

Maciej Zagierski

WPŁYW PALENIA PAPIEROSÓW
NA RÓWNOWAGĘ ANTYOKSYDACYJNO –
PROOKSYDACYJNĄ
W MLEKU KOBIECYM.

Rozprawa doktorska przeprowadzona
pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Marii Korzon
w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci
Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2008

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2005-2008
jako projekt badawczy promotorski (nr 2 P05D 047 29)

SPIS TREŚCI	3
WSTĘP	5
I. Właściwości mleka kobiecego	5
II. Reaktywne formy tlenu i ich działanie w organizmie	11
Działania reaktywnych form tlenu i ich ocena	18
III. Bariera antyoksydacyjna	24
IV. Antyoksydacyjne właściwości mleka kobiecego	28
V. Stres oksydacyjny i jego szczególna rola w okresie okołoporodowym	31
VI. Palenie papierosów w okresie ciąży i laktacji	34
Substancje szkodliwe zawarte w dymie	35
Palenie papierosów a przebieg ciąży	36
Palenie papierosów a karmienie piersią	39
Narażenie dzieci na bierne palenie	40
Dym papierosowy a stres oksydacyjny	41
CELE PRACY	45
MATERIAŁY I METODY	46
Wybór grup badanych oraz sposób pobierania materiału	46
Metody analityczne	47
Metody statystyczne	50
WYNIKI	53
I. Charakterystyka badanych grup	53
Liczebność grup oraz wiek badanych kobiet	53
Dane dotyczące ciąży, porodu i noworodka	53
Dane dotyczące palenia papierosów w grupie badanych kobiet	56
II. Porównanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku kobiet palących i niepalących	60
1. Całkowita zdolność antyoksydacyjna w sianie	60
2. Całkowita zdolność antyoksydacyjna w mleku właściwym	61
3. Zmienność całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku kobiecym w czasie trwania laktacji	63
III. Ocena produktów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów w mleku kobiet palących papierosy na podstawie stężeń izoprostanów	65
1. Ocena stężeń izoprostanów w sianie	65
2. Ocena stężeń izoprostanów w mleku właściwym	65

3. Zmienność stężeń izoprostanów w czasie trwania laktacji w mleku kobiecym ...	66
IV. Ocena natężenia stresu oksydacyjnego na podstawie badania wydalania izoprostanów w moczu kobiet palących i niepalących w 30 dniu laktacji.	68
V. Badania u dzieci	73
1. Ocena wpływu palenia papierosów przez matki na natężenie stresu oksydacyjnego u ich dzieci na podstawie badania stężeń izoprostanów w moczu	73
2. Oznaczenia kotyniny w moczu badanych dzieci	74
VI. Ocena zależności między natężeniem stresu oksydacyjnego a właściwościami antyoksydacyjnymi mleka kobiecego	77
1. Zależność między natężeniem stresu oksydacyjnego u matek wyrażonym jako stężenie izoprostanów w moczu a całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku właściwym	77
2. Zależność między natężeniem stresu oksydacyjnego wyrażonym jako stężenie izoprostanów w mleku a całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku	78
VII. Ocena zależności między stężeniem markerów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów w mleku i moczu badanych kobiet	80
VIII. Ocena zależności między natężeniem stresu oksydacyjnego u kobiet i ich dzieci	81
IX. Ocena zależności między właściwościami antyoksydacyjnymi mleka kobiecego (TAS) a natężeniem stresu oksydacyjnego u dzieci	82
WNIOSKI	84
DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW	85
STRESZCZENIE	111
ABSTRACT	114
PIŚMIENNICTWO	117
ZAŁĄCZNIKI	139

WSTĘP

I. Właściwości mleka kobiecego

Optymalne odżywienie noworodka i niemowlęcia zapewnia pokarm matki, który jest zalecany przez Rezolucję WHA jako jedyny rodzaj karmienia w pierwszych sześciu miesiącach życia dziecka. [1] Kontynuowanie karmienia piersią wraz z innymi rodzajami pożywienia zalecane jest minimum do końca dwunastego miesiąca życia. [2] Karmienie piersią, zgodnie ze współczesną wiedzą, jest jedynym sposobem żywienia niemowląt i małych dzieci zapewniający im optymalny stan zdrowia i rozwój, zgodnie ze stanowiskiem Amerykańskiej Akademii Pediatrii z 2005 roku [2]. Pokarm kobiecy jest wyjątkową substancją dostosowującą swój skład w każdej chwili do potrzeb wzrastającego organizmu noworodka i niemowlęcia. W pierwszych trzech dobach po porodzie (siara) ma inne właściwości: jest wodnisty, dominują w nim białka i substancje immunologicznie czynne, jest bardziej energetyczny niż mleko wydzielane później, zapewnia też odporność. Mleko pojawia się zwykle w 3-4 dniu (u kobiet po cięciu cesarskim niekiedy dopiero w piątym dniu). Przez kilka pierwszych dni zwane jest mlekiem przejściowym, następnie od 12-20 doby – właściwym (dojrzałym). Posiada ono zbalansowane właściwości odżywcze, immunologiczne, przeciwzapalne, ochronne oraz antyoksydacyjne związane z przeciwdziałaniem reaktywnym formom tlenu. [3,4] Niezmiernie ważne jest znaczenie emocjonalne naturalnego karmienia, wiążące się z kontaktem matka – dziecko. Karmienie piersią jest pozbawione kosztów, wygodne, proekologiczne, jak również poprzez zmniejszenie liczby zachorowań wśród dzieci – obniża koszty społeczne. [3]

Karmienie naturalne zapewnia dziecku idealnie dostosowane do wieku i potrzeb pożywienie, bowiem skład pokarmu odpowiada

aktualnym potrzebom i możliwościom trawiennym organizmu. Zapewnia ono prawidłowe nawodnienie dziecka, które nie wymaga dodatkowo dopajania, jak to się dzieje przy karmieniu sztucznym. W mleku matki stwierdzono prawidłową proporcję białek do tłuszczów (1:3). Stosunek kazeiny do białek serwatkowych (3:1) jest korzystniejszy niż w mleku innych ssaków, tym samym mleko kobiece jest łatwiej przyswajalne. **Białka** mleka kobiecego to ponad 80 enzymów ułatwiających trawienie składników pokarmowych w przewodzie pokarmowym niemowlęcia. **Tłuszcze** stanowią dobrze przyswajalne źródło energii dla młodego organizmu. Długołańcuchowe, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LC-PUFA: kwas arachidonowy i kwas dokozaheksaenowy) mają wpływ na rozwój mózgu i siatkówki oka. Tłuszcze MCT (medium - chain triglyceride – trójglicerydy średniołańcuchowe) – zwalniają motorykę przewodu pokarmowego, poprawiają wchłanianie pokarmu, a cholesterol wpływa korzystnie na rozwój mózgu, jest składnikiem błon komórkowych, kwasów żółciowych, witaminy D3. **Węglowodany**, w głównej mierze laktoza, stanowią zasoby energetyczne pokarmu kobiecego. Dodatkowo galaktoza wchodzi w skład galaktolipidów niezbędnych do rozwoju OUN, zaś oligosacharydy są prebiotykami, pobudzają wzrost i aktywność korzystnych szczepów bakterii w jelitach dziecka. [3-5]

Pokarm kobiecy zawiera prawie wszystkie poza witaminą D3 niezbędne witaminy w ilościach warunkujących prawidłowy rozwój niemowlęcia. Pokarm matki zawiera również odpowiednią ilość pierwiastków śladowych, a niskie stężenie jonów Na, Cl, K, PO₄, SO₄ działa ochronnie na nerki dziecka nie w pełni jeszcze przystosowane do dużego ładunku osmotycznego. Żelazo zawarte w mleku kobiecym jest przyswajane aż w 50% - 70% dzięki laktoferrynie, która wiążąc żelazo ułatwia jego wchłanianie. Tym samym jest ono w mniejszym

stopniu dostępne dla bakterii chorobotwórczych. Dla porównania żelazo zawarte w mieszankach sztucznych wchłaniane jest zaledwie w 2-7,5%. [3-5]

Pokarm kobiecy zawiera liczne składniki obrony immunologicznej, zarówno swoistej jak i nieswoistej. Należą do nich:

- a) Oligosacharydy – o działaniu prebiotycznym pobudzającym rozwój *Lactobacillus bifidus* w jelitach dziecka
- b) Laktoferryna – o działaniu bakteriobójczym wywieranym poprzez wiązanie żelaza
- c) Lizozym – o działaniu bakteriobójczym związanym z uszkodzaniem ścian komórkowych bakterii
- d) Nukleotydy - zwiększają aktywność komórek NK (Natural Killers)
- e) Cytokiny – powodujące rozwój poszczególnych tkanek i układów
- f) Proteina wiążąca witaminę B12 - Zmniejszająca ilość wolnej witaminy B12 poprzez jej wiązanie, tym samym czyni ją niedostępną dla bakterii przewodu pokarmowego. Witamina B12 jest niezbędna w procesie namnażania bakterii.
- g) Glikoproteina 90K (Mac – 2 – BP) neutralizująca cząsteczki wirusa RSV, przeciwdziałająca chorobom dróg oddechowych
- h) Makrofagi oraz neutrofile o działaniu fagocytarnym w jelicie niemowląt
- i) Limfocyty B i T – składniki swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej
- j) Sekrecyjna immunoglobulina A (SIgA), która pokrywając szczelną warstwą nabłonek jelitowy, ma działanie bakteriobójcze i ochronne przed przenikaniem alergenów. SIgA powstaje w wyniku kontaktu drobnoustrojów z błonami śluzowymi matki wyzwalającymi swoistą reakcję immunologiczną, w czasie której dochodzi do namnażania się komórek plazmatycznych wytwarzających swoiste przeciwciała.

Komórki te, osiedlając się w sąsiedztwie pęcherzyków mlecznych, wydzielają przeciwciała bezpośrednio do mleka. Najwyższe stężenie SIgA w pokarmie obserwuje się w pierwszych dniach po porodzie i w czasie powolnego odstawiania dziecka od piersi. [3-7]

Udowodniono znacznie mniejszą częstość i czas trwania zachorowań wśród dzieci karmionych naturalnie, znacznie mniejszą zachorowalność na niektóre choroby infekcyjne (zapalenie ucha środkowego, posocznice, zapalenie opon mózgowo – rdzeniowych, choroby zakaźne układu oddechowego, moczowego, pokarmowego, chłoniaki). [8-16] Dzieci te mają mniejsze szanse na rozwój choroby atopowej, ryzyko zespołu nagłego zgonu niemowląt (SIDS – Sudden Infant Death Syndrome) jest trzykrotnie mniejsze. [11,17] Dzieci karmione naturalnie lepiej odpowiadają na szczepienia, nie prezentują zaburzeń artykulacyjnych ani wad zgryzu. Karmienie piersią ma również skutki długofalowe: obniża w ciągu dalszych lat życia ryzyko wystąpienia: nadwagi, otyłości, cukrzycy typu I i typu II, astmy, białaczek i chłoniaków. [1] Dorośli karmieni w dzieciństwie piersią mają niższe ryzyko hipercholesterolemii i nadciśnienia tętniczego. [1,10]

Karmienie piersią wywiera również korzystny wpływ dla matek, u których dzięki laktacji występuje szybsza involucja macicy; zaś częstość krwotoków poporodowych, anemii z niedoboru żelaza, nowotworów sutka i nabłonkowego raka jajnika oraz osteoporozy są zdecydowanie niższe. [3] Jednocześnie wydzielana w tym czasie w dużej ilości prolaktyna wpływa łagodząco na nastrój kobiety. Matka odczuwa więcej radości i satysfakcji z macierzyństwa. [3]

Tab. 1. Dowody na korzyści płynące z karmienia piersią dla niemowląt, dzieci, ich matek oraz osób dorosłych w krajach rozwiniętych (wg AAP)

Skutki zdrowotne, w których przypadku karmienie piersią ma efekt protekcyjny			
Materiał dowodowy	Niemowlęta i dzieci	Przewlekłe choroby okresu dziecięcego bądź późniejszego	Matki
Przekonywujący (związki bezwzględnie potwierdzone w metaanalizach bądź badaniach gruntownych)	Choroby przewodu pokarmowego Zapalenie ucha środkowego Choroby układu oddechowego Martwicze zapalenie jelit		Wydłużony powrót do zdrowia po porodzie Skrócony okres niepłodności poporodowej Rak sutka w okresie premenopauzalnym
Prawdopodobny (większość prac potwierdza związek, lecz wymagane jest potwierdzenie)	Obniżone zdolności poznawcze Astma i alergie Białaczki Zakażenia dróg moczowych Nieswoiste zapalenia jelit Celiakia Zespół nagłej śmierci niemowląt	Otyłość	Rak sutka w okresie postmenopauzalnym Rak jajnika Reumatoidalne zapalenie stawów
Możliwy (zbyt niewielka ilość metodologicznie prawidłowych prac)	Cukrzyca insulinozależna Posocznica Zapalenie opon mózgowo – rdzeniowych Opóźnione wyrzynanie zębów	Niedokrwienność choroba serca Miażdżycy Cukrzyca typu II Zespół metaboliczny	Depresja poporodowa Ograniczone więzi matka – dziecko Rak endometrium Opóźnienie powrotu do wagi sprzed ciąży Osteoporoza i złamania kości

Bezpośredni kontakt matki z dzieckiem podczas karmienia oraz ich wzajemne oddziaływanie stymulują psychiczny rozwój dziecka poprzez kontakt wzrokowy z matką, bliskość jej ciała, częstą zmianę pozycji podczas karmienia. Wytwarzane w trakcie karmienia silne relacje matka – dziecko wpływają na pozytywne emocje w rodzinie. Nie bez znaczenia jest również aspekt ekonomiczny (mniejsze koszty żywienia dzieci, redukcja wydatków na leczenie). Jednocześnie stwierdzono, iż dzieci karmione piersią mają w przyszłości nieco lepszy rozwój funkcji poznawczych [2], rozwój psychomotoryczny [10], wyższy iloraz inteligencji [18], osiągają lepsze, od dzieci karmionych sztucznie, wyniki w testach badających inteligencję. [19]

Pokarm naturalny odgrywa również istotną rolę w utrzymywaniu równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej w organizmie dziecka. Za reakcje utleniania odpowiedzialne są tzw. reaktywne formy tlenu (RFT).

II. Reaktywne formy tlenu i ich działanie w organizmie

Tlen – pierwiastek obecny od 3,5 miliarda lat na Ziemi, stanowi około 25% masy Ziemi, w formie związków z innymi metalami oraz jako tlen wolny. Głównym tlenkiem niezbędnym do życia jest tlenek wodoru - główny składnik organizmów dorosłych ssaków (60-70% masy ciała). Jako tlen wolny – składnik atmosfery bądź gaz rozpuszczony w wodzie stanowi 21% objętości w dolnych partiach atmosfery i jest niezbędny do procesów oddychania organizmów aerobowych tzw. tlenowców. [20]

Ilości energii uzyskiwane na drodze oddychania tlenowego w mitochondriach są znacznie większe niż w procesach fermentacyjnych zachodzących w cytoplazmie. Korzyści stąd płynące przewyższają straty powodowane przez właściwości tlenu uszkadzające składniki komórek. Tlen jest bowiem pierwiastkiem toksycznym: dla bezwzględnych beztlenowców (np. *Clostridium tetani*) już w mikroskopijnych ilościach, dla tlenowców w wyższych stężeniach niż obecne w atmosferze: np. dla muszki owocowej z gatunku *Drosophila melanogaster* jest letalny pod ciśnieniem 1 atmosfery. Organizm człowieka również ulega skutkom toksycznym przy wyższych stężeniach tlenu. Narządami najbardziej wrażliwymi są **płuca i oczy**. Dłuższa ekspozycja na czysty tlen **uszkadza pęcherzyki płucne**, powodując ich obrzęk, następnie obumieranie nabłonka wyściełającego, wzmożone wytwarzanie kolagenu, co w ostateczności doprowadza do zwłóknienia płuc. Wpływ nadmiernego podawania tlenu wcześniakom w inkubatorach doprowadza do **retinopatii, czyli zwłóknienia pozasoczewkowego**. Równie wrażliwy jest układ nerwowy: znane są przypadki wystąpienia drgawek czy trwałego uszkodzenia mózgu i rdzenia po nagłym narażeniu na wysokie ciśnienia tlenu. Opisywano również przypadki krwotoków

do ucha wewnętrznego i głuchoty spowodowanych leczeniem w komorach hiperbarycznych. [20]

Głównymi sprawcami toksyczności tlenu są tzw. reaktywne formy tlenu, czyli wysoce aktywne chemicznie produkty redukcji i wzbudzenia cząsteczki tlenu. Zalicza się do nich produkty jedno-, dwu-, i trójstopniowej redukcji wody oraz tlen singletowy. [21] [tab. 2]

Tab. 2. Reaktywne formy tlenu.

anionorodnik ponadtlenkowy w roztworach wodnych znajdujący się w równowadze ze swą bardziej aktywną formą - rodnikiem wodoronadtlenkowym $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HO}_2^{\cdot} \text{ (pK = 4,8)}$
nadtlenek wodoru - H_2O_2
rodnik hydroksylowy - $\cdot\text{OH}$ o silnych właściwościach utleniających $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$
ozon - O_3
tlenek azotu - $\text{NO}\cdot$ i nadtlenoazotyn - $\text{ONOO}\cdot$
rodniki organiczne
tlen singletowy - $^1\text{O}_2$

Są one w warunkach fizjologicznych produkowane w organizmie w sposób ciągły. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu jest mitochondrialny łańcuch oddechowy, gdzie odbywa się enzymatyczna redukcja tlenu atmosferycznego do cząsteczki wody [21]. Jednak część elektronów przepływających przez elementy łańcucha oddechowego „wycieka” w postaci zredukowanych form koenzymu Q i jego dehydrogenazy [21]. „Wyciekające” elektrony wchodzi w reakcje z tlenem tworząc jego tzw. reaktywne formy. Znaczna ilość reaktywnych form tlenu powstaje również w peroksysomach, mikrosomalnym

łańcuchu elektronów, w którym utleniane są substancje pochodzące ze środowiska: leki, składniki pożywienia, pestycydy itp. (zwane ksenobiotykami). Powstawanie reaktywnych form tlenu towarzyszy wielu reakcjom w organizmie katalizowanym przez oksydazy, m. in. reakcjom kaskady kwasu arachidonowego, przemianom kwasu moczowego, aldehydów oraz autooksydacji amin katecholowych. Tworzeniu anionorodnika ponadtlenkowego sprzyja również utlenianie białek oddechowych tj. hemo- i mioglobiny. Liczne komórki zaangażowane w procesie zapalnym (neutrofile, eozynofile, monocyty i makrofagi), w trakcie tzw. „wybuchu tlenowego”, do którego dochodzi **w procesach fagocytozy**, generują duże ilości RFT. Proces ten jest bezwzględnie konieczny w walce z mikroorganizmami patogennymi oraz pewnymi niepożądanymi cząsteczkami. Polega on na otoczeniu, zabiciu oraz wchłonięciu mikroorganizmu (głównie bakterii). Nie byłby on możliwy gdyby nie ogromne ilości wolnych rodników. Pojawiające się na zewnątrz fagocyta cząsteczki anionorodnika ponadtlenkowego, reagują ze sobą tworząc **nadtlenek wodoru**, posiadający **własności przeciwbakteryjne**. W ziarnistościach azurofilnych granulocytów obojętnochłonnych obecna jest mieloperoksydaza, katalizująca reakcję utleniania jonów chlorkowych do kwasu podchlorawego, który wywiera działanie bakteriobójcze poprzez reagowanie z enzymami istotnymi dla życia komórek. [22] [zał. 1]

Synteza RFT w organizmie pobudzana jest również poprzez działanie czynników zewnętrznych takich jak promieniowanie jonizujące i widzialne, ultradźwięki, światło słoneczne, wysokie temperatury, substancje wdychane z powietrzem (dym papierosowy, ozon, tlenki azotu) oraz ksenobiotyki (alloksan, dikwat, parakwat, środki ochrony roślin czy substancje konserwujące żywność). [23]

Reaktywne formy tlenu poza procesami fagocytozy pełnią jeszcze kilka innych pozytywnych dla organizmu funkcji. Poprzez szybsze niszczenie erytrocytów przeciwdziałają rozwojowi zarodźca malarii, bakteriobójczo działają aktywnie wydzielane do śliny czy mleka podtociocyaniny. Działanie wielu leków oparte jest także na produkcji wolnych rodników, m.in. rifamycyny, maści stosowanych w opryszczce, psoralenów. Fototerapia stosowana w leczeniu żółtaczki noworodków wykorzystuje tlen singletowy. [20]

Reaktywne formy tlenu w wyniku wysokiej reaktywności chemicznej łatwo wchodzi w reakcje chemiczne, w wyniku których dochodzi do utleniania związków chemicznych prowadzące do zmiany ich budowy oraz funkcji. Znanych jest wiele efektów uszkodzania komórek. [tab.3]

Uszkodzeniu oksydacyjnemu ulegają lipidy, białka, kwasy nukleinowe i wodorowęglany.

Peroksydacja lipidów to najbardziej znany biologiczny łańcuchowy proces wolnorodnikowy utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów. Powstają w jego trakcie nadtlarki tych związków. Pod wpływem działania cząsteczek rodników tlenowych i organicznych, kompleksów żelaza dwu- i trójwartościowego, tlenków azotu i siarki dochodzi do oderwania wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego i powstania wolnego rodnika alkilowego, który następnie w reakcji z tlenem tworzy wolne rodniki nadtlarkowe. Te zaś zdolne są do odrywania atomów wodoru od kolejnych cząsteczek kwasów tłuszczowych i tym samym doprowadzają do szerzenia się procesów peroksydacji. W wyniku reakcji między dwoma rodnikami dochodzi do terminacji procesu. [tab.4] [20]

Tab. 3. Niektóre efekty działania reaktywnych form tlenu na komórki i ich składniki (wg Bartosza)

Niektóre efekty działania reaktywnych form tlenu na komórki i ich składniki
❖ Utlenianie związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian, nukleotydy nikotynoamidoadeninowe) ❖ Degradacja kolagenu ❖ Depolimeryzacja kwasu hialuronowego ❖ Pogorszenie funkcji surfaktantu płucnego ❖ Utlenienie hemoglobiny ❖ Inaktywacja enzymów i białek transportowych ❖ Zaburzenia syntezy proteoglikanu ❖ Pęknięcia nici DNA, uszkodzenie zasad DNA, degradacja rybozy ❖ Uszkodzenia rybosomów ❖ Peroksydacja lipidów błony ❖ Liza erytrocytów ❖ Inhibicja fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach ❖ Zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} ❖ Zaburzenia struktury cytoszkieletu (polimeryzacja aktyny, rozerwanie mikrofilamentów) ❖ Modyfikacja właściwości antygenowych komórek ❖ Agregacja płytek krwi ❖ Zmiany morfologii komórek ❖ Powstawanie mutacji ❖ Transformacja nowotworowa komórek

Tab. 4. Peroksydacja lipidów (wg Bartosza) [LH wielonienasycony kwas tłuszczowy, $\cdot\text{OH}$ rodnik hydroksylowy, $\text{L}\cdot$ wolny rodnik alkilowy, $\text{LOO}\cdot$ wolny rodnik nadtlenkowy, $\text{L} - \text{L}$ dimer kwasów tłuszczowych, $\text{L} = \text{O}$ oksokwas tłuszczowy, LOH hydroksykwas tłuszczowy]

1) Inicjacja	$\text{LH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$
2) Propagacja	$\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$
3) Terminacja	$\text{L}\cdot + \text{L}\cdot \rightarrow \text{L} - \text{L}$ $\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{L} = \text{O} + \text{LOH} + \text{O}_2$ $\text{LOO}\cdot + \text{L}\cdot \rightarrow \text{L} = \text{O} + \text{LOH}$

Powstałe produkty końcowe: dimery kwasów tłuszczowych, okso- lub hydroksykwasy tłuszczowe to zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów, powodujące m.in. zmiany struktury dwuwarstwowej błony komórkowej oraz błon wewnątrzkomórkowych, co zaburza ich przepuszczalność. Przy braku mechanizmów przeciwutleniających dochodzi do nieodwracalnych zmian w obrębie błon komórkowych a w konsekwencji do śmierci komórki.

Inne produkty peroksydacji lipidów powstające wskutek dalszych przemian m.in. β -eliminacji (polegającej na przesunięciu protonu z atomu węgla tzw. β i utworzeniu wiązania podwójnego), to kilku- i kilkunastowęglowe fragmenty tj. aldehydy i węglowodory. Najbardziej znane to:

* **dialdehyd malonowy (MDA)**, związek o wysokiej cytotoksyczności, przejawia działania mutagenne i kancerogenne, 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, ale mało specyficznej),

* **4 – hydroksy – trans - nonenal**, wpływający na proliferację komórek, o działaniach genotoksycznych, klastogennych, chemotaktycznych i stymulujących fosfolipazę C,

* inne aldehydy i węglowodory (etan, pentan). [20]

Aldehydowe produkty peroksydacji jak i nadtlarki kwasów tłuszczowych rozprzegają fosforylację oksydacyjną w mitochondriach.

Uszkodzenia wolnorodnikowe białek obecnych w błonie komórkowej powodują zaburzenia funkcji przenośników białkowych, białek antygenowych i receptorów. 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 zawarte w dymie papierosowym prowadzi do przewlekłej obturacyjnej choroby płuc u osób palących, zaś w przypadku osób cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów stres oksydacyjny uszkadzający alfa – 1 antyproteinazę prowadzi do zmian w obrębie mazi stawowej. Białka pod wpływem reaktywnych form tlenu (głównie rodnika hydroksylowego) tworzą rodniki białkowe, które następnie po przyłączeniu cząsteczki tlenu tworzą rodniki nadtlarku białka. Oznaczanie grup karbonylowych stanowi czułą metodę oceny uszkodzenia oksydacyjnego białek. [20]

Kwasy nukleinowe są najmniej podatne na działanie reaktywnych form tlenu. Wynika to zapewne ze szczególnej ochrony materiału genetycznego w komórce. Nie mniej jednak w przypadku dużego nasilenia reakcji wolnorodnikowych dochodzi do ich uszkodzeń, głównie zasad purynowych i pirymidynowych, reszt cukrowych oraz rozrywania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy, co

w konsekwencji prowadzi do pęknięcia nici kwasów nukleinowych. W wyniku powyższych zmian **dochodzi do mutacji punktowych, delecji, pęknięcia chromosomów oraz amplifikacji genów.** [20] Zjawiska te mogą być szczególnie niebezpieczne podczas tworzenia gamet i tym samym uszkodzony materiał genetyczny może być przekazywany potomstwu, prowadząc **do powstawania wad genetycznych.** Zmiany te mogą również prowadzić do zaburzeń kontroli podziałów materiału genetycznego, prowadząc do onkogenezy. Jednocześnie DNA uszkodzony przez reaktywne formy tlenu jest silniej immunogeny, co stymuluje powstawanie autoprzeciwciał, m.in. w grupie układowych chorób tkanki łącznej.

Uszkodzenia wolnorodnikowe węglowodanów polegają głównie na uszkodzeniu reszt glikolipidów i glikoprotein, powodując zmianę ich właściwości antygenowych. Może to prowadzić do zmniejszenia ich trwałości, funkcjonalności, jak również powstawania autoprzeciwciał. Istotnym problemem jest depolimeryzacja kwasu hialuronowego, głównego składnika mazi stawowej, powstająca pod wpływem stresu oksydacyjnego obserwowana w chorobach zapalnych tkanki łącznej.

Działania reaktywnych form tlenu i ich ocena

W związku ze swymi działaniami niepożądanymi, wolne rodniki tlenowe **uczestniczą w patogenezie wielu chorób.** Lista jednostek chorobowych, w których udowodniono sprawczy, negatywny wpływ reaktywnych form tlenu wciąż rośnie. Wskazuje się na rolę stresu oksydacyjnego m.in. **w chorobach związanych z wcześniactwem, takich jak dysplazja oskrzelowo płucna, retinopatia wcześniacza czy martwicze zapalenie jelit.** [24-27] [tab.5]

Ocena natężenia reakcji wolnorodnikowych jest trudna. Jediną metodą pozwalającą na pomiar stężeń wolnych rodników jest

elektronowy rezonans spinowy. Okresy półtrwania reaktywnych form tlenu są bardzo krótkie [$T_{1/2}(\cdot\text{OH}) - 10^{-9}\text{s}$, $T_{1/2}(\text{ROO}\cdot) - 7\text{s}$].

Alternatywę dla pomiaru wolnych rodników stanowi pomiar stężenia produktów wolnorodnikowych uszkodzeń **białek** [28-30], **lipidów** [31,32] czy **DNA** [33,34].

Do oceny uszkodzeń **białek** najczęściej wykorzystuje się oznaczanie w płynach biologicznych **zawartości grup karbonylowych** w reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNFH) w silnie kwaśnym środowisku przy użyciu metod spektrofotometrycznej bądź elektroforetycznej przy użyciu specyficznych przeciwciał. Inne znane metody to: pomiar zawartości grup tiolowych, aminowych, tryptofanowych i innych. Zawartość konkretnych produktów oksydacyjnej modyfikacji białek oznaczana jest metodami chromatografii cieczowej. [20]

W odniesieniu do produktów wolnorodnikowych uszkodzeń **lipidów** dotychczas stosowane były głównie metody o dużej czułości, jednak dość niskiej swoistości, takie jak: reakcja barwna aldehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym, pomiar stężenia nadtlenków lipidów, sprzężonych dienów czy uwalniania alkanów. [20]

Tab. 5. Choroby, w których etiopatogenezie postulowano udział RFT (wg Bartosza)

Choroby, w których etiopatogenezie postulowano udział RFT	
❖ AIDS ❖ Alkaptonuria ❖ Anemia Fanconiego, anemia sierpowata ❖ Astma ❖ Choroba alkoholowa ❖ Choroba Alzheimera ❖ Choroba niedokrwienna serca ❖ Choroba Parkinsona ❖ Choroba popromienna ❖ Choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy ❖ Choroby autoimmunologiczne ❖ Cukrzyca ❖ Dystrofia mięśniowa ❖ Dysplazja oskrzelowo – płucna ❖ Fawizm ❖ Grypa ❖ Hemochromatoza samoistna ❖ Jaskra ❖ Kardiomiopatia polekowa i poalkoholowa ❖ Kontaktowe zapalenie skóry ❖ Kwashiorkor ❖ Martwicze zapalenie jelit ❖ Miażdżycza ❖ Nadczynność tarczycy ❖ Niedobór witaminy E	❖ Nowotwory ❖ Oparzenie ❖ Ostre zapalenie trzustki ❖ Porfiria ❖ Retinopatia wcześniacza ❖ Reumatoidalne zapalenie stawów ❖ Retinopatie ❖ Rozedma płuc ❖ Schizofrenia ❖ Stany przedrzucawkowe ❖ Stwardnienie rozsiane ❖ Talasemia ❖ Toczeń rumieniowaty ❖ Zaćma ❖ Zapalenie kłębuszków nerkowych ❖ Zapalenie naczyń krwionośnych ❖ Zapalenie opon mózgowych ❖ Zatrucia chlorowcoalkanami, endotoksynami bakteryjnymi, metalami ciężkimi ❖ Zawał serca ❖ Zespół błon szklistych ❖ Zespół Downa ❖ Zespoły przyspieszonego starzenia się

W ostatnim czasie odkryto izoprostany – pochodne prostaglandyn powstające w organizmie podczas wolnorodnikowej peroksydacji kwasu arachidonowego w cyklu niezależnym od enzymów cyklooksygenazy. Do ich produkcji nie jest wymagany wolny kwas arachidonowy, gdyż są one formowane w fosfolipidach błon i uwalniane dzięki fosfolipazie A₂. Istnieje wiele klas izoprostanów oznaczanych dużymi literami alfabetu w celu podkreślenia ich podobieństwa do poszczególnych prostaglandyn. Na szczególną uwagę zasługują F₂-izoprostany (F₂-IsoP), grupa 64 związków izomerycznych podobna w swej budowie do prostaglandyn PGF_{2α} odkryta w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia *in vivo*. [35-37] Najszerzej poznanym i najczęściej wykorzystywanym w badaniach jest 15-F_{2t}-IsoP zwany inaczej 8-izo- PGF_{2α}. W przeciwieństwie do innych izoprostanów rozpoznano podstawowy metabolit tego związku u ludzi. Jest nim występujący w moczu 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-izo-PGF_{2α}. [35]

Poznano również działania biologiczne izoprostanów: zmiany w integralności błon komórkowych, zwężenie naczyń w nerkowym i płucnym układzie krążenia, indukowanie syntezy DNA w komórkach mięśni gładkich, stymulacja mitogenezy i modyfikacja funkcji płytek krwi. Z uwagi na swą stabilność chemiczną, brak zależności od spożywanej diety, wysokie stężenia wykrywane w tkankach i płynach biologicznych, powstawanie *in vivo* jako specyficzny produkt peroksydacji lipidów oraz narastanie stężeń u zwierząt doświadczalnych pod wpływem stresu oksydacyjnego, izoprostany wydają się być idealnym markerem jego natężenia [26,27,38]. Oznaczanie stężeń izoprostanów w moczu wydaje się być chętnie stosowane również dzięki dodatkowym właściwościom: stężenia izoprostanów w moczu są kilkadziesiąt razy wyższe niż w osoczu, a zarazem nie stwierdzono

in vitro tworzenia tych związków w procesach autooksydacji. Wzrost stężeń izoprostanów w tkankach i licznych płynach ustrojowych (osocze, mocz, płyn mózgowo – rdzeniowy, płyn owodniowy), a nawet wydychanym powietrzu potwierdziło rolę stresu oksydacyjnego w licznych chorobach i stanach patologicznych. [tab. 6] [39-45] Szczególnie często stwierdzano zależność między paleniem papierosów zarówno czynnym jak i biernym a wzrostem stężenia izoprostanów w surowicy i moczu palaczy. [35-37,39-42,45]

Ocena wolnorodnikowych uszkodzeń **kwasów nukleinowych** opiera się głównie na pomiarach 8 – hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) w płynach ustrojowych. [33,34]

Tab. 6. Zaburzenia i czynniki patofizjologiczne, w których pomiar F2-Izoprostanów udowodnił rolę stresu oksydacyjnego u ludzi (wg Montuschi)

Choroby układu krążenia ❖ Miażdżyca ❖ Niedokrwienie/reperfuzja ❖ Choroba niedokrwienna serca, zawał mięśnia sercowego ❖ Choroby naczyń nerkowych	Choroby płuc ❖ Astma oskrzelowa ❖ Przewlekła obturacyjna choroba płuc ❖ Mukowiscydoza ❖ Choroby śródmiąższowe płuc ❖ Zespół zaburzeń oddychania
Czynniki ryzyka chorób układu krążenia ❖ Palenie papierosów ❖ Hipercholesterolemia ❖ Cukrzyca ❖ Hiperhomocysteinemia ❖ Płeć męska ❖ Otyłość Powikłania położnicze ❖ Stany przedrzucawkowe ❖ Przedwczesne porody ❖ Dystrofia wewnątrzmaciczna	Choroby nerek ❖ Hemodializa ❖ Niewydolność nerek w przebiegu rabdomiolizy Choroby wątroby ❖ Ostre i przewlekłe alkoholowe choroby wątroby ❖ Zespół wątrobowo - nerkowy ❖ Pierwotna marskość żółciowa wątroby ❖ Przeszczep wątroby
Choroby OUN ❖ Choroba Alzheimera ❖ Krwawienie podpajęczne ❖ Płásawica Huntingtona ❖ Stwardnienie rozsiane ❖ Choroba Creutzfeld – Jacoba	Inne ❖ Twardzina ❖ Zespół Downa ❖ Choroba Leśniowskiego – Crohna ❖ Zespół przewlekłego zmęczenia ❖ Osteoporoza ❖ Układowy toczeń rumieniowaty

III. Bariera antyoksydacyjna

Z uwagi na ciągłe narażenie swych komórek na uszkodzenia wywołane działaniem reaktywnych form tlenu organizmy mające styczność z tlenem wykształciły mechanizmy obronne, chroniące je przed niekorzystnymi skutkami opisanymi powyżej. Ten system obrony organizmów tlenowych przed niekorzystnym działaniem reaktywnych form tlenu to bariera antyoksydacyjna (BA). [46]

W skład bariery antyoksydacyjnej wchodzi **enzymy** oraz **elementy nieenzymantyczne**.

Enzymy katalizują reakcje unieczynniania reaktywnych form tlenu. Główne enzymy antyoksydacyjne to:

- * **dysmutaza ponadtlenkowa** - katalizująca reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, w organizmach ssaków występująca w trzech rodzajach: **cytoplazmatycznej** zawierającej w swoich centrach aktywnych jony miedzi i cynku, **mitochondrialnej** zawierającej jony manganu, **pozakomórkowej** zawierającej jony Cu i Zn oraz reszty sacharydowe.

- * **peroksydaza glutationowa** - enzym seleno-zależny, katalizujący reakcję pomiędzy glutationem i nadtlenkiem wodoru, prowadząc tym samym do unieczynnienia nadtlenku. W wyniku tej reakcji powstaje jednak disulfid glutationu (GSSG) - związek potencjalnie utleniający grupy tiolowe białek.

- * **reduktaza glutationu** - katalizująca reakcję mającą na celu przemianę disulfidu glutationu z powrotem do glutationu kosztem utlenienia NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego)

- * **katalaza** - katalizująca reakcję dysproporcjonowania nadtlenku wodoru do cząsteczek wody. [20]

Równie istotną rolę pełnią białka wiążące jony metali żelaza i miedzi, takie jak transferryna, laktoferryna (szczególnie aktywna w mleku), ceruloplazmina, metalotioneina, albumina i haptoglobina. [20]

Nieenzymatyczne składniki bariery antyoksydacyjnej możemy podzielić na rozpuszczalne w tłuszczach (hydrofobowe) - chroniące wnętrze błon komórkowych oraz rozpuszczalne w wodzie (hydrofilowe) - chroniące środowisko wodne.

Do hydrofobowych antyoksydantów zaliczamy:

- * **alfa-tokoferol (witamina E)** – najważniejszy antyoksydant występujący w błonach komórkowych i lipoproteinach osocza. Jego działanie antyoksydacyjne polega na „zmiataniu” wtórnych wolnych rodników organicznych i terminacji reakcji peroksydacji lipidów poprzez szybkie wiązanie z organicznymi rodnikami nadtlenkowymi i wytworzenie mało reaktywnego rodnika tokoferylowego. Niedobór witaminy E u człowieka powoduje skrócenie czasu życia erytrocytów, zaburzenia neurologiczne, choroby mięśni i zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego, zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia.

- * **beta-karoten i trans – retinol (prowitamina i witamina A)** i inne karotenoidy - są efektywnymi „wygaszczaczami” aktywności tlenu singletowego i reagują z organicznymi wolnymi rodnikami powstającymi w procesie peroksydacji lipidów. Ich działanie w organizmie to podtrzymywanie wzrostu, reprodukcji, procesu widzenia, różnicowania nabłonka, procesów mielinizacji oraz działanie przeciwnowotworowe.

- * **koenzym Q (ubihydrochinon)** – chroniący lipoproteiny o małej gęstości przed peroksydacją skuteczniej od wyżej wymienionych witamin A i E, ważny czynnik zapobiegający miażdżycy.

* **cholesterol i jego pochodne (prowitamina i witamina D3)** jako istotne składniki błon komórkowych – ich działanie antyoksydacyjne jest zauważalne dopiero przy dużych stężeniach.

* **żeńskie hormony płciowe, pochodne estronu i estradiolu** przejawiające także działanie antyoksydacyjne. [20]

Hydrofilowe antyoksydanty to:

* **witamina C (askorbinian)** – związek niesyntetyzowany w organizmach naczelnych, przeciwdziałający szkorbutowi, o działaniu zarówno anty- jak i prooksydacyjnym. Istnieje w formie sprzężonej z produktem utleniania tj. dehydroaskorbinianem, który może ulegać dalszym nieodwracalnym przemianom do kwasu diokso – L – gulonowego. W obecności jonów metali przejściowych, takich jak żelazo czy miedź bądź kobalt i nikiel, askorbinian może stymulować reakcje prooksydacyjne. Dehydroaskorbinian powoduje hemolizę, może uszkadzać komórki β -trzustki, inaktywować białka. Jednocześnie stymuluje aktywność enzymów cyklu pentozowego, podwyższa poziom glutationu, chroni soczewki przed działaniem nadtlenu wodoru. Najistotniejszą zaletą askorbinianu wydaje się jednak ochrona antyoksydacyjna DNA, szczególnie w nasieniu. [47]

* **glutation** – główny składnik wewnątrzkomórkowego buforu redoks, występujący głównie w formie zredukowanej chroniący grupy tiolowe białek przed działaniem wolnych rodników tlenowych; substrat reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationu.

* **cysteina,**

* **kwas moczowy** – występujący w fizjologicznym zakresie pH głównie jako anion moczanowy reagujący z oksydantami i wiążący jony żelaza. Jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza. Występuje w dużych stężeniach w tkankach

narażonych na intensywne działanie oksydantów: w śluzówce jelita, śródbłonku, hepatocytach. Produktem jego utleniania jest alantoina.

* **kreatynina**,

* **neopteryna** – niedawno odkryta pterydyna obecna m.in. w mleczku pszczelim, marker aktywacji układu odpornościowego, antyoksydant.

Współdział poszczególnych antyoksydantów w inaktywacji reaktywnych form tlenu bądź unieczynniania czynników utleniających jest trudny do oszacowania, stanowią one szczególny system obrony antyoksydacyjnej. Dlatego też często miarą ich aktywności nie jest oznaczanie aktywności poszczególnych substancji, ale **całkowitej zdolności antoksydacyjnej (Total Antioxidant Status - TAS)**, rozumianej jako wypadkowa zdolność badanego materiału do przeciwdziałania określonej reakcji utlenienia. [48]

IV. Antyoksydacyjne właściwości mleka kobiecego

Mleko kobiece jako jeden z płynów ustrojowych o szczególnym znaczeniu ochronnym dla potomstwa posiada określoną zdolność antyoksydacyjną. Dowodem na to jest spontaniczna redukcja cytochromu c w mleku. [49] Nieznana jest jeszcze kompletna lista antyoksydantów zawartych w mleku kobiecym i konieczne są dalsze badania w tym kierunku. Stwierdzono na przykład, że jeden z ostatnio odkrytych składników mleka kobiecego, chinon pirochinoliny (PQQ), posiada również aktywność antyoksydacyjną. [50] Mleko zawiera długą listę uznanych antyoksydantów: cysteinę, kwas moczowy, kwas askorbinowy, β -karotenoidy, α -tokoferol i glutation. [51-53] Zawiera również laktoferryne – białko wiążące żelazo, które nie tylko jest niezbędne w procesach rozmnażania bakterii, ale w kontekście przeciwdziałania reaktywnym formom tlenu, jest katalizatorem reakcji utleniania. Dlatego postulowane jest dodawanie rekombinowanej ludzkiej laktoferryny do mieszanek mlecznych zawierających znaczne ilości żelaza. [54]

W badaniach *in vitro* potwierdzono już korzystne działanie antyoksydacyjne laktoferryny po jej dodaniu do mieszanek mlecznych, co skutkowało znacznym zmniejszeniem uszkodzeń oksydacyjnych w mieszankach. [55]

Mimo wykazania różnych składników bariery antyoksydacyjnej w pokarmie naturalnym, ich stężenia różnią się znacząco w zależności od tygodnia ciąży, w którym nastąpił poród, czasu trwania laktacji, diety matki karmiącej, przyjmowania preparatów witaminowych w ciąży i w czasie laktacji, ale również od regionu geograficznego, w którym ona mieszka. [56-60]

Stężenia takich antyoksydantów jak witamina A, karotenoidy, α -tokoferol i glutation są najwyższe w siarze, z czasem trwania laktacji

ich stężenia stopniowo obniżają się. [61-63] Alberti – Fidanza wykazał, iż całkowita zdolność antyoksydacyjna w sianie jest najwyższa i z czasem laktacji maleje [56].

Stężenia seleniu, cynku i miedzi – mikroelementów będących kofaktorami enzymów antyoksydacyjnych obecnych w ich aktywnych centrach również maleją wraz z czasem trwania laktacji. [64]

Istotnymi składnikami bariery antyoksydacyjnej w pokarmie naturalnym są **enzymy**, stwierdzono, że co najmniej trzy główne tzn. katalaza, dysmutaza nadtlenkowa i peroksydaza glutationowa obecne są w mleku kobiecym. Aktywność katalazy w mleku kobiecym jest 10-krotnie wyższa niż w mleku krowim [65] i maleje wraz z czasem trwania laktacji [66]. Z kolei aktywność dysmutazy nadtlenkowej jest 10-25-krotnie wyższa w mleku niż w surowicy krwi matki, a aktywność peroksydazy glutationowej 2-5-krotnie wyższa. [67] Co ciekawe, aktywność tych dwóch ostatnich enzymów rośnie wraz z czasem trwania laktacji, inaczej niż jest to obserwowane w przypadku nieenzymatycznych składników bariery antyoksydacyjnej. [67] Sugerowałoby to jednak znaczący wpływ nieenzymatycznych antyoksydantów i katalazy na całkowitą zdolność antyoksydacyjną w pokarmie naturalnym, odnosząc się do pracy Alberti – Fidanza i wsp., szczególnie w sianie.

Dzięki zawartości licznych antyoksydantów o zróżnicowanym mechanizmie działania, **pokarm naturalny zapewnia lepszą od pokarmu sztucznego ochronę przed niekorzystnym wpływem reaktywnych form tlenu.** [66] Mleko matek dzieci urodzonych przedwcześnie zapewnia podobną ochronę jak mleko matek dzieci urodzonych w terminie. [66] Aczkolwiek aktywność dysmutazy

ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej jest wyższa w mleku matek dzieci urodzonych przedwcześnie. [67]

Zdolność antyoksydacyjna mleka kobiecego zmienia się również wraz z ewentualnym czasem jego przechowywania. Częściowo w związku z aktywnością zawodową matek coraz popularniejsze staje się obecnie magazynowanie pokarmu naturalnego. Niestety, przechowywanie pokarmu obniża zdolność antyoksydacyjną pokarmu. Stwierdzono, że zmniejsza się zawartość aktywnej witaminy C w mleku. Po 24 godzinach przechowywania 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 wyjściowego w świeżym pokarmie. [69] U dzieci karmionych głównie pokarmem przechowywanym wskazana wydaje się 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 szczególnie ważne. O nasileniu reakcji wolnorodnikowych u tych dzieci powstało już wiele prac, a niedobory witamin o działaniu antyoksydacyjnym w szczególności witamin A i E spowodowały umieszczenie w standardach suplementacji tych substancji.

Jednocześnie wiadomo, że już nawet 2- godzinne przechowywanie mleka zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w lodówce czy zamrażarce w znaczący sposób obniża zawartość również innego ważnego antyoksydanta - glutationu [61], a przechowywanie pokarmu naturalnego prowadzi do zwiększenia stężenia obecnych w nim produktów utleniania lipidów. [70]

V. Stres oksydacyjny i jego szczególna rola w okresie okołoporodowym

W warunkach fizjologicznych, w organizmie utrzymywana jest równowaga pomiędzy stężeniami reaktywnych form tlenu uszkadzającymi składniki komórkowe a stężeniami antyoksydantów przeciwdziałającymi tym reakcjom. Zaburzenie tej równowagi, poprzez zwiększenie szybkości wytwarzania RFT, bądź osłabienia bariery antyoksydacyjnej prowadzą do zwiększenia ilości reakcji indukowanych przez RFT i nosi nazwę **stresu oksydacyjnego**.

Po urodzeniu znacznie **zwiększa się ekspozycja** organizmu na reaktywne formy tlenu. W szczególności dotyczy to **dzieci przedwcześnie urodzonych** oraz tych, u których w wyniku powikłań okresu okołoporodowego stosowano terapię tlenową. [71] Produkty peroksydacji lipidów są najwyższe w surowicy krwi dzieci tuż po porodzie i z czasem stopniowo maleją. [66] Tak gwałtowna ekspozycja na tlen atmosferyczny po porodzie oraz izolacja od matczynego systemu obrony przeciwutleniającej skutkuje tym, iż w pierwszym dniu po porodzie aktywność enzymatycznych składników bariery antyoksydacyjnej (peroksydazy glutationowej i katalazy) jest wyraźnie niższa niż u osób dorosłych. [72] Jednocześnie u noworodka stosunkowo szybko dochodzi do rozwoju aktywności bariery antyoksydacyjnej pod wpływem zaistniałego stresu. Mimo to pierwsze dni życia są wyraźnie nacechowane niedoborami antyoksydantów i nasileniem reakcji wolnorodnikowych.

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 [70], choć nie wpływa to na poziom całkowitej

zdolności antyoksydacyjnej, [73] 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. [74]

Badania ostatnich lat dostarczyły bezpośrednich dowodów na to, że **zawarte w mleku kobiecym antyoksydanty zwiększają wydolność bariery antyoksydacyjnej w surowicy krwi u dzieci**. U wcześniaków karmionych piersią całkowita aktywność antyoksydacyjna badana w surowicy krwi jest istotnie wyższa niż u dzieci karmionych sztucznie. [68,75] Stwierdzono również, że stężenie karotenoidów obecnych we krwi u dzieci karmionych naturalnie systematycznie wzrasta po porodzie, podczas gdy u dzieci karmionych sztucznie stopniowo obniża się. [53]

W grupie dzieci przedwcześnie urodzonych, u których **stres oksydacyjny w dużym stopniu jest odpowiedzialny za powstawanie powikłań wcześniactwa**: dysplazji oskrzelowo-płucnej, retinopatii wcześniaczej i martwiczego zapalenia jelit [24,26], dowiedziono ochronnego wpływu karmienia naturalnego. Częstość występowania martwiczego zapalenia jelit jest 6-10 razy wyższa u noworodków i niemowląt karmionych sztucznie niż u karmionych naturalnie. [15] Z kolei wczesne wprowadzenie karmienia naturalnego u wcześniaków w istotny sposób zmniejsza częstość występowania retinopatii wcześniaczej. [76]

Co więcej, u dzieci szczególnego ryzyka rozwoju powikłań, z bardzo niską wagą urodzeniową, wykazano korzystny wpływ pokarmu naturalnego na zmniejszenie nasilenia stresu oksydacyjnego. Miernikiem nasilenia reakcji wolnorodnikowych w tym badaniu było stężenie produktów oksydacji DNA. [77]

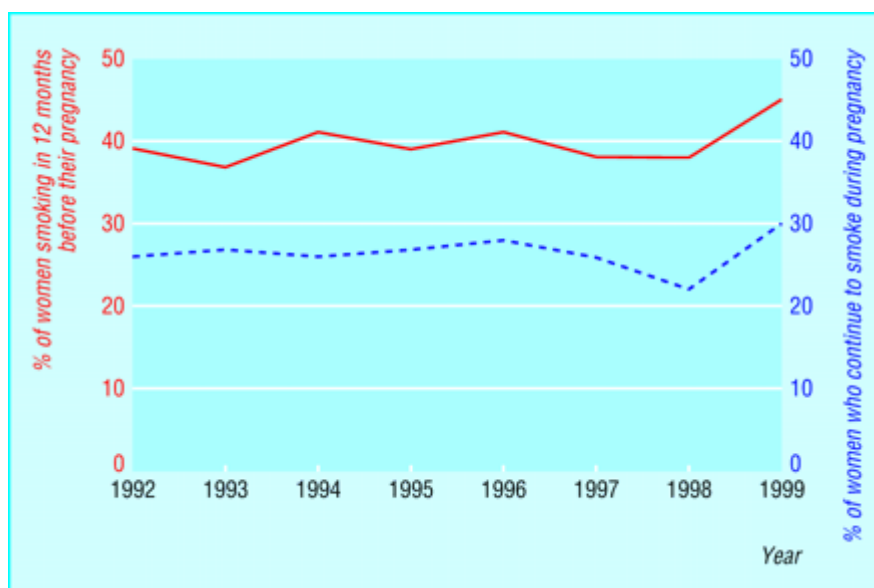
Na zaburzenia równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej, i tak już przesuniętej w stronę reakcji utleniania w okresie ciąży i porodu, wpływają również czynniki zewnętrzne, z których najsilniejszym i niestety najczęściej występującym jest dym tytoniowy, który w jednej porcji zawiera aż 10^{15} cząsteczek reaktywnych form tlenu. [78]

VI. Palenie papierosów w okresie ciąży i laktacji

Liczba kobiet palących papierosy w okresie ciąży i karmienia piersią jest zatrważająca. Według danych statystycznych ocenia się, iż na świecie 8,1-30% kobiet ciężarnych pali papierosy [79-85]. Wyniki nielicznych prac dotyczących Polek wykazują podobny odsetek tj. 12,5-30%. [34,86-88] W badaniach przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii stwierdzono, że ponad 25% kobiet kontynuuje palenie w ciąży, kolejne dwadzieścia kilka procent po krótkotrwałej przerwie (głównie w okresie I trymestru) powraca do palenia. [ryc. 1] Znany jest również fakt, iż po okresie wstrzemięźliwości od papierosów w okresie ciąży, wiele kobiet powraca do palenia zaraz po porodzie, tym samym ilość kobiet palących i jednocześnie karmiących piersią jest jeszcze większa. [79-86]

Nie bez znaczenia jest oczywiście również narażenie kobiet i ich dzieci na palenie bierne. [87-91] Około 60% dzieci w Polsce jest zmuszonych przez obu czy jednego z rodziców do biernego palenia.

W Polsce wymuszone bierne palenie od momentu poczęcia do 4 roku życia jest największym zagrożeniem dla zdrowia dzieci. Jednocześnie świadomość szkodliwości palenia w okresie laktacji jest znacznie mniejsza niż świadomość szkodliwości palenia w ciąży. Z badania przeprowadzonego w Polsce wynika, że jedynie 20% kobiet palących w czasie ciąży zostaje przez lekarza poinformowanych o szkodliwości palenia i jedynie 16,5% kobiet palących deklaruje świadomość zdrowotnych skutków palenia. [92]



Ryc. 1. Palenie papierosów wśród kobiet w ciąży (wg Coleman) [*Year* – Rok; *% of women smoking in 12 months before their pregnancy* - % kobiet palących w ciągu 12 miesięcy przed ciążą; *% of women who continue to smoke during pregnancy* - % kobiet kontynuujących palenie w ciąży]

Substancje szkodliwe zawarte w dymie.

Uważa się, iż dym papierosowy składa się z ponad 5000 substancji chemicznych, w tym co najmniej 70 karcynogenów. W zależności od sposobu oddziaływania na organizm substancji szkodliwych zawartych w dymie tytoniowym, przyjął się podział na: **substancje toksyczne** (tlenek węgla, cyjanowodór, amoniak, tlenki azotu); **drażniące** (akroleina, tlenek siarki, amoniak, formaldehyd); **ciliotoksyczne** (blokujące aktywność szeregu enzymów oddechowych i ruch rzęsek wyściełających drogi oddechowe - cyjanowodór, akroleina, aldehyd octowy, formaldehyd); **kokancerogeny** (formaldehyd, piren, fluoranten, naftaleny, katechol); **kancerogeny** (benzen, dwumetylonitrozoamina, etylometylonitrozoamina, dwuetylonitrozoamina, nitrozopirolidyna, hydrazyna, chlorek winylu); **inicjatory nowotworów** (toluen, fenol, uretan). Spośród wymienionych

wyżej substancji najbardziej szkodliwymi są: **nikotyna** - ($C_{10}H_{14}N_2$), **kotynina** - metabolit nikotyny o większej trwałości chemicznej, dlatego chętnie wykorzystywana w oznaczeniach kontaktu z paleniem papierosów; **tlenek węgla, tlenki azotu** – (NO i NO_2), nitrozoaminy, cyjanowodór, substancje smoliste, katechol. [93]

Wolne rodniki tlenowe zawarte w dymie papierosowym powodują nasilenie stresu oksydacyjnego. U palaczy stwierdza się podwyższony poziom produktów oksydacyjnego uszkodzenia lipidów [39,94-99], białek [100] i DNA [101,102] zarówno we krwi jak i w moczu. Jednocześnie dochodzi u nich do głębokich zaburzeń w wydolności bariery antyoksydacyjnej w postaci spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych [95,96,103] oraz obniżenia nieenzymatycznych antyoksydantów w surowicy krwi [96,97,104]. Wskutek zaprzestania palenia, dochodzi do obniżenia stężenia markerów peroksydacji lipidów w surowicy krwi, z kolei stężenie antyoksydantów wzrasta. [97] Stężenie produktów peroksydacji lipidów, w tym izoprostanów, normalizuje się już w ciągu kilku tygodni. [40,41] Jednak u osób, które ponownie wróciły do palenia papierosów, maksymalne stężenie markerów oksydacji obserwowane jest już po tygodniu. [42] Podaż witamin antyoksydacyjnych zmniejsza natężenie stresu oksydacyjnego u palaczy. [40,105,106]

Palenie papierosów a przebieg ciąży

Liczba danych dotyczących działań toksycznych palenia papierosów na zdrowie kobiet i ich dzieci jest zatrważająca. Cięższe kobiety palących należą **do ciąż wysokiego ryzyka**. Dwukrotnie wzrasta ryzyko samoistnych poronień, zwiększone jest ryzyko powikłań ciąży takich jak łożysko przodujące, krwawienia z dróg rodnych, przedwczesne odejście wód płodowych, przedwczesne odklejanie się łożyska. Uważa się, iż gdyby wszystkie kobiety ciężarne zaprzestały palenia papierosów

zaobserwowano 10% spadek śmiertelności płodów i noworodków. Tymczasem obserwujemy **zwiększone (1,4-2,8 razy) ryzyko wad wrodzonych**, głównie rozszczepów podniebienia, wad serca i kończyn, występowania wielotorbielowatości nerek, wytrzewienia czy deformacji czaszki. [107] Obserwowano również częstsze występowanie wad cewy nerwowej związane m.in. z zaburzeniem transportu kwasu foliowego do pęcherzyka ciążowego. [108] Najbardziej negatywnie na rozwój płodu wpływa zwłaszcza palenie w ostatnich 2 miesiącach ciąży. Podejrzewa się również częstsze występowanie zespołu Downa w związku z paleniem papierosów przez matkę. [107]

Najbardziej znanymi zaburzeniami spowodowanymi paleniem w ciąży są **mała urodzeniowa masa ciała oraz porody przedwczesne**. Palenie wpływa zarówno na czas trwania ciąży jak i wewnątrzmaciczne zaburzenia wzrostu. Palenie uszkadza płód poprzez redukcję wewnątrzmacicznego przepływu krwi o 30-40% a tym samym ograniczenie tlenu i składników odżywczych. Tlenek węgla zawarty w dymie ma większe powinowactwo do hemoglobiny płodowej, tym samym jeszcze mocniej zmniejsza dostarczanie tlenu do tkanek płodu. Palenie przez matkę powoduje powstawanie zmian w łożysku, głównie w postaci przerostu kosmków. [109]

Działanie toksyczne nikotyny na młody rozwijający się organizm to głównie uszkodzenie komórek Centralnego Układu Nerwowego u płodów i młodych niemowląt. Badania grubości kory mózgowej u nastolatków, których matki paliły w ciąży, wykazały cieńszą korę w okolicach płatów czołowych, co korelowało ze znacznie zmniejszoną zdolnością do zachowań opiekuńczych – zaburzenia te były wyraźniejsze u dziewcząt. [110] Obserwowano liczne zaburzenia funkcji poznawczych. Stwierdzono m.in. negatywny wpływ palenia na ruchomość zewnętrznych komórek włoskowych w uchu, prowadzące

do zaburzeń słuchu, a w następstwie funkcji językowych. U dzieci tych stwierdzono mniejsze zdolności w zakresie arytmetyki, gramatyki, nauki języków. [111] W grupie dzieci matek palących w ciąży wykazano zwiększony brak zdolności do gaworzenia w wieku 8 miesięcy. Jednocześnie stwierdzono protekcyjny wpływ karmienia piersią na te zaburzenia. [112] U chłopców, których matki paliły w ciąży, dominowały zaburzenia zachowania pod postacią **zachowań agresywnych czy nadpobudliwości ruchowej** (ADHD - Attention Deficit Hyperactivity Disorder). U obu płci obserwowano zaburzenia strefy motywacyjnej, manifestujące się zwiększoną częstością stosowania używek, opuszczaniem zajęć szkolnych oraz zachowaniami antyspołecznymi. [113]

U noworodków płci męskiej matek palących stwierdzono zaburzenia rytmu serca, co ma najprawdopodobniej związek z wpływem dymu papierosowego na równowagę sympatyczno – parasympatyczną autonomicznego układu nerwowego. [114] Jakkolwiek wpływ nikotyny na naczynia łożyska w badaniach na zwierzętach został uznany za główny czynnik toksyczny w okresie ciąży, nie potwierdzają tego wyniki analiz wpływu terapii nikotynozastępczej u ciężarnych, które dowiodły, iż nikotyna sama w sobie wywiera minimalne efekty negatywne na układ sercowonaczyniowy matek i ich dzieci. Tym samym część środowisk naukowych i organizacji zdrowia publicznego zaleca stosowanie terapii nikotynozastępczej w okresie rezygnacji z palenia w czasie ciąży i laktacji, jako krótkotrwałą substytucję o minimalnych skutkach ubocznych. [115]

Palenie przez matkę podczas ciąży jest głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia SIDS. Dwie trzecie śmierci łóżeczkowych wśród dzieci kobiet palących w ciąży jest związanych z dymem papierosowym. I choć dokładne mechanizmy nie są poznane, istnieje

związek przyczynowy między prenatalną ekspozycją na dym papierosowy a występowaniem SIDS (ryzyko u dzieci matek palących wzrasta 2-3 - krotnie i rośnie wraz z intensyfikacją palenia). [116]

Palenie papierosów a karmienie piersią

U kobiet palących obserwujemy **mniejszą produkcję mleka jak i krótszy czas laktacji**. W badaniach prowadzonych w różnych krajach wykazano, że procent kobiet decydujących się na karmienie piersią jest znacznie niższy wśród kobiet palących niż u niepalących. Palenie jest jednym z czynników negatywnie wpływających na podtrzymywanie laktacji. Kobiety palące **częściej też przechodzą epizod depresyjny** po porodzie. [117]

Nikotyna zawarta w mleku kobiecym jest absorbowana systematycznie przez dziecko. Ilość nikotyny zawarta w mleku kobiecym jest kilkakrotnie wyższa niż w surowicy krwi matki i tym samym przekazywana dziecku drogą pokarmu naturalnego w znaczących ilościach. Ilość kotyniny w moczu dzieci matek palących jest nawet 10-krotnie wyższa u dzieci kobiet palących karmionych piersią niż u dzieci kobiet palących karmionych sztucznie. [118-123] Jednocześnie matki palące produkują mniej mleka, ponieważ nikotyna redukuje poziom prolaktyny oraz podwyższa stężenia somatostatyny. Wiadomo, że spadek stężeń somatostatyny na skutek ssania jest odpowiedzialny za objętość pokarmu. [107]

Mleko matek palących zawiera 19% mniej tłuszczu niż mleko matek niepalących, co może ograniczać przyrost masy ciała i zdolności neurorozwojowe. Jest to najprawdopodobniej związane z wyższymi stężeniami lipidów w surowicy krwi matek palących i ich nieprawidłowym rozkładem (przewaga trójglicerydów i LDL – cholesterolu) i małym przechodzeniem tłuszczów do mleka kobiecego w wyniku palenia. Dotyczy to zwłaszcza frakcji LC-PUFA

(długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), szczególnie n-3 LC-PUFA tj np. kwasu dokozaheksaenowego – DHA. [124]

Stwierdzono także częstsze występowanie kolki u niemowląt karmionych piersią przez matki palące w stosunku do niemowląt matek niepalących (u 40% dzieci matek palących badanych w Norwegii występowały kolki i zaledwie u 26% dzieci matek niepalących). [125]

Mleko kobiet palących zawiera znacznie większe ilości wielu metali ciężkich, szczególnie kadmu. [126] Palenie wywiera również negatywny wpływ na właściwości immunologiczne pokarmu naturalnego. Znane są prace wskazujące na protekcyjny efekt karmienia piersią u matek niepalących, podobnego efektu nie obserwuje się u matek palących. Hydrochinon i katechol supresyjnie wpływają na produkcję IL-1 β , IL-2 oraz interferonu γ . Stwierdzono znaczące obniżenie stężeń IL-1 β w sianie kobiet palących papierosy, czym można tłumaczyć częstsze występowanie chorób infekcyjnych i zespołu nagłej śmierci niemowląt u ich dzieci. [127]

Obniżone stężenia jodu w mleku właściwym kobiet palących może być czynnikiem ryzyka uszkodzeń Centralnego Układu Nerwowego z niedoboru tego pierwiastka u niemowląt. Prawdopodobnie wyższe stężenia tiocyjanianu u kobiet palących hamują transport jodu w gruczole sutkowym. [128]

Narażenie dzieci na bierne palenie

Liczne prace z zakresu pediatrii dowiodły, że palenie przez matki, ojców i innych domowników zarówno w czasie ciąży jak i w okresie poporodowym wpływa **negatywnie na rozwój somatyczny, psychoruchowy i poznawczy dzieci**. Spośród istotnych chorób związanych bezpośrednio z narażeniem na składniki dymu tytoniowego wymienia się nagłe zgony noworodków, astmę wraz z innymi procesami

alergicznymi, schorzenia układu oddechowego, ucha środkowego, reumatoidalne zapalenia stawów, otyłość, bulimię, zaburzenia uwagi i zespół nadpobudliwości psychoruchowej (ADHD) oraz choroby nowotworowe. [129,130] Obserwowano **znacznie wyższą zachorowalność na białaczkę**, co wiązano z obecnością fenoli i hydrochinonu w metabolitach dymu papierosowego, które poprzez działania hematotoksyczne, uszkodzanie DNA oraz hamowanie topoizomerazy II wykazują działanie kancerogenne. [131] Obserwowano również wyższą częstość występowania inwazyjnej choroby meningokokowej u dzieci południowoafrykańskich narażonych na dym papierosowy. [132]

Stwierdzono również wpływ palenia papierosów w okresie poporodowym przez domowników **na występowanie SIDS**. Palenie bierne może bezpośrednio drażnić drogi oddechowe niemowlęcia lub poprzez pobudzanie do infekcji układu oddechowego indukować SIDS. Podejrzewając rolę nikotyny, infekcji dróg oddechowych oraz odpowiedzi przeciwzapalnej w patomechanizmie SIDS grupa autorów norweskich potwierdziła w badaniach na prosiętach wpływ nikotyny na wydłużenie samoistnych bezdechów i wydłużony czas autoresuscytacji na drodze odruchu krtaniowego po bezdechu. Innym prawdopodobnym mechanizmem jest zaburzenie regulacji receptorów dopaminergicznych. [116]

Dym papierosowy a stres oksydacyjny

Unikanie dymu tytoniowego w czasie ciąży i laktacji ma również, a może przede wszystkim istotne znaczenie w aspekcie zapobiegania niekorzystnemu wpływowi reaktywnych form tlenu zawartych w dymie na młody, rozwijający się organizm w okresie pre- i postnatalnym.

Już u zdrowych kobiet ciężarnych obserwuje się nasilenie stresu oksydacyjnego. [133,134] Palenie papierosów w czasie ciąży powoduje **dodatkowy wzrost procesów wolnorodnikowych oraz obniżenie stężenia niektórych antyoksydantów we krwi**, co w oczywisty sposób wpływa niekorzystnie na płód i noworodka. [135,136] Analiza zawartości markerów stresu oksydacyjnego w powietrzu wydychanym wykazuje, że **natężenie stresu u matek palących koreluje z natężeniem stresu obserwowanym u ich nowo narodzonych dzieci**. [137] Obie wartości pomiarów: u matki i dziecka, zależą bezpośrednio od ilości wypalanych przez matkę papierosów. [137] Wyniki badań dotyczących wpływu palenia papierosów przez kobietę ciężarną na natężenie peroksydacji lipidów w łożysku nie są jednoznaczne. Falcon i in. nie zaobserwowali zwiększenia peroksydacji lipidów w łożyskach kobiet palących, podczas gdy Laskowska-Klita i in. wykazali, że u matek palących stężenie produktów peroksydacji lipidów w łożysku jest wyższe. [109,138,139] Badania krwi pępowinowej u noworodków matek palących wykazały jednoznacznie **podwyższone stężenia markerów peroksydacji lipidów**. [139,140] Dodatkowo, aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie nieenzymatycznych antyoksydantów we krwi pępowinowej noworodków matek palących jest obniżona w porównaniu do wartości stwierdzanych u noworodków matek niepalących. [139] Chociaż palenie w ciąży nie zwiększa obecności markerów uszkodzenia DNA w łożysku, to w limfocytach noworodków urodzonych przez matki palące stwierdza się nasilone uszkodzenie oksydacyjne DNA, a nasilenie tych uszkodzeń wzrasta wraz z ilością wypalanych papierosów i czasem, od jakiego matka pali papierosy. [141] Udowodniono jednocześnie **większe nasilenie reakcji wolnorodnikowych i obniżenie TAS w surowicy niemowląt narażonych na bierne palenie** w pierwszych miesiącach

życia. [75] W doświadczeniach na zwierzętach, stwierdzono znaczny wzrost uszkodzeń wolnorodnikowych DNA w wątrobie płodowej po ekspozycji matki na związki charakterystyczne dla nikotyny (nitrozamina). [142]

Liczba opublikowanych badań na temat wpływu palenia papierosów przez matki na równowagę antyoksydacyjno-prooksydacyjną w mleku jest bardzo niewielka. Stężenie takich antyoksydantów jak witaminy A, E i C jest obniżone w mleku matek palących papierosy. [143,144] W jedynym dostępnym badaniu badającym produkty peroksydacji lipidów oraz zdolność antyoksydacyjną w mleku matek palących w 7 dniu po porodzie stwierdzono znaczący wzrost stężeń MDA, obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz brak wpływu palenia papierosów na poziom TAS w mleku. [145]

Dalsze badania skutków, jakie niesie za sobą palenie w czasie laktacji, wydają się być konieczne. Niezwykle interesujące wydaje się pytanie, na które obecnie nie potrafimy w pełni odpowiedzieć: **jakie długofalowe skutki dla zdrowia dziecka karmionego piersią przez matkę palącą, ma nasilenie stresu oksydacyjnego i zwiększenie ilości substancji toksycznych od pierwszych dni życia.** Z uwagi na skąpe dane w literaturze światowej dotyczące palenia papierosów w okresie laktacji, wpływu na pokarm kobiecy, obejmujące jedynie pierwsze dni po porodzie, a jednocześnie dużą rozbieżność uzyskanych wyników, podjęto próbę oceny zaburzeń równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej w mleku kobiecym pod wpływem dymu papierosowego. Przeprowadzenie tych badań wydaje się być konieczne w celu dostarczenia kolejnych racjonalnych argumentów przeciwko paleniu przez matki karmiące, bądź może wskazać konieczność ewentualnej terapii antyoksydacyjnej bądź nikotynozastępczej u kobiet, które nie będą w stanie rzucić palenia. Jednocześnie podjęto próbę

wykorzystania oznaczeń izoprostanów w mleku kobiecym (wskaźnik peroksydacji lipidów), jako swoistego markera stresu oksydacyjnego związanego z paleniem papierosów.

CELE PRACY

- 1) Ocena zaburzeń równowagi antyoksydacyjno – prooksydacyjnej w mleku kobiecym pod wpływem palenia papierosów przez kobiety w okresie ciąży i laktacji.
- 2) Ocena wpływu palenia papierosów na aktywność antyoksydacyjną mleka kobiecego poprzez badanie **Całkowitego Statusu Antyoksydacyjnego** (TAS - Total Antioxidative Status) **w mleku**.
- 3) Ocena **wpływu natężenia palenia** (określonego przez ilość wypalanych papierosów i stężenie kotyniny w moczu) na nasilenie **zaburzeń równowagi antyoksydacyjnej w pokarmie** kobiecym.
- 4) Ocena stopnia uszkodzenia wolnorodnikowego lipidów w pokarmie naturalnym matek palących papierosy poprzez badanie stężenia **izoprostanów w mleku**.
- 5) Ocena wpływu palenia papierosów na wykładniki natężenia stresu oksydacyjnego u **matek karmiących** oraz **ich dzieci** poprzez badanie wydalania **izoprostanów w ich moczu**.

MATERIAŁ I METODY

Wybór grup badanych oraz sposób pobierania materiału

Prospektywne badania kohortowe zostały przeprowadzone w dwóch Szpitalach Położniczych w Gdańsku (Oddział Położnictwa Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku oraz Oddział Położnictwa Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety AMG).

Wśród położnic po porodach naturalnych w/w oddziałów przeprowadzono badanie ankietowe, jednocześnie pobierając próbkę mleka na początku 3 doby po porodzie. Ankieta dotyczyła wieku i stanu zdrowia matki, ewentualnych chorób przewlekłych i alergicznych, dotychczasowego wywiadu położniczego, przebiegu ostatniej ciąży, przyjmowanych leków i chorób, masy i długości ciała oraz skali APGAR urodzonego dziecka, wywiadu atopowego w rodzinie, ilości wypalanych papierosów przed ciążą, w czasie jej trwania oraz tuż po porodzie oraz ewentualnej deklaracji co do chęci palenia papierosów w okresie karmienia piersią. [zał. 2]

Posłużenie się ankietą medyczną jako kryterium włączenia pacjentów do grup badawczych jest szeroko stosowane w nauce. [146,147] W niniejszej pracy oprócz danych ankietowych użyto pomiaru wydalania kotyniny w moczu jako dodatkowego obiektywnego kryterium palenia i kwalifikacji pacjentek do badań. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji ustalono, iż specyficzność i czułość kwalifikacji opartej na badaniu ankietowym są wysokie (odpowiednio: 90% i 94%). [zał. 5]

Na podstawie ankiety oraz stężeń kotyniny w moczu wyodrębniono **dwie grupy badane. Pierwszą grupę** stanowiły kobiety **palące papierosy**, które spełniały następujące kryteria: urodziły siłami natury donoszone zdrowe noworodki, planowały karmić piersią swoje dzieci, paliły ≥ 5 papierosów dziennie, kontynuowały palenie

papierosów podczas laktacji, podpisały zgodę na przeprowadzenie badań oraz jednocześnie: nie były poddane paleniu biernemu, nie chorowały na choroby ostre i przewlekłe, przebieg ich ciąży był prawidłowy, nie były leczone farmakologicznie.

Drugą grupą badaną była **grupa referencyjna**, w której kobiety spełniały wszystkie wymienione wyżej kryteria poza paleniem papierosów. Na wizytę kontrolną w 30 dobie po porodzie zapraszano matki wraz z dziećmi, które przynosiły jednocześnie świeżo zebrane mleko oraz mocz własny i dzieci. W tym samym dniu dzieci były badane przedmiotowo, pogłębiano dane ankietowe dotyczące palenia przez matki w czasie laktacji oraz w ich otoczeniu, jak również zbierano wywiad dotyczący ewentualnych chorób okresu noworodkowego u dziecka. Próbki mleka i moczu zbierano w sterylnych plastikowych pojemnikach i natychmiast zamrażano w temperaturze -70°C do czasu wykonania oznaczeń. Spośród ankietowanych wyłoniono 31 kobiet palących papierosy wraz z ich dziećmi oraz 30 kobiet z grupy referencyjnej wraz z dziećmi. Wszystkie uczestniczki badania podpisały zgodę na udział w badaniu. Badanie uzyskało zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Metody analityczne

Oznaczanie izoprostanów: Oznaczeń izoprostanów w mleku i w moczu dokonano przy użyciu gotowych zestawów odczynników: w przypadku oznaczeń w mleku - firmy Cayman Chemical (STAT 8-Isoprostane EIA kit), a przy oznaczeniach w moczu – firmy OxisResearch (Bioxytech Urinary 8-epi-Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane Cat.Nr 21048) w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki AMG (Kierownik: prof. dr hab. n. farm. R. Kaliszan). [149] Mechanizm wykrywania oparty jest na fakcie, że 8-izoprostan (8-EPI) w próbkach współzawodniczy o miejsce wiązania z 8 - EPI sprzężonym

z peroksydazą chrzanową (HRP). Aktywność peroksydazy wprost proporcjonalna do ilości 8 - EPI - HRP i odwrotnie proporcjonalna do ilości 8 - EPI niezwiązanej w próbkach przejawia się zmianą koloru po dodaniu substratu.

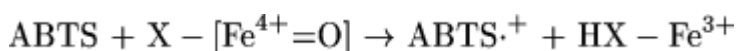
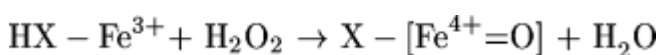
Oznaczanie 8-izoprostanu w próbkach mleka matki składało się z trzech etapów: przygotowania próbek, ekstrakcji 8-izoprostanów do fazy stałej (8-Isoprostane Affinity Column, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) oraz oznaczenia immunologicznego przy użyciu testu STAT-8-Isoprostane EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

W pierwszym etapie, próbki mleka były pięciokrotnie rozcieńczane roztworem Affinity Buffer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) i wirowane w celu usunięcia części tłuszczów. Następnie klarowny roztwór mleka aplikowany był na odpowiednio przygotowaną kolumnę do ekstrakcji 8-izoprostanów. Proces ekstrakcji przebiegał wg schematu dostarczanego przez producenta kolumn do ekstrakcji, przy pomocy zestawu próżniowego do ekstrakcji, Baker spe-12G (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). W końcowym etapie otrzymano etanolowy roztwór 8-izoprostanów, który odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość rozpuszczano w 150 μ l roztworu TRIS i używano do oznaczeń 8-izoprostanu w teście immunologicznym. Test immunologiczny STAT-8-Isoprostane EIA Kit przeprowadzano wg schematu dostarczanego przez producenta. Pomiarów absorbancji dokonywano trzykrotnie przy długości fali 405 nm czytnikiem płytek (Bio-Tek FL600; oprogramowanie KC4, BIO-TEK Instruments Inc.) w Katedrze Histologii i Immunologii AMG (Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Myśliwska), a stężenie 8-izoprostanów obliczano przy pomocy krzywej kalibracyjnej otrzymanej w trakcie testu.

Oznaczanie 8-izoprostanu w próbkach moczu matek i dzieci składało się z dwóch etapów: przygotowania próbek oraz oznaczenia immunologicznego przy użyciu testu Bioxytech Urinary 8-epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane (Oxis Research, Cat.Nr 21048, Foster City, CA, USA).

W pierwszym etapie, próbki moczu po rozmrożeniu były wirowane, a następnie klarowny roztwór aplikowany był na mikropłytkę. Test immunologiczny Bioxytech Urinary 8-epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane przeprowadzano wg schematu dostarczanego przez producenta. Pomiarów absorbancji dokonywano trzykrotnie przy długości fali 450 nm czytnikiem płytek (Bio-Tek FL600; oprogramowanie KC4, BIO-TEK Instruments Inc.) w Katedrze Histologii i Immunologii AMG, a stężenie 8-izoprostanów obliczano przy pomocy krzywej kalibracyjnej otrzymanej w trakcie testu dzięki dołączonym do zestawu standardom 8-epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

Oznaczanie TAS: Za pomocą gotowych zestawów firmy Randox (Randox Total Status Antioxidant Kit) oceniony został potencjał antyoksydacyjny mleka ludzkiego. Ocena ta oparta jest na reakcji 2,2-azino-di-(3-sulfonioetylobenzotiazoliny) ($ABTS^{\text{®}}$) dokonanej przez peroksydazę (metmioglobiny) w obecności H_2O_2 , której produktem jest rodnik kationowy $ABTS^{\cdot+}$:



gdzie $HX - Fe^{4+}$ jest metmioglobina. Rodnik kationowy ma stosunkowo stały niebiesko - zielony kolor, który był mierzony przy długości fali 600 nm. Antyutleniacze zawarte w próbce mleka znoszą formowanie tego koloru. [149] Oznaczenia zostały wykonane w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku

(Kierownik prof. dr hab. n. med. W. Łysiak – Szydłowska) przy użyciu Spektrofotometru LKB – Ultrospec III.

Oznaczeń kreatyniny w moczu dokonano w Laboratorium Centralnym Akademickiego Centrum Klinicznego AMG przy użyciu standardowej metody opartej na reakcji Jaffe. [150]

Oznaczeń kotyniny w moczu dokonano przy użyciu zestawu immunologicznego firmy DRG Cotinine (Urine) ELISA (EIA-1377 or EIA-1726, DRG International, Inc. USA) w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku przy użyciu Spektrofotometru LKB – Ultrospec III przy długości fali 450 nm wg schematu dostarczonego przez producenta. Oznaczenia te oparte były na kompetytywnej reakcji kotyniny związanej z płytką a przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą w obecności kotyniny pochodzącej z badanego moczu. Producenci zestawu sugerują wartość kotyniny w moczu > 500 ng/ml jako świadczącą o aktywnym paleniu papierosów. [151] Wg innych autorów należy uznać już wartość > 200 ng/ml jako świadczącą o aktywnym paleniu papierosów. [152] Tę wartość przyjęto w poniższej pracy. Jednocześnie należy pamiętać o spadku poziomu kotyniny w moczu w ciągu 84 godzin niepalenia (czas połowicznego rozpadu – $T_{1/2}$ = 19 godzin). [153]

Metody statystyczne.

Materiał badawczy składał się z badań empirycznych 62 pacjentów i stanowił niejednorodną grupę badawczą złożoną z kobiet zaklasyfikowanych jako osoby palące bądź osoby niepalące. Stosowane kryteria identyfikacji osób palących i niepalących wyszczególnione w rozdziale „Materiał i metody” oraz rozdziale I „Wyników” dotyczyły przeprowadzonych badań ankietowych oraz badań biochemicznych stężeń kotyniny w moczu.

W zakresie analizy opisowej zmiennych ilościowych jako miarę położenia przyjęto średnią i pięć nieparametrycznych charakterystyk Tukey'a: minimum, kwartył 25% (Q25), mediana (Q50), kwartył 75% (Q75) i maksimum. Jako miarę rozrzutu przyjęto odchylenie standardowe (SD). Wartości statystyk opisowych i z podziałem na grupy badawcze zaprezentowano w tabelach lub/i w formie prezentacji graficznej. W opisie charakterystyk jakościowych stosowano tablice kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego. W niektórych przypadkach obliczone zostały współczynniki odds ratio (oznaczone θ).

Statystyczną analizę decyzyjną przeprowadzono w oparciu o testowanie nieparametryczne. W grupach badawczych kobiet uznanych za palące i niepalące porównanie median zmiennych ilościowych testowano testem U Manna-Whitneya (jednostronnym lub dwustronnym). W niektórych przypadkach, gdy test U nie wskazywał na różnicę median stosowano test serii Walda-Wolfowitza. Do porównania zmiennych zależnych używany był test znaków (jednostronny lub dwustronny) lub test kolejności par Wilcoxa. Statystycznie istotne różnice w położeniu median, lub szerzej, statystycznie potwierdzone różnice w rozkładach zmiennych prezentowano graficznie używając wykresów typu ramkowego z zaznaczeniem pomiarów rzeczywistych, odstających i ekstremalnych (przyjęto współczynnik 1,5).

W niektórych zagadnieniach zaprezentowano zależność między zmiennymi w postaci linii regresji. Zawsze wówczas był prezentowany wykres zależności z zaznaczeniem 95% przedziałów ufności dla krzywej regresji. W tych analizach obliczany był współczynnik korelacji i test zerowania się tego współczynnika. Na bazie tego testu (t-Studenta)

wyciągane były szczegółowe wnioski o hipotezach zależności między zmiennymi ilościowymi.

W przypadku tablic wielodzielczych testowana była hipoteza o niezależności za pomocą testu χ^2 (Pearson Chi-square).

Jako regułę przyjęto by przy każdej decyzji zaznaczyć test przy pomocy którego weryfikowano postawioną hipotezę będącą podstawą decyzji, wartość statystyki testowej i poziom istotności odpowiadający błędowi pierwszego rodzaju dla tej hipotezy.

Jako graniczny poziom przyjęto $p = 0,05$. W przypadku poziomu istotności mniejszego od 0,001 pisano zawsze $p < 0,001$. Jeśli poziom istotności był poniżej 0,05 to podejmowano decyzję o istotności różnicy lub częstości.

Obliczenia zostały wykonane z użyciem pakietu statystycznego Statistica 8.0 i środowiska obliczeń statystycznych R 2.6.1. [154-156]

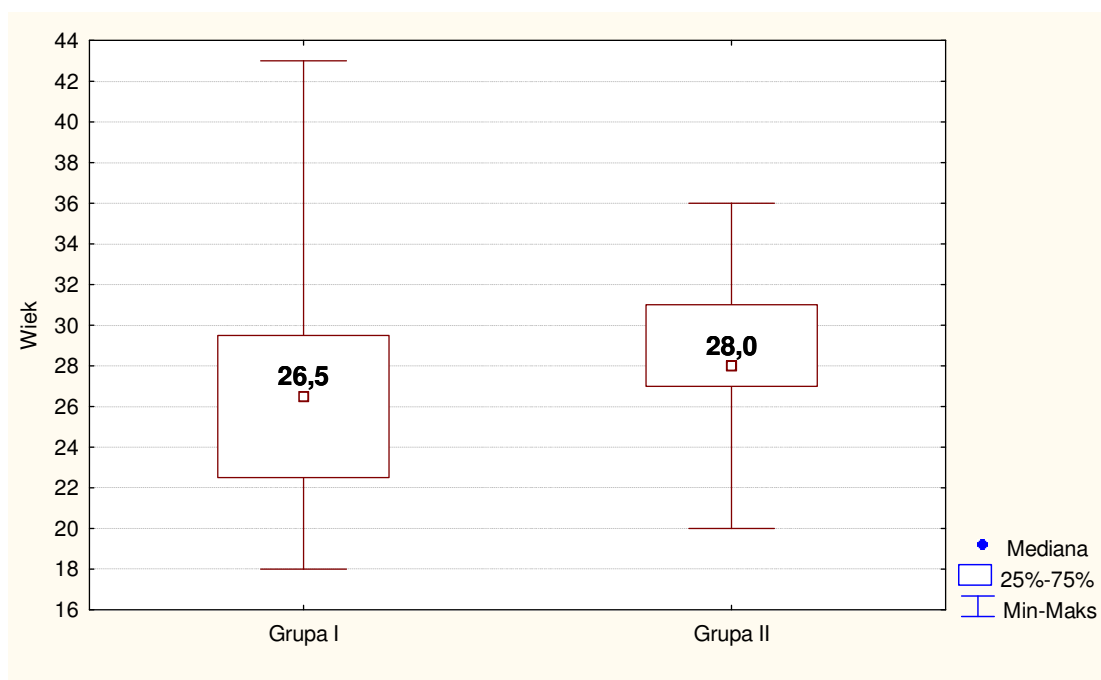
WYNIKI

I. Charakterystyka badanych grup

Liczebność grup oraz wiek badanych kobiet

Badaniami objęto łącznie 61 kobiet: 32 kobiety zakwalifikowano do grupy I (kobiet palących papierosy) i 29 kobiet do grupy II (referencyjnej). Zasady kwalifikacji do wyżej wymienionych grup omówiono w Rozdziale „Materiały i metody”.

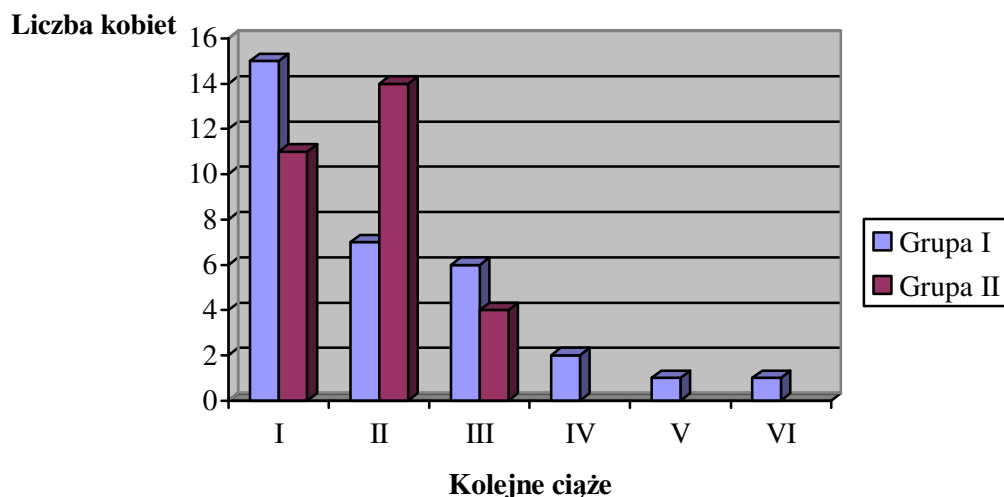
Średnia wieku w grupie I wynosiła 26,8 lat (SD 5,96 roku; zakres między 18-43 lat), a w grupie II 28,6 lat (SD 3,91 roku; zakres 20-36 lat). Różnice te nie były istotne statystycznie.



Ryc. 2. Średni wiek w grupach badanych

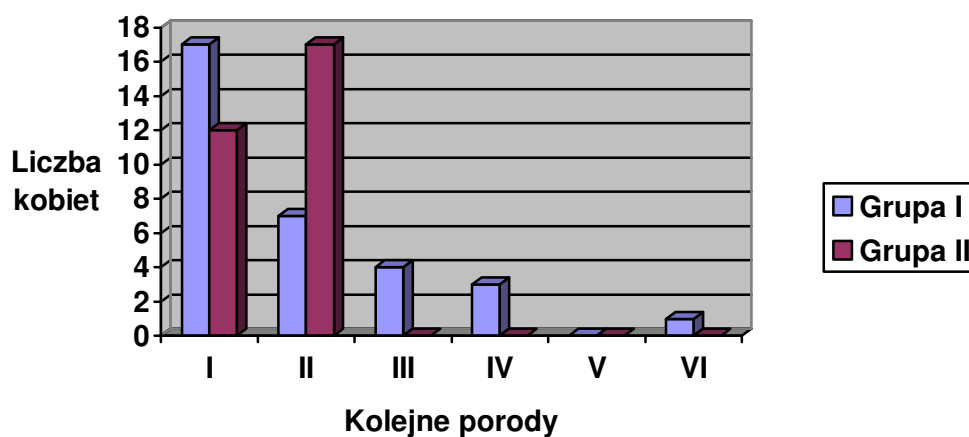
Dane dotyczące ciąży, porodu i noworodka

W grupie I u 15 kobiet była to ciąża pierwsza, u 7 kobiet ciąża druga, u 6 kobiet ciąża trzecia, u 2 kobiet ciąża czwarta, u jednej kobiety ciąża piąta i u jednej kobiety ciąża szósta. W grupie II u 11 kobiet była to ciąża pierwsza, u 14 - ciąża druga, a u 4 kobiet – ciąża trzecia. Nie stwierdzono różnic statystycznych między badanymi grupami. Powyższe dane pokazuje ryc. 3.



Ryc. 3. Kolejność ciąży u kobiet w obu grupach badanych.

U 17 kobiet badanych w grupie I był to ich pierwszy poród, u 7 - drugi, u 4 - trzeci, u 3 - czwarty i u jednej szósty poród oraz w grupie II u 12 kobiet - pierwszy poród i u 7 - drugi poród. Nie stwierdzono tu istotnej różnicy w grupach badanych.

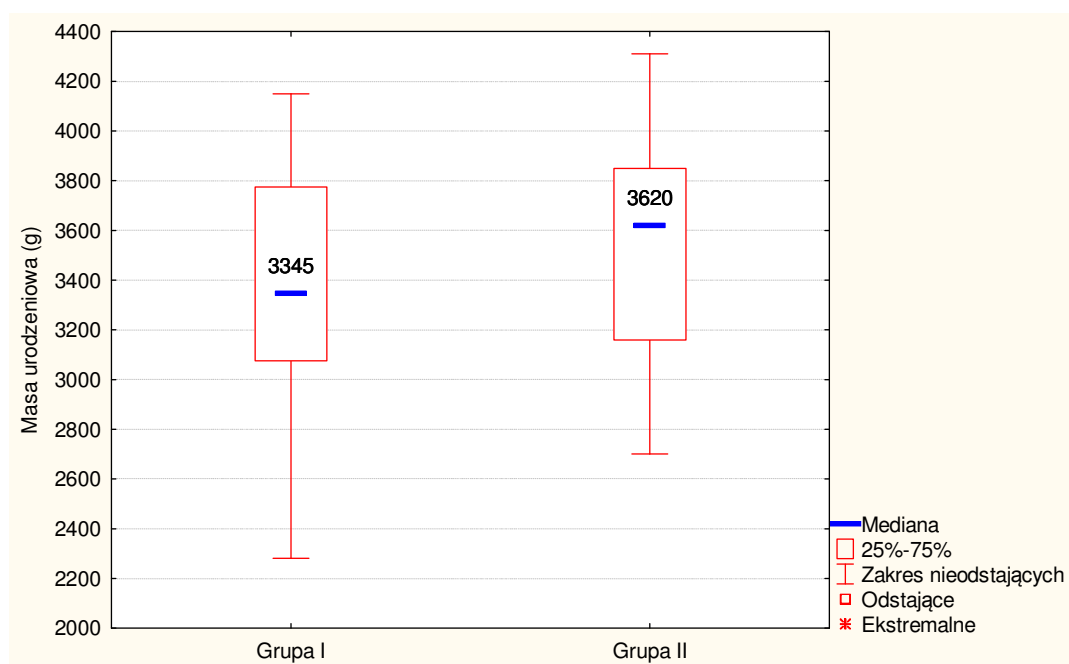


Ryc. 4. Kolejność porodu u kobiet w obu grupach badanych.

Podsumowanie rozdziału

Stwierdzono więc, że wiek, ilość ciąż i porodów nie różniły się istotnie statystycznie u kobiet w grupach I i II.

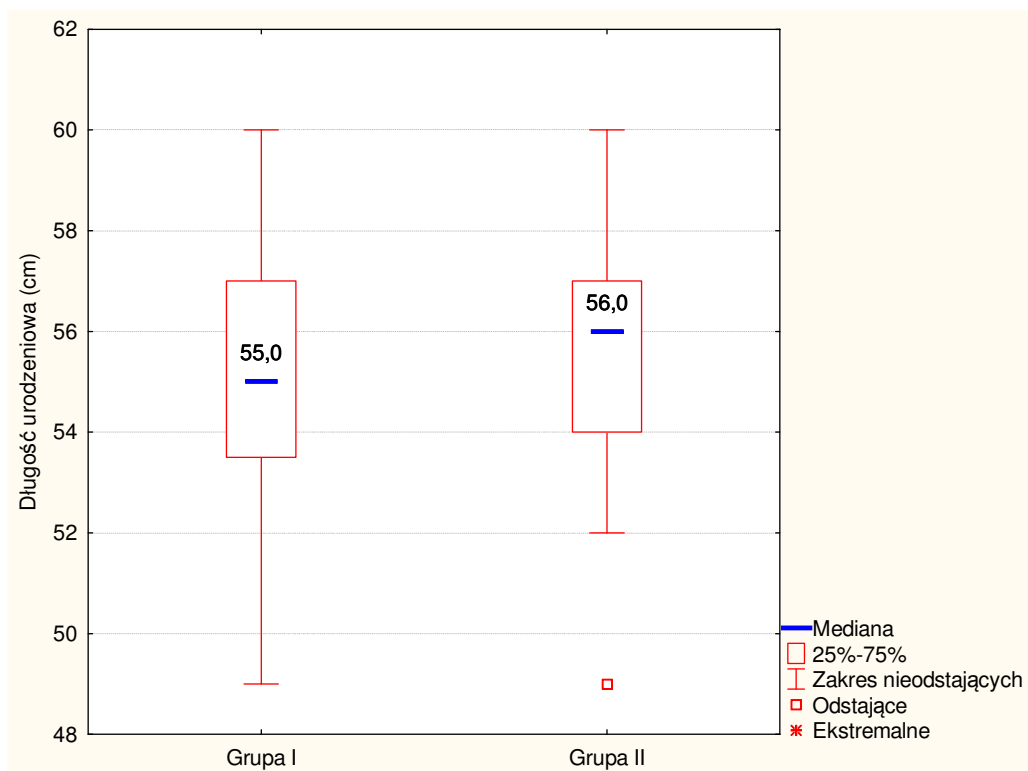
Masa urodzeniowa dzieci badanych kobiet wynosiła średnio w grupie I: 3328 g (SD 529,5 g, zakres 2230g – 4150g) zaś w grupie II: 3547 g (SD 427,6 g, zakres 2700g – 4310g).



Ryc. 5. Masy urodzeniowe dzieci w badanych grupach.

Mimo iż zaobserwowano tendencję do niższych mas urodzeniowych dzieci matek palących w okresie ciąży, (zjawisko szeroko opisywane w piśmiennictwie), to nie stwierdzono różnic statystycznych u dzieci w obu grupach. [157] Ten zaskakujący wynik omówiono w rozdziale „Dyskusja”.

Długość urodzeniowa dzieci badanych kobiet wynosiła średnio w grupie I: 55,1 cm (SD 2,52 cm, zakres 51cm – 60cm) zaś w grupie II: 55,4 cm (SD 2,31 cm, zakres 49cm – 60cm). [ryc. 6] Nie stwierdzono różnic statystycznych w długości urodzeniowej dzieci matek z obu grup.



Ryc. 6. Długość urodzeniowa dzieci w badanych grupach

Wszystkie dzieci były urodzone o czasie tj. między 38 a 42 tygodniem ciąży.

Podsumowanie rozdziału

Tak więc urodzeniowa masa i długość ciała noworodków oraz ich wiek ciążowy nie różniły się istotnie u dzieci w grupie matek palących (grupa I) oraz matek niepalących (grupa II).

Dane dotyczące palenia papierosów w grupie badanych kobiet

Dane ankietowe

Na podstawie ankiet do grupy kobiet określanych jako „palące” zaklasyfikowano 31 pacjentek, które deklarowały, że palą dziennie co najmniej pięć papierosów. 30 kobiet nie potwierdziło palenia i stanowiło grupę porównawczą.

Klasyfikacja ta uległa modyfikacji w dalszym toku analiz po uwzględnieniu stężeń kotyniny w moczu, która jest obiektywnym

wskaźnikiem palenia bądź niepalenia papierosów. Według przeprowadzonych badań ankietowych kobiety zakwalifikowane do grupy I paliły od 5 do 25 papierosów dziennie, średnio 11,87 papierosa/dzień $\pm$ 5,31 papierosa. Mediana liczby dziennie wypalanych papierosów w tej grupie wyniosła 10 sztuk. Wartość tę w dalszej części badań użyto do różnicowania stopnia natężenia palenia papierosów.

Pomiar wydalanania kotyniny w moczu

W celu obiektywizacji danych ankietowych zmierzono, jak wyżej wspomniano, **stężenia kotyniny w moczu** badanych kobiet. Mocz zbierano w 30 dobie po porodzie (ze względu na krwawienie z dróg rodnych położnic).

Pomiar stężenia kotyniny w moczu wykonano zarówno u kobiet w grupie palących papierosy jak i u kobiet w grupie referencyjnej.

Otrzymane wyniki stężeń kotyniny wpłynęły na zmianę klasyfikacji jedynie u jednej z matek z grupy referencyjnej. Stężenie kotyniny w moczu u tej pacjentki wyniosło 1789 ng/ml i było tym samym najwyższym stwierdzanym stężeniem kotyniny w moczu badanych kobiet. Pacjentkę tą zaliczono do grupy kobiet palących. Po tej modyfikacji grupa I liczyła 32 osoby, a grupa II 29 osób.

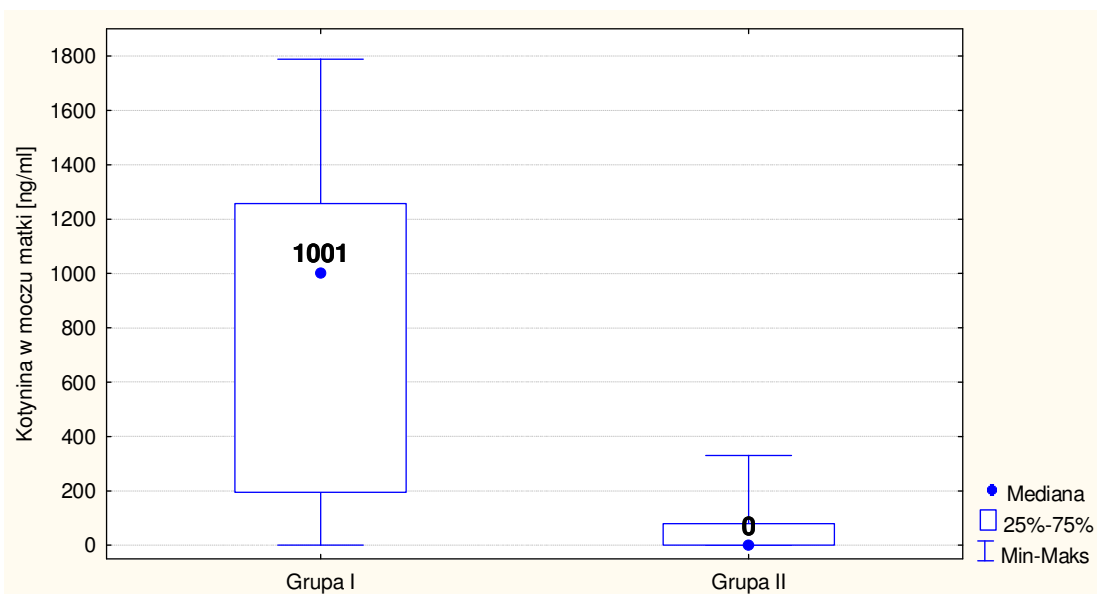
W grupie I średnie stężenie kotyniny w moczu wyniosło 819 ng/ml ($\pm$ 616) i było tym samym istotnie wyższe niż w grupie II, gdzie średnie stężenie kotyniny wyniosło 61 ng/ml (SD $\pm$ 95). Mediana stężenia kotyniny w moczu kobiet w grupie I wyniosła 1001 ng/ml i została przyjęta w dalszej części pracy jako wartość różnicująca stopień natężenia palenia papierosów. [ryc. 7]

Uznaną formą interpretacji wartości wydalanania substancji z moczem jest określenie tzw. **wskaźnika kreatyninowego**. Tak więc aby wyeliminować wpływ różnych gęstości badanego moczu na stężenie kotyniny, oznaczono kreatyninę w moczu badanych kobiet. Rozkład

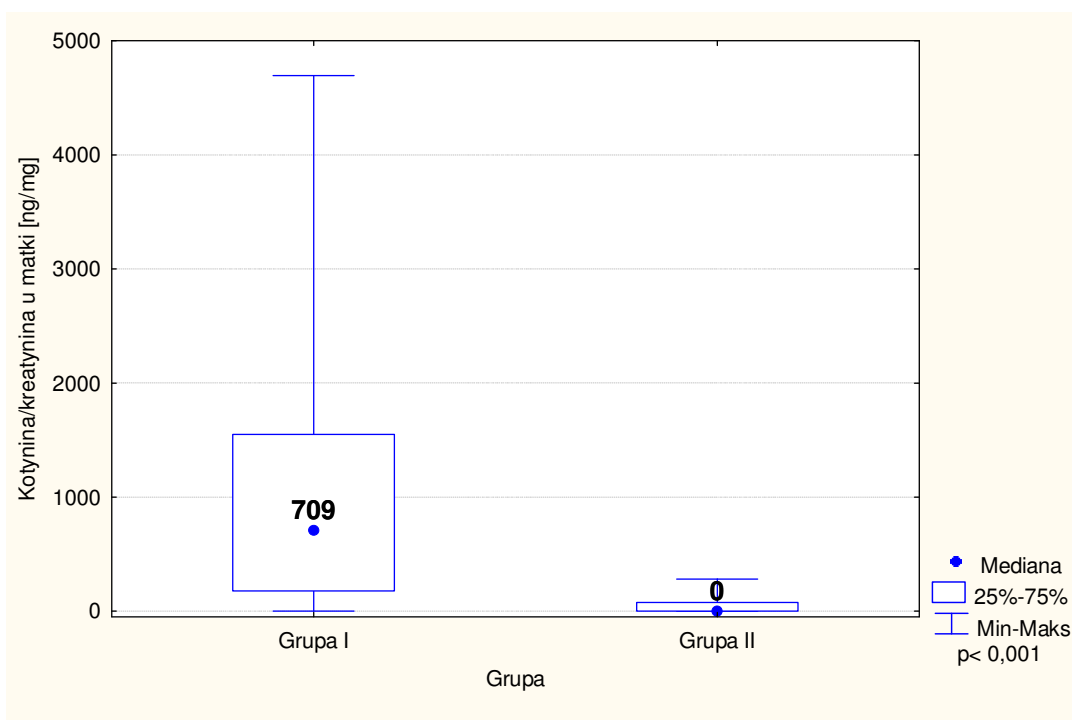
stężenia kreatyniny w moczu w grupie badanej i referencyjnej był porównywalny. Wartość wskaźnika kotynina/kreatynina (CCR – cotinine:creatinine ratio; ng kotyniny/mg kreatyniny) przedstawiono na rycinie 8. Stwierdzono istotne różnice między grupą kobiet palących i referencyjną. Uzyskaną wartość mediany CCR równą 709 ng/mg użyto **jako wartość różnicującą stopień natężenia palenia papierosów** w dalszej części pracy.

U większości kobiet w grupie I zarówno wartości wydalania kotyniny z moczem, jak i wartości wskaźnika kotynina/kreatynina przekraczały wartości uznane za różnicujące aktywne palenie od palenia biernego. Na podstawie piśmiennictwa uznano, iż są to odpowiednio: 200 ng/ml dla stężenia kotyniny w moczu oraz 150 ng/mg dla wskaźnika kotynina/kreatynina. [152,158] Zaskakujący jest fakt, iż u 6 kobiet deklarujących palenie wartości te były niższe od wyżej wymienionych norm. Wynik ten omówiono szczegółowo w rozdziale „Dyskusja”.

U kobiet w grupie II poza wspomnianym już ewidentnym przypadkiem zatajenia palenia, uzyskane wartości stężeń kotyniny w moczu oraz CCR były niższe od przyjętych norm.



Ryc. 7. Stężenia kotyniny w moczu w obu badanych grupach kobiet palących i niepalących ($p < 0,001$).



Ryc. 8. Wskaźnik kotynina/kreatynina (CCR, ng/mg) w badanych grupach ($p < 0,001$)

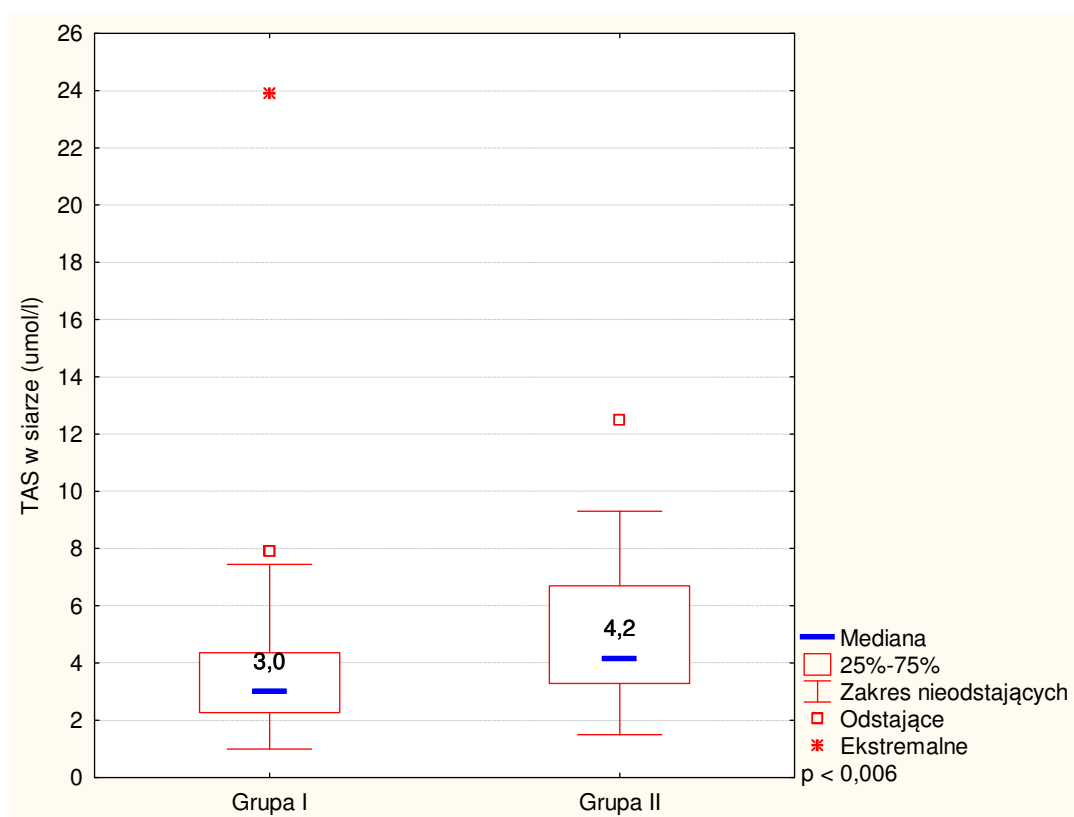
Podsumowanie rozdziału

Kobiety w grupie I paliły od 5-25 papierosów na dobę (średnio 11,87 papierosa/dobę). Wydalanie kotyniny z moczem, jak i wskaźnik kotynina/kreatynina w grupie matek palących były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie referencyjnej. Aby zróżnicować grupę kobiet palących pod względem natężenia palenia papierosów wykorzystano mediany liczby wypalanych papierosów oraz wydalania kotyniny z moczem.

II. Porównanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku matek palących i niepalących

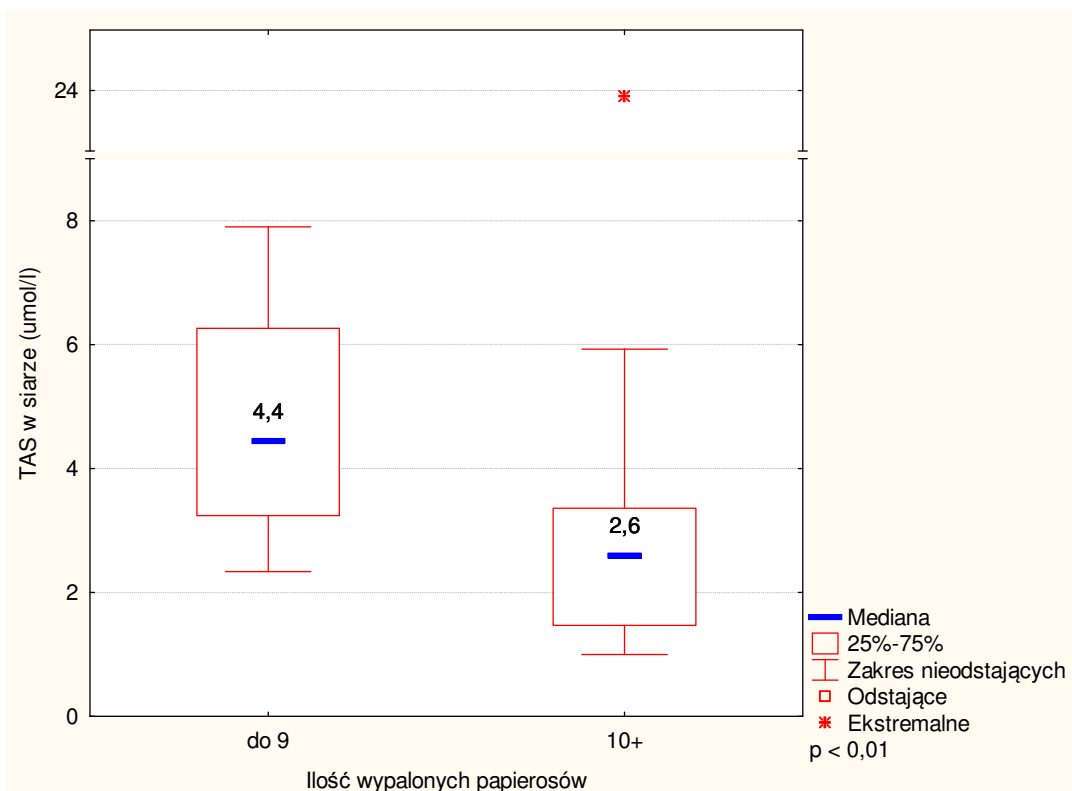
1. Całkowita zdolność antyoksydacyjna w sianie

Badanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) przeprowadzono w sianie kobiet z grupy I i sianie kobiet z grupy II. Zarówno średnie jak i mediany TAS w sianie matek palących były statystycznie istotnie niższe niż w grupie referencyjnej i wynosiły odpowiednio 4,07 $\mu\text{mol/l}$ i 3 $\mu\text{mol/l}$ w sianie kobiet z grupy I oraz 5,1 $\mu\text{mol/l}$ i 4,2 $\mu\text{mol/l}$ w sianie kobiet z grupy II.



Ryc. 9. Całkowita zdolność antyoksydacyjna w sianie

Zależności te są również widoczne w odniesieniu do ilości wypalanych papierosów. Kobiety palące co najmniej 10 papierosów na dobę mają zdecydowanie niższą zdolność antyoksydacyjną w sianie niż kobiety palące do 9 papierosów na dobę (mediany odpowiednio 2,6 $\mu\text{mol/l}$ i 4,44 $\mu\text{mol/l}$).

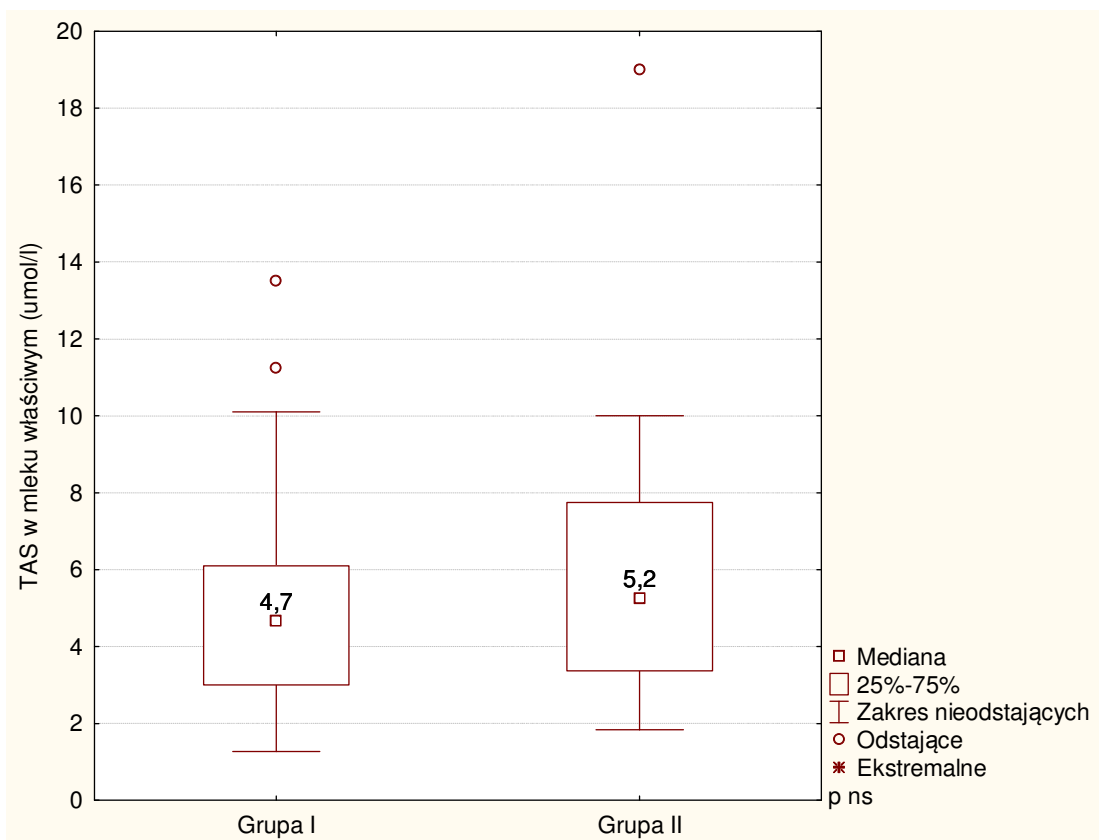


Ryc. 10. Zależność między ilością wypalanych papierosów przez matkę a TAS w sianie.

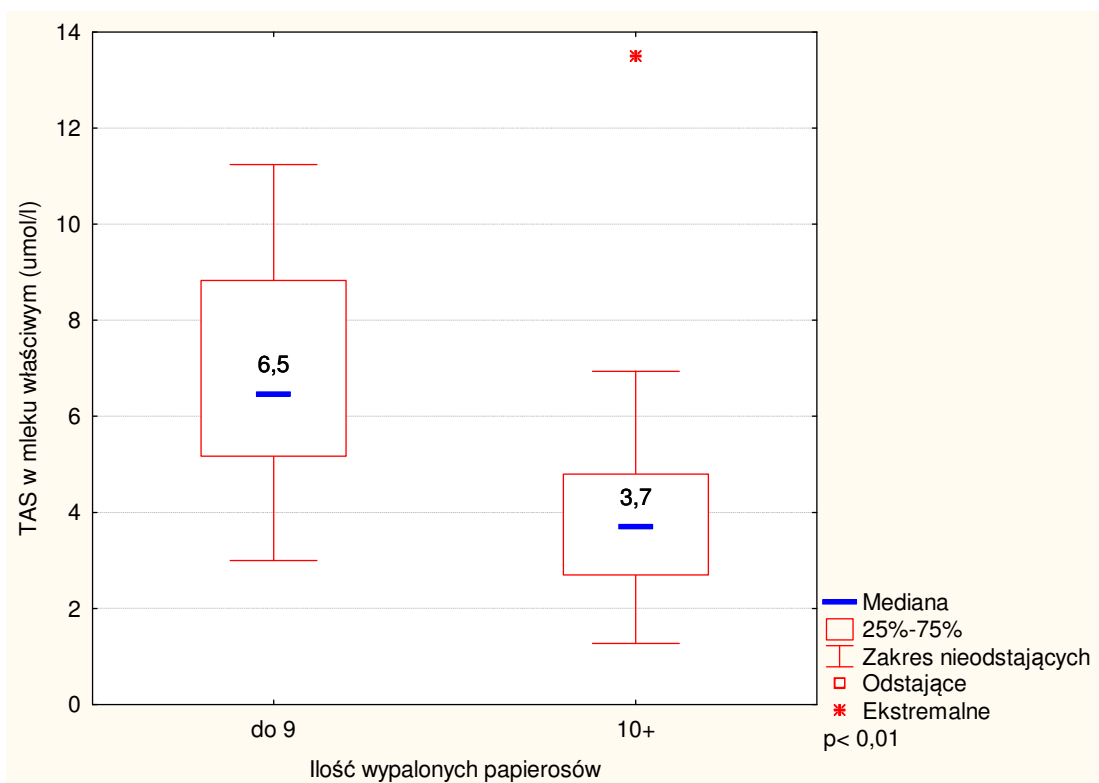
2. Całkowita zdolność antyoksydacyjna w *mleku właściwym* (trzydziesty dzień laktacji)

Badanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) przeprowadzono w mleku właściwym kobiet z grupy I i kobiet z grupy II. Mimo zauważalnych różnic w wartościach median TAS w mleku właściwym w badanych grupach (4,66 $\mu\text{mol/l}$ w mleku właściwym kobiet z grupy I oraz 5,25 $\mu\text{mol/l}$ w mleku właściwym kobiet z grupy II), nie wykazano istotności statystycznej między tymi wynikami. [ryc. 11]

Istotność statystyczną stwierdzono natomiast badając zależność całkowitej zdolności antyoksydacyjnej mleka od ilości wypalanych papierosów. W podgrupie kobiet palących co najmniej 10 papierosów na dobę TAS w mleku właściwym był statystycznie istotnie niższy niż w podgrupie kobiet palących do 9 papierosów na dobę. [ryc. 14]



Ryc. 11. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS) w mleku właściwym

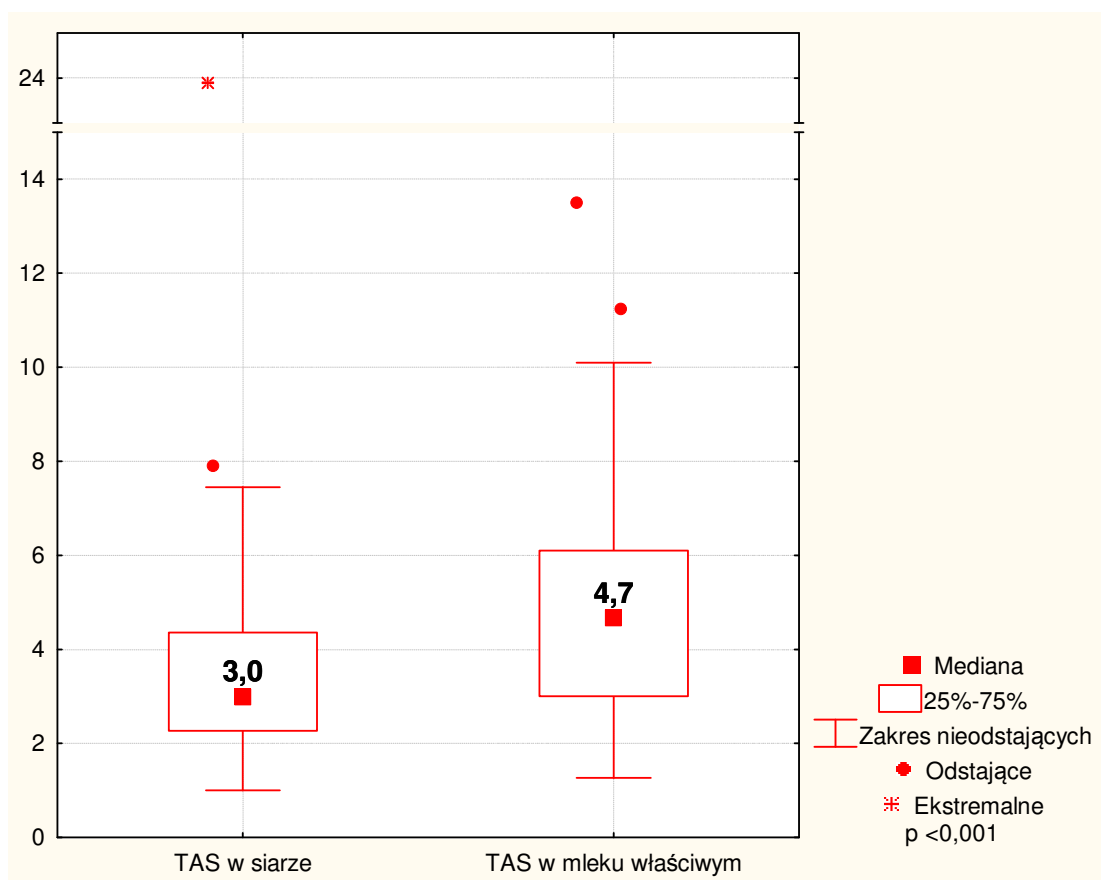


Ryc. 12. Zależność całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku właściwym od ilości wypalanych papierosów

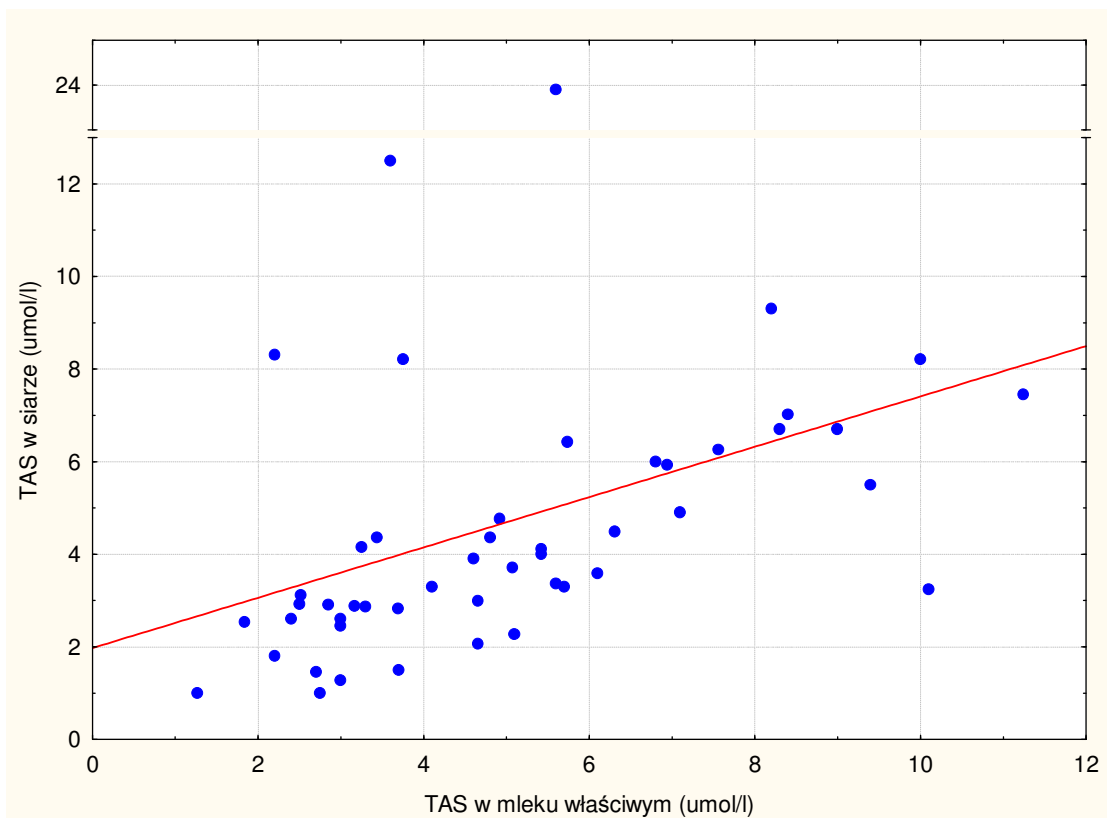
3. Zmienność całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku kobiecym w czasie trwania laktacji.

Zbadano również zmienność zdolności antyoksydacyjnej w czasie trwania laktacji, tj. porównano TAS w sianie i mleku właściwym u poszczególnych kobiet (porównanie par wyników TAS w sianie i mleku właściwym dla każdej z badanych). W grupie kobiet palących wykazano statystycznie istotny wzrost TAS w toku laktacji. Może być to odzwierciedleniem kompensacji istniejących zaburzeń aktywności antyoksydacyjnej pokarmu w tej grupie kobiet. [ryc. 13]

Dodatkowo, porównując wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w sianie i mleku właściwym znaleziono zbieżność par uzyskanych wyników. U kobiet, u których obserwowano niskie aktywności antyoksydacyjne w sianie, jednocześnie obserwowano niskie aktywności antyoksydacyjne w mleku właściwym. [ryc. 14]



Ryc. 13. Porównanie TAS w sianie i mleku właściwym kobiet palących.



Ryc. 14. Zależność między wartościami TAS w sianie i mleku właściwym badanych kobiet.

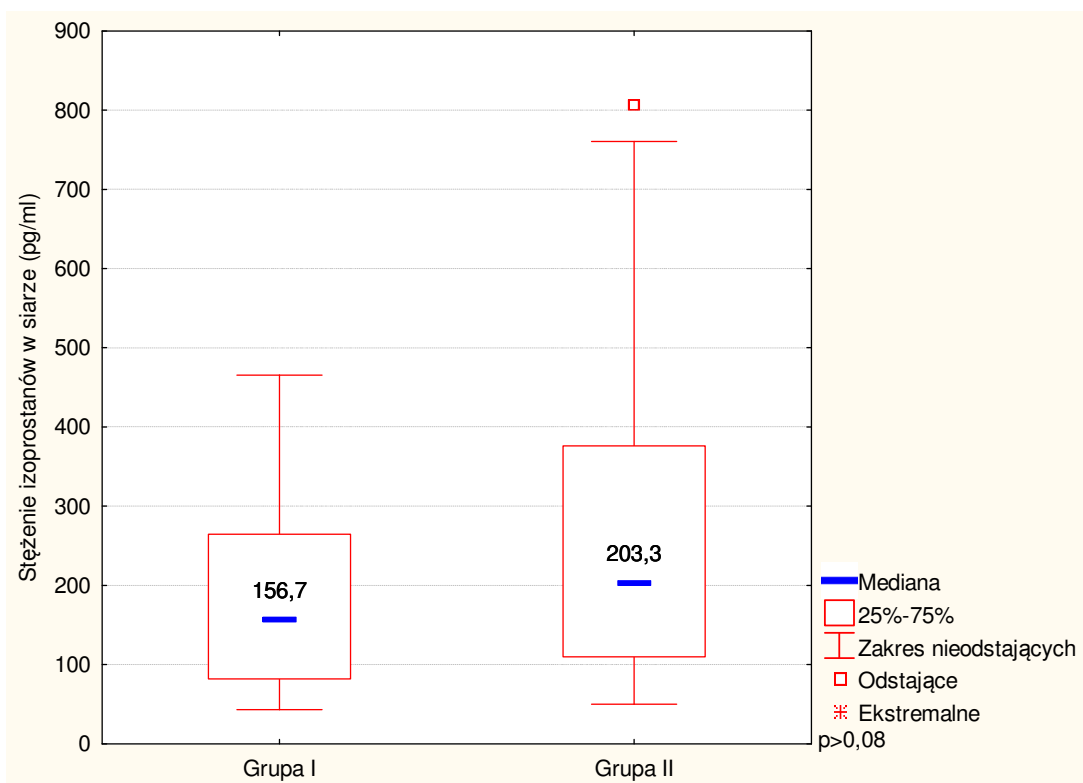
Podsumowanie rozdziału

Aktywność TAS w sianie i mleku właściwym kobiet palących jest niższa niż w grupie referencyjnej. Istotność statystyczną stwierdzono zarówno w sianie kobiet palących papierosy jak i w mleku właściwym kobiet palących co najmniej 10 papierosów na dobę. W grupie kobiet palących papierosy w toku laktacji stwierdzono istotny wzrost aktywności TAS, będący wyrazem procesu kompensacji istniejących zaburzeń.

III. Ocena produktów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów w mleku kobiet palących papierosy na podstawie stężeń izoprostanów.

1. Ocena stężeń izoprostanów w sianie.

Pomiarów izoprostanów dokonano w sianie kobiet z grupy I oraz kobiet z grupy II. Wartości median w badanych grupach wynosiły 157 pg/ml w sianie kobiet z grupy I oraz 203 pg/ml w sianie kobiet z grupy II ($p = 0,081$). Dość nieoczekiwanie wysokie wartości izoprostanów w sianie stwierdzano w pojedynczych przypadkach u kobiet z grupy referencyjnej, co tłumaczyć możemy zwiększoną zawartością tłuszczów w ich mleku (problem szczegółowo omówiony w dyskusji). [ryc. 15]

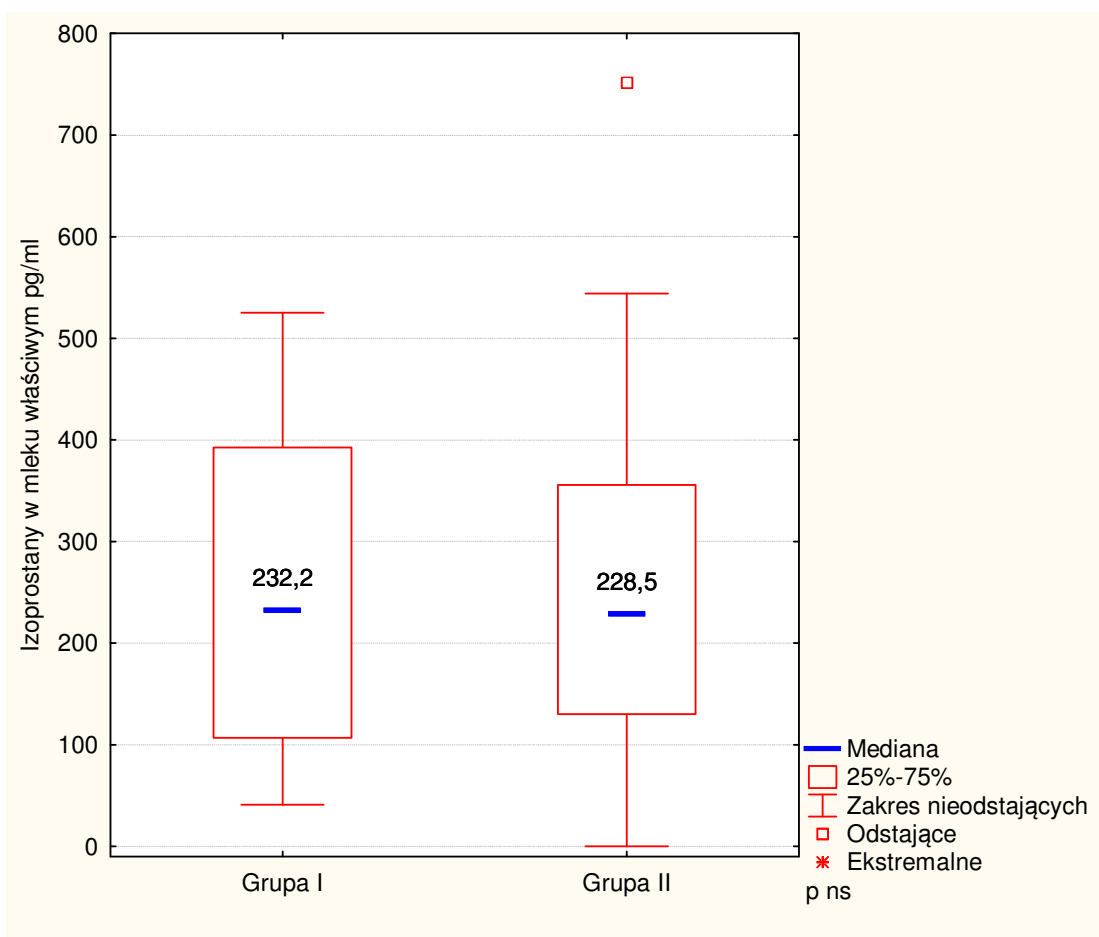


Ryc. 15. Stężenie izoprostanów (pg/ml) w sianie badanych kobiet

2. Ocena stężeń izoprostanów w mleku właściwym.

Dokonano pomiarów stężeń izoprostanów w mleku właściwym kobiet z grupy I oraz kobiet z grupy II. Wartości median nie różniły się

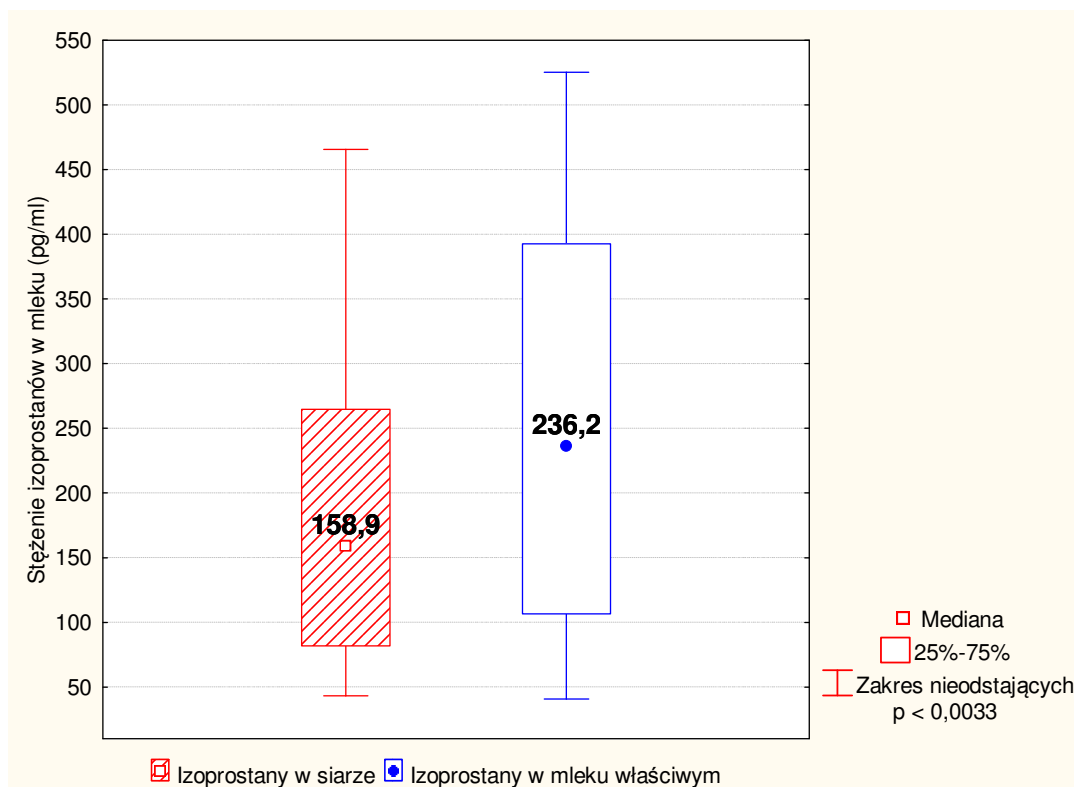
istotnie statystycznie między badanymi grupami i wynosiły odpowiednio 232 pg/ml w mleku właściwym kobiet z grupy I oraz 228 pg/ml w mleku właściwym kobiet z grupy II. W przypadku stężeń izoprostanów w mleku właściwym ich rozkład nie różnił się w obu grupach. [ryc. 16]



Ryc. 16. Stężenia izoprostanów (pg/ml) w mleku właściwym w badanych grupach.

3. Zmienność stężeń izoprostanów w czasie trwania laktacji w mleku kobiecym.

Zbadano również zmienność stężeń izoprostanów w mleku kobiecym w toku trwania laktacji, tj. porównano pary wyników stężeń izoprostanów w sianie i w mleku właściwym dla każdej z badanych kobiet. Wśród kobiet z grupy I stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężeń izoprostanów wraz z czasem trwania laktacji ($p < 0,0033$). [ryc. 17]



Ryc. 17. Porównanie stężeń izoprostanów w sianie i mleku właściwym w grupie kobiet palących.

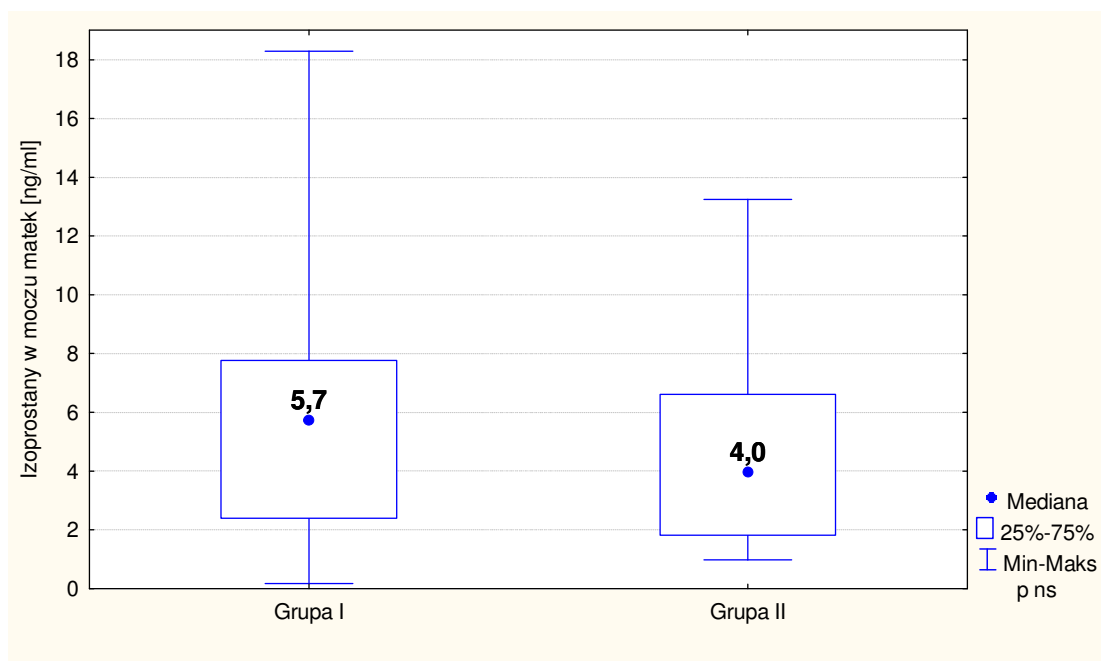
Podsumowanie rozdziału

Stężenia izoprostanów w mleku nie różniły się istotnie statystycznie między grupami I i II, zarówno w sianie jak i w mleku właściwym. W grupie matek palących w toku laktacji zaobserwowano istotny wzrost stężeń izoprostanów w mleku. Wydaje się, iż pomiar izoprostanów w mleku kobiecym, z uwagi na dużą rozpiętość uzyskiwanych wartości nie spełnia kryteriów markera uszkodzeń wolnorodnikowych lipidów pod wpływem palenia papierosów.

IV. Ocena natężenia stresu oksydacyjnego na podstawie badania wydalania izoprostanów w moczu u matek karmiących w grupie palących i niepalących w 30 dniu laktacji.

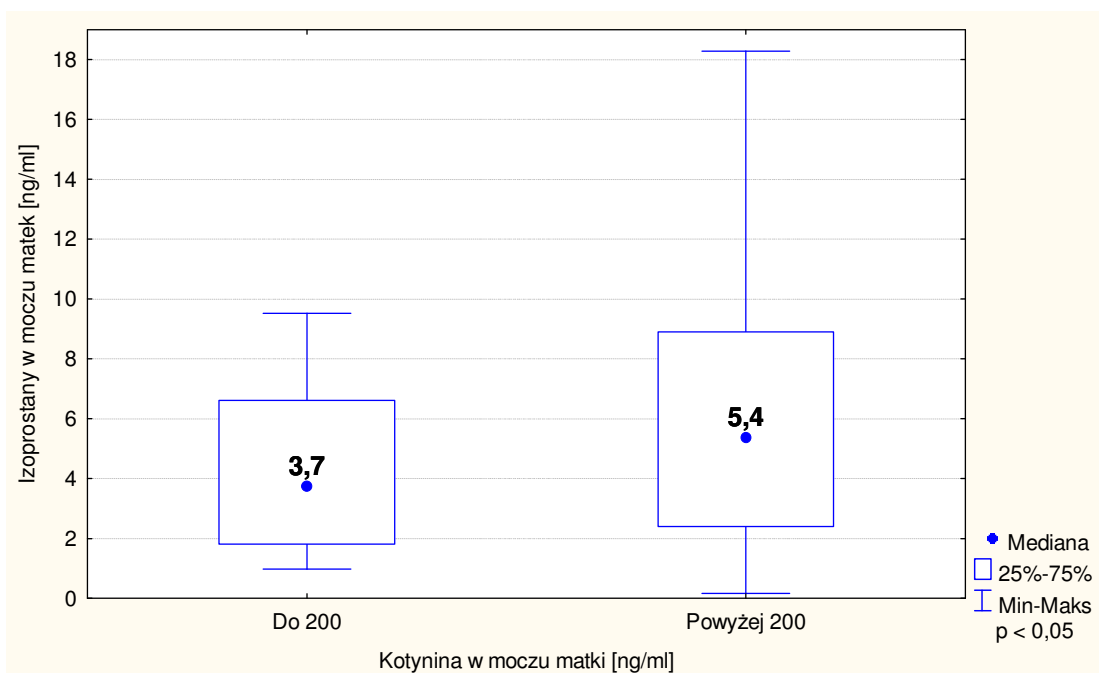
Aby zobrazować nasilenie stresu oksydacyjnego u badanych kobiet zdecydowano się określić wydalanie w moczu produktów wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów, jakimi są izoprostany. O ile stężenia izoprostanów w mleku (rozdział poprzedni) są rzadko przytaczane w literaturze [159], być może ze względu na trudności techniczne, o tyle oznaczanie stężeń izoprostanów w moczu jest szeroko stosowane do oceny natężenia reakcji wolnorodnikowych, szczególnie w przypadku stresu oksydacyjnego wywołanego paleniem papierosów. [35,36,37,39,41]

Oznaczeń dokonano w moczu kobiet z grupy I oraz kobiet z grupy II. Mediany stężeń w badanych grupach wyniosły 5,7 ng/ml w moczu kobiet z grupy I oraz 4 ng/ml w moczu kobiet z grupy II. Stwierdzono wyższe stężenia izoprostanów w moczu kobiet palących niż w grupie referencyjnej, nie uzyskując jednak istotności statystycznej. [ryc. 18]



Ryc. 18. Stężenia izoprostanów w moczu badanych kobiet w 30 dobie po porodzie.

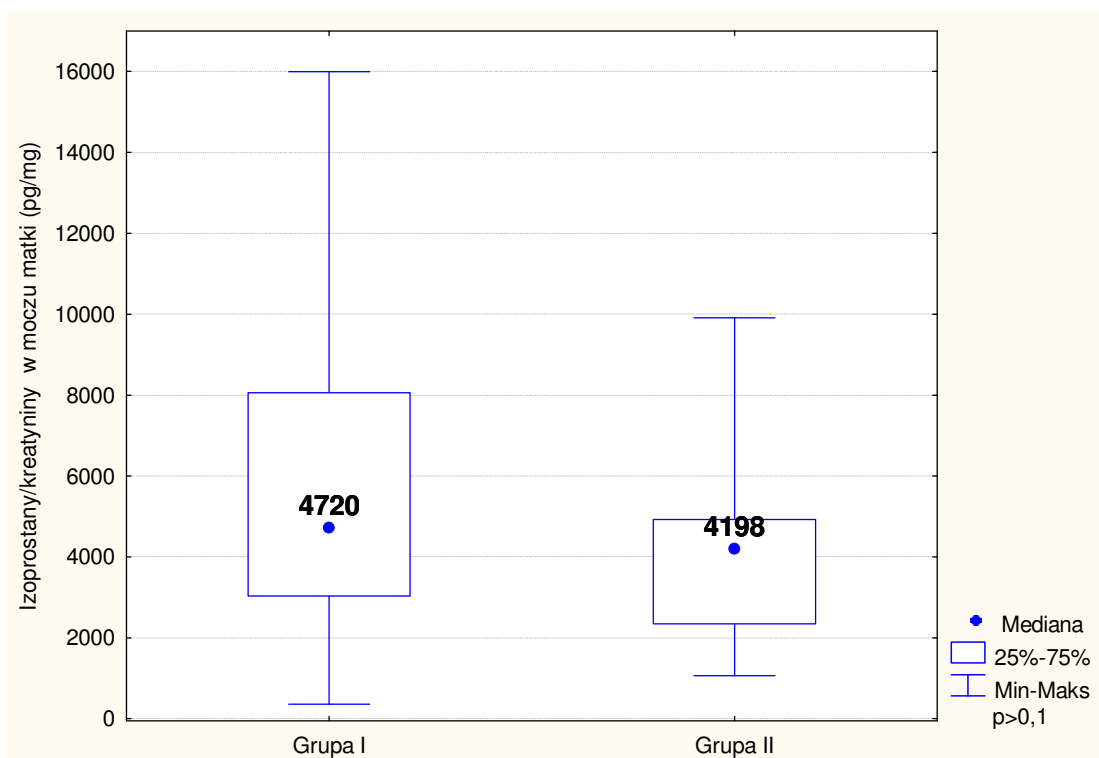
Porównano również dwie grupy kobiet, u których stwierdzone uprzednio wydalenie kotyniny w moczu było wyższe bądź niższe niż 200 ng/ml. Stężenia izoprostanów w moczu kobiet, u których stężenia kotyniny w moczu przekraczały 200 ng/ml, są statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kobiet o mniejszych stężeniach kotyniny w moczu. [ryc. 19]



Ryc. 19. Stężenia izoprostanów w moczu w zależności od stężeń kotyniny w moczu.

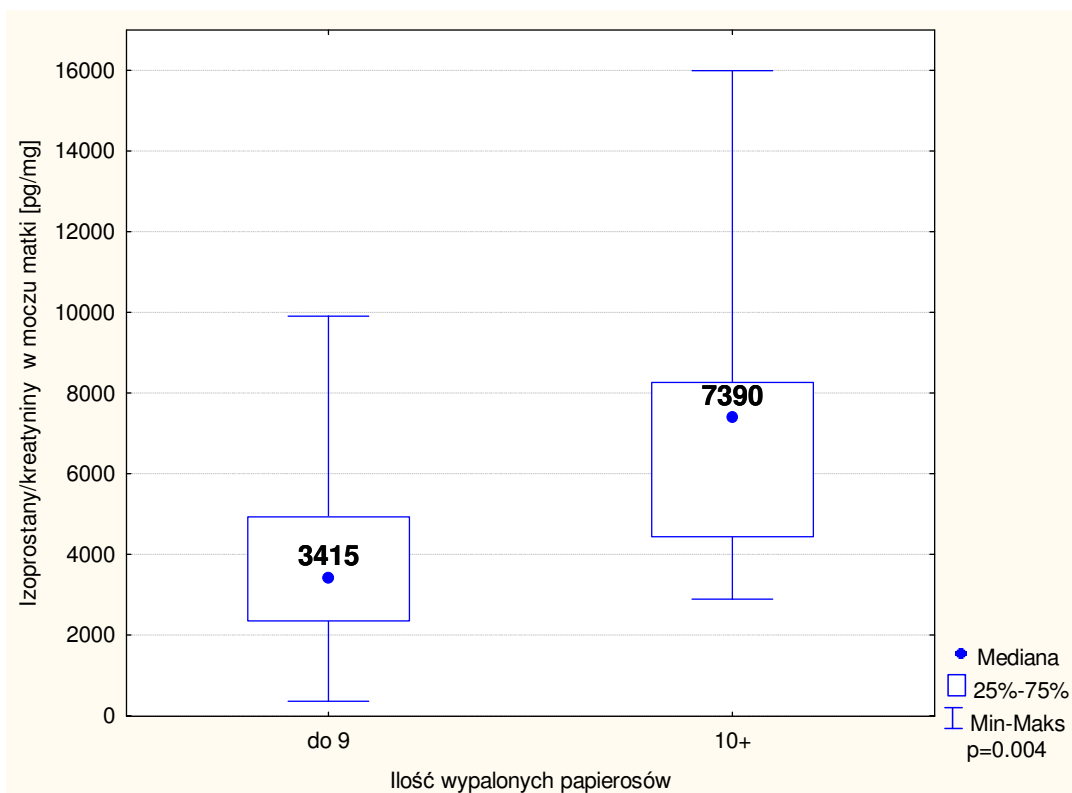
Uznaną formą interpretacji wyników wydalania substancji z moczem, jak już wspomniano, jest określenie tzw. wskaźnika kreatyninowego. W tym celu porównano stężenia izoprostanów (skorygowane względem kreatyniny) w moczu kobiet palących i niepalących (pg izoprostanów/mg kreatyniny). Mieściły się one między 358,1 i 15990 pg/mg. [ryc. 20] W moczu kobiet z grupy I średnia wartość stężeń izoprostanów w odniesieniu do kreatyniny wynosiła 5843 pg/mg, zaś w moczu kobiet z grupy II średnia ta wyniosła 4183 pg/mg. Przy użyciu standardowego testu U Manna-Whitneya nie udało się wykazać istotnych różnic statystycznych między badanymi

grupami ($p=0,107$). Jednak obserwując poszczególne wartości stężeń izoprostanów skorygowanych względem kreatyniny, możemy zauważyć, iż w pewnej liczbie przypadków kobiet palących wartości te były bardzo wysokie, zaś w grupie kobiet niepalących oscylowały one wokół mediany [ryc. 20]

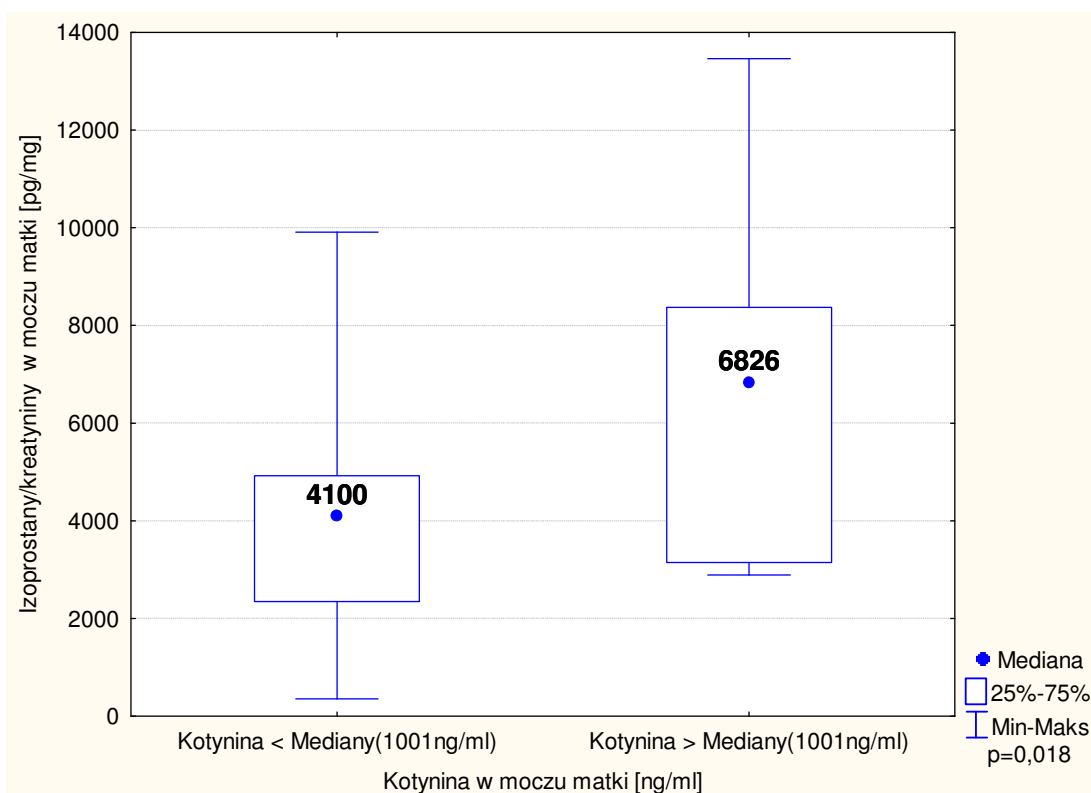


Ryc. 20. Stężenia izoprostanów skorygowane względem kreatyniny w moczu kobiet palących i niepalących.

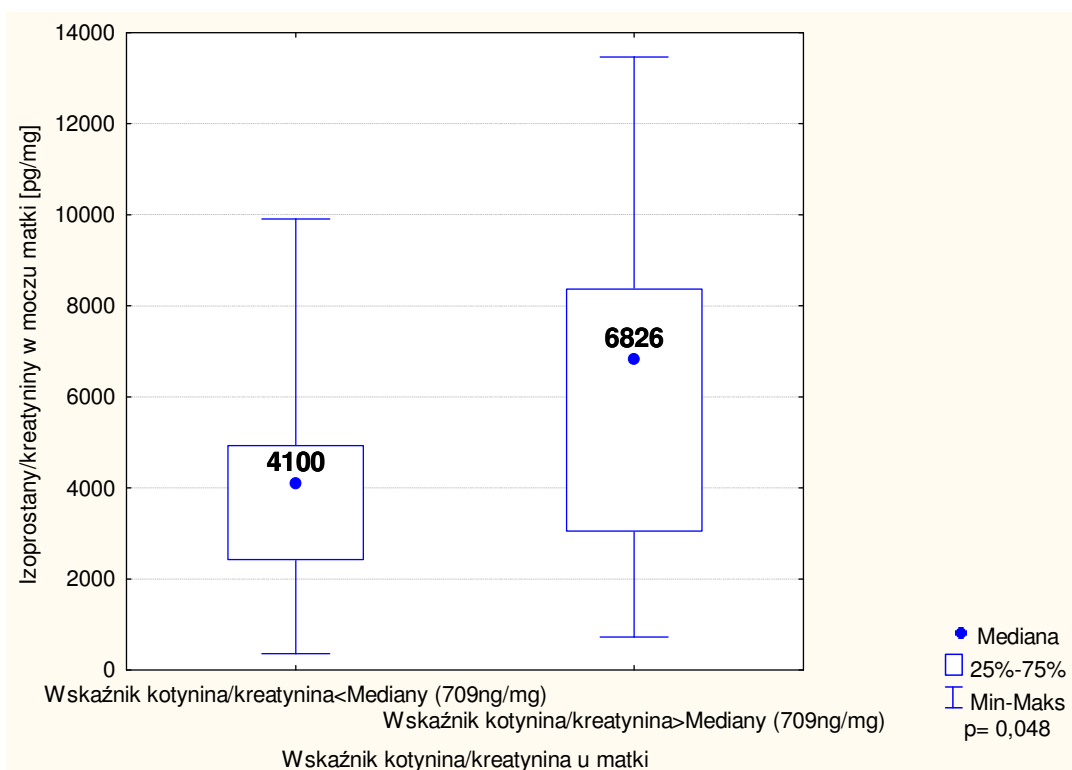
Jeżeli przeanalizujemy uzyskane wyniki stężeń izoprostanów skorygowanych względem kreatyniny w moczu kobiet w zależności od liczby wypalanych papierosów [ryc. 21] oraz ilości wydalania kotyniny w moczu (rozpatrywanych jako wartości bezwzględne oraz skorygowane względem kreatyniny) [ryc. 22 i 23], stężenia te u kobiet intensywnie palących będą znacząco wyższe niż u pozostałych uczestniczek badania. Jako wartość różnicującą intensywność palenia przyjęto medianę liczby wypalanych papierosów oraz stężeń kotyniny w moczu.



Ryc. 21. Zależność między stężeniem izoprostanów skorygowanym względem kreatyniny w moczu a ilością wypalanych papierosów.



Ryc. 22. Zależność między stężeniem izoprostanów skorygowanym względem kreatyniny w moczu a stężeniem kotyniny w moczu.



Ryc. 23. Zależność między stężeniem izoprostanów skorygowanym względem kreatyniny w moczu a wskaźnikiem kotynina/ kreatynina.

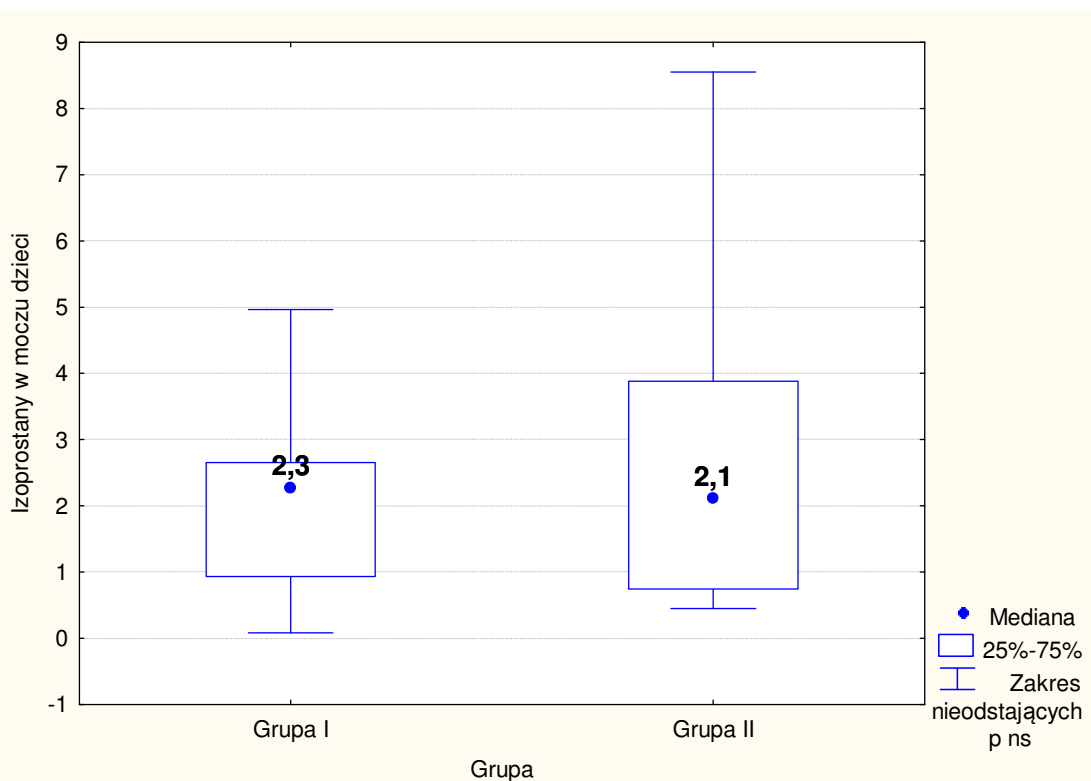
Podsumowanie rozdziału

Stężenia izoprostanów w moczu kobiet w grupach I i II nie różniły się istotnie statystycznie; różnice te stawały się istotne w grupie kobiet, u których wydalanie kotyniny z moczem było wyższe niż 200 ng/ml. U kobiet intensywnie palących (wyodrębnionych na podstawie danych ankietowych oraz ilości wydalania kotyniny z moczem) stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenia izoprostanów w moczu (skorygowane względem kreatyniny) niż u pozostałych uczestniczek badania.

V. Badania u dzieci

1. Ocena wpływu palenia papierosów przez matki na natężenie stresu oksydacyjnego u ich dzieci na podstawie badania stężeń izoprostanów w moczu.

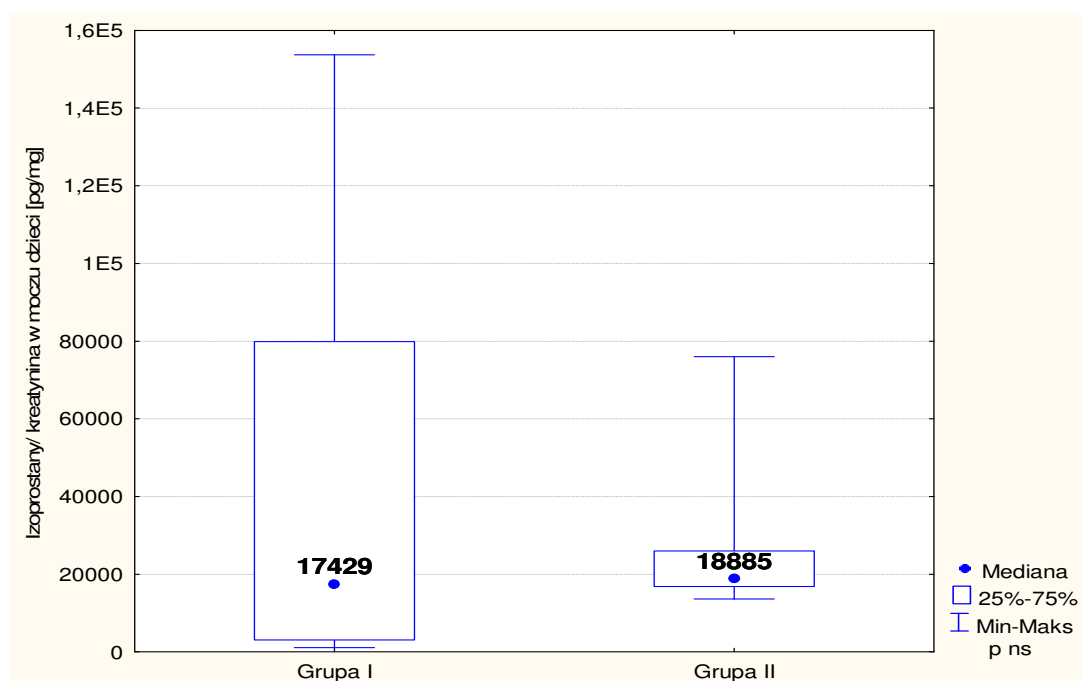
Kolejnym etapem badań była próba oceny nasilenia reakcji wolnorodnikowych u dzieci karmionych piersią przez matki palące papierosy w porównaniu do dzieci karmionych piersią przez matki niepalące. Badania stężeń izoprostanów wykonano w moczu dzieci matek z grupy I oraz dzieci matek z grupy II. Mediany stężeń izoprostanów w moczu wyniosły 2,3 ng/ml u dzieci matek z grupy I oraz 2,1 ng/ml u dzieci matek z grupy II.



Ryc. 24. Stężenie izoprostanów (ng/ml) w moczu dzieci karmionych przez matki palące i niepalące

Interpretacji wyników dokonano jak poprzednio w stosunku do tzw. wskaźnika kreatyninowego. Stężenia izoprostanów skorygowane względem kreatyniny są zdecydowanie wyższe w moczu dzieci

w porównaniu do moczu ich matek, co wynika ze zdecydowanie niższych stężeń kreatyniny w moczu dzieci. Możemy też zaobserwować znaczącą dyspersję wartości w stężeniach izoprostanów w moczu dzieci matek palących. [ryc. 25]



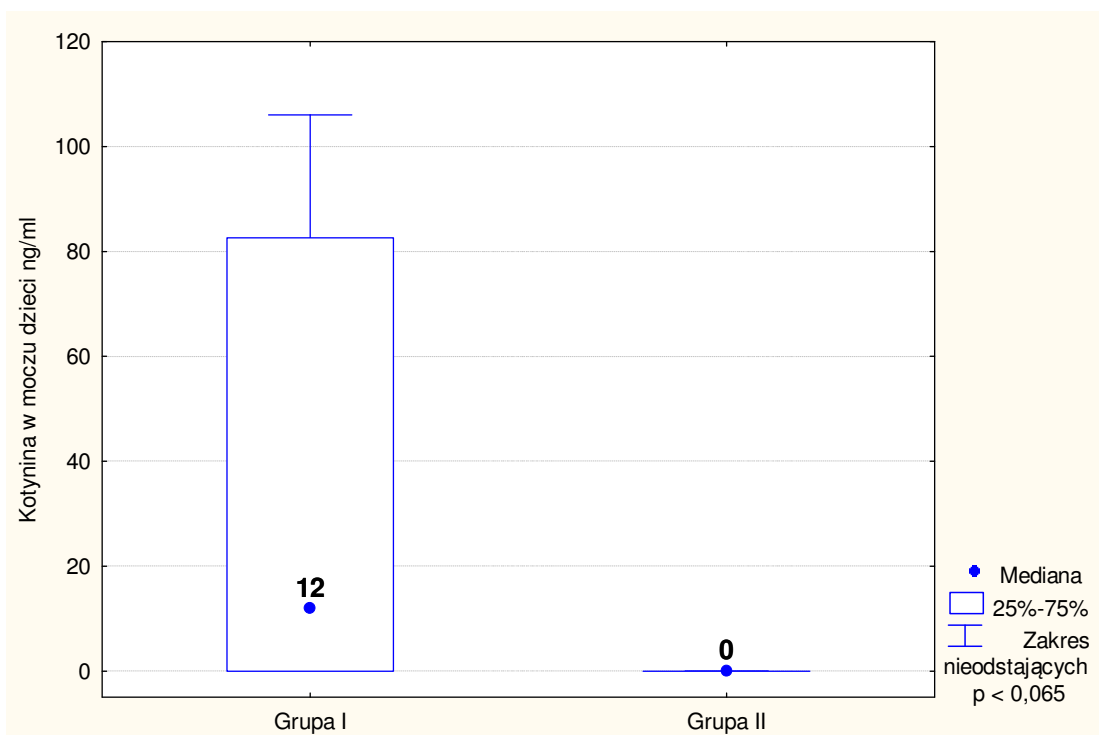
Ryc. 25. Stężenia izoprostanów skorygowane względem kreatyniny w moczu badanych dzieci matek palących i niepalących.

Przy użyciu standardowego testu U Manna-Whitneya nie zauważono różnic statystycznych między badanymi grupami noworodków matek palących i niepalących. Można jednak zaobserwować różnicę w rozkładzie uzyskanych wyników ($p=0,031$, jednostronny test serii Walda Wolfowitza). W przypadku grupy I ilość dzieci, u których stężenia izoprostanów w moczu w odniesieniu do kreatyniny były wysokie, była większa niż w grupie II.

2. Oznaczenia kotyniny w moczu badanych dzieci

Oceniono również stężenia kotyniny w moczu badanych dzieci w grupie dzieci matek palących oraz niepalących. U 6 dzieci matek

z grupy I i 14 dzieci matek z grupy II nie stwierdzono obecności kotyniny w moczu, w pozostałych przypadkach stwierdzono stężenia wahające się od 23,9 do 477 ng/ml. Ten ostatni wynik stwierdzono w moczu dziecka matki, u której stwierdzono najwyższe stężenie kotyniny w moczu. Stwierdzone stężenia kotyniny w moczu dzieci nie wykazywały zależności ze stężeniami kotyniny w moczu ich matek. Mimo różnic w stężeniach kotyniny w moczu dzieci matek palących i niepalących nie stwierdzono istotności statystycznych różnic. [ryc. 26]



Ryc. 26. Stężenia kotyniny w moczu badanych dzieci (ng/ml)

Wskaźnik kotynina/kreatynina nie różnił się znacząco między badanymi grupami dzieci. [zał. 7]

Analizując uzyskane wyniki wskaźnika kotyninowo - kreatyninowego w poszczególnych przypadkach [zał. 8], u dzieci, u których stężenia kotyniny były oznaczalne (>0), w większości wskaźnik kotynina/ kreatynina był wyższy niż u ich matek, co wynika zapewne z niskich stężeń kreatyniny w ich moczu. U dwojga dzieci matek niepalących (stężenie kotyniny w moczu równe 0), stwierdzono

dodatnie stężenia kotyniny w moczu. Świadczy to zapewne o poddaniu tych dzieci paleniu biernemu. Wskaźnik kotynina/kreatynina był u tych dzieci znacząco wyższy niż przyjęta w piśmiennictwie dla starszych dzieci i dorosłych wartość 150 ng/mg świadcząca o aktywnym paleniu. [87,158]

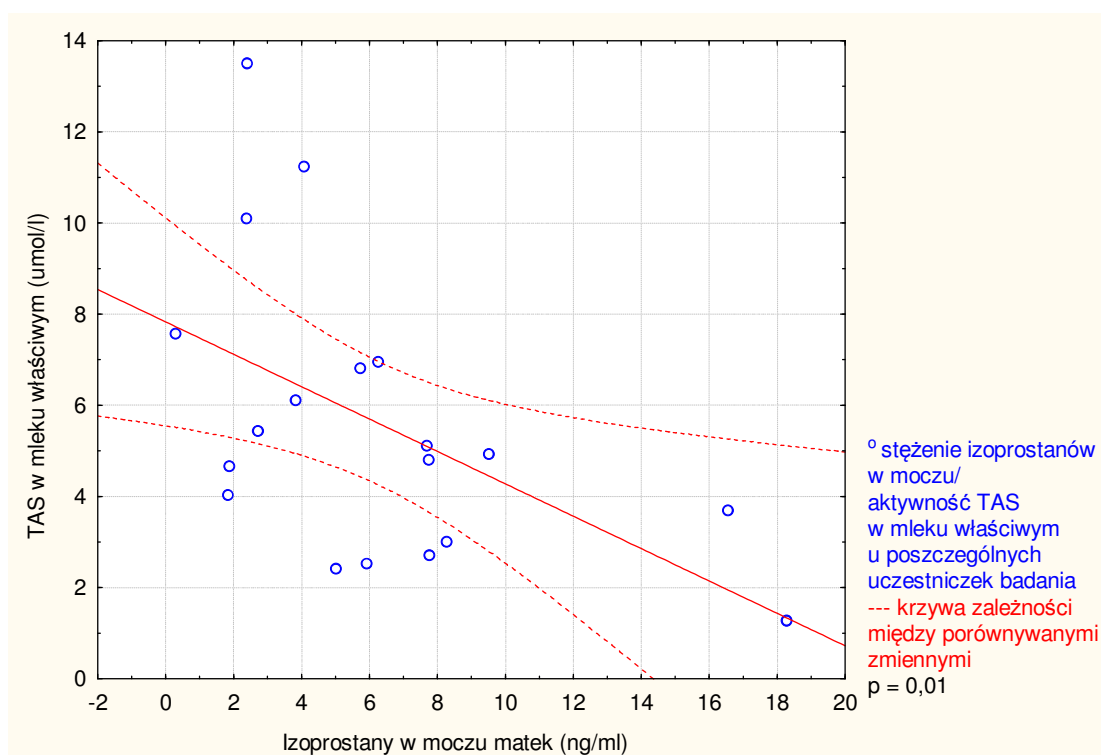
Podsumowanie rozdziału

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wydalaniu izoprostanów ani kotyniny w moczu dzieci matek z obu grup. Zauważono znaczną dyspersję wartości stężeń izoprostanów i kotyniny w moczu dzieci matek palących. W moczu dzieci z grupy I zaobserwowano większą ilość dzieci z wysokimi stężeniami izoprostanów skorygowanymi względem kreatyniny niż w grupie II. Wskaźnik kotynina/kreatynina przy oznaczalnych stężeniach kotyniny w moczu dzieci przewyższa odpowiedni wskaźnik u ich matek.

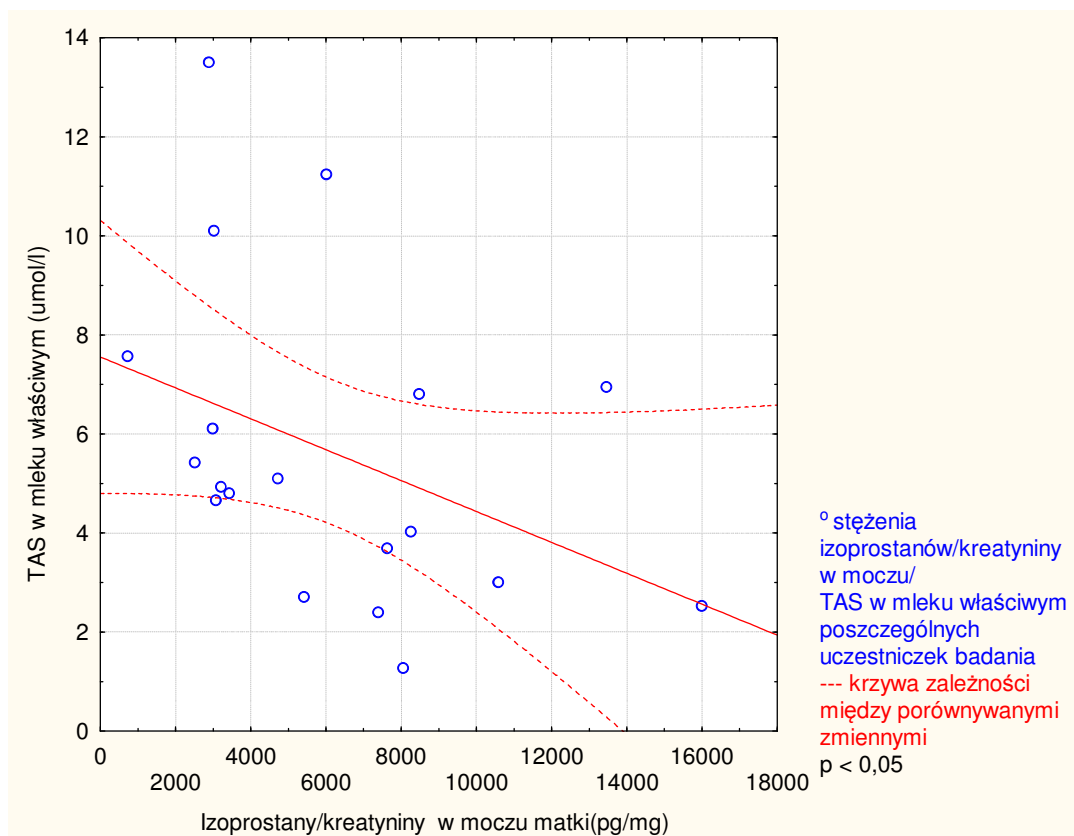
VI. Ocena zależności między natężeniem stresu oksydacyjnego a właściwościami antyoksydacyjnymi mleka kobiecego.

1. *Zależność między natężeniem stresu oksydacyjnego u matek wyrażonym jako stężenie izoprostanów w **moczu** a całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w **mleku** właściwym.*

Porównano stężenia izoprostanów w moczu z całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku właściwym badanych kobiet. Zaobserwowano odwrotną zależność między stężeniami izoprostanów w moczu wyrażonymi zarówno jako wartość bezwzględna (ng/ml) oraz jako stężenia izoprostanów skorygowane względem kreatyniny (pg/mg) [ryc. 27 i 28] a TAS w grupie kobiet palących. Oznacza to, iż w grupie I wraz ze wzrostem natężenia stresu oksydacyjnego u matek (wyższe stężenia izoprostanów w moczu) malała aktywność antyoksydacyjna w mleku.



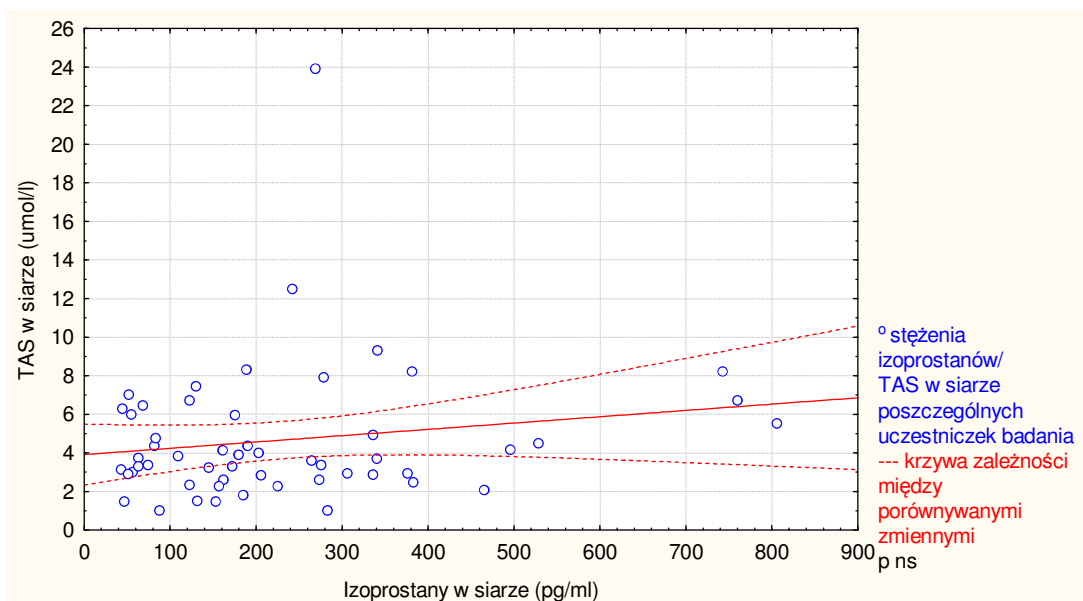
Ryc. 27. Zależność między całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku właściwym a stężeniami izoprostanów w moczu kobiet palących



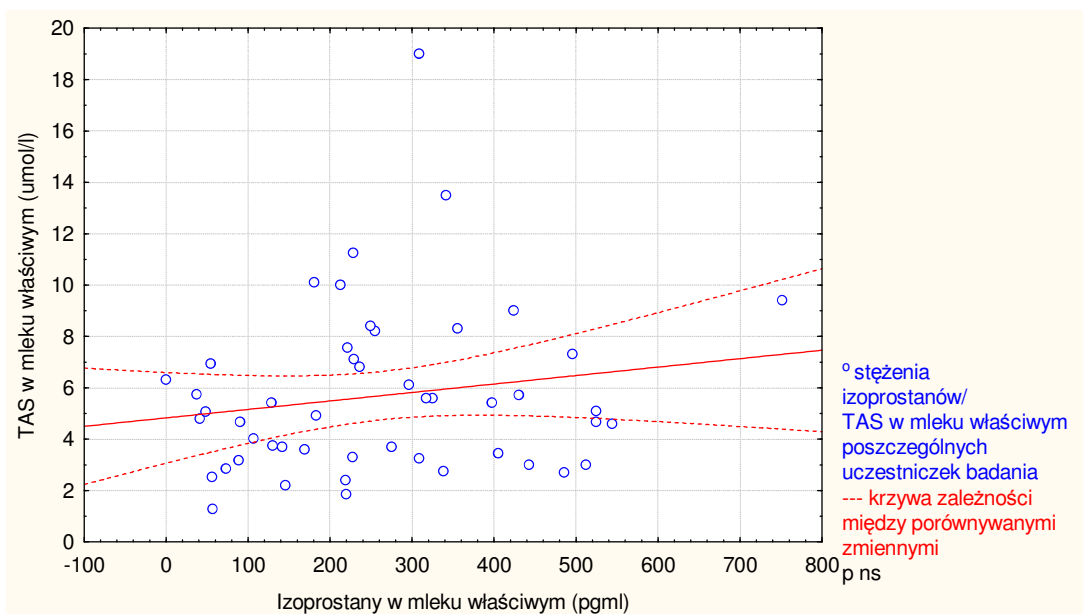
Ryc. 28. Zależność między całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku właściwym (TAS) a stężeniami izoprostanów skorygowanymi względem kreatyniny w moczu kobiet palących.

2. Zależność między natężeniem stresu oksydacyjnego wyrażonym jako stężenie izoprostanów w mleku a całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w mleku.

Porównano stężenia izoprostanów w mleku z całkowitą zdolnością antyoksydacyjną odpowiednio w siarze [ryc. 29] i mleku właściwym [ryc. 30]. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności, ani istotnych różnic między badanymi grupami.



Ryc. 29. Porównanie stężeń izoprostanów z całkowitymi zdolnościami antyoksydacyjnymi (TAS) w sianie.



Ryc. 30. Porównanie stężeń izoprostanów z całkowitymi zdolnościami antyoksydacyjnymi (TAS) w mleku właściwym.

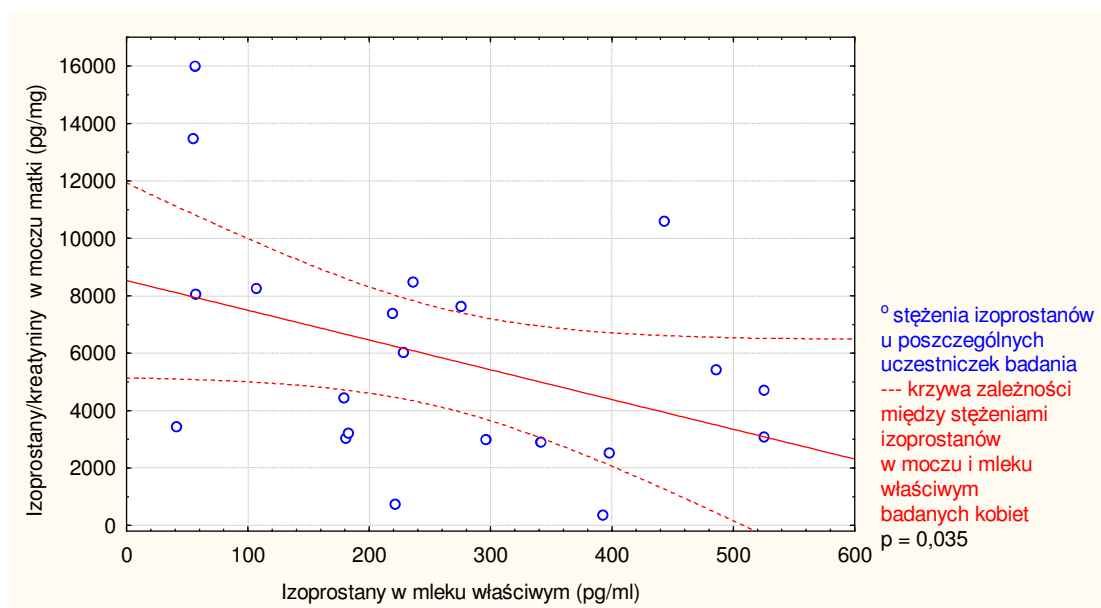
Podsumowanie rozdziału

W grupie I wraz ze wzrostem natężenia stresu oksydacyjnego u matek (wyższe stężenia izoprostanów w moczu) malała aktywność antyoksydacyjna w mleku. Nie stwierdzono istotnych zależności między stężeniami produktów wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów w mleku kobiecym a zdolnością antyoksydacyjną, zarówno w sianie jak i w mleku właściwym.

VII. Ocena zależności między stężeniem markerów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów w mleku i moczu badanych kobiet

Porównując stężenia **izoprostanów w mleku** właściwym ze stężeniami **izoprostanów wydalanych w moczu** badanych kobiet w 30 dniu po porodzie nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.

Porównując stężenia izoprostanów w mleku właściwym ze stężeniami izoprostanów skorygowanymi względem stężeń kreatyniny w moczu uzyskano znaczącą różnicę między badanymi grupami. W grupie I zwiększeniu stężeń izoprostanów w moczu towarzyszyło obniżenie stężeń izoprostanów w mleku kobiet. [ryc. 31] Ten zaskakujący wynik omówiono w rozdziale „Dyskusja”.



Ryc. 31. Zależność między stężeniami izoprostanów w mleku i w moczu skorygowanymi względem stężeń kreatyniny w 30 dobie po porodzie w grupie I.

Podsumowanie rozdziału

Stwierdzono, iż w grupie I zwiększeniu stężeń izoprostanów w moczu (skorygowanych względem kreatyniny) towarzyszyło obniżenie stężeń izoprostanów w mleku kobiet.

VIII. Ocena zależności między natężeniem stresu oksydacyjnego u matek i ich dzieci

Porównano natężenie stresu oksydacyjnego u matek i ich dzieci określając stężenia izoprostanów w ich moczu pobieranym w 30 dobie po porodzie. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności. Podobnie, gdy porównano stężenia izoprostanów skorygowane względem kreatyniny w moczu matek i ich dzieci nie stwierdzono zależności.

Natężenie stresu oksydacyjnego u dzieci wyrażone jako stężenie izoprostanów w moczu nie wykazywało również korelacji ze stężeniem izoprostanów w mleku właściwym ich matek.

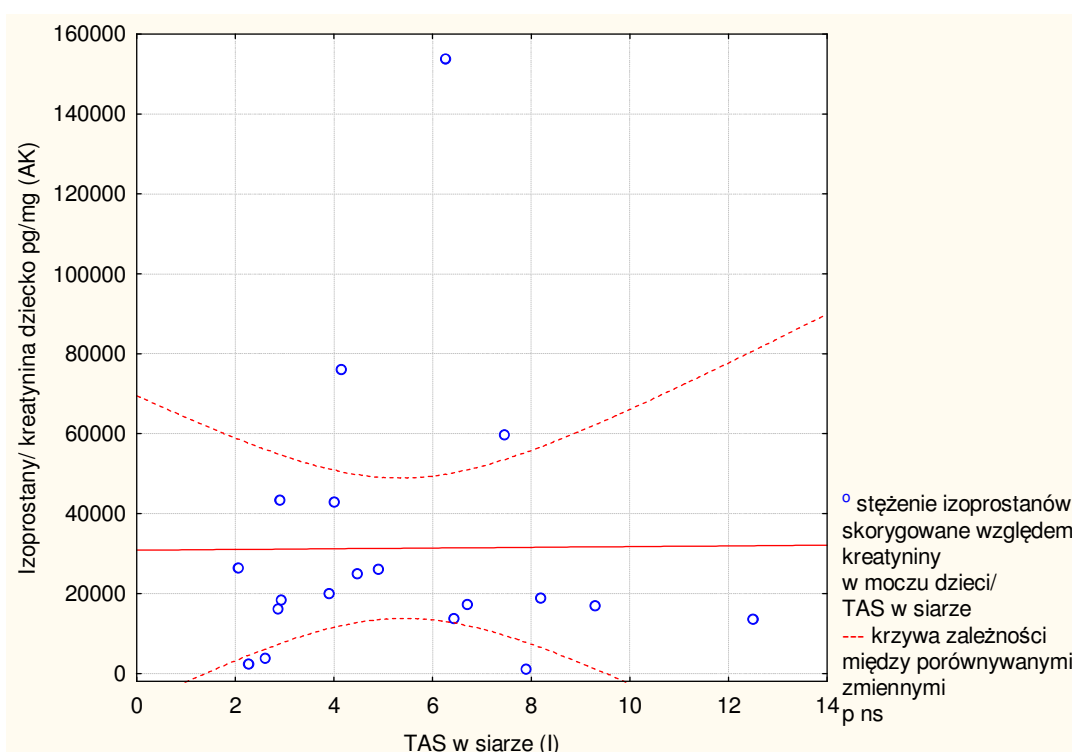
Podsumowanie rozdziału

Nie stwierdzono istotnych zależności między natężeniem stresu oksydacyjnego u matek i ich dzieci wyrażonym poprzez wydalenie izoprostanów w moczu. Nie stwierdzono również zależności między stopniem uszkodzeń wolnorodnikowych lipidów w mleku kobiecym a natężeniem stresu oksydacyjnego u dzieci nim karmionych.

IX. Ocena zależności między właściwościami antyoksydacyjnymi mleka kobiecego (TAS) a natężeniem stresu oksydacyjnego u dzieci

1. Ocena zależności między TAS w sianie kobiet a stężeniem izoprostanów w moczu ich dzieci

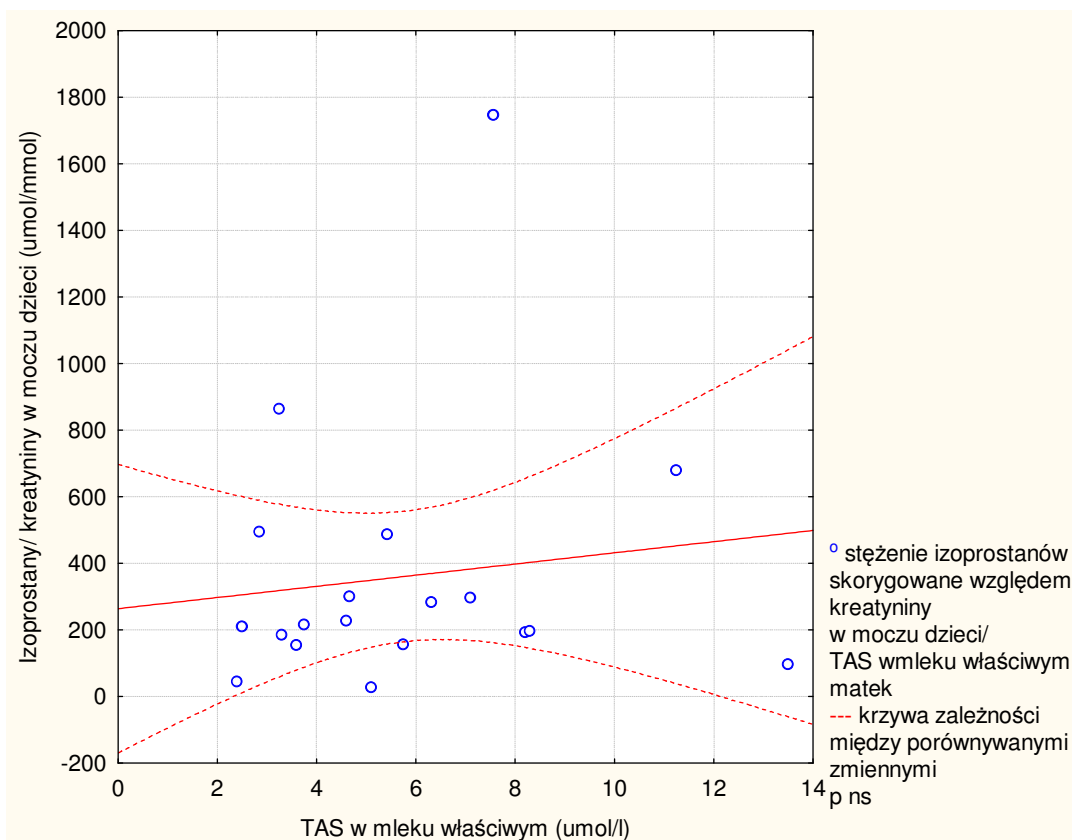
Oceniono zależność między aktywnością TAS w sianie kobiet a stężeniami izoprostanów w moczu ich dzieci pobranym w 30 dobie po porodzie. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.



Ryc. 32. Ocena zależności między TAS w sianie a stężeniem izoprostanów w moczu dzieci

2. Ocena zależności między TAS w mleku właściwym kobiet a stężeniem izoprostanów w moczu ich dzieci

Oceniono zależność między aktywnością TAS w mleku właściwym kobiet a stężeniami izoprostanów skorygowanymi względem kreatyniny w moczu ich dzieci pobranym w 30 dobie po porodzie. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.



Ryc. 33. Ocena zależności między TAS w mleku właściwym kobiet a stężeniem izoprostanów w moczu ich dzieci.

Podsumowanie rozdziału

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między aktywnością TAS w mleku kobiet a stężeniami izoprostanów w moczu ich dzieci pobranym w 30 dobie po porodzie.

WNIOSKI

- 1) Palenie papierosów przez kobiety w okresie ciąży i laktacji zaburza równowagę antyoksydacyjno – prooksydacyjną w mleku kobiecym.
- 2) U kobiet palących papierosy w okresie ciąży i laktacji stwierdzono znaczące obniżenie Całkowitej Zdolności Antyoksydacyjnej (TAS) w sianie.
- 3) Całkowita Zdolność Antyoksydacyjna w sianie i w mleku właściwym kobiet palących jest zależna od liczby wypalanych przez nie papierosów.
- 4) U kobiet palących wolnorodnikowe uszkodzenia elementów mleka pogłębiają się w toku laktacji.
- 5) Stres oksydacyjny w organizmie kobiety karmiącej wyrażony ilością wydalanych izoprostanów w jej moczu koreluje z zaburzeniami antyoksydacyjnymi w jej pokarmie.

DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW

Palenie papierosów **przez kobiety karmiące** jest znacznym problemem zarówno społecznym, jak i zdrowotnym, szczególnie, iż dotyczy głównie zdrowia ich nowo narodzonych dzieci. Jednocześnie wydaje się być problemem mniej dostrzeganym przez autorytety medyczne i społeczne niż np. **palenie tytoniu w okresie ciąży**. Z przeprowadzonych badań wiemy, iż wiele kobiet powstrzymujących się od tego nałogu w okresie ciąży wraca do niego po porodzie. [79-85] Palenie papierosów jest również uznanym czynnikiem ryzyka szybszego zakończenia karmienia piersią. [79,88,117] Upośledzone są również ilość i jakość produkowanego pokarmu. [107,124] Znaczna jest także ilość dostarczanych tą drogą toksycznych substancji, w tym nikotyny i cyjanowodoru. Wysokie poziomy nikotyny w mleku kobiecym utrzymują się do 2 godzin po wypaleniu ostatniego papierosa. [118-123] Palenie papierosów to także, a może przede wszystkim, największe środowiskowe źródło reaktywnych form tlenu. [94-102] Negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na rozwój i zdrowie nowo narodzonych dzieci jest w ostatnich latach coraz szerzej udowodniany. [71]

Niniejsza praca miała na celu prześledzić zjawiska zachodzące w pokarmie naturalnym pod wpływem palenia tytoniu przez matki w okresie laktacji.

Wybór dwóch momentów czasowych, w których dokonywano badań, tj. początek trzeciej i trzydziesta doba po porodzie wydaje się być dobrze uzasadniony. Początek trzeciej doby po porodzie to z jednej strony dzień zwiększenia ilości produkowanej siary, z drugiej – czas, który upłynął od silnego stresu oksydacyjnego, jakim dla matki i dziecka jest poród. [160,161] Trzydziesta doba po porodzie to czas produkcji mleka właściwego. Duża ilość kobiet, zwłaszcza palących przestaje karmić w pierwszych kilku tygodniach po porodzie. [162]

W opublikowanych dotychczas badaniach dotyczących równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej w pokarmie naturalnym, dzień laktacji, w którym pobierano próbki, różnił się znacząco. W części badań wybierano podobne przedziały czasowe (Quiles i wsp. – 3, 8 i 30 doba po porodzie). [163] Alberti – Fidanza i wsp. badali również całkowitą zdolność antyoksydacyjną w mleku porównując ją w trzech okresach: produkcji siary, mleka przejściowego i właściwego. [56] W badaniu Ermis i wsp. [145] oceniano wpływ palenia papierosów na pokarm kobiecy w 7 dobie po porodzie. Ortega i wsp. [143,144] badali stężenia istotnych antyoksydantów – witamin C i E w mleku przejściowym (14 - 15 doba) oraz właściwym kobiet palących papierosy (40 doba po porodzie). Ezaki i wsp. badali całkowitą zdolność antyoksydacyjną w mleku kobiecym do końca 8 miesiąca życia zaczynając od 3 doby po porodzie, 30 doba po porodzie stanowiła tu ważną granicę czasową. [164]

Decyzję o kwalifikacji kobiet do odpowiednich grup na podstawie danych ankietowych podejmowano w licznych badaniach. [124,143,144,145,165] Wykazanie istotnych różnic między stężeniami kotyniny oraz wskaźnikiem kotynina/kreatynina w moczu kobiet deklarujących palenie oraz w moczu kobiet z grupy referencyjnej było dodatkowym czynnikiem weryfikującym prawdziwość przyjętej tezy o wiarygodności danych ankietowych. Użycie przyjętych wartości granicznych stężenia kotyniny w moczu oraz wskaźnika kotynina/kreatynina nie zmieniło klasyfikacji badanych kobiet poza jednym ewidentnym przypadkiem zatajenia faktu palenia papierosów.

Liczne badania porównujące zależność między deklaracją dotyczącą faktu palenia oraz jego natężenia a wydalaniem kotyniny, w różnych grupach pacjentów, wykazywały, że dane ankietowe cechują

się dużą wiarygodnością. Kobiety w ciąży są jedną z grup, które z racji wysokiej szkodliwości działania dymu tytoniowego na płód, są często weryfikowane w aspekcie palenia papierosów. [146,152,166-168] W niektórych badaniach uzyskane czułości i swoistości były bardzo wysokie [146], w innych nieco niższe, choć wciąż zadowalające. [147,168] Podobne wartości uzyskano w niniejszym badaniu (czułość 94%, swoistość 90%). W niniejszej pracy zastanawiający jest dość wysoki procent kobiet deklarujących palenie, u których jednocześnie stwierdzono niskie stężenia kotyniny w moczu. Rodzi się w tych wypadkach pytanie, czy może palenie papierosów w ciąży nie skłania ankietowanych kobiet do zgłaszania tego faktu, mimo że w toku karmienia przestały palić. Część uzyskanych niezgodności między deklaracją a stężeniami kotyniny w moczu można wytłumaczyć różnymi stężeniami nikotyny w wypalanych papierosach, techniką palenia przez badane kobiety, różnym indywidualnym metabolizmem nikotyny w ustroju bądź wpływem dymu papierosowego zawartego w środowisku. [168-170] W pracy DeLorenze i wsp. wykazano, iż wiele kobiet w ciąży mimo bardzo dokładnych pytań dotyczących biernego palenia nie zdaje sobie sprawy z narażenia na fakt wdychania dymu tytoniowego. [167] Walsh i wsp. podaje, iż aż 7,4 – 15,2% kobiet deklarujących niepalenie na podstawie badań biochemicznych (kotynina) musiało być zakwalifikowanych do grupy kobiet palących. [171] Avidano - Bitton i wsp. oraz England i wsp. stwierdzili w swych badaniach małą wiarygodność deklaracji dotyczących palenia w grupie kobiet w ciąży, szczególnie u tych, które twierdziły, iż rzuciły palenie. [152,172] Perez-Stable i wsp. stwierdzili, iż właśnie w grupie deklarujących palenie niewielkiej liczby papierosów (1-9) wykryto największą ilość niezgodności między deklaracją a stężeniami kotyniny w ich moczu (ok. 20%). [173]

Średnie stężenia kotyniny w moczu badanych kobiet uzyskane w niniejszej pracy są porównywalne z danymi epidemiologicznymi przeprowadzonymi wśród kobiet palących. [174-176] Poczynione spostrzeżenia o znacznej indywidualnej zmienności między ilością deklarowanych wypalanych papierosów a stężeniami kotyniny w moczu pokrywają się z doniesieniami innych autorów. W pracy Ziegler i wsp. o jednakowej metodyce udowodniono związek między stężeniami kotyniny a liczbą wypalanych papierosów (prezentowanymi w formie przedziałów: 0, 1-9, 10-19, ≥ 20 papierosów). [151] Klebanoff i wsp. oraz Haddow i wsp. ustalili średnie **stężenie kotyniny w surowicy** w przeliczeniu na jednego wypalonego papierosa (ok. 9,5 ng/ml). [168,176] W innych pracach stwierdzono bardzo duże indywidualne rozbieżności w stężeniach kotyniny między badanymi o porównywalnej deklarowanej liczbie wypalanych papierosów. [166,168,177,178] Uzyskane w niniejszej pracy średnie stężenie **kotyniny w moczu** w przeliczeniu na jednego deklarowanego wypalonego papierosa 76 ng/ml nie różni się znacząco od wartości uzyskanej na podstawie licznych prac (100 ng/ml/ papieros). [169,174,175,178] Wartość ta jest jednak podważana w obszernej metaanalizie przeprowadzonej przez Dukic i wsp., w której sugerowane jest przyjęcie dwukrotnie wyższej wartości za bardziej wiarygodną. [179]

Badanie kotyniny w moczu noworodków urodzonych przez matki palące i niepalące nie wykazały statystycznie istotnych różnic. Fakt ten jest najprawdopodobniej związany z dość wysokim progiem czułości użytego testu immunoenzymatycznego (ok. 10-15 ng/ml) przy średnich stężeniach w moczu noworodków wynoszących ok. 1-50 ng/ml. (119,175,180-182) Dlatego też w części analizowanych próbek niewykrywalne stężenia kotyniny mogłyby się okazać stężeniami rzędu kilku ng/ml, co w zestawieniu z niskimi stężeniami kreatyniny w moczu

niemowląt tworzyłoby znaczący wskaźnik kotynina/kreatynina. Przyjęta wartość wskaźnika (150 ng/mg), stosowana u dorosłych jako granica różnicująca palenie aktywne od wpływu środowiskowego dymu papierosowego, w przypadku noworodków i młodych niemowląt wydaje się nie mieć zastosowania.

W dwóch przypadkach uzyskano wartości zdecydowanie wyższe od 150 ng/ml u noworodków matek deklarujących niepalenie (kotynina w moczu tych matek była nieoznaczalna). Podobnych obserwacji o obecności kotyniny w moczu noworodków matek niepalących dokonali Mascola i wsp., którzy w moczu 6-tygodniowych niemowląt poddanych paleniu biernemu stwierdzili wskaźnik kotynina/kreatynina rzędu 400 ng/mg (zakres 0-15200 ng/mg), zaś u dzieci karmionych piersią przez matki palące wskaźnik ten był o wiele wyższy - wynosił ok. 4200 ng/mg. [120]

Becker i wsp. zaobserwowali pięciokrotnie wyższe stężenia kotyniny w moczu noworodków karmionych piersią przez matki palące papierosy niż w moczu noworodków urodzonych przez matki palące, ale karmionych sztucznie. [180] Podobną różnicę zaobserwowali Labrecque i wsp. [121] W badaniu Woodward i wsp. przeprowadzonym wśród 3 – miesięcznych niemowląt karmionych piersią przez palące matki stwierdzono wartości 0 – 1120 ng/mg, wprost proporcjonalne do ilości wypalanych przez matkę papierosów. [122] Schulte – Hobein i wsp. porównali stężenia kotyniny w moczu niemowląt matek palących do stężeń kotyniny w moczu u osób dorosłych. Stwierdzono, iż uzyskane stężenia kotyniny w moczu u dzieci karmionych sztucznie przez matki palące były wyższe niż u osób dorosłych biernie palących, zaś u dzieci karmionych naturalnie przez matki palące stężenia te są porównywalne ze stężeniami uzyskiwanymi u osób dorosłych aktywnie palących. [123] Luck i wsp. stwierdzili wartości między 10 a 870 ng/mg, uzyskując

statystycznie istotnie wyższe wartości u dzieci karmionych piersią w porównaniu do dzieci karmionych sztucznie przez palące matki. [119]

Należy również pamiętać, że czas półtrwania kotyniny w płynach biologicznych noworodków jest znacznie dłuższy niż u dorosłych. [183] Na poziom kotyniny w moczu dziecka ma także wpływ czas, który upłynął od wypalenia przez matkę ostatniego papierosa do momentu karmienia dziecka. [119]

Szeroko opisywany i udowadniany jest fakt, że kobiety palące rodzą noworodki o istotnie niższej masie urodzeniowej. Uważa się, iż palenie papierosów odpowiedzialne jest nawet za 25% obniżenie urodzeniowej masy ciała. [109, 157] W niniejszej pracy nie uzyskano różnic statystycznych w masie urodzeniowej noworodków urodzonych przez matki palące i niepalące. Zaobserwowano co prawda średnie niższe masy urodzeniowe u dzieci matek palących, ale bez istotności statystycznej. O braku różnic statystycznych w tej pracy mógł zdecydować fakt klasyfikacji do grupy palących również kobiet palących niewielkie ilości papierosów.

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. Rodzaj wykorzystywanych markerów stresu oksydacyjnego oraz narzędzi badawczych jest przeogromny. Markery te mogą być cząsteczkami powstającymi w wyniku reakcji z reaktywnymi formami tlenu oraz składnikami obrony antyoksydacyjnej organizmu. [184] Substancje te znajdują się zarówno we krwi i w moczu, jak również w płynie mózgowo – rdzeniowym, stawowym, oskrzelowym, owodniowym,

mleku kobiecym, ślinie, tkankach, włosach oraz wydychanym powietrzu. [184]

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 [133,134], 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. [185] Natężenie stresu oksydacyjnego u zdrowych niemowląt stopniowo obniża się do 6 miesiąca życia [186]. 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). [187,188]

U dzieci przedwcześnie urodzonych stężenia izoprostanów w surowicy krwi zaraz po porodzie są znacząco wyższe niż u dzieci urodzonych o czasie. W pracy Comporti i wsp. udowodniono odwrotną zależność między stężeniem izoprostanów w surowicy krwi noworodków a **tygodniem życia ciążowego**, w którym nastąpił poród. [185]

W badaniu przeprowadzonym wśród 342 zdrowych dzieci do lat 7, Kauffman i wsp. udowodnili obniżanie się stężeń izoprostanów w moczu wraz z wiekiem. [186] Friel i wsp. zaobserwowali podobne zjawisko w surowicy krwi niemowląt w wieku 1-6 miesięcy. [189]

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. [160] Stężenie witaminy C również wzrasta w osoczu noworodków wraz z wiekiem i jest zależne od zawartości tego związku w mleku. [70] U niemowląt przedwcześnie urodzonych stężenie witaminy C w surowicy maleje wraz z wiekiem. [68] Aktywność katalazy wzrasta do 4 miesiąca życia. [186] **Aktywność enzymów o działaniu antyoksydacyjnym jest zdecydowanie niższa u dzieci urodzonych przedwcześnie oraz drogą cięcia cesarskiego.** [190,191]

Karmienie naturalne, dzięki zawartości licznych składników ochrony przeciwutleniającej [80-83], wydaje się być skutecznym sposobem zmniejszenia narażenia noworodków na stres oksydacyjny. Mleko kobiece bezsprzecznie ma działanie antyoksydacyjne w przewodzie pokarmowym. [192] Udowodniono związek karmienia naturalnego z mniejszą zachorowalnością na pewne choroby, w których etiopatogenezie sugeruje się rolę reaktywnych form tlenu. [15,76] 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. [187] 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. [192] Autorzy sugerują, że są one aktywnie produkowane

w gruczole piersiowym i następnie przekazywane w ilościach niebagatelnych karmionym mlekiem dzieciom. [192] Wart podkreślenia jest 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.** [66] 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. [193] U dzieci karmionych naturalnie obserwuje się równie po urodzeniu stopniowy wzrost stężenia karotenoidów (jednego z antyoksydantów) we krwi, podczas gdy u dzieci karmionych sztucznie stężenie to stopniowo obniża się [53]. 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. [77,194,195] 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. [74] W badaniu Granot i wsp. udowodniono jednak zależność wprost przeciwną: karmione sztucznie niemowlęta w wieku 2 - 4 miesięcy miały niższe stężenia MDA (dialdehyd malonowy) niż ich rówieśnicy karmieni naturalnie, nie pociągało to jednak za sobą zmian w zdolności antyoksydacyjnej. [196] 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 frakcjami początkowymi i końcowymi mleka kobiecego.

Fracja początkowa zawierająca mniej tłuszczu, zawiera również mniej produktów peroksydacji lipidów. Jest to szczególnie widoczne w siarze. [73]

Dane dotyczące zawartości markerów stresu oksydacyjnego oraz składników bariery antyoksydacyjnej w mleku kobiecym są różne. Friel i wsp. [66] stwierdzili podobne poziomy MDA w mleku kobiecym w pierwszych trzech miesiącach laktacji zarówno u matek po porodach o czasie jak i przedwczesnych. Tuoli i wsp. nie obserwowali zależności między zdolnością antyoksydacyjną mleka a poziomami markerów peroksydacji lipidów. [73] 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. [73] Gutikova i wsp. badając mleko właściwe położnic, u których w ciąży rozpoznano zatrucie ciążowe, stwierdzili zwiększone stężenia markerów peroksydacji lipidów w mleku. [197]

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej rośnie w mleku wraz z czasem trwania laktacji do końca 3 miesiąca życia. [67] 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. [198] Ezaki i wsp. stwierdzili natomiast, iż całkowita zdolność antyoksydacyjna mleka kobiecego maleje wraz z upływem czasu laktacji i wynosi średnio 3,8 $\mu\text{mol/ml}$. Wiążą to ze zmniejszaniem stężeń nieenzymatycznych antyoksydantów w mleku w toku laktacji. [164] Ma

to najprawdopodobniej związek ze zmniejszającymi się stężeniami witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. [63] Podobną tendencję obserwowano w badaniach Alberti – Fidanza i wsp. oraz Quiles i wsp. [56,163] Wykazano również zależność aktywności TAS w mleku matek karmiących od ilości spożywanych przez nie antyoksydantów. Ilość witamin dostarczana w III trymestrze ciąży wpływała na zdolność antyoksydacyjną siary i mleka przejściowego, a witaminy spożywane po porodzie - na zdolność antyoksydacyjną mleka właściwego. [163]

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 wydaje się być w okresie porodu) i jednoczesnym zużywaniem składników bariery antyoksydacyjnej, w tym głównie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach wraz z czasem trwania laktacji, jednocześnie wydalanych do mleka. [199]

Obserwowany w niniejszej pracy wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w czasie trwania laktacji stoi w sprzeczności z prezentowanymi wyżej obserwacjami innych autorów. [56,163,164,199] Co prawda w grupie referencyjnej, (której dotyczyły powyższe badania) nie uzyskano statystycznie istotnych różnic między wartościami TAS w 3 i 30 dobie. Wzrost zdolności antyoksydacyjnej wraz z czasem trwania laktacji obserwowany w mleku kobiet palących może sugerować istnienie swoistej odpowiedzi kompensacyjnej w związku z narażeniem na stres oksydacyjny. Wzrost aktywności TAS w mleku właściwym kobiet palących papierosy może też być odpowiedzią na wzrost stężeń izoprostanów w mleku w czasie trwania

laktacji. Obserwując zachowania poszczególnych składników bariery antyoksydacyjnej w toku laktacji, kiedy to wzrastają szczególnie aktywności peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej [67,164], za stwierdzany w niniejszej pracy wzrost aktywności TAS w mleku palących odpowiedzialne głównie mogłyby być wspomniane enzymy. Ustalone w niniejszej pracy wartości aktywności TAS w mleku są porównywalne m.in. do wartości uzyskanych przez Ezaki i wsp. [164]

Korzystny wpływ naturalnego karmienia na dziecko może zostać znacznie umniejszony w wyniku palenia przez matkę papierosów. Kobiety palące mają niższe stężenia witaminy C i E w surowicy oraz niższą aktywność istotnych enzymów „zmiatających” wolne rodniki. [97,200-202] Wartości TAS badane w ślinie kobiet palących są znacząco niższe niż w ślinie kobiet niepalących. [203] W niektórych badaniach jednak u kobiet palących nie obserwowano spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych. [204,205]

Dziecko matki palącej w czasie ciąży, już wewnątrzłonowo narażone jest na znaczne **nasilenie stresu oksydacyjnego**. Równowaga antyoksydacyjno-prooksydacyjna zaburzona jest w tym przypadku w dwojaki sposób. Po pierwsze obserwuje się wzrost markerów natężenia reakcji utleniania zarówno w łożysku jak i we krwi pępowinowej. [136,138,206] Z drugiej strony we krwi pępowinowej obniżone jest stężenie enzymatycznych jak i nieenzymatycznych elementów bariery antyoksydacyjnej [136,138,202], wskutek czego **całkowita aktywność przeciwutleniająca** we krwi jest obniżona. W limfocytach noworodków urodzonych przez matki palące stwierdza się nasilone uszkodzenie oksydacyjne DNA. [141] Udowodniono jednocześnie większe nasilenie reakcji wolnorodnikowych i obniżenie TAS w surowicy niemowląt narażonych na bierne palenie w pierwszych

miesiącach życia. [75,207] **Stężenie izoprostanów** w moczu trzymiesięcznych niemowląt poddanych paleniu biernemu (palenie papierosów przez domowników) było **istotnie wyższe** niż u dzieci wychowywanych w rodzinach niepalących i korelowało ze stężeniami kotyniny w moczu. [208] Również tzw. wskaźnik stresu oksydacyjnego (OSI – Oxidative Stress Index – nowy marker wykorzystywany w ocenie równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej, będący stosunkiem całkowitego stężenia nadtlenków w surowicy do całkowitego potencjału antyoksydacyjnego surowicy), jest wyraźnie podwyższony we krwi pępowinowej dzieci biernie palących. [207] Jego wartość w surowicy krwi niemowląt poddanych paleniu biernemu koreluje z wartościami stwierdzanymi u ich matek. Udowodniono również znacznie niższe stężenia witaminy C w surowicy krwi biernie palących niemowląt, co pozostaje w zgodzie z innymi badaniami przeprowadzonymi w populacji osób czynnie i biernie palących tytoń. [95-97]

Bolisetty i wsp. badający surowicę palących matek i ich nowo narodzonych dzieci w 1 i 4 dobie po porodzie stwierdzili niższe stężenia witamin A i E w surowicy noworodków niż u ich matek. [209] Paradoksalnie jednak, autorzy stwierdzili również niższe stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w surowicy krwi matek palących i ich dzieci w porównaniu do grupy referencyjnej. Obserwowano także znaczący spadek stężeń MDA w 4 dobie po porodzie.

Ustosunkowując się do wyników niniejszej pracy, gdzie stwierdzono niższe stężenia izoprostanów w sianie w 3 dobie po porodzie u kobiet palących i porównując go z danymi Bolisetty i wsp., można przypuszczać, iż za to zjawisko może być odpowiedzialna stymulacja endogennego systemu antyoksydacyjnego zachodząca pod wpływem przewlekłego narażenia na stres oksydacyjny.

Wybór izoprostanów jako markera peroksydacji lipidów został podyktowany ich wyjątkowymi właściwościami, takimi jak stabilność chemiczna, brak zależności od spożywanej diety, wysokie stężenia wykrywane w tkankach i płynach biologicznych, powstawanie *in vivo* jako specyficzny produkt peroksydacji lipidów oraz narastanie stężeń u zwierząt doświadczalnych pod wpływem stresu oksydacyjnego. Jednocześnie są one wykorzystywane coraz częściej przez naukowców w badaniach nad stresem oksydacyjnym. [26,27,38] Qin i wsp. [43] udowodnili, iż stężenie izoprostanów we krwi tętniczej pępowinowej jest dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego u płodów. W badaniach Longini i wsp. [44] dotyczących stężeń izoprostanów w płynie owodniowym w 14 - 18 tygodniu ciąży wykazano natomiast, iż ich wzrost może być wskaźnikiem prognostycznym zahamowania wzrostu płodu. Są one również podwyższone w płynie owodniowym kobiet z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych. Wykazano także bezpośredni wpływ izoprostanów na patomechanizm retinopatii wcześniaczej, co w połączeniu z danymi wykazującymi odwrotną korelację między ich stężeniami w surowicy krwi dzieci a wiekiem ciążowym może być szczególnie istotne. Franco i wsp. udowodnili istnienie podobnej zależności w odniesieniu do masy urodzeniowej. [210] Wykazano również wzrost stężeń izoprostanów w surowicy krwi noworodków o ekstremalnie niskiej urodzeniowej masie ciała wraz ze wzrostem ryzyka rozwoju dysplazji oskrzelowo – płucnej lub leukomalacji okołokomorowej. [211] Takiej zależności nie znaleziono natomiast w odniesieniu do stężeń izoprostanów w moczu. [212]

W licznych pracach wykorzystujących izoprostany jako marker peroksydacji lipidów otrzymywano różne ich stężenia w zależności od wieku, płci, chorób czy stanów patologicznych. W badaniach Morrow

i wsp., Tomey i wsp. oraz Reilly i wsp. udowodniono znaczący wzrost stężeń izoprostanów zarówno w surowicy jak i moczu osób palących papierosy. [39,213-215] Zależności takiej nie stwierdzili Block i wsp., tłumacząc ten fakt mniejszą ilością wypalanych papierosów w grupie przez nich badanych. [216] Badacze ci jednocześnie potwierdzili silną zależność między liczbą wypalanych papierosów a stężeniami MDA w surowicy. [216] Reilly i wsp. wyznaczyli zależność między ilością wypalanych papierosów a stężeniem izoprostanów w moczu. [215] Podobną zależność stwierdzili Sinzinger i wsp. w surowicy i w moczu dzieci poddanych biernemu paleniu. [217] Dietrich i wsp. udowodnili znaczącą zależność między BMI (Body Mass Index) a stężeniem izoprostanów w surowicy krwi osób palących. Jedynie u osób z wysokim BMI udowodniono wpływ suplementacji witaminą C na obniżenie stężeń izoprostanów w surowicy. [106] Helmersson i wsp. stwierdzili natomiast, iż palenie papierosów jest niezależnym czynnikiem powodującym wzrost stężeń izoprostanów w płynach biologicznych bez względu na BMI. [45] Stojiljkovic i wsp. udowodnili zależność między stężeniami wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych a izoprostanów w surowicy. [218] Richelle i wsp. udowodnili brak zależności stężeń izoprostanów w moczu od spożywanej diety. [219] Barden i wsp. natomiast udowodnili wpływ diety matki ciężarnej (suplementacja oleju rybiego) na obniżenie stężeń izoprostanów we krwi pępowinowej. [220] Zależność ta nie do końca mogła być wytłumaczona zmniejszeniem stężeń kwasu arachidonowego. W badaniu Friel i wsp. stwierdzono znaczący wzrost stężeń izoprostanów w łożysku i we krwi pępowinowej, czego nie obserwowano w surowicy matek w okresie okołoporodowym. [186] Stężenia izoprostanów zarówno w surowicy jak i w moczu wzrastają znacząco pod koniec ciąży. [221] Nie stwierdzono natomiast dobowej zmienności stężeń izoprostanów

w moczu. [222] W licznych pracach udowodniono istnienie zależności między wzrostem stężeń izoprostanów a wzrostem stężeń innych markerów stresu oksydacyjnego bądź obniżeniem stężeń antyoksydantów. [221,223]

Izoprostany były również często wykorzystywane w badaniach nad rolą stresu oksydacyjnego w stanach przedrzucawkowych i w nadciśnieniu ciążowym. Wielu autorów udowodniło wzrost stężeń izoprostanów w surowicy i w ślinie badanych oraz **spadek stężeń izoprostanów w moczu kobiet w stanie przedrzucawkowym**, który tłumaczono zmniejszonym klirensiem izoprostanów oraz ich bezpośrednim i pośrednim działaniem wazokonstrykcyjnym. [224,225]

Uzyskane w tej pracy wyniki wykazały duże zróżnicowanie indywidualne stężeń izoprostanów w mleku kobiecym (wartości od 0 do 807 pg/ml), średnie wartości wyższe niż opisywane w surowicy zdrowych dorosłych (średnie wartości u dorosłych to 35 – 100 pg/ml). [39] Podobnie duże zróżnicowanie indywidualne stężeń izoprostanów w płynach biologicznych stwierdzili w swych pracach inni badacze. [208,211] Stężenia izoprostanów stwierdzone w mleku są jednak zdecydowanie niższe niż uzyskiwane w moczu (wartości średnie w zależności od autora: 250 – 1600 pg/mg kreatyniny). [36] W grupie pacjentek badanych w niniejszej pracy zauważono nawet wyższe stężenia izoprostanów w moczu.

Mimo iż nie wykazano statystycznie istotnych różnic między poziomami izoprostanów w mleku kobiet palących i niepalących zarówno w sianie jak i w mleku właściwym (30 doba po porodzie), to zauważono statystycznie istotny wzrost stężeń izoprostanów w toku laktacji w mleku kobiet palących papierosy. Analizując wyniki badań Friel i wsp., gdzie stężenie izoprostanów w surowicy krwi noworodków i niemowląt obniża się wraz z ich wiekiem, oraz badań wykazujących

zmniejszanie się stężeń kwasu arachidonowego w mleku kobiecym w toku laktacji, [226-228] stwierdzany w niniejszej pracy **wzrost stężeń izoprostanów** w mleku w toku laktacji dowodzi, iż palenie wpływa niekorzystnie na natężenie reakcji wolnorodnikowych w pokarmie naturalnym.

Wzrost stężeń izoprostanów można również tłumaczyć wzrostem ilości wypalanych papierosów po powrocie kobiet z oddziałów położniczych do domu. W pracach Chehne i wsp., Pilz i wsp. oraz Flores i wsp. [41,42,228] udowodniono, iż odstawienie palenia skutkuje szybkim obniżaniem się stężeń izopostanów w surowicy krwi oraz w moczu palących, natomiast powrót do palenia ponownie podwyższa te poziomy osiągając maksimum już po tygodniu. Siara zbierana była jeszcze na oddziałach położniczych, gdzie, jak wiemy, palenie papierosów jest zabronione i tym samym trudno wykonalne, zwłaszcza w takim natężeniu jak w warunkach domowych. Po powrocie do swojego środowiska, kobieta zaczyna palić często równie intensywnie jak przed ciążą.

Wykazana zaskakująca tendencja do **niższych stężeń izoprostanów w sianie** może wynikać z mniejszej ilości tłuszczów (w tym kwasu arachidonowego) w pokarmie kobiet palących bądź być odzwierciedleniem szybszego zużywania składników bariery antyoksydacyjnej w sianie kobiet palących. [124,229]

Palenie papierosów powoduje obniżenie stężeń lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL – high density lipoproteins), zwiększenie stężeń triglicerydów w surowicy krwi, osłabienie lipolizy lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL – very low density lipoproteins). Nikotyna dodatkowo upośledza aktywność lipazy lipoproteinowej w różnych tkankach. [229]

W dostępnej literaturze obecna jest praca Mannello i wsp., [159] w której badano stężenia izoprostanów w mleku 10 kobiet w pierwszym miesiącu laktacji. Uzyskane stężenia izoprostanów w mleku były porównywalne do stwierdzanych w niniejszej pracy. Były one wyższe niż stężenia w surowicy krwi, a jednocześnie znacząco niższe od stężeń izoprostanów w płynie aspiracyjnym pobranym z okolic brodawki. Autorzy nie stwierdzili korelacji między stężeniami izoprostanów w różnych płynach biologicznych, tłumacząc ten fakt powstawaniem izoprostanów głównie z lipidów znajdujących się w konkretnych kompartmentach. Może być to pośrednim dowodem istnienia pewnej bariery nieprzepuszczającej izoprostanów do mleka.

Brak statystycznych różnic między stężeniami izoprostanów w mleku kobiet palących i niepalących sugeruje, iż izoprostany nie mogą być uznane markerem wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów pod wpływem palenia papierosów w pokarmie naturalnym (w przeciwieństwie do stężenia izoprostanów w moczu, gdzie stanowią one czuły marker palenia papierosów).

Wykazane w niniejszym badaniu wysokie stężenia **izoprostanów w moczu** korelują z danymi literaturowymi badań przeprowadzonych wśród kobiet w ciąży i po porodzie oraz noworodków i niemowląt. [189,220,230] Stwierdzone w tych grupach badanych stężenia izoprostanów często wielokrotnie przewyższają stężenia u osób zdrowych bądź palących papierosy, nie będących w ciąży. W badaniu Goil i wsp. w moczu noworodków uzyskano wyniki rzędu 4-12 ng izoprostanów/mg kreatyniny, zaś w badaniu Barden i wsp. średnio rzędu 60-70 ng/mg kreatyniny. [220,230] Autorzy sugerują, iż tak wysokie parametry stresu oksydacyjnego związane są z małą wydajnością niedojrzałych jeszcze systemów antyoksydacyjnych u noworodków, szczególnie w momencie silnego stresu, jakim jest sam poród. Innymi

czynnikami odpowiedzialnymi za to zjawisko są: uwalnianie się dużych ilości prooksydacyjnie działającego żelaza z hemolizowanych erytrocytów oraz działania mające na celu szybkie usuwanie produktów wolnorodnikowych uszkodzeń. [220]

Oznaczanie izoprostanów w moczu wydaje się bardziej dokładną metodą pomiaru przewlekłego narażenia na stres oksydacyjny niż oznaczanie ich stężeń w surowicy. [35]

W niniejszej pracy wykazano nasilenie stresu oksydacyjnego u kobiet palących poprzez udowodnienie statystycznie istotnych różnic między stężeniami izoprostanów w moczu u kobiet z wysokimi poziomami kotyniny w moczu i grupy kobiet, u których wydalenie kotyniny w moczu było niskie. Tak więc stężenia określanych w moczu izoprostanów były powiązane ze stężeniami wydalanej kotyniny. Podobne obserwacje są szeroko opisywane w piśmiennictwie. [215,231-233]

Istotna wydaje się korekcja uzyskanych wyników stężeń izoprostanów w moczu względem kreatyniny. Obserwowane skorygowane stężenia izoprostanów w moczu kobiet intensywnie palących (dane oparte o liczbę wypalanych papierosów oraz stężenia kotyniny w moczu) były statystycznie istotnie wyższe niż w grupach kobiet niepalących i palących mniej intensywnie.

Celowa byłaby interpretacja stwierdzanych stężeń izoprostanów w mleku kobiecym względem jego gęstości bądź zawartości tłuszczu. Idealnym i łatwym do wykorzystania parametrem mógłby być tzw. *creamotocrit* (brak polskiego określenia), czyli procent zawartości tłuszczu w mleku ludzkim po jego odwirowaniu. [234] Innym parametrem, względem którego możnaby skorygować uzyskane stężenia izoprostanów w mleku, mogłoby być stężenie kwasu arachidonowego.

Niezbędne są dalsze badania dotyczące ewentualnej konieczności korekcji uzyskanych stężeń izoprostanów w mleku.

Doniesienia na temat wpływu palenia przez matkę w czasie laktacji na natężenie reakcji wolnorodnikowych oraz aktywność bariery antyoksydacyjnej w mleku są nieliczne. Obserwacje o obniżeniu aktywności antyoksydacyjnej w mleku wskutek palenia papierosów, potwierdzają doniesienia innych autorów, w których stwierdzano niższe stężenia takich antyoksydantów jak witamina A, E i C w mleku właściwym matek palących. [143,144] W badaniu Ermis i wsp. [145] badającym produkty peroksydacji lipidów oraz zdolność antyoksydacyjną w mleku matek palących w 7 dniu po porodzie stwierdzono znaczący wzrost stężeń dialdehydu malonowego (MDA), obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Nie stwierdzono natomiast wpływu palenia papierosów na aktywność TAS. Miranda i wsp. nie obserwowali zależności między paleniem papierosów przez matki a stężeniami MDA w ich mleku. [235]

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały obniżenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w mleku kobiet palących (obserwowane u wszystkich pacjentek w siarze a w podgrupie kobiet intensywnie palących także w mleku właściwym). Potwierdzają one poglądy o negatywnym wpływie palenia papierosów na właściwości antyoksydacyjne pokarmu naturalnego. Dowodzą tego również obserwacje o znaczącym wzroście stężeń izoprostanów u matek palących wraz z czasem trwania laktacji.

Niestety nadal niewiele wiadomo o odległych skutkach palenia przez matki karmiące na równowagę oksydacyjno – antyoksydacyjną ich dzieci. U noworodków karmionych naturalnie przez matki palące, stwierdzono nasilenie stresu oksydacyjnego, jednak obserwacje te dotyczyły jedynie pierwszych 24 godzin życia dziecka. [194] Brak

istotności statystycznych między stężeniami izoprostanów w moczu badanych w tej pracy dzieci może z jednej strony wynikać z małej liczby próbek, z drugiej być odzwierciedleniem dużej różnorodności indywidualnej. Narastanie stężeń izoprostanów w moczu trzymiesięcznych niemowląt poddanych paleniu biernemu zaobserwowali jednak Noakes i wsp. Stężenia te korelowały ze stężeniami kotyniny w moczu tych dzieci. [208] Z pewnością konieczne są dalsze badania dotyczące nasilenia stresu oksydacyjnego u dzieci karmionych piersią przez matki palące oraz badania wyjaśniające wpływ niedostatecznej ilości dostarczanych antyoksydantów z pokarmem naturalnym przez matki palące na dalszy rozwój i zdrowie ich dziecka. Wydaje się to być szczególnie interesujące w świetle wyników najnowszych badań, stwierdzających, że wysokie stężenie w pokarmie naturalnym witaminy C wpływa ochronnie na występowanie atopii nawet u dzieci z grupy wysokiego jej ryzyka. [236] Istotne wydaje się podjęcie działań profilaktycznych w grupie kobiet palących papierosy w ciąży. Wiele kobiet mimo rzucenia palenia papierosów w początkach ciąży, wraca do nałogu w jej drugiej połowie a także w czasie karmienia. [79,237] Głównymi czynnikami powodującymi powrót do palenia po porodzie są: palenie przed ciążą, palenie papierosów przez partnera i otoczenie, stresorodność wykonywanej pracy. [238]

W związku z uzyskanymi wynikami rodzi się również pytanie: czy matki palące papierosy powinny karmić piersią swoje dzieci. Niewątpliwie sytuację tą należy rozpatrywać indywidualnie. Najlepszym rozwiązaniem byłoby oczywiście rzucenie palenia i karmienie piersią. Drugą ewentualnością są terapie nikotynozastępcze. Ilość nikotyny bądź kotyniny w moczu dzieci karmionych przez matki stosujące te terapie są jednak porównywalne z ilościami stwierdzanymi u dzieci matek

palących. [118,238] Podobne również stężenia nikotyny obserwujemy w mleku kobiet w obu grupach. [238]

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach udowodniono, iż nikotyna dostarczana drogą pokarmu matki powodowała istotne uszkodzenia narządów wewnętrznych oraz istotnie zmniejszała aktywność enzymów o działaniu antyoksydacyjnym a także zwiększała stężenia MDA w surowicy krwi. [239] Jednak dzieci karmione przez matki stosujące terapie nikotynozastępcze nie są narażone na tysiące innych składników zawartych w dymie papierosowym, a nikotyna jest znacznie bardziej neutralizowana przez układ wątrobowo – wrotny niż w płucach.

Mimo znajomości szkodliwości palenia znaczna część kobiet nie zaprzestanie palić w czasie karmienia. W wielu kampaniach społecznych czy zdrowotnych zaleca się zaprzestania palenia papierosów w okresie ciąży i laktacji i jednocześnie zwraca uwagę, iż mleko matek palących jest „niepełnowartościowe”. Część palących matek, odczuwając niemożność porzucenia nałogu, korzysta z tych akcji tylko w taki sposób, iż zaprzestaje karmienia naturalnego, pozbawiając tym samym dziecka szeregu mechanizmów obronnych zawartych w pokarmie naturalnym. [240] W związku ze znajomością powyższych faktów, kierując się zasadą „mniejszego zła”, Komitet ds. Leków Amerykańskiej Akademii Pediatrii w latach 2000 – 2001 stanowczo podkreślił, że palenie papierosów przez matkę nie jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do naturalnego karmienia. [241] Problemem tym bardzo skrupulatnie zajął się Jose Dorea, który w swym artykule wymienia wiele udowodnionych korzyści karmienia naturalnego, również przez matki palące papierosy. [242] Bierne palenie oraz sztuczne karmienie są głównymi czynnikami ryzyka infekcji

dolnych dróg oddechowych (w tym głównie najgroźniejszego zapalenia oskrzelików) w pierwszych trzech latach życia oraz choroby wieńcowej w wieku dorosłym. [243,244] Ochronny wpływ naturalnego karmienia jest najbardziej spektakularny u dzieci poddanych biernemu paleniu. [245] Karmienie piersią łagodzi również skutki niekorzystnego wpływu palenia papierosów przez matkę w czasie ciąży na rozwój neurologiczny płodu. [246] Amerykańska Akademia Pediatrii uznaje, iż karmienie piersią dzieci przez matki palące papierosy jest zdecydowanie bezpieczniejsze niż karmienie sztuczne dzieci tych matek. [241]

Problem palenia papierosów i naturalnego karmienia jest niewątpliwie zdecydowanie bardziej złożony. Kobiety palące papierosy mają mniejszą objętość produkowanego mleka, są również mniej chętne, aby podtrzymywać laktację i znacznie częściej i szybciej przechodzą na karmienie sztuczne swych dzieci. [107,117]

Wyniki badań tej pracy potwierdziły niekorzystny wpływ palenia papierosów na właściwości antyoksydacyjne mleka kobiecego, szczególnie w grupie kobiet intensywnie palących. Zależności te są bardziej zaznaczone w siarze, w której zawartość antyoksydantów i aktywność enzymów o działaniu antyoksydacyjnym jest w znacznej mierze zależna od zasobów antyoksydantów magazynowanych w czasie ciąży oraz nasilenia stresu oksydacyjnego stwierdzanego w tym okresie. Jak zaobserwowano, całkowita zdolność antyoksydacyjna pokarmu naturalnego poprawia się w czasie trwania laktacji (mechanizmy kompensacyjne) w mleku kobiet palących papierosy. Wynik ten jest szczególnie interesujący w zestawieniu z wzrastającymi w tym samym czasie stężeniami izoprostanów. Podobną kompensacyjną odpowiedź aktywności antyoksydacyjnej **we krwi ciężarnych** palących papierosy odkryli Laskowska – Klita i wsp. [136]

Kolejnym istotnym wnioskiem wynikającym z tej pracy jest stwierdzenie faktu, iż stres oksydacyjny obserwowany u kobiety karmiącej (wyrażony jako stężenie izoprostanów w jej moczu) koreluje z zaburzeniami właściwości antyoksydacyjnych jej pokarmu. Status oksydacyjny matki odgrywa istotną rolę w procesach przekazywania ochrony antyoksydacyjnej dziecku za pomocą pokarmu naturalnego.

Istotne jest zagadnienie czy celowa jest suplementacja antyoksydantów nieenzymatycznych u kobiet palących papierosy w okresie laktacji bądź u karmionych przez nie dzieci. Dane literaturowe są w tym wypadku dość niespójne. Suplementacja 600 mg witaminy E u dorosłych z cukrzycą typu 2 skutkowała 37% redukcją stężeń izoprostanów w moczu. [247] W badaniu przeprowadzonym przez Kauffman i wsp. nie stwierdzono różnic w równowadze antyoksydacyjno – prooksydacyjnej u dzieci pod wpływem stosowania standardowych preparatów wielowitaminowych. [189] Jednocześnie obserwowano odwrotną zależność między stężeniami witamin A i C a stężeniami markerów stresu oksydacyjnego w surowicy. [128,216] Ilość witamin zawartych w sianie jest zależna jedynie od stanu odżywienia kobiety w ciąży. Dimenstein i wsp. badając zawartość retinolu w sianie nie stwierdzili zależności między innymi badanymi parametrami takimi jak stan społeczny, wykształcenie, masa urodzeniowa itd. [248] W badaniu Cederberg i wsp. przeprowadzonym na zwierzętach w ciąży, obserwowano zmniejszenie natężenia stresu oksydacyjnego po wprowadzeniu suplementacji witaminami C i E tym znaczniejsze im większe dawki witamin stosowano. [249] Z drugiej strony znane są badania wskazujące na niekorzystne działanie nadmiernej podaży szczególnie witamin A i E na rozwój płodu. [250]

Kolejnym wartym podkreślenia wnioskiem wynikającym z tej pracy jest stwierdzenie znaczących indywidualnych różnic stężeń markerów równowagi antyoksydacyjno – prooksydacyjnej zarówno w pokarmie naturalnym jak i w moczu badanych kobiet i ich dzieci. Mimo próby stworzenia względnie jednorodnych grup pacjentek, po wyeliminowaniu znacznej ilości parametrów, które mogłyby wpływać na te zależności, nie sposób wykluczyć pewnych cech indywidualnych (dieta, uwarunkowania genetyczne), które mogą różnić się znacząco. Liczba mechanizmów i powiązań funkcjonujących w tym skomplikowanym systemie wydaje się być przeogromna.

W niniejszej pracy nie udowodniono zależności między stężeniami izoprostanów w moczu niemowląt a stężeniem izoprostanów w mleku ich matek w 30 dobie po porodzie. Fakt ten wytłumaczony mógłby być tym, iż stężenie markerów stresu oksydacyjnego w moczu zaledwie w nikłym procencie (2%) pochodzi z pożywienia. Udowodnili to Shigenaga i wsp. w badaniach na zwierzętach. [251] Stwierdzenie to w zestawieniu z danymi uzyskanymi w pracy Shoji i wsp. potwierdza, iż istotną rolę w zmniejszaniu stężeń markerów stresu oksydacyjnego u dzieci odgrywają antyoksydacyjne właściwości pokarmu. [195] W niniejszej pracy takiej zależności jakkolwiek nie udało się udowodnić.

Stwierdzony w tych badaniach niekorzystny wpływ palenia papierosów w czasie laktacji na własności antyoksydacyjne pokarmu oraz narastanie stężeń markerów stresu oksydacyjnego wraz z czasem trwania laktacji, może stać się przyczynkiem do popularyzacji wiedzy o szkodliwości palenia nie tylko w czasie ciąży, ale również w okresie laktacji. Konieczne wydaje się więc szersze rozpropagowanie wiedzy wśród przyszłych matek na temat wszystkich aspektów szkodliwości palenia w czasie ciąży i laktacji. Z badania przeprowadzonego w Polsce

wynika, że jedynie 20% kobiet palących w czasie ciąży zostaje przez lekarza poinformowanych o szkodliwości palenia i jedynie 16,5% kobiet palących deklaruje świadomość zdrowotnych skutków palenia. [92] W badaniu przeprowadzonym w Wielkiej Brytanii stwierdzono, że jedynie 30% spośród kobiet palących w ciąży uważa, iż palenie przez nie papierosów jest bardzo niebezpieczne dla zdrowia ich dzieci. [79] Konieczne są dalsze badania wpływu zaburzeń równowagi prooksydacyjno – antyoksydacyjnej w mleku kobiecym pod wpływem palenia papierosów przez matki na karmione nim dzieci. Istotna mogłaby się okazać również analiza stężeń poszczególnych antyoksydantów w mleku w czasie i wpływ jaki wywiera na nie palenie papierosów.

STRESZCZENIE

Wprowadzenie: Palenie papierosów jest wciąż szeroko rozpowszechnione wśród matek karmiących. Dym papierosowy jest źródłem znacznej ilości reaktywnych form tlenu, które odpowiedzialne są za reakcje utleniania białek, lipidów i kwasów nukleinowych w organizmach żywych. Odgrywają one rolę w patogenezie przewlekłych chorób zapalnych, nowotworowych oraz ciężkich chorób okresu noworodkowego: retinopatii wcześniaczej, martwiczym zapaleniu jelit i dysplazji oskrzelowo-płucnej. Antyoksydacyjne właściwości pokarmu naturalnego to jedna z wielu korzyści karmienia naturalnego, mogą one zostać obniżone przez palenie papierosów przez matkę karmiącą. Nie wiadomo jeszcze, jakie długofalowe skutki dla zdrowia dziecka karmionego piersią przez matkę palącą ma nasilenie stresu oksydacyjnego od pierwszych dni życia.

Cele pracy: 1) Ocena zaburzeń równowagi antyoksydacyjno – prooksydacyjnej w mleku kobiecym pod wpływem palenia papierosów przez kobiety w okresie ciąży i laktacji. 2) Ocena wpływu palenia papierosów na aktywność antyoksydacyjną mleka kobiecego poprzez badanie Całkowitego Statusu Antyoksydacyjnego (TAS) w mleku. 3) Ocena wpływu natężenia palenia (określonego przez ilość wypalanych papierosów i stężenie kotyniny w moczu) na nasilenie zaburzeń równowagi antyoksydacyjnej w pokarmie kobiecym. 4) Ocena stopnia uszkodzenia wolnorodnikowego lipidów w pokarmie naturalnym matek palących papierosy poprzez badanie stężenia izoprostanów w mleku. 5) Ocena wpływu palenia papierosów na wykładniki natężenia stresu oksydacyjnego u matek karmiących oraz ich dzieci poprzez badanie wydalania izoprostanów w ich moczu.

Materiał i metoda: Prospektywne badanie kohortowe zostało przeprowadzone na oddziałach położniczych dwóch szpitali w Gdańsku (Klinika Położnictwa AMG oraz Oddział Ginekologii i Położnictwa Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku). Grupa badana składała się z 32 matek palących wraz z ich dziećmi, grupa referencyjna z 29 matek niepalących wraz ze swoimi dziećmi. Do badań włączono matki, które: 1) urodziły naturalnie donoszone zdrowe noworodki bez powikłań, 2) planowały karmić piersią swoje dzieci, 3) paliły (przynajmniej 5 papierosów dziennie) – określono to przy pomocy pytań bezpośrednich, 4) nie planowały zaprzestać palenia podczas laktacji, 5) podpisały świadomą zgodę; oraz jednocześnie: 1) nie były poddane paleniu biernemu, 2) nie chorowały na choroby ostre i przewlekłe, 3) przebieg ich ciąży był prawidłowy, 4) nie były leczone farmakologicznie. Do grupy referencyjnej włączono matki spełniające wszystkie w/w kryteria poza paleniem. Prawdopodobność matek potwierdzono oznaczeniem wydalania kotyniny w moczu. Od kobiet z obu grup pobierano próbki siary w 3 dobie po porodzie oraz mleka właściwego w 30 dniu laktacji. Podczas wizyty kontrolnej w 30 dniu laktacji zbierano próbki mleka oraz moczu matek i ich dzieci. W celu oceny wykładników natężenia stresu oksydacyjnego u matek, ich dzieci oraz w pokarmie kobiecym w próbkach oznaczano pochodne prostaglandyn – izoprostany przy użyciu 8-Isoprostanes EIA Kit firmy CaymanChemical metodą immunoenzymatyczną. Własności antyoksydacyjne mleka kobiecego oceniono na podstawie oznaczeń Całkowitego Statusu Antyoksydacyjnego (TAS) przy pomocy zestawu firmy Randox (Randox Total Antioxidant Status Kit) metodą spektrofotometryczną. Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica 8.0 oraz środowiska obliczeń statystycznych R 2.6.1.

Wyniki: 1) Całkowita zdolność antyoksydacyjna w sianie matek niepalących ($5,1 \pm 2,6$ umol/l) była statystycznie wyższa niż w sianie matek palących papierosy ($4,07 \pm 4,2$ umol/l). Intensywne palenie obniżało aktywność TAS w mleku (u kobiet palących co najmniej 10 papierosów na dobę średnia TAS w sianie wynosiła $3,7 \pm 5$ umol/l, w mleku właściwym - $4,3 \pm 2,7$ umol/l, u kobiet niepalących średnia TAS w sianie wynosiła $5,1 \pm 2,6$ umol/l, a w mleku właściwym wynosiła $5,8 \pm 3,5$ umol/l). 2) Aktywność TAS ($4,07 \pm 4,2$ umol/l) i stężenie izoprostanów (174 ± 108 pg/ml) w sianie matek palących były statystycznie niższe niż w mleku właściwym (odpowiednio $5,12 \pm 2,97$ umol/l – aktywność TAS oraz 261 ± 159 pg/ml – stężenie izoprostanów). 3) Wyższe stężenia izoprostanów stwierdzono w moczu matek palących ($6,6 \pm 5,1$ ng/ml) niż niepalących ($4,3 \pm 2,5$ ng/ml). 4) TAS w mleku matek palących była tym niższa im wyższe stężenie izoprostanów w ich moczu. 5) Zakres stężeń izoprostanów w mleku i moczu ludzkim jest szeroki.

Wnioski: 1) Palenie papierosów przez kobiety w okresie ciąży i laktacji zaburza równowagę antyoksydacyjno – prooksydacyjną w mleku kobiecym. 2) U kobiet palących papierosy w okresie ciąży i laktacji stwierdzono znaczące obniżenie Całkowitej Zdolności Antyoksydacyjnej (TAS) w sianie. 3) Całkowita Zdolność Antyoksydacyjna w sianie i w mleku właściwym kobiet palących jest zależna od liczby wypalanych przez nie papierosów. 4) U kobiet palących wolnorodnikowe uszkodzenia elementów mleka pogłębiają się w toku laktacji. 5) Stres oksydacyjny w organizmie kobiety karmiącej wyrażony ilością wydalanych izoprostanów w jej moczu koreluje z zaburzeniami antyoksydacyjnymi w jej pokarmie. 6) Konieczne jest dalsze poszerzanie wiedzy o szkodliwości palenia pośród matek i kobiet w ciąży.

ABSTRACT

Background: Smoking is still very common among lactating women. Cigarette smoke is a source of reactive oxygen species responsible for oxidation of proteins, lipids and nucleic acids. They play a significant role in diseases such as chronic inflammation, neoplasms and critical diseases of neonates: retinopathy of prematurity, necrotizing enterocolitis and broncho-pulmonary dysplasia. Antioxidative properties are one of many advantages of human milk, which can be decreased by maternal smoking during lactation. The long term influence of increased oxidative stress from the first day of life in children fed by smoking mothers is still not recognized.

Aims: 1) To estimate disorders in antioxidative – prooxidative balance in human milk due to smoking cigarettes; 2) To investigate how maternal smoking influences antioxidative properties of milk by means of Total Antioxidative Status; 3) To investigate how intensification of smoking (presented as number of cigarettes smoked and concentration of cotinine in urine) influences antioxidative properties of milk; 4) To estimate lipids free radicals' damage in human milk in mothers who smoke by means of isoprostanes concentration; 5) To investigate relationship between maternal smoking and intensity of oxidative stress in women and their children by means of isoprostanes concentration in urine.

Methods: A prospective cohort study was conducted in two hospitals in Gdansk (Dept. of Obstetrics, MUG and Maternity Unit in City Hospital of Gdansk). The group includes 32 smoking mothers with their infants. The reference group consists of 29 non-smoking mothers with their infants. Inclusion criteria: Mothers who: 1) delivered naturally full-term healthy infants, 2) breast-fed, 3) smoke (at least 5 cigarettes a day) – smoking determined by direct question, 4) did not plan to stop smoking during lactation, 5) signed informed consent. Exclusion criteria:

1) Passive smoking, 2) Chronic and acute diseases, 3) Pregnancy related illnesses, 4) Pharmacological treatment. Reference group included women who met all inclusion and exclusion criteria, except from smoking. The reliability of their declarations was confirmed by cotinine in urine evaluation. The milk was collected from women of both groups in 3rd day post partum (colostrum) and in the 30th day of lactation. During the follow-up visit the samples of urine both of mothers and children were collected. To evaluate relationship between maternal smoking and intensity of oxidative stress in women, their children and human milk, prostaglandin-like compounds – isoprostanes were investigated by means of 8-Isoprostanes EIA Kit from CaymanChemical immunoenzymatically. By means of the Randox Total Antioxidant Status Kit antioxidative potential of human milk was estimated spectrophotometrically. The statistical analysis was performed by means of STATISTICA 8.0 program and R 2.6.1 statistical environment.

Results: 1) Total Antioxidant Status in colostrum of non-smoking mothers ($5,1 \pm 2,6$ $\mu\text{mol/l}$) was statistically higher than in colostrum of smoking mothers ($4,07 \pm 4,2$ $\mu\text{mol/l}$). Intensive smoking decreases TAS in milk (in women smoking at least 10 cigarettes a day median TAS in colostrum was $3,7 \pm 5$ $\mu\text{mol/l}$, - in mature milk - $4,3 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/l}$; median TAS in nonsmokers was $5,1 \pm 2,6$ $\mu\text{mol/l}$ in colostrum and $5,8 \pm 3,5$ $\mu\text{mol/l}$ in mature milk). 2) TAS ($4,07 \pm 4,2$ $\mu\text{mol/l}$) and isoprostanes concentration (174 ± 108 pg/ml) in colostrum of smoking mothers were statistically lower than in the mature milk (respectively – TAS - $5,12 \pm 2,97$ $\mu\text{mol/l}$ and isoprostanes concentration - 261 ± 159 pg/ml). 3) The higher concentration of isoprostanes were detected in urine of smoking ($6,6 \pm 5,1$ ng/ml) than non-smoking mothers ($4,3 \pm 2,5$ ng/ml). 4) TAS in milk was

inversely correlated with oxidative stress in smoking mothers. 5) The range of isoprostanes' concentrations in human milk and urine is very broad.

Conclusions: 1) Smoking cigarettes disturbs antioxidative – prooxidative balance in human milk. 2) Maternal smoking during pregnancy and lactation effects in reduction of antioxidative status in colostrum. 3) Total Antioxidative Status in colostrum and mature milk is related to number of cigarettes smoked. 4) Free radicals mediated damage to elements of milk augmented in smoking women in course of lactation. 5) Oxidative stress in women is correlated with antioxidative disorders in their milk. 6) Knowledge about harmfulness of cigarette smoke need to be extended among mothers and pregnant women.

PIŚMIENNICTWO

1. Fifty-Eighth World Health Assembly Resolution
2. Gartner L.M., Morton J., Lawrence R.A., Naylor A.J., Hare D.O., Schandler R.J., Eidelman A.I. American Academy of Pediatrics. Section on breastfeeding. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*. 2005; 115: 496-506. Opracowanie polskie: *Medycyna Praktyczna – pediatria*. 6/2005: 31-39. *Medycyna Praktyczna – Położnictwo i Ginekologia*. 1/2006:21-28.
3. Podręcznik Karmienie Piersią. Praca zbiorowa pod redakcją Magdaleny Nehring-Gugulskiej i Moniki Żukowskiej-Rubik. Komitet Upowszechniania Karmienia Piersią. Warszawa 2006.
4. Allen J., Hector D. Benefits of breastfeeding. *N S W Public Health Bull*. 2005; 16(3-4): 42-6.
5. Rumball S., Darragh A. Biology of Human Milk. W *Human Milk, Lactation and Infant Feeding Study Guide* Department of Chemistry and Biochemistry, Massey University 1995.
6. Emsley J. The magic ingredient in a mother's milk. W *The Independent*, Kings College, London 1998.
7. Goldman A.S. The immune system of human milk: Antimicrobial, antiinflammatory, and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J*. 1993; 12: 664-672.
8. Raisler J., Alexander C., O'Campo P. Breast-feeding and infant illness: A dose-response relationship. *Am J Publ H*. 1999; 89: 25-30.
9. Bauchner H., Leventhal J.M., Shapiro E.D. Studies of breastfeeding and infections. How good is the evidence? *J Am Med Assoc*. 1986; 256: 887-92.
10. Leon-Cava N., Lutter C., Ross J., Martin L. Quantifying the benefits of breastfeeding: a summary of the evidence. The Linkages Project. Washington DC: Pan American Health Organisation, 2002.
11. McVea K.L., Turner P.D., Peppler D.K. The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *J Hum Lact*. 2000; 16: 13-20
12. Martin R.M., Ebrahim S., Griffin M., Davey Smith G., Nicolaides A.N., Georgiou N., Watson S., Frankel S., Holly J.M., Gunnell D. Breastfeeding and atherosclerosis. Intima-media thickness and plaques at 65-year follow-up of the Boyd Orr Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005

13. Kwan M.L., Buffler P.A., Abrams B., Kiley V.A. Breastfeeding and the risk of childhood leukemia: a meta-analysis. *Public Health Rep.* 2004; 119: 521–535.
14. Challacombe D.N., Mecrow I.K., Elliot K., Clarke F.J., Wheeler E.E. Changing infant feeding practices and declining coeliac disease in West Somerset. *Archives of Diseases in Childhood.* 1997; 77: 206-9.
15. Lucas A., Cole T.J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990; 336: 1519-1523.
16. Oddy W.H. Breastfeeding protects against illness and infection in infants and children: a review of the evidence. *Breastfeed Rev.* 2001; 9: 11-18.
17. Kramer M.S. Does breastfeeding help protect against atopic disease? Biology, methodology, and a golden jubilee of controversy. *J Pediatr.* 1988; 112: 181–190.
18. Lucas A., Morley R., Cole T.J., Lister G., Leeson-Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet.* 1992; 339: 261-264.
19. Lucas A., Morley R., Cole T.J. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ.* 1998; 317: 1481-1487.
20. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
21. Fuller G.M., Shields D. *Podstawy molekularne biologii. Aspekty medyczne*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
22. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109: 33-44.
23. Davis Conference – Cross C.E. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med.* 1987; 107: 526-545.
24. Davis J.M.: Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. *Acta Paediatr. Suppl.* 2002; 91: 23-25.
25. Okur H., Kucukaydin M., Kose K., Kontas O., Dogam P., Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg.* 1995; 30: 1416-1419.
26. Saugstad O.D. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2001; 13: 147-153.
27. Weinberger B., Laskin D.L., Heck D.E., Laskin J.D. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 181: 60-67.
28. Chevion M., Bereshtein E., Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Rad Res.* 2000; 33: 99-108.

29. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; 32: 790-796.
30. Stadtman E., Berlett B. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* 1998; 30: 225-243.
31. Piconi L., Quagliaro L., Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1144-1149.
32. Romero F.J., Bosch-Morell F., Romero M.J., Jareño E.J., Romero B., Marín N., Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect.* 1998; 106 Suppl 5: 1229-1234.
33. Lunec J., Holloway K.A., Cooke M.S., Faux S., Griffiths H.R., Evans M.D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 875-885.
34. Simic M.G. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54(7 Suppl): 1918s-1923s.
35. Morrow J.D., Roberts L.J. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research, *Biochem. Pharmacol.* 1996; 51: 1-9.
36. Morrow J.D., Roberts L.J. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1345: 121-135.
37. Montuschi P., Barnes P., Roberts L.J. Insights into Oxidative Stress: The Isoprostanes. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 703-717.
38. Zejda J.E. Wpływ biernego palenia tytoniu na stan układu oddechowego u dzieci w Polsce. *Alkohol Narkom.* 2000;13: 373-380.
39. Morrow J.D., Frei B., Longmire A.W., Gaziano J.M., Lynch S.M., Shyr Y., Strauss W.E., Oates J.A., Roberts L.J. II. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 1995; 332: 1198-1203.
40. Oguogho A., Lupattelli G., Palumbo B., Sinzinger H. Isoprostanes quickly normalize after quitting cigarette smoking in healthy adults. *Vasa.* 2000; 29: 103-105.
41. Pilz H., Oguogho A., Chehne F., Lupattelli G., Palumbo B., Sinzinger H. Quitting cigarette smoking results in a fast improvement of in vivo oxidation injury (determined via plasma, serum and urinary isoprostane). *Thromb Res.* 2000; 99: 209-221.

42. Chehne F., Oguogho A., Lupattelli G., Budinsky A.C., Palumbo B., Sinzinger H. Increase of isoprostane 8-epi-PGF(2 α) after restarting smoking. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001; 64: 307-310.
43. Qin Y., Wang C.C., Kuhn H., Rathmann J., Pang C.P., Rogers MS. Determinants of umbilical cord arterial 8-iso-prostaglandin F2 α concentrations. *BJOG*. 2000; 107: 973-981.
44. Longini M., Perrone S., Kenanidis A., Vezzosi P., Marzocchi B., Petraglia F., Centini G., Buonocore G. Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38: 1537-1541.
45. Helmersson J., Larsson A., Vessby B., Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F2 α , interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis*. 2005; 181: 201-207.
46. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993; 2: 213-219.
47. Konopacka M. Rola witaminy C w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA. *Postepy Hig Med Dosw*. 2004; 58: 343-348.
48. Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106-1114.
49. Buescher E.S., McIlheran S.M. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res*. 1988; 24: 14-19.
50. 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.
51. Goldman A.S., Goldblum R.M., Hanson L.A. Anti-inflammatory systems in human milk. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 262: 69-76.
52. Buescher E.S., McIlheran S.M. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1992; 14: 47-56.
53. 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.

54. 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.
55. Raghuveer 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.
56. 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.
57. Canfield L.M., Clandinin M.T., Davies D.P., Fernandez M.C., Jackson J., Hawkes J., Goldman W.J., Pramuk K., Reyes H., Sablan B., Sonobe T., Bo X. Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers. *Eur J Nutr.* 2003; 42: 133-141.
58. Kantol M., Vartiainen T. Changes in selenium, zinc, copper and cadmium contents in human milk during the time when selenium has been supplemented to fertilizers in Finland. *J Trace Elem Med Biol.* 2001; 15: 11-17.
59. Tawfeek H.I., Muhyaddin O.M., al-Sanwi H.I., al-Baety N. Effect of maternal dietary vitamin C intake on the level of vitamin C in breastmilk among nursing mothers in Baghdad, Iraq. *Food Nutr Bull.* 2002; 23: 244-247.
60. Zachara B.A., Pilecki A. Daily selenium intake by breast-fed infants and the selenium concentration in the milk of lactating women in western Poland. *Med Sci Monit.* 2001; 7: 1002-1004.
61. Ankrah N.A., Appiah-Opong R., Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. *J Trop Pediatr.* 2000; 46: 111-113.
62. Macias C., Schweigert F.J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab.* 2001; 45: 82-85.
63. 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.
64. Wasowicz W., Gromadzinska J., Szram K., Rydzynski K., Cieslak J., Pietrzak Z. Selenium, zinc, and copper concentrations in the blood and milk of lactating women. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 79: 221-233.

65. Heyndrickx G.V. Investigations on the enzymes in human milk. *Ann Paediatr.* 1962; 198: 356-362.
66. 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.
67. 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.
68. van Zoeren-Grobbe 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.
69. 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.
70. 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.
71. Saugstad O.D., Ramji S., Irani S.F., El-Meneza S., Hernandez E.A., Vento M., Talvik T., Solberg R., Rootwelt T., Aalen O.O. Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: follow-up at 18 to 24 months. *Pediatrics.* 2003; 112: 296-300.
72. Nowak D., Antczak A., Krol M., Pietras T., Shariati B., Bialasiewicz P., Jeczowski K., Kula P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J.* 1996; 9: 652-657.
73. Turolì D., Testolin G., Zanini R., Bellù R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr.* 2004; 93: 1569-1574.
74. 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.
75. 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.

76. 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
77. 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.
78. 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.
79. Coleman T. Special group of smokers. *BMJ.* 2004; 328: 575-577.
80. Kukla L., Hrubá D., Tyrlik M. Influence of prenatal and postnatal exposure to passive smoking on infants' health during the first six months of their life. *Cent. Eur. J. Public. Health.* 2004; 12: 157-160.
81. CDC. Cigarette smoking during the last 3 months of pregnancy among women who gave birth to live infants – Maine, 1988-1997, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999; 48: 421-425.
82. Dejin-Karlsson E., Ostergren P.O. Psychosocial factors, lifestyle, and fetal growth: the added value of both pre- and post-natal assessments. *Eur. J. Public Health.* 2003; 13: 210-217.
83. 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.
84. Johnson I.L., Ashley M.J., Reynolds D., Goettler F., Lee-Han H., Stratton J., Yim C., Murray J. Prevalence of smoking associated with pregnancy in three Southern Ontario Health Units. *Can. J. Public Health.* 2004; 95: 209-213.
85. Salvador J., Villalbí J.R., Nebot M., Borrell C. [Exposure to smoking during pregnancy: Barcelona (Spain) 1994-2001]. *An. Pediatr.* 2004; 60: 139-141.
86. Adamek R., Adamek A.M., Anholcer A., Bręborowicz G.H., Moczko J., Florek E. Palenie tytoniu a ciąża – zagrożenie zdrowia kobiety ciężarnej, płodu i noworodka. *Med. Rodz.* 2001; 4: 225-227.
87. Sabanty W., Brózik H. Wybrane wskaźniki stanu zdrowia oraz stężenie kotyniny w moczu chłopców z łódzkich szkół podstawowych narażonych na działanie dymu tytoniowego w środowisku domowym. Część 1. Kotynina jako wskaźnik narażenia na działanie dymu tytoniowego (palenie bierne). *Przegl Pediatr.* 2004; 33: 53-59.

88. Chazan B., Szymborski J., Zatoński W., Nieżurawski J., Ciastoń-Przeclawska E., Borkowski W. Ocena postaw kobiet w wieku rozrodczym wobec palenia tytoniu. *Med Wieku Rozwoj.* 1997; 1: 163-175.
89. Henderson A.J., Sherriff A., Northstone K., Kukla L., Hrubá D. Pre- and postnatal parental smoking and wheeze in infancy: cross cultural differences. Avon Study of Parents and Children (ALSPAC) Study Team, European Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood (ELSPAC) Co-ordinating Centre. *Eur Respir J.* 2001; 18: 323-329.
90. Johansson A., Halling A., Hermansson G. Indoor and outdoor smoking: impact on children's health. *Eur J Public Health.* 2003; 13: 61-66.
91. Nakamura M.U., Alexandre S.M., Kuhn dos Santos J.F., de Souza E., Sass N., Auritscher Beck A.P., Trayna E., Andrade C.M., Barroso T., Kulay Júnior L. Obstetric and perinatal effects of active and/or passive smoking during pregnancy. *Sao Paulo Med J.* 2004; 122: 94-98.
92. Adamek R., Florek E., Bręborowicz G.H., Anholcer A., Kaczmarek E. Świadomość zdrowotnych konsekwencji ekspozycji na dym tytoniowy oraz dostęp do informacji dotyczących szkodliwości dymu tytoniowego wśród kobiet ciężarnych. *Przegl Lek.* 2004; 61: 1012-1015.
93. Rogers J.M. Tobacco and pregnancy: overview of exposures and effects. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008; 84: 1-15.
94. 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.
95. Codandabany U. Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in cigarette smokers. *Cell Biochem Funct.* 2000; 18: 99-102.
96. Kim S.H., Kim J.S., Shin H.S., Keen C.L. Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea. *Nutrition.* 2003; 19: 240-243.
97. Polidori M.C., Mecocci P., Stahl W., Sies H. Cigarette smoking cessation increases plasma levels of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative challenge. *Br J Nutr.* 2003; 90: 147-150.
98. Altuntas I., Dane S., Gumustekin K. Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2002; 13: 69-72.

99. Ozbay B., Dulger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 197: 119-124.
100. Marangon K., Devaraj S., Jialal I. Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. *Clin Chem.* 1999; 45: 577-578.
101. Chuang C.Y., Lee C.C., Chang Y.K., Sung F.C. Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxydeoxyguanosine: influence of taxi driving, smoking and areca chewing. *Chemosphere.* 2003; 52: 1163-1171.
102. Kasai H., Iwamoto-Tanaka N., Miyamoto T., Kawanami K., Kawanami S., Kido R., Ikeda M. Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res.* 2001; 92: 9-15.
103. Yildiz L., Kayaoglu N., Aksoy H. The changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes of active and passive smokers. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 612-615.
104. Kim H.S., Lee B.M. Protective effects of antioxidant supplementation on plasma lipid peroxidation in smokers. *J Toxicol Environ Health A.* 2001; 63: 583-598.
105. Chao J.C., Huang C.H., Wu S.J., Yang S.C., Chang N.C., Shieh M.J., Lo P.N. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem.* 2002; 13: 427-434.
106. 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.
107. Nusbaum M.L., Gordon M., Nusbaum D., McCarthy M.A., Vasilakis D. Smoke alarm: a review of the clinical impact of smoking on women. *Prim Care Update Ob Gyns.* 2000; 7: 207-214.
108. Jauniaux E., Johns J., Gulbis B., Spasic-Boskovic O., Burton G.J. Transfer of folic acid inside the first-trimester gestational sac and the effect of maternal smoking. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 58.e1-6.

109. Falcon M., Vinas P., Perez-Carceles M.D., Luna A. Placental cadmium and lipid peroxidation in smoking women related to newborn anthropometric measurements. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2003; 45: 278-282.
110. Toro R., Leonard G., Lerner J.V., Lerner R.M., Perron M., Pike G.B., Richer L., Veillette S., Pausova Z., Paus T. Prenatal Exposure to Maternal Cigarette Smoking and the Adolescent Cerebral Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33: 1019-1027.
111. Key A.P.F., Ferguson M., Molfese D.L., Peach K., Lehman C., Molfese V.J. Smoking during Pregnancy Affects Speech-Processing Ability in Newborn Infants. *Environ Health Perspect.* 2007; 115: 623-629.
112. Obel C., Henriksen T.B., Hedegaard M., Secher N.J., Ostergaard J. Smoking during pregnancy and babbling abilities of the 8-month-old infant. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1998; 12: 37-48.
113. Langley K., Holmans P.A., van den Bree M.B., Thapar A. Effects of low birth weight, maternal smoking in pregnancy and social class on the phenotypic manifestation of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and associated antisocial behaviour: investigation in a clinical sample. *BMC Psychiatry.* 2007; 7: 26.
114. Haustein K.O. Cigarette smoking, nicotine and pregnancy. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1999; 37: 417-427.
115. Dempsey D.A., Benowitz N.L. Risk and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 2001; 24: 277-322.
116. Froen J.F., Akre H., Stray-Pedersen B., Saugstad O.D. Adverse effects of nicotine and interleukin-1beta on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 2000; 105: E52.
117. McLnnes R.J., Love J.G., Stone D.H. Independent predictors of breastfeeding intention in a disadvantaged population of pregnant women. *BMC Public Health.* 2001; (1): 10.
118. 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.
119. Luck W., Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and urine of infants exposed via passive smoking or milk from smoking mothers. *J Pediatr.* 1985; 107: 816-820.

120. Mascola M.A., Van Vunakis H., Tager I.B., Speizer F.E., Hanrahan J.P. Exposure of young infants to environmental tobacco smoke: breast-feeding among smoking mothers. *Am J Public Health*. 1998; 88: 893-896.
121. Labrecque M., Marcoux S., Weber J.P., Fabia J., Ferron L. Feeding and urine cotinine values in babies whose mothers smoke. *Pediatrics*. 1989; 83: 93-97.
122. Woodward A., Grgurinovich N., Ryan P. Breast feeding and smoking hygiene: Major influences on cotinine in urine of smokers' infants. *J Epidemiol Community Health*. 1986; 40: 309-315.
123. Schulte-Hobein B., Schwartz-Bickenbach D., Abt S., Plum C., Nau H. Cigarette smoke exposure and development of infants throughout the first year of life: influence of passive smoking and nursing on cotinine levels in breast milk and infant's urine. *Acta Paediatr*. 1992; 81: 550-557.
124. Agostoni C., Marangoni F., Grandi F., Lammardo A.M., Giovannini M., Riva E., Galli C. Earlier smoking habits are associated with higher serum lipids and lower milk fat and polyunsaturated fatty acid content in the first 6 months of lactation. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2003; 57: 1466-1472.
125. Nylander G., Matheson I. [Breast feeding. Effects of smoking and education]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1989; 109: 970-973.
126. Nishijo M., Nakagawa H., Honda R., Tanebe K., Saito S., Teranishi H., Tawara K. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occup Environ Med*. 2002; 59: 394-397.
127. Zanardo V., Nicolussi S., Cavallin S., Trevisanuto D., Barbato A., Faggian D., Favaro F., Plebani M. Effect of maternal smoking on breast milk interleukin-1alpha, beta-endorphin, and leptin concentrations. *Environ. Health Perspect*. 2005; 113: 1410-1413.
128. Laurberg P., Nohr S.B., Pedersen K.M., Fuglsang E. Iodine nutrition in breast – fed infants is impaired by maternal smoking. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 181-187.
129. Kukla L., Hrubá D., Tyrlik M. Influence of prenatal and postnatal exposure to passive smoking on infants' health during the first six months of their life. *Cent. Eur. J. Public. Health*. 2004; 12: 157-160.
130. Montgomery S.M., Ehlin A., Ekblom A. Smoking during pregnancy and bulimia nervosa in offspring. *J. Perinat. Med*. 2005; 33: 206-211.

131. McDonald T.A., Holland N.T., Skibola C., Duramad P., Smith M.T. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*. 2001; 15: 10-20.
132. Moodley J.R., Coetzee N., Hussey G. Risk factors for meningococcal disease in Cape Town. *S Afr Med J*. 1999; 89: 56-59.
133. 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.
134. Zusterzeel P.L., Mulder T.P., Peters W.H., Wiseman S.A., Steegers E.A. Plasma protein carbonyls in nonpregnant, healthy pregnant and preeclamptic women. *Free Radic Res*. 2000; 33: 471-476.
135. Chełchowska M., Laskowska-Klita T., Szymborski J. Poziom retinolu i β -karotenu w osoczu krwi palących i niepalących kobiet ciężarnych. *Wiad Lek*. 2001; 54: 248-254.
136. Laskowska-Klita T., Szymborski J., Chełchowska M., Czerwinska B., Chazan B. Kompensacyjna aktywność przeciwutleniająca krwi kobiet w ciąży powikłanej paleniem tytoniu. *Med Wieku Rozwoj*. 1999; 3: 485-494.
137. Seidman D.S., Paz I., Merlet-Aharoni I., Vreman H., Stevenson D.K., Gale R. Noninvasive validation of tobacco smoke exposure in late pregnancy using end-tidal carbon monoxide measurements. *J Perinatol*. 1999; 19: 358-361.
138. Laskowska-Klita T., Szymborski J., Chełchowska M., Czerwińska B., Kucharski K.T. Nadtliski lipidowe i wybrane parametry obrony przeciwutleniającej w łożysku i krwi pępowinowej noworodków matek palących w przebiegu ciąży. *Badania własne. Med Wieku Rozwoj*. 2001; 5: 35-42.
139. Obwegeser R., Oguogho A., Ulm M., Berghammer P., Sinzinger H. Maternal cigarette smoking increases F2-isoprostanes and reduces prostacyclin and nitric oxide in umbilical vessels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1999; 57: 269-279.
140. Daube H., Scherer G., Riedel K., Ruppert T., Tricker A.R., Rosenbaum P., Adlkofer F. DNA adducts in human placenta in relation to tobacco smoke exposure and plasma antioxidant status. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997; 123: 141-151.
141. 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: 213-217.
142. Sipowicz M.A., Amin S., Desai D., Kasprzak K.S., Anderson L.M. Oxidative DNA damage in tissues of pregnant female mice and fetuses caused by the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Cancer Lett.* 1997; 117: 87-91.
 143. Ortega R.M., Lopez-Sobaler A.M., Martinez R.M., Andres P., Quintas M.E. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 662-667.
 144. Ortega R.M., Lopez-Sobaler A.M., Quintas M.E., Martinez R.M., Andres P. The influence of smoking on vitamin C status during the third trimester of pregnancy and on vitamin C levels in maternal milk. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17: 379-384.
 145. Ermis B., Yildirim A., Örs R., Tastekin A., Ozkan B., Akcay F. Influence of Smoking on Serum and Milk Malondialdehyde, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Antioxidant Potential Levels in Mothers at the Postpartum Seventh Day. *Biol Trace Elem Res.* 2005; 105: 27-36.
 146. McDonald S.D., Perkins S.L., Walker M.C. Correlation between self-reported smoking status and serum cotinine during pregnancy. *Addict Behav.* 2005; 30: 853-857.
 147. Klebanoff M.A., Levine R.J., Morris C.D., Hauth J.C., Sibai B.M., Ben Curet L., Catalano P., Wilkins D.G. Accuracy of self-reported cigarette smoking among pregnant women in the 1990s. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2001; 15: 140-143.
 148. Roberts L.J., Morrow J.D. Measurement of F2-isoprstanes as an index of oxidative stress invivo. *Free Rad. Biol. Medicine.* 2000; 28: 505-513.
 149. Damiani E., Kalinska B. Canapa A. Canestrari S. Wozniak M. Olmo, E. Greci, L. The effects of nitroxide radicals on oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1257-1265.
 150. Jaffé M.Z. About the precipitation caused by pikrinic acid in normal urine and about a new reaction of creatinine. *Physiol Chem*, 1886, 10, 391-400.
 151. Ziegler U.E., Kauczok J., Dietz U.A., Reith H.B., Schmidt K. Clinical correlation between the consumption of nicotine and cotinine concentrations

- in urine and serum by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Pharmacology*. 2004; 72: 254-259.
152. Avidano Britton G.R., Brinthaup J., Stehle J.M., James G.D. Comparison of Self-Reported Smoking and Urinary Cotinine Levels in a Rural Pregnant Population. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2004; 33: 306-311.
 153. Haufroid V., Lison D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health*. 1998; 71: 162–168.
 154. Altman, D. G. *Practical Statistics for medical Research*, 2nd. ed. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida 2001.
 155. Bickel, J. P. Doksum K. A. *Mathematical Statistics*. 2nd. ed. Prentice Hall, New Jersey 2000.
 156. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna 2007, Austria, <http://www.R-project.org>
 157. Nijati K., Satoh K., Otani K., Kimata Y., Ohtaki M. Regression analysis of maternal smoking effect on birth weight. *Hiroshima J Med Sci*. 2008; 57: 61-67.
 158. Riboli E., Haley N.J., Tredaniel J., Saracci R., Preston M.S., Trichopoulos D. Misclassification of smoking status among women in relation to exposure to environmental tobacco smoke. *Eur. Respir. J*. 1995; 8: 285-290.
 159. Mannello F., Tonti G.A., Pagliarani S., Benedetti S., Canestrari F., Zhu W., Qin W., Sauter E.R. The 8-epimer of prostaglandin F(2alpha), a marker of lipid peroxidation and oxidative stress, is decreased in the nipple aspirate fluid of women with breast cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120: 1971-1976.
 160. 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.
 161. Robles R., Palomino N., Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev*. 2001; 65 Suppl: S75–S81
 162. Donath SM, Amir LH, ALSPAC Study Team. The relationship between maternal smoking and breastfeeding duration after adjustment for maternal infant feeding intention. *Acta Paediatr*. 2004; 93: 1514-1518.
 163. 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.

164. 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.
165. Bloomer R.J. Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. *Nutr J.* 2007; 6: 39.
166. Pickett K.E., Rathouz P.J., Kasza K., Wakschlag L.S., Wright R. Self-reported smoking, cotinine levels, and patterns of smoking in pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2005; 19: 368–376.
167. DeLorenze G.N., Kharrazi M., Kaufman F.L., Eskenazi B., Bernert J.T. Exposure to Environmental Tobacco Smoke in Pregnant Women: The Association between Self-Report and Serum Cotinine. *Environ Res.* 2002; 90: 21–32.
168. Klebanoff M.A., Levine R.J., Clemens J.D., DerSimonian R., Wilkins D.G. Serum cotinine concentration and self-reported smoking during pregnancy. *Am J Epidemiol.* 1998; 148: 259–262.
169. Secker-Walker R.H., Vacek P.M., Flynn B.S., Mead P.B. Exhaled carbon monoxide and urinary cotinine as measures of smoking in pregnancy. *Addict Behav.* 1997; 22: 671–684.
170. Dempsey D., Jacob P. III, Benowitz N.L. Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301: 594–598.
171. Walsh R.A., Redman S., Adamson L. The accuracy of self-report of smoking status in pregnant women. *Addict Behav.* 1996; 21: 675–679.
172. England L.J., Grauman A., Qian C., Wilkins D.G., Schisterman E.F., Yu K.F., Levine R.J. Misclassification of maternal smoking status and its effects on an epidemiologic study of pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 2007; 9: 1005–1013.
173. Pérez-Stable E.J., Marín B.V., Marín G., Brody D.J., Benowitz N.L. Apparent underreporting of cigarette consumption among Mexican American smokers. *Am J Public Health.* 1990; 80: 1057–61.
174. Wu F.Y., Chiu H.T., Wu H.D., Lin C.J., Lai J.S., Kuo H.W. Comparison of urinary and plasma cotinine levels during the three trimesters of pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008; 22: 296–301.
175. Laskowska-Klita T., Chełchowska M., Leibschang J. Stężenie kotyniny w surowicy i moczu palących kobiet w ciąży oraz we krwi łóżyskowej

- i pępowinowej. *Przegl Lek.* 2005; 62: 1007-1009.
176. Haddow J.E., Knight G.J., Palomaki G.E. Measuring serum cotinine to aid in smoking cessation during pregnancy and to enhance assessment of smoking-related fetal morbidity. W: Poswillo D., Alberman E. *Effects of smoking on the fetus, neonate and child.* Nowy Jork: Oxford University Press, 1992: 207-222.
 177. Joseph A.M., Hecht S.S., Murphy S.E., Carmella S.G., Le C.T., Zhang Y., Han S., Hatsukami D.K. Relationships between Cigarette Consumption and Biomarkers of Tobacco Toxin Exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 2963–2968.
 178. Vine M.F., Hula B.S, Magolin B.H., Truong Y.K., Hu P., Schramm M.M., Griffith J.D., McCann M., Everson R.B. Cotinine Concentrations in Semen, Urine, and Blood of Smokers and Nonsmokers. *Am J Public Health.* 1993; 83: 1335-1338.
 179. Dukic V.M., Niessner M., Benowitz N., Hans S., Wakschlag L. Modeling the relationship of cotinine and self-reported measures of maternal smoking during pregnancy: A deterministic approach. *Nicotine Tob Res.* 2007; 9: 453–465.
 180. Becker A.B., Manfreda J., Ferguson A.C., Dimich-Ward H., Watson W.T.A., Chan-Yeung M. Breast-feeding and Environmental Tobacco Smoke Exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999; 153: 689-691.
 181. Godding V., Bonnier C., Fiasse L., Michel M., Longueville E., Lebecque P., Robert A., Galanti L. Does in utero exposure to heavy maternal smoking induce nicotine withdrawal symptoms in neonates? *Pediatr Res.* 2004; 55: 645-651.
 182. Hovell M.F., Zakarian J.M., Matt G.E., Hofstetter C.R., Bernert J.T., Pirkle J. Effect of counselling mothers on their children's exposure to environmental tobacco smoke: randomised controlled trial. *BMJ.* 2000; 321: 337-342.
 183. Etzel R.A., Greenberg R.A., Haley N.J., Loda F.A. Urine cotinine excretion in neonates exposed to tobacco smoke products in utero. *J Pediatr.* 1985; 107: 146-148.
 184. Tsukahara H. Biomarkers for Oxidative Stress: Clinical Application in Pediatric Medicine. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 339-351.
 185. 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.
 186. 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.
187. 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.
 188. 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.
 189. Kauffman L.D., Sokol R.J., Jones R.H., Awad J.A., Rewers M.J., Norris J.M. Urinary F2-isoprostanes in young healthy children at risk for type 1 diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35: 551-557.
 190. Georgeson G.D., Szońny B.J., Streitman K., Varga I.S., Kovaćs A., Kovaćs L., La'szlo' A. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002; 103: 136-139.
 191. 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.
 192. 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.
 193. 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.
 194. 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.
 195. 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.
 196. 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.

197. Gutikova L.V. [Chemical composition of milk of puerperas suffered from gestosis of different degree of severity] *Biomed Khim.* 2007; 53: 332-337.
198. Debski B., Finley D.A., Picciano M.F., Lo'nnnerdal B., Milner J. Selenium content and glutathione peroxidase activity of milk from vegetarian and nonvegetarian women. *J Nutr.* 1988; 119: 215–220.
199. Castillo C., Herná'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.
200. Kim S.H., Kim J.S., Shin H.S., Keen C.L. Influence of Smoking on Markers of Oxidative Stress and Serum Mineral Concentrations in Teenage Girls in Korea. *Nutrition.* 2003; 19: 240 –243.
201. Ho S.P., Chan-Yeung M., Chow K.K., Ip M.S., Mak J.C. Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking. *Respirology.* 2005; 10: 305-309.
202. Madruga de Oliveira A., de Carvalho Rondo P.H., Barros S.B. Concentrations of ascorbic acid in the plasma of pregnant smokers and nonsmokers and their newborns. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004; 74: 193-198.
203. Ziobro A., Bartosz G. A comparison of the total antioxidant capacity of some human body fluids. *Cell Mol Biol Lett.* 2003; 8: 415-419.
204. Wurzel H., Yeh C.C., Gairola C., Chow C.K. Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette smoke. *J Biochem Toxicol.* 1995; 10: 11-17.
205. Hulea S.A., Olinescu R., Nită S., Crocnan D., Kummerow F.A. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1995; 14: 173-180.
206. Chełchowska M., Laskowska-Klita T., Leibschang J. Wpływ palenia tytoniu w przebiegu ciąży na stężenia dialdehydu malonowego we krwi matki i we krwi pępowinowej noworodka. *Ginekol Pol.* 2005; 76: 960-965.
207. Aycicek A., Ipek A. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood. *Eur J Pediatr.* 2008; 167: 81-85.
208. Noakes P.S., Thomas R., Lane C., Mori T.A., Barden A.E., Devadason S.G., Prescott S.L. Association of maternal smoking with increased infant oxidative stress at 3 months of age. *Thorax.* 2007; 62: 714-717.
209. Bolisetty S., Naidoo D., Lui K., Koh T.H.H.G., Watson D., Montgomery R.,

- Whitehall J. Postnatal changes in maternal and neonatal plasma antioxidant vitamins and the influence of smoking. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002; 86: F36–F40.
210. Franco M.C., Kawamoto E.M., Gorjão R., Rastelli V.M., Curi R., Scavone C., Sawaya A.L., Fortes Z.B., Sesso R. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in children born small for gestational age: evidence of lipid peroxidation. *Pediatr Res.* 2007; 62: 204-208.
 211. Ahola T., Fellman V., Kjellmer I., Raivio K.O., Lapatto R. Plasma 8-isoprostane is increased in preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia or periventricular leukomalacia. *Pediatr Res.* 2004; 56: 88-93.
 212. Reuter S.D., O'Donovan D.J., Hegemier S.E., Smith E.O., Heird W.C., Fernandes C.J. Urinary F2-isoprostanes are poor prognostic indicators for the development of bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol.* 2007; 27: 303-306.
 213. Tomey K.M., Sowers M.R., Li X., McConnell D.S., Crawford S., Gold E.B., Lasley B., Randolph J.F. Jr. Dietary fat subgroups, zinc, and vegetable components are related to urine F2a-isoprostane concentration, a measure of oxidative stress, in midlife women. *J Nutr.* 2007; 137: 2412-2419.
 214. Yan W., Byrd G.D., Ogden M.W. Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *J Lipid Res.* 2007; 48: 1607-1617.
 215. Reilly M., Delanty N., Lawson J.A., FitzGerald G.A. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation.* 1996; 94: 19-25.
 216. Block G., Dietrich M., Norkus E.P., Morrow J.D., Hudes M., Caan B., Packer L. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. *Am J Epidemiol.* 2002; 156: 274–285.
 217. Sinzinger H., Oguogho A., Pilz H. Increased oxidation injury in children of smoking parents. *Circulation.* 2002; 106: 740–741.
 218. Stojiljkovic M.P., Lopes H.F., Zhang D., Morrow J.D., Goodfriend T.L., Egana B.M. Increasing plasma fatty acids elevates F2-isoprostanes in humans: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *J Hypertens.* 2002; 20: 1215-1221.
 219. 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.

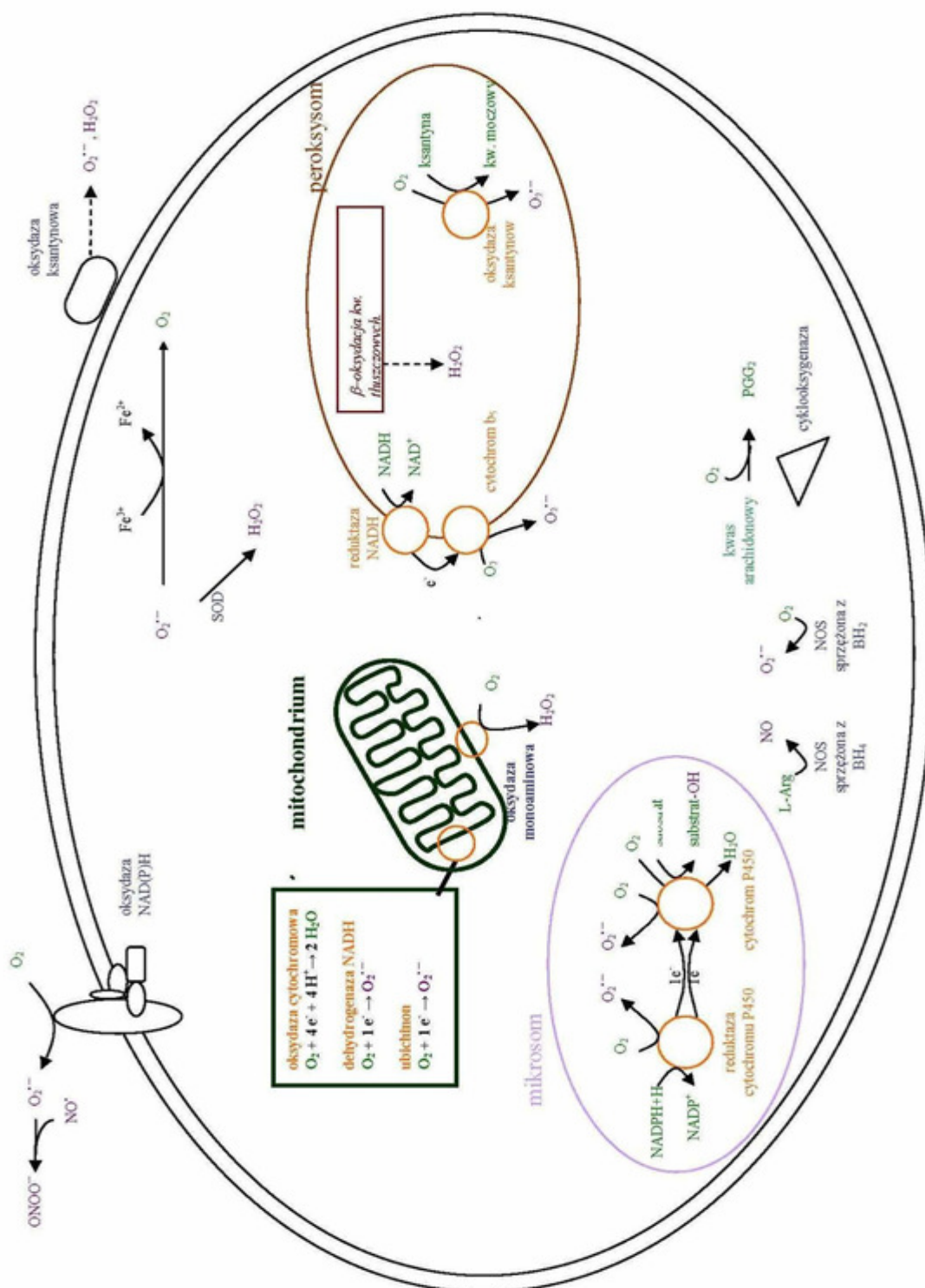
- FEBS Letters. 1999; 459: 259-262.
220. Barden A.E., Mori T.A., Dunstan J.A., Taylor A.L., Thornton C.A., Croft K.D., Beilin L.J., Prescott S.L. Fish Oil Supplementation in Pregnancy Lowers F2-isoprostanes in Neonates at High Risk of Atopy. *Free Radic Res.* 2004; 38: 233–239.
 221. Ishihara O., Hayashi M., Osawa H., Kobayashi K., Takeda S., Vessby B., Basu S. Isoprostanes, prostaglandins and tocopherols in pre-eclampsia, normal pregnancy and non-pregnancy. *Free Radic Res.* 2004; 38: 913-918.
 222. Helmersson J., Basu S. F2-Isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999; 61: 203–205.
 223. Wendland B.E., Aghdassi E., Tam C., Carrier J., Steinhart H.A., Wolman S.L., Baron D., Allard J.P. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 259–264.
 224. McKinney E.T., Shouri R., Hunt R.S., Ahokas R.A., Sibai B.M. Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: 874-877.
 225. Barden A., Beilin L.J., Ritchie J., Croft K.D., Walters B.N., Michael C.A. Plasma and urinary 8-isoprostane as an indicator of lipid peroxidation in preeclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci.* 1996; 91: 711-718.
 226. Kova'cs A., Funke S., Marosvo'lglyi T., Burus I., Decsi T. Fatty Acids in Early Human Milk after Preterm and Full-Term Delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 41: 454–459.
 227. Marangoni F., Agostoni C., Lammardo A.M., Giovannini M., Galli C., Riva E. Polyunsaturated fatty acid concentrations in human hindmilk are stable throughout 12-months of lactation and provide a sustained intake to the infant during exclusive breastfeeding: an Italian study. *Br J Nutr.* 2000; 84: 103–109.
 228. Flores L., Vidal M., Abian J., Casest A., Cannpistol J.M., Claria J., Lario S. Esmatjes E. The effects of smoking and its cessation on 8-epi-PGF2a and transforming growth factor-beta 1 in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2004; 21: 285-289.
 229. Hopkinson J.M., Schanler R.J., Fraley J.K., Garza C. Milk production by mothers of premature infants: influence of cigarette smoking. *Pediatrics.* 1992; 90: 934-938.
 230. Goil S., Truog W.E., Barnes C., Norberg M., Rezaiekhalthigh M., Thibeault D.

- Eight-epi-PGF2 α : A possible marker of lipid peroxidation in term infants with severe pulmonary disease. *J Pediatr*. 1998; 132: 349-351.
231. Basu S., Helmersson J. Factors regulating isoprostane formation in vivo. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7: 221–235.
 232. Montuschi P., Collins J.V., Ciabattini G., Lazzeri N., Corradi M., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1175-1177.
 233. Keaney Jr J.F., Larson M.G., Vasan R.S., Wilson P.W., Lipinska I., Corey D., Massaro J.M., Sutherland P., Vita J.A., Benjamin E.J.; Framingham Study. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 434–439.
 234. Lucas A., Gibbs J.A., Lyster R.L., Baum J.D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J*. 1978; 1: 1018–1020.
 235. Miranda M., Muriach M., Almansa I., Jareño E., Bosch-Morella F., Romero F.J., Silvestre D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *BioFactors*. 2004; 20: 129–137.
 236. Hoppu U., Rinne M., Salo-Vaananen P., Lampi A.M., Piironen V., Isolauri E. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr*. 2005; 59: 123-128.
 237. Kaneko A., Kaneita Y., Yokoyama E., Miyake T., Harano S., Suzuki K., Ibuka E., Tamaki T., Nakajima H., Ohida T. Smoking trends before, during, and after pregnancy among women and their spouses. *Pediatr Int*. 2008; 50: 367-375.
 238. Dahlstrom A., Ebersjo C., Lundell B. Nicotine exposure in breastfed infants. *Acta Paediatr*. 2004; 93: 810–816.
 239. Ozokutan B.H., Ozkan K.U., Sari I., Inanç F., Güldür M.E., Kiliç M. Effects of maternal nicotine exposure during lactation on breast-fed rat pups. *Biol Neonate*. 2005; 88: 113-117.
 240. Bogen D.L., Davies E.D., Barnhart W.C., Lucero C.A., Moss D.R. What do mothers think about concurrent breast-feeding and smoking? *Ambul Pediatr*. 2008; 8: 200-204.
 241. AAP-American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics*. 2001; 108: 776–789.

242. Dorea J.G. Maternal smoking and infant feeding: breastfeeding is better and safer. *Matern Child Health J.* 2007; 11: 287-291.
243. Rich-Edwards J.W., Stampfer M.J., Manson J.E., Rosner B., Hu F.B., Michels K.B., Willett W.C. Breastfeeding during infancy and the risk of cardiovascular disease in adulthood. *Epidemiology.* 2004; 15: 550–556.
244. Al-Shehri M.A., Sadeq A., Quli K. Bronchiolitis in Abha, Southwest Saudi Arabia: viral etiology and predictors for hospital admission. *West Afr J Med.* 2005; 24: 299–304.
245. Nafstad P., Jaakkola J.J., Hagen J.A., Botten G., Kongerud J. Breastfeeding, maternal smoking and lower respiratory tract infections. *Eur Respir J.* 1996; 9: 2623-2629.
246. Batstra L., Neeleman J., Hadders-Algra M. Can breast feeding modify the adverse effects of smoking during pregnancy on the child's cognitive development? *J Epidemiol Community Health.* 2003; 57: 403–404.
247. Davi G., Ciabattini G., Consoli A., Mezzetti A., Falco A., Santarone S., Pennese E., Vitacolonna E., Bucciarelli T., Costantini F., Capani F., Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2α} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation.* 1999; 99: 224–229.
248. Dimenstein R., Simplício J.L., Ribeiro K.D., Melo I.L. [Retinol levels in human colostrum: influence of child, maternal and socioeconomic variables]. *J Pediatr.* 2003; 79: 513-518.
249. Cederberg J., Simán C.M., Eriksson U.J. Combined Treatment with Vitamin E and Vitamin C Decreases Oxidative Stress and Improves Fetal Outcome in Experimental Diabetic Pregnancy. *Pediatr Res.* 2001; 49: 755-762.
250. Duitsman P.K., Olson J.A. Comparative embryoletality and teratogenicity of the all-trans isomers of retinoic acid, 3,4-didehydroretinyl acetate, and retinyl acetate in pregnant rats. *Teratology.* 1996; 53: 237-244.
251. Shigenaga M.K., Ames B.N. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10: 211-216.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Drogi tlenu w komórce (gdzie: O_2 tlen, $O_2^{\cdot -}$ anionorodnik ponadtlenkowy, H_2O_2 nadtlenek wodoru, PGG_2 prostaglandyna G2, H_2O woda, H^+ wodór, $NO^{\cdot}$ tlenek azotu, $ONOO^{\cdot -}$ nadlenoazotyn, NOS (Nitrous Oxide Systems), e^- elektron, $Fe^{2+/3+}$ żelazo 2/3- wartościowe, BH_2 dihydrobiopteryna, BH_4 tetrahydrobiopteryna, L-Arg L-Arginina, NADH dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, NADPH fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego).



Załącznik 2. Ankieta przeprowadzana wśród uczestniczek badania

IMIĘ (NAZWISKO): _____										WIEK: _____				NR _____	
KONTAKT (TELEFON, ADRES): _____															
MIEJSCE POBRANIA:										DATA POBRANIA:				CIĄŻA: PORÓD:	
Przebieg ciąży:										Leki: Witaminy: Żelazo:					
PAPIEROSY:															
PRZED CIĄŻĄ:					W TRAKCIE					PO PORODZIE					
NIE	TAK <10/ dz	10 - 20	> 20 /dz	Palenie bierne	NIE	TAK <10/ dz	10 - 20	> 20 /dz	Palenie bierne	NIE	TAK <10/ dz	10 - 20	> 20 /dz	Palenie bierne	
Ile?															
CHOROBY PRZEWLEKŁE U MATKI:															
Asthma (A)										Choroba niedokrwienna serca					
Alergiczny nieżyt nosa/spojówek (ANN/S)										Cukrzyca					
Alergie skórne (AS)										Miażdżycy					
Alergia pokarmowa (AP)										Nowotwory					
Dodatni wywiad osobniczy w kierunku atopii:										Choroby neurodegeneracyjne					
										Choroby zapalne tkanki łącznej:					
Inne choroby przewlekłe:															

WYWIAD RODZINNY W KIERUNKU ATOPII:														
OJCIEC DZIECKA														
A	ANN/S	AS	AP	inne	A	ANN/S	AS	AP	inne	A	ANN/S	AS	AP	inne
A	ANN/S	AS	AP	inne	A	ANN/S	AS	A P	Inne	A	ANN/S	AS	AP	inne
PORÓD														
_____Hbd					Prawidłowy		Nieprawidłowy			Jaki nieprawidłowy?				
Masa urodzeniowa: _____g					Długość: _____cm					Apgar:				
Uwagi:														
Odchylenia od stanu prawidłowego:														

Załącznik 3. Informacja o badaniu dla kobiet.

INFORMACJA O BADANIU

Nazwa programu badawczego: OCENA WPŁYWU PALENIA PAPIEROSÓW NA RÓWNOWAGĘ ANTYOKSYDACYJNO – PROOKSYDACYJNĄ W MLEKU KOBIECYM.

Nazwisko i imię badanego.....

Data urodzenia.....Wiek.....

Adres.....Telefon.....

Niniejsze badanie ma na celu ocenę wpływu dymu papierosowego na właściwości mleka kobiecego. Badanie będzie prowadzone wśród kobiet, które rodziły w tym Szpitalu. Poproszona Pani zostanie o wypełnienie kwestionariusza dotyczącego Pani stanu zdrowia, chorób występujących w Rodzinie, przebiegu ciąży i porodu oraz narażenia na dym papierosowy. Do badań pobierana będzie próbka mleka zebranego przez Panią na początku 3 doby po porodzie. Kontrolne oznaczenie odbędzie się w 30 dniu laktacji. W tym dniu zapraszamy Panią do Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej w Gdańsku przy ulicy Nowe Ogrody 1-6 wraz z dzieckiem, które zostanie zbadane, jeśli Pani będzie sobie tego życzyła, przez pediatrów pracujących w Klinice. Jednocześnie zależałoby nam na zbadaniu podobnych parametrów w moczu Pani oraz Pani dziecka. Postaramy się wcześniej skontaktować telefonicznie.

Mamy nadzieję, że przeprowadzone badania przybliżą nam wiedzę na temat zagrożeń związanych z narażeniem na dym papierosowy, i tym samym pomogą w znalezieniu odpowiednich metod leczniczych i poprawią stan zdrowia naszych dzieci.

Zachowamy pełną poufność dotyczącą osobiście Pani oraz wyników badań.

Niniejsze badanie zostało przyjęte i zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw badań naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku, powołaną przez Rektora Uczelni, na podstawie rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej. Zadaniem Komisji jest ochrona praw badanego. Kierownikiem badania jest lek.med. Maciej Zagierski (tel. 058 302 30 31 w.239).

Załącznik 4. Tekst świadomej zgody badanego.

ŚWIADOMA ZGODA BADANEGO

Zapoznałam się z informacją dotyczącą przeprowadzanego badania pt. Ocena wpływu palenia papierosów na równowagę antyoksydacyjno – prooksydacyjną w mleku kobiecym. Zgadzam się uczestniczyć w w/w badaniu

Podpis badanej.....Data.....

Ja, niżej podpisany w pełni wyjaśniłem wszelkie szczegóły tego badania choremu lub prawnemu opiekunowi. W pełni świadomie podejmuję się prowadzenia tego badania i rozumiem swoją rolę.

Podpis badacza.....Data.....

Załącznik 5. Porównanie deklaracji ankietowanych i stężeń kotyniny w moczu

	Kotynina +	Kotynina -
Deklaracja o paleniu papierosów	20 wyniki prawdziwie dodatnie	3 wyniki fałszywie dodatnie
Deklaracja o niepaleniu papierosów	1 wyniki fałszywie ujemne	27 wyniki prawdziwie ujemne
	Czułość 94%	Swoistość 90%

Załącznik 6. Zestawienie liczby deklarowanych wypalanych na dobę papierosów ze stężeniami kotyniny oraz wskaźnikiem kotynina/kreatynina u poszczególnych kobiet

l.p.	Papierosy (sztuki)	Kotynina ng/ml	Kotynina/ kreatynina (ng/mg)	l.p.	Papierosy (sztuki)	Kotynina ng/ml	Kotynina/ kreatynina (ng/mg)
1	15	1326	1597,6	32	0	30,2	20,7
4	5	236,3	500,6	33	0	50,9	31,5
7	5	0	0	34	0	143,3	77
8	20	150,1	92,2	35	0	69	63
9	25	1310	2126,6	36	0	0	0
10	5	552,1	1302,1	37	0	114,3	89,9
11	7	0	0	38	0	247,2	280
12	10	1664	725,7	39	0	23,6	29,8
13	10	234	243,2	40	0	0	0
14	18	1786	814	41	0	0	0
15	15	1059	4696,2	42	0	0	0
16	18	56,7	39,2	43	0	0	0
18	12	1085	1373,4	44	0	0	0
19	7	1199	1504,4	45	0	141,6	123,3
20	5	1168	1707,6	46	0	61,7	1114
21	8	897,2	692,3	47	0	0	0
22	10	0	0	48	0	330	138
23	10	212,4	309,2	49	0	79,4	37,1
24	10	1432	767	50	0	0	0
25	8	177,4	110,6	51	0	0	0
26	15	1206	2621,7	52	0	298,3	102,1
28	15	943,6	677,4	53	0	0	0
31	8	1165	1703,2	54	0	0	0
				55	0	1789	598,9
				56	0	0	0
				57	0	0	0
				58	0	0	0
				60	0	57,1	42,5

Załącznik 7. Wskaźnik kotynina/kreatynina w moczu badanych dzieci (ng/mg)

Kotynina/kreatynina u dzieci	Średnie	S.D.	Min.	Max.	Mediana
Dzieci matek z grupy I	1470	3840	0,0	12321	0,0
Dzieci matek z grupy II	80	210	0,0	621	0,0
Ogół grup	620	2410	0,0	12321	

Załącznik 8. Zestawienie stężeń kotyniny w moczu u dzieci i ich matek (ng/ml)

L.p	Kotynina w moczu dziecka	Kotynina w moczu matki	Kotynina/ kreatynina w moczu dziecka	Kotynina/ kreatynina w moczu matki	L.p.	Kotynina w moczu dziecka	Kotynina w moczu matki	Kotynina/ kreatynina w moczu dziecka	Kotynina/ kreatynina w moczu matki
1	0	1326	0	1597,6	40	0	0	0	0
4	106	236,3	548,1	500,6	41	0	0	0	0
8	0	150,1	0	92,2	42	0	0	0	0
9	23,9	1310	263,2	2126,6	43	0	0	0	0
10	0	552,1	0	1302,1	44	67,4	0	587,6	0
11	0	0	0	0	47	0	0	0	0
12	368,4	1664	12321	725,7	48	0	330	0	138
16	0	56,7	0	39,3	49	27,2	79,4	123,9	37,1
20	56,9	1168	1585	1707,6	50	213	0	621,2	0
23	0	212,4	0	309,2	51	0	0	0	0
25	59,2	177,4		1106	54	0	0	0	0
34	0	143,3	0	77	55	477	1789		598,9
36	0	0	0	0	58	0	0	0	0
37	0	114,3	0	89,9	60	0	57,1	0	42,5
39	0	23,6	0	29,8					