen, ksylen) umożliwia przedostawanie się do mleka nie tylko metali, ale także różnych zanieczyszczeń chemicznych i organicznych.

1.4.1. Glin

Do niedawna glin nie budził większego zainteresowania toksykologii środowiskowej, choć należy do głównych składników skorupy ziemskiej. W organizmie ludzkim glin występuje w śladowych ilościach. Znajduje się w kościach, w płucach i w tkankach miękkich w ilości od 50 do 500 ppm, z czego 1/2 zasobów tego pierwiastka zlokalizowana jest w kościach, 1/4 w płucach, a 1/4 w pozostałych narządach. Dostarczany jest do organizmu człowieka z żywnością, wodą pitną, w lekach, kosmetykach oraz w wyniku działań gospodarczo - antropogenicznych. Według WHO dopuszczalna spożyta dawka glinu wynosi 7mg/kg masy ciała/tydzień, co w przeliczeniu na dzień wynosi 1mg glinu na

1 kg masy ciała dziennie. Szacowane dzienne spożycie glinu waha się w przedziale od 10 do 100 mg glinu (zalecany przez ekspertów poziom dopuszczalnego przyjmowania glinu jest możliwy tylko przy zachowaniu odpowiedniego stylu życia i reżimu w przetwórstwie żywności) [106]. Stężenie glinu w płucach rośnie wraz z wiekiem. Spowodowane jest to osadzaniem stałych i nierozpuszczalnych związków glinu, które przedostały się do układu oddechowego. Ilość glinu w tkance mózgowej waha się w granicy 0,5 mg/kg masy mózgu i jest dwa razy większa w istocie szarej niż białej. Zawartość Al^{3+} zwiększa się wraz z wiekiem – od 0,2 mg/kg u niemowląt do 0,6-0,7 mg/kg u ludzi starszych [99-101]. Niewielkie dawki glinu w 90% usuwane są z organizmu z moczem, aczkolwiek badania wykazują, że wszelkie dysfunkcje nerek zakłócają prawidłowy mechanizm wydalania glinu, zwiększając tym samym jego kumulację w mózgu [106]. Najczęściej u zdrowego człowieka proces wydalania przebiega prawidłowo, a zatem kumulacja jest niewielka. Obecność glinu w organizmie zaburza procesy metaboliczne przebiegające w organellach komórkowych [102]. Naturalne źródła glinu nie stanowią zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi, ale zakwaszenie środowiska powstające w wyniku działań antropogenicznych zwiększa występowanie form toksycznych glinu. Źródłem glinu są artykuły spożywcze: mleczne, mięsne, roślinne oraz woda pitna. Dodatkowo leki stosowane przy nadkwasocie żołądka, przeciwzapalne i przeciwbólowe, łagodzące stany zapalne skóry, płyny dializujące oraz produkty żywnościowe przechowywane w naczyniach i foliach aluminiowych, np. piwo, soki [103]. Potencjalne efekty działania glinu na organizm ludzki to encefalopatia dializacyjna, zwiększona zapadalność na stwardnienie rozsiane, chorobę Parkinsona i Alzheimerera. Glin w organizmie człowieka oddziałuje toksycznie na układ nerwowy, kostny i krwiotwórczy [104]. Nie odnaleziono informacji na temat minimalnej ilości spożywanego glinu. Już w latach osiemdziesiątych stwierdzono, że jony glinu z wody mogą dyfundować do osocza krwi powodując uszkodzenia układu nerwowego, a przenikanie jonów przez barierę krew-mózg uzależnione jest od stopnia jonizacji związku, jego rozpuszczalności w lipidach i wielkości cząsteczki [105]. Kolejne badania wykazały duże znaczenie dynamiki przenikania glinu do mózgu i funkcji nerek. Okres półtrwania glinu w surowicy krwi wynosi około 30 min., zatem jego kumulacja uzależniona jest od wydolności nerek. Opisywany zespół encefalopatii może także występować w wyniku zażywania leków zawierających w swoim składzie glin np. środki przeciw nadkwasocie zawierające $Al(OH)^3$. W efekcie licznych badań i podjętych prób eliminacji glinu z leków oraz dializatów przypadki encefalopatii zdarzają się stosunkowo rzadko [106]. Stwardnienie zanikowe boczne, parkinsonizm skojarzony z demencją starczą to kolejne jednostki

chorobowe w których czynnikiem etiologicznym może być również glin. Cechą wspólną tych chorób jest atrofia neuronów, degeneracja neurofibryli, limfopenia, zaburzenia funkcji limfocytów T. Badania rezonansu magnetycznego wskazują na kumulację glinu w obrębie hipokampa [107]. Istnieje prawdopodobieństwo, że glin jest również czynnikiem etiologicznym klasycznej choroby Parkinsona. Zwolennicy tej teorii powołują się między innymi na to, że 30-50% cierpiących na parkinsonizm choruje równocześnie na chorobę Alzheimera, a u 60% pacjentów z demencją Alzheimera zdarzają się zaburzenia pozapiramidowe [107].

Glin jest również jednym z lepiej poznanych metaloestrogenów, który wykazuje zdolność zarówno do łączenia się z ER α , jak i bezpośrednio z ERE, co prowadzi do transkrypcji genów docelowych [110]. Ma to znaczenie dla profilaktyki rozwoju raka piersi u kobiet, u których organizm narażony jest na długotrwałą ekspozycję na działanie kosmetyków stosowanych powszechnie przeciw poceniu, tzw. antyperspirantów, w skład których wchodzi glin, stanowiąc nawet 1/4 objętości kosmetyku (może to powodować akumulowanie się tego metalu w tkankach leżących w okolicy miejsca aplikacji tego kosmetyku). Badania z użyciem izotopu glinu ²⁶Al wykazały, że glin wnika do organizmu człowieka przez skórę, a częste aplikowanie dezodorantu w okolicy gruczołu sutkowego, na świeżo podrażnioną goleniem skórę dodatkowo ułatwia przenikanie tego metalu przez skórę do krwiobiegu. Może to prowadzić do stymulacji komórek nowotworowych gruczołu sutkowego i wzrostu liczby nowotworów piersi umiejscowionych w okolicy pachowej w górnym, zewnętrznym kwadrancie piersi [111]. Opisano, że glin wpływa na receptory estrogenowe wzbudzając ekspresję genów regulowanych przez estrogeny (jony glinu wypierają 17 β -estradiol z receptorów estragenowych α), jednak nadal potrzeba więcej badań na temat samego subkomórkowego działania glinu na komórki piersi oraz jego wchłanianości przez skórę [111]. Glin może być także przekazywany potomstwu w okresie ciąży, czy podczas laktacji, co budzi szczególne zainteresowanie w aspekcie zdrowia rozwijającego się organizmu [109].

1.4.2. Ołów (Pb)

W stanie naturalnym ołów występuje w postaci minerałów, np. siarczku, węgla, tlenku, siarczanu. Do emisji ołowiu do środowiska dochodzi przede wszystkim na skutek działalności człowieka. Jego głównym źródłem są procesy spalania węgla, paliw płynnych i śmieci, produkcja żelaza i metali nieżelaznych, górnictwo rud metali nieżelaznych. Ołów wchłania się do organizmu głównie przez przewód pokarmowy i układ oddechowy.

Biodostępność ołowiu zależy od postaci, w jakiej ten metal występuje, a także od wieku i stanu fizjologicznego narażonej osoby. Przez drogi oddechowe Pb wchłania się w 30–50%. Przy wdychaniu aerozolu zawierającego związki ołowiu część ziaren (10–30 %) ulega deponowaniu w płucach. Przez układ pokarmowy wchłania się dużo mniej ołowiu (5–10%). Wchłanianie ołowiu z przewodu pokarmowego zależy również od diety i wzrasta w okresie głodówki [113]. U dzieci wchłanianie ołowiu przez przewód pokarmowy jest wyższe niż u dorosłych i może wynosić nawet 50% [114]. Po wchłonięciu do krwi ołów w 99% jest wiązany z erytrocytami [115]. Z krwią dostaje się do wszystkich tkanek i narządów: wątroby, płuc, serca i nerek (pula szybkowymienna), skóry i mięśni (pula średniowymienna) oraz do tkanki kostnej, gdzie ulega kumulacji. Kumulacja ołowiu w kościach rozpoczyna się już w okresie życia płodowego, a ilość tego pierwiastka w kościach wzrasta przez całe życie osiągając w kości piszczelowej stężenie około 27 mg/kg po 70 roku życia [116]. Całkowita zawartość ołowiu zgromadzona w organizmie osób nienarażonych zawodowo po 60-70 latach może wynosić 200 mg. Stężenie ołowiu w tkankach miękkich i w płynach ustrojowych odzwierciedla narażenie na ten metal w niedalekiej przeszłości, podczas gdy stężenie ołowiu w kościach jest odbiciem długotrwałej ekspozycji. Łożysko nie stanowi bariery dla ołowiu pomiędzy matką a płodem. Stężenia tego metalu w krwi matki i płodu są prawie identyczne [117-120]. Głównymi drogami wydalania ołowiu z ustroju są nerki (76%) i przewód pokarmowy (16%). Pozostałe drogi wydalania Pb to wydalanie przez skórę, włosy, paznokcie, pot (8%). Ołów wykazuje działanie toksyczne przy narażeniu na duże dawki oraz przy długotrwałej ekspozycji na niskie stężenia. Działanie toksyczne ołowiu prowadzi do zaburzeń metabolicznych i ograniczenia aktywności enzymów, zaburzenia syntezy białek oraz zaburzeń gospodarki biopierwiastkami (cynk, miedź, żelazo, wapń). Spośród pozostałych skutków toksycznych działania ołowiu należy wymienić m.in. zaburzenia układu krwiotwórczego w syntezie hemu i globiny, a także toksyczne działanie na układ nerwowy. Grupą podwyższonego ryzyka przy narażeniu środowiskowym na ołów są dzieci, u których ośrodkowy układ nerwowy jest układem krytycznym przy ekspozycji na ten metal [121]. Efektem narażenia kobiet ciężarnych na ołów jest narażenie płodu, które może prowadzić do dysfunkcji OUN [121,122]. U dzieci narażonych na ten metal w okresie płodowym występuje większe ryzyko rozwoju schizofrenii w dorosłym życiu i wystąpienia innych chorób, które ujawniają się po wielu latach w okresie młodzieńczym lub wczesnej dorosłości. Prenatalne narażenie na ołów wpływa na wzrost ryzyka urodzeń przedwczesnych, poronień, zmian neurologicznych i wrodzonych u noworodków [119,123-125].

Ołów ma działanie teratogenne, prowadzi do trwałych zaburzeń strukturalnych lub czynnościowych w trakcie rozwoju embrionalnego lub płodowego. Zaburzenia te mogą ujawnić się przed i po urodzeniu. U kobiet ciężarnych dochodzi do mobilizacji ołowiu skumulowanego w tkankach i kościach, wzrostu absorpcji ołowiu z pożywieniem oraz zwiększenia retencji w nerkach. Efektem tego jest zwiększony poziom ołowiu u kobiet w okresie ciąży, które może być odzwierciedleniem narażenia na ten metal w przeszłości [118,120,126]. Ołów przechodzi też do mleka matki, co stanowi istotną drogę narażenia noworodków [119,125]. Niekorzystny wpływ obniżenia stężenia cynku, wapnia, miedzi i żelaza przy narażeniu na ołów kobiet w ciąży objawia się zaburzeniami prawidłowego wzrostu i rozwoju płodu [127]. Zaburzenia homeostazy miedzi mogą doprowadzić do niedostatecznego rozwoju błon płodowych, nieprawidłowego rozwoju szkieletu i mózgowia, ataksji i niedokrwistości noworodka [128]. Narażenie kobiet na ołów zwiększa ryzyko hipotrofii płodu, uszkodzeń neurologicznych i zaburzeń pracy mięśni [128]. Wysokie stężenie ołowiu w krwi matek koreluje z niską punktacją w skali Apgar noworodka [123,129]. U dzieci, których matki narażone były na ołów wykazano liczne zmiany w kościach i zębach [123].

1.4.3. Miedź (Cu)

Jest składnikiem i aktywatorem enzymów w licznych procesach oksydacyjno-redukcyjnych, głównie przy tworzeniu czerwonych krwinek, wspomaga tworzenie tkanki łącznej. Miedź, aktywując enzym niezbędny do budowy erytrocytów, wpływa na prawidłowe funkcjonowanie układu krwiotwórczego. Istotny jest także jej wpływ – (m.in. poprzez syntezę dopaminy) na rozwój układu nerwowego oraz - poprzez syntezę kolagenu i elastyny - na regenerację tkanki łącznej. Ponadto miedź wraz z cynkiem przeciwdziałają uszkodzeniom wywołanym przez wolne rodniki tlenowe. Miedź konieczna jest dla absorpcji oraz metabolizowania żelaza, odgrywa także rolę przy utlenianiu witaminy C. Podstawowa rola miedzi w organizmach zwierzęcych wiąże się z jej występowaniem w różnych enzymach biorących udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych np.: oksydazie cytochromowej zwierząt wyższych, działa stymulująco na ilość i aktywność hemoglobiny. Miedź wpływa również na metabolizm lipidów (np. cholesterolu) i właściwości mielinowej osłonki włókien nerwowych. Miedź jest niezbędna zarówno do prawidłowego metabolizmu tkanki łącznej, jak i do funkcjonowania komórek mózgu. Stąd niedobór miedzi powoduje zaburzenia w ww. procesach, które objawiają się w różnych

zespołach chorobowych, jak np. niedokrwistość, ograniczenia wzrostu i płodności, zaburzenia sytemu nerwowego (migreny), choroby układu krążenia, a także osteoporoza. Miedź łatwo tworzy połączenia z różnymi białkami, zwłaszcza drobnocząsteczkowymi oraz zawierającymi siarkę. Metalotioneina jako białko bogate w grupy sulfhydrylowe, wykazuje dużą pojemność w wiązaniu miedzi i jest odpowiedzialna w znacznym stopniu za zwiększoną jej zawartość w wątrobie. Interakcje zachodzące między miedzią a innymi pierwiastkami mogą być przyczyną jej wtórnego deficytu lub toksyczności. Najczęściej występuje antagonizm miedzy miedzią i cynkiem (Cu-Zn), którym tłumaczy się wiele objawów związanych z niedoborem miedzi. Brak miedzi powoduje ogólna słabość, obniżenie prawidłowego oddychania tkankowego, owrzodzenia skórne. Natomiast nadmiar miedzi wiąże się z ryzykiem zatruć chronicznych, na co są szczególnie narażone dzieci i niemowlęta. Nadmiar miedzi w diecie człowieka wywołuje różne zmiany metaboliczne, a odległe skutki wiążą się przede wszystkim ze zmianami w wątrobie, a w następnej kolejności z uszkodzeniem nerek, tkanki mózgowej oraz naczyń wieńcowych i mięśnia sercowego. Miedź wykazuje większą toksyczność przy bezpośrednim działaniu na komórki, zwłaszcza w ich młodym stadium rozwojowym, co tłumaczy się zmianami w strukturze białek pod wpływem tego metalu. Najczęstszymi skutkami nadmiaru miedzi mogą być zaburzenia psychiki, uszkodzenia nerek, a także nadciśnienie tętnicze. Stężenie miedzi w komórkach regulują białka ATP7A i ATP7B. Są one niezbędne w wielu ważnych procesach zachodzących w organizmie. Główną rolą białek ATPaz transportujących jony Cu jest utrzymanie stałego stężenia jonów miedzi w organizmie poprzez usuwanie nadmiaru tego pierwiastka z komórek, jednak równie ważną funkcję spełniają one transportując jony do tych obszarów komórki, w których zostaną przyłączone do białek zależnych od miedzi [135]. Cykl katalityczny białek ATP7A i ATP7B jest ściśle związany z ich budową i polega na transporcie jonów miedzi przez błonę. Syntezę białka ATP7B stwierdzono także w łożysku. Zachodzi ona w komórkach syncytiotrofoblastu. Stężenie jonów miedzi w krwi matki jest 5-krotnie wyższe niż w krwi rozwijającego się płodu, dlatego białko ATP7B w komórkach łożyska pełni funkcję regulacyjną i zabezpiecza przed nadmiernym stężeniem tego pierwiastka we krwi rozwijającego się płodu [132,133]. W komórkach gruczołu mlekowego w okresie laktacyjnym, białko ATP7B zlokalizowano przy błonie wierzchołkowej komórek wydzielniczych. Służy ono jako nośnik kationów miedziowych wydzielanych do mleka matki [130,131,134]. Również w komórkach łożyska i komórkach gruczołu mlekowego, zaobserwowano podstawno-boczną lokalizację białka ATP7A, ponieważ bierze ono udział w transporcie jonów miedzi poprzez łożysko

do rozwijającego się płodu [130,131,133] oraz w wydzielaniu kationów miedzi do mleka matki w okresie laktacji [131-134]. W łożysku syntezę białka ATP7A stwierdzono w komórkach syncytiotrofoblastu, cytotrofoblastu oraz w komórkach naczyń krwionośnych płodu, co wskazuje na to, że bierze ono bezpośredni udział w przekazywaniu kationów miedziowych z krwiobiegu matki do krwi płodu [132,133]. Natomiast w komórkach gruczołu mlekowego w okresie laktacji białko ATP7A reguluje stężenie miedzi w komórkach wydzielniczych poprzez usuwanie nadmiaru jonów tego pierwiastka z powrotem do krwiobiegu matki [130,131,134].

1.4.4. Nikiel (Ni)

Nikiel jest pierwiastkiem wszechobecnie występującym w wodzie, powietrzu i biosferze. Zakres stężeń niklu w poszczególnych jego źródłach prezentuje się następująco (podane wartości mogą się wahać z uwagi na częsty wysoki stopień kontaminacji): woda 5-100 $\mu\text{g}/\text{dm}^{-3}$, gleba 5-500 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$, rośliny 0,5-5 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$, zwierzęta 0,1-5 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$. W niektórych surowcach obserwujemy wysokie stężenie niklu, niezależne od stopnia zanieczyszczenia gleby [136]. Zakres stężeń niklu w poszczególnych jego źródłach występowania jest niezależny od stopnia zanieczyszczenia gleby. Surowce nieprzetworzone o wysokiej zawartości tego pierwiastka to m.in. pszenica, żyto, groch zielony, ziarna soi, owies, ryż, orzechy ziemne. Wśród produktów przetworzonych wyróżnić można herbatę suszoną, czekoladę, suszone lub konserwowane nasiona roślin strączkowych, suszone lub puszkowane owoce [136]. Funkcja niklu w fizjologii człowieka nie jest dobrze poznana aczkolwiek, fizjologiczna śladowa obecność niklu w organizmach żywych jest czymś naturalnym i pożądanym, niezbędnym do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania. Metal warunkuje prawidłowy przebieg niektórych procesów metabolicznych i jest aktywatorem różnych enzymów ludzkich tkanek. Jest on składnikiem grup prostetycznych metaloenzymów (np. pewne glioksalazy, deformylazy peptydów, reduktaza metylokoenzymu M, ureaza, tyrozynazy, arginazy, deokosyrybonukleazy, fosfoglukomatazy, niektórych dehydrogenaz i karboksylaz). Pełni rolę w transporcie tlenu do tkanek, w przemianach węglowodanów, tłuszczu i białek. Ponadto nikiel reguluje funkcję plazminy, zwiększa aktywność hormonalną oraz stabilizuje strukturę kwasów nukleinowych [136]. U człowieka niedobór niklu powoduje zmniejszenie zużycia tlenu w wątrobie, zwiększenie nagromadzenia tłuszczów, zahamowanie wzrostu, zmniejszenie przyswajania żelaza, obniżenie stężenia hemoglobiny [51]. Jednakże, w dawkach minimalnie większych niż wymagane staje się on toksykiem. Dziennie dorosły mieszkaniec rozwiniętego kraju europejskiego narażony jest na spożycie

średnio 1,49-1,63 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ masy ciała dziennie. Największa średnia ekspozycja w badaniu UK Total Diet Studies wskazana została dla grupy wiekowej 1,5-4,5 lat [137]. Nikiel jest silnym alergenem skórny. Szacuje się, że alergia dotykowa na nikiel to problem 4-13,1% populacji. Jedną z przyczyn uwrażliwienia na nikiel jest częsty kontakt skórny z wyrobami zawierającymi ten pierwiastek [136,140]. Alergia na ww. metal jest najczęstszym rodzajem nadwrażliwości kontaktowej w krajach rozwiniętych [142,143]. Istnieje pogląd iż nikiel to także alergen pokarmowy, choć aktualnie jest to jeszcze teza nie w pełni zbadana i kontrowersyjna [141]. Szacowana podaż dobową tego pierwiastka wynosi 109-222 μg [14,15]. Akumulacja zaabsorbowanego w organizmie toksycznego niklu skutkuje rozwojem chorób płuc, nerek, choroby wieńcowej [138], jednak ponad 90% endogennego niklu nie jest adsorbowane i ulega sekrecji. Miarą zdolności metabolicznych szkodliwych metali jest ich biologiczny czas półtrwania czyli okres, w jakim organizm pozbywa się połowy ilości, jaka się do niego dostała [139]. Nikiel jest też kancerogenem, lecz z racji wysokiego wydalania rozpuszczalne formy niklu (chlorek, siarczan, azotan) stanowią zagrożenie tylko przy chronicznym poborze. Mechanizm rakotwórczego działania niklu polega na wywołaniu zaburzenia syntezy DNA, hamowaniu procesów jego naprawy i wypadnięciu sekwencji DNA. Nikiel występuje głównie w tkankach miękkich, ale potwierdzono także wpływ na metabolizm tkanki kostnej [51,144, 145]. Nikiel przenika do mleka, a jego zawartość w mleku różnych ssaków (np. krowim i kozim) zależy od stopnia zanieczyszczenia środowiska. Przykładem może być średnie stężenie niklu w mleku krowim, z terenu przemysłowego to 0.2358 mg/kg w porównaniu z terenem uznawanym za czysty 0.065 mg/kg, oraz średnie stężenie niklu w mleku kozim z terenu przemysłowego 0.226mg/kg i z terenu uznawanego za czysty 0.063 mg/kg [84,143]. Przechodzenie do mleka różnych substancji zależy w dużym stopniu od selektywnej przepuszczalności błony komórkowej pęcherzyka mlekowego. Utrata tej cechy wskutek działania niekorzystnych czynników (stany zapalne, chemiczne uszkodzenia-alkohol, benzen, ksylen) umożliwia przedostawanie się do mleka różnych zanieczyszczeń w tym i metali. Nie ma natomiast dokładnych danych na temat mechanizmu warunkującego przechodzenie niklu do mleka kobyliczego [84,143].

1.4.5. Cynk (Zn)

Cynk jest metalem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, spełniających wiele ważnych funkcji w układzie immunologicznym, hormonalnym czy w trakcie rozwoju. Dzielne zapotrzebowanie na cynk, waha się u człowieka,

w zależności od wieku, w granicach: 3-5mg/d u niemowląt, 10mg/d u dzieci i 10-15mg/dobę u dorosłych [151]. Mikroelement ten pobierany jest drogą pokarmową, z produktów takich jak mięso, jaja, nasiona słonecznika, dyni, kiełki i otręby pszenne, czosnek, cebula, a także ryby czy ostrygi. Wchłanianie cynku odbywa się w dwunastnicy i jelicie cienkim. Przyswajany jest w 20-40%, łatwiej wchłania się z pokarmów pochodzenia zwierzęcego. Za jego transport w głąb enterocyta odpowiedzialny jest transporter metali dwuwartościowych 1 (DCT1). DCT1 obecny w rąbku szczoteczkowym, jest zdolny do wiązania nie tylko dwuwartościowych jonów cynku, ale także innych pierwiastków takich jak żelazo, miedź, kadm, mangan, kobalt, nikiel czy ołów [151]. Po przedostaniu się ze światła jelita do komórki, jony cynku wiążą się z metalotioneinami lub są magazynowane w pęcherzykach wydzielniczych. Osoczowa pula cynku to jony związane z albuminą i α 2-makroglobuliną [159]. Pośród wszystkich motywów białkowych zdolnych do wiązania cynku na szczególną uwagę zasługuje grupa metalotionein (MT). W drugorzędowej strukturze tych białek charakterystyczne są pętle bogate w reszty cysteiny w liczbie od 70 do 80, co pozwala im na wiązanie jonów metali, w tym cynku. Za główną rolę metalotionein przyjmuje się wiązanie nadmiaru jonów metali w przestrzeni komórkowej i ochronę komórki przed wywoływaną przez nie toksycznością, co ma swoje szczególne odzwierciedlenie w układzie nerwowym [151]. Cynk pełni w komórce bardzo istotne funkcje, odgrywając ważną rolę w regulacji replikacji i naprawy DNA, transkrypcji i translacji, proliferacji i dojrzewania komórek, apoptozy a także odpowiedzi na metale [155, 156]. Jony cynku ze względu na swoje właściwości są składnikami wielu enzymów. Mogą pełnić w nich rolę zarówno stabilizatora struktury przestrzennej, jak i kofaktora, uczestnicząc w katalizie substratów. Białka katalityczne wymagające obecności jonów metali najprościej podzielić na: metaloenzymy – trwale wiążące jony metali, dla cynku będą to np. karboksypeptydaza A, dysmutaza ponadtlenkowa, anhydraza węglanowa czy dehydrogenaza alkoholowa oraz na enzymy aktywowane jonami metali, czyli takie, w których jon metalu nie wiąże się trwale, jest łatwo uwalniany, tworzy z białkiem kompleks enzym- Me^{2+} i służy, jako aktywator, powodując znaczne zwiększenie szybkości reakcji enzymatycznej [161]. Stężenie cynku regulowane jest również za pomocą metalotionein (MT) – niskocząsteczkowych białek, bogatych w reszty cysteinowe. Metalotioneiny zidentyfikowano zarówno w środowisku zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowym. Wewnątrzkomórkowa pula tego bogatego w reszty cysteinowe białka jest rezerwuarem istotnych metali, usuwa reaktywne formy tlenu i azotu oraz odgrywa istotną rolę w detoksyfikacji metali oraz związków organicznych. W zewnątrzkomórkowym środowi-

sku metalotioneina pełni rolę antyoksydanta, bierze udział w transporcie metali między tkankami oraz uczestniczy w odpowiedzi komórki na stres. Pojedyncza cząsteczka metalotioneiny zdolna jest do związania siedmiu dwuwartościowych jonów cynku i do 12 jednowartościowych jonów miedzi. Są także zdolne do wiązania Cd, Fe, Hg czy Ni, Ag, Au [153]. Indukcja MT zachodzi w wyniku oddziaływania wielu różnych bodźców, takich jak: obecność metali, hormonów, cytokin, stresu oksydacyjnego czy czynników zapalnych [153]. W tkance chrzęstnej i kostnej cynk odgrywa rolę we wzrastaniu kości na długość, regulacji osi hormonalnej i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej [146]. Cynk ma silne działanie stymulujące osteoblasty i tworzenie kości oraz działanie hamujące resorpcję kości przez osteoklasty. Cynk wchodzi w skład wielu białek w komórkach tkanki łącznej m.in. w komórkach chondroblastów, chondrocytów, okostnej, prekursorów osteoblastów i osteocytów. Ma bardzo duże znaczenie we wzroście i dojrzewaniu kości [147-148]. Liczne badania dowodzą, że niedobór cynku prowadzi do objawów takich jak: zahamowanie wzrostu, niedobory immunologiczne, opóźnienie dojrzewania płciowego [157, 160], wtórna niedoczynność tarczycy, zaburzenia węchu i smaku czy upośledzenie funkcji poznawczych, a nawet autyzm. Deficyt cynku najbardziej niebezpieczny jest w czasie wzmożonego wzrostu, jak okres rozwoju płodowego i dzieciństwa, a także okres ciąży u kobiet. Niedobór cynku prowadzi do opóźnienia wzrostu liniowego kości, co wiąże się z zaburzeniem funkcji hormonu wzrostu (GH) i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) [150]. Przypadki zatrucia cynkiem zdarzają się rzadko, głównie z uwagi na rozwinięte mechanizmy odpowiedzialne za utrzymywanie komórkowej homeostazy tych kationów, takie jak systemy białek wiążących i transporterów kontrolujących przepływy na zewnątrz i do wnętrza komórki. W szczególnie wrażliwym na działanie cynku ośrodkowym układzie nerwowym zaburzenia jego równowagi mogą być jednym z wielu czynników prowadzących do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [154]. Ponadto szeroko udokumentowany jest metaboliczny związek między miedzią i cynkiem. Dowiedziono, iż długotrwałe przyjmowanie o wiele wyższych niż dzienne zapotrzebowanie dawek cynku może prowadzić do zaburzeń wchłaniania miedzi, które w konsekwencji prowadzą do upośledzenia utylizacji żelaza i syntezy hemu, a co za tym idzie do niedokrwistości. Dodatkowo wiele innych efektów początkowo wiązanych z nadmiarem cynku w organizmie powodowane jest przez indukowany wysokimi dawkami tego metalu niedobór miedzi, natomiast niedobór cynku nasila toksyczność miedzi [157]. Z drugiej jednak strony nadmierna podaż miedzi w diecie lub zwiększone jej wiązanie do metalotionein powoduje zaburzenia w równowadze cynku zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego. Dane te wskazują,

że kationy te są metabolicznymi antagonistami i prawidłowe funkcjonowanie organizmu możliwe jest przy ich określonym stosunku w przestrzeni pozakomórkowej [152]. Najnowsze badania nie wykazują korelacji między stężeniami cynku w mleku kobiecym a zawartością jego w diecie matki. Wiele badań wskazuje również na fakt, że suplementacja diety żelazem może wiązać się z nieprawidłową absorpcją innych mikroelementów, takich jak cynk i chrom, prowadząc do ich obniżonych stężeń w pokarmie kobiecym [152].

1.4.6. Żelazo (Fe)

Żelazo jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków i odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie komórek [162]. Średnia zawartość żelaza u dorosłego człowieka wynosi 4 g, co nie przekracza 0,01% masy ciała, z czego ponad 2 g znajdują się w hemoglobinie, 1 g zmagazynowany jest w hepatocytach, a pozostała część w białkach pełniących różnorodne funkcje [164,165]. Jest katalizatorem reakcji enzymatycznych, głównie reakcji oksydoredukcyjnych. Ważną rolą żelaza jest jego udział w wytwarzaniu reaktywnych form tlenu, które w niskich stężeniach spełniają funkcje fizjologiczne, w wyższych działają toksycznie na komórki powodując ich destrukcję [163]. Pierwiastek ten wykorzystywany jest w transporcie tlenu, syntezie mieliny i neuroprzekazników, cyklach komórkowych oraz syntezie kwasów nukleinowych. Podkreśla się również wagę żelaza w procesie dojrzewania limfocytów i prawidłowym funkcjonowaniu narządu wzroku. [166]. Żelazo bierze udział w syntezie kolagenu i przekształceniu 25-hydroksywitaminy D do postaci aktywnej. Wykazano, że żelazo jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania osteoblastów. Nadmiar żelaza w osteoblastach może prowadzić do zaburzeń metabolicznych kości (osteoporozy, osteopenii i osteomalacji) [167]. Grupą szczególnie wrażliwą na zachwiania równowagi w gospodarce żelazem są noworodki. Niedobór żelaza w czasie ciąży niesie za sobą poważne konsekwencje kliniczne. Wydaje się, że główną rolę w transporcie żelaza między organizmem matki a płodu odgrywa hepcydyna oraz opisane w 2010 roku białko – zyklopen [166]. Mechanizm transportu żelaza z organizmu matki do organizmu płodu nie jest dokładnie poznany. Zasadniczą rolę w maczyno-płodowym krążeniu żelaza odgrywa łożysko. Główną rolę w transporcie żelaza poprzez komórki syncytiotrofoblastu pełni receptor transferyny typu 1 [168]. Jego ekspresję obserwuje się przede wszystkim na powierzchni wierzchołkowej syncytiotrofoblastu [169]. Status gospodarki żelazem u noworodka zależy od ilości żelaza dostarczonego z transferyną matki, dlatego zarówno niedobór, jak i nadmiar żelaza niosą za sobą poważne konsekwencje kliniczne, jednak niedokrwistość z niedoboru żelaza u

matki nie zawsze jest przyczyną niedokrwistości związanej z niedoborem żelaza (IDA) u noworodków [170]. Główną konsekwencją niedoboru żelaza w okresie prenatalnym i noworodkowym są zaburzenia w budowie i funkcjonowaniu układu nerwowego. Zmniejszenie intensywności mielinizacji i syntezy neuroprzekaźników w życiu płodowym może skutkować: zmniejszeniem efektywności pamięci krótkotrwałej, zaburzeniami rozwoju poznawczego, dysfunkcją szlaków czołowo - prążkowiowych, większą nieśmiałością, słabszą orientacją i zaangażowaniem oraz zaburzeniami snu i słuchu w porównaniu do dzieci bez niedoboru żelaza [168-175]. Żelazo wykazuje działanie antagonistycznie w stosunku do kadmu, manganu, cynku i ołowiu oraz synergistycznie z miedzią [162].

1.5. Stres oksydacyjny w czasie ciąży

Stresem oksydacyjnym nazywamy zaburzenie równowagi między natężeniem procesów oksydacyjnych, które indukują powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) i przeciwdziałającym systemem obronnym – antyoksydacyjnym. Układ antyoksydacyjny reguluje produkcję aktywnych rodników tlenowych oraz bierze udział w procesach naprawczych uszkodzonych tkanek. Reaktywne formy tlenu to wolne rodniki i nadtlenki, a także mniej reaktywne ponadtlenki, które mogą zostać zredukowane do bardziej agresywnych cząstek powodujących uszkodzenie komórki [193]. W przebiegu ciąży fizjologicznej, wszystkie tkanki i narządy rozwijającego się płodu, wymagają dostarczania dużych ilości tlenu [176]. Reaktywne formy tlenu-RFT, generowane zarówno w organizmie matki, jak i płodu, promują replikację, różnicowanie i dojrzewanie powstających komórek [177]. Działają one dwukierunkowo, ponieważ odpowiednia ich podaż jest niezbędna dla prawidłowej implantacji i rozwoju zarodka, obrony przeciwko matczynym infekcjom, prawidłowej steroidogenezy, natomiast niekontrolowana produkcja RFT może prowadzić do resorpcji zarodków na wczesnym etapie rozwoju, embriopatii, rozwoju stanu przedrzucawkowego, również do zwyrodnienia łożyska komplikującego wymianę matczyno-płodową i skutkującą zahamowaniem wzrastania płodu, oraz porodem przedwczesnym i niską masą urodzeniową 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 [178].

Żywieniowe i środowiskowe czynniki mogą się przyczyniać do powstawania wspomnianych powikłań ciąży i zwiększać podatność potomstwa na choroby. Szczególne znaczenie ma unikanie dymu tytoniowego w czasie ciąży i laktacji. Ma to istotne znaczenie w aspekcie zapobiegania niekorzystnemu wpływowi RFT na rozwijający się organizm w okresie ciąży i noworodkowym [176,177].

Jednoczesne palenie papierosów lub narażenie na wdychanie dymu tytoniowego powoduje, poza wziewną drogą dla niektórych metali, dodatkowy wzrost procesów wolnorodnikowych, powodujących zmiany sygnalizacji wewnątrz i międzykomórkowej oraz uszkodzenie makrocząsteczki, a także obniżenie aktywności niektórych antyoksydantów we krwi [179]. Przeprowadzona analiza zawartości markerów stresu oksydacyjnego w wydychanym powietrzu u ciężarnych i noworodków wykazała dodatnią korelację w stosunku do ilości wypalanych przez matkę papierosów [180]. 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 [178,181]. W limfocytach noworodków palących matek stwierdza się nasilone uszkodzenia oksydacyjne DNA, proporcjonalne do liczby dziennie wypalanych papierosów oraz czasu ekspozycji [182]. 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 [183]. Usuwanie wolnych rodników odbywa się poprzez dwa rodzaje mechanizmów: nieenzymatyczny i enzymatyczny. Stopień aktywności antyoksydacyjnej poszczególnych składników tego układu jest trudny do oszacowania ze względu na krótki okres półtrwania wolnych rodników. Do pośrednich metod określania sprawności układu antyoksydacyjnego zalicza się m.in. analityczne oznaczenie stężenia poszczególnych substancji jak np. witamin, czy aktywności enzymów antyoksydacyjnych w surowicy krwi. Parametrami określającymi sumarycznie status antyoksydacyjny ustroju jest całkowita zdolność antyutleniająca osocza (ang. the ferric reducing ability of plasma, FRAP) rozumiana jako wypadkowa zdolność antyoksydacyjna badanej próbki do przeciwdziałania określonemu ładunkowi utleniającemu [193]. Innym pośrednim wskaźnikiem potencjału antyoksydacyjnego jest stężenie aldehydu malonowego MDA biorącego udział w procesie peroksydacji lipidów [194].

1.5.1 Diałdehyd malonowy (MDA)

Mechanizmy cytotoksycznego działania niektórych pestycydów, metali, stanów zapalnych, procesów starzenia, chorobach nowotworowych, infekcjach, związane są z indukcją w komórkach procesów peroksydacji lipidów [245]. W wyniku tego procesu dochodzi do uszkodzenia i depolaryzacji błon cytoplazmatycznych oraz błon mitochondrialnych, co skutkuje wzmożonym wytwarzaniem wolnych rodników tlenowych RFT w komórce [245]. Najczęściej badanym procesem, związanym ze skutkami zachodzenia w organizmie reakcji z RFT, jest peroksydacja lipidów. Przez peroksydację lipidów rozumiemy wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w którym powstają nadtlenki tych związków. Peroksydacja lipidów, składa się z trzech etapów: inicjacji, propagacji (prolongacji), terminacji. Inicjacja peroksydacji lipidów polega na oderwaniu atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego lub reszty takiego kwasu wchodzącego w skład fosfolipidu. Reakcja inicjacji przekształca cząsteczkę kwasu tłuszczowego w wolny rodnik alkilowy $L\cdot$, gdyż przy atomie węgla, który stracił atom wodoru, pozostaje niesparowany elektron. Do czynników odrywających wodór od wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (L), inicjującego peroksydację lipidów należy zaliczyć rodnik hydroksylowy $\cdot OH$ oraz rodniki: nadtlenkowy $LOO\cdot$, alkoksyłowy $LO\cdot$, bądź alkilowy $L\cdot$ substancji obecnych w komórce [112].

– inicjacja: $LH + O_2 \rightarrow L\cdot + HOO\cdot$; $2 LH + O_2 \rightarrow 2 L\cdot + H_2O_2$

– propagacja: $L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$; $LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$; $LOOH \rightarrow LO\cdot + \cdot OH$

– terminacja: $L\cdot + L\cdot \rightarrow L-L$; $L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL$; $LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O_2$

Ryc. 1. Trzyetapowy przebieg procesu peroksydacji lipidów [112].

Wolne rodniki powstające w procesach peroksydacji lipidów mogą reagować z białkami. W rezultacie powstają wolne rodniki białek, które mogą uczestniczyć w reakcjach terminacji, tworząc mieszane połączenia białkowo-lipidowe. W procesie peroksydacji lipidów może wystąpić zjawisko reinicjacji polegające na tym, że nadtlenki lipidów (nierodnikowe produkty peroksydacji) mogą ulegać rozkładowi i prowadzić do ponownego powstania wolnych rodników. Rozpad taki inicjowany może być przez jony metali przejściowych, głównie jony żelaza i miedzi [112]:

$LOOH + Fe_2^+ \rightarrow LO\cdot + OH^- + Fe_3^+$; $LOOH + Fe_3^+ \rightarrow LOO\cdot + H^+ + Fe_2^+$

Produktami etapu terminacji są dimery kwasów tłuszczowych (w błonach biologicznych dimery fosfolipidów) oraz okso- lub hydroksykwasy – a więc zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów [9]. Dalsze przemiany produktów peroksydacji zachodzące m.in. za pośrednictwem β -eliminacji, prowadzą do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i powstania kilku- lub kilkunastowęglowych fragmentów. Produktami końcowymi powyższych reakcji są m.in. dialdehyd malonowy (MDA) i *trans*-4-hydroksynonenal (4-HNE), które mogą uszkadzać cząsteczki kwasów nukleinowych i białek. Spośród wymienionych produktów peroksydacji lipidów, 4-HNE jest najbardziej toksyczny, natomiast MDA wykazuje mutagenność wobec licznych komórek bakteryjnych i komórek ssaków [73,80]. Podwyższone stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym TBARS (thiobarbituric reactive substances) odzwierciedla zwiększoną peroksydację lipidów. Dialdehyd malonowy to związek o wysokiej cytotoksyczności, przejawia działania mutagenne i kancerogenne. MDA hamuje aktywność szeregu enzymów, prowadząc do hamowania replikacji DNA, transkrypcji i oddychania. Jest to również substancja najczęściej wykorzystywana do oceny peroksydacji lipidów *in vivo* w barwnej reakcji z kwasem tiobarbiturowym - czulej, choć mało specyficznej [112].

Nadtlenki kwasów tłuszczowych jak i aldehydowe produkty peroksydacji rozprzegają fosforylację oksydacyjną w mitochondriach. Uszkodzenia wolnorodnikowe białek obecnych w błonie komórkowej powodują zaburzenia funkcji przekaźników białkowych, receptorów i białek antygenowych. Utlenianie białek prowadzi do zmian w ich strukturze. Nawet niewielkie zmiany struktury białek powodują znaczącą zmianę ich aktywności. Dobrze poznane zostały skutki wolnorodnikowego uszkodzenia białek w przypadku alfa – 1 – antyproteinazy, głównego inhibitora elastazy w osoczu krwi. Pozbawienie właściwości enzymatycznych tego białka poprzez wolne reaktywne formy tlenu prowadzi do przewlekłej obturacyjnej choroby płuc w szczególności u osób palących, natomiast w przypadku osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów stres oksydacyjny, uszkadzając alfa – 1 antyproteinazę która prowadzi do zmian w obrębie mazi stawowej. Białka pod wpływem reaktywnych form tlenu - głównie rodnika hydroksylogowego- tworzą rodniki białkowe, które następnie po przyłączeniu cząsteczki tlenu tworzą rodniki nadtlenku białka. Czując metodę w oznaczaniu grup karbonylowych stanowi ocena uszkodzenia oksydacyjnego białek [112].

Skutek reakcji utleniania związków lipidowych stanowi również poważny problem sektora spożywczego [243]. Reakcje oksydacji wpływają bowiem niekorzystnie na właściwości fizykochemiczne żywności (w tym także mleka), pogarszając jej zapach i smak [243]. Produkty utleniania lipidów powstają już w trakcie wytwarzania samej żywnościowych [243]. Tworzone są także podczas przetwarzania (np. obróbki cieplnej) oraz przechowania żywności [243,244].

Szczególnie niebezpieczne są wtórne produkty utleniania lipidów, takie jak już wcześniej omówiono, niskocząsteczkowe aldehydy i ketony [244]. Są to bardzo lotne związki, odpowiedzialne w głównej mierze za zmiany sensoryczne produktów żywnościowych i niejednokrotnie doprowadzające je do zepsucia. Cechuje je wysoka reaktywność, przez co łatwo reagują z innymi składnikami żywności, np. z białkami. Tworzą z nimi trwałe połączenia, obniżając przy tym wartość odżywczą pożywienia (mleka) [244]. Szybkość reakcji znacznie wzrasta wraz ze zwiększającym się ciśnieniem tlenu oraz temperaturą. Znaczącą rolę odgrywa także światło, obecność metali (miedzi, żelaza, manganu), wody oraz innych składników nielipidowych. Warto dodać, że im bardziej nienasycony jest związek lipidowy, a takim jest mleko, tym szybciej ulega on utlenianiu [243,244]. Dlatego rozpatrywanie zawartości metali w mleku kobiecym w kontekście procesów powstawania wolnych rodników może być bardzo istotne dla młodego rozwijającego się organizmu.

1.6. Środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla niemowląt i małych dzieci

Żywność dla niemowląt i małych dzieci jest zaliczana do żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego [184]. Może ona być stosowana jako uzupełnienie posiłku mlecznego lub jako posiłki samodzielne w diecie mieszanej. Za jakość żywności, w tym dla niemowląt i dzieci, całkowitą odpowiedzialność ponosi wytwórca [184]. Ta grupa produktów o szczególnym przeznaczeniu wymaga nienaganej jakości zdrowotnej i stabilnego, odpowiadającego recepturze, składu. Używane surowce oraz stosowane technologie produkcji zapewnić muszą właściwą wartość żywieniową produktów z maksymalnym ograniczeniem substancji dodatkowych oraz zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych do poziomu nie stwarzającego ryzyka dla zdrowia [185]. W Polsce gotowe produkty przeznaczone dla niemowląt i małych dzieci podlegają określonym wymaganiom odnośnie składu, wartości odżywczej, a także przepisom dotyczącym produkcji, wprowadzenia do obrotu jak również reklamy [186]. Produkty specjalnego przeznaczenia żywieniowego nie powinny zawierać żadnych substancji w ilościach, które mogłyby zagrażać zdrowiu niemowląt i małych dzieci. Maksymalne dopuszczalne poziomy tych substancji oraz kryteria czystości mikrobiologicznej określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia, w którym wyszczególniono maksymalne poziomy zanieczyszczeń metalami szkodliwymi dla zdrowia (ołów, kadm, rtęć, arsen, cyna), azotanami i azotynami oraz zanieczyszczeń drobnoustrojami we wszystkich grupach żywności przeznaczonej dla niemowląt i małych dzieci [187]. Rozporządzenie nakłada obowiązek na producentów oznaczania zawartości metali szkodliwych w produktach przeznaczonych dla najmłodszej grupy konsumentów. Nie podaje natomiast

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006, poza dopuszczalnym poziomem ołowiu w produktach do początkowego żywienia niemowląt, specyficznych limitów zawartości pierwiastków szkodliwych dla zdrowia w produktach przeznaczonych dla tej grupy populacji, warunkujących ich bezpieczeństwo. W Polsce takie limity są bardziej rygorystyczne dla tej grupy produktów [188]. Realizacja wymagań względem kryteriów jakości zdrowotnej określonych w przepisach prawnych przerodziła się w konkretne działania ze strony producentów, polegające między innymi na: doborze surowców z upraw i hodowli kontrolowanych o najwyższej jakości, ograniczeniu ilości zanieczyszczeń chemicznych i fizycznych (metale ciężkie, pozostałości pestycydów, azotanów i azotynów, hormonów), zaostrzenie kontroli sanitarnej na wszystkich etapach wytwarzania, produkcji w zakładach do tego przeznaczonych, stosowaniu kryteriów dotyczących czystości mikrobiologicznej [187]. Produkty specjalnego przeznaczenia żywieniowego, podobnie jak inne środki spożywcze, mogą zawierać mniejsze lub większe ilości toksycznych metali ciężkich. Aczkolwiek wielokrotnie wykonywane badania kontrolne, wykazały, że zawartość metali ciężkich w żywności dla niemowląt i dla małych dzieci nie przekracza dopuszczalnych limitów, a tym samym nie stwarza zagrożenia dla zdrowia [188]. Wymagania te są podyktowane tym, że niemowlęta i małe dzieci stanowią grupę, w której pobranie metali, nawet w śladowych ilościach, może powodować nieodwracalne zmiany, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym. Jest to spowodowane m.in. większym niż u dorosłych wchłanianiem metali z przewodu pokarmowego, szybszym przebiegiem procesów metabolicznych, deficytem żelaza i witaminy D, oraz nie w pełni rozwiniętą barierą krew–mózg [189]. W okresie noworodkowym i niemowlęcym niedostatecznie rozwinięte procesy detoksykacyjne organizmu, są utrudnione z powodu niedojrzałego systemu enzymów mikrosomalnych wątroby, ograniczonych możliwości wydalania substancji toksycznych przez nerki oraz niesprawności mechanizmów układu immunologicznego [189]. Dla bezpieczeństwa zdrowia człowieka ważne jest oszacowanie wielkości pobrania metali ciężkich wraz z pożywieniem w określonym przedziale czasowym. Służy temu wskaźnik PTWI (ang. provisional tolerable weekly intake), czyli tygodniowe tolerowane pobranie metali. Tolerowane tygodniowe pobranie tych pierwiastków, podane przez Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Substancji Dodatkowych (JECFA), jest małe i podlega ciągłej weryfikacji: ołów – 0,025, kadm – 0,007, arsen – 0,025, rtęć – 0,005 (Hgorg 0,0016) mg/kg masy ciała [190]. Przyjmując założenie, że dziecko waży 8 kg oraz zjada 1 porcję (50 g) kaszki dziennie przez tydzień. Z obliczeń wynika, że kaszki błyskawiczne nie stanowią dla niemowląt i małych dzieci znaczącego źródła ww. metali. Kaszki błyskawiczne, obok mleka początkowego i następnego, są uzupełnieniem żywienia niemowląt i małych dzieci. Często ich dieta opiera się wyłącznie na tych produktach, zwłaszcza gdy karmienie mlekiem matki nie jest możliwe. Wówczas prawdopodobieństwo zwiększonego

pobrania szkodliwych substancji wzrasta. Wpływ na to ma jeszcze dodatkowo woda (i jej skład), jaką stosuje się do przygotowania produktu mlekozastępczego. Jest to bardzo niekorzystne dla tej grupy wiekowej, szczególnie wrażliwej na działanie metali, stąd też stałe monitorowanie poziomu zanieczyszczenia żywności i wody, jest konieczne do zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego produktów [191,192].

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena stężeń wybranych metali oraz wpływu środowiska na ich zawartość w mleku kobiecym. Analizie poddano wybrane czynniki środowiskowe mogące mieć potencjalny wpływ na stężenie badanych pierwiastków toksycznych oraz ich związek z peroksydacją lipidów mleka kobiecego.

Cel ten był realizowany z uwzględnieniem poniższych celów szczegółowych:

1. Oceny stężeń metali, Al, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, oraz MDA w mleku kobiecym od 3 do 6 doby po porodzie.

2. Analizy danych ankietowych przeprowadzonych w okresie poporodowym oceniającą:

- stopień narażenia kobiet na czynniki szkodliwe przed ciążą i w czasie ciąży, a następnie poprzez ocenę i porównanie poszczególnych stężeń metali i MDA w pobranych próbkach mleka w wybranych grupach kobiet,
- wpływ diety deklarowanej przez pacjentkę (pokarmy mięsne, roślinne, ryby, owoce morza) na zawartość metali i MDA w próbkach mleka kobiecego,
- wpływ palenia papierosów zarówno przed ciążą jak i w ciąży na ilość metali i MDA w mleku mam,
- ocenę zależności pomiędzy wiekiem kobiety, a zawartością pierwiastków w pokarmie kobiecym,
- ocenę korelacji pomiędzy miejscem zamieszkania, a ilością pierwiastków w pokarmie kobiet,
- wpływ amalgamatowych wypełnień zębowych na zawartość metali i MDA w pokarmie.

3. Analizy parametrów klinicznych dotyczących matki i noworodka:

- masa ciała sprzed ciąży i przed porodem (BMI), wzrost,
- chorób współtowarzyszących w ciąży (GDM, PROM, NIC, IUGR, niedokrwistość).

oraz dotyczących dziecka w okresie około i poporodowym:

- sposobu ukończenia ciąży,
- pomiarów dziecka (masa urodzeniowa i masa z dnia pobrania pokarmu, obwód główki, klatki piersiowej, długości ciała),
- ryzyka wystąpienia żółtaczki fizjologicznej,
- masy łożyska.

4. Korelacji badanych parametrów kobiet i noworodków ze stężeniem metali i MDA w pokarmie kobiecym.

3. Materiał i metodyka

3.1 Grupa badana

Badanie przeprowadzono na grupie kobiet hospitalizowanych w oddziałach położniczych, w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu po odbytych porodach.

Badania przeprowadzono w terminie od lipca do października 2016 roku. Badaniem objęto 101 położnic przebywających w oddziałach położniczych (Oddziale Położniczym II, III i IV, Oddziale Położniczo Ginekologicznym II i III, Oddziale Ginekologii I i Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu) oraz grupę 101 noworodków przebywających razem z matką zarówno w ww. oddziałach poporodowych jak i oddziale neonatologii (Klinice Opieki Ciągłej i Klinice Intensywnej Terapii Noworodka). Grupa badana objęła położnice od 16 do 42 roku życia, (średnia 31,22 lata), zarówno po porodach fizjologicznych jak i operacyjnych. Według wskazań medycznych wyodrębnione zostały grupy kobiet zarówno z ciąż fizjologicznych, zakończonych porodem o czasie jak i porodem przedwczesnym, oraz ciąż powikłanych: nadciśnieniem indukowanym ciążą - NIC, przedwczesnym pęknięciem błon płodowych - PROM, cukrzycą ciężarnych GDM - typ 1 i 2 oraz wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu IUGR (< 10 centyla z zaburzeniami w przepływach i bez zaburzeń w przepływach tętnicy pępowinowej w badaniu dopplerowskim). Kolejnego podziału na grupy pacjentek dokonano ze względu na miejsce zamieszkania: wieś lub miasto, palenie papierosów – paląca, paląca w przeszłości i niepaląca, ze względu na wiek – poniżej 30 roku życia i powyżej 30 roku życia. W zależności od deklarowanej diety: tradycyjną, wegetariańską, wegańską i inną z uwzględnieniem częstotliwości spożywania warzyw i owoców, mięsa, ryb i owoców morza, oraz deklarowania posiadania plomb z wypełnieniem amalgamatowym, z uwzględnieniem czasu ich posiadania i liczby. Noworodki do analizy podzielono ze względu na: masę urodzeniową poniżej 2500g, powyżej 2500g, oraz ze względu na stopień nasilenia żółtaczki - brak żółtaczki, rozpoczynającą się żółtaczkę i noworodki wymagające naświetlania. Do badania rekrutowano pacjentki które wyraziły pisemną świadomą zgodę. Na 104 pacjentki zapytane czy przystąpią do badania, jedna zrezygnowała w trakcie pobierania pokarmu ze względu na zbyt dużą wrażliwość brodawek (przy ręcznym odciąganiu pokarmu), dwie pacjentki nie były zainteresowane przystąpieniem do badania. 101 kobiet wyraziło zgodę. Informację na temat projektu, przekazywano matkom podczas procedury udzielania porady laktacyjnej w okresie nawału mlecznego od 3 do 6 doby po porodzie. Pokarm odciągany był przy pomocy odciągacza ręcznego Harmony (Medela, Szwajcaria) lub elektrycznego Swinga (Medela, Szwajcaria).

W przypadku używania laktatora elektrycznego regulacja siły ssania urządzenia była dobierana do indywidualnych potrzeb pacjentki tak, by laktator nie sprawiał bólu, przy jednoczesnym utrzymaniu prawidłowego wypływu pokarmu. Przy ręcznym odciąganiu pokarmu stosowano uchwycenie piersi całą dłonią złożoną na kształt litery C. Kciuk obejmował pierś z dołu, a reszta palców podtrzymywała pierś od góry. Uwalnianie mleka z kanalików polegało na delikatnym ucisku piersi z jednoczesnym lekkim podnoszeniem piersi ku górze. Podczas ściskania piersi, nie ściskano brodawki, a ucisk był od niej odsunięty o jakieś 2 - 3 centymetry. Przy odciąganiu pokarmu stosowano delikatne korekty w zmianie uchwytu. Przed odciąganiem pokarmu w obu przypadkach (odciąganiu ręcznym i mechanicznym) nie stosowano wcześniejszej dezynfekcji piersi.

3.2 Procedura pobierania mleka

Pokarm był pobierany w ilości od 5 do 20 ml. W celu uniknięcia wtórnego zanieczyszczenia metalami, pobrane mleko za każdym razem bezpośrednio trafiało do pojemnika wykonanego z materiałów niezawierających bisfenolu - BPA, polietylenowych, dopuszczonych do kontaktu z żywnością dla niemowląt. W przypadku stosowania odciągaczy były to butelki firmy Medela (Szwajcaria), w odciąganiu ręcznym stosowano strzykawkę 20 ml, (Braun, Niemcy).

We wszystkich wspomnianych przypadkach mleko mamy było pobierane tylko w przypadku wystarczającej jego ilości dla noworodka. Zaraz po pobraniu było ono przechowywane w walidowanej lodówce oddziału położniczego (Amica, Polska), a następnie w przeciągu 3 godzin od pobrania transportowane w torbie termoizolacyjnej (EL – Comp, Polska), do Zakładu Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Przed dalszymi procedurami, w Zakładzie Medycyny Środowiskowej próbki mleka zamrażano w temperaturze - 40°C (LT C300, Nordic Lab, Dania). Udział w badaniu był dobrowolny, a pacjentki uprzednio zostały poinformowane o istocie i celowości jego wykonania. Wszystkie kobiety wyraziły pisemną świadomą zgodę na wzięcie w nim udziału.

3.2.1 Dane ankietowe

Po wyrażeniu pisemnej świadomej zgody przez pacjentkę na udział w badaniu, pobraniu mleka, proszono każdą z kobiet o wypełnienie ankiety.

Ankieta zawierała następujące elementy:

- analiza miejsca zamieszkania (wieś, miasto),
- historia palenia (liczba wypalanych papierosów w przeszłości i obecna),
- stopień narażenia na substancje chemiczne w środowisku pracy (kontakt z metalami ciężkimi),
- sposób odżywiania (dieta tradycyjna, wegańska, wegetariańska, ilość i częstość spożywanego mięsa, ryb, owoców morza, warzyw i owoców),
- analiza amalgamatowych wypełnień zębowych (liczba plomb, okres ich posiadania, ewentualnie czas jaki upłynął od ich usunięcia).

Dane na temat przebiegu ciąży, stwierdzonych w trakcie jej trwania powikłań oraz sposobu jej rozwiązania, a także informacje o noworodku zaczerpnięto z dokumentacji medycznej. Ta część ankiety zawierała następujące elementy:

- dane ogólne (rodność, wiek, wzrost, masa ciała sprzed ciąży i przed porodem, BMI),
- przebieg ciąży (choroby współistniejące z ciążą),
- przebieg porodu (poród drogami natury, zabiegowy- wyciągacz próżniowy i kleszcze położnicze, cięcie cesarskie),
- ocenę noworodka (skala Apgar, pomiary masy-urodzeniowa i z dnia pobrania pokarmu, parametry noworodka - obwód główki, klatki piersiowej i długości ciała),
- stopień nasilenia żółtaczki (od której doby, oznaczenia poziomu bilirubiny).

W ankiecie respondentkom zapewniano anonimowość i ochronę danych osobowych. Wzór ankiety został umieszczony w załączniku nr 1.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 16 czerwca 2016r. uchwałą nr 782/16.

3.3. Materiał biologiczny i oznaczenia analityczne

Oznaczenia analityczne zostały przeprowadzone przy udziale Zakładu Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w Zakładzie Chemii Analitycznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

- **Oznaczenie stopnia peroksydacji lipidów jako markera stresu oksydacyjnego**

W celu oznaczenia stopnia peroksydacji lipidów, w badanym mleku wykonywano oznaczenie malondialdehydu (MDA) z wykorzystaniem metody z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w oparciu o zestaw komercyjny Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Wielka Brytania). Do rozmrożonej próbki mleka o objętości 100 μL dodawano 300 μL płynu lizującego z dodatkiem 1% tetrabutylowanego hydroksytoluenu (BHT) celem zapobiegania zachodzenia peroksydacji lipidów podczas dalszej preparatyki. Tak przygotowane próby wirowano w 4°C przy 4000 rpm przez 10 minut. Po odwirowaniu z każdej próbki ściągano po 100 μL roztworu w trzech powtórzeniach i dodawano po 300 μL TBA. Następnie próbki inkubowano w 95°C przez okres 1 h, celem utworzenia kompleksów MDA-TBA. Reakcję zatrzymywano przez osadzenie próbek na lodzie na 10 minut. Następnie na płytkę 96-dołkową nakładano po 200 μL każdej próbki i dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 532 nm czytnikiem BioTek Synergy HTX (BioTek, USA). Otrzymane wartości porównywano do krzywej wzorcowej przygotowanej w oparciu o roztwór standardowy MDA (BioVision, Wielka Brytania) i wyrażano jako $\mu\text{mol/L}$ (nmol/mL). Współczynnik determinacji (r^2) dla krzywej wzorcowej wyniósł 0.99.

- **Oznaczenie profilu pierwiastkowego**

W celu oznaczenia stężenia metali, z rozmrożonego i dobrze wymieszanego mleka pobrano dokładnie mL i umieszczono w naczyniach teflonowych. Następnie, mleko zmineralizowano w zamkniętym układzie Mars 6 (CEM, USA) w obecności 2 mL ultra-czystego kwasu azotowego ogrzewanym mikrofalowo wpierw ogrzewając je do temperatury 180°C przez 20 minut, następnie utrzymując w tej temperaturze przez kolejne 3 mL w obecności 2 mL ultra-czystego kwasu azotowego (Sigma-Aldrich, Niemcy). Po mineralizacji próbki ostudzono do temperatury pokojowej i rozcieńczono do ostatecznej objętości 5 mL przy pomocy ultra-czystej wody uzyskanej z systemu MilliQ (Millipore, USA).

Zmineralizowane i rozcieńczone próbki poddano analizie pierwiastkowej w oparciu o technikę atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ang. Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry ICP-OES). W tym celu wykorzystano urządzenie Agilent 5100 ICP-OES (Agilent, USA). Do atomizacji i wzbudzenia wykorzystuje się fale radiowe o wysokiej częstotliwości, które umożliwiają wytworzenie plazmy o wysokiej temperaturze (ok 7000K). Dzięki niej związki chemiczne rozpadają się do atomów, a następnie ulegają wzbudzeniu, po czym emituje pochłoniętą energię w postaci promieniowania elektromagnetycznego, charakterystycznego dla danego pierwiastka. Do kalibracji urządzenia wykorzystano komercyjne wzorce analityczne CM17 PrimAg Plus i KP7 PrimAg (Romil, Wielka Brytania). Zastosowano następujące długości fal: Al - 396.152 nm, Cu - 327.275 nm, Fe - 238.204 nm, Ni - 231.604 nm, Pb - 220.353, Zn - 213.857 nm (Siwulski i inni 2017). Limit detekcji wynosił 0.00053 mg/L dla Al, 0.00026 mg/L dla Cd, 0.004 mg/L dla Cu, 0.0004 mg/L dla Fe, 0.00093 mg/L dla Ni, 0.0023 dla Pb i 0.0011 mg/L dla Zn. Procedurę mineralizacji i oznaczenia pierwiastkowego wykonano w Zakładzie Chemii Analitycznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

- **Oznaczenie poziomu bilirubiny u noworodka**

Ocena poziomu bilirubiny u noworodka została dokonana przy pomocy schematu LI Kramera, miernika przeskrórnego, oraz oznaczeń stężeń bilirubiny we krwi żyłnej dziecka. Badanie wykonywane przy pomocy schematu LI Kramera, polegało na wizualnej ocenie żółtaczki. Przyjęto założenie, że żółtaczka pojawia się najpierw na skórze twarzy, następnie skórze klatki piersiowej i brzucha, potem na dłoniach i stopach. Metoda ta wyodrębnia V stref. Strefa I obejmuje zażółcenie twarzy i przyjmuje się, że w tej strefie poziom bilirubiny jest od 4 do 8 mg%. Oznaczenia bilirubiny z krwi żyłnej, dokonywano rutynowo u każdego noworodka w przypadku oznaczeń wykonywanych przy pomocy miernika przezskórnego, przekraczających poziom 10-12 mg/dl. Badanie przy pomocy miernika polega na naświetlaniu skóry światłem białym, a następnie pomiarze stopnia absorpcji powracających o różnej długości fal. Absorbancja światła jest proporcjonalna do zawartości bilirubiny w naczyniach włosowatych skóry i tkance podskórnej. Oznaczenia stężenia bilirubiny we krwi żyłnej noworodka wykonywało laboratorium GPSK na aparacie Cobas-c 501 (Roche, USA).

3.4. Analiza statystyczna

Metodyka

Dane zostały poddane analizom statystycznym w programie STATISTICA 12.5. (Stat-Soft, USA).

Na podstawie deklaracji pacjentek oraz analizy dokumentacji medycznej, do badań wyłoniono kilka grup pacjentek. Wynik uznano za istotny statystycznie, przy $p < 0.05$.

Aby sprawdzić czy występują zależności między wiekiem matki, jej indeksem BMI, masą łożyska, a także długością ciała, obwodem głowy, obwodem klatki piersiowej i masą noworodka oraz występowaniem żółtaczki u dziecka, a badanymi metalami (Al, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) i stężeniem MDA zastosowano macierz korelacji r-Pearsona.

Kolejna analiza dotyczyła grup kobiet - ze względu na wiek (poniżej 30 lat i powyżej 30 lat), miejsce zamieszkania (wieś/miasto), palenie papierosów (paląca/niepaląca), ogólnie przebyte choroby w trakcie ciąży, oraz na poszczególne choroby matki: cukrzycę (GDM), nadciśnienie (NIC), przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM), hipotrofię płodu (IUGR), a także masę urodzeniową noworodka (poniżej 2500 g i powyżej 2500 g) oraz tydzień ciąży (przed 37 i po 37 tygodniu). Do porównania stężeń poszczególnych metali i MDA w mleku matki w zależności od danego podziału użyto testów U-Manna Whitneya ($n=100$).

Do porównania stężeń poszczególnych metali i MDA w mleku matki w zależności od kontaktu z metalami użyto testów U- Manna Whitneya ($n=100$).

Wpływ diety (tradycyjna, wegetariańska, wegańska i inna) oraz częstotliwość spożywania warzyw i owoców, mięsa oraz ryb i owoców morza przez matkę na zawartość metali i MDA w mleku matki analizowano testem Kruskala-Wallisa ($n \sim 100$).

Do porównania stężeń poszczególnych metali i MDA w mleku kobiet w zależności od posiadanych amalgamatowych wypełnień zębowych użyto testów U- Manna Whitneya ($n=100$).

Powyższe testy zastosowano po sprawdzeniu braku normalności rozkładu testem Shapiro-Wilka.

4. Wyniki

4.1 Charakterystyka badanej grupy

Prezentowane badanie zostało przeprowadzone u 101 kobiet w wieku od 16 do 42 lat, średnia wieku 31,22 lata. Do badań łącznie pobrano 101 próbek mleka kobiecego z czego prawidłowych pobrań było 100. Jeden materiał odrzucono ze względu na zbyt małą porcję pobranego mleka, poniżej 5ml. Ostatecznie analiza objęła 100 próbek mleka kobiecego. Ponieważ pacjentki dobierano, bez określonych kryteriów, założeń i wykluczeń, poszczególne grupy kobiet znacząco różnią się liczebnością. Podziału na grupy dokonano na podstawie analizy ankiety i dokumentacji medycznej. Ogólna charakterystyka badanych pacjentek została zawarta w tabeli nr 2.

Tabela 2. Ogólna charakterystyka badanych pacjentek.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy (n) | Odsetek | Przedział | Średnia +-SD* |
|--|----------------------|---------|---------------|---------------|
| Ogólny wiek kobiet poddanych badaniu | 100 | 100% | (16-42) | 31,22 +-0,57 |
| BMI badanych kobiet | 100 | 100% | (16,26-52,80) | 22,92 +-0,50 |
| Liczba pobranych próbek mleka(n) | 101 | | | |
| Liczba próbek mleka odrzuconych- zbyt mała ilość <5 ml (n) | 1 | | | |
| Liczba próbek mleka poddana analizie(n) | 100 | 100% | | |
| Wiek matki < 30 roku życia (n) | 31 | 31% | | |
| Wiek matki > 30 roku życia (n) | 69 | 69% | | |

*SD-Odchylenie standardowe

Do badań włączono kobiety, które deklarowały w ankiecie palenie papierosów. Wśród pacjentek wyłoniono dwie grupy badawcze. Matki palące i niepalące. Następnie po szczegółowej analizie ankiet dokonano podziału pacjentek na kobiety palące aktualnie, niepalące oraz palące w przeszłości.

Tabela 3. Podział pacjentek na palące w przeszłości, palące i niepalące.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy (n) | Odsetek |
|----------------------------------|----------------------|---------|
| Kobiety palące w przeszłości (n) | 37 | 37% |
| Kobiety palące aktualnie (n) | 3 | 3% |
| Kobiety niepalące (n) | 60 | 60% |

Na podstawie analizy miejsca zamieszkania – wieś lub miasto, wyodrębni grupę kobiet zamieszkujących aglomeracje miejskie i tereny wiejskie. Analiza dotyczyła także miejsca pracy pacjentek, a w szczególności narażenie na kontakt chemikaliami.

Tabela 4. Podział pacjentek ze względu na kontakt z chemikaliami w miejscu pracy, oraz zamieszkujących miasto lub wieś.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy (n) | Odsetek |
|--|----------------------|---------|
| Kontakt z chemikaliami w miejscu pracy (n) | 5 | 5% |
| Pacjentki mieszkające na wsi (n) | 24 | 24% |
| Pacjentki mieszkające w mieście (n) | 76 | 76% |

Analizując przebieg ciąży, dokonano podziału kobiet na te u których ciąża miała przebieg powikłany chorobami współistniejącymi oraz na te, gdzie przebieg ciąży był prawidłowy.

Tabela 5. Podział pacjentek ze względu na ciążę o przebiegu powikłanym i niepowikłanym.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy(n) | Odsetek |
|--|---------------------|---------|
| Choroby matki GDM (cukrzyca) (n) | 8 | 8% |
| Choroby matki NIC (nadciśnienie) (n) | 14 | 14% |
| Choroby matki PROM (przedwczesne pęknięcie błon płodowych) (n) | 8 | 8% |
| Choroby matki IUGR (hipotrofia płodu) (n) | 3 | 3% |
| Przebieg ciąży niepowikłany chorobą współistniejącą (n) | 67 | 67% |

Rodzaj preferowanej diety i różnorodność spożywanych produktów żywnościowych, był podstawą wyodrębnienia kolejnych grup pacjentek. Szczegółowa analiza poszczególnych grup badawczych została przedstawiona w tabeli 6.

Tabela 6. Podział pacjentek ze względu na rodzaj diety oraz częstotliwość spożywanych produktów mięsnych i jego przetworów, warzyw i owoców, ryb i owoców morza.

| Rodzaj diety | Liczebność Grupy(n)/odsetek | Częstotliwość spożywania(n) wybranych produktów | 2-3 Razy dziennie | 1 Raz dziennie | 2-3 razy w tygodniu | Raz w tygodniu | Rzadko | Wcale |
|-----------------------------|------------------------------------|--|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|--------------|
| Dieta tradycyjna(n) | 89 | | | | | | | |
| Dieta wegetariańska (n) | 6 | | | | | | | |
| Dieta wegańska (n) | 2 | | | | | | | |
| Ryby i owoce morza (n) | | | 1 | 0 | 16 | 45 | 36 | 2 |
| Mięso i przetwory mięsne(n) | | | 25 | 37 | 28 | 8 | 0 | 2 |
| Warzywa i owoce (n) | | | 57 | 31 | 9 | 2 | 1 | 0 |

Aby sprawdzić czy występują zależności między wiekiem pacjentek przed 30 rokiem życia i po 30 roku życia, oraz sposobu ukończenia ciąży drogą porodu samoistnego, cięcia cesarskiego, porodu zabiegowego a zawartością metali ciężkich w pokarmie kobiet, wyłoniono kolejną grupę badawczą spośród pacjentek.

Tabela 7. Podział pacjentek ze względu na sposobu ukończenia porodu - poród samoistny, zabiegowy i cięcie cesarskie.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy(n) | odsetek |
|--|----------------------------|----------------|
| poród samoistny(n) | 39 | 39% |
| Poród zabiegowy (vacuum, kleszcze) (n) | 13 | 13% |
| Poród ukończony przez cięcie cesarskie(n) | 48 | 48% |

Przeanalizowano również deklarowane przez pacjentki w ankiecie amalgamatowe wypełnienia zębowe. Dokonano podziału pacjentek ze względu na posiadanie i nie posiadanie wypełnień

amalgamatowych, oraz wyodrębniono grupę kobiet które posiadały w przeszłości wypełnienia amalgamatowe. Do badań nie włączono trzech pacjentek, ze względu na posiadanie implantu zębowego.

Tabela 8. Podział pacjentek ze względu na posiadanie amalgamatowych wypełnień zębowych.

| Charakterystyka grupy badanej | Liczebność grupy(n) | Odsetek |
|--|---------------------|---------|
| Pacjentki z wypełnieniami amalgamatowymi (n) | 45 | 45% |
| Pacjentki bez wypełnień amalgamatowych (n) | 38 | 38% |
| Pacjentki które miały w przeszłości wypełnienia amalgamatowe (n) | 14 | 14% |
| Pacjentki posiadające implant zębowy (n) | 3 | 3% |

Scharakteryzowano także noworodki i dane z porodu uwzględniające: masę łożyska, długość ciała, obwód głowy, obwód klatki piersiowej i masę noworodka, co przedstawiono w tabeli nr 9.

Tabela 9. Podział noworodków ze względu na masę, obwód klatki piersiowej, głowy, długość ciała i masę łożyska.

| Charakterystyka wybranej grupy noworodków(n=liczebność) | Średnia+-SD* | Mediana | przedział |
|---|-----------------|---------|------------|
| Noworodki o masie =< 2500g (n) | 1962,78+-210,23 | 2310g | 2500-980g |
| Noworodki o masie > 2500g(n) | 3507,47+-50,36 | 3490g | 4820-2520g |
| Obwód klatki piersiowej cm (n=99) | 33,081cm | 34,00cm | 38-20cm |
| Obwód głowy cm (n=99) | 34,14+-0,22 | 34,00cm | 38-25,5cm |
| Długość ciała cm (n=99) | 54,87+-0,44 | 55.0cm | 65-35,5cm |
| Masa łożyska g (n=100) | 608,500+-11,83 | 605g | 900-280g |

*SD-Odchylenie standardowe

Noworodki zaszeregowano w trzy grupy, w zależności od stopnia nasilenia żółtaczki, wg kryterium stężenia bilirubiny. Szczegółowy opis przedstawia tabela nr. 10.

Tabela 10. Podział noworodków ze względu na występowanie żółtaczki noworodkowej.

| Charakterystyka wybranej grupy noworodków(n=liczebność) | Liczebność grupy | Przedział bilirubiny |
|--|------------------|--------------------------------|
| Noworodki z cechami rozpoczynającej się żółtaczki (n) | 37 | >5-10mg/dl |
| Noworodki z żółtaczką wymagające fototerapii łóżeczkowej (n) | 27 | >10mg/dl (10,67-19,14mg/dl) |
| Noworodki bez cech żółtaczki (n) | 35 | < 5mg/dl |

4.2 Stężenia wybranych metali i MDA w pokarmie kobiecym

We wszystkich pobranych próbkach mleka potwierdzono obecność badanych metali: glin(AL), miedź(Cu), żelazo(Fe), nikiel(Ni), ołów(Pb), cynk(Zn) i dialdehyd malonowy (MDA). Oznaczeniu poddano również kadm(Cd), ponieważ w każdej próbce wymieniony pierwiastek był poniżej detekcji (najniższego stężenia, które można było odróżnić od zera), został on wyłączony z dalszych analiz. Ogólną zawartość pierwiastków w pobranym mleku kobiecym przedstawiono w tabeli nr.11.

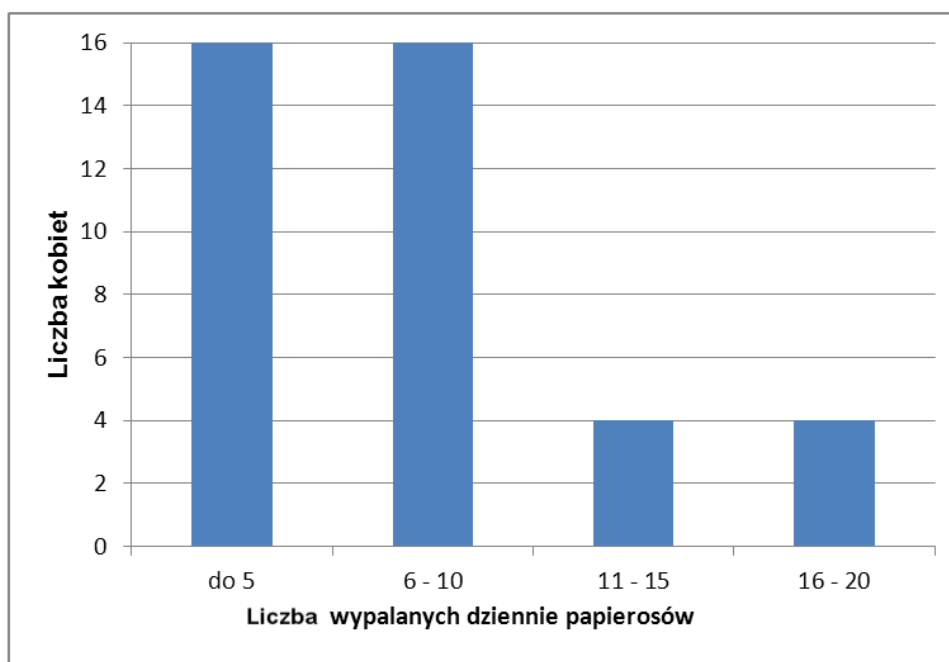
Tabela. 11. Ogólna zawartość metali i MDA w pobranym mleku kobiecym.

| Rodzaj pierwiastka | Średnia ± SD* | Mediana | Przedział |
|--------------------|------------------|---------|----------------|
| MDA nmol/mL | 0,66 ± 0,027 | 0,62 | 1,3461-0,2379 |
| AL mg/L | 0,091 ± 0,00892 | 0,074 | 0,2773-0,02773 |
| Cu mg/L | 0,308 ± 0,02327 | 0,267 | 1,3182-0,0048 |
| Fe mg/L | 0,994 ± 0,11678 | 0,633 | 5,641-0,322 |
| Ni mg/L | 0,001 ± 0,00027 | 0,000 | 0,0065-0,0018 |
| Pb mg/L | 0,008 ± 0,00130 | 0,002 | 0,0329-0,01 |
| Zn mg/L | 11,895 ± 0,61843 | 11,226 | 30,7689-0,691 |

*SD –Odchylenie standardowe

4.3 Wpływ palenia papierosów na zawartość metali i MDA w mleku

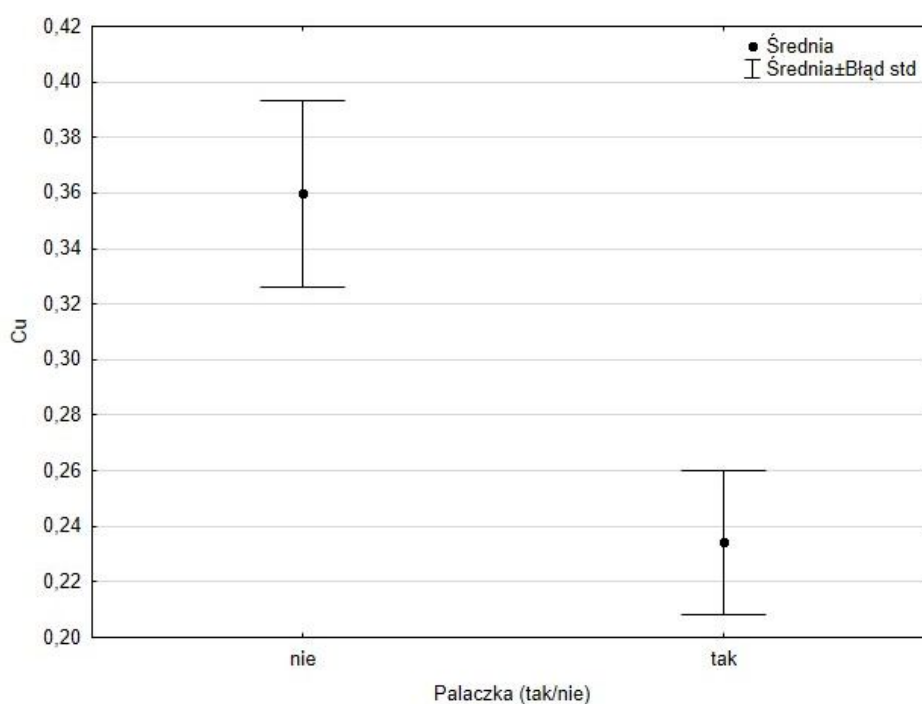
Deklaracja kobiet dotycząca palenia papierosów przed ciążą czyli w przeszłości, palących nadal oraz nie palących, była podstawą do wyodrębnienia poszczególnych grup pacjentek. Położnice, które deklarowały zaprzestanie palenia papierosów w ciąży były uznawane jako kobiety palące w przeszłości. Liczba wypalanych papierosów przez kobiety zarówno palące w przeszłości jak i obecnie, mieściła się w przedziale od 1 do 20 sztuk dziennie. Średnia deklarowana liczba wypalanych papierosów wynosiła 10 sztuk dziennie (rycina 2). Ustalono, że w całej grupie badanej, do regularnego palenia w przeszłości przyznało się 37 pacjentek. Istotnym momentem, w którym badane kobiety podejmowały decyzję o zaprzestaniu palenia papierosów, najczęściej była pierwsza wizyta lekarska i informacja o ciąży, stąd aktywnie palących pacjentek przez cały okres ciąży było 3. Niepalenie deklarowało 60 kobiet.



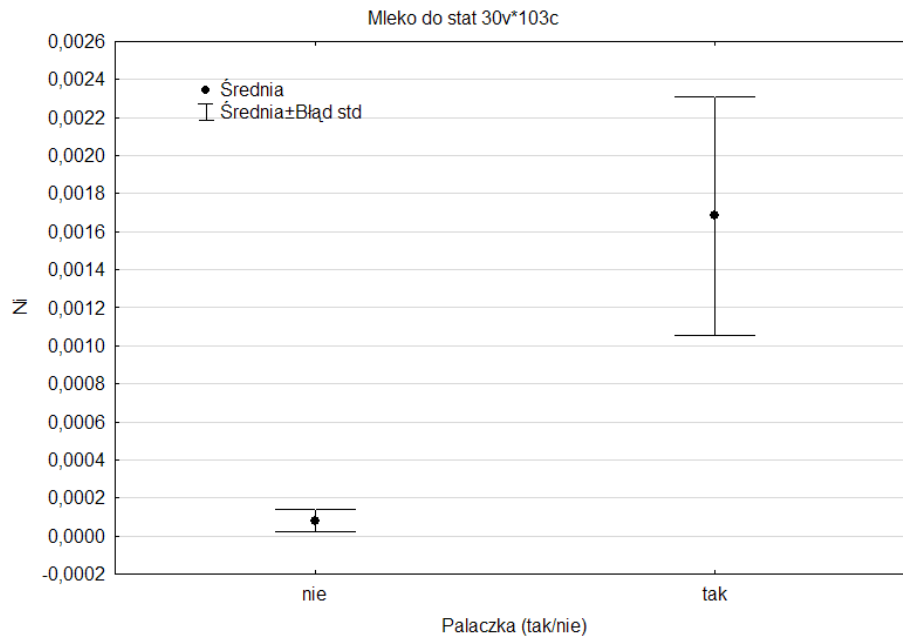
Rycina 2. Deklarowana liczba dziennie wypalanych papierosów przez pacjentki palące w przeszłości i obecnie.

Pierwotny podział badanych pacjentek obejmował kobiety palące (n=40) oraz niepalące (n=60). Dokonano ostatecznego podziału pacjentek na: palące w przeszłości, palące i niepalące. Zauważono istotne różnice statystyczne przy podziale na palące i niepalące w zawartości miedzi(Cu), niklu(Ni), cynku(Zn), natomiast przy podziale na palące w przeszłości, obecne i niepalące w zawartości ołowiu(Pb). Przy pierwszym podziale odnotowano istotne różnice statystyczne między kobietami palącymi (n=40) i niepalącymi (n=60), a zawartością miedzi (Cu)

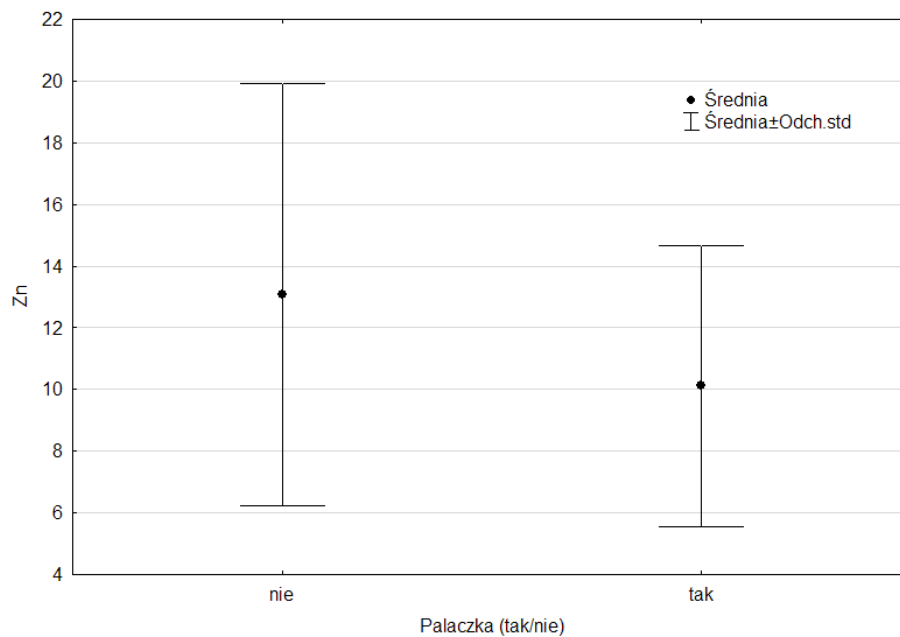
($Z=2,6$; $p=0,009$) (Ryc. 3), niklu(Ni) ($Z=-2,8$; $p=0,006$) (Ryc. 4), cynku(Zn) ($Z=2,06$; $p=0,039$) (Ryc. 5) w mleku matki. Wyższą średnią zawartość miedzi(Cu) i cynku(Zn) odnotowano u kobiet niepalących (odpowiednio, 0,36 mg/L; 13,08 mg/L) niż u palących (odpowiednio 0,23mg/L; 10,11 mg/L). Natomiast średnia zawartość niklu(Ni) była wyższa u palaczek (0,002mg/L) niż u niepalących (0,00008 mg/L). Palenie papierosów nie miało wpływu na zawartość pozostałych metali i MDA (MDA $p=0,74$; Al $p=0,26$; Fe $p=0,97$; Pb $p=0,14$) (Tabela 13).



Ryc. 3. Średnia i błąd standardowy zawartości miedzi w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, paląca (tak) i niepaląca (nie).



Ryc. 4. Średnia i błąd standardowy zawartości niklu w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, paląca (tak) i niepaląca (nie).



Ryc. 5. Średnia i błąd standardowy zawartości cynku w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, paląca (tak) i niepaląca (nie).

Wśród kobiet palących w przeszłości, palących i niepalących, również odnotowano istotne różnice statystyczne (test Kruskala-Wallis). Różnice te wykazano między kobietami palącymi w przeszłości (n=37), obecnymi palaczkami (n=3) i kobietami nie palącymi (n=60) w zawartości w mleku miedzi(Cu) (H= 7,07; p=0,029), Ni (H= 32,98; p =0,000) i ołowiu(Pb) (H= 10,29; p =0,006). Testy *post-hoc* (wielokrotne porównania średnich rang dla wszystkich prób) wykazały następujące różnice:

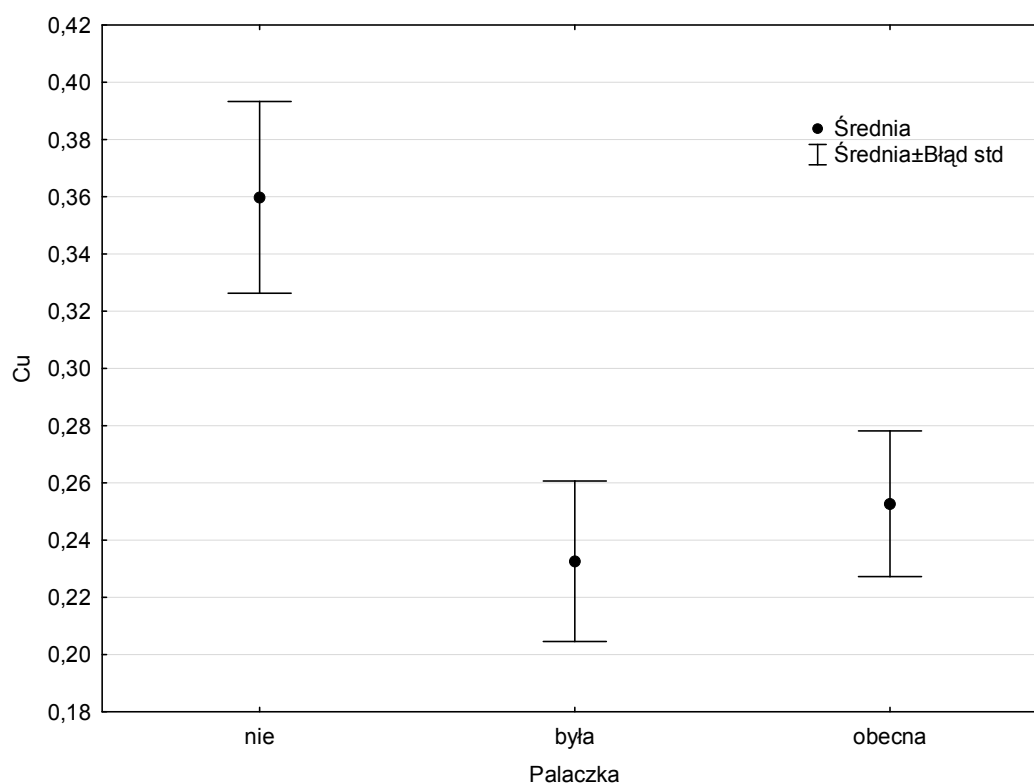
Cu – kobiety nie palące vs. była palaczka p = 0,024 (ryc. 6)

Ni – kobiety nie palące vs. obecne palaczki p = 0,009 (ryc. 7)

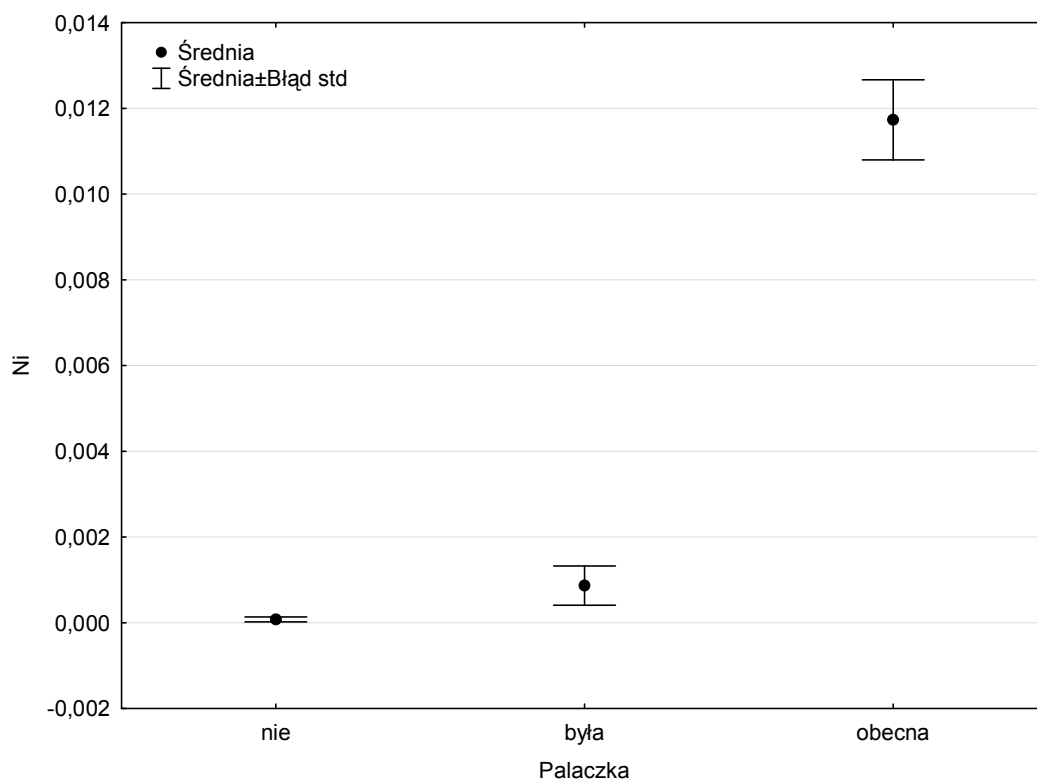
Ni – były palaczki vs. obecne palaczki p = 0,026

Pb – kobiety nie palące vs. obecne palaczki p = 0,008 (ryc. 8)

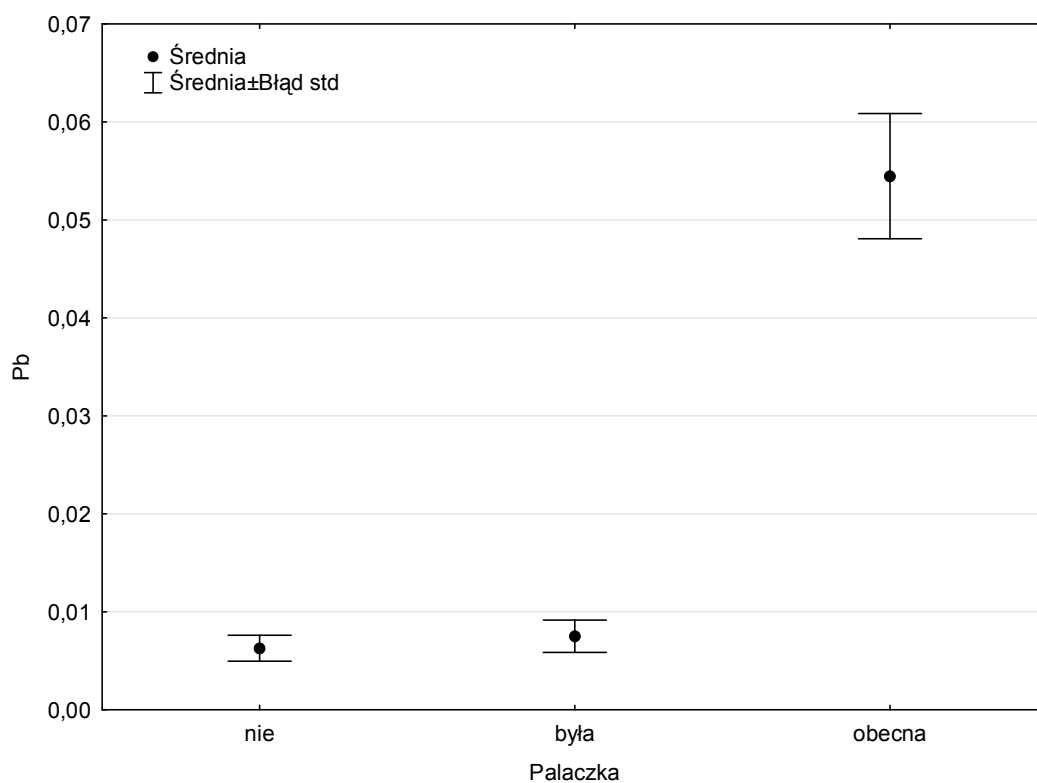
Pb – były palaczki vs. obecne palaczki p = 0,022



Ryc. 6. Średnia i błąd standardowy zawartości miedzi w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, nie paląca (nie), paląca w przeszłości (była) i obecna palaczka (obecna).



Ryc. 7. Średnia i błąd standardowy zawartości niklu w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, nie paląca (nie), paląca w przeszłości (była) i obecna palaczka (obecna).



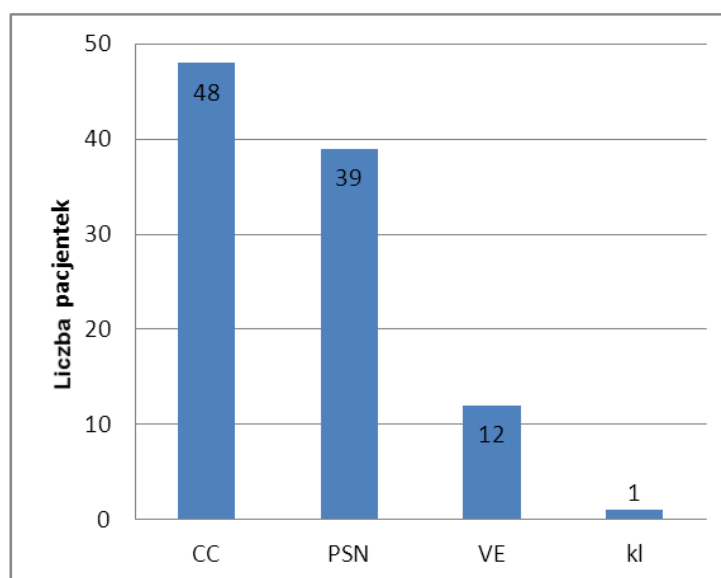
Ryc.8. Średnia i błąd standardowy zawartości ołowiu w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na palenie, nie paląca (nie), paląca w przeszłości (była) i obecna palaczka (obecna).

- **Korelacja liczby wypalanych papierosów a stężenie niklu**

Ze względu na znacznie podwyższoną zawartość niklu u palaczek, sprawdzono czy istnieje zależność między liczbą wypalanych dziennie papierosów, a stężeniem niklu(Ni) w pokarmie kobiecym. W badanej grupie nie znaleziono istotnych statystycznie zależności między liczbą wypalanych papierosów a stężeniem niklu(Ni) w mleku matki ($r = 0,02$; $p = 0,843$; $n = 100$).

4.4. Stężenia metali i MDA a sposób ukończenia ciąży

Badano również na podstawie analizy dokumentacji medycznej wpływ sposobu ukończenia ciąży na stężenia metali i MDA. Liczbowe zestawienie grupy pacjentek przedstawia rycina nr 9.



Rycina 9. Liczba pacjentek z podziałem na sposób ukończenia porodu: cięcie cesarskie (cc), siłami natury (PSN), vacuum extractor (VE), kleszcze (KI).

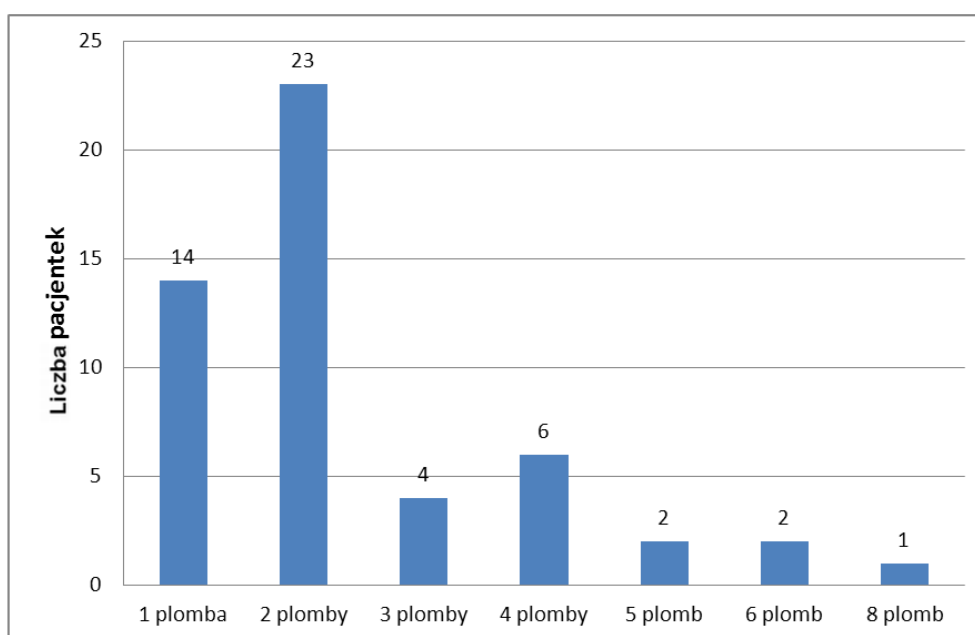
W przedstawionej grupie kobiet nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych między sposobem ukończenia porodu a zawartością metali i MDA w mleku matki (MDA $p=0,60$; Al $p=0,65$; Cu $p=0,51$; Fe $p=0,48$; Ni $p=0,85$; Pb $p=0,56$; Zn $p=0,24$) (test Kruskala-Wallisa). Po podziale na grupy rodzące siłami natury (PSN, KL, VE) w stosunku do kobiet u których poród ukończono przez cesarskie cięcie (CC) również nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

Tabela 13. Podział pacjentek na rodzaje siłami natury (PSN, KL, VE) i cesarskim cięciem (CC) w stosunku do zawartości metali i MDA.

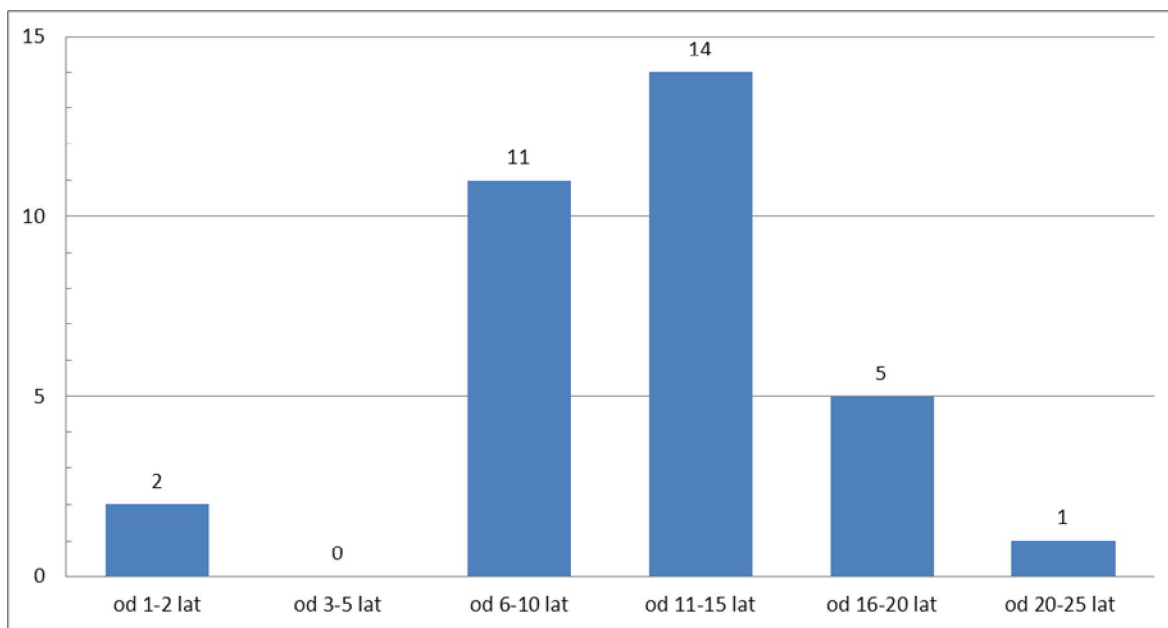
| Zmienna | Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) Względem zmiennej: Poród (PSN/CC) Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05$ | | | |
|---------|---|----------|-------------|------------|
| | Z popraw. | p | N ważn. PSN | N ważn. CC |
| MDA | 0,528643 | 0,597053 | 51 | 48 |
| Al | 0,539113 | 0,589809 | 51 | 48 |
| Cu | 1,312210 | 0,189450 | 45 | 47 |
| Fe | -0,188327 | 0,850620 | 50 | 48 |
| Ni | -0,094697 | 0,924555 | 50 | 48 |
| Pb | -0,540849 | 0,588612 | 51 | 48 |
| Zn | 1,879876 | 0,060126 | 51 | 48 |

4.5. Wpływ posiadanych amalgamatowych wypełnień zębowych na stężenia badanych substancji

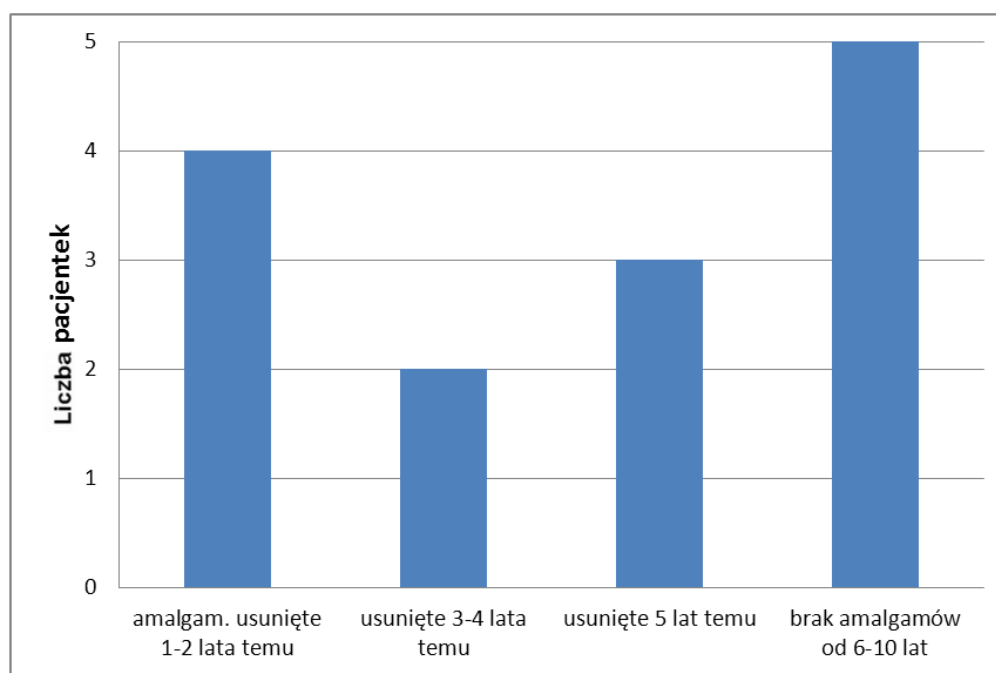
Analizie badawczej poddano pacjentki posiadające wypełnienia amalgamatowe. Do badań włączono pacjentki które deklarowały w ankiecie posiadanie plomb amalgamatowych (n=45) oraz kobiety które nie posiadały plomb z amalgamatu (n=38). Ostatecznie z badań ze względu na czas jaki upłynął od usunięcia plomb amalgamatowych, wyłączono pacjentki które deklarowały, że posiadały takie wypełnienia w przeszłości (n=14) i trzy (n=3) kobiety które deklarowały posiadanie zębowych implantów. Dokładny podział pacjentek ze względu na liczbę posiadanych wypełnień przedstawia rycina nr 10. Liczbę lat założenia wypełnień obrazuje rycina nr 11. Podział pacjentek uwzględniający czas jaki upłynął od usunięcia ww. wypełnień przedstawia rycina nr 12.



Rycina 10. Podział pacjentek ze względu na liczbę wypełnień z amalgamatem.



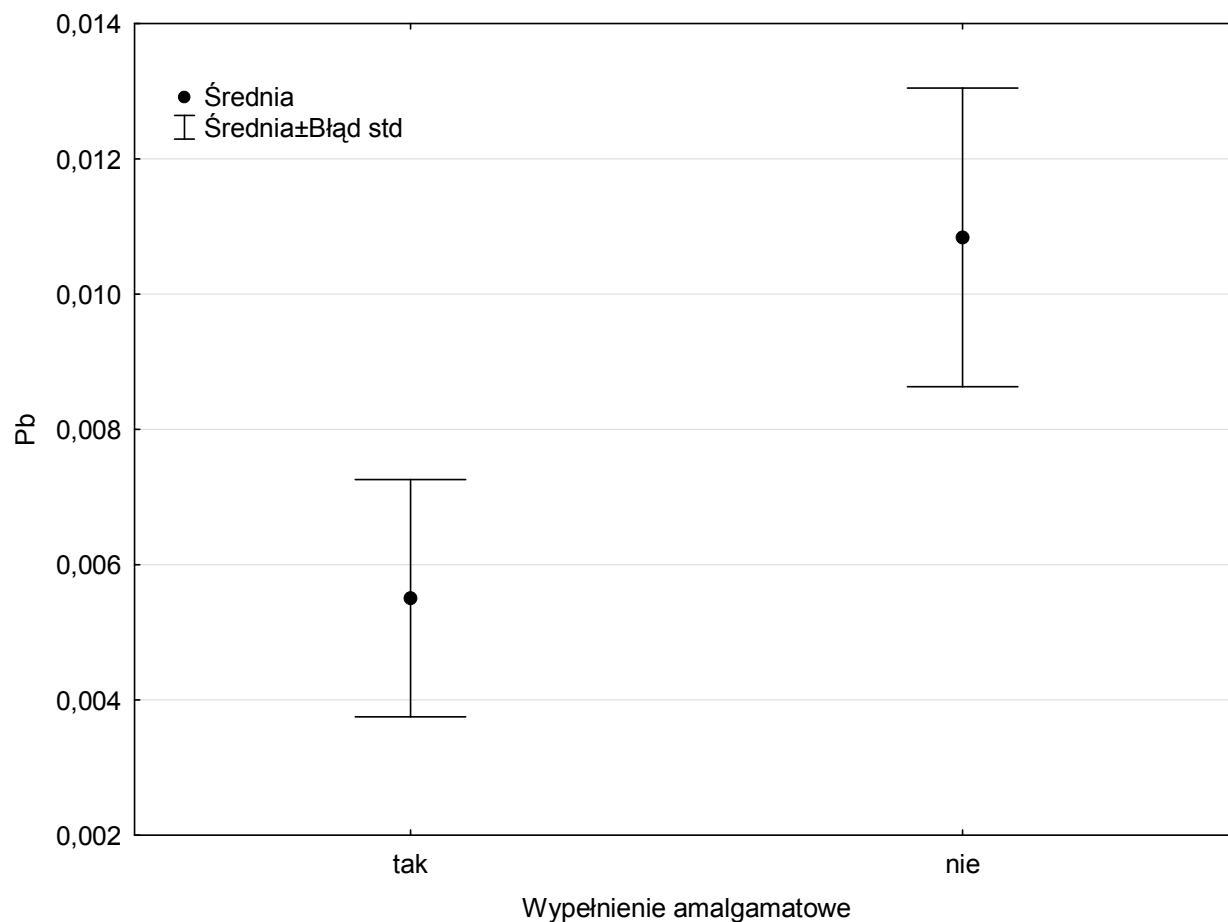
Rycina 11. Podział pacjentek ze względu na liczbę lat posiadania wypełnień z amalgamatem.



Rycina 12. Podział pacjentek ze względu na czas jaki upłynął od usunięcia wypełnień z amalgamatem.

Na podstawie testu U Manna-Whitneya stwierdzono, że posiadanie amalgamatowych wypełnień zębowych przez matki („tak” n=45; „nie” n=41) miało istotny statystycznie wpływ na zawartość ołowiu (Pb) w mleku matki ($Z=-2,24$; $p=0,025$). Warto podkreślić, że jego stężenia były wyższe u kobiet nie posiadających amalgamatowego wypełnienia (średnia odpowiednio

0,011 mg/L) niż u kobiet z wypełnieniem (średnia wynosiła 0,006 mg/L). Nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych dla pozostałych metali i MDA (MDA $p=0,83$; Al $p=0,25$; Cu $p=0,98$; Fe $p=0,30$; Ni $p=0,54$; Zn $p=0,93$). Również liczba wypełnień oraz czas ich posiadania nie korelowały istotnie z zawartością ww. metali i MDA w mleku matek.



Ryc. 13. Średnia i błąd standardowy zawartości ołowiu w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na posiadanie zębowych wypełnień amalgamatowych.

Statystyki opisowe:

Tabela 14. Statystyki opisowe dla grupy kobiet posiadających amalgamatowe wypełnia zębowe.

| Zmienna | Amalgamat=tak | | | | | | |
|---------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
| | N ważnych | Średnia | Mediana | Minimum | Maksimum | Odch.std | Standard. Błąd |
| MDA | 45 | 0,66695 | 0,58926 | 0,234847 | 1,27406 | 0,270000 | 0,040249 |
| Al | 45 | 0,07944 | 0,07250 | 0,017500 | 0,21180 | 0,036224 | 0,005400 |
| Cu | 45 | 0,30926 | 0,28655 | 0,004800 | 1,31820 | 0,234310 | 0,037048 |
| Fe | 45 | 0,92094 | 0,69575 | 0,321700 | 2,69960 | 0,592494 | 0,089322 |
| Ni | 45 | 0,00076 | 0,00000 | 0,000000 | 0,01320 | 0,002710 | 0,000404 |
| Pb | 45 | 0,00550 | 0,00000 | 0,000000 | 0,06310 | 0,011765 | 0,001754 |
| Zn | 45 | 11,96700 | 11,55110 | 0,691000 | 30,76890 | 6,189307 | 0,922647 |

Tabela 15. Statystyki opisowe dla grupy kobiet nieposiadających amalgamatowych wypełnień zębowych.

| Zmienna | Amalgamat=nie | | | | | | |
|---------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
| | N ważnych | Średnia | Mediana | Minimum | Maksimum | Odch.std | Standard. Błąd |
| MDA | 41 | 0,68171 | 0,67036 | 0,255871 | 1,34615 | 0,277150 | 0,043284 |
| Al | 41 | 0,10939 | 0,07580 | 0,044500 | 0,88520 | 0,132085 | 0,020628 |
| Cu | 41 | 0,31500 | 0,27290 | 0,018000 | 0,96370 | 0,229762 | 0,036791 |
| Fe | 41 | 1,14831 | 0,59720 | 0,261000 | 9,55290 | 1,683704 | 0,262950 |
| Ni | 41 | 0,00040 | 0,00000 | 0,000000 | 0,01000 | 0,001692 | 0,000267 |
| Pb | 41 | 0,01084 | 0,00680 | 0,000000 | 0,05830 | 0,014137 | 0,002208 |
| Zn | 41 | 12,28730 | 10,06250 | 3,296000 | 35,76900 | 6,939075 | 1,083701 |

4.6. Zawartość metali i MDA a parametry antropometryczne noworodka i masa łożyska

Aby ocenić korelacje metali, z masą łożyska, długością ciała, obwodem głowy, obwodem klatki piersiowej i masą noworodka, dokonano kolejnych analiz grupy 99 noworodków. Z badania wyłączono jednego z noworodków. Dziecko ze względu na liczne wady rozwojowe (zarośnięcie przełyku, Tetralogia Fallota, zwężenie i zarośnięcie odbytu bez przetoki, agnezja nerki i ektopia nerki prawej, wada kręgosłupa na wysokości Th 9) zaraz po urodzeniu, celem dalszego leczenia operacyjnego, przekazano do Instytutu Pediatrii. U tego noworodka oceniono masę urodzeniową, natomiast nie wykonano pozostałych pomiarów biometrycznych ciała. W grupie tej nie znaleziono istotnych statystycznie zależności między wiekiem matki, jej indeksem BMI, masą łożyska, długością ciała, obwodem głowy, obwodem klatki piersiowej i masą noworodka, a badanymi metalami i MDA (MDA, Al, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) (Tabela 16 i 17). Badane parametry nie korelowały istotnie ze sobą.

Tabela 16. Korelacja między masą łożyska oraz długością ciała, obwodu głowy, klatki piersiowej i masą noworodka a zawartością metali i MDA w mleku matki (n=90).

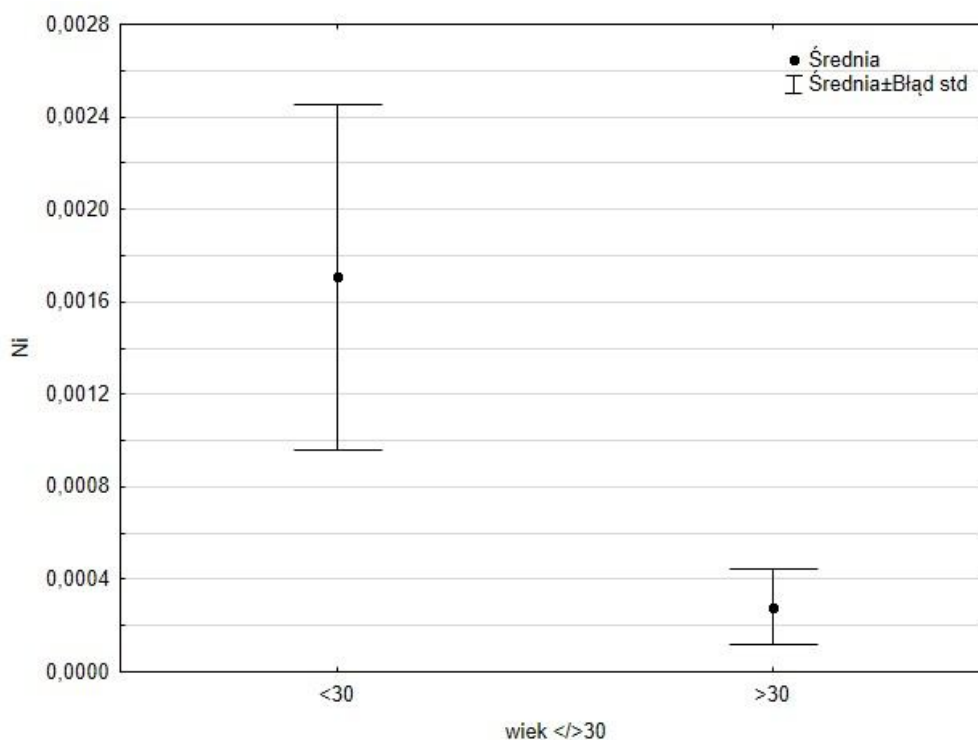
| Rodzaj pierwiastka | Masa łożyska | Długość ciała | Obwód głowy | Obwód klatki | Masa noworodka |
|--------------------|--------------|---------------|-------------|--------------|----------------|
| MDA | -0,03 | 0,02 | 0,11 | 0,12 | 0,11 |
| | p=0,81 | p=0,83 | p=0,288 | p=0,28 | p=0,29 |
| Al | 0,18 | 0,10 | 0,1731 | 0,20 | 0,20 |
| | p=0,10 | p=0,37 | p=0,103 | p=0,06 | p=0,06 |
| Cu | 0,02 | -0,05 | -0,0453 | -0,01 | -0,02 |
| | p=0,85 | p=0,62 | p=0,672 | p=0,91 | p=0,86 |
| Fe | 0,11 | 0,01 | 0,1698 | 0,12 | 0,16 |
| | p=0,29 | p=0,91 | p=0,110 | p=0,25 | p=0,13 |
| Ni | -0,03 | -0,02 | 0,0316 | 0,07 | 0,01 |
| | p=0,80 | p=0,83 | p=0,768 | p=0,50 | p=0,92 |
| Pb | -0,13 | 0,002 | 0,0031 | -0,07 | -0,03 |
| | p=0,21 | p=0,98 | p=0,977 | p=0,49 | p=0,80 |
| Zn | -0,04 | 0,02 | -0,02 | 0,03 | 0,02 |
| | p=0,71 | p=0,84 | p=0,884 | p=0,81 | p=0,87 |

Tabela 17. Korelacja między wiekiem matki, BMI, a zawartością metali i MDA w mleku matki (n=90).

| Rodzaj pierwiastka | Wiek matki | BMI |
|--------------------|------------|--------|
| MDA | -0,03 | 0,16 |
| | p=0,77 | p=0,13 |
| Al | -0,04 | 0,17 |
| | p=0,70 | p=0,12 |
| Cu | -0,13 | -0,07 |
| | p=0,22 | p=0,54 |
| Fe | -0,001 | 0,07 |
| | p=0,99 | p=0,53 |
| Ni | -0,10 | 0,04 |
| | p=0,34 | p=0,70 |
| Pb | -0,11 | 0,17 |
| | p=0,31 | p=0,11 |
| Zn | 0,09 | 0,02 |
| | p=0,39 | p=0,89 |

4.7. Wpływ wieku na zawartość metali i MDA

Stwierdzono, na podstawie testu U Manna-Whitneya, że wiek matki (wiek<30 n=31; wiek>30 n=69) miał istotny statystycznie wpływ na zawartość niklu(Ni) w mleku matki (Z=2,13; p=0,03), a jego stężenie było o rząd wielkości wyższy u kobiet poniżej 30 roku życia (średnia wynosiła 0,002 mg/L) niż u kobiet powyżej 30 roku życia (średnia wynosiła 0,0003mg/L) (Ryc. 9). Natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych dla pozostałych metali i MDA (MDA p=0,82; Al p=0,86; Cu p=0,49; Fe p=0,54; Pb p=0,56; Zn p=0,52) (Tabela 17).



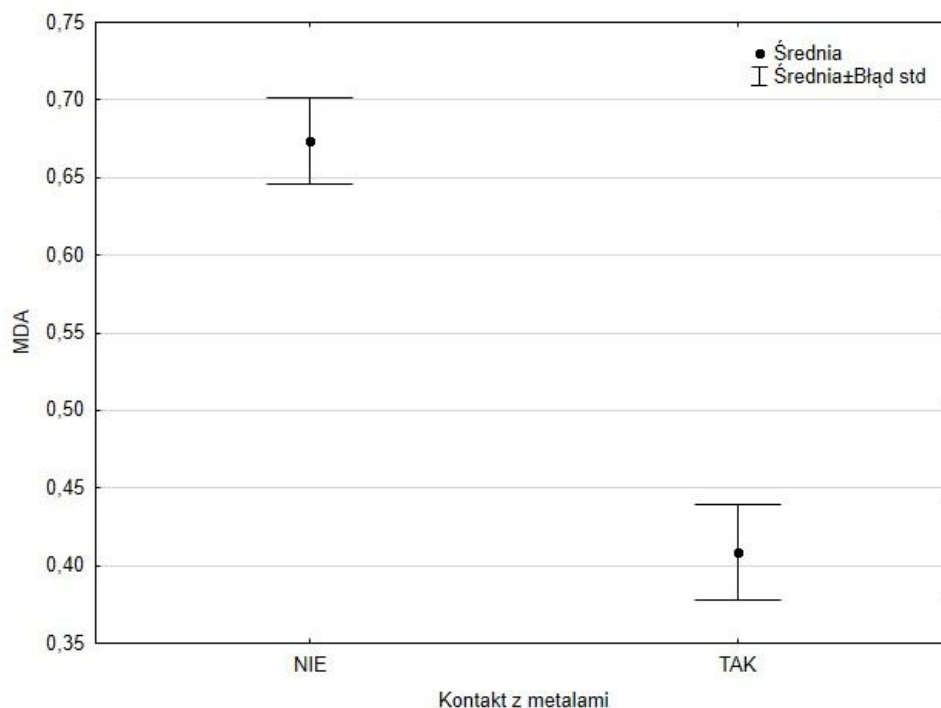
Ryc.14. Średnia i błąd standardowy zawartości niklu w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na wiek, poniżej 30 roku życia (<30) i powyżej 30 roku życia (>30).

4.8. Wpływ miejsca zamieszkania na stężenia metali i MDA

Miejsce zamieszkania może mieć istotny wpływ na stężenie metali w pokarmie kobiecym, spośród badanych pacjentek wyłoniono dwie grupy. Tereny wiejskie zamieszkiwały 24 kobiety. Zdecydowanie więcej było pacjentek mieszkających w mieście bo aż 76. Nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych między zamieszkaniem (wieś n=24; miasto n=76), a zawartością metali i MDA w mleku matki (MDA p=0,58; Al p=0,97; Cu p=0,89; Fe p=0,53; Ni p=0,74; Pb p=0,18; Zn p=0,41) (Tabela 19).

4.9. Wpływ kontaktu z metalami na ich stężenia w mleku matki oraz zawartość MDA

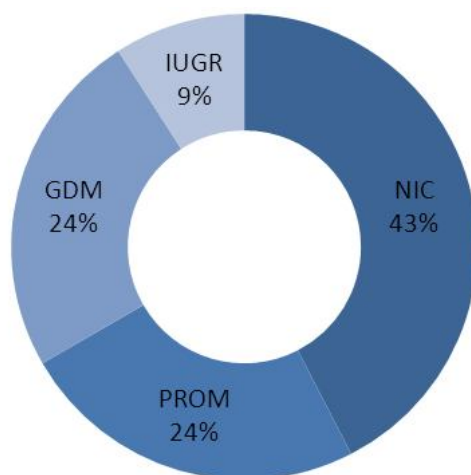
W badanej grupie osób (n=100) 5 kobiet miało kontakt z metalami. Na podstawie testu U Manna-Whitneya stwierdzono, że kontakt z metalami miał istotny statystycznie wpływ na zawartość MDA w mleku matki (Z=2,40; p=0,02) (Ryc. 8). Natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych dla pozostałych metali (Al p=0,28; Cu p=0,66; Fe p=0,94; Ni p=0,46; Pb p=0,55; Zn p=0,74).



Ryc. 15. Średnia i błąd standardowy zawartości MDA w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na osoby mające kontakt z metalami (TAK) i nie mające kontaktu z metalami (NIE).

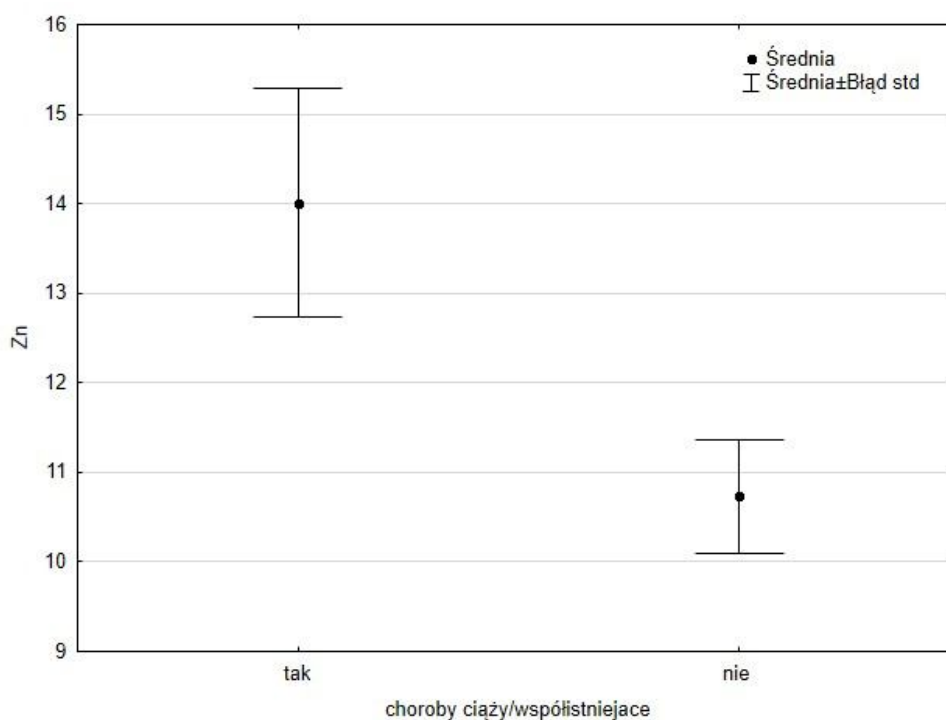
4.10. Choroby wikłające ciążę a stężenia badanych pierwiastków i MDA

U 35% badanych kobiet zaobserwowano wystąpienie różnego typu powikłań ciążowych. Najczęściej spotykanymi były: cukrzyca ciążowa (GDM) n=8, przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM)n=8, wewnątrzmaciczne ograniczenia wzrostu płodu (IUGR) n=3, nadciśnienie ciążowe (NIC) n=14. Procentowy udział pacjentek ww. grupie przedstawia rycina nr.16. Dokonując szczegółowej analizy kobiet, u których ciąża miała charakter powikłany chorobami współistniejącymi zaobserwowano ciekawe korelacje.



Rycina 16. Procentowe zestawienie pacjentek w grupie 35 kobiet u których ciąża była powikłana chorobami współistniejącym: NIC,PROM,GDM,IUGR.

Porównując zawartość metali w mleku matki u kobiet, które przechodziły choroby w trakcie trwania ciąży (n=35) z kobietami, które nie miały ww. powikłań (n=65) odnotowano różnice istotne statystycznie dla cynku(Zn) ($Z=2,17$; $p=0,03$) (Ryc. 5). Wyższą średnią zawartość cynku(Zn) notowano u kobiet, które przechodziły ww. choroby (14,01 mg/L) niż u kobiet zdrowych (10,73 mg/L). Dla pozostałych metali i MDA parametr ten nie był istotny (MDA $p=0,64$; Al $p=0,17$; Cu $p=0,17$; Fe $p=0,74$; Ni $p=0,77$; Pb $p=0,09$) (Tabela 18 i 20).



Ryc. 17. Średnia i błąd standardowy zawartości cynku w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na przebycie chorób (tak) i niechorowanie (nie).

- **Analiza stężeń metali i MDA u pacjentek z cukrzycą (GDM)**

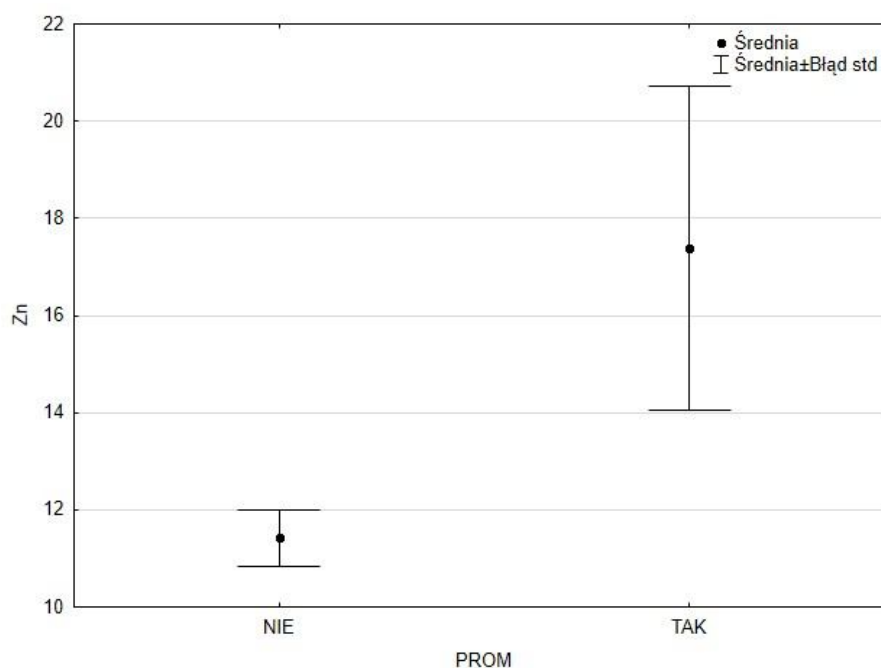
Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki u kobiet chorych na cukrzycę (n=8) z kobietami zdrowymi (n=92) nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (MDA p=0,50; Al p=0,80; Cu p=0,89; Fe p=0,54; Ni p=0,87; Pb p=0,74; Zn p=0,34) (Tabela 18).

- **Analiza stężeń metali i MDA u pacjentek z nadciśnieniem tętniczym (NIC)**

Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki u kobiet chorych na nadciśnienie (n=14) z kobietami zdrowymi (n=86) nie odnotowano istotnych różnic statystycznych (MDA p=0,65; Al p=0,56; Cu p=0,35; Fe p=0,66; Ni p=0,65; Pb p=0,10; Zn p=0,34) (Tabela 18).

- **Analiza stężeń metali i MDA u pacjentek z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (PROM)**

Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki u kobiet, u których nastąpiło przedwczesne pęknięcie błon płodowych (n=8) z kobietami, u których to nie wystąpiło (n=92) różnicę istotną statystycznie zaobserwowano dla cynku(Zn) ($Z=-1,96$; $p=0,049$) (Ryc. 6). U matek, u których nie pękły przedwcześnie błony płodowe średnia zawartość cynku(Zn) była niższa (11,42 mg/L) niż u kobiet, u których nastąpiło przedwczesne pęknięcie (17,39 mg/L). Dla pozostałych metali i MDA nie odnotowano istotnych różnic statystycznych (MDA p=0,78; Al p=0,40; Cu p=0,46; Fe p=0,88; Ni p=0,65; Pb p=0,78) (Tabela 18).



Ryc. 18. Średnia i błąd standardowy zawartości cynku w mleku matki z podziałem na grupy ze względu na normalne (nie) i przedwczesne pęknięcie błon płodowych (tak).

- **Analiza stężeń metali i MDA u pacjentek z hipotrofią płodu (IUGR)**

Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki u kobiet u których odnotowano hipotrofię płodu (n=3) z kobietami u których nie zaobserwowano hipotrofii płodu (n=97) nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (MDA p=0,37; Al p=0,44; Cu p=0,64; Fe p=0,53; Ni p=0,57; Pb p=0,16; Zn p=0,66) (Tabela 18).

Tabela 18. Wyniki testu U Manna-Whitneya ze względu na przebyte choroby w trakcie ciąży (GDM – cukrzyca, NIC – nadciśnienie, PROM – przedwczesne pęknięcie błon płodowych, IUGR – hipotrofia płodu) a zawartość metali i MDA w mleku matki.

| Rodzaj pierwiastka | Choroby ciąży | | | | | | | |
|--------------------|---------------|-------|---------|-------|---------------|--------------|---------|-------|
| | GDM | | NIC | | PROM | | IUGR | |
| | Z popr. | p | Z popr. | p | Z popr. | p | Z popr. | p |
| MDA | 0,667 | 0,505 | -0,452 | 0,651 | 0,273 | 0,785 | -0,879 | 0,379 |
| Al | -0,248 | 0,804 | 0,581 | 0,561 | -0,845 | 0,398 | -0,768 | 0,443 |
| Cu | 0,138 | 0,890 | 0,940 | 0,347 | -0,747 | 0,455 | 0,468 | 0,640 |
| Fe | 0,610 | 0,542 | 0,437 | 0,662 | -0,148 | 0,883 | -0,623 | 0,534 |
| Ni | -0,160 | 0,873 | -0,451 | 0,652 | -0,282 | 0,778 | -0,566 | 0,571 |
| Pb | 0,330 | 0,741 | 1,638 | 0,101 | -0,047 | 0,962 | 1,403 | 0,161 |
| Zn | -0,959 | 0,337 | 0,949 | 0,343 | -1,963 | 0,050 | -0,445 | 0,657 |

4.11. Wpływ metali i MDA na masę urodzeniową noworodka (poniżej 2500 g <2500, powyżej 2500 g >2500)

W następnej części badań dokonano oceny masy urodzeniowej noworodków.

Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki z masą urodzeniową noworodków poniżej 2500 g (n=9) i powyżej 2500 g (n=91) nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (MDA p=0,84; Al p=0,52; Cu p=0,78; Fe p=0,24; Ni p=0,94; Pb p=0,92; Zn p=0,83) (Tabela 20).

4.12. Wpływ metali i MDA na tydzień ukończenia ciąży (poród przed 37 i po 37 tygodniu ciąży)

Porównując zawartość metali i MDA w mleku matki z tygodniem urodzenia dziecka (przed 37 tygodniem, n=10 i po 37 tygodniu ciąży, n=90) nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (MDA p=0,63; Al p=0,63; Cu p=0,84; Fe p=0,31; Ni p=0,30; Pb p=0,94; Zn p=0,95) (Tabela 20).

Tabela 19. Wyniki testu U Manna-Whitneya wg podziałów na grupy (ze względu na wiek, zamieszkanie, palenie papierosów) a zawartość metali i MDA w mleku matki.

| Rodzaj pierwiastka | Wiek 30</>30 | | Zamieszkanie (wieś/miasto) | | Palenie | |
|--------------------|-----------------|-------|-------------------------------|-------|------------|-------|
| | Z popr. | p | Z popr. | p | Z popr. | p |
| MDA | 0,223 | 0,823 | -0,549 | 0,583 | -0,338 | 0,736 |
| Al | 0,175 | 0,861 | -0,040 | 0,968 | 1,129 | 0,259 |
| Cu | 0,694 | 0,487 | 0,138 | 0,890 | 2,622 | 0,009 |
| Fe | 0,615 | 0,539 | -0,625 | 0,532 | -0,039 | 0,969 |
| Ni | 2,128 | 0,033 | -0,337 | 0,737 | -2,775 | 0,006 |
| Pb | 0,589 | 0,556 | 1,344 | 0,179 | -1,485 | 0,138 |
| Zn | 0,648 | 0,517 | 0,827 | 0,408 | 2,058 | 0,040 |

Tabela 20. Wyniki testu U Manna-Whitneya wg podziałów na grupy (ze względu na przebyte choroby w trakcie ciąży masę noworodków i tydzień urodzenia) a zawartość metali i MDA w mleku matki.

| Rodzaj pierwiastka | Choroby ciąży | | Masa noworodków | | Tydzień urodzenia (przed/po 37 tyg.) | |
|--------------------|---------------|-------|-----------------|-------|---|-------|
| | Z popr. | p | Z popr. | p | Z popr. | p |
| MDA | - | 0,642 | -0,205 | 0,838 | -0,489 | 0,625 |
| Al | 1,380 | 0,168 | -0,638 | 0,523 | -0,488 | 0,625 |
| Cu | 1,376 | 0,169 | 0,279 | 0,780 | 0,205 | 0,838 |
| Fe | 0,326 | 0,744 | -1,175 | 0,240 | -1,016 | 0,310 |
| Ni | 0,289 | 0,772 | 0,081 | 0,935 | -1,036 | 0,300 |
| Pb | 1,688 | 0,091 | 0,102 | 0,919 | 0,079 | 0,937 |
| Zn | 2,170 | 0,030 | 0,217 | 0,828 | 0,063 | 0,950 |

4.13. Zawartość metali i MDA, a rodzaj diety matki (tradycyjna, wegetariańska, wegańska, inna)

Ocenie i analizie poddano dietę badanych kobiet. Wśród 100 kobiet najczęściej deklarowaną dietą była dieta tradycyjna n=89, następnie wegetariańska n=6, wegańska n=3 oraz inna, którą deklarowały tylko 2 pacjentki n=2.

Następnie przeanalizowano wpływ diety (tradycyjnej, wegetariańskiej, wegańskiej, innej; odpowiednio n= 89, n= 6, n=3, n=2) na zawartość metali i MDA w mleku matki. Żaden z badanych metali nie różnił się istotnie statystycznie ze względu na dietę (Tabela 21).

Tabela 21. Wpływ diety (podzielonej na tradycyjną, wegetariańską, wegańską i inne) na zawartość metali i MDA w mleku matki (test Kruskala-Wallisa: 3, n= 100).

| Rodzaj pierwiastka | H | p |
|--------------------|-------|-------|
| MDA | 2,077 | 0,557 |
| Al | 3,301 | 0,348 |
| Cu | 2,550 | 0,466 |
| Fe | 1,766 | 0,622 |
| Ni | 0,771 | 0,856 |
| Pb | 1,848 | 0,605 |
| Zn | 7,743 | 0,052 |

- **Zawartość metali, a częstotliwość spożywania warzyw i owoców, mięsa oraz ryb i owoców morza przez matkę**

Również częstotliwość spożywania (2-3 razy dziennie, raz dziennie, 2-3 razy w tygodniu, raz w tygodniu, rzadko, wcale) warzyw i owoców (odpowiednio n=57, n=31, n=9, n=2, n=1, n=0), mięsa (odpowiednio n=25, n=37, n=28, n=8, n=0, n=2) oraz ryb i owoców morza (odpowiednio n=1, n=0, n=16, n=45, n=36, n=2) nie wykazała istotnych różnic w zawartości metali i MDA w mleku matki (Tabela 22).

Tabela 22. Wpływ częstotliwości spożywania warzyw i owoców, mięsa oraz ryb i owoców morza na zawartość metali i MDA w mleku matki (test Kruskala-Wallis: 4, n= ~100).

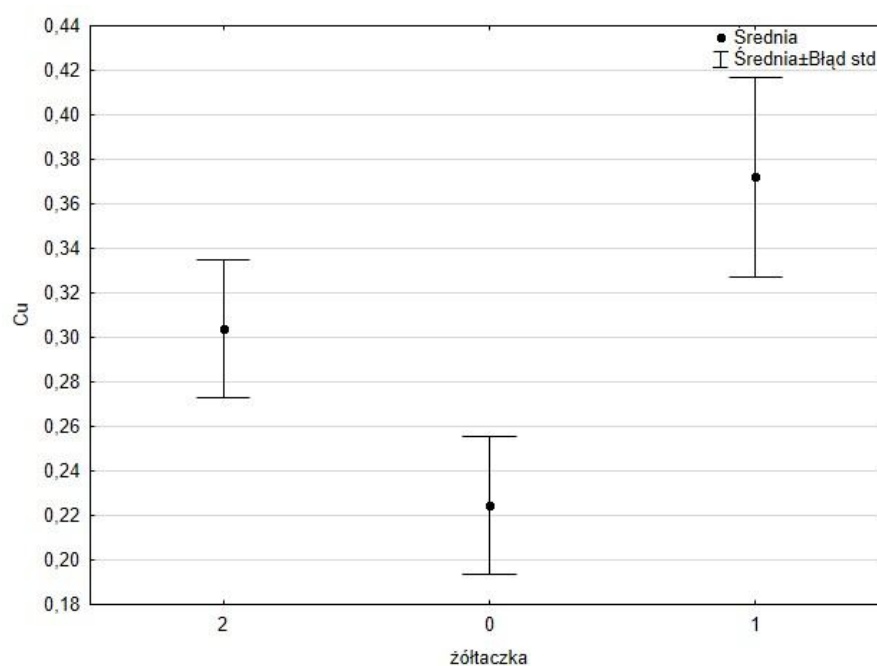
| | Warzywa i owoce | | Mięso | | Ryby i owoce morza | |
|--------------------|-----------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|
| Rodzaj pierwiastka | H | p | H | p | H | p |
| MDA | 4,841 | 0,304 | 1,095 | 0,895 | 5,520 | 0,238 |
| Al | 5,707 | 0,222 | 0,765 | 0,943 | 2,840 | 0,585 |
| Cu | 7,394 | 0,117 | 2,803 | 0,591 | 5,438 | 0,245 |
| Fe | 5,415 | 0,247 | 4,964 | 0,291 | 2,731 | 0,604 |
| Ni | 2,886 | 0,577 | 1,903 | 0,754 | 4,728 | 0,316 |
| Pb | 5,125 | 0,275 | 2,809 | 0,590 | 7,049 | 0,133 |
| Zn | 1,060 | 0,901 | 4,511 | 0,341 | 5,550 | 0,235 |

4.14. Zawartość metali i MDA a występowanie żółtaczki u dziecka

Ocenie i analizie poddano 99 noworodków. Nie włączono do badań jednego z noworodków ze względu na przekazanie dziecka do Instytutu Pediatrii (zarośnięcie przelyku, Tetralogia Fallota, zwężenie i zarośnięcie odbytu bez przetoki, agnezja nerki i ektopia nerki prawej, wada kręgosłupa na wysokości Th 9). Noworodki podzielono na trzy grupy. Przydział do grupy był zależny od stopnia nasilenia żółtaczki. Grupę 0 (n=35), stanowiły dzieci u których nie zaobserwowano żółtaczki. Do grupy 1 (n=37) włączono dzieci z rozpoczynającą się żółtaczką - poziom bilirubiny nie był oznaczany z krwi dziecka, a diagnozę postawiono na podstawie wizualnej oceny stopnia zażółcenia skóry. Ocena ta została dokonana przy pomocy schematu LI Kramera. Grupę 2 (n=27), stanowiły noworodki u których rozpoczęto naświetlanie – fototerapię łożeczkową. W tej grupie zawartość bilirubiny oznaczonej z krwi żyłnej była powyżej 10mg/dl, średnia 12,85 (mediana 13,54) przedział (10,67-19,14). Oznaczenia bilirubiny dokonywano rutynowo u każdego noworodka w przypadku oznaczeń wykonywanych przy pomocy miernika przezskórnego, przekraczających poziom 10-12 mg/dl. Analizując korelacje między zawartością metali w mleku matki, a występowaniem żółtaczki u dziecka (0, 1, 2, odpowiednio n=35, n=37, n=27) (Tabela 23), zaobserwowano tylko różnice w zawartości miedzi między grupą 0 a 1 (p=0,01) (Ryc. 19). Średnie stężenie miedzi(Cu) w mleku matki a żółtaczką 0 wynosiło 0,22 mg/L, z żółtaczką 1 – 0,37 mg/L, a z żółtaczką 2 – 0,30 mg/L.

Tabela 23. Występowanie żółtaczki u dziecka a zawartość metali i MDA w mleku matki (test Kruskala-Wallis: 2, $n = \sim 99$).

| Rodzaj pierwiastka | Żółtaczka | |
|--------------------|-----------|--------|
| | H | p |
| MDA | 0,959 | 0,619 |
| Al | 0,361 | 0,835 |
| Cu | 9,162 | 0,0102 |
| Fe | 3,243 | 0,200 |
| Ni | 0,103 | 0,950 |
| Pb | 1,779 | 0,411 |
| Zn | 3,844 | 0,146 |



Ryc. 19. Średnia i błąd standardowy zawartości miedzi w mleku matki a występowaniem żółtaczki u dziecka.

5. Dyskusja

Środowiskowe zagrożenie ze strony metali stanowi ważny problem z punktu widzenia zdrowia człowieka. Negatywne oddziaływanie zanieczyszczeń na organizmy żywe: rośliny, zwierzęta i człowieka interesował naukowców od bardzo dawna, aczkolwiek intensywny rozwój tych badań obserwujemy na szeroką skalę dopiero od połowy ubiegłego wieku. Związane jest to z szeroko pojętą antropopresją, która przejawia się gwałtowną industrializacją, rozwojem miast, w tym dużych aglomeracji miejskich i wzrostem transportu, często przy całkowitym braku troski o środowisko naturalne.

Niniejsza praca miała na celu przedstawić wpływ czynników środowiskowych na zawartość wybranych metali w pokarmie naturalnym, w początkowym okresie laktacji. W pracy przedstawiono wyniki badań nad występowaniem metali w pokarmie kobiecym. Wybór różnych czynników środowiskowych, w których dokonywano badań, a w szczególności oceny wpływu zanieczyszczenia powietrza oraz sposobu odżywiania wydaje się być zasadny. Zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego metalami jest uważane za jedno z najpoważniejszych zagrożeń środowiska. Nadmierna obecność metali w powietrzu negatywnie oddziałuje na wszystkie elementy środowiska oraz stwarza niebezpieczeństwo dla zdrowia, a niekiedy nawet życia ludzi. Udowodniono działanie kancerogenne, mutagenne i teratogenne metali [83]. Łożysko oraz gruczoł mleczny, u ssaków stanowią dość skuteczną barierę przed większością substancji chemicznych, jednak na podstawie dotychczas przeprowadzonych wielu badań wiadomo, że pewne metale takie jak: Pb, Cd, Ni, Al, Hg przechodzą przez barierę łożyskową i gruczoł piersiowy. Akumulując się w tkankach płodu, a następnie noworodka, mogą powodować poważne zagrożenie dla rozwijającego się organizmu [83].

Karmienie piersią jest bardzo ważne dla zdrowia i rozwoju dziecka. Dzięki żywieniu naturalnemu w pierwszych miesiącach życia dziecko otrzymuje wszystkie niezbędne składniki pokarmowe w optymalnej ilości, co gwarantuje mu harmonijny wzrost i rozwój. Z licznych badań wynika również, że dzieci karmione naturalnie są bardziej odporne, a ich rozwój intelektualny i możliwości poznawcze są wyższe niż przy jakiegokolwiek innej diecie we wczesnym dzieciństwie [1-4]. Jest najtańszym, najzdrowszym, a jednocześnie najwygodniejszym sposobem karmienia, idealnie dostosowanym do potrzeb małego organizmu. Oprócz niekwestionowanych zalet karmienia piersią, pokarm kobiecy zawiera również pewne ilości toksycznych substancji przenikających do organizmu matki z zanieczyszczonego środowiska. Drogą tą dostarczane są również metale.

Większość badań dotyczących negatywnego wpływu różnych metali w okresie prenatalnym i postnatalnym była, i jest prowadzona ze względów etycznych, na zwierzętach, głównie

gryzoniach. Jednak wyniki otrzymane dla tych ssaków nie mogą być bezpośrednio przenoszone na człowieka. Narażenie może być podobne, jednak czas ekspozycji znacznie inny, bo zdecydowanie dłuższy u człowieka w porównaniu do myszy czy szczurów. W Polsce przez długi okres czasu nie wiązało się zdrowia człowieka z zanieczyszczeniem środowiska, dopiero wejście Polski do Unii Europejskiej wymusiło na władzach administracyjnych zainteresowanie ww. problemem, oraz zwrócenie uwagi na negatywny wpływ różnych źródeł emisji na stan środowiska i człowieka. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska prezentuje wyniki pomiarów stężeń pyłu zawieszonego w trybie on-line poprzez „Portal Jakości Powietrza” oraz poprzez aplikację na urządzenia mobilne „Jakość powietrza w Polsce”. Dane aktualizowane są co godzinę, i są dostępne wraz z informacją o potencjalnym wpływie stężeń pyłu zawieszonego na zdrowie ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem grup ludzi wrażliwych (dzieci, osoby chore, kobiety w ciąży, osoby starsze).

Badania nad zależnością pomiędzy śmiertelnością, czy zachorowalnością na choroby układu oddechowego a zanieczyszczeniami atmosferycznymi, prowadzone są już od 30 lat [224]. Na choroby spowodowane zanieczyszczeniem powietrza w Unii Europejskiej umiera rocznie ok. 350 tys. osób. Nowe regulacje zatwierdzone przez Parlament Europejski w 2007 roku dotyczące czystości powietrza w Unii Europejskiej nakładają silne restrykcje na przemysł i transport. W celu zbadania wielkości zanieczyszczenia powietrza tworzone są narodowe sieci monitoringu środowiska. Do rutynowo mierzonych zanieczyszczeń powietrza należą: tlenek węgla (CO), dwutlenek węgla (CO₂), zanieczyszczenia pyłowe o średnicy 10 µm (PM₁₀) i 2,5 µm (PM_{2,5}), dwutlenek azotu (NO₂), dwutlenek siarki (SO₂), a często także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). To właśnie ich stężenie w powietrzu przekracza często dopuszczalne normy, zwłaszcza w dużych miastach. One też najczęściej stanowią punkt odniesienia do badań epidemiologicznych.

Badaniom poddawana jest także emisja metali do powietrza atmosferycznego. Jest ona stosunkowo zróżnicowana, bowiem największy ładunek dotyczy Zn – 1520 mg/rok, mniejsze ładunki są charakterystyczne dla Pb – 573 mg/rok, Cu – 367 mg/rok i Ni – 178 mg/rok [225]. Emisja As, Cr i Cd utrzymuje się na poziomie o rząd niższym, As – 44,9 mg/rok, Cr – 49,3 mg/rok i Cd – 39,4 mg/rok [225]. Emisja Hg w 2008 roku osiągnęła 15,7 mg/rok [226]. Decydujący wpływ na wartość emisji większości metali mają procesy przemysłowe (procesy produkcyjne oraz procesy spalania w przemyśle): Cu – 69,6%, Pb – 66,4%, As – 52,3% oraz Cr – 44,2% [225]. Wielkość emisji związana jest również z określonym rejonem geograficznym.

W niniejszej pracy badania oparto na oznaczeniu stężeń wybranych metali (Al, Cu, Fe, Ni, Pb i Zn oraz MDA) w pokarmie kobiecym. Badania wykonano w początkowym etapie

laktacji (3-6 doba po porodzie) i wykazano różne wielkości stężeń ww. metali. Średnie stężenia wynosiły: Zn- 11,885mg/L, Fe- 0,994mg/L, Cu- 0,308mg/L, Al - 0,091mg/L, Pb- 0,008mg/L i Ni- 0.001mg/L. Na uwagę zasługuje również fakt, że oznaczeniu poddano także Cd. Jednak ze względu na to, że w każdej próbce wymieniony pierwiastek był poniżej detekcji, nie był on analizowany w niniejszej pracy. Fakt ten można tłumaczyć tym, że emisja metali na terenie Polski nie rozkłada się równomiernie. Największe zagrożenie zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego metalami występuje w rejonach lokalizacji emitorów przemysłowych. Województwo śląskie przoduje w emisji Cd (16,9%), Cr (40,7%) i Hg (17,4%), natomiast województwo dolnośląskie w emisji As (38,4%), Cu (55,1%), Pb (31,4%) i Zn (40,4%) [225]. Warto podkreślić, że tylko w przypadku Ni, jego emisja na obszarze województwa mazowieckiego (16,3%) jest większa niż na obszarze województwa śląskiego (14,0%). Z raportu Inspekcji Ochrony Środowiska wynika, że potencjalnie najniższe dawki Cd wchłaniane są przez mieszkańców Aglomeracji Poznańskiej (obszar gdzie dokonano badań), Lubelskiej i miasta Olsztyna (średnie stężenia dla Poznania: 0.16-0,31ng/m³) [225], co może przekładać się na brak oznaczeń tego metalu w badanych próbkach mleka kobiecego. Istotne również jest to, że zgodnie z doniesieniami literaturowymi metale takie jak Cd i Ni bardzo dobrze wchłaniają się przez układ oddechowy [80,227]. Wchłanianie Cd przez płuca (u ludzi) jest kilkakrotnie większe (ok. 80%) niż przez przewód pokarmowy (3-7%, ale może się zwiększyć nawet do 20% przy niskiej zawartości w diecie Ca, Fe lub białek) [80,227]. Na uwagę zasługuje również fakt, że o poziomie emisji Cd i Ni w największym stopniu decydują procesy spalania w sektorze komunalnym i mieszkaniowym (odpowiednio: 62,5% i 45,0%). Badanie wykonano w okresie letnim, co oznacza brak emisji spalin z lokalnych kotłowni. W badaniach epidemiologicznych skupiających się na problematyce zanieczyszczeń powietrza największą uwagę przykładana się do analizy współczynników śmiertelności w schorzeniach dróg oddechowych, w dwóch grupach społecznych, najbardziej podatnych na szkodliwy wpływ toksyn środowiskowych, czyli u dzieci i osób starszych. Dzieci wdychają ok. 50% więcej powietrza na kilogram masy ciała niż osoba dorosła. Ponadto układ oddechowy u dzieci jest niedojrzały morfologicznie i czynnościowo, a odporność słabsza. Dlatego dzieci są bardziej wrażliwe na zanieczyszczenia powietrza niż dorośli [80].

W niniejszej pracy nie udowodniono zależności między stężeniami wybranych metali i MDA w mleku matek a masą urodzeniową (< 2500g, > 2500g), masą łożyska, długością ciała, obwodem głowy, obwodem klatki piersiowej noworodków. Takich zależności nie znaleziono również przy podziale pacjentek ze względu na tydzień ciąży (poród przed 37 i po 37 tygodniu ciąży) oraz sposobem ukończenia porodu – samoistny, zabiegowy, cięcie cesarskie. Ww. zależności i wpływu metali oraz MDA na masę urodzeniową, masę łożyska, długość ciała, obwód głowy, obwód klatki piersiowej noworodków należy wobec powyższego szukać

w okresie ciąży. Badania przeprowadzone przez wielu badaczy tzn. epidemiologia i biologia reprodukcyjna dostarczają wielu dowodów wskazujących na większą wrażliwość płodów a następnie noworodków na toksyny środowiskowe w porównaniu z osobami dorosłymi. Zakładają oni, że okres ciąży wydaje się być najbardziej wrażliwym okresem w życiu rozwijającego się organizmu, nie tylko ze względu na szybkość proliferujących komórek, ale także na zmiany w metabolizmie hormonalnym. Praktycznie metale nie ulegają metabolizmowi, a jedyną drogą ich eliminacji jest transport przez łożysko do krążenia matki lub wydzielanie do wód płodowych. Dlatego biologiczne okresy półtrwania ksenobiotyków w krążeniu płodu ulegają wydłużeniu, a stężenia ich u płodu mogą być wyższe niż w organizmie matki [117]. Dla przykładu hemoglobina płodowa ma większe powinowactwo do Pb niż hemoglobina osób dorosłych. Uważa się, że stężenia Pb we krwi pępowinowej przekraczające $0,15\mu\text{mol/L}$ wywołują zmiany w układzie nerwowym płodu. Im większe stężenie Pb, tym wolniejszy rozwój wewnątrzmaciczny dziecka [221]. Axelrod w swoim badaniu wykazał, że okres, w jakim płód został narażony na zanieczyszczenia, jest często ważniejszy niż całkowita jego dawka. Przebywanie matek w środowisku atmosferycznym o wysokim stężeniu pyłów zawieszonych (PM_{10} i $\text{PM}_{2,5}$, WWA), oraz średnim wzrostem stężenia SO_2 , CO_2 , i NO_2 w powietrzu o $50\mu\text{g/m}^3$, w czasie pierwszego trymestru ciąży może zwiększyć ryzyko porodu przedwczesnego o 15%-18%, wzrasta także ryzyko niskiej masy urodzeniowej odpowiednio o 6% i 7% [228]. Stwierdzono również, że ekspozycja na zanieczyszczone powietrze (stężenia CO_2 w atmosferze $>5,5\text{ppm}$) w ostatnim trymestrze ciąży, może oddziaływać na końcową masę urodzeniową, zwiększając ryzyko urodzenia dziecka z niską masą urodzeniową ($<2500\text{g}$) o 20%, po uwzględnieniu czynników zakłócających - płci noworodków, poziomu opieki prenatalnej, wieku, wykształcenia i narodowości matki, pomiaru zanieczyszczeń [228]. Bezpośrednie i krótkoterminowe działanie zanieczyszczeń powietrza na funkcje reprodukcyjne kobiet zaobserwowano także wśród pacjentek poddawanych zabiegowi *in vitro*. Pięciokrotnie wyższe ryzyko niedonoszenia tak wywołanej ciąży występowało u tych kobiet, które były narażone na wysokie stężenie pyłów zawieszonych w atmosferze w trakcie fazy folikularnej cyklu, w której następowało sztuczne zapłodnienie [229]. Również badania na zwierzętach potwierdziły zwiększone ryzyko wczesnego samoistnego poronienia lub niedonoszenia ciąży w wyniku narażenia na zanieczyszczenia powietrza, takie jak NO_2 i pyły zawieszane, będące rezerwuarem m.in. WWA [230]. WWA oraz inne związki między innymi metale (Cd, Al, Ni), występujące w środowisku zaliczane do grupy związków endokrynych odpowiedzialnych za naruszenie równowagi wydzielania wewnętrznego (EDC), które to mogą naśladować lub zmieniać działanie endogennych hormonów (mają one zdolność aktywowania receptora SXR/PXR występującego w wątrobie i jelitach, co w konsekwencji może wywołać zmianę lokalnej biodostępności syntetyzowanych w organizmie

androgenów i estrogenów) wiążąc się z ich receptorami. Przypuszcza się, że zmiany epigenetyczne wywołane ekspozycją na EDC w okresie rozwoju embrionalnego są dziedziczne, a efekty mogą być obserwowane nawet do czwartego pokolenia, które nie było narażone na działanie tych substancji [231].

Dane literaturowe dotyczące obecności metali w mleku polskich kobiet są stosunkowo niewielkie i niewystarczające. Artykuły opublikowane przez Andersona [238], Davison [239] i Rocckens [240] wskazują na istotne znaczenie problemu. Autorzy twierdzą, że w ciągu siedmiu miesięcy niemowlęta karmione piersią przyjmują średnio 1,6 mg Pb z mleka matki. Wobec tego średnia zawartość ołowiu w mleku kobiet wynosiła 0,011 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Natomiast wg. ww. autorów stężenia Fe, Zn i Cu w mleku kobiet po porodzie są związane z aktywnym mechanizmem transportu w gruczole mlecznym dla wszystkich 3 metali, natomiast nie są związane z innymi czynnikami takimi jak np. status ekonomiczny kobiet [241]. Badacze doszli wobec powyższego do wniosku, że w przypadku niemowląt karmionych piersią mleko matki jest ekspozowane na Pb (ze względu na zdolność do osiągnięcia wysokiego poziomu Pb w mleku matek nawet do 12 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) założono, że może być ono szkodliwe (dopuszczalny poziom Pb w mieszankach 0.10mg/kg, średnia w mleku krowim 0,0128 mg/kg). W większości metale z ludzkiego ciała są wydalane głównie z moczem (76%), kałem (16%) i przez pierś do mleka (8%) [221]. W badaniach które przeprowadzono tylko posiadanie amalgamatowych wypełnień zębowych przez matki miało, istotny statystycznie wpływ na zawartość Pb w mleku matek ($p=0,025$). Paradoksalnie należy podkreślić, że jego stężenia były wyższe u kobiet nieposiadających amalgamatowego wypełnienia (średnia 0,011 mg/L) niż u kobiet z wypełnieniem (średnia 0,006 mg/L). Nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych dla pozostałych metali i MDA. Również liczba wypełnień oraz czas ich posiadania nie korelowały istotnie z zawartością ww. metali w mleku matek.

Amalgamaty charakteryzują się twardością i odpornością na ściskanie oraz wyższym modułem zgięciowo-zgięciowym niż inne materiały kompozytowe (stosowane do wypełnień estetycznych) oraz mniejszym współczynnikiem rozszerzalności cieplnej. Duża wytrzymałość mechaniczna i stosunkowo mniejsza wrażliwość amalgamatów na wilgoć tłumaczy ich powszechne stosowanie jako materiał do wypełnień ubytków w zębach bocznych mlecznych i stałych [253]. Badania własne potwierdziły, że pomimo nie stosowania amalgamatów stomatologicznych z rtęcią w większości krajów Unii Europejskiej, w Polsce nadal plombuje się zęby amalgamatem (aż 45% kobiet potwierdziło że posiada takie wypełnienia). Ze względu na skład amalgamaty dzielą się na konwencjonalne z fazą gamma 2 (niskomiedziowe) i wolne od fazy gamma 2 (wysokosrebrowe, niskosrebrowe). Te pierwsze to amalgamaty srebrowo-cynowe [253]. Cząsteczki tego stopu po połączeniu się z rtęcią tworzą fazę srebrowo-rtęciową (gamma

1), a potem cynowo-ręciową (gamma 2) i srebrzo-cynową [253]. Amalgamaty wysokosrebrze wolne od fazy gamma 2 zawierają 70% srebra, 18% cyny i 12% miedzi, niskosrebrze wolne od fazy gamma 2 zawierają 60% srebra, 28% cyny i 11-13% miedzi, a wysokomiedziowe wolne od fazy gamma 2 zawierają 41-50% srebra, 27-31% cyny i 29-39% miedzi [253]. Wobec powyższego, trudno jest właściwie ustosunkować się do otrzymanych wyników ze względu na brak danych dotyczących składu amalgamatów (pod względem zawartości metali) u badanych pacjentek. Powszechnie znany jest negatywny wpływ rtęci zawartej w plombach amalgamatowych, który to nie był przedmiotem powyższych badań. Natomiast wpływ Pb na gospodarkę biopierwiastkami jest złożony. Badania nad interakcją pomiędzy Pb a Cu (występuje antagonizm) wskazują, że spożycie odpowiedniej ilości Cu minimalizuje toksyczne działanie Pb. Można wobec powyższego przyjąć, że składniki wypełnień stomatologicznych wraz z czasem i ekspozycją na różne czynniki uwalniają się pod wpływem żucia, stąd uwolniona dodatkowo z plomb Cu wyparła Pb, ponieważ metale te konkurują o miejsca wiązania białek, takich jak np. kompleks ATP-azy [133]. Inni badacze uważają, że wzrost stężenia Pb w ustroju powoduje zwiększone wydalanie Fe i Cu oraz hamowanie powstawania ceruloplazminy (Cp) [128]. Pb i Cd wykazują działanie synergistyczne, natomiast Zn jest antagonistą Pb. Wchłanianie Pb zależy od ilości w diecie innych metali i maleje przy zwiększonym spożyciu Ca. Niedobór Ca jest też przyczyną zwiększonej toksyczności Pb [124,127,128].

Analizując wyniki stężeń oznaczonych metali w mleku matek, należy stwierdzić, że przeprowadzone badanie wykazało, że zawartość metali niezbędnych Fe, Cu i Zn (średnie wartości z badań własnych Fe-0,99mg/L, Cu-0,308mg/L, Zn-11,885mg/L) kształtowała się na poziomach prawidłowych (nie różniła się znacząco od tych które podają inni badacze). Należy również zaznaczyć, że tak jak u innych badaczy nie znaleziono korelacji pomiędzy stężeniem Zn w mleku ludzkim a jego zawartością w diecie. Kwapulinski i wsp. podaje średnią wartość stężeń dla kobiet niepalących dla miasta Częstochowa, odpowiednio dla Fe-0.63µg/cm³, Cu-0.49µg/cm³ i Zn- [11.34µg/cm³ 242]. Podobne stężenia dla metali niezbędnych podaje Lawrence R.A, - Fe- 0.3 mg/L, Cu-0.25mg/L i Zn 1.2 mg/L [32]. Kowalska i wsp. zaznaczają, że mikroelementy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka w pokarmie kobiecym osiągają średnie stężenia Fe-4-15ng/mL, Cu 0.2-0.4 µg/mL, Zn 1-3 µg/mL [255]. Stwierdzono natomiast, że wiek matki powyżej 30 r.ż., miał istotny statystycznie wpływ na zawartość Ni w mleku (p=0,03), a jego stężenie było o rząd wielkości wyższe u kobiet poniżej 30 roku życia (średnia wynosiła 0,002 mg/L) niż u kobiet powyżej 30 roku życia (średnia wynosiła 0,0003mg/L). Dla pozostałych metali i MDA nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych. Porównując zawartość metali w mleku u kobiet, które przechodziły choroby w trakcie trwania ciąży (NIC,PROM,GDM,IUGR) z kobietami, które nie miały ww. powikłań

odnotowano różnice istotne statystycznie tylko dla Zn ($p=0,03$). Wyższą średnią zawartość Zn notowano u kobiet, które przechodziły ww. choroby w trakcie ciąży (14,01 mg/L) niż u kobiet zdrowych (10,73 mg/L). Dla pozostałych metali i MDA parametr ten nie był istotny. Największą istotną statystycznie różnicę ($p=0,049$) stężeń dla Zn wykazała analiza w grupie pacjentek z PROM. U matek, u których nie pękły przedwcześnie błony płodowe średnia zawartość Zn była niższa (11,42 mg/L) niż u kobiet, u których nastąpiło przedwczesne pęknięcie błon płodowych (17,39 mg/L). Dla pozostałych metali i MDA nie odnotowano istotnych różnic statystycznych. Zmiany w stężeniach Zn w mleku matek, mogą być wobec powyższego wynikiem przesunięć tkankowych związanych z wykorzystaniem tych pierwiastków do syntezy enzymów antyoksydacyjnych, których aktywność jest zmieniona w przebiegu ciąży powikłanej. Niskie stężenie Zn zwiększa występowanie autoimmunizacji i nadmiernego stanu zapalnego [151]. Badacze podają, że nawet stężenia Zn będące na granicy odpowiedniego, mogą wpływać ujemnie na funkcje odpornościowe oraz obniżać odpowiedź na szczepienia [151]. Oznacza to, że przywrócenie poziomu Zn do odpowiedniego stanu, pozwala chronić organizm przed nowotworami, infekcjami, autoimmunizacją oraz przewlekłym stanem zapalnym [151]. Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Brzozowski i Bajor, zaobserwowali oni zdecydowanie wyższe stężenie Zn w osoczu ciężarnych z ciąży powikłanej cukrzycą w stosunku do grupy kontrolnej złożonej z ciężarnych zdrowych. Różnica ta była istotna statystycznie ($p<0.01$) [254].

W przeprowadzonym badaniu, poddając ocenie wpływ zanieczyszczenia powietrza na zawartość wybranych metali w mleku kobiecym, dokonano podziału pacjentek na dwie grupy pod względem miejsca zamieszkania. W zdecydowanej większości deklarowanym przez respondentki miejscem zamieszkania było miasto Poznań, a tylko nieliczna druga grupa zamieszkiwała tereny wiejskie województwa wielkopolskiego. W badanych grupach nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic, między zamieszkaniem, a zawartością badanych metali Cu, Fe, Ni, Zn, Al, Pb oraz MDA. Wobec powyższego, można przyjąć, że ww. grupach narażenie środowiskowe było równomierne (brak kobiet zamieszkujących tereny wysoko zanieczyszczone – w pobliżu zakładów przemysłowych, hut, spalarni śmieci i innych temu podobnych emitorów, a także jednolite warunki szpitalne w okresie pobierania próbek mleka). Dla wielkości stężeń metali w mleku matek, również istotna była pora roku pobierania mleka od kobiet. Mleko pozyskiwano w okresie letnim, od lipca do października. Jak już wcześniej podawano wartości skażenia powietrza są zależne, nie tylko od stopnia emisji, położenia geograficznego, ale również od warunków meteorologicznych, takich jak brak wiatrów i mgła. Lato to również brak emisji spalin z lokalnych kotłowni oraz indywidualnych gospodarstw. Ma to przede wszystkim wpływ na „niską emisję” pyłów. Podobnej obserwacji dokonali Kwapiński J., i wsp [242], oceniając zawartość metali w mleku kobiet mieszkających na terenach

uprzemysłowionych Górnego Śląska, gdzie stężenia metali w mleku matek, nie były zależne od zamieszkiwanego miasta i szlaków komunikacyjnych, ale od ich stężenia w powietrzu. Autorzy wskazali na większą zawartość metali w powietrzu, w mieście Katowice w porównaniu do miasta Cieszyna i okolic. Uzyskane stężenia metali były badane przy pomocy różnych biologicznych testów i potwierdziły, że większe zagrożenie ze strony środowiska jest dla matek z miasta Katowice. Wykazano tym samym związek między środowiskiem zanieczyszczonym metalami, a stężeniem metali w mleku matek. Autorzy podkreślili również, że stężenia metali w mleku matek niepalących odzwierciedlają poziomy zagrożenia środowiska. Dla przykładu zawartość kadmu w mleku kobiet niepalących była 2,6 razy większa niż w powietrzu – współczynnik korelacji był wyższy niż 0,5 i dotyczył współwystępowania tego metalu w powietrzu. W przypadku miasta Katowice zebrane próbki wykazały dużą współzależność występowania pomiędzy: Pb i Zn ($p=0,88$), Pb i Cd ($p=0,66$), Pb i Ni ($p=0,56$), Zn i Cr ($p=0,82$), Zn i Ni ($p=0,88$) [242].

Wielokrotnie udowodniono, iż zanieczyszczenie metalami surowców żywnościowych, w tym też mleka, jest ściśle powiązane ze stopniem zanieczyszczenia środowiska, w jakim są one pozyskiwane [143,222,223]. Dobrzański i in. [143] wykazali, że średnia zawartość Cd była wyższa w mleku pochodzącym od zwierząt z terenu przemysłowego. Mleko krowie zawierało: 0,003 mg/kg Cd w mleku – teren uznany za czysty (Dolny Śląsk), i 0,007 mg/kg – teren przemysłowy (Górny Śląsk). Identyczne poziomy Cd odnotowano dla mleka koziego zarówno z terenu zanieczyszczonego, jak i terenu uznawanego za wolny od zanieczyszczeń [143]. Największe ilości metali, bo aż 80%, dostają się do organizmu wraz z pożywieniem przez przewód pokarmowy [220,221]. Najważniejsze ogniwo w łańcuchu żywieniowym na drodze przenikania metali ze środowiska (głównie z gleby) do organizmów zwierzęcych i ludzkich stanowią rośliny. Przedostawanie się metali do organizmu zwierząt następuje głównie drogą pokarmową, w wyniku spożywania dużej ilości paszy zawierającej metale pobrane z gleby lub zanieczyszczonej glebą. Pewną rolę odgrywa także pobieranie grudek ziemi podczas wypasu. Na obszarach o zanieczyszczonej glebie, od 9 do 80% Pb i 34–90% Ar zostaje wprowadzone do organizmu tą drogą. Ma to szczególne znaczenie u zwierząt [143], ponieważ w pewnym sensie na ilość, a tym samym stężenie metali pobranych z pożywieniem, w mleku kobiet można wpływać poprzez moderowanie swojej diety, a także przebywanie na terenach mniej skażonych. Takiej możliwości nie ma przy żywieniu dziecka mieszankami. Uznając wobec powyższego, że dieta kobiet może być istotnym modyfikatorem badanej zależności – wpływu środowiska na zawartość metali w pokarmie kobiet, poddaną ją analizie.

W badaniu wykazano, że dieta badanych kobiet nie odbiegała od średniej krajowej i dla okresu ciąży i karmienia piersią. Matki spożywały głównie dania tradycyjne (zupa warzywna,

ziemniaki, kotlet mięsny, surówka warzywna, pieczywo, wędliny, sery). Wszystkie badane kobiety posiadały w swoich tygodniowych dietach znaczny udział warzyw i owoców, a ponad połowa badanych spożywała je kilka razy dziennie. Natomiast 2-3 raz w tygodniu jadły ryby oraz mniej niż dwa razy owoce morza. Tylko 9% badanych całkowicie wykluczyła z diety mięso. W grupie tej nie znaleziono statystycznie istotnych różnic w zależności od rodzaju spożywanej diety a zawartością metali w pokarmie. Fakt ten można tłumaczyć tym, że w stosunku do badanej grupy kobiet nie było pacjentek, u których dodatkowo występowały żywieniowe czynniki ryzyka, często związane z niskim statusem socjoekonomicznym, takie jak: niska wartość kaloryczna diety, niedożywienie białkowe, niedostateczne spożycie mikrośladników antyoksydacyjnych. Takie kobiety według Kannan i wsp. są prawdopodobnie bardziej narażone na zanieczyszczenia środowiskowe [232]. Dieta może zatem wpływać na badane zależności pomiędzy poziomem zanieczyszczenia powietrza a kondycją noworodka poprzez wiele mechanizmów biologicznych, takich jak: stres oksydacyjny, reakcja zapalna tkanek, proces krzepnięcia krwi i funkcja śródbłonna związana z produkcją tlenu azotu [232].

Brak zależności od rodzaju spożywanej diety a zawartością metali w pokarmie, można tłumaczyć również tym, że w stosunku do badanej grupy kobiet dla oszacowania rzeczywistej ekspozycji na metale w żywności konieczne byłoby poznanie jeszcze kilku innych danych: stężenia szkodliwych substancji w żywności oraz poziomu konsumpcji (w określonym interwale czasowym). Dodatkowo można by oszacować faktyczną ilość szkodliwych substancji w tym metali, które zostały w organizmie. Należy przy tym zapewnić, by oszacowanie było możliwie jak najbardziej dokładne, zwłaszcza, że w niektórych produktach żywnościowych zawartość metali jest śladowa, natomiast poprzez spożycie dużych ilości może dojść do dolegliwości zdrowotnych, a w skrajnych przypadkach nawet do zatrucia lub śmierci. Bez dodatkowych analiz, szczególnie źródeł pochodzenia żywności, nie można określić przyczyn istotnych różnic pomiędzy zawartością metali, a poszczególnymi produktami. Na wchłanianie metali przez organizm wpływ ma jeszcze kilka innych czynników, których w niniejszej pracy nie uwzględniono ze względu na brak odpowiednich danych. Autorzy najczęściej podają wielkość porcji, stosowanie leków, spożywanie alkoholu i innych używek (nikotyna). Oprócz tego bierze się pod uwagę obecność kompleksów metali, ich biodostępność, interakcje z innymi związkami oraz własności chemiczne poszczególnych związków metali (sole, tlenki i inne) [233]. Inne badania dotyczące wpływu różnych czynników na przechodzenie metali do tkanek prowadzone są także na innych organizmach żywych (np. organizmy morskie). W tych badaniach wykazano, że zawartość metali w badanych tkankach zależy od temperatury, pH, rodzaju szkodliwych związków, od twardości wody, interakcji z innymi pierwiastkami i związkami [235]. Zdaniem Żukowskiej i Biziuka zdublikowana dieta dostarcza najbardziej dokładnej informacji na temat

otrzymanej dawki metali. Polega ona na dokładnej analizie żywności i używek spożywanych przez określoną populację, oraz sposobów przygotowania posiłków [234]. Wielu autorów zwraca uwagę na fakt, że różne sposoby przygotowania posiłków wpływają na różną zawartość metali i innych związków (blanszowanie, gotowanie znacznie obniża zawartość metali w żywności) [230], mycie, oczyszczanie (dotyczy szczególnie warzyw i owoców), temperatura pieczenia oraz wiele innych czynności związanych z przygotowaniem posiłków [236]. Również składniki pokarmowe takie jak: białka, błonnik, witaminy C, D, i E oraz niektóre składniki mineralne ograniczają ich przyswajalność. Dodatkowo poszczególne badane osoby różnią się między sobą, i nie są w pełni znane ich nawyki żywieniowe. Należy także uwzględnić, że okres ciąży to dla wielu kobiet moment na zmianę sposobu (dotyczącą jakości i ilości spożywanych produktów) odżywiania, a także czas na wprowadzenie wielu suplementów diety w postaci preparatów witaminowych (w ankiecie 100% kobiet deklarowało, że przyjmowały preparaty multiwitaminowe zawierające mikroelementy oraz w ramach prowadzenia programu prewencji wad cewy nerwowej kawas foliowy). Badanie budżetów gospodarstw domowych również nie było do końca poznane. Jako źródło metali należałoby uwzględnić także wodę oraz przekąski (chipsy, batoniki, słodkie napoje), i część produktów (żywność kupowana i spożywana w barach czy restauracjach) która nie jest głębiej analizowana, w związku z czym nie wiadomo, jaki był skład posiłków spożywanych poza domem.

W badaniu ocenie poddano także indeks BMI (średnia 22,92) pacjentek uważając, że niewłaściwa dieta bogata w zbyt duże spożycie tłuszczów (w tkance tłuszczowej kumulują się przede wszystkim związki o charakterze hydrofobowym, następnie podczas jej spalania są włączane w metabolizm komórkowy), oraz wysokokaloryczna, czy bogata w produkty białkowe, może wpływać na wzrost stężenia rodników tlenowych. Ponadto obecne w tłuszczach wielonienasycone kwasy tłuszczowe i cholesterol podczas obróbki cieplnej ulegają utlenieniu do rodników, nadtlenków, epoksydów kwasów tłuszczowych oraz aldehydów. One z kolei mogą zapoczątkować łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów prowadzących do powstania licznych mutagenów, promotorów i kancerogenów. W badanej grupie nie wykazano jednak istotnych statystycznie zależności pomiędzy indeksem BMI, wiekiem kobiet, rodzajem diety, a badanymi metalami oraz MDA. Dietrich i wsp. udowodnili natomiast znaczącą zależność między BMI, a stężeniem izoprostanów (markera stresu oksydacyjnego) w surowicy krwi osób palących. Jedynie u osób z wysokim BMI udowodniono wpływ suplementacji witaminą C na obniżenie stężeń izoprostanów w surowicy [249]. Helmersson i wsp. stwierdzili natomiast, że palenie papierosów jest niezależnym czynnikiem powodującym wzrost stężeń izoprostanów w płynach biologicznych bez względu na BMI [248]. Inni badacze - Richelle i wsp. udowodnili brak zależności stężeń izoprostanów w moczu od spożywanej diety [250].

W niniejszej pracy analizując korelacje między zawartością metali w mleku matek, a występowaniem żółtaczki u noworodków, zaobserwowano bardzo interesujące różnice w zawartości Cu między grupą nie mającą cech żółtaczki a noworodkami z rozpoczynającą się żółtaczką. Średnie stężenie Cu w mleku matek u dzieci bez cech żółtaczki wynosiło 0,22 mg/L, z rozpoczynającą się żółtaczką 0,37 mg/L, a z żółtaczką wymagającą naświetlania 0,30 mg/L. W osoczu krwi jony miedzi nie występują w stanie wolnym, ale są przyłączone do albuminy, histydyny i glutationu. W postaci tych kompleksów miedź wraz z krwią rozprawadzana jest po całym organizmie [251,252]. Głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi jest wątroba. To właśnie wątroba gromadzi największą ilość tego pierwiastka [251,252]. W hepatocytach zachodzi synteza ceruloplazminy (Cp), białka, które w każdej swojej cząsteczce wiąże 6 atomów miedzi, a po uwolnieniu do krwioobiegu pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego mikroelementu. Warto dodać, że aż 65-70% miedzi w osoczu związana jest właśnie z Cp. Obok Cp w wątrobie produkowana jest również, metalotioneina – bogate w cysteinę białko wiążące nadmiar miedzi w organizmie. Narząd ten pełni również ważną rolę w okresie prenatalnym – w trakcie życia płodowego w wątrobie płodu gromadzone są zapasy miedzi, które młody organizm wykorzystuje w pierwszych dniach samodzielnego życia [251,252]. W wątrobie zachodzi również produkcja żółci, w której zawartość Cu jest największa spośród wszystkich mikroelementów [251,252]. Również nadmiar Cu jest wydzielany do żółci, która następnie trafia do jelit i wraz z kałem zostaje wydalona z organizmu. W taki sposób 98% Cu jest usuwane z organizmu (tylko około 2% Cu usuwane jest przez nerki drogą filtracji kłębuszkowej). Jednak kiedy Cu jest zbyt dużo w okresie jej uwalniania może dojść do przełomów hemolitycznych – nagłego rozpadu dużej liczby erytrocytów (takie zjawisko ma miejsce między innymi w chorobie Wilsona). Wyższe stężenia Cu w pokarmie mam mogą wobec tego w pewien sposób przyspieszać proces rozpadu erytrocytów prowadząc tym samym do żółtaczki. Pobieranie Cu przez komórkę, jej transport w obrębie komórki, jak również usuwanie jej nadmiaru podlega ścisłej regulacji i zachodzi przy udziale specyficznych białek. Kationy Cu usuwane są z komórki przy udziale białek ATP7A i ATP7B, natomiast pobieranie Cu przez komórki organizmów eukariotycznych odbywa się za pomocą białek CTR, tworzących rodzinę transporterów miedziowych [251,252]. Jak się okazuje, problem ten jest bardzo złożony, gdyż na ekspresję i lokalizację wewnątrzkomórkową białka CTR1 wpływają też inne czynniki takie jak: wiek badanego osobnika (w przypadku badania noworodek urodzony przed 37tc, i po 37tc) czy rodzaj diety - może to być mleko matek o większej zawartości Cu. Porównanie wyników otrzymanych w przeprowadzonym badaniu z danymi w innych pracach naukowych jest trudne do realizacji ze względu na niewielką ilość badań zajmujących się tą tematyką.

Do badania włączono również kobiety palące. Znaczna jest ilość dostarczanych tą drogą toksycznych substancji, w tym nie tylko nikotyny, cyjanowodoru, ale także metali. Wysokie poziomy nikotyny w mleku kobiecym utrzymują się do 2 godzin po wypaleniu ostatniego papierosa [193] a dopiero po 12 godzinach od ostatniego papierosa w pokarmie kobiet nie ma większości substancji toksycznych. Palenie papierosów to również, największe środowiskowe źródło reaktywnych form tlenu [190]. Wśród badanych kobiet odnotowano istotne różnice statystyczne między kobietami palącymi i niepalącymi. Różnice te wykazano w zawartości miedzi ($p=0,009$), niklu ($p=0,006$) i cynku ($p=0,039$) w mleku matek. Wyższą średnią zawartość miedzi i cynku odnotowano u kobiet niepalących (odpowiednio, 0,36 mg/L; 13,08 mg/L) niż u palących (odpowiednio 0,23 mg/L; 10,11 mg/L). Natomiast średnia zawartość niklu była wyższa u palaczek (0,002 mg/L) niż u niepalących (0,00008 mg/L). Palenie papierosów nie miało wpływu na zawartość pozostałych metali i MDA. Różnice te wykazano dopiero między kobietami palącymi w przeszłości, obecnymi palaczkami i kobietami nie palącymi, a dotyczyły one stężeń Cu ($p=0,029$), Ni ($p=0,000$) i Pb ($p=0,006$). Wyższą średnią zawartość miedzi odnotowano u kobiet niepalących w stosunku do palących. Natomiast średnia zawartość Pb i Ni była znacznie wyższa u kobiet palących w stosunku do niepalących. Badania własne są porównywalne z takimi jak Kwapiński i wsp. [242], gdzie stwierdzono wyższe stężenia wybranych metali w pokarmie kobiet palących, które to były zależne od miejsca zamieszkania i niezależne od ilości wypalanych papierosów (Pb- $1.45\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i Ni- $0.041\mu\text{g}/\text{g}$). Brak zależności od ilości wypalanych papierosów można tłumaczyć pobytem pacjentek w szpitalu związanym z okresem porodowym i poporodowym, gdzie palenie papierosów jest zabronione, przez co trudno wykonalne. Pomimo niekorzystnego wpływu palenia papierosów na właściwości mleka kobiecego, Komitet ds. Leków Amerykańskiej Akademii Pediatrii w latach 2000-2001 stanowczo podkreślił, że palenie papierosów przez matkę, nie jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do naturalnego karmienia [246]. Jose Dorea w swoim artykule dotyczącym jakości pokarmu pochodzącego od matek palaczek, udowadnia wiele korzyści naturalnego karmienia również przez matki palące papierosy [247].

Negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na rozwój i zdrowie nowo narodzonych dzieci jest w ostatnich latach coraz szerzej udawadniany [91]. Podjęcie w niniejszym opracowaniu tematu zaburzeń równowagi antyoksydacyjno – prooksydacyjnej w pokarmie naturalnym związane jest ze wzrostem zainteresowania naukowców badaniami nad znaczeniem stresu oksydacyjnego w wieku rozwojowym. W coraz większej liczbie jednostek chorobowych udowodniono etiopatogenetyczne znaczenie reaktywnych form tlenu.

Badań dokonywano na początku trzeciej doby, jak i w kolejnych dobach (do 6 włącznie) po porodzie. Był to również okres zwiększonej produkcji siary, oraz właściwy czas jaki upłynął

od silnego stresu oksydacyjnego, jakim był dla matki i dziecka poród. Średnia zawartość MDA w badanym pokarmie kobiet wynosiła 0.66 nmol/mL. Natężenie stresu oksydacyjnego jest największe w okresie okołoporodowym i maleje wraz z wiekiem dziecka. W wyniku nasilenia produkcji reaktywnych form tlenu w organizmie kobiety w czasie ciąży i porodu [200,201], noworodki narażone są na silny stres oksydacyjny. Ekspozycja na tlen atmosferyczny po porodzie, przy jednoczesnej izolacji od matczynego systemu ochrony antyoksydacyjnej dodatkowo nasila to zjawisko. Zawartość niektórych markerów stresu oksydacyjnego np. produktów oksydacyjnego uszkodzenia lipidów, jest wyższa u zdrowych noworodków w porównaniu z wartościami obserwowanymi u ludzi dorosłych [205]. Natężenie stresu oksydacyjnego u zdrowych niemowląt stopniowo obniża się do 6 miesiąca życia [206]. Stężenia produktów peroksydacji lipidów oraz białek są wyższe u noworodków przedwcześnie urodzonych i tym wyższe im większe jest ryzyko wystąpienia wolnorodnikowych chorób okresu wcześniactwa (dysplazji oskrzelowo – płucnej, retinopatii wcześniaczej) [207,208]. Składniki obrony antyoksydacyjnej również znacząco zmieniają się wraz z wiekiem dzieci. Stężenie witaminy E w surowicy noworodków wzrasta znacząco po porodzie, osiągając po 3 dobie życia wartości porównywalne do stężeń u dorosłych [202]. Stężenie witaminy C wzrasta również w osoczu noworodków wraz z wiekiem i jest zależne od zawartości tego związku w mleku [74]. U niemowląt przedwcześnie urodzonych stężenie witaminy C w surowicy maleje wraz z wiekiem [92]. Aktywność katalazy wzrasta do 4 miesiąca życia [200]. Aktywność enzymów o działaniu antyoksydacyjnym jest zdecydowanie niższa u dzieci urodzonych przedwcześnie oraz drogą cięcia cesarskiego [209,210]. Karmienie naturalne, dzięki zawartości licznych składników ochrony przeciwutleniających [80,197], wydaje się być skutecznym sposobem zmniejszenia narażenia noworodków na stres oksydacyjny. Mleko kobiece bezsprzecznie ma działanie antyoksydacyjne w przewodzie pokarmowym [211]. Udowodniono związek karmienia naturalnego z mniejszą zachorowalnością na pewne choroby, w których etiopatogenezie sugeruje się rolę reaktywnych form tlenu [88,96]. Dostarczanie odpowiedniej ilości antyoksydantów wraz z pokarmem naturalnym, zwiększa barierę antyoksydacyjną ustroju dziecka w porównaniu do dzieci karmionych mieszankami mlecznymi. Sugeruje się niebagatelny wpływ enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej) oraz ich zdolności do przenikania przez pory w ścianie jelita we wczesnym niemowlęctwie [207]. Zauważono również wyższą aktywność tych enzymów w mleku matki niż w surowicy krwi [65]. Aktywność tioredoksyn – innego niskocząsteczkowego białka o działaniu antyoksydacyjnym jest 8 – krotnie wyższa w mleku niż w surowicy krwi matek [211]. Autorzy sugerują, że są one aktywnie produkowane w gruczole piersiowym i następnie przekazywane w ilościach znaczących karmionym mlekiem dzieciom [211]. Istotnym jest również fakt korzystnego wpływu

karmienia naturalnego na równowagę antyoksydacyjno-prooksydacyjną u wcześniaków i dzieci hipotroficznych. U wcześniaków karmionych piersią stwierdzono wyższą wydolność antyoksydacyjną we krwi niż u wcześniaków karmionych sztucznie [71]. U noworodków hipotroficznych karmienie piersią wpływa na wzrost stężenia selenu we krwi, który jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania jednego z enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy glutationowej [212]. U dzieci karmionych naturalnie obserwuje się również po urodzeniu stopniowy wzrost stężenia karotenoidów (jednego z antyoksydantów) we krwi, podczas gdy u dzieci karmionych sztucznie stężenie to stopniowo obniża się [61]. Dzięki antyoksydantom zawartym w mleku kobiecym, nasilenie stresu oksydacyjnego zmniejsza się. U dzieci karmionych naturalnie stężenie markerów nasilenia stresu oksydacyjnego jest znacznie niższe i obniża się wraz z wiekiem [97,213,214]. Wydalanie z moczem produktów utleniania lipidów przez dzieci karmione naturalnie jest istotnie niższe w porównaniu ze stężeniem tych produktów obecnych w moczu dzieci karmionych sztucznie [94]. W badaniu Granot i wsp. udowodniono jednak zależność wprost przeciwną: karmione sztucznie niemowlęta w wieku 2 - 4 miesięcy miały niższe stężenia MDA niż ich rówieśnicy karmieni naturalnie, nie pociągało to jednak za sobą zmian w zdolności antyoksydacyjnej [215]. Odpowiedzialna za to zjawisko może być udowodniona wyższa zawartość długołańcuchowych kwasów tłuszczowych LC-PUFA i DHA w pokarmie naturalnym.

Zaobserwowano również różnice w stężeniach produktów peroksydacji lipidów między fazami początkową i końcową mleka kobiecego. Faza początkowa zawierająca mniej tłuszczu, zawiera również mniej produktów peroksydacji lipidów. Jest to szczególnie widoczne w siarce [93]. Dane dotyczące zawartości markerów stresu oksydacyjnego oraz składników bariery antyoksydacyjnej w mleku kobiecym są różne. Friel i wsp [71], stwierdzili podobne poziomy MDA w mleku kobiecym w pierwszych trzech miesiącach laktacji zarówno u matek po porodach o czasie jak i przedwczesnych. Turol i wsp. nie obserwowali zależności między zdolnością antyoksydacyjną mleka a poziomami markerów peroksydacji lipidów [93]. Stwierdzili natomiast niższe stężenia markerów peroksydacji lipidów (reaktywne pochodne kwasu tiobarbiturowego i dieny) w tych mieszankach mlecznych, w których stężenia witamin rozpuszczalnych w tłuszczach A i E były wyższe [93]. Gutikova i wsp. badając mleko właściwe położnic, u których w ciąży rozpoznano nadciśnienie tętnicze, stwierdzili zwiększone stężenia markerów-MDA peroksydacji lipidów w mleku [216]. W niniejszej pracy nie uzyskano różnic statystycznych u kobiet z NIC, a także z PROM, GDM-1i2, IUGR. Zaobserwowano jedynie niewielkie różnice w stężeniach MDA, ale bez istotności statystycznej. Natomiast kontakt z metalami w miejscu pracy miał istotny statystycznie wpływ na zawartość MDA w mleku kobiet ($p=0.02$), co może jedynie potwierdzać, że długie narażenie środowiskowe na metale, przekłada się na

wystąpienie zwiększonego ryzyka stresu oksydacyjnego. Jednak niewielka grupa pacjentek ($n=5$), uniemożliwia wyciągnięcie konkretnych wniosków. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej wzrasta w mleku wraz z czasem trwania laktacji do końca 3 miesiąca życia [72]. Wykazano również wprost proporcjonalną zależność między aktywnością selenozależnej peroksydazy glutationowej w pokarmie naturalnym a stężeniem wielonienasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, co może świadczyć o ochronnej roli tegoż enzymu w „zmiataniu” wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych [217]. Ezaki i wsp. stwierdzili natomiast, iż całkowita zdolność antyoksydacyjna mleka kobiecego maleje wraz z upływem czasu laktacji i wynosi średnio $3,8 \mu\text{mol/mL}$. Wiąże się to ze zmniejszaniem stężeń nieenzymatycznych antyoksydantów w mleku, w toku laktacji [204]. Ma to najprawdopodobniej związek ze zmniejszającymi się stężeniami witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [69]. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach Alberti – Fidanza i wsp. oraz Quiles i wsp. [198,203]. Wykazano również zależność w aktywności całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) w mleku matek karmiących, od ilości spożywanych przez nie antyoksydantów. Ilość witamin przyjmowana przez ciężarne w III trymestrze ciąży wpływała na zdolność antyoksydacyjną siary i mleka przejściowego, a witaminy spożywane po porodzie - na zdolność antyoksydacyjną mleka właściwego [203]. W badaniach prowadzonych na zwierzętach (krowy mleczne) stwierdzono w surowicy krwi wysokie stężenia zarówno markerów peroksydacji lipidów (MDA) jak i TAS na początku laktacji, które w jej toku znacząco się zmniejszały. Tłumaczono ten fakt zmniejszaniem się nasilenia stresu oksydacyjnego (największy przypada na okres porodu) i jednoczesnym zużywaniem składników bariery antyoksydacyjnej, w tym głównie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach wraz z czasem trwania laktacji, jednocześnie wydalanych do mleka [218]. Pomiar zawartości MDA jest także ogólnie przyjętą metodą określania stopnia rozkładu tłuszczu w żywności. Matysiak-Żurowska i Stołyhwo zbadali zawartość MDA w mieszankach do początkowego i następnego żywienia niemowląt, wykazując w nich znaczne zawartości MDA (od 40.50 do $89.60 \mu\text{g}/100\text{ml}$) w porównaniu do mleka ludzkiego średnio $19.35 \mu\text{g}/100\text{ml}$, w zależności od stosowanej przez producenta technologii produkcji, sposobu pakowania oraz warunków przechowywania gotowego produktu. Mając na uwadze szkodliwe działanie dla zdrowia MDA, szczególnie dla noworodków i niemowląt ww. autorzy zasugerowali wprowadzenie limitu zawartości MDA w mleku początkowym i następnym dla niemowląt. Proponowany limit to $48.0 \mu\text{g MDA}/100\text{ml}$ [219].

Wartość pokarmu kobiecego może wobec powyższego zostać obniżona przez wpływ różnych zanieczyszczeń pochodzących ze środowiska, które to kumulują się w organizmie człowieka. Nie ma jednak bezpośrednich przesłanek by sądzić, że zanieczyszczenia zawarte w pokarmie kobiecym mogą poważnie wpływać na stan zdrowia niemowlęcia. Nie ma również

udowodnionej negatywnej zależności między zawartością w pokarmie zanieczyszczeń pochodzących ze środowiska, a stanem zdrowia dziecka karmionego piersią. W krajach europejskich obniża się emisję zanieczyszczeń takich jak: dioksyny, dibenzofurany, dioksynopodobne plichlorobifenyle, wobec czego stwierdza się mniejsze stężenia tych substancji w mleku kobiecym. W dostępnym piśmiennictwie często wykazywany jest negatywny wpływ zanieczyszczeń na zdrowie noworodka. Stosunkowo najlepiej udokumentowany jest wpływ zanieczyszczeń środowiskowych na masę urodzeniową, wspierany badaniami z dziedziny biologii molekularnej, dostarczającymi wiedzy w zakresie prawdopodobnych mechanizmów leżących u podłoża tej zależności. Jednakże, aby mówić o związku przyczynowo - skutkowym niezbędne są dalsze badania potwierdzające wpływ stopnia zanieczyszczenia środowiska na zdrowie noworodka, mierzone wskaźnikami antropometrycznymi i biochemicznymi. Dalszego potwierdzenia wymaga także ustalenie najbardziej wrażliwych na zanieczyszczenia środowiska okresów ciąży, oraz zróżnicowanie wpływu czynników środowiskowych na stan zdrowia noworodka w zależności od jego płci, masy, tygodnia ciąży oraz weryfikacji długoterminowych konsekwencji złej kondycji zdrowotnej tuż po urodzeniu, wynikającej z narażenia na czynniki środowiskowe w okresie płodowym, a następnie poporodowym.

Biorąc pod uwagę, że karmienie piersią przypada na najbardziej wrażliwy okres w rozwoju dziecka, kluczowe jest unikanie lub zminimalizowanie w tym okresie, kontaktu matek karmiących ze szkodliwymi substancjami. Efekt pojedynczego narażenia na każdy z badanych metali był od dawna wnikliwie badany. Wiele prac badawczych, dotyczących skutków toksycznego działania metali, zarówno u ludzi jak i w doświadczeniach na zwierzętach, pozwoliło w dużym przybliżeniu ustalić mechanizmy tego działania. Są to jednak w większości badania z wykorzystaniem modelu zatruwania metalami w dużych dawkach. Pozwala to wprowadzić wywołać szybciej ujemne skutki, które to ze względu na duże nasilenie ujawniają całą gamę reakcji organizmu zarówno w zakresie jego destrukcji jak i mechanizmów obronnych. Wyniki tych badań nie odzwierciedlają jednak rzeczywistych interakcji, zachodzących w środowisku człowieka. Uwzględnić należy również fakt, że jesteśmy narażeni na wiele czynników szkodliwych (najczęściej w niskich stężeniach), a skutki ich wpływu dają się zauważyć dopiero w momencie nieodwracalnych zaburzeń. Niezwykle istotne wydaje się poznanie odpowiedzi organizmu na toksyny w małych dawkach, w tym metale, zwłaszcza na poziomie molekularnym, a więc w początkowym okresie oddziaływania, co pozwoliłoby podjąć skuteczną ochronę przed niekorzystnymi, dalszymi długoterminowymi konsekwencjami. W związku z powyższym, należałoby przyjąć stanowisko, że korzyści płynące z karmienia piersią przeważają w dużym stopniu ewentualne, niekorzystne działania zanieczyszczeń środowiskowych obecnych w pokarmie, szczególnie, ze względu na fakt, że ich zawartość jest znacznie niższa od zawartości

tych zanieczyszczeń, w mieszankach sztucznych. Liczni badacze podają również, że najwięcej toksyn znajduje się w mleku w pierwszych dniach karmienia piersią. W miarę dalszych karmień ilość toksyn w mleku kobiecym zmniejsza się. Oznacza to, że z czasem mleko matek staje się wręcz bezpieczniejsze.

6. Wnioski

1. Pokarm kobiecy zawiera metale, a stężenie niklu jest zależne od wieku kobiety i palenia papierosów, natomiast cynku od chorób wikłających ciążę. Stężenie dialdehydu malonowego zależy od kontaktu z chemikaliami w miejscu pracy.
2. Zawartość pierwiastków śladowych w mleku kobiecym nie zależy od miejsca zamieszkania (miasto, wieś).
3. Stwierdzono, że zawartość pierwiastków śladowych w mleku kobiecym nie zależy od indeksu BMI pacjentki, sposobu ukończenia i tygodnia ciąży, a także rodzaju diety i spożywanego pokarmu.
4. Palenie papierosów oraz posiadanie plomb z wypełnieniem amalgamatowym ma wpływ na stężenie ołowiu i miedzi w mleku kobiet, i jest niezależne od liczby wypalanych papierosów, oraz liczby wypełnień amalgamatowych.
5. Palenie papierosów koreluje znamienne z zawartością miedzi, niklu, ołowiu i cynku w mleku matek.
6. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w zawartości miedzi w mleku kobiet, w grupie noworodków z rozpoczynającą się żółtaczką, w stosunku do grupy noworodków bez cech żółtaczki.
7. Wykazano, że stężenie metali i dialdehydu malonowego w pokarmie kobiet jest niezależne od masy urodzeniowej noworodka, jego długości ciała, obwodu główki i klatki piersiowej oraz masy łożyska.

7. Streszczenie

W okresie życia wewnątrzmacicznego, oraz karmienia naturalnego dziecko może być narażone na przyjmowanie wielu pierwiastków śladowych pochodzących z zanieczyszczonego środowiska. Udowodniono udział pierwiastków śladowych zanieczyszczonego powietrza i dymu tytoniowego zarówno w rozwoju noworodka, jak i wielu powikłań ciąży. Celem pracy była ocena stężeń wybranych metali i dialdehydu malonowego oraz wpływu środowiska na ich zawartość w mleku kobiecym. Analizie poddano wybrane czynniki środowiskowe mogące mieć potencjalny wpływ na stężenie badanych pierwiastków toksycznych oraz ich związków z peroksydacją lipidów mleka kobiecego. Analizie badawczej i ocenie poddano także wpływ metali i dialdehydu malonowego na przebieg ciąży i stan urodzeniowy dziecka. Bazując na danych ankietowych dokonano pewnej charakterystyki grupy kobiet i noworodków. Oznaczenie profilu pierwiastkowego dokonano poprzez wstępne zmineralizowanie próbki mleka, a następnie zmineralizowane i rozcieńczone próbki poddano analizie pierwiastkowej w oparciu o technikę atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ang. Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry ICP-OES). W celu oznaczenia stopnia peroksydacji lipidów, w badanym mleku wykonywano oznaczenie malondialdehydu z wykorzystaniem metody z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w oparciu o zestaw komercyjny Lipid Peroxidation (dialdehyd malonowy) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Wielka Brytania). Badanie przeprowadzono na 100 kobietach karmiących piersią, oraz na 99 noworodkach, które na podstawie ankiety oraz analizy dokumentacji medycznej, przydzielono do jednej z grup w zależności od wieku, palenia papierosów, miejsca zamieszkania, spożywanej diety, posiadanych wypełnień amalgamatowych, sposobu ukończenia ciąży, czasu jej trwania i chorób ją wikłających, a także masy urodzeniowej noworodka i jego pomiarów biometrycznych, żółtaczki noworodkowej i masy łożyska. Średnie stężenia wynosiły: cynk- 11,885mg/L, żelazo- 0,994mg/L, miedź- 0,308mg/L, glin- 0,091mg/L, ołów- 0,008mg/L i nikiel- 0.001mg/L. Oznaczeniu poddano także kadm, ale jego stężenie było poniżej poziomu wykrywalności. Stwierdzono wyższe stężenie niklu i ołowiu w mleku kobiet palących w stosunku do niepalących oraz wyższe stężenia cynku zależne od wieku matek i chorób wikłających ciążę. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic, stężeń wybranych metali i dialdehydu malonowego pomiędzy grupami badanymi, miasto - wieś, indeks BMI, sposób ukończenia i tygodnia ciąży, rodzaju diety, pomiarów biometrycznych noworodka i masy łożyska. Natomiast dodatnie korelacje zaobserwowano w stężeniach miedzi, niklu, ołowiu i cynku w mleku palących kobiet. Posiadanie plomb z wypełnieniem amalgamatowym ma wpływ na stężenie ołowiu i miedzi w mleku kobiet, i jest niezależne od liczby wypełnień amalgamatowych. Stwierdzono także istotne statystycznie różnice w zawartości miedzi w mleku kobiet w grupie noworodków z rozpoczynającą się żółtaczką, w stosunku do grupy noworodków bez cech żółtaczki.

Słowa kluczowe: metale, dialdehyd malonowy, mleko kobiet, ciąża, , noworodek

Abstract

During its life in the womb and natural feeding, a child may be exposed to many trace elements from the polluted environment. The contribution of polluted air and tobacco smoke have been proven both in the development of the newborn and many pregnancy complications. The aim of the work was to assess the concentrations of selected metals and malondialdehyde and the impact of the environment on their content in mothers' milk. The analysis included selected environmental factors that may have a potential effect on the concentration of the toxic elements studied and their relationship to lipid peroxidation of breast milk. The influence of metals and malondialdehyde on the course of pregnancy and the child's birth status were also analysed and evaluated. Based on the survey data, some characteristics of the group of women and newborns were created. The profile of elements was determined by pre-mineralisation of the milk sample, and then the mineralised and diluted samples were subjected to elemental analysis based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). In order to determine the degree of lipid peroxidation, the malondialdehyde was measured in the milk tested using the thiobarbituric acid (TBA) method based on the Lipid Peroxidation (malondialdehyde) Colorimetric / Fluorometric Assay Kit (BioVision, UK). The study was conducted on 100 breastfeeding women and 99 newborns, who were assigned to one of the groups based on the questionnaire and an analysis of medical documentation, depending on their age, smoking habits, place of residence, diet, amalgam fillings, way of giving birth, pregnancy duration and diseases that complicate it, as well as the birth weight of the newborn and its biometric measurements, neonatal jaundice and placental mass. Average concentrations were: zinc - 11.885 mg/L, iron - 0.994 mg/L, copper - 0.308 mg/L, aluminum - 0.091 mg/L, lead - 0.008 mg/L and nickel - 0.001 mg/L. Cadm was also determined, but its concentration was below the level of detection. Higher concentrations of nickel and lead were found in the milk of women who smoked compared to non-smokers and higher zinc concentrations depending on the age of mothers and diseases that complicate pregnancy. There were no statistically significant differences in concentrations of the selected metals and malondialdehyde between the study groups of: town-village, BMI index, method of giving birth and week of pregnancy, diet type, biometric measurements of the newborn or placenta mass. On the other hand, positive correlations were observed in concentrations of copper, nickel, lead and zinc in the milk of women who smoke. Having amalgam fillings affects the concentration of lead and copper in milk of women, and is independent of the number of amalgam fillings. There were also statistically significant differences in the content of copper in the milk of women in the group of newborns with jaundice, compared to the group of newborns without jaundice.

Key words: metals, malondialdehyde, women's milk, pregnancy, newborns

8. Piśmiennictwo

- [1]. Butte N.F., Lopez-Alarcon M.G., Garza C., Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life, World Health Organization, Geneva 2002, http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/nut_adequacy_of_exc_bfeeding_eng.pdf [12.09.2017].
- [2]. Borszewska-Kornacka M.K., Wesołowska A., Znaczenie pokarmu kobiecego w intensywnej terapii noworodka przedwcześnie urodzonego, *Postępy neonatologii*, 2013, 2(19):37-42.
- [3]. Szotowa W., Znaczenie swoistości gatunkowej mleka ludzkiego w karmieniu naturalnym niemowląt, *Pediatr. Pol.*, 1993, 68(5):7-11.
- [4]. Field C.J., The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants, *J. Nutr.*, 2005, 135:1-4.
- [5]. França E.L., Calderon Ide M., Vieira E.L., Morceli G., Honorio-França A.C., Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers, *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, 928187.
- [6]. Mizuno K., Hatsuno M., Aikawa K., Takeichi H., Himi T., Kaneko A., Kodaira K., Takahashi H., Itabashi K., Mastitis is associated with IL-6 levels and milk fat globule size in breast milk, *J. Hum. Lact.*, 2012, 28:529-534.
- [7]. Pan Y., Lee A., Wan J., Coventry M.J., Michalski W.P., Shiell B., Roginski H., Antiviral properties of milk proteins and peptides, *Int. Dairy J.*, 2006, 16:1252-1261.
- [8]. Pawlus B., Kordek A., Łoniewska B., Enzymy mleka kobiecego - najnowsze wiadomości, *Przegl. Pediatr.*, 2005, 35:168-170.
- [9]. Pawlus B., Kordek A., Łoniewska B., Podstawowe składniki mleka kobiecego - najnowsze wiadomości. *Medycyna Rodzinna*, 2004, 5:213-216.
- [10]. Schack L., Lange A., Kelsen J., Agnholt J., Christensen B., Petersen T.E., Sørensen E.S., Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk and infant formulas, *J. Dairy Sci.*, 2009, 92:5378-5385.
- [11]. Gibbs B. Forste R., Breastfeeding, Parenting, and Early Cognitive Development. *J. Pediatr.* 2014, 164:487-93.
- [12]. Hallowell S., Spatz D., The Relationship of Brain Development and Breastfeeding in the Late-Preterm Infant., *Journal of Pediatric Nursing*, 2012, 27:154-162.
- [13]. Jager E, Broadbent J., Fuller-Tyszkiewicz, Skouteris H., The role of psychosocial factors in exclusive breastfeeding to six months postpartum, *Midwifery* 2014, 30:657-666.

- [14]. McCrory C., Layte R., Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age, *Social Science & Medicine*, 2012, 75:323-330.
- [15]. Męczekalski B; *Endokrynologia ciąży*, PZWL, Warszawa 2012, 144-148,149-153,301-303.
- [16]. Riodan J., Wambach K., *Breastfeeding And Human Lactation*, 2009, 4th ed.
- [17]. Romaszko E., *Synteza mleka ludzkiego*, *Pediatrics Polska*, 2012, 87:467-461.
- [18]. Palmer B., *Breastfeeding and Infant Caries: No Connection*. *ABM NEWS and VIEWS*, The Newsletter of The Academy of Breastfeeding Medicine, 2000, 6(4):27-31.
- [19]. Petkowicz B, Pedowska M, Weremko-Fałdyga M, Krzaczek P., *Karmienie naturalne a zdrowie jamy ustnej.*, *Mag Stomat.*, 2013, 11:130–134.
- [20]. Samogyi A., Beck H *Nurturing and breast-feeding: exposure to chemicals in breast milk*, *Environ, Health Perspect*, 1993, 101, Suppl., 2:45-52.
- [21]. Longnecker M.P., Klebanoff M.A., Gladen B.C., Berends H.W., *Serial levels of serum organochlorines during pregnancy and postpartum*, *Arch. Environ. Health*, 1999, 54(2):110-114.
- [22]. Rudzki E., *Alergia pokarmowa. Część I – Mleko krowie*. *Postęp Dermatol Alergol*, 2005, 22(2):77-8023.
- [23]. Lis J., Orczyk-Pawilowicz M., Kałnik-Prastowska I., *Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne*, *Postepy Hig Med Dosw*, 2013, 67:529-547.
- [24]. Aydin S., Aydin S., Ozkan Y., Kumru S., *Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk*, *Peptides*, 2006, 27:878-882.
- [25]. De Leoz M.L., Gaerlan S.C., Strum J.S., Dimapasoc L.M., Mirmiran M., Tancredi D.J., Smilowitz J.T., Kalanetra K.M., Mills D.A., German J.B., Lebrilla C.B., Underwood M.A., *Lacto-N-tetraose, fucosylation, and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm*, *J. Proteome Res.*, 2012, 11:4662-4672.
- [26]. França E.L., Nicomedes T.R., Calderon I.M., Honorio-França A.C., *Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk*. *Biol. Rhythm Res.*, 2010, 5:333-347.
- [27]. Molinari C.E., Casadio Y.S., Hartmann B.T., Livj A., Bringans S., Arthur P.G., Hartmann P.E., *Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk*, *J. Proteome Res.*, 2012, 11:1696-1714.
- [28]. Uchiyama S., Sekiguchi K., Akaishi M., Anan A., Maeda T., Izumi T., *Characterization and chronological changes of preterm human milk gangliosides*. *Nutrition*, 2011, 27: 998-1001.
- [29]. Florea M., *Laktacja i karmienie piersią. Przegląd piśmiennictwa*. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, 2014, tom 7, zeszyt 3, 165-170.
- [30]. Emmett P.M., Rogers I.S., *Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition*, *Early Hum. Dev.*, 1997; 49:S7-S28.

- [31]. Araújo E.D., Gonçalves A.K., Cornetta Mda C., Cunha H., Cardoso M.L., Morais S.S., Giraldo P.C., Evaluation of the secretory immunoglobulin A levels in the colostrum and milk of mothers of term and pre-term newborns, *Braz. J. Infect. Dis.*, 2005, 9:357-362.
- [32]. Lawrence, R. A., & Lawrence, R. M., *Breastfeeding E-Book: A Guide for the Medical Professional*. Elsevier Health Sciences, 2010, 105-70.
- [33]. Hale T.W., Hartmann P.E., *Hale & Hartmann's Textbook of Human Lactation*: Hale Pub 1, 2007, 89-111, 661.
- [34]. Picciano MF., Nutrient composition of human milk, *Pediatric Clin North Am* 2001, 48(1): 53-67.
- [35]. Guo M., Chemical composition of human milk. [in:] *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Guo M (ed). Elsevier 2014, 1-420.
- [36]. Miller EM, Aiello MO, Fujita M, et al. Field and laboratory methods in human milk research *Am J Hum Biol*, 2013, 25:1-11.
- [37]. Zander Z.L., Mickiewicz D. Laktoferyna—multipotencjalne białko mleka. *Innowacyjne Mleczarstwo*, 2014, 2(1):18–21.
- [38]. Lara-Villoslada F., Olivares M., Sierra S., Rodríguez J.M., Boza J., Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteriam isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition*, 2007, 98: S96–S100.
- [39]. Rak K., Bronkowska M., Immunologiczne znaczenie siary, *Hygeia Public Health*, 2014, 49(2):249–254.
- [40]. Piskorska-Jasiulewicz M.M., Witkowska-Zimny M., Perinatal sources of stem cells. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2015, 69:327–334.
- [41]. Piskorska-Jasiulewicz M.M., Witkowska-Zimny M. Mleko kobiece jako naturalny produkt leczniczy, *Problemy Pielęgniarstwa*, 2015, tom 23(3): 417-421.
- [42]. Zimecki M., Artym J., Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk., *Postępy Hig. Med.Dosw.*, 2005, 59:309–323.
- [43]. Sasaki Y., Otsuki K., Hasegawa A. i wsp., Preventive effect of recombinant human lactoferrin on lipopolysaccharide--induced preterm delivery in mice. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 2004, 83(11):1035–1038.
- [44]. Małaczewska J., Rotkiewicz Z., Laktoferyna—białko multipotencjalne., *Medycyna Weterynaryjna* 2007, 63(2):136–139.
- [45]. Lönnerdal B., Bioactive proteins in breast milk., *Journal of Paediatrics & Child Health*, 2013, 49:1–7.

- [46]. Borowiak R., Leśniewski G., Próba zwiększenia funkcjonalności preparatów otrzymanych metodą wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu, *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 19(2012):124-134.
- [47]. Leśniewski G., Kijowski J., *Lysozyme, Bioactive Egg Compounds*, Edytorzy: Huopalathi R., Lopez R., Anton M., Schade R. Springer-Verlag, Berlin 2007, 33-42.
- [48]. Zimecki M., Artym J., Właściwości terapeutyczne białek i peptydów z siary i mleka, *Postępy i Higiena Medycyny Doświadczalnej*, 59(2005), 309-323.
- [49]. Abdou A. M., Higashiguchi S., Aboueleinin A. M., Kim M., Ibrahim H. R., Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species, *Food Control*, 18(2007), 173-178.
- [50]. Zhao Y., Jiang X., Kong X., Di G., Nie G., Li, X., Effects of hypoxia on lysozyme activity and antioxidant defences in the kidney and spleen of *Carassius auratus*, *Aquaculture Research*, 2015, DOI: 10.1111/are.12876.
- [51]. Knyazeva E.L., Grishchenko V.M., Fadeev R.S., Akatov V.S., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Who is Mr. HAMLET? Interaction of human alpha-lactalbumin with monomeric oleic acid. *Biochemistry* 2008, 47(49):13127–13137.
- [52]. Hassiotou F., Hartmann P.E. At the dawn of a new discovery: the potential of breast milk stem cells. *Advances In Nutrition*, 2014, 5(6):770–778.
- [53]. Twigger A.J., Hodgetts S., Filgueira L., Hartmann P.E., Hassiotou F., From breast milk to brains: the potential of stem cells in human milk, *Journal Of Human Lactation: Official Journal Of International Lactation Consultant Association*, 2013, 29(2):136–139.
- [54]. Hassiotou F., Beltran A., Chetwynd E. i wsp., Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells*, 2012, 30(10):2164–2174.
- [55]. Hosseini S.M., Talaei-Khozani T., Sani M., Differentiation of human breast-milk stem cells to neural stem cells and neurons., *Neurology Research International*, 2014, 807896–807904.
- [56]. Heaven D., Are breast milk stem cells the real deal?, *New Scientist*. 2013, 217(2908):14.
- [57]. Patki S., Kadam S., Chandra V., Bhonde R., Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell*, 2010, 23(2):35–40.
- [58]. Buescher E.S., McIlheran S.M., Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res.*, 1988, 24:14-19.
- [59]. He K., Nukada H., Urakami T., Murphy M.P., Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems., *Biochem Pharmacol*, 2003, 65:67-74.
- [60]. Goldman A.S., Goldblum R.M., Hanson L.A., Anti-inflammatory systems in human milk, *Adv Exp Med Biol*, 1990, 262:69-76.

- [61]. Sommerburg O., Meissner K., Nelle M., Lenhartz H., Leichsenring M., Carotenoid supply in breast-fed and formula-fed neonates, *Eur J Pediatr*, 2000; 159:86-90.
- [62]. Davidsson L., Kastenmayer P., Yuen M., Lonnerdal B., Hurrell R.F., Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants., *Pediatr Res.*, 1994, 35:117-124.
- [63]. Raghuvver T.S., McGuire E.M., Martin S.M., Wagner B.A., Rebouché C.J., Buettner G.R., Widness J.A., Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products, *Pediatr Res*, 2002, 52:964-972.
- [64]. Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B., Salzman A.L., Szabo C., Melatonin is a scavenger of peroxynitrite, *Life Sci*, 1997, 10:169–174.
- [65]. Reiter R.J., Tan D-X., Kim S.J., Qi W., Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA, *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 1998, 41:229–235.
- [66]. Reiter R.J., Melchiorri D., Sewerynek E., Poeggeler B., Barlow-Walden L.R., Chuang S.H. i wsp., A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant, *J. Pineal Res.*, 1995, 18:1–11.
- [67]. Escames G., Guerrero J.M., Reiter R.J., Garcia J.J., Munoz-Hoyos A., Ortiz G.G., i wsp., Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates, *Neurosci. Lett.*, 1997, 230:147–150.
- [68]. Ankrah N.A., Appiah-Opong R., Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content, *J Trop Pediatr.*, 2000, 46:111-113.
- [69]. Schweigert F.J., Bathe K., Chen F., Buscher U., Dudenhausen J.W., Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions, *Eur J Nutr.*, 2004, 43:39-44.
- [70]. Heyndrickx G.V. Investigations on the enzymes in human milk, *Ann Paediatr.*, 1962, 198: 356-362.
- [71]. Friel J.K., Martin S.M., Langdon M., Herzberg G.R., Buettner G.R., Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula., *Pediatr Res.*, 2002, 51:612-618.
- [72]. L'Abbe M.R., Friel J.K., Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2000, 31:270-274.
- [73]. Buss I.H., McGill F., Darlow B.A., Winterbourn C.C., Vitamin C is reduced in human milk after storage, *Acta Paediatr*, 2001, Jul, 90:813-815.
- [74]. van Zoeren-Grobbe D., Moison R.M., Ester W.M., Berger H.M., Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy, *Acta Paediatr*, 1993, 82:645-649.

- [75]. McManaman J.L., Neville M.C., Mammary physiology and milk secretion, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55:629-641.
- [76]. Burgoyne R.D., Duncan J.S., Secretion of milk proteins, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1998, 3:275-286.
- [77]. Grega T., Barowicz T., Przenikanie do mleka chemicznych zanieczyszczeń środowiska, *Post.Nauk Rol.*, 1977, 2:95-110.
- [78]. Górska A., Litwińczuk Z., Występowanie ołowiu i kadmu oraz substancji hamujących w mleku woj. siedleckiego., *Med. Wet.*, 1996, 52(9): 591-592.
- [79]. Bodak E., Dobrzański Z., Ekotoksykologiczne problemy chowu zwierząt w rejonach skażeń metalami ciężkimi, Wyd. Elma, Wrocław 1997.
- [80]. Seńczuk, W. and T. Bogdanik, Toksykologia współczesna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL., 2005, 57-730.
- [81]. Pyrz M., Transfer kadmu, ołowiu, cynku, miedzi i magnezu z organizmu matki do organizmu potomstwa poprzez zdrowy i chorobowo zmieniony gruczoł mlekowy owiec, Wyd. AR, Lublin 2006, z. 306: 90.
- [82]. Madej J.A., Klimentowski S., Kołacz R., Dobrzański Z., Rola metali ciężkich w patogenezie enzootycznej białaczki bydła (EBB), *Med. Wet.*, 1994, 50(8):374-376.
- [83]. Olędzka R., Wpływ metali i innych substancji obcych na biodostępność mikroelementów, *Bromat. Chem. Toksykol. XXXII*, 1999, 3:207-213.
- [84]. Dobrzański Z., Górecka H., Opaliński S., Chojnacka K., Kołacz R., Zawartość pierwiastków śladowych i ultraśladowych w mleku i krwi krów, *Med. Wet.*, 2005, 61(3):301-304.
- [85]. Pulina G., Dairy goats feeding and nutrition, *Cab International*, 2008 (1):10-31.
- [86]. Ryś B., Pierwiastki śladowe w roślinach pastewnych, dawkach pokarmowych i mleku krów w rejonie oddziaływania przemysłu siarkowego, *Rozprawy Naukowe AR Kraków*, z. 253. Wyd. AR, Kraków 1999.
- [87]. Kabata-Pendias A., Biogeochemia pierwiastków śladowych, PWN ,Warszawa 1999, (7):96-105.
- [88]. Lucas A., Cole T.J, Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*, 1990, 336: 1519-1523.
- [89]. Davis J.M., Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease, *Acta Paediatr. Suppl.*, 2002, 91:23-25.
- [90]. Saugstad O.D., Update on oxygen radical disease in neonatology, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2001, 13:147-153.
- [91]. Sommerburg O., Meissner K., Nelle M., Lenhartz H., Leichsenring M., Carotenoid supply in breast-fed and formula-fed neonates, *Eur J Pediatr.*, 2000, 159:86-90.

- [92]. van Zoeren-Grobben D., Lindeman J.H., Houdkamp E., Brand R., Schrijver J., Berger H.M., Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk, *Am J Clin Nutr.*, 1994, 60:900- 906.
- [93]. Turoli D., Testolin G., Zanini R., Bellù R. Determination of oxidative status in breast and formula milk, *Acta Paediatr.*, 2004, 93:1569-1574.
- [94]. Koletzko B., Sauerwald U., Keicher U., Saule H., Wawatschek S., Böhles H., Bervoets K., Fleith M., Crozier-Willi G., Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. A randomized clinical trial, *Eur J Nutr.*, 2003, 42:243-253.
- [95]. Aycicek A., Erel O., Kocyigit A., Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers, *Pediatr Int.*, 2005, 47:635-639.
- [96]. Hylander M.A., Strobino D.M., Pezzullo J.C., Dhanireddy R., Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants, *J Perinatol.*, 2001, 21:356-362.
- [97]. Shoji H., Shimizu T., Shinohara K., Oguchi S., Shiga S., Yamashiro Y., Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 2004, 89:F136-138.
- [98]. Pryor W.A., Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance, *Free Radic Biol Med*, 1992, 13: 659-676.
- [99]. Sigel S. (red.) *Aluminium and its Role in Biology*, New York 1988, 1-57.
- [100]. Ziola A., Frankowski M., Siepak J., Toksyczność glinu–fakt czy mit?, *Ochrona Środowiska*, 2008, 3:56–59.
- [101]. Ziola-Frankowska A., Frankowski M., Siepak J., Analiza specjacyjna w oznaczeniu chmglinu, *Ochrona Środowiska*, 2008, 9:58–62.
- [102]. Gworek B., Glin w środowisku przyrodniczym a jego toksyczność, *Ochrona Środowiskami Zasobów Naturalnych*, 2006, 29:27–38.
- [103]. Langauer-Lewowicka H., Glin – zagrożenia środowiskowe, *Medycyna Środowiska*, 2005, 1:59–64.
- [104]. Michałek W.J., *Ekotoksykologia. Wybrane aspekty dotyczące toksyczności glinu*, *Ekoinżynieria* 1997, 34.
- [105]. Widłak M., Widłak A., Environmental determination of aluminium soils, *Archives of Waste Management and Environmental Protection*, 2013, 15:81-88.
- [106]. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Glin – występowanie w przyrodzie oraz wpływ na organizmy roślin, zwierząt i człowieka, *UMCS, Lublin* 1999, 6-84.

- [107]. Zabłocka A., Choroba Alzheimerera jako przykład schorzenia Neurodegeneracyjnego, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006, 60:209-216.
- [108]. Harvey PW, Darbre P., Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women?, *J. Appl Toxicol*, 2004, 24:167-176.
- [109]. Ahmed AS., The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field, *Toxicology* 2000, 150(1-3):191-206.
- [110]. Satoh E, Yasuda I, Yamada T, et al. Involvement of no generation in aluminium-induced cell death, *Boil Pharm Bull*, 2007, 30:1390-1394.
- [111]. Darbre PD., Aluminium, antiperspirants and breast cancer, *J Inorg Biochem*, 2005, 99: 1912-1919.
- [112]. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, rozdz.1.7: 99-120.
- [113]. Rabinowitz M.B., Wetherill G.W., Kopple J.D., Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans, *J. Clin. Incest.*, 1976, 58:260-270.
- [114]. Carlisle J.C., Wade M.J., Predicting blood lead concentrations from environmental concentrations, *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, 1992, 16:280-289.
- [115]. De Silva P.E., Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes, *Br. J. Ind. Med*, 1981, 38:209-217.
- [116]. Wittmers L.E., Aufderheide A.C., Wallgren J., Rapp G., Alich A., Lead in bone. IV Distribution of Lead in the human skelton. *Arch. Environ. Health*, 1988, 43:381-391.
- [117]. Lauwerys R., Buchet J.P., Roels H., Hubermont G., Placental transfer of lead, mercury, cadmium, and carbon monoxide in women, *Environ. Research*, 1978, 15:278-289.
- [118]. Roels H., Hubermont G., Buchet J.P., Lauwerys R., Placental transfer of lead, mercury, cadmium, and carbon monoxide in women, *Environ. Research*, 1978, 16:236-247.
- [119]. Nashashibi N., Cardamakis E., Bolbos G., Tzingounis V., Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1999, 48:158-162.
- [120]. Gardella C., Lead exposure in pregnancy: A review of the literature and argument for routine prenatal screening, *Obst. Gynecol. Survey.*, 2001, 56:231-238.
- [121]. Centers of Disease Control. Preventing lead poisoning in young children. A statement by centers of disease control, US. Department of Health and Human Services, 1991.
- [122]. Winneke G., Brockhaus A., Ewers U., Kramer U., Neuf M., Results from the European multicenter study on lead neurotoxicity in children: implications for risk assessment, *Neurotox. Teratol.*, 1990, 12:553-559.

- [123]. Andrews K.W., Savitz D.A., Hertz-Picciotto I., Prenatal lead exposure in relation to gestational age and birth weight: A review of epidemiological studies, *Am. J. Ind. Med.*, 1994, 26:13-32.
- [124]. Baranowska I., Aleksandrowicz R., Cekański A., Baranowski J., Determination of metals in human placenta using graphite furnace atomic absorption spectroscopy, *Polish J. Environ. Studies*, 1992, 1:3-8.
- [125]. Burton G.J., Palmer M.E., Dalton K.J., Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers, *B. J. Obstet. Gynecol.*, 1989, 96:907-915.
- [126]. Ong C.N., Chia S.E., Foo S.C., Ong H.Y., Tsakok M., Liouw P., Concentrations of heavy metals in maternal and umbilical cord blood, *BioMetals.*, 1993, 6:61-66.
- [127]. Kuhnert B.R., Kuhnert P.M., Debanne S. Williams T.G., The relationship between cadmium, zinc, and birth weight in pregnant women who smoke, *Am J Obstet. Gynecol.*, 1987, 157:1247-1251.
- [128]. Goyer R.A., Trans placental transport of lead. *Environ, Health Perspect.*, 1990, 89:101-105.
- [129]. Baranowska I., Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Occup. Environ. Med.*, 1995, 52:229-232.
- [130]. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dymitriev OY, Function and regulation of human copper-transporting ATPases, *Physiol Rev*, 2007, 87:1011-1046.
- [131]. La Fontaine S, Mercer JFB, Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis, *Arch Biochem Biophys*, 2007, 463:149-167.
- [132]. Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B, Hubbard A., Dynamics of endogenous protein ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper dependent redistribution between two intracellular sides, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292:G1118-G1194.
- [133]. Ackland ML, Anikijenko P, Michalczyk A, Mercer JF, Expression of Menkes copper-transporting ATPase, MNK in the lactating human breast: possible role in copper transport into milk, *J Histochem Cytochem*, 1999, 47:1553-1562.
- [134]. El Meskini R, Cline LB, Eipper BA, Ronnet GV (2005) The developmentally regulated expression of Menkes protein ATP7A suggest a role in axon extension and synaptogenesis, *Dev Neurosci*, 27:333-348.
- [135]. Lenartowicz M, Krzeptowski W, Budowa i funkcja białek ATP7A i ATP7B— ATPaz transportujących jony miedzi, *Postępy Biochemii* 2010, 56 (3):317-320.
- [136]. Sharma A., Relationship between nickel allergy and diet Vol. 73, 2007, 307-312.

- [137]. Rose M., et al., Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK Total Diet Study and some trends over the last 30 years. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2010, 27(10):1380-404.
- [138]. Adamczyk M. and Bal W., Współczesne poglądy na kancerogenezę metali –mechanizmy molekularne kancerogenezy jonów niklu, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2006, 39(4): 361-370.
- [139]. Menezes L.M., Quintao C.A. and Bolognese A.M., Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2007, 131(5):635-638.
- [140]. Torres F., et al., Management of contact dermatitis due to nickel allergy: an update, *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2009, 2:39-48.
- [141]. Pizzutelli S., Systemic nickel hypersensitivity and diet: myth or reality? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2011, 43(1):5-18.
- [142]. ATSDR, Toxicological profile for nickel, American Toxic Substances and Diseases Registry: Atlanta 2007, 21-169.
- [143]. Dobrzański Z., Skiba M., Brożyńska A., Kowalska-Górska M., Zawartość wybranych metali ciężkich w mleku przeżuwaczy (krów i kóz) z regionów przemysłowych i czystych ekologicznie, „*Acta Scientiarum Polonorum Medicina Veterinaria*”, 2009, 8(1):3-14.
- [144]. Cempel, M. and G. Nickel, Nickel: a review of its sources and environmental toxicology, *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006, 15(3):375-382.
- [145]. Brodziak-Dopierala, B., et al., The occurrence of nickel and other elements in tissues of the hip joint, *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011, 74(4):630-635.
- [146]. Solomons, N.W., Update on Zinc Biology. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2013, 62(suppl 1)(Suppl. 1):8-17.
- [147]. Hesse, E., et al., Zinc finger protein 521, a new player in bone formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1192(1):32-37.
- [148]. Yamaguchi, M. and M.N. Weitzmann, Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. *Molecular and cellular biochemistry*, 2011, 355(1-2):179-186.
- [149]. Fong, L., et al., Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth, *Bone*, 2009, 44(6):1151-1162.
- [150]. Hamza, R.T., A.I. Hamed, and M.T. Sallam, Effect of zinc supplementation on growth hormone-insulin growth factor axis in short Egyptian children with zinc deficiency, *Ital J Pediatr*, 2012, 38(1):21.

- [151]. Gapys B., Raszeja-Specht A., Bielarczyk H., Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu. *Diagnostyka laboratoryjna, Journal of Laboratory Diagnostics Diagn Lab*, 2014, 50(1):45-52.
- [152]. Bjorklund G., The role of zinc and copper in autism spectrum disorders, *Acta neurobiol exp* 2013, 73:225-236.
- [153]. Carpena E, Andreani G, Isani G., Metallothionein functions and structural characteristics, *J Trace Elem Med Biol* 2007, 21(S1):35-39.
- [154]. Craddock TJ, Tuszynski JA, Chopra D, et al. The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease, *PLoS One*, 2012, 7(3):e33552.
- [155]. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV., Structural classification of zinc fingers: survey and summary, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(2):532-550.
- [156]. Oteiza PI., Zinc and the modulation of redox homeostasis, *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(9):1748-1759.
- [157]. Plum LM, Lothar R, Hajo H., The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health, *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7:1342-1365.
- [158]. Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka L, Tarasiewicz M., Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. III. Cynk – składnik i aktywator enzymów, *Pol Merk Lek*, 2009, XXVII, 161, 419.
- [159]. Reyes JG., Zinc transport in mammalian cells, *Am J Physiol*, 1996, 270(2 Pt 1):C401-410.
- [160]. Tian X, Diaz FJ., Zinc Depletion Causes Multiple Defects in Ovarian Function during the Perioovulatory Period in Mice, *Endocrinology*, 2012, 153(2):873–886.
- [161]. Vallee BL, Falchuk KH., The biochemical basis of zinc physiology, *Physiol Rev*, 1993, 73:79–118.
- [162]. Słomka A., Żekanowska E., Piotrowska K., Kwapisz J., Metabolizm żelaza z zagadnieniami matczyno- płodowego krążenia żelaza, *Postepy Hig Med Dosw*, (online), 2012, 66:876-887.
- [163]. Collins, J.F., J.R. Prohaska, and M.D. Knutson, Metabolic crossroads of iron and copper, *Nutr Rev*, 2010, 68(3):133-47.
- [164]. Ganz T., Molecular control of iron transport, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007, 18:394–400.
- [165]. Wąsowska-Królikowska K., Baranowski W.J., Znaczenie żelaza w rozwoju i żywieniu niemowląt. I Metabolizm żelaza, *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 2000, 4:65–77.
- [166]. Ferguson C.J., Wareing M., Ward D.T., Green R., Smith C.P., Riccardi D., Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2001, 280:F803–F814.

- [167]. Brodziak-Dopierala, B., et al., Interactions of copper and iron with other elements in the osseous tissue of the femur head. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2009, 18(10a):1963-1966.
- [168]. Bergamaschi G., Bergamaschi P., Carlevati S., Cazzola M., Transferrin receptor expression in the human placenta, *Haematologica*, 1990, 75:220–223.
- [169]. Vanderpuye O.A., Kelley L.K., Smith C.H., Transferrin receptors in the basal plasma membrane of the human placental syncytiotrophoblast, *Placenta*, 1986, 7:391–403.
- [170]. Sichieri R., Fonseca V.M., Hoffman D., Trugo N.M., Moura A.S., Lack of association between iron status at birth and growth of preterm infants, *Rev. Saude Publica*, 2006, 40:641–647.
- [171]. Bothwell T.H., Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 72(Suppl.1):257S–264S.
- [172]. Corapci F., Calatroni A., Kaciroti N., Jimenez E., Lozoff B., Longitudinal evaluation of externalizing and internalizing behavior problems following iron deficiency in infancy, *J. Pediatr. Psychol.*, 2010, 35:296–305.
- [173]. Jougoux J.L., Rioux F.M., Church M.W., Fiset S., Surette M.E., Mild maternal iron deficiency anemia during pregnancy and lactation in guinea pigs causes abnormal auditory function in the offspring, *J. Nutr.*, 2011, 141:1390–1395.
- [174]. Lozoff B., Clark K.M., Jing Y., Armony-Sivan R., Angelilli M.L., Jacobson S.W., Dose-response relationships between iron deficiency with or without anemia and infant social-emotional behavior, *J. Pediatr.*, 2008, 152:696–702.
- [175]. Lukowski A.F., Koss M., Burden M.J., Jonides J., Nelson C.A., Kaciroti N., Jimenez E., Lozoff B., Iron deficiency in infancy and neurocognitive functioning at 19 years: evidence of long-term deficits in executive function and recognition memory. *Nutr. Neurosci.*, 2010, 13:54–70.
- [176]. Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C., The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes, *Int J Biochem Cell Biol.*, 2010, 42(10):1634-1650.
- [177]. Mutinati M., Piccinno M., Roncetti M. i wsp., Oxidative stress during pregnancy in the sheep, *Reprod Domest Anim.*, 2013, 48(3):353-357.
- [178]. Laskowska-Klita T., Szyborski J., Chełchowska M. i wsp., Nadtlenki lipidowe i wybrane parametry obrony przeciwutleniającej w łożysku i krwi pępowinowej noworodków matek palących w przebiegu ciąży, *Badania własne. Med Wieku Rozw.*, 2001, 5:35-42.
- [179]. Chełchowska M., Laskowska-Klita T., Szyborski J., Poziom retinolu i β -karotenu w osoczu krwi palących i niepalących kobiet ciężarnych, *Wiad. Lek.*, 2001, 54:248-254.

- [180]. Seidman D.S., Paz I., Merlet-Aharoni I. i wsp., Noninvasive validation of tobacco smoke exposure in late pregnancy using endtidal carbon monoxide measurements, *J Perinatol.*, 1999, 19(5):358-361.
- [181]. Obwegeser R., Oguogho A., Ulm M. i wsp., Maternal cigarette smoking increases F2-isoprostanes and reduces prostacyclin and nitric oxide in umbilical vessels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 1999, 57(4):269-279.
- [182]. Sardas S., Walker D., Akyol D., Karakaya A.E., Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique, *Mutat Res*, 1995, 335(3):213-217.
- [183]. Zgierski M., Wpływ palenia papierosów na równowagę antyoksydacyjno - peroksydacyjną w mleku kobiecym, Praca doktorska. Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Gdansk. Gdańsk 2008.
- [184]. Kalisz S, Mitek M., Żywność dla najmłodszych, *Przem Spoż*, 2006, 12:20-23.
- [185]. Sadowska H., Dietetyczne środki spożywcze dla niemowląt i dzieci w świetle ustawodawstwa żywnościowego i potrzeb krajowych, *Żyw Czł Metabol*, 1990, XVII (1):62-69.
- [186]. Weker H, Więch M., Kryteria oceny żywności bezpiecznej dla dzieci, *Żyw Czł Metabol*, 2003, XXX (3/4):900-904.
- [187]. Świącicka A, Jeznach M., Ocena jakości produktów gotowych w słoikach dla niemowląt i małych dzieci w opinii matek, *Żyw Czł Metabol*, 2003, XXX, (3/4):1081-1087.
- [188]. Wojciechowska-Mazurek M, Starska K i wsp., Monitoring zanieczyszczeń żywności pierwiastkami szkodliwymi dla zdrowia. Cz. I. Produkty zbożowe pszenne, warzywne, cukiernicze oraz produkty dla niemowląt i dzieci, *Rocz PZH*, 2008, 59(3):251-266.
- [189]. Wojciechowska-Mazurek M, Starska K., Brulińska-Ostrowska E., Materiały szkoleniowe. Urzędowa kontrola żywności w zakresie zanieczyszczeń chemicznych. Cz. II-10, 2006.
- [190]. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food, *Eur. Food Saf. Author. J.* 2009, 980.
- [191]. Wojciechowska-Mazurek M, Starska K., Brulińska-Ostrowska E., Biernat U., Plewa M., Karłowska K., Ocena zanieczyszczenia produktów dla niemowląt i małych dzieci pierwiastkami szkodliwymi dla zdrowia, *Bromatol. Chem. Toksykol.* 39, 2006, Suplement: 35-39.
- [192]. Heś M., Nadolna J., Ocena zawartości wybranych metali ciężkich w kaszkach błyskawicznych dla niemowląt, Copyright ©Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2010, Tom 4. Zeszyt 2:2-9.
- [193]. Ponczek MB, Wachowicz B., Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami, *Post Biochem*, 2005, 51:140-5.

- [194]. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radic Biol Med.*, 2000, 29(11):1106-14.
- [195]. Simic MG., DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis, *Cancer Res.*, 1994, 1:54(7 Suppl):1918s-23s.
- [196]. Miller E.R. 3rd, Appel L.J., Jiang L., Risby T.H., Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study. *Circulation*, 1997, 96:1097-1101.
- [197]. Eriksson K.M., Haug K., Salvesen K.A., Nesheim B.I., Nylander G., Rasmussen S., Andersen K., Nakling J.O., Eik-Nes S.H., Smoking habits among pregnant women in Norway, 1994-95. *Acta Obstet, Gynecol. Scand*, 1998, 77:159-164.
- [198]. Alberti-Fidanza A., Burini G., Perriello G., Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk, *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 2002, 11:275-279.
- [199]. Ilett K.F., Hale T.W., Page-Sharp M., Kristensen J.H., Kohan R., Hackett L.P., Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, 74:516-524.
- [200]. Morris J.M., Gopaul N.K., Endresen M.J., Knight M., Linton E.A., Dhir S., Anggård E.E., Redman C.W., Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia, *Br J Obstet Gynaecol*, 1998, 105:1195-1199.
- [201]. Zusterzeel P.L., Mulder T.P., Peters W.H., Wiseman S.A., Steegers E.A., Plasma protein carbonyls in nonpregnant, *Free Radic Res*, 2000 Nov, 33(5):471-6.
- [202]. Hutchens T.W., Yip T.T., Morgan W.T., Identification of histidine-rich glycoprotein in human colostrum and milk, *Pediatr Res.*, 1992, 31:239-246.
- [203]. Quiles J.L., Ochoa J.J., Ramirez-Tortosa M.C., Linde J., Bompadre S., Battino M., Narbona E., Maldonado J., Mataix J., Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res.* 2006, 40:199-206.
- [204]. Ezaki S., Ito T., Suzuki T., Tamura M., Association between Total Antioxidant Capacity in Breast Milk and Postnatal Age in Days in Premature Infants, *J Clin Biochem Nutr.*, 2008, 42:133-137.
- [205]. Comporti M., Signorini C., Leoncini S., Buonocore G., Rossi V., Ciccoli L., Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age, *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 37,724-32.
- [206]. Friel J.K., Friesen R.W., Harding S.V., Roberts L.J., Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr. Res.*, 2004, 56,878-82.

- [207]. Inder T.E., Darlow B.A., Sluis K.B., Winterbourn C.C., Graham P., Sanderson K.J., Taylor B.J., The correlation of elevated levels of an index of lipid peroxidation (MDA-TBA) with adverse outcome in very low birthweight infants, *Acta Paediatr.*, 1996, 85:1116-1122.
- [208]. Rogers S., Witz G., Anwar M., Hiatt M., Hegyi T. Antioxidant Capacity and Oxygen Radical Diseases in the Preterm Newborn, *Arch Pediatr Adolesc Med.*, 2000, 154:544-548.
- [209]. Georgeson G.D., Szo"ny B.J., Streitman K., Varga I.S., Kova'cs A., Kova'cs L., La'szlo' A. , Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants, 2002, 103:136-139.
- [210]. Shoji H., Oguchi S., Fujinaga S., Shinohara K., Kaneko K., Shimizu T., Yamashiro Y., Effects of human milk and spermine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IEC-6 cells., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2005, 41:460-465.
- [211]. Di Renzo L., Di Pierro D., Bigioni M., Sodi V., Galvano F., Cianci R., La Fauci L., De Lorenzo A., Is antioxidant plasma status in humans a consequence of the antioxidant food content influence?, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 2007, 11:185-192.
- [212]. Strambi M., Longini M., Vezzosi P., Berni S., Buoni S. Selenium status, birth weight, and breast-feeding: pattern in the first month, *Biol Trace Elem Res.*, 2004, 99:71-81.
- [213]. Schwarz K.B., Cox J.M., Sharma S., et al. Prooxidant effects of maternal smoking and formula in newborn infants, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 1997, 24:68-74.
- [214]. Shoji H., Oguchi S., Shimizu T., Yamashiro Y., Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants, *Pediatr Res.*, 2003, 53:850-852.
- [215]. Granot E., Golan D., Berry E.M., Breast-fed and formula-fed infants do not differ in immunocompetent cell cytokine production despite differences in cell membrane fatty acid composition, *Am J Clin Nutr.*, 2000, 72:1202-1205.
- [216]. Gutikova L.V., Chemical composition of milk of puerperas suffered from gestosis of different degree of severity, *Biomed Khim.*, 2007, 53:332-337.
- [217]. Debski B., Finley D.A., Picciano M.F., Lo"nnerdal B., Milner J., Selenium content and glutathione peroxidase activity of milk from vegetarian and nonvegetarian women, *J Nutr.*, 1988, 119:215-220.
- [218]. Castillo C., Herna'ndez J., Valverde I., Pereira V., Sotillo J., Lo'pez Alonso M., Benedito J.L., Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows, *Res Vet Sci.*, 2006, 80:133-139.
- [219]. Martysiak-Żurawska D., Stołyhwo A., Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w preparatach do początkowego i następnego żywienia niemowląt, *Pol. J. Food Nutr.Sci.*, 2006, Vol.15/56, No 3:323-328

- [220]. Borowiec M., Huculak M., Hoffman K., Hoffman J., Ocena zawartości wybranych metali ciężkich w produktach spożywczych zgodnie z obowiązującym w Polsce prawodawstwem, „Proceedings of ECOpole”, 2009, 3, 2, 433-438.
- [221]. Krzywy I., Krzywy E., Pastuszek-Gabinowska M., Brodkiewicz A., Ołów-czy jest się czego obawiać?, „Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie”, 2010, 56, 2:118-128.
- [222]. Kołacz R., Dobrzański Z., Górecka H., Chojnacka K., Rudnicka A., The content of lead and cadmium in milk and blood of cows kept in industrial and typically agricultural region, “Chem. Agric.”, 2004, 5:312-316.
- [223]. Vidovic M., Sadibasic A., Cupic S., Lausevic S., Cd and Zn in atmospheric deposit, soil, wheat, and milk, “Environmental Research”, 2005, 97:26-31.
- [224]. Brunekreef B, Holgate ST., Air pollution and health, *Lancet*, 2002, 19;360(9341), 1233–42.
- [225]. Instytut Ochrony Środowiska, Inwentaryzacja emisji do powietrza SO₂, NO_x, CO, NH₃, pyłów, metali ciężkich, NMLZO i TZO w Polsce za rok 2007, Warszawa 2009, Raport_LRTAP_2007
- [226]. Kashue-Kobize, Instytut Ochrony Środowiska, Inwentaryzacja emisji do powietrza SO₂, NO_x, CO, NH₃, pyłów, metali ciężkich, NMLZO i TZO w Polsce za rok 2008, Warszawa 2009.
- [227]. Kabata-Pentias A., Pendias H., Biogeochemia pierwiastków śladowych, PWN, Warszawa 1999.
- [228]. Axelrod D, D 1. avis DL, Hajek RA & Jones LA., It's time to rethink dose, the case for combining cancer and birth and developmental defects, *Environ Health Perspect*, 2001, 109(6), A246–A249.
- [229]. Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Foltran Januario DAN, i wsp., Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer, *Fertility and Sterility*, 2010, 93,1,1, 301–303.
- [230]. Tomei G, Ciarrocca M, Fortunato BR, Capozzella A, Rosati MV, Cerratti D. i wsp., Exposure to traffic pollutants and effects on 17-beta-estradiol (E2) in female workers, In *Arch Occup Environ Health.*, 2006, 80(1), 70–77.
- [231]. Merklinger-Gruchała A. Maria Kapiszewska M., Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na kondycję płodu. Środowisko a gospodarka hormonalna kobiet, Oficyna Wydawnicza AFM, Kraków 2011, 213-224.
- [232]. Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A., Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes, a biologically plausible mechanistic framework

for exploring potential effect modification by nutrition, *Environ Health Perspect*, 2006, 114(11): 1636–1642.

[233]. Nordberg G.F., Fowler B.A., Friberg L., Jernelov A., Nelson N, Piscator M., Sandstead H.H., Vostal J., Vouk B.B., Factors influencing metabolism and toxicity of metals: a consensus report, *Environ Health Perspective*, 1978, 25 August, 3-41.

[234]. Żukowska J., Biziuk M., Methodological Evaluation of Method for Dietary Heavy Metal Intake, „*Journal of Food Science*”, 2008, vol. 00, no.0.1-8.

[235]. Wang W., Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms, „*Overview Environment International*”, 1987, vol. 13, iss. 6.437-457.

[236]. Ersoy B., Yanar Y., Kucukgulmez A., Celik M., Effects of four cooking methods on the heavy metal concentrations of sea bass fillets (*Dicentrarchus Labrax Linne*), „*Food Chemistry*” 2006, 99(4):748-751.

[237]. Perell G., Mart-Cid R., Llobet J.M., Domingo J.L., Effects of Various Cooking Processes on the Concentrations of Arsenic, Cadmium, „Mercury and Lead in Foods *Journal of Agricultural and Food Chemistry*”, 2008, 56 (23):11262-11269.

[238]. Anderson R., Variation In major mineral of human milk During first five months of lactation, *Nutr Res*, 1992, 12:701-711.

[239]. Davidson L., The effect of industrial dietary components on manganese absorption in humans, *Ann J Clin Nutr*, 1991, 54:1065-1070.

[240]. Roekens H., Deelstra H., Robbercht H., Trace elements in human milk, selenium a case study, *Sci Total Environ*, 1985, 42:91-108.

[241]. Wąsowicz W., Gromadzinska J., Szram K., Rydzyński K., Cieslak J., Pietrzak Z., Selenium, zinc and copper concentrations in the blood and milk of lactating women. *Biol Trace Elem Res*, 2001, 79:221-224.

[242]. Kwapulinski J., Suflita M., Brewczynski P.Z., i wsp., Zawartość metali ciężkich w mleku kobiet mieszkających na terenach uprzemysłowionych, *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 2014, Vol. 17, No.3, 39-44.

[243]. Dąbrowska M., Zielińska A., Nowak I., Produkty utleniania lipidów jako potencjalny problem zdrowotny oraz analityczny, *CHEMIK*, 2015, 69, 2, 89–94.

[244]. Cichosz G., Czeczot H., Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne, *Bromat.Chem.Toksykol.*, 2011, XLIV, 1:50–60.

[245]. Grosicka-Maciąg E., Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów, *Postepy Hig Med Dosw.*, 2011, 65:357-366.

[246]. AAP-American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk, *Pediatrics*, 2001, 108:776–789.

- [247]. Dorea J.G., Maternal smoking and infant feeding: breastfeeding is better and safer, *Matern Child Health J.*, 2007, 11:287-291.
- [248]. Helmersson J., Larsson A., Vessby B., Basu S., Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F₂, interleukin-6 and F₂- isoprostane formation in elderly men, *Atherosclerosis*, 2005, 181:201–207.
- [249]. Dietrich M., Block G., Hudes M., Morrow J.D., Norkus E.P., Traber M.G., Cross C.E., Packer L., Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2002, 11:7-13.
- [250]. Richelle M., Turini M.E., Guidoux R., Tavazzi I., Me'tairon S., Fay L.B. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet, *FEBS Letters*, 1999, 459:259-262.
- [251]. Lenartowicz M., Krzeptowski W., Budowa i funkcja białek ATP7A i ATP7B-ATPaz transportujących jony miedzi., *Postępy Biochemii*, 2010, 56 (3):317-324.
- [252]. Pierzchała O., Ogórek M., Bednarz A., Lenartowicz M., Budowa i funkcja białek z rodziny CTR-błonowych transporterów jednowartościowych jonów metali, *Postępy Biologii Komórki*, Tom 42, 2015, nr 2:351–374.
- [253]. Jańczuk Z., *Stomatologia zachowawcza – zarys kliniczny. Podręcznik dla studentów stomatologii* Wyd. 3 rozszerzone, Wydaw. Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, 83-88.
- [254]. Brzozowski I., Bojar I., Stężenie pierwiastków(cynku, miedzi i selenu) biorących udział w reakcjach stresu oksydacyjnego u pacjentek ciążą powikłaną cukrzycą typu I, *European Journal of Medical Technologies*, 2014, 4(5):55-65.
- [255]. Kowalska D., Gruczyńska E., Bryś J., Mleko matki – pierwsza żywność w życiu człowieka., *Probl. Hig. Epidemiol.* 2015, 96(2):387-398

Załączniki

Załącznik 1

ANKIETA: Analiza czynników środowiskowych i ich wpływ na zawartość metali w mleku kobiecym.

1. Kod pacjenta:
2. Wiek 3. Wzrost 4. Masa. 5. BMI
6. Para / / /

6. Czy pali Pani papierosy? TAK / NIE
Jeśli tak to ile średnio wypala Pani papierosów dziennie?.....
Od ilu lat Pani pali?.....

7. Czy paliła Pani papierosy w przeszłości? TAK / NIE
Jeśli tak to ile średnio paliła Pani papierosów dziennie?.....
Przez ile lat Pani paliła?.....Od kiedy Pani nie pali?....

8. Gdzie Pani mieszkała w przeszłości (włącznie z dzieciństwem) i obecnie. Proszę wskazać miejsca zamieszkania > 1 roku oraz przybliżony okres

| | Miejscowość | Województwo | Od kiedy | Do kiedy |
|---|-------------|-------------|----------|----------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |

9. Czy ma Pani aktualnie kontakt zawodowy z metalami ciężkimi-pracuje w przemyśle ciężkim, elektronicznym, chemicznym? TAK / NIE
Jeśli tak, od jak dawna?.....
Jeżeli tak, gdzie Pani pracuje?.....

10. Czy miała Pani w przeszłości kontakt zawodowy z metalami ciężkimi? TAK / NIE
Jeśli tak to proszę wpisać przez jaki okres czasu?.....
Gdzie Pani pracowała?.....

11. Czy w rodzinie występowały choroby przewlekłe, nowotwory?
Nowotwór

12. Jaka dietę Pani stosuje?
a) tradycyjną b) wegetariańską c) wegańską d) inną.....

13. Jak często spożywa Pani warzywa i owoce?
a) 2-3 razy dziennie b) 1 dziennie c) 2-3 razy w tygodniu d) 1 w tygodniu e) rzadziej f) nie spożywam wcale

14. Jak często spożywa Pani mięso i przetwory mięsne?

a) 2-3 razy dziennie b) 1 dziennie c) 2-3 razy w tygodniu d) 1 w tygodniu e) rzadziej f) nie spożywam wcale

15. Jak często spożywa Pani ryby i owoce morza?

a) 2-3 razy dziennie b) 1 dziennie c) 2-3 razy w tygodniu d) 1 w tygodniu e) rzadziej f) nie spożywam wcale

16. Czy stosowała Pani suplementy diety w ciąży i jeśli tak to jak długo?nazwa preparatu.....

17. Czy stosowała Pani antykoncepcję hormonalną? ile lat?nazwa preparatu

18. Czy kiedykolwiek chorowała Pani na niedokrwistość: TAK / NIE

19. Czy były w ciąży choroby współistniejące: nadciśnienie, cukrzyca ciążowa, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, inne.....

20. Czy posiada Pani plomby z wypełnieniem amalgamatowym TAK/NIE

Ile plomb Pani posiada.....jak długo.....

Od jakiego czasu są one usunięte.....

Poród

| | | |
|-----------------|------------|------------------------|
| 1. Poród | operacyjny | cesarskie cięcie |
| | zabiegowy | op. kleszczowa |
| | | próżnociąg |
| | naturalny | |
| 2. Masa łożyska | g | |

Ocena noworodka

| | | |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Masa | urodzeniowa g | w dobie pobrania mleka mamy g |
| 2. Apgar | | |
| 3. Wymiary | obwód główki cm | |
| | obwód klatki piersiowej cm | |
| | długość ciała cm | |
| 4. Żółtaczka fizjologiczna | od doby | do doby |
| | maksymalne stężenie bilirubiny | w dobie |