



Academia Medica Gedanensis
Facultas Pharmaceutica

Marcin Marszałł

**Ekspozycja na dym tytoniowy a poziom homocysteiny
i jej kofaktorów we krwi i moczu
u osób palących i niepalących**

Rozprawa na stopień
doktora nauk farmaceutycznych

Promotor
Prof. dr hab. Wojciech Czarnowski

Katedra i Zakład Toksykologii

Gdańsk 2007

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu Promotorowi Prof. dr hab. Wojciechowi Czarnowskiemu
za cenne rady i pomoc w realizacji pracy*

*Panu dr Ryszardowi Makarowskiemu
za pomoc w realizacji doświadczenia*

*Pani Teresie Pawłowskiej
za poświęcony czas i pomoc w przeprowadzeniu doświadczenia*

*Pani dr Małgorzacie Szyszko
za pomoc w przygotowywaniu próbek do oznaczeń*

*Panu dr Radosławowi Żbikowskiemu
za cenne konsultacje matematyczno-statystyczne*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
za udostępnienie ciekłego azotu i możliwość przechowywania próbek*

Mojej kochanej Żonie i Rodzicom

Spis treści

I. Spis skrótów	7
II. Wykaz wykorzystywanych publikacji	9
1. WSTĘP	10
1.1. Wprowadzenie	11
1.2. Budowa papierosa, skład i właściwości dymu tytoniowego i jego toksyczność	12
1.3. Palenie tytoniu a stres oksydacyjny	15
1.3.1. Znaczenie glutationu jako antyoksydanta	18
1.4. Ocena ekspozycji na dym tytoniowy	20
1.4.1. Kwestionariusz ankiety	20
1.4.2. Biomarkery narażenia na dym tytoniowy	21
1.4.2.1. Oznaczanie kotyniny w moczu jako biomarkera narażenia na dym tytoniowy	21
1.5. Homocysteina	24
1.5.1. Formy występowania homocysteiny w materiale biologicznym	25
1.5.2. Metabolizm homocysteiny	26
1.5.2.1. Rola kwasu foliowego w metabolizmie homocysteiny	27
1.5.2.2. Rola witaminy B ₆ w metabolizmie homocysteiny	30
1.5.3. Hiperhomocysteinemia jako wskaźnik zagrożenia zdrowia	31
1.5.3.1. Czynniki wpływające na stężenie homocysteiny	34
2. CEL PRACY	37
3. METODYKA BADAŃ	39
3.1. Badane grupy	40
3.2. Zakres badań	41
3.2.1. Oznaczanie stężenia kotyniny w moczu	41
3.2.1. Oznaczanie kreatyniny w moczu	43
3.2.3. Oznaczanie całkowitego stężenia homocysteiny i całkowitego stężenia glutationu w osoczu	44
3.2.4. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi	48
3.2.5. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego w osoczu	50

3.2.6. Oznaczanie stężenia kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu	52
3.2.7. Oznaczanie stężenia B ₆ jako sumy pirydoksalu i fosforanu 5'-pirydoksalu oraz kwasu 4-pirydoksynowego w osoczu	55
3.2.8. Obliczenia matematyczno-statystyczne	60
4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	62
4.1. Charakterystyka osób zakwalifikowanych do badań	63
4.2. Stężenie homocysteiny w osoczu	65
4.3. Korelacja pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu	67
4.4. Stężenie glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi oraz stosunek stężeń obu form glutationu	68
4.5. Korelacja pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi stosunkiem stężeń obu form a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu	73
4.6. Stężenie glutationu zredukowanego, utlenionego i całkowitego w osoczu	73
4.7. Korelacja pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego, utlenionego i całkowitego w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu	79
4.8. Stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu	79
4.9. Korelacja pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu	85
4.10. Korelacja pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu a stężeniem homocysteiny w osoczu	85
4.11. Stężenie pirydoksalu, fosforanu 5'-pirydoksalu i kwasu 4-pirydoksynowego w osoczu	90
4.12. Korelacja pomiędzy stężeniem pirydoksalu i fosforanu 5'-pirydoksalu w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu	90
4.13. Analiza czynnikowa	96
5. DYSKUSJA	98
5.1. Ocena narażenia na dym tytoniowy w oparciu o oznaczone stężenie kotyniny,	

stosunek stężeń kotynina/kreatynina oraz wywiad ankietowy	99
5.2. Wpływ palenia tytoniu na stężenie homocysteiny w osoczu	101
5.3. Wpływ palenia tytoniu na stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi i osoczu	102
5.4. Wpływ palenia tytoniu na stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu	104
5.5. Zależność pomiędzy kwasem foliowym a homocysteiną	105
5.6. Wpływ palenia tytoniu na stężenie witaminy B ₆ w osoczu	106
5.7. Wykorzystanie detekcji elektrochemicznej kulometrycznej w HPLC do oznaczeń tioli i witamin z grupy B prezentowanych w pracy	107
5.8. Ocena kondycji zdrowotnej respondentów biorących udział w badaniu	108
6. WNIOSKI	110
7. STRESZCZENIE	112
8. PIŚMIENNICTWO	115
III. ZAŁĄCZNIK – wzór ankiety	129

I. Wykaz skrótów

4-PA	- kwas 4-pirydoksynowy
5-MTHF	- kwas 5-metylotetrahydrofoliowy
AARS	- syntetaza aminoacylo-tRNA
AIDS	- zespół nabytego niedoboru odporności
ATP	- adenozynotrifosforan
BH ₂	- dihydrobiopteryna
BH ₄	- tetrahydrobiopteryna
BHMT	- metylotransferaza betaina:homocysteina
BSD	- boczny strumień dymu
bHcy	- związana homocysteina
C	- cytozyna
CBS	- β-syntaza cystationiny
CST	- γ-liaza cystationowa
CYP 2A6	- cytochrom P 450 izoforma 2A6
DAD	- detektor diodowy
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
EDTA	- sól disodowa kwasu etylenodiaminoczteroctowego
ETS	- środowiskowy dym tytoniowy
FDA	- Amerykańska Agencja ds. Leków i Żywności
fHcy	- wolna homocysteina
GSD	- główny strumień dymu
GSH	- glutation zredukowany
GSSG	- glutation utleniony
GSH/GSSG <i>ratio</i>	- stosunek stężeń glutationu zredukowanego do utlenionego
H ₂ O ₂	- nadtlenek wodoru
H ₄ PteGlu	- kwas tetrahydropteroiloglutarowy
Hcy-cys	- homocysteina-cysteina
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
IL-6	- interleukina 6
IUPAC	- Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
LDL	- lipoproteiny o małej gęstości
MAT	- adenozylotransferaza metioninowa

MTHFR	- reduktaza metylotetrahydrofolianowa
MS	- syntaza metioninowa
mGluR	- glutaminergiczne receptory metabotropowe
NADPH	- fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana
NMDA	- receptor N-metylo-D-asparginianu
NNK	- N'-nitrozonornikotyna
NNN	- 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-butanon
PL	- pirydoksal
PLP	- fosforan 5'-pirydoksalu
PM	- pirydoksamina
PN	- pirydoksyna
POChP	- przewlekła obturacyjna choroba płuc
PPi	- pirofosforan nieorganiczny
RDI	- referencyjne normy spożycia
RFT	- reaktywne formy tlenu
RNA	- kwas rybonukleinowy
RSD	- względne odchylenie standardowe
SAH	- S-adenozylhomocysteina
SAM	- S-adenozylometionina
SOD	- dysmutaza nadtlenkowa
SRNT	- <i>Society for Research on Nicotine and Tobacco</i>
T	- tymina
TCEP	- tris(2-karboksyetyl) fosfiny chlorowodorek
THF	- tetrahydrofolian
tGSH	- całkowity glutation
tHcys, tHcy	- całkowita homocysteina
t _R	- czas retencji
v/v	- stosunek objętościowo/objętościowy
WHO	- Światowa Organizacja Zdrowia
WWA	- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

II. Wykaz wykorzystywanych publikacji

1. Marszał M., Czarnowski W.: Wykorzystanie metody HPLC z detekcją elektrochemiczną do równoczesnego oznaczania glutationu i homocysteiny w materiale biologicznym. *Przegl. Lek.*, 2005; 62 (10): 1225.
2. Marszał M., Makarowski R., Czarnowski W.: Wpływ palenia tytoniu na poziom homocysteiny i glutationu w materiale biologicznym. *Przegl. Lek.*, 2006; 63 (10): 948.
3. Marszał M., Żbikowski R., Szyszko M., Czarnowski W.: Effect of cigarette smoking on the levels of cadmium, elenium, zinc, homocysteine and cotinine in humans. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2007; 16 (3a): 195.
4. Kowalski P., Marszał M., Olędzka I., Czarnowski W.: Comparative evaluation of CE and HPLC for determination of cotinine in human urine. *Chromatographia*, 2007; 66, 357.
5. Marszał M., Czarnowski W.: Ekspozycja na dym tytoniowy a poziom homocysteiny i kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego u osób palących i niepalących. *Przegl. Lek.*, 2007; praca zaakceptowana do druku.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Wielokierunkowe działanie substancji toksycznych i rakotwórczych oraz uzależniająca natura nikotyny zawartej w tytoniu i dymie tytoniowym sprawiają, że palenie papierosów uznawane jest za najważniejszy czynnik zagrożenia ludzkiej populacji, szczególnie w pierwszej połowie XXI wieku. Obecnie, według danych WHO, na świecie pali około 1/3 populacji osób dorosłych, to jest 1,1 miliarda ludzi. Szacuje się, że do 2025 roku liczba ta wzrośnie do 1,7 miliarda ludzi. Palenie tytoniu było przyczyną śmierci ponad 4,9 mln osób w 2000 roku; prognozuje się, że liczba ta wzrośnie do ponad 10 mln osób w 2020 roku, głównie w krajach rozwijających się [WHO, 2000].

W Polsce liczbę palaczy tytoniu ocenia się na 9,5 miliona. Regularnie pali w naszym kraju około 40% mężczyzn i 25% kobiet. Średnia liczba wypalanych codziennie papierosów przez uzależnionych od tytoniu dorosłych mężczyzn wynosi około 20; u kobiet wartość ta jest mniejsza i wynosi około 15 sztuk [Zatoński 2007]. Do palenia papierosów przyznaje się także 19,3% 15-letnich chłopców oraz 12,6% 15-letnich dziewcząt [Piekoszewski, Florek 2006]. Wśród kobiet ciężarnych odsetek aktywnie palących wynosi 24%, a eksponowanych biernie na dym tytoniowy 60% [Hanke 2002]. Toksyczne działanie składników dymu tytoniowego występuje u osób w każdym wieku, ale w okresie rozwoju jest ono szczególnie nasilone. Badania naukowe jednoznacznie wskazują na przyczynowy związek wymuszonego, biernego palenia małych dzieci, z nagłym zgonem noworodków, astmą, schorzeniami układu oddechowego i ucha środkowego [WHO 1999]. Także bierne narażenie na dym tytoniowy dorosłych jest przyczyną poważnego zagrożenia zdrowia. Szacuje się, że 60% małych dzieci i ponad 80% dorosłych, niepalących Polaków, jest eksponowanych na środowiskowy dym tytoniowy (ETS, *ang. Environment Tobacco Smoke*) [Zatoński 2001]. Żaden inny pojedynczy czynnik nie ma tak istotnego wpływu na zdrowie Polaków, jak tytoń. W konsekwencji obserwuje się narastanie epidemii chorób związanych z jego używaniem, takich jak nowotwory, choroby układu krążenia, nienowotworowe zaburzenia funkcjonowania układu oddechowego oraz wiele innych ostrych i przewlekłych stanów chorobowych.

Pomimo udowodnionej od lat szkodliwości palenia tytoniu, wzrastającej świadomości zdrowotnej społeczeństwa, wprowadzania zakazów palenia tytoniu w miejscach publicznych, propagowania przez różnych pracowników służby zdrowia zdrowego, wolnego od dymu stylu życia, postępu farmakologii w zakresie uzależnienia od nikotyny, problem palenia tytoniu nie zmniejsza się, a wprost przeciwnie, w wolnym tempie rośnie [Piekoszewski, Florek 2006]. Konieczne wydaje się podjęcie kompleksowych działań, zmierzających do

obniżenia częstości palenia tytoniu w naszej populacji. Jest to najskuteczniejsza droga do zahamowania i w konsekwencji obniżenia przedwczesnej umieralności w naszym kraju, w ciągu najbliższych dziesięcioleci.

W pracy zobiektywizowano intensywność ekspozycji na dym tytoniowy poprzez oznaczenie kotyniny w moczu u osób deklarujących palenie lub abstynencję w wywiadzie ankietowym. Oznaczono stężenie w osoczu krwi homocysteiny, która jest uznanym i niezależnym czynnikiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i naczyniowo-mózgowych [JAMA 2002]. Zbadano także wpływ palenia tytoniu na poziom kwasu foliowego i witaminy B₆, które pełnią rolę kofaktorów przemian homocysteiny do nietoksycznych tioli. Oznaczono stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego, który uczestniczy w ochronie komórek przed szkodliwym atakiem wolnych rodników, pochodzących z dymu tytoniowego.

1.2. Budowa papierosa, skład i właściwości dymu tytoniowego i jego toksyczność

Najbardziej popularnym w naszym kręgu kulturowym produktem tytoniowym jest papieros. Mniej popularnymi w Polsce wyrobami tytoniowymi lub metodami ich konsumpcji są: żucie tytoniu, tabaka mokra i sucha, fajka wodna, pałeczki (*ang. sticks, bidis, kreteks*), a także palenie cygar, uważanych za towar bardziej luksusowy [Piekoszewski, Florek 2006]. Papieros składa się z odpowiednio spreparowanych (między innymi w wyniku nawożenia, suszenia, fermentacji i maturacji) liści tytoniu (*łac. Nicotina tabaccum*), umieszczonych w rurce z cienkiej bibułki, z dodatkiem substancji konserwujących i poprawiających rynkową wartość produktu. W polskich warunkach klimatycznych uprawia się głównie tytonie ciemne, które charakteryzują się wyższą zawartością substancji smolistych i większą wrażliwością na zanieczyszczenia środowiska. Większość dostępnych papierosów wyposażonych jest w filtr, głównie węglowy lub acetatowo-węglowy. Substancje, które poprawiają cechy fizyczne papierosa, tak zwane sosy oraz substancje aromatyzujące, mają często nieznaną, nawet utajnioną przez producentów skład chemiczny. Obecnie dopuszczonych jest około 600 takich substancji chemicznych [Bates i in., 1999]. Dodatek specjalnych soli powoduje stałe tlenie się papierosa, dodatek amoniaku zmianę pH i uaktywnia nikotynę, dodatek cukru i lukrecji poprawia smak, a gliceryna dłużej zachowuje świeżość tytoniu. Liczni producenci dodatkowo wzbogacają swoje produkty nikotyną [Bates i in., 1999; Baker 2004 *a,b,c*].

Proces palenia papierosa przebiega w różnym zakresie temperatur. Temperatura stożka papierosa podczas zaciągania waha się w granicach 860 do 950 °C. W przerwach między zaciąganiem, w wyniku tlenia się papierosa, temperatura jest niższa o około 350 °C.

Zatem podczas palenia powstają dwa rodzaje strumienia dymu: główny strumień dymu (GSD), tworzący się w czasie zaciągania się palacza dymem oraz boczny strumień dymu (BSD), powstający w przerwach pomiędzy zaciąganiem. Osoby niepalące, przebywające w zamkniętych pomieszczeniach, narażone są zarówno na główny strumień dymu, wydychany przez palacza, jak i na boczny strumień, powstający w przerwach pomiędzy zaciąganiem, w wyniku tlenia się papierosa. Zjawisko to określa się mianem zanieczyszczenia środowiska dymem tytoniowym. W licznych badaniach wykazano, że stężenia substancji szkodliwych w bocznym strumieniu dymu są wielokrotnie wyższe, niż w tym, jaki wdycha palacz. Otaczające powietrze przyczynia się do ich późniejszego rozcieńczenia. Przykładem takich substancji jest: tlenek węgla (II), amoniak, lotne N-nitrozoaminy, benzen, aminy aromatyczne, nikotyna, kadm, formaldehyd i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Stąd wyniki wielu badań wskazują na poważne zagrożenia zdrowotne osób niepalących, stwarzane przez środowiskowy dym tytoniowy (ETS) [Bonita in., 1999; Kosecik i in., 2005; Whincup i in., 2004]. Również retrospektywne analizy badań epidemiologicznych potwierdzają wzrost ryzyka zachorowań na choroby sercowo-naczyniowe osób niepalących, ale ekspozowanych na środowiskowy dym tytoniowy [Barnoya i Glantz 2005; Law i Wald 2003].

Podczas palenia papierosa zachodzi wiele różnych procesów fizykochemicznych i chemicznych, takich jak destylacja, kondensacja, utlenianie, redukcja, dekarboksylacja, dehydratacja i piroliza. Procesy te odpowiadają za skład chemiczny dymu tytoniowego, również za jego właściwości toksyczne. Wchłanianie dymu tytoniowego zachodzi głównie w układzie oddechowym, także w przewodzie pokarmowym, jako rezultat pochłaniania wydzielin i śliny. Składniki dymu tytoniowego przenikają z pęcherzyków płucnych do krwiobiegu i są rozprzestrzeniane w całym organizmie. Stąd efekt toksyczny dymu obserwowany jest nie tylko w obrębie jamy ustnej i w płucach, ale we wszystkich narządach, na przykład w pęcherzu moczowym, żołądku, trzustce, narządach rodnych, naczyniach obwodowych, narządzie wzroku, w formującym się płodzie.

Następnie substancje toksyczne ulegają biotransformacji na wielu szlakach metabolicznych (utlenianie, redukcja, sprzęganie i inne). Skala toksyczności dymu tytoniowego jest ogromna, ponieważ w trakcie palenia każdego papierosa powstaje ponad 4000 związków chemicznych, w tym około 50 związków rakotwórczych. Do najważniejszych związków toksycznych, występujących w dymie tytoniowym, należą substancje drażniące, które uszkodzają błonę śluzową oskrzeli (tlenek azotu (II), aldehyd mrówkowy, cyjanowodór, kwasy karboksylowe, fenole i inne), substancje rakotwórcze (na przykład wielopierścieniowe węglowodory

aromatyczne (WWA) i N-nitrozoaminy), metale ciężkie (miedzy innymi nikiel, polon 210, ołów, kadm, które odkładają się w szpiku kostnym, śledzionie i nerkach, uszkadzają układ nerwowy człowieka, powodują występowanie anemii, zaburzenia snu, zmiany behawioralne), także nikotyna i jej pochodne, które działają uzależniająco, tlenek węgla (II), upośledzający transport tlenu przez hemoglobinę do tkanek oraz reaktywne formy tlenu (RFT), będące przyczyną wielu procesów patologicznych.

Toksyczność, w tym rakotwórczość wielu substancji zawartych w dymie tytoniowym, jak i w tytoniu, może być wzmocniona poprzez ich synergistyczne oddziaływanie na organizm człowieka, w powiązaniu z innymi substancjami o udowodnionym działaniu toksycznym i rakotwórczym, obecnymi w otoczeniu osób palących [Zatoński, 2007]. Biologiczne efekty toksycznego działania dymu tytoniowego oraz innych substancji toksycznych mogą się dodawać, wywołując efekt addytywny lub mogą się mnożyć, wywołując efekt multiplikatywny. Ma to miejsce w przypadku ryzyka zachorowania na raka płuca u osób palących i mających kontakt z pyłem azbestowym, jak również w przypadku zachorowań na raka krtani i spożywania dużych ilości wysokoprocentowych napojów alkoholowych [Roggli i Sanders, 2000; Zang i Wynder, 2001]. Palenie tytoniu związane jest także ze zwiększonym ryzykiem występowania ostrych incydentów naczyniowych, takich jak zawał serca i udar mózgu. Substancje chemiczne zawarte w dymie tytoniowym mają też kluczowe znaczenie w procesie rozwoju miażdżycy. Chemiczne produkty spalania papierosa wywołują dysfunkcję komórek śródbłonna, wyścielającego tętnice, są przyczyną oblepiania naczyń przez krwinki białe i stymulują zlepianie się płytek krwi i tworzenie zakrzepów [Bonetti i in., 2003]. Badania wykazują, że już u palących nastolatków obserwuje się uszkodzenie śródbłonna naczyń [Barnoya i Glantz 2005]. Miażdżycogenne działanie dymu tytoniowego uwidacznia się także w jego wpływie na stężenie homocysteiny, która jest niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych [JAMA 2002]. Palenie tytoniu jest także najważniejszą przyczyną przewlekłego zapalenia oskrzeli i przewlekłego zacinowania dróg oddechowych. Kaszel palacza, przewlekły nieżyt oskrzeli i rozedma płuc są ściśle związane z liczbą wypalanych papierosów. Ryzyko przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) jest 20 – 30 razy wyższe u osób regularnie i intensywnie palących, w porównaniu z niepalącymi. Prospektywne badania prowadzone przez lekarzy wielu krajów wykazują, że 80 – 90 % nowotworów złośliwych płuc występuje u palaczy tytoniu [Khuder 2001; Troughton i in., 2007]. Podobnie w Polsce nowotwór złośliwy płuca u niepalących mężczyzn jest rzadki.

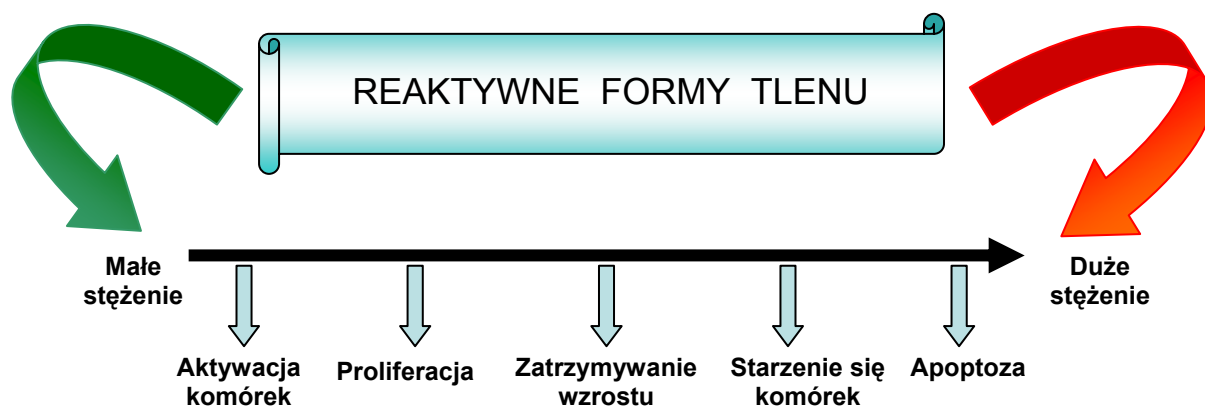
Należy również wspomnieć tutaj o bardzo niebezpiecznym zjawisku palenia tytoniu przez kobiety ciężarne. Palenie tytoniu i bierne narażenie na dym wpływa niekorzystnie na rozwój płodu i przebieg ciąży. Liczne badania dowodzą, że ksenobiotyki zawarte w dymie tytoniowym mogą powodować ograniczenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, w konsekwencji obniżenie masy urodzeniowej noworodków, także rozwój wad wrodzonych oraz występowanie zespołu nagłej śmierci niemowlęcia [Adamek i in., 2003; Florek i Marszałek 1999; Sajdak i in., 2005]. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat palenie tytoniu stało się najczęstszą przyczyną przedwczesnych zgonów w krajach rozwiniętych i wydaje się, że w ciągu najbliższych dziesięcioleci problem ten będzie dotyczył większości mniej rozwiniętych krajów świata. Rośnie bowiem ryzyko zgonów wśród mężczyzn w wielu 35-69 lat, a cały wzrost ryzyka zgonu jest powodowany wzrostem ryzyka zachorowań na choroby odytoniowe.

1.3. Palenie tytoniu a stres oksydacyjny

Wolne rodniki pełnią istotną rolę w regulowaniu metabolizmu komórkowego jako przekaźniki sygnału, odpowiadające także za niektóre procesy fizjologiczne, takie jak starzenie się komórek i ich śmierć (ryc 1). Dla każdego układu, rozumianego jako komórka, narząd czy organizm, optymalnym rozwiązaniem jest wytworzenie stanu równowagi pomiędzy szybkością produkowania reaktywnych form tlenu (RFT) a potencjałem przeciwutleniającym, który ogranicza ich działanie do funkcji fizjologicznych, chroniąc w ten sposób komórki przed destrukcją [Duda-Chodak, Tuszyński 2007]. Naruszenie tej równowagi na korzyść reaktywnych form tlenu określono mianem stresu oksydacyjnego i uznano za przyczynę licznych zmian chorobowych i stanów patologicznych.

Funkcje ochronne w stosunku do negatywnych skutków działania RFT w organizmie spełniają: niskocząsteczkowe antyoksydanty hydrofilowe, do których zalicza się glutation, askorbinian i kwas moczowy oraz niskocząsteczkowe antyoksydanty hydrofobowe, do których należą α i γ -tokoferol, flawonoidy, karotenoidy, bilirubina, koenzym Q10, cholesterol, witamina i prowitamina D₃. Podobne znaczenie mają enzymy, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, a także białka, na przykład tioredoksyna, ceruloplazmina, metalotioneina. Wspierają je ponadto enzymy utrzymujące niskocząsteczkowe antyoksydanty w formie zredukowanej, takie jak reduktaza glutationowa, reduktaza tioredoksyny oraz układ dostarczający fosforan dinukleotydu

nikotynamidoadeninowego (NADPH), który jest niezbędny w cyklu redoks glutationu [Bartosz 2003].

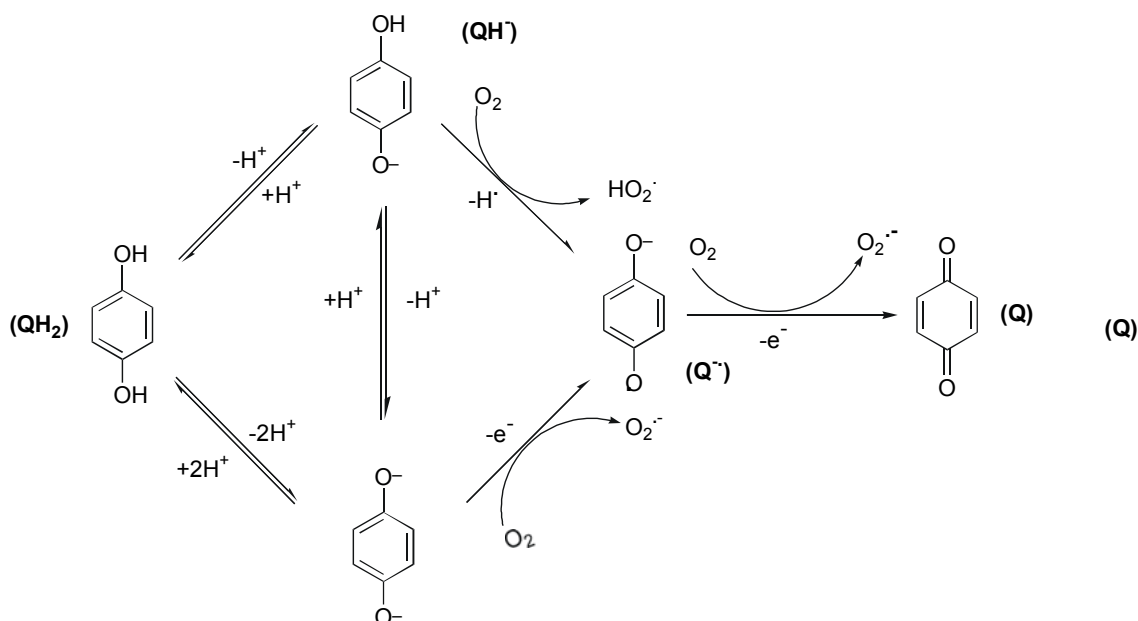


Rycina 1. Zależności pomiędzy ilością reaktywnych form tlenu a ich oddziaływaniem na komórki.

Na skutek podaży reaktywnych form tlenu, pochodzących z dymu tytoniowego, może dojść do wystąpienia stresu oksydacyjnego, który zainicjuje zmiany patologiczne organizmu. Wieloletnie badania amerykańskiego zespołu naukowców pod przewodnictwem Pryor'a dowiodły istnienia wielu reaktywnych form tlenu fazy gazowej i frakcji smolistej dymu tytoniowego [Church i Pryor 1985; Pryor 1992; Zang i in., 1995; Pryor i in., 1998]. Większość rodników frakcji smolistej dymu stanowią rodniki semichinonowe ($QH^{\bullet}$), które pozostają w równowadze z rodnikami chinonowymi (Q) i hydrochinonowymi (QH_2), co pokazano na rycinie 2. W doświadczeniu Zang'a i wsp., analogicznie do warunków panujących w płucach, nasycano powietrzem wodny ekstrakt dymu tytoniowego. Wykazano, że substancje zawarte we frakcji smolistej ulegają procesowi autooksydacji [Zang i wsp. 1995].

W fazie gazowej dymu tytoniowego przeważają rodniki, których cechą charakterystyczną jest krótki czas przeżycia, zwykle nie przekraczający 5 minut. Należą do nich proste rodniki tlenowe, takie jak rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$) oraz rodnik wodoronadtlenkowy ($HO_2^{\bullet}$), a także nie będący rodnikiem H_2O_2 . Nadtlenek wodoru, ze względu na możliwość utleniania jonów metali przejściowych, jest prekursorem powstawania reaktywnego rodnika hydroksylowego. Z biologicznego punktu widzenia, niebezpieczeństwem związanym z obecnością nadadtlenku wodoru jest możliwość utleniania grup tiolowych białek i związków niskocząsteczkowych.

Stąd, w warunkach fizjologicznych, aktywność katalazy i peroksydazy glutationowej utrzymuje nadtlenek wodoru w bardzo niskich stężeniach [Włodek 2003].



Rycina 2. Powstawanie rodników semichinonowych i wodorotlenowych powstających w wyniku autooksydacji hydrochinonu, na podstawie doświadczenia Zanga i wsp. [Zang i in., 1995].

Proste rodniki tlenowe fazy gazowej wchodzą w reakcje z węglowodorami, znajdującymi się w dymie, tworząc rodniki alkilowe (R[•]) oraz alkoksylowe (RO[•]). Uwagę badaczy zwraca również obecność w dymie tlenu azotu (II), który nie należy do rodników wysoko reaktywnych, a którego źródłem są aminy oraz nadtlenoazotan (III) (O=N-OO[•]) [Wooten i in., 2006]. Należy tutaj podkreślić, że jego małe stężenia powodują zwykle przerwanie wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W większych stężeniach tworzy on niebezpieczne rodniki nadtlennkowe i alkoksylowe. Zgodnie z mechanizmem proponowanym przez zespół Pryor'ea NO₂[•] ulega szybkiej reakcji w obecności izoprenu i butadienu, tworząc bardzo reaktywne nitrozowęglowe rodniki alkilowe (RCH[•]-CH₂NO₂) [Pryor i in., 1998]. Ciekawa jest także reakcja rodnika NO[•] z anionorodnikiem ponadtlenkowym, prowadząca do powstawania bardzo niebezpiecznych nadtlenoazotynów (ONOO[•]) [Denicola i Radi 2005; Reiter i in., 2000]. Mogą one uszkadzać bezpośrednio mitochondria komórek, prowadząc do braku produkcji odpowiedniej ilości energii, a z kolei niski poziom adenozynotrifosforanu (ATP) wywiera bezpośredni wpływ na biosyntezę glutationu. W wyniku hemolitycznego rozpadu kwasu nadtlenoazotawego dochodzi do uwalniania się rodnika hydroksylowego (HO[•]), zdolnego do utlenienia związków tiolowych, z utworzeniem rodników tyliowych (RS[•]). Dalej rodniki

tiylowe, w reakcjach z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, mogą ulegać bezpośredniej addycji do wiązań podwójnych, czego efektem mogą być zmiany w upakowaniu i gęstości dwuwarstwowej lipidowej błony komórkowej [Sprinz i in., 2000].

Jak podkreśla Sobczak, organizm osoby palącej może reagować na dym tytoniowy wytworzeniem mechanizmów adaptacyjnych, chroniących przed skutkami toksycznego działania dymu. Broniąc się przed działaniem reaktywnych form tlenu, organizm uwalnia większą ilość antyoksydantów, które niwelują utleniające właściwości RFT [Sobczak 2005b].

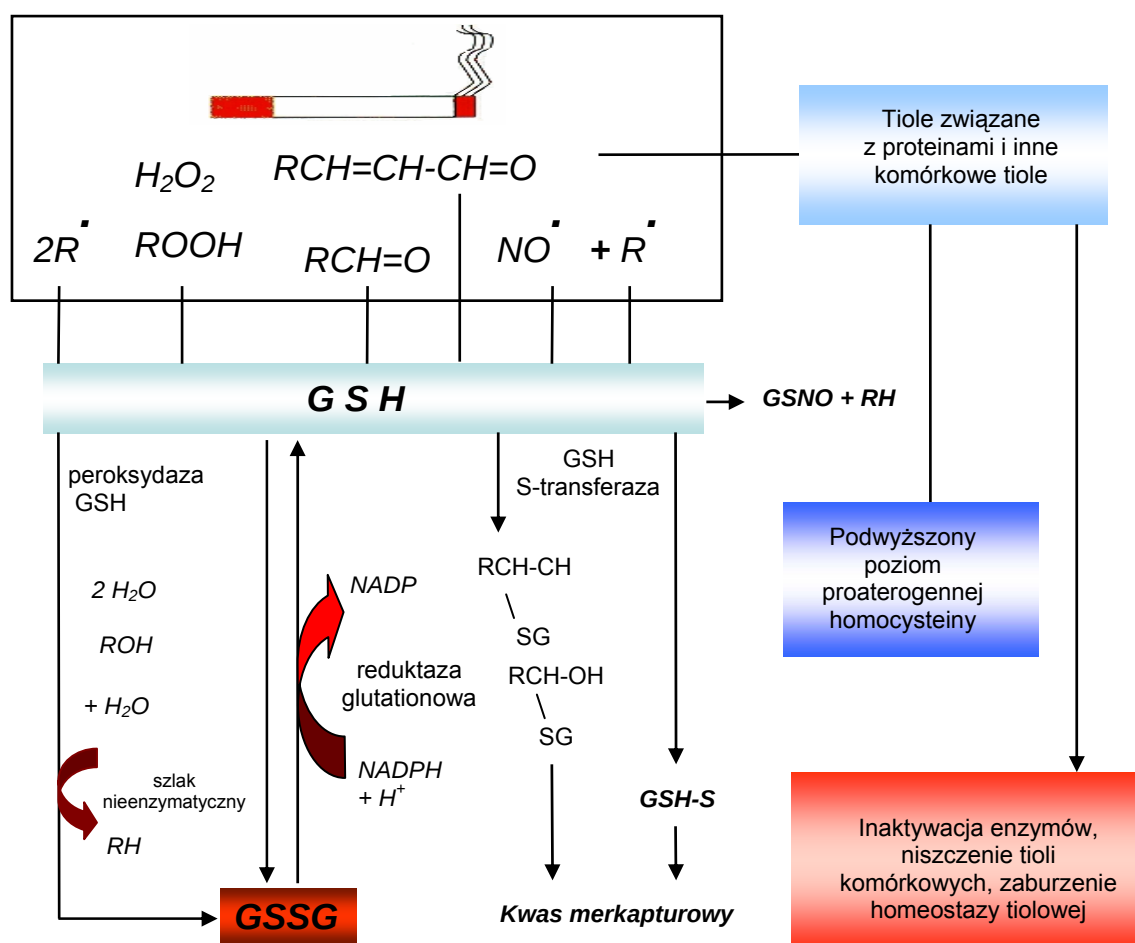
1.3.1. Znaczenie glutationu jako antyoksydanta

Glutation jest powszechnie występującym tripeptydem, zbudowanym z trzech aminokwasów: kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Między grupą aminową cysteiny i grupą γ -karboksylową glutaminianu posiada nietypowe wiązanie izopeptydowe. Biologiczne funkcje glutationu są związane z aktywnością grupy sulfhydrylowej (-SH), dzięki którym utrzymuje on białka komórek w postaci zredukowanej. Jako antyoksydant może reagować nieenzymatycznie z rodnikiem hydroksylowym, który jest cytotoksycznym produktem biologicznej reakcji Fentona, jak również z NO_3^- , ONOO^- , O_2 i $\text{O}_2^{\cdot -}$ [Sies 1999]. Z udziałem enzymu peroksydazy glutationowej i przy współudziale reduktazy glutationowej, odgrywa istotną rolę w detoksykacji nadtlenu wodoru i nadtlenu organicznych, powstałych wskutek peroksydacji lipidów. Centrum aktywne peroksydazy glutationowej zawiera selenowy analog cysteiny, dzięki któremu możliwe jest dwukierunkowe utlenianie glutationu do disulfidu (GSSG). W tej reakcji nie uwalniania się bardzo niebezpieczny rodnik tiylowy ($\text{GS}^{\cdot}$). Reduktaza glutationowa odgrywa tutaj szczególną rolę dlatego, że od jej aktywności zależy ścisła kontrola stosunku stężeń GSH/GSSG i potencjału redoks komórek.

Funkcje peroksydazy glutationowej są szczególnie ważne w mitochondriach komórek, gdzie nie występuje aktywność katalaz, które, niezależnie od glutationu, mogą redukować powstający nadtlenek wodoru. Stąd mitochondrialny GSH odgrywa największą rolę w obronie przed powstającymi w czasie stresu oksydacyjnego wolnymi rodnikami [Esposito i in., 1999]. Antyoksydacyjna rola glutationu polega także na możliwości reagowania z wolnymi rodnikami organicznymi białek, co pozwala na regenerację uszkodzonych cząsteczek [Włodek 2003]. Glutation może uczestniczyć na drodze nieenzymatycznej, jak i z pomocą transhydrogenazy glutationowej, w redukcji mostków disulfidowych w białkach.

Silny stres oksydacyjny i nitrozylujący, jaki powstaje wskutek palenia tytoniu, może skutecznie obniżać poziom GSH w komórkach (ryc. 3). Dlatego przy nasilonych

uszkodzeniach rodnikowych oraz niedoborze NADPH, może następować akumulacja formy disulfidowej glutationu.



Rycina 3. Wpływ palenia tytoniu na homeostazę tiolową (na podstawie Wooten i in., 2006).

Podwyższony poziom GSSG prowadzi do powstawania mieszanych disiarczków, na przykład z cysteiną i może także być przyczyną glutatiolacji białek, co wywołuje zmiany w statusie redokсовym tioli [Klatt i Lamas 2000]. Zgodnie z hipotezą Winterbourn, aby działanie glutationu jako antyoksydanta było pełne, potrzebna jest jego ścisła kooperacja z dysmutazą ponadtlenkową (SOD). SOD inaktywuje bowiem anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) do nadtlenku wodoru i tlenu [Winterbourn 1995].

W badaniach Lenton'a i wsp. wykazano, że glutation może współdziałać z innymi komórkowymi antyoksydantami, takimi jak askorbinian, na drodze zarówno enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej [Lenton i in., 1999].

Specyficzne właściwości glutationu sprawiają, że odgrywa on zasadniczą rolę w utrzymaniu fizjologicznej równowagi pomiędzy pro- i antyoksydantami, uczestnicząc we wszystkich etapach obrony komórkowej przed stresem oksydacyjnym [Bartosz 2003].

1.4. Ocena ekspozycji na dym tytoniowy

Monitorowanie ryzyka wystąpienia chorób odtytoniowych musi być związane ze śledzeniem i oceną wielkości narażenia na dym tytoniowy, zarówno wśród czynnych palaczy, jak i u osób niepalących, ale narażonych na środowiskowy dym tytoniowy. Ograniczeniem metod opartych tylko na kwestionariuszach ankiet jest subiektywny, nie zawsze szczerzy charakter oceny. Aby zobiektywizować proces diagnostyczny, a tym samym uwiarygodnić ocenę ekspozycji, wykonuje się pomiary biomarkerów narażenia na dym tytoniowy w materiale biologicznym.

1.4.1. Kwestionariusz ankiet

Wywiad ankietowy jest najprostszym źródłem pozyskiwania informacji o nałogu i nawykach palenia tytoniu. Wnioski wyciągane są tu na podstawie samooceny badanego. Dlatego w pomiarach narażenia na palenie tytoniu w badaniach doświadczalnych, opartych wyłącznie na ocenie ankietowej, może pojawić się wiele nieprawidłowości wynikających z ograniczonej ilości, bądź niedokładnie sformułowanych pytań, błędów w ocenie konsumpcji tytoniu przez osoby przebywające w najbliższym otoczeniu, nie zwracania uwagi na ekspozycję, zatajenia niektórych informacji. Odpowiednie przygotowanie i przeprowadzanie badań ankietowych może w znacznym stopniu zminimalizować możliwość wystąpienia błędów. Światowa Organizacja Zdrowia proponuje klasyfikację osób palących na codziennych palaczy, okazjonalnych codziennych palaczy, byłych codziennych palaczy i osoby nigdy nie palące [WHO 1999b]. W celu lepszego zdiagnozowania, czy w związku z paleniem nie występują określone problemy zdrowotne oraz dokonania wstępnej klasyfikacji do pomiaru uzależnienia od tytoniu, ważne jest określenie wielkości ekspozycji i historii palenia tytoniu przez osobę poddawaną badaniu ankietowemu. Aby zobiektywizować proces diagnostyczny, a przez to uwiarygodnić ocenę ekspozycji, stosuje się najczęściej metody laboratoryjne oznaczenia biologicznych markerów narażenia na dym tytoniowy.

1.4.2. Biomarkery narażenia na dym tytoniowy

Markery narażenia na dym tytoniowy powinny charakteryzować się specyficznością dla środowiskowego dymu tytoniowego, łatwością oznaczenia, możliwością zastosowania dla różnych produktów tytoniowych oraz stałym stosunkiem do innych interesujących składników ETS. O ich przydatności decyduje dokładność pomiaru analitycznego w danym materiale biologicznym, umożliwiającą ocenę ilości pobranego przez organizm związku chemicznego, zawartego w dymie. Poważnym ograniczeniem większości biomarkerów jest to, że pozwalają one oceniać narażenie w stosunkowo krótkim czasie, od kilku godzin do kilkunastu tygodni. Stąd w ocenie zagrożenia danej osoby na ETS wiele badań epidemiologicznych bazuje na ankietach i wywiadach, poszerzonych o oznaczenia biomarkerów [Piekoszewski, Florek 2001].

Markerami dymu tytoniowego mogą być zarówno niektóre jego składniki, jak i powstające w ustroju metabolity poszczególnych jego składników. Do składników dymu, które pełnią rolę markerów, zalicza się metabolity wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (najczęściej oznaczane to: 1-hydroksypiren, hydroksyfenantreny i hydroksynaftaleny), N-nitrozoaminy (najczęściej oznaczane to: N'-nitrozonornikotyna (NNN), 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-butanon (NNK)), kwas trans, trans-mukonowy (tt-MA), kwas S-fenylomerkapturowy oraz addukty 4-aminobifenylu z hemoglobina. Wymienione wyżej związki są stosowane do oceny zagrożenia procesem nowotworzenia wśród czynnych palaczy tytoniu. Główną wadą tych związków jest mała specyficzność, brak możliwości ich wykorzystywania w monitoringu osób biernie narażonych na dym tytoniowy oraz bardzo zaawansowane technicznie metody analityczne. Z praktycznego punktu widzenia, do monitorowania narażenia biernych i czynnych palaczy przydatne jest badanie laboratoryjne stężenia nikotyny i jej metabolitów (kotyniny i trans 3'-hydroksykotyniny), wydychanego przez palaczy tlenu węgla (II), karboksyhemoglobiny i tiocyjanidów. Charakterystykę wybranych biomarkerów, na podstawie publikacji Sobczaka i wsp. oraz Piekoszewskiego i Florek przedstawiono w tabeli 1 [Sobczak i in., 2005 B; Piekoszewski, Florek 2001].

1.4.2.1 Oznaczanie kotyniny w moczu jako biomarkera narażenia na dym tytoniowy

Kotynina, obok trans-3'hydroksykotyniny oraz tlenków nikotyny i kotyniny, jest głównym metabolitem nikotyny [Tricker 2003]. Metabolizm nikotyny jest zależny zarówno od cech osobniczych palacza, zachowań w czasie trwania nałogu, zdolności

detoksykacyjnych, trybu życia, stosowanej diety, jak i polimorfizmu genów kodujących enzymy, które uczestniczą w procesie jej biotransformacji [Benowitz i in., 2003; Dempsey i in. 2000; Hatsukami i in., 1997; Patterson i in., 2003]. Nikotyna jest metabolizowana przy współudziale cytochromu P-450 izoformy 2A6 do kotyniny, a następnie do trans-3'-hydroksykotyniny. Polimorfizm genu CYP 2A6 może prowadzić do utraty aktywności enzymu i wpływać w konsekwencji na metabolizm nikotyny. Według ostatnich doniesień aktywność CYP 2A6 może odzwierciedlać oznaczanie w moczu stosunku stężeń trans-3'-hydroksykotyniny do kotyniny [Trypień i in., 2000 i 2006; Dempsey i in., 2004].

Jak podano w tabeli 1, kotynina oraz nikotyna mogą być oznaczane w podobnych materiałach biologicznych: krwi, moczu, ślinie, mleku matek karmiących oraz we włosach. Kotynina, w odróżnieniu od nikotyny, charakteryzuje się jednak znacznie dłuższym czasem półtrwania, wynoszącym średnio 16 – 20 godzin [Benowitz 1996; Benowitz i in., 2003; Hatsukami i in., 1997]. Jest to bardzo ważna cecha, która preferuje kotyninę przy wyborze biomarkera narażenia na dym tytoniowy. W wielu badaniach potwierdzono dobrą korelację pomiędzy stężeniem kotyniny w płynach ustrojowych, a ilością nikotyny wypalaną przez palaczy, jak również utrzymywanie się stężenia kotyniny na tym samym poziomie w materiale biologicznym przy jednoczesnym zmniejszaniu się stężenia nikotyny po okresie narażenia na ETS [Ebbert i in., 2004; Ghosheh i in., 2000; Jauniaux i in., 1999; Song i in., 2005]. Dodatkowo warto podkreślić, że komisja ekspertów, powołana w ramach *Society for Research on Nicotine and Tobacco*, uznaje pomiar stężenia kotyniny w surowicy lub moczu za najlepszą metodę w ocenie narażenia na środowiskowy dym tytoniowy [SRNT, 2002].

Również, z uwagi na nieinwazyjne pobranie próbki, mocz wydaje się być najbardziej uniwersalnym materiałem do badania, w którym stężenie głównego metabolitu nikotyny jest 5 - 6 razy wyższe, niż w surowicy lub ślinie. Wyższe stężenia kotyniny w moczu pozwalają na zastosowanie selektywnych i, co należy podkreślić, znacznie prostszych i bardziej uniwersalnych metod analitycznych, niż przy oznaczeniach tego samego metabolitu w innych materiałach, na przykład we włosach. Wydalanie kotyniny z moczem zależy od sprawności funkcjonowania nerek i pH moczu [Piekoszewski, Florek 2001]. Także, jak podkreślają Wiergowski i wsp., w aspekcie badań toksykologicznych nie bez znaczenia pozostaje możliwość zafałszowania próbki przed pobraniem poprzez jej rozcieńczenie lub zagęszczenie [Wiergowski i in., 2006]. Stąd, dla prawidłowej interpretacji wyników pomiarów, preferuje się oznaczenie i przeliczenie stężenia analitów względem zawartości kreatyniny w moczu [Heavner i in., 2006; Sobczak i in., 2004, 2005c; SRNT 2002].

Tabela 1. Charakterystyka wybranych biomarkerów narażenia na dym tytoniowy [Sobczak i in., 2005b; Piekoszewski, Florek 2001].

Biomarker	Materiał do badań	Prekursor w dymie	Specyficzność	Czułość	Okres oceny narażenia	Ograniczenia
Tiocyjaniany	krew, mocz, ślina	cyjanowodór	mała	mała	kilka tygodni	niespecyficzny dla dymu tytoniowego, źródła egzogenne (pożywienie, bakterie okrężnicy)
Karboksyhemoglobina	krew	tlenek węgla (II)	mała	mała	kilka godzin	krótki okres półtrwania, niespecyficzny dla dymu tytoniowego, źródła egzogenne i endogenne
Tlenek węgla	wydychane powietrze	tlenek węgla (II)	mała	mała	kilka godzin	niespecyficzny dla dymu tytoniowego, źródła egzogenne i endogenne
Nikotyna	krew, mocz, ślina, włosy	nikotyna	duża	duża	kilka godzin	krótki okres półtrwania we krwi, wydalanie z moczem zależy od jego ilości i pH
Kotynina	krew, mocz, ślina, smółka, włosy	nikotyna	duża	duża	do 3 dni	wydalanie z moczem zależy od jego ilości i pH, międzyosobnicze różnice w metabolizmie nikotyny
Trans-3'-hydroksykotynina	krew, mocz	nikotyna	duża	duża	do 3 dni	wydalanie z moczem zależy od jego ilości i pH, międzyosobnicze różnice w metabolizmie nikotyny

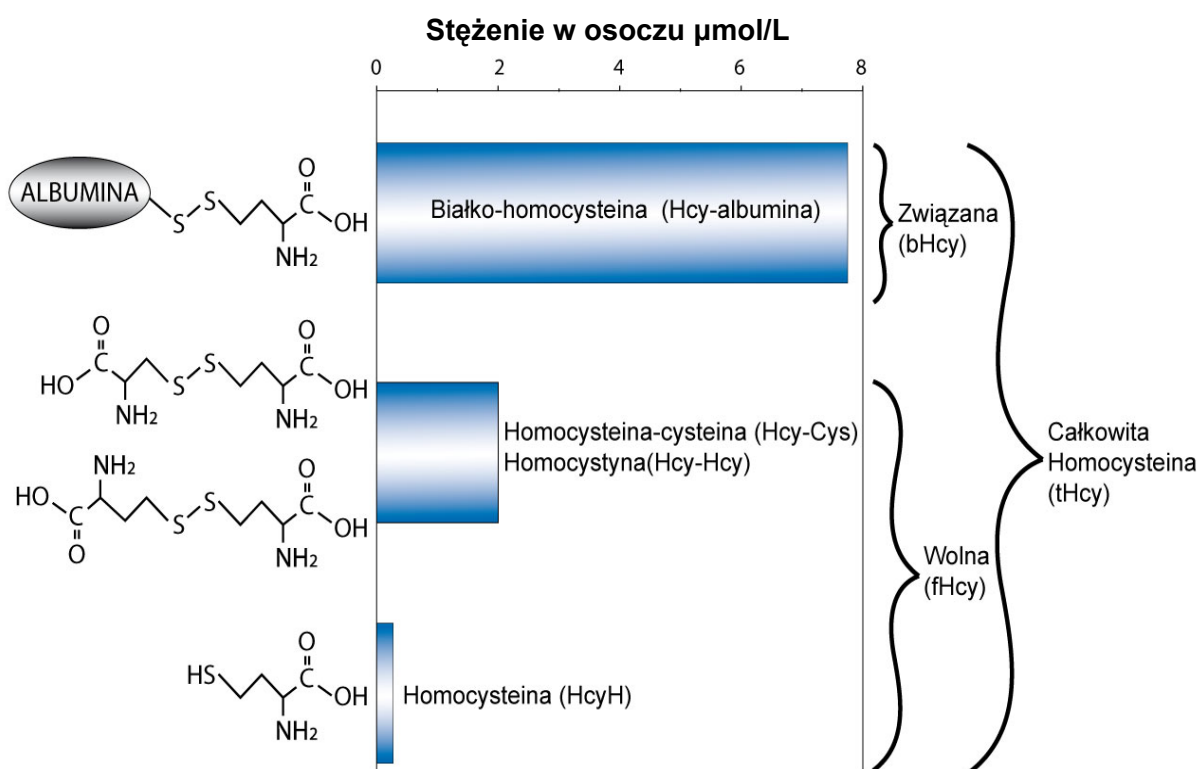
1.5. Homocysteina

Homocysteina jest jednym z trzech podstawowych, obok glutationu i cysteiny, niskocząsteczkowych tioli, który został odkryty przypadkowo podczas pracy nad siarczanem insuliny przez Butz i du Vigneaud w 1932 roku [Finkelstein i Martin 2000]. Powstaje w organizmie z metioniny, będącej składnikiem białek pochodzenia zwierzęcego, dostarczanych z pożywieniem. Homocysteina nie jest obecna w naturalnie występujących proteinach ludzkich, ponieważ w kodzie genetycznym człowieka brak jest dla niej kodonu [Bald 2003]. Odpowiednią dietą, ograniczeniem palenia tytoniu i dbałością o optymalny poziom aktywności fizycznej można modyfikować poziom tego aminokwasu we krwi.

W latach 60-tych XX wieku pojawiły się pierwsze doniesienia naukowe o homocysteine, oznaczonej w moczu dzieci upośledzonych w rozwoju umysłowym. Następnie, w 1964 roku, Muld i wsp. opisał brak enzymu β -syntazy cystationiny, który odpowiada za przemianę homocysteiny do cysteiny, a którego kofaktorem jest witamina B₆ [Bolander-Gouaille i Bottiglieri 2003]. Były to pierwsze doniesienia, które łączyły wysoki poziom homocysteiny (hiperhomocysteinemię) z tematyką dotyczącą witamin z grupy B. Przełomową pracą nad badaniem wpływu podwyższonego poziomu homocysteiny na organizm człowieka była publikacja Klimera McCully, w której autor opisał szkodliwe działanie homocysteiny na naczynia krwionośne [Larkin 1998]. Wysunął on hipotezę, że skoro wysokie stężenie homocysteiny powoduje duże nasilenie zmian miażdżycowych, prowadzące często do śmierci w młodym wieku, to umiarkowanie podwyższone jej stężenie może prowadzić do mniejszych zmian, często klinicznie niezauważalnych. Teorię tę potwierdzają liczne późniejsze badania epidemiologiczne, prowadzone na dużą skalę dopiero w latach 90-tych XX wieku, po wprowadzeniu rutynowych i prostszych metod analitycznych oznaczania homocysteiny w osoczu i moczu. Zdecydowana większość badań potwierdza związek pomiędzy hiperhomocysteinemią i miażdżycą. Obecnie homocysteina, która została okrzyknięta mianem cholesterolu XXI wieku, jest uznanym czynnikiem ryzyka, nie tylko chorób sercowo-naczyniowych, ale również komplikacji ciążowych, wad rozwojowych płodu spowodowanych uszkodzeniem cewy nerwowej, chorób neurodegeneracyjnych (między innymi choroby Alzheimera i Parkinsona) oraz rozwoju nowotworów, głównie raka jelita grubego i nowotworów indukowanych przez estrogeny.

1.5.1. Formy występowania homocysteiny w materiale biologicznym

W warunkach *in vivo* homocysteina występuje w formie utlenionej i zredukowanej. Forma zredukowana stanowi około 1,5 % całkowitej puli. Do form utlenionych zalicza się homocysteinę związaną z proteinami (około 70 %), disiarczki homocysteiny z cysteiną i z homocysteiną (homocystyna) [Refsum i in., 2004]. Formy występowania homocysteiny wraz z obowiązującym nazewnictwem przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Formy występowania homocysteiny w osoczu wraz z obowiązującym nazewnictwem, na podstawie publikacji Refsum i wsp. 2004.

Stężenie zredukowanej formy homocysteiny u zdrowego człowieka jest niskie, ale rośnie wraz ze wzrostem homocysteiny całkowitej, co wpływa na status redoks innych tioli w osoczu [Ueland 1995]. Zmiany statusu redoks skutkują zmianami dostępności reszt tiolowych w proteinach i enzymach na drodze reakcji wymiany tiol-disiarczek. Badania zespołu Mansoor i wsp. wykazały istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy stosunkiem ilości zredukowanej do całkowitej homocysteiny i zredukowanej do całkowitej cysteiny [Mansoor i in., 1992].

Wymienione na rycinie 4 frakcje homocysteiny – całkowita homocysteina (*tHcys* – *ang. total plasma homocysteine*) - są integralną częścią antyoksydacyjnego systemu obronnego, połączonego z wewnątrzkomórkowym statusem redoks tioli, będących w ciągłej równowadze dynamicznej [Mansoor i in., 1992]. Obecnie przyjmuje się, że całkowite stężenie homocysteiny w osoczu krwi dorosłego, zdrowego człowieka, pobranej na czczo, powinno mieścić się w granicach 5 – 15 $\mu\text{mol/l}$ [Refsum i in., 2004].

1.5.2. Metabolizm homocysteiny

Homocysteina jest produktem demetylacji metioniny - aminokwasu, którego jedynym źródłem jest pożywienie (rycina 5). Jest metabolizowana w dwóch głównych szlakach przemian: remetylacji do metioniny oraz transulfuracji do cystationiny, a następnie do cysteiny [Mayer i in., 1996]. W obecności adenozynotrifosforanu (ATP) oraz adenozylotransferazy metioninowej (MAT), metionina ulega przekształceniu w S-adenozynometioninę (SAM). SAM jest donorem grupy metylowej, a produktem ubocznym, powstałym w wyniku jej przemian, jest S-adenozylhomocysteina (SAH), która jest hydrolizowana do homocysteiny [Melnik i in., 2000].

W przypadku niedoboru metioniny lub niskiego stężenia SAM, homocysteina ulega remetylacji, z udziałem enzymu syntazy metioninowej (MS). Donorem grupy metylowej jest w tym przypadku 5-metylotetrahydrofolian, powstający w reakcji katalizowanej przez reduktazę metyloctetrahydrofolianową (MTHFR), a kofaktorem przemian jest witamina B₁₂.

Inna droga, o mniejszym znaczeniu, prowadząca do remetylacji, przebiega przy współudziale metyloctetrahydrofolianu : homocysteina (BHMT), w której dawcą grupy metylowej jest betaina. Produktami tej reakcji jest metionina oraz N,N-dimetyloglicyna [Yagisawa i in., 2006].

Drugi kierunek przemian homocysteiny nazywa się transulfuracją i zachodzi przy dodatnim bilansie metioniny. Pierwszy etap tego procesu katalizowany jest przez β -syntazę cystationową z udziałem fosforanu 5'-pirydoksalu jako kofaktora. Homocysteina ulega wówczas konwersji do cystationiny, a ta przy udziale γ -liazy cystationowej i w obecności tej samej witaminy B₆, ulega przekształceniu do cysteiny [Sassi i in., 2002]. Cysteina bierze udział w syntezie glutationu lub jest katabolizowana do innych siarkowych aminokwasów, na przykład tauryny lub do siarczanów [Rasmussen i Møller 2000].

Dzięki wysokiemu stężeniu glutationu zredukowanego, homocysteina wewnątrz komórek występuje głównie w formie zredukowanej. Jeżeli ilość produkowanej homocysteiny przekracza pojemność metaboliczną komórki, to jej nadmiar jest eksportowany do przestrzeni pozakomórkowej [Bald 2003]. W osoczu ulega ona utlenianiu do disiarczków mieszanych, wolnej homocysteiny lub cyklizacji do tiolaktonu [Jakubowski 2000].

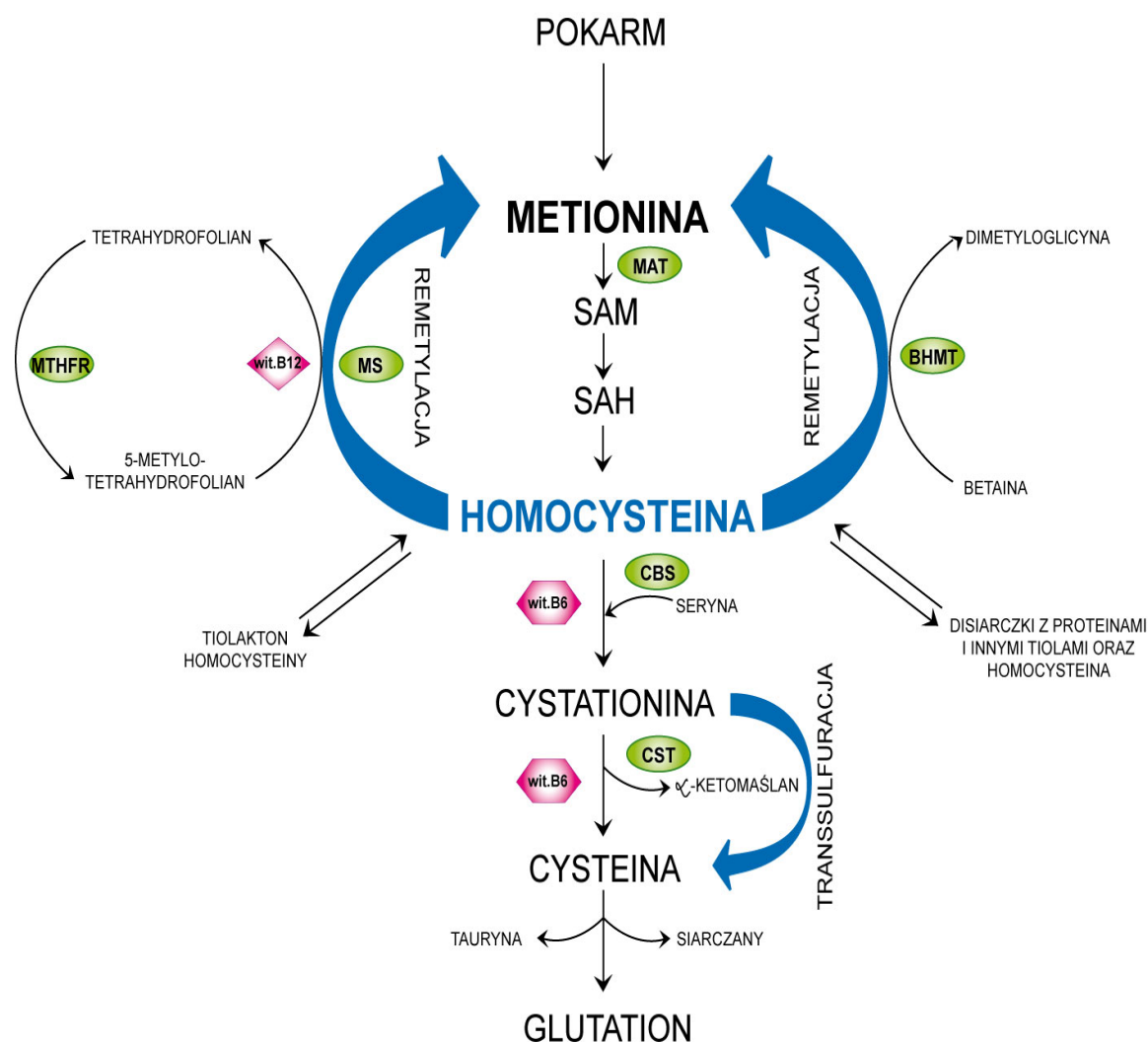
Tiolakton homocysteiny w warunkach fizjologicznych powstaje przy udziale syntetazy aminoacylo-tRNA (AARS) i ATP, z uwolnieniem pirofosforanu (PPi). Tiolakton posiada zdolność acylowania wolnych grup aminowych białek, wskutek czego tracą one swoją biologiczną aktywność [Jakubowski 2000].

1.5.2.1. Rola kwasu foliowego w metabolizmie homocysteiny

Koenzymatycznymi formami kwasu foliowego w ludzkim organizmie są jego tetrahydropochodne. Kwas tetrahydropteroilloglutarowy – $H_4PteGlu$ – inaczej zwany kwasem tetrahydrofoliowym, jest centralnym metabolitem na szlaku przemian kwasu foliowego. Przyjmuje on grupę metylową i przenosi na kolejne akceptory [Quinlivan i in., 2006]. Dawcą grupy metylowej dla homocysteiny, na szlaku jej remetylacji do metioniny, jest kwas 5-metylotetrahydrofoliowy (5-MTHF) (ryc. 6). Metylokobalamina (witamina B_{12}) pośredniczy w tej przemianie, a w przypadku jej niedoboru następuje deficyt kwasu tetrahydrofoliowego (THF), czego rezultatem jest naruszenie syntezy puryn, kwasów nukleinowych i podziału komórek.

Należy tutaj podkreślić, że ta droga przemian homocysteiny jest jedyną możliwą w komórkach śródbłonna tętnic, co tłumaczy niezbędnosć kwasu foliowego dla prawidłowego funkcjonowania naczyń krwionośnych. Foliany w ścianach tętnic są nie tylko donorami grup metylowych dla homocysteiny, ale także donorami wodoru i elektronów, niezbędnych dla procesu redukcji dihydrobiopteryny (BH_2) do tetrahydrobiopteryny (BH_4) [Vasquez-Vivar i in., 2002]. BH_4 jest kofaktorem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, która wytwarza rozszerzający naczynia tlenek azotu. Kwas foliowy w remetylacji homocysteiny jest zużywany ilościowo, jednak przy niedostatecznej jego podaży, jest wykorzystywany tylko do redukcji BH_2 .

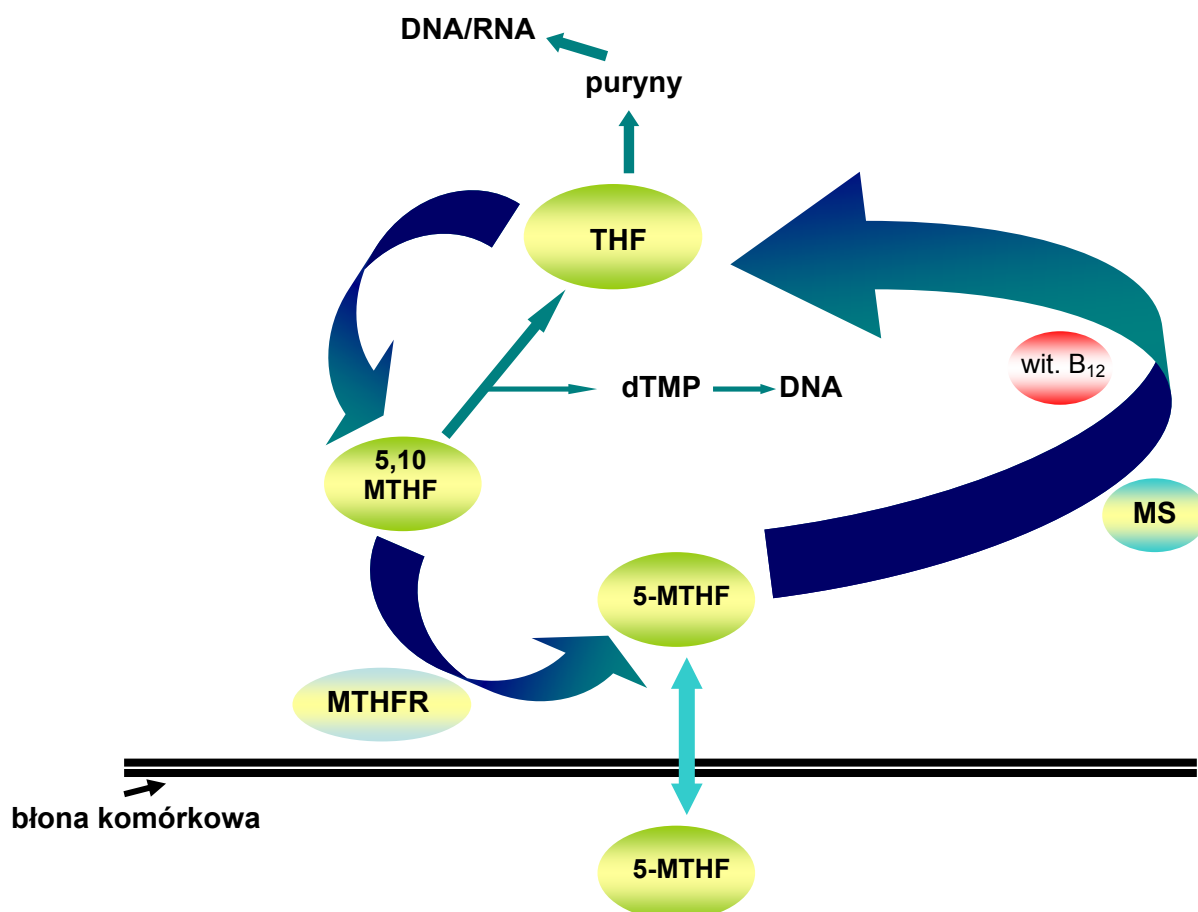
Stąd wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie homocysteiny w ścianach tętnic, co może prowadzić do wystąpienia efektów toksycznych [Maier i in., 2000].



- MAT** – adenozylotransferaza metioninowa
MS – syntaza metioninowa
BHMT – metylotransferaza betaina:homocysteina
CBS – β -syntaza cystationiny
CST – γ -cystationaza
MTHFR – reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa
 Rycina 5. Schemat metabolizmu homocysteiny.

Znane są wrodzone zaburzenia metabolizmu homocysteiny, związane z polimorfizmem genów kodujących reduktazę metylo-tetrahydrofolianową (MTHFR). Najczęstszym defektem genetycznym jest mutacja punktowa polegająca na zmianie cytozyny (C) na tyminę (T) w pozycji 677 (C677→T) genu kodującego MTHFR. W wyniku tej zamiany nukleotydów powstaje termowrażliwy enzym N⁵-N¹⁰-metylotetrahydrofolianu o obniżonej aktywności całkowitej. Stan ten sprzyja powstawaniu hiperhomocysteinemii w przypadku niedoboru kwasu foliowego, szczególnie u osób,

u których występuje homozygotyczność tej mutacji. W licznych badaniach epidemiologicznych wykazano, że ten typ mutacji jest zależny od rasy w różnych grupach etnicznych. Jest ona praktycznie niespotykana wśród Afroamerykanów, natomiast w rasie kaukaskiej i azjatyckiej stwierdza się 10 -13 % homozygot T/T i 50 % heterozygot C/T.



MS – syntaza metioninowa; **MTHFR** – reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa; **THF** – tetrahydrofolian; **5-MTHF** – 5-metylotetrahydrofolian; **5,10-MTHF** – 5,10-dimetylotetrahydrofolian.

Rycina 6. Metabolizm folianów.

Pod koniec lat 90-tych XX wieku Amerykanie - Bagley i Selhub, Duńczycy – zespół pod kierunkiem Van der Put oraz kanadyjski zespół Weisberga opisali inną, często występującą mutację oddziaływającą na reduktazę metylo-tetrahydrofolianową – (mutacja A1298C) [Bagley, Selhub 2000; Van der Put i in., 1998; Weisberg i in., 1998]. Mutacja ta, zdaniem autorów jest wynikiem interakcji pomiędzy polimorfizmem a mutacją C677→T genu kodującego MTHFR. Heterozygoty C677 tej mutacji ujawniały takie same cechy charakterystyczne, co homozygoty C677 [Chango i in., 2000].

1.5.2.2. Rola witaminy B₆ w metabolizmie homocysteiny

Obecnie znanych jest sześć biologicznie aktywnych form witaminy B₆: pirydoksyna (PN), pirydoksal (PL) i pirydoksamina (PM) oraz ich ufosforylowane formy oraz produkty degradacji, na przykład kwas 4-pirydoksynowy i jego lakton. Pod wpływem kinazy pirydoksalowej PN, PL i PM ulegają fosforylacji, a następnie, przy udziale oksydazy pirydoksaminofosforanowej, ufosforylowana forma pirydoksaminy i pirydoksyny przechodzi do fosforanu 5'-pirydoksalu. Ten ostatni jest koenzymatyczną formą witaminy B₆, która jest niezbędna nie tylko w procesach dekarboksylacji aminokwasów ale także w transaminacji, racemizacji oraz β i γ -eliminacji [Moszczyński, Pyć 1998].

Transsulfuracja homocysteiny do cystationeiny, a następnie do cysteiny, zachodzi w obecności witaminy B₆ jako kofaktora i jest, w przeciwieństwie do szlaku remetylacji, procesem nieodwracalnym. Zachodzi przy dodatnim bilansie metioniny, na przykład wskutek zwiększonej konsumpcji mięsa i jego przetworów. Wówczas ponad połowa homocysteiny usuwana jest na drodze transsulfuracji [Sobczak 2005b; Stipanuk 2004].

W licznych doniesieniach naukowych z ostatniego dziesięciolecia opisano wpływ dodatkowej suplementacji witamin z grupy B na stężenie homocysteiny. W większości prac autorzy stwierdzają zgodnie, że dodatek kwasu foliowego do żywności lub suplementacja kwasem foliowym zdecydowanie obniża stężenie homocysteiny [Dustianond i in., 2005; Moat i in. 2004; Ruggeri i in., 1999,]. W przypadku suplementacji witaminą B₆ nie stwierdza się znamiennych korelacji pomiędzy ostrymi incydentami naczyniowymi, a podawaniem tej witaminy. W doświadczeniu prowadzonym przez Ullegaddi i wsp. nie wykazano różnic w stężeniach homocysteiny w grupie osób po udarze mózgu, w porównaniu z grupą placebo [Ullegaddi i in., 2004]. Podobne rezultaty uzyskano w randomizowanych badaniach VITATOPS. Co prawda obserwowano obniżenie stężenia homocysteiny u osób suplementujących witaminy z grupy B, jednak nie obserwowano zmian w biochemicznych czynnikach ryzyka chorób sercowo-naczyniowych [Dusitanond i in., 2005]. Krytycznie suplementację witaminą B₆ oraz kwasem foliowym u osób z ostrymi incydentami naczyniowymi ocenia również Mangoni [Mangoni 2006]. Z kolei Naruszewicz i wsp. podkreślają, że dodatek do pożywienia omawianych witamin u osób z przewlekłą niewydolnością nerek, może przynosić dodatkowe korzyści w postaci zmniejszenia stężenia innych czynników ryzyka – fibrynogenu oraz lipoptoteiny (a) [Naruszewicz i in., 2001].

1.5.3. Hiperhomocysteinemia jako wskaźnik zagrożenia zdrowia

Łagodną hiperhomocysteinemię rozpoznaje się, gdy jej stężenie w osoczu zawiera się w przedziale $>15 - 30 \mu\text{mol/l}$, średnio nasiloną przy wartościach $>30 - 100 \mu\text{mol/l}$, natomiast postać ciężką przy stężeniu $>100 \mu\text{mol/l}$. Niekiedy bardzo wysokie stężenia, sięgające nawet $400 \mu\text{mol/l}$, obserwuje się we wrodzonych, genetycznie uwarunkowanych homocysteinuriach [Bald 2003]. Szkodliwość homocysteiny przypisywana jest głównie stresowi oksydacyjnemu, związanemu z obecnością w jej cząsteczce bardzo reaktywnej grupy tiolowej, dzięki której posiada ona zdolność modyfikacji białek osocza.

Homocysteina może tworzyć z grupami tiolowymi białek połączenia disiarczkowe, (jest to S-homocysteinylacja), jak również może reagować z grupami aminowymi białek, na drodze N-homocysteinylacji, która prowadzi do powstawania bardzo niebezpiecznego tiolaktonu homocysteiny. Skutkiem S-homocysteinylacji jest upośledzenie funkcji białek, na przykład albuminy, hemoglobiny i γ -globulin. Z kolei tiolakton homocysteiny posiada zdolność modyfikowania lipoprotein o małej gęstości (*LDL, ang. low density lipoprotein*). Uszkodzenia tego typu dotyczą głównie komórek śródbłónka. Z kolei w obecności podwyższonego stężenia homocysteiny komórki mięśni gładkich w ścianach tętnic namnażają się znacznie szybciej, co może prowadzić do zwiększenia oporu obwodowego i sprzyjać rozwojowi nadciśnienia tętniczego. Udowodniono również, że powstające zgrubienia w ścianach tętnic szyjnych są przyczyną niedokrwienia i udaru mózgu. Metaanaliza badań obserwacyjnych z 2002 roku ujawniła, że stężenie homocysteiny w osoczu, zwiększone o około $3 \mu\text{mol/l}$, wiąże się z o 11-razy większym ilorazem możliwości wystąpienia choroby wieńcowej i o 19-razy udaru mózgu [Undas 2007]. Nie bez powodu w 2002 roku, w ramach *Homocysteine Studies Collaboration*, uznano homocysteinę za niezależny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i naczyniowo-mózgowych [JAMA 2002].

Rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych, a zwłaszcza nadciśnienia tętniczego, sprzyja także upośledzenie przez homocysteinę działania tlenu azotu (II) i zmniejszenie jego ilości. Homocysteina wpływa bowiem na stężenie disymetrycznej argininy (ADMA), która jest inhibitorem naczyniowej syntazy tlenu azotu [Valkonen i Laaksonen 2004].

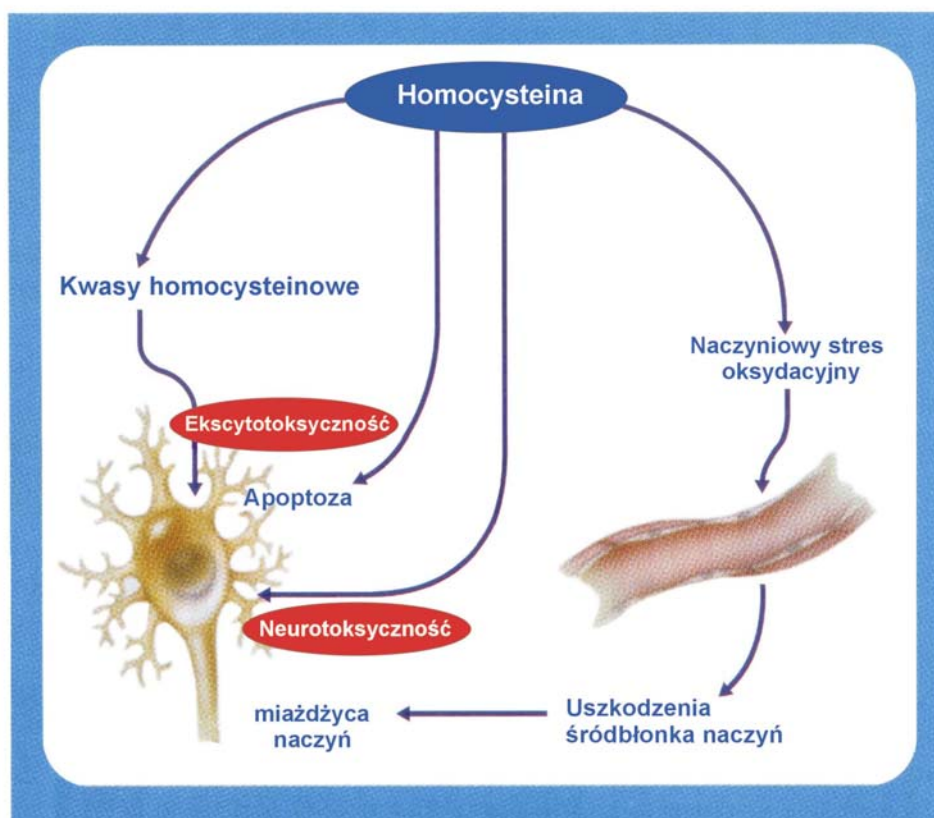
W badaniach Naruszewicza i wsp. wykazano, że aktywność pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej maleje wprost proporcjonalnie do wzrostu stężenia homocysteiny w układzie krwionośnym [Naruszewicz i wsp. 1997]. Homocysteina posiada zdolność generowania RFT poprzez uszczuplanie puli glutationu zredukowanego w osoczu lub poprzez autooksydację grup sulfhydrylowych w obecności jonów metali przejściowych, co prowadzi do powstawania nadtlenu wodoru oraz rodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). W wyniku reakcji nadtlenu wodoru mogą powstawać niebezpieczne rodniki wodorotlenowe, które biorą udział w peroksydacji lipidów.

Podwyższone stężenie homocysteiny w osoczu wpływa także na rozwój zakrzepicy, zarówno naczyń tętniczych, jak i żylnych. Hipotezę jej szkodliwego działania przypisuje się Daltonowi i wsp., którzy stwierdzili, że homocysteina wpływa na układ krzepnięcia poprzez inhibicję ekspresji trombomoduliny i tkankowego aktywatora plazminogenu oraz zmniejszenie aktywności białka C [Dalton i wsp., 1997]. Prace badawcze ostatnich lat potwierdzają także niekorzystne działanie homocysteiny na rozwój płodu i zaburzenia ciążowe. Jej wysokie stężenie w płynie pęcherzykowym jajnika może zaburzać interakcję pomiędzy komórką jajową a plemnikiem, uniemożliwiając zapłodnienie. Hiperhomocysteinemia w okresie ciąży jest czynnikiem ryzyka poronień nawykowych, wewnątrzmacicznej śmierci płodu oraz wad cewy nerwowej płodu, co przy niedoborze kwasu foliowego może spowodować poważne uszkodzenia.

Hiperhomocysteinemia może przyczyniać się także, w sposób pośredni lub bezpośredni, do wystąpienia dysfunkcji poznawczych, jak również neuropsychiatrycznych. Homocysteina została uznana za czynnik ryzyka parkinsonizmu i choroby Alzheimera, co świadczy o jej bezpośrednim działaniu neurotoksycznym [Isobe i in., 2005; Perry i in., 1995; Refsum i in., 1998; Seshardi i in., 2002]. Mechanizm tego efektu nie jest do końca poznany. Brany jest pod uwagę mechanizm ekscytotoksyczności. Hipoteza ekscytotoksyczności wiąże toksyczny wpływ glutaminianu na neurony z ich nadmiernym pobudzeniem. Metabolity homocysteiny zawierające atom siarki na wyższym stopniu utleniania, takie jak kwas L-homocysteiniosulfonowy oraz L-homocysteiniosulfonowy wpływają bezpośrednio na receptor N-metylo-D-asparginianu (NMDA) [Loscalzo 2002; Seshardi i in., 2002]. Aktywacja tego receptora powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, z następnym uwolnieniem komórkowych proteaz, które mogą prowadzić do

śmierci komórek. Homocysteina jest jednak słabym aktywatorem kanału w receptorze NMDA, ponieważ blokuje miejsce wiążące koagonistę – glicynę. Również interakcja homocysteiny z tlenkiem azotu przyczynia się do obniżenia aktywności kanału w receptorze NMDA.

W badaniach wykonanych na modelach zwierzęcych, prowadzonych przez Łazarkiewicza i wsp. stwierdzono powinowactwo homocysteiny do receptorów mGluR grupy I (są to glutaminergiczne receptory metabotropowe) [Łazarkiewicz i in., 2003]. Wykazano, że receptory te, wraz z receptorami NMDA, pośredniczą w wywołanej przez homocysteinę mobilizacji wapnia w hipokampie. Nie bez znaczenia w procesie neurodegradacji pozostają także zmiany miażdżycowe naczyń mózgowych, pogłębiające się pod wpływem hiperhomocysteinemii oraz obniżony poziom tetrahydrobiopteryny, która bierze udział w syntezie dopaminy i noradrenaliny [Brattström i in., 1998; Vasquez-Vivar i in., 2002]. Potencjalny mechanizm działania homocysteiny na komórki układu nerwowego, według Lozcalzo, przedstawiono na rycinie 7 [Lozcalzo 2002].



Rycina 7. Potencjalny mechanizm działania homocysteiny na komórki układu nerwowego.

1.5.3.1. Czynniki wpływające na stężenie homocysteiny

Stężenie homocysteiny we krwi, oprócz defektów genetycznych, jest uwarunkowane przez szereg czynników, do których zalicza się: wiek, płeć, sprawność organów detoksykacyjnych (wątroba, nerki), nabyte choroby, stosowanie niektórych leków oraz czynniki wpływające na styl życia, z których największe znaczenie mają: palenie tytoniu, wysoka konsumpcja napojów alkoholowych, kawy, niewłaściwa dieta oraz brak lub nieznaczna aktywność fizyczna.

Stężenie homocysteiny rośnie wraz z wiekiem i jest uzależnione od płci. Wyższe stężenia obserwuje się u chłopców oraz mężczyzn niż u dziewcząt i kobiet, a zjawisko hiperhomocysteinemii jest częstsze w wieku starszym [Nygård i in., 1995; Osganian i in., 1999; Sassi i in., 2002]. Wiadomo również, że stężenie homocysteiny jest wyższe u kobiet w wieku postmenopauzalnym, niż u mężczyzn, a do okresu menopauzy utrzymuje się na poziomie o około 15% niższym [Celik i in., 2002].

Wiele badań wskazuje także na podwyższony poziom homocysteiny w licznych stanach chorobowych. Najczęściej wymieniane są choroby o charakterze autoimmunologicznym, takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, łuszczyca, AIDS, niedoczynność tarczycy, także liczne choroby nowotworowe oraz choroby nerek [Müller i in., 1996; Svenungsson i in., 2001; Van Guldener i in., 1998]. W cukrzycy obserwuje się podwyższone stężenie homocysteiny, co może być skutkiem oporności na insulinę [Drzewoski i in., 2000; Fiorina i in., 1998]. Ponadto stosowanie niektórych leków, takich jak antymetabolity kwasu foliowego (metotreksat), niektóre leki przeciwcukrzycowe, przeciwdrgawkowe, czy doustne hormonalne leki antykoncepcyjne może zakłócać cykl metylacji homocysteiny, podwyższając jej stężenie w osoczu.

Czynniki wpływające na styl życia, takie jak palenie tytoniu, spożywanie dużych ilości alkoholu i kawy, niewłaściwa dieta, uboga w witaminy z grupy B oraz mała aktywność fizyczna, są najczęstszymi rozważanymi determinantami łagodnej hiperhomocysteinemii. Liczne doniesienia z badań epidemiologicznych i klinicznych, prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu, w większości potwierdzają niekorzystny wpływ palenia tytoniu na poziom homocysteiny i jej kofaktorów [O'Callaghan i in., 2002; Panagiotakos i in., 2005]. Wzrost stężenia homocysteiny u osób palących jest proporcjonalny do ilości wypalanych papierosów. Wypalanie jednego papierosa

dziennie podnosi stężenie homocysteiny u kobiet o około 1 %, a u mężczyzn o około 0,5 % [Nygård i in., 1995]. Na wzrost ten u palaczy ma wpływ wiele toksycznych związków chemicznych, występujących w dymie tytoniowym, które w sposób bezpośredni lub pośredni mogą zmieniać jej metabolizm. Cyjanowodór i tlenek siarki (IV) tworzą z hydroksykobalaminą cyjanokobalaminę i sulfokobalaminę, które nie pełnią roli koenzymów w remetylacji homocysteiny do metioniny. Tlenek i disiarczek węgla mogą dezaktywować witaminę B₆ w hepatocytach, poprzez zwiększenie produkcji interleukiny 6 (IL-6). IL-6 stymuluje aktywność fosfatazy pirydoksalu. W konsekwencji może dojść do zmniejszenia stężenia fosforanu 5'-pirydoksalu i obniżenia aktywności enzymów, biorących udział w procesach transsulfurylacji [Bald 2003; McCarty 2000]. Palenie tytoniu wpływa także na status redoks homocysteiny i zwiększa stężenie jej zredukowanej formy [Bergmark i in., 1997].

Wzrostowi stężenia homocysteiny towarzyszy spadek stężenia witamin, biorących udział w jej przemianach. Z obniżeniem stężenia folianów u palaczy związane są złe nawyki żywieniowe oraz brak dodatkowej suplementacji kwasem foliowym [Cafolla i in., 2000; Ortega i in., 1994 i 1997; Pagan i in., 2001; Sygnowska i Waśkiewicz 2001]. Organizm człowieka nie wytwarza kwasu foliowego, chociaż jest on związkiem niezbędnym nie tylko w procesie remetylacji homocysteiny do metioniny i wytwarzania tlenu azotu w śródbłonku tętnic, lecz także do metylacji kwasów nukleinowych, białek i neurotransmiterów [Nowicka 2005]. Dbłość o zachowanie kwasu foliowego w spożywanych pokarmach pozwoli zatem zmniejszyć zagrożenie hiperhomocysteinemią. Suplementacja kwasem foliowym ma szczególne znaczenie u kobiet w okresie ciąży, gdyż zapobiega uszkodzeniom cewy nerwowej i innym patologiom płodu [Kloeben 1999; Rosenquist i in., 1996]. Ponadto uważa się, że hipometylacja DNA jest przyczyną mutacji związanych z inicjacją lub rozwojem chorób nowotworowych [Lebiedzińska 2007]. Działania interwencyjne, podjęte w wielu krajach, sprowadzają się do wzbogacania niektórych produktów spożywczych, głównie zbożowych, kwasem foliowym. W Stanach Zjednoczonych od 1997 roku obowiązuje zalecenie wzbogacania w taki sposób żywności, aby dziennie dostarczać 400 µg kwasu foliowego oraz 2,4 µg witaminy B₁₂ [DRI 1998, FDA 1996a,b]. W Polsce zaleca się spożywanie 260 - 340 µg kwasu foliowego dziennie [Ziemiański 2001].

Na wzrost stężenia homocysteiny w osoczu wpływa także częste spożywanie dużych ilości alkoholu [Cravo i Camilo 2000]. Nadużywanie alkoholu wywołuje zaburzenia żołądkowo-jelitowe i hamuje wchłanianie witamin uczestniczących w

metabolizmie homocysteiny. W badaniach udowodniono także, że spożywanie 9 i więcej filiżanek kawy dziennie powoduje średni wzrost stężenia homocysteiny o 19 % u mężczyzn i 28 % u kobiet, w stosunku do grupy kontrolnej, w tym samym przedziale wiekowym [Vollset i in., 2000]. Ci sami autorzy stwierdzili także obniżony poziom homocysteiny po intensywnym wysiłku fizycznym oraz po spożywaniu herbaty.

Łagodna hiperhomocysteinemia, będąca udziałem od 7 do 10 % ogólnej populacji ludzkiej i uznana za niezależny czynnik przedwczesnego rozwoju miażdżycy, jest skutkiem przede wszystkim niewłaściwego stylu życia. Można jej zatem zapobiegać i leczyć głównie poprzez zmiany stylu życia, dietę bogatą w kwas foliowy i witaminy B₆ i B₁₂ lub suplementację tych witamin oraz rzucenie nałogu palenia tytoniu.

2. CEL PRACY

Celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu palenia tytoniu na osoczowe stężenia homocysteiny i jej kofaktorów: kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF) i witaminy B₆.

Zbadano także aktywność glutationowego buforu redoks we krwi i osoczu osób palących, biernie narażonych i niepalących, aby potwierdzić upośledzenie bariery antyoksydacyjnej ustroju przez dym tytoniowy.

Aby zrealizować ten cel:

1. Osoby biorące udział w doświadczeniu podzielono na trzy grupy badawcze: kontrolną, złożoną z osób, które nie miały kontaktu z dymem tytoniowym, grupę palaczy czynnych oraz biernie narażonych.
2. Zbiektywizowano wywiad ankietowy o narażeniu na dym tytoniowy osób należących do poszczególnych grup, poprzez pomiar stężenia kotyniny w moczu oraz ocenę stosunku stężeń kotyniny do kreatyniny.
3. Oznaczono i oceniono stężenie homocysteiny w osoczu osób z grupy kontrolnej, biernych i czynnych palaczy.
4. Zbadano aktywność glutationowego buforu redoks osób aktywnie palących, biernie narażonych i niepalących, poprzez oznaczenie stężeń glutationu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) we krwi oraz oznaczenie stężeń GSH, GSSG i całkowitego glutationu (tGSH) w osoczu.
5. Zweryfikowano pogląd na temat udziału antyoksydantów w inaktywacji reaktywnych form tlenu, pochodzących z dymu tytoniowego, na podstawie oznaczonych stężeń glutationu.
6. Oznaczono i oceniono wpływ aktywnego palenia lub biernego narażenia na dym tytoniowy na poziom kofaktorów homocysteiny: kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego oraz witaminy B₆.
7. Oceniono również zależność pomiędzy stężeniem homocysteiny a stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu.
8. Opracowano metody oznaczeń tioli, kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego oraz witaminy B₆ oraz opisano wykorzystanie detekcji elektrochemicznej kulometrycznej w HPLC do oznaczeń tych analitów w materiale biologicznym.
9. W pracy oceniono także częstotliwość wykonywania podstawowych badań lekarskich przez respondentów, biorących udział w doświadczeniu.

3. METODYKA BADAŃ

3.1. Badane grupy

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku nr 203/2006 z dnia 19.06.2006 roku.

Do badań zakwalifikowano 134 ochotników (74 kobiety i 60 mężczyzn) w przedziale wiekowym od 19 do 45 lat (średni wiek badanych $24,4 \pm 2,2$). Ochotnicy zamieszkiwali aglomerację Trójmiasta (109 osób) oraz Elbląg (25 osób). W wywiadzie lekarskim, przeprowadzanym przed pobraniem materiału biologicznego u badanych osób, nie stwierdzono nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, cukrzycy, schorzeń wątroby oraz chorób infekcyjnych. Badane osoby wypełniały kwestionariusz ankiety (wzór podany w załączniku pracy).

W ankietach, oprócz stosunku do palenia tytoniu, pytano między innymi o aktywność fizyczną, dodatkową suplementację witaminami z grupy B, stosowanie specjalnego rodzaju diety oraz częstotliwość wykonywania podstawowych badań lekarskich (pomiar ciśnienia tętniczego krwi, badanie poziomu glukozy we krwi, badanie poziomu cholesterolu we krwi oraz ogólne badanie moczu).

Osoby przyznające się w wywiadzie ankietowym do palenia tytoniu określały liczbę, moc, porę wypalania pierwszego papierosa lub innego wyrobu tytoniowego. Osoby deklarujące abstynencję od wyrobów tytoniowych oświadczały, iż nigdy nie paliły tytoniu i nie przebywają w otoczeniu osób palących lub w pomieszczeniach, w których pali się tytoń. Wywiad ankietowy zweryfikowano poprzez oznaczenie kotyniny w moczu i na tej podstawie badane osoby zakwalifikowano do grupy niepalących (grupa kontrolna), palaczy biernych lub czynnych. Za umowne wartości graniczne, odróżniające osoby niepalące i nie ekspozowane na dym tytoniowy, przyjęto wartość poniżej $50 \mu\text{g}$ kotyniny/l moczu, natomiast za wartość graniczną, odróżniającą biernych od czynnych palaczy, przyjęto wartość $< 500 \mu\text{g}$ kotyniny/l moczu. Do grupy niepalących zaliczono 56 osób (34 kobiety i 22 mężczyzn), do grupy biernych palaczy 33 osoby (20 kobiet i 13 mężczyzn), do grupy czynnych palaczy 45 osób (20 kobiet i 25 mężczyzn).

Próbki moczu zbierano na czczo, w godzinach porannych, natomiast krew pobierano z żyły łokciowej, po 12 – godzinnej przerwie od ostatniego posiłku. Próbki moczu i krwi pobierano od czynnych palaczy przed wypaleniem pierwszego papierosa w danym dniu.

3.2. Zakres oznaczeń

3.2.1. Oznaczanie stężenia kotyniny w moczu

Zasada oznaczenia

Kotyninę, po zasadowej hydrolizie moczu, ekstrahowano chlorkiem metylenu. Po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego, suchą pozostałość rozpuszczano w fazie ruchomej i poddawano analizie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV (metoda Ceppa i in. 2000, w modyfikacji własnej, Kowalski i in. 2007).

Odczynniki

- (-) Kotynina, Sigma Aldrich;
- Wodorotlenek sodu, Sigma Aldrich;
- Metylenu chlorek do chromatografii HPLC, POCh;
- Wodorofosforan sodu, siedmiowodny, Sigma Aldrich;
- Kwas o-fosforowy 85 %, Riedel-de-Haën;
- Kwas solny 37 %, Merck;
- Metanol, HPLC Analyzed, J.T.Baker;
- Acetonitryl, HPLC Analyzed, J.T. Baker;
- Woda dejonizowana 18 mΩ, Hydrolab HLP 10.

Aparatura

- Przygotowanie próby: wytrząsarka analityczna typ 327 Premed, wirówki MPW 22, MPW 50, Mechanika Precyzyjna W-wa;
- Przygotowanie fazy ruchomej: pehametr N 5172, Teleko, Polska, system próżniowego sączenia fazy ruchomej, Kontem Ultra-ware, Niemcy, sączki membranowe 0,22 μm, Millipore;
- Zestaw HPLC: pompa P580 (Dionex), detektor UV 340 S DAD (Dionex), piec termostatujący STH 585 (Dionex), wstrzykiwacz ręczny Rheodyne 7725i oraz kolumna Thermo Hypersil BDS C18 5 μ (250 x 4,6 mm).

Przygotowanie próbek do oznaczenia

Do polietylenowych probówek pobierano 2,5 ml moczu, który alkalizowano poprzez dodatek 0,5 ml 5 mol/l roztworu wodorotlenku sodu. Następnie dodawano 2,5 ml chlorku metylenu i przez 15 min. wytrząsano. Po odwirowaniu (15 min. 3000 obr/min.) warstwę wodną odrzucano, a 1,5 ml warstwy organicznej przenoszono do probówek typu eppendorf, zawierających 0,1 ml 0,1 % metanolowego roztworu kwasu solnego. Chlorek metylenu

odparowywano w strumieniu chłodnego powietrza, pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml fazy ruchomej i 20 µl poddawano analizie chromatograficznej. Każde oznaczenie powtarzano 3-krotnie.

Warunki chromatograficzne

Separacji chromatograficznej dokonywano w przebiegu izokratycznym na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 5 µ (250 x 4,6 mm). Mieszaninę elującą stanowił 30 mM bufor fosforanowy z acetonitrylem (90:5 v/v) o pH 3,2, uzyskanym za pomocą stężonego kwasu fosforowego. Rozdziałów dokonywano w temperaturze 40 °C. Pomiaru eluatu dokonywano przy długości fali $\lambda_{\max}$ 262 nm. W czasie retencji kotyniny (t_R 4,7 min.) nie obserwowano interferencji spowodowanej innymi substancjami. Całkowity czas analizy wyniósł 7,0 min. Przykładowy chromatogram próbki moczu z oznaczonym stężeniem kotyniny przedstawiono na rycinie 8.

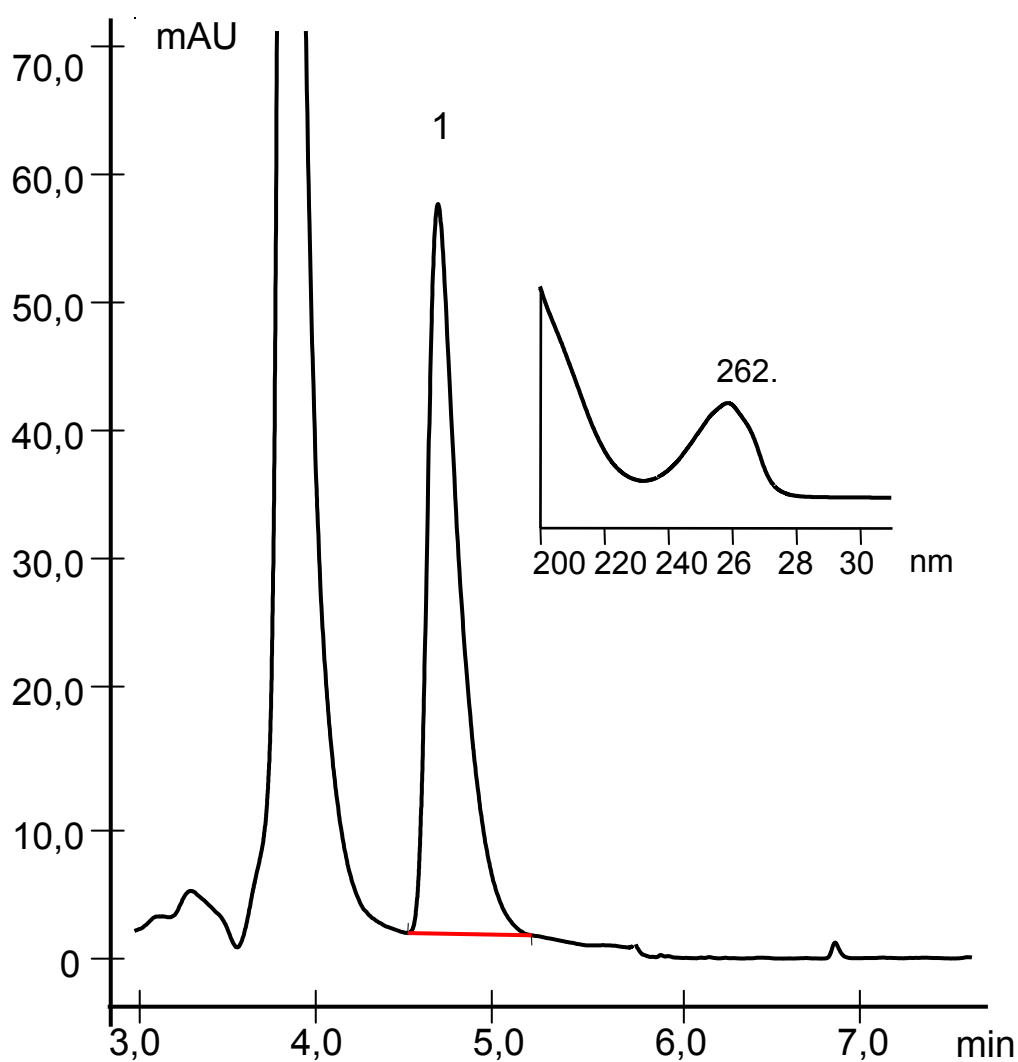
Parametry analityczne uśrednionej krzywej kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Parametry analityczne uśrednionej krzywej kalibracji kotyniny w moczu oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	Kotynina
zakres oznaczalności [ng/ml]	10 - 4000
wyraz wolny	-0,0788
współczynnik kierunkowy prostej	4,11
współczynnik korelacji (r)	0,9996
granica wykrywalności [ng/ml]	3,2
granica oznaczalności [ng/ml]	10,0

Poprawność metody

Z uwagi na brak materiału referencyjnego, do trzech losowo wybranych próbek moczu dodano 50, 500 oraz 2500 ng/ml roztworu wzorcowego kotyniny. Średnia wartość odzysku kotyniny, uzyskana z pięciu powtórzeń, wynosiła $89,4 \pm 2,3\%$, $95,2 \pm 1,8\%$ i $98,5 \pm 1,1\%$ dla kolejno 50, 500 i 2500 ng/ml moczu.



Rycina 8. Przykładowy chromatogram próbki moczu, 1 – kotynina (t_R 4,7 min, 2340 ng/ml).

3.2.2. Oznaczanie kreatyniny w moczu

Kreatyninę w moczu oznaczano testem kolorymetrycznym, kinetycznym z odbiałczeniem opartym na reakcji Jaffe (test firmy Emapol). Zasada oznaczenia opiera się na wytworzeniu w środowisku alkalicznym kompleksu kreatynina – kwas pikrynowy, którego absorbancja jest proporcjonalna do stężenia kreatyniny w badanym materiale.

W niniejszej pracy stężenie kotyniny w moczu przeliczano na stężenie kreatyniny wydzielanej wraz z moczem (stosunek stężeń kotynina/kreatynina).

Oznaczano także ciężar właściwy moczu przy użyciu testów paskowych Multistix (Bayer, Niemcy).

3.2.3. Oznaczanie całkowitego stężenia homocysteiny i całkowitego stężenia glutationu w osoczu

Zasada oznaczenia

Całkowite stężenie homocysteiny i glutationu w osoczu oznaczano w tych samych próbkach, po redukcji mostków disiarczkowych tioli w osoczu i odbiałczaniu, metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną kulometryczną w oparciu o metodę Menlyk i in. 1999, (z własną modyfikacją, Marszał i in. 2006, Marszał i in. 2007, Menlyk i in., 1999).

Odczynniki

- DL-Homocysteina, Sigma Aldrich;
- DL-Homocysteiny tiolakton, chlorowodorek, Fluka;
- Glutation zredukowany, Sigma Aldrich;
- Tris(2-karboksyeetyl) fosfiny chlorowodorek (TCEP), Sigma Aldrich;
- Kwas chlorowy (VII), 70 %, Merck;
- Sól disodowa kwasu etylenodiaminoczteroctowego (EDTA), POCh;
- Wodorofosforan sodu, siedmiowodny, Sigma Aldrich;
- Kwas o-fosforowy 85 %, Riedel-de-Haën;
- Dodecylosulfonian sodu, Serva;
- Acetonitryl, HPLC Analyzed, J.T. Baker;
- Woda dejonizowana 18 mΩ, Millipore Milli-Q.

Aparatura

- Przygotowanie próby: probówki heparynowe do próżniowego pobierania krwi Vacuette, Austria; wirówki MPW-300, MPW-50, Mechanika Precyzyjna W-wa, Vortex, IKA, Niemcy;
- Przygotowanie fazy ruchomej: pehametr N 5172, Teleko, Polska, system próżniowego sączenia fazy ruchomej, Kontem Ultra-ware, Niemcy, saszki membranowe 0,22 μm, Millipore;
- Zestaw HPLC: pompa P 580 (Dionex), piec termostatujący STH 585 (Dionex), wstrzykiwacz ręczny Rheodyne 7725i, detektor elektrochemiczny kulometryczny Coulochem II z zestawem elektrod analitycznych, model 5010 (ESA) i elektrodą ochronną, model 5020 (ESA) oraz kolumna Thermo Hypersil BDS C18 5 μ (250 x 4,6 mm).

Przygotowanie próbek do oznaczenia

Pobierano 0,15 ml osocza, otrzymanego po odwirowaniu krwi pełnej (15 min., 4000 obr/min.). Do osocza dodawano 0,075 ml wody dejonizowanej oraz 0,025 ml związku redukującego połączenia disiarczkowe tioli (TCEP). Po wymieszaniu zawartości (60 sek., 1200 obr/min.), próbki pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Zaletą dodatku tri(2-karboksyetyl)fosfiny do próbki jest możliwość redukcji połączeń disiarczkowych w temperaturze pokojowej, niezależnie od uzyskanego końcowego pH. Następnie próbki wirowano (5 min., 15000 obr/min.), a roztwór nad osadem (supernatant) przenoszono do próbówki zawierającej 0,8 mol/l kwas chlorowy (VII) z 1 mmol/l EDTA. Proces odbiałczania prowadzono w obniżonej temperaturze przez 10 minut. Próbki ponownie odwirowywano (5 min., 15000 obr/min), a roztwór nad osadem zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analizy HPLC. Maksymalny czas przechowywania zamrożonych próbek nie przekraczał 45 dni. Przygotowanie każdej próbki powtarzano 3-krotnie.

Woltamogramy hydrodynamiczne dla homocysteiny i glutationu zredukowanego

Woltamogramy hydrodynamiczne są odpowiedzią detektora dla utlenianych lub zredukowanych związków na elektrodach analitycznych, zależnie od napięcia przyłożonego do tych elektrod. W celu zbadania, przy jakim potencjale utleniającym możliwa jest detekcja oznaczanych związków, sporządzono 10 $\mu\text{mol/l}$ roztwory wzorcowe, które nanoszono (objętość nanoszona 20 μl) na elektrody bez kolumny chromatograficznej. Pełna odpowiedź detektora dla oznaczanych tioli występowała przy potencjale +0,7 V dla homocysteiny oraz +0,95 V dla glutationu zredukowanego. Na tej podstawie ustalono parametry detekcji elektrochemicznej: potencjał elektrody roboczej, pracującej jako elektroda osłaniająca +1,0 V, potencjał pierwszej elektrody roboczej, pracującej jako elektroda ekranująca +0,35 V, potencjał elektrody roboczej, z której zbierano właściwy sygnał +0,95 V dla glutationu i +0,7 V dla homocysteiny. Dla uzyskania bardziej czytelnych chromatogramów, zdecydowano o podniesieniu zakresu sygnału aparatu do 20 μA dla glutationu i 2 μA dla homocysteiny. Stąd w tych samych próbkach oznaczono osobno, a nie jednocześnie, GSH i tHcys, poprzez dwukrotne nanoszenie na kolumnę chromatograficzną takich samych objętości próbki (20 μl).

Warunki chromatograficzne

Separacji chromatograficznej dokonywano w przebiegu izokratycznym, z prędkością przepływu fazy ruchomej 1 ml/min., na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 5 μ (250 x 4,6 mm). Mieszaninę eluującą stanowił 50 mM bufor fosforanowy z acetonitrylem (94:6 v/v) o pH 2,7, uzyskanym za pomocą stężonego kwasu fosforowego oraz dodatek 1 mmol/l dodecylosulfonianu sodu jako czynnika par jonowych. Rozdziałów dokonywano w temperaturze pokojowej (22 °C).

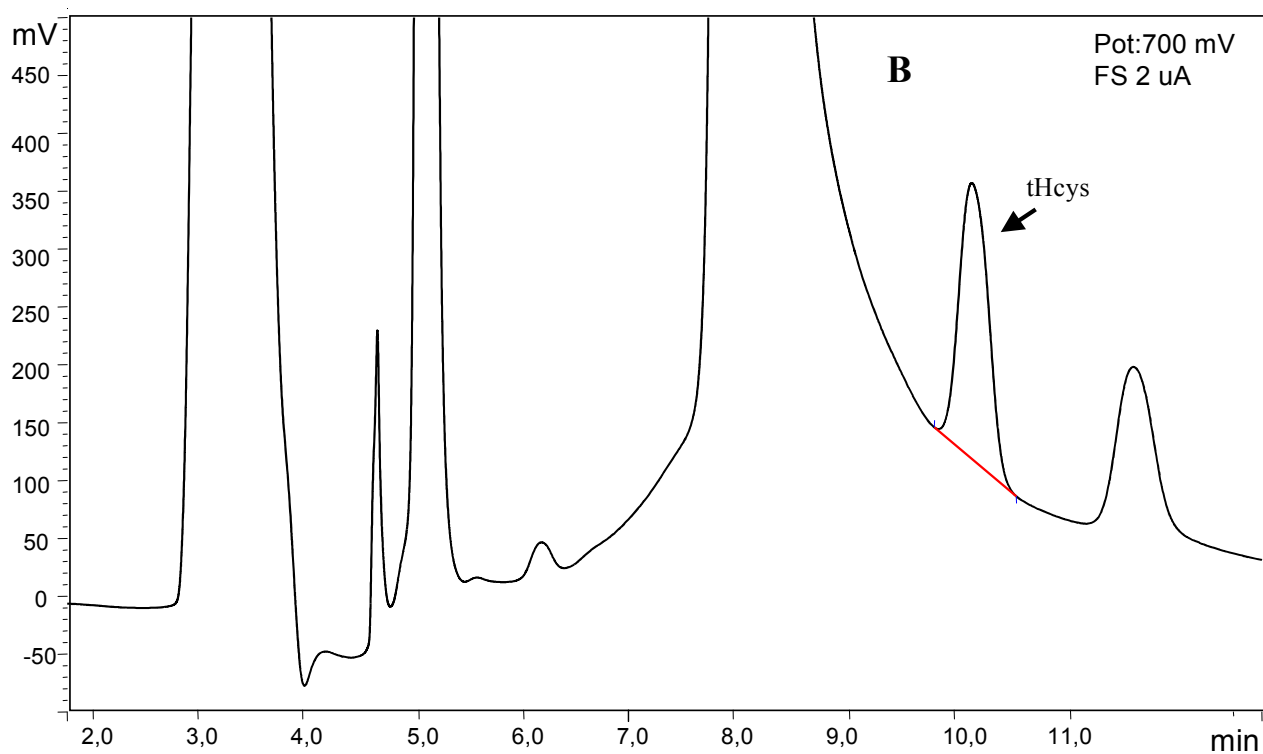
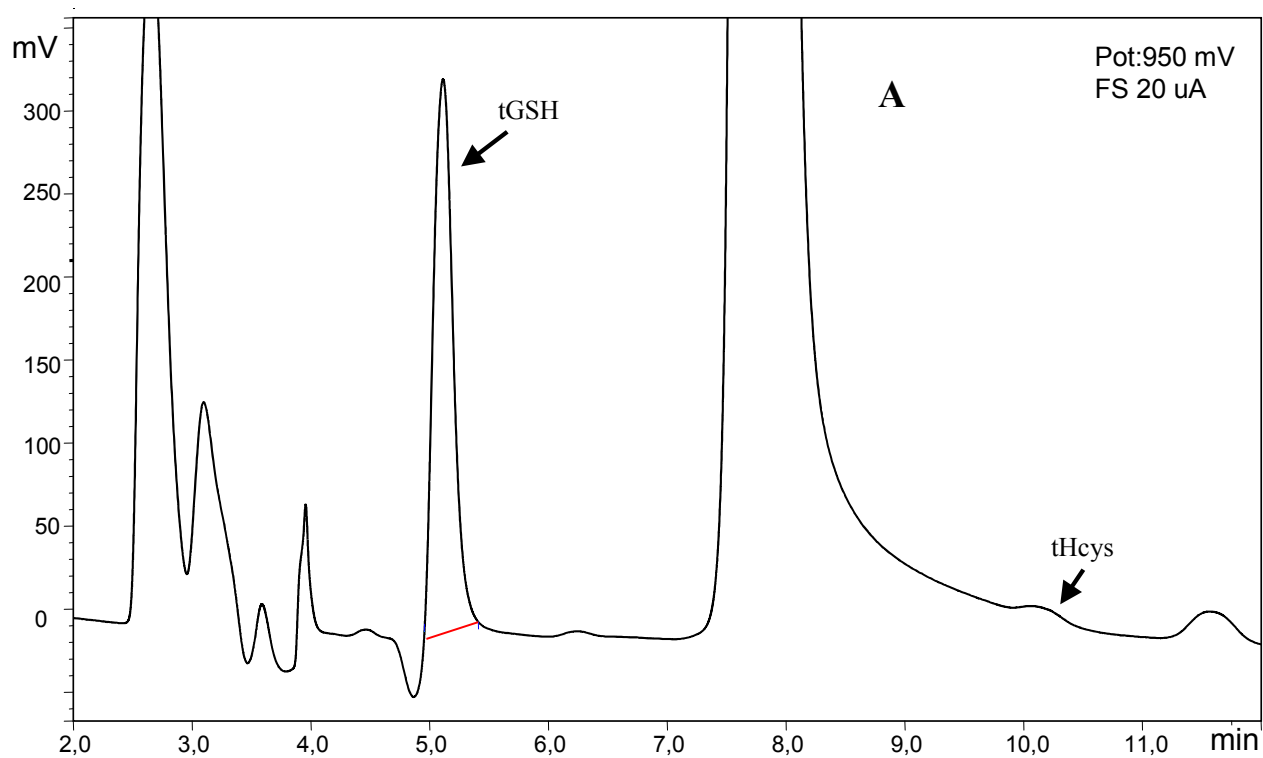
W czasie retencji glutationu (t_R 5,1 min.) i homocysteiny (t_R 10,1 min.) nie obserwowano interferencji, spowodowanej innymi substancjami. Całkowity czas analizy wyniósł 12,0 min. Przykładowy chromatogram próbki osocza z oznaczonym stężeniem glutationu (A) i homocysteiny (B) przedstawiono na rycinie 9 A, B. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji (n = 9) homocysteiny glutationu w osoczu oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	Homocysteina	Glutation
zakres oznaczalności [μ mol/l]	1- 50	1 - 15
wyraz wolny	-0,51	-0,0988
współczynnik kierunkowy prostej	2,08	18,68
współczynnik korelacji (r)	0,9997	0,9991
granica wykrywalności [μ mol/l]	0,32	0,227
granica oznaczalności [μ mol/l]	0,97	0,694

Poprawność metody

Poprawność metody zweryfikowano w oparciu o analizę homocysteiny w certyfikowanym materiale referencyjnym Clin Chek[®] Plasma Control, Level I (Recipe, Niemcy). Wartość deklarowana przez producenta dla metod RP - HPLC to 9,41 μ mol/l (7,56 – 11,3). Z dwunastu powtórzeń uzyskano średnio $9,16 \pm 0,61$ μ mol/l (8,18 – 10,06), co stanowi 97,3% oznaczonego stężenia homocysteiny. Zbadano także odzysk dla glutationu dodawanego do trzech serii próbek (po 4 każda) w ilościach odpowiadających 5, 10 i 15 μ mol/l. Średnia wartość odzysku dla kolejnych serii oznaczeń (5, 10, 15 μ mol/l) wynosiła $95,4 \pm 1,1\%$, $96,2 \pm 0,8\%$ oraz $96,9 \pm 1,3\%$.



Rycina 9. Przykładowy chromatogram próbki osocza: A – glutation całkowity (t_R 5,1 min., 12,4 $\mu\text{mol/l}$, zakres sygnału (FS) 20 μA); B – całkowitej homocysteiny (t_R 10,1 min., 9,78 $\mu\text{mol/l}$, zakres sygnału (FS) 2 μA).

3.2.4. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi

Zasada oznaczenia

Stężenie glutationu zredukowanego i utlenionego oznaczono równocześnie, we krwi pełnej po odbiaćzaniu, metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną kulometryczną (metoda wg Smith i in. 1995 z modyfikacją własną, Marszał i in. 2005, 2006).

Odczynniki

- Glutation zredukowany, Sigma Aldrich;
- Glutation utleniony, Sigma Aldrich;
- Kwas chlorowy (VII), 70 %, Merck;
- Sól disodowa kwasu etylenodiaminoczteroocowego (EDTA), POCh;
- Wodorofosforan sodu, siedmiowodny, Sigma Aldrich;
- Kwas o-fosforowy 85 %, Riedel-de-Haën;
- Acetonitryl, HPLC Analyzed, J.T. Baker;
- Woda dejonizowana 18 mΩ, Millipore Milli-Q.

Aparatura

- Przygotowanie próby: probówki heparynowe do próżniowego pobierania krwi Vacuette, Austria; wirówka MPW-50, Mechanika Precyzyjna W-wa;
- Przygotowanie fazy ruchomej: pehametr N 5172, Teleko, Polska, system próżniowego sączenia fazy ruchomej, Kontem Ultra-ware, Niemcy, saszki membranowe 0,22 μm, Millipore;
- Zestaw HPLC: pompa P 580 (Dionex), piec termostatuujący STH 585 (Dionex), wstrzykiwacz ręczny Rheodyne 7725i, detektor elektrochemiczny kulometryczny Coulochem II z zestawem elektrod analitycznych, model 5010 (ESA) i elektrodą ochronną, model 5020 (ESA) oraz kolumna Thermo Hypersil ENV C18 5 μ (250 x 4,6 mm).

Przygotowanie próbek do oznaczenia

Pobierano 0,2 ml krwi pełnej, którą odbiaćzano, dodając nadmiar 0,8 mol/l kwasu chlorowego (VII) z 1 mmol/l EDTA (0,8 ml do 0,2 ml krwi). Proces odbiaćzania prowadzono w obniżonej temperaturze przez 15 minut. Następnie próbki odwirowywano (5 min., 15000 obr/min) a roztwór nad osadem (supernatant) zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze – 80 °C do czasu wykonania analizy HPLC. Przygotowanie każdej próbki powtarzano 3-krotnie.

Woltamogramy hydrodynamiczne dla glutationu zredukowanego i utlenionego

W celu zbadania, przy jakim potencjale utleniającym możliwa jest detekcja oznaczanych związków sporządzono 20 $\mu\text{mol/l}$ roztwory wzorcowe, które nanoszono (objętość nanoszona 20 μl) na elektrody bez kolumny chromatograficznej. Zaobserwowano wyraźny sygnał dla utleniającego się GSH przy potencjale +0,35 V, a efekt plateau występował przy potencjale +0,9 V. Odpowiedź detektora dla formy utlenionej była wyraźna przy potencjale +0,55 V, a efekt plateau przy potencjale +0,95 V. Na tej podstawie ustalono parametry detekcji elektrochemicznej: potencjał elektrody roboczej, pracującej jako elektroda osłaniająca +1,0 V, potencjał pierwszej elektrody roboczej, pracującej jako elektroda ekranująca +0,35 V, potencjał elektrody roboczej, z której zbierano właściwy sygnał dla obu form glutationu +0,95V. Zakres sygnału dla obu oznaczanych form glutationu ustalono na poziomie 50 μA .

Warunki chromatograficzne

Separacji chromatograficznej dokonywano w przebiegu izokratycznym, z prędkością przepływu fazy ruchomej 1 ml/min., na kolumnie Thermo Hypersil ENV C18 5 μ (250 x 4,6 mm). Mieszaninę eluującą stanowił 20 mM bufor fosforanowy z acetonitrylem (98:2 v/v) o pH 2,7, uzyskanym za pomocą stężonego kwasu fosforowego. Rozdziały chromatograficzne wykonywano w temperaturze 30 $^{\circ}\text{C}$.

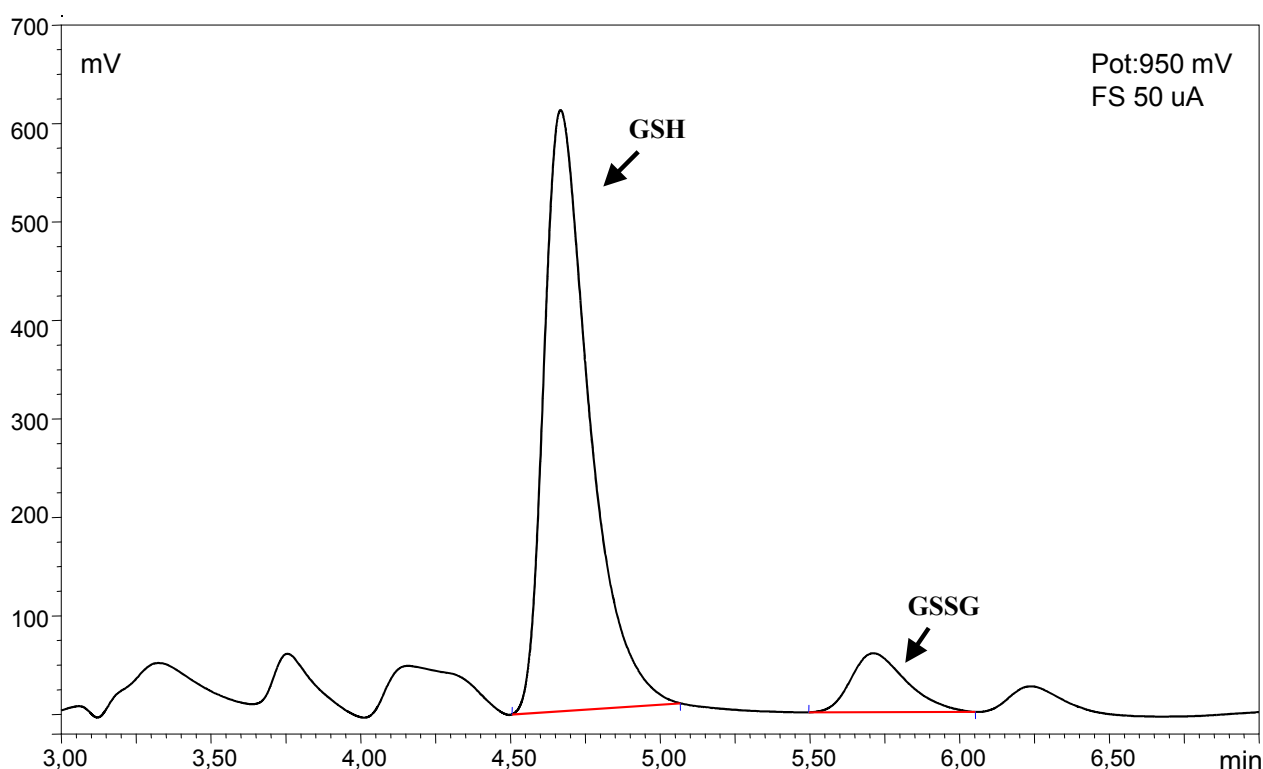
W czasie retencji glutationu zredukowanego (t_R 4,7 min.), utlenionego (t_R 5,7 min.), nie obserwowano interferencji, spowodowanej innymi substancjami. Całkowity czas analizy wyniósł 6,5 min. Przykładowy chromatogram próbki krwi z oznaczonym stężeniem obu form glutationu przedstawiono na rycinie 10. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 4.

Poprawność metody

Przy braku materiału referencyjnego, dokładność zastosowanej metody wykonano poprzez zbadanie odzysku. Do trzech serii próbek krwi (po 5 próbek w każdej), dodawano wzrastające stężenia roztworów wzorcowych obu form glutationu, odpowiadające: 750 $\mu\text{mol/l}$ GSH i 5 $\mu\text{mol/l}$ GSSG dla pierwszej serii, 800 $\mu\text{mol/l}$ GSH i 15 $\mu\text{mol/l}$ GSSG dla drugiej serii i 900 $\mu\text{mol/l}$ GSH i 25 $\mu\text{mol/l}$ GSSG dla trzeciej serii. Średnia wartość odzysku dla pierwszej serii wynosiła $89,6 \pm 1,2\%$ dla GSH oraz $93,4 \pm 0,8\%$ GSSG, dla drugiej serii $92,7 \pm 2,2\%$ dla GSH oraz $95,4 \pm 0,9\%$, a dla trzeciej serii: $98,6 \pm 1,8\%$ dla GSH oraz $97,9 \pm 1,1\%$.

Tabela 4. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji ($n = 9$) glutationu zredukowanego (GSH) oraz utlenionego (GSSG) we krwi oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	GSH	GSSG
zakres oznaczalności [$\mu\text{mol/l}$]	700 - 1100	2,5 - 25
wyraz wolny	1,17	-0,0174
współczynnik kierunkowy prostej	$11,81 \cdot 10^{-2}$	1,28
współczynnik korelacji (r)	0,9992	0,9994
granica wykrywalności [$\mu\text{mol/l}$]	0,069	0,035
granica oznaczalności [$\mu\text{mol/l}$]	0,208	0,108



Rycina 10. Przykładowy chromatogram próbki krwi z oznaczonym stężeniem glutationu zredukowanego (GSH, t_R 4,7 min., 895,6 $\mu\text{mol/l}$) i utlenionego (GSSG, t_R 5,7 min, 9,26 $\mu\text{mol/l}$), zakres sygnału 50 μA .

3.2.5. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego w osoczu

Do oznaczenia obu form glutationu w osoczu stosowano takie same odczynniki i aparaturę, a także wykorzystano woltamogramy hydrodynamiczne, jak przy oznaczeniu glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi (rozdz. 3.2.4). Również warunki chromatograficzne nie uległy zmianie, z wyjątkiem stosowania innego zakresu sygnału

aparatu, wyznaczonego na poziomie 20 μA . Uzyskano takie same czasy retencji dla obu form glutationu (GSH t_R 4,7 min; GSSG t_R 5,7 min), co przedstawiono na rycinie 11. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 5.

Przygotowanie próbek do oznaczenia

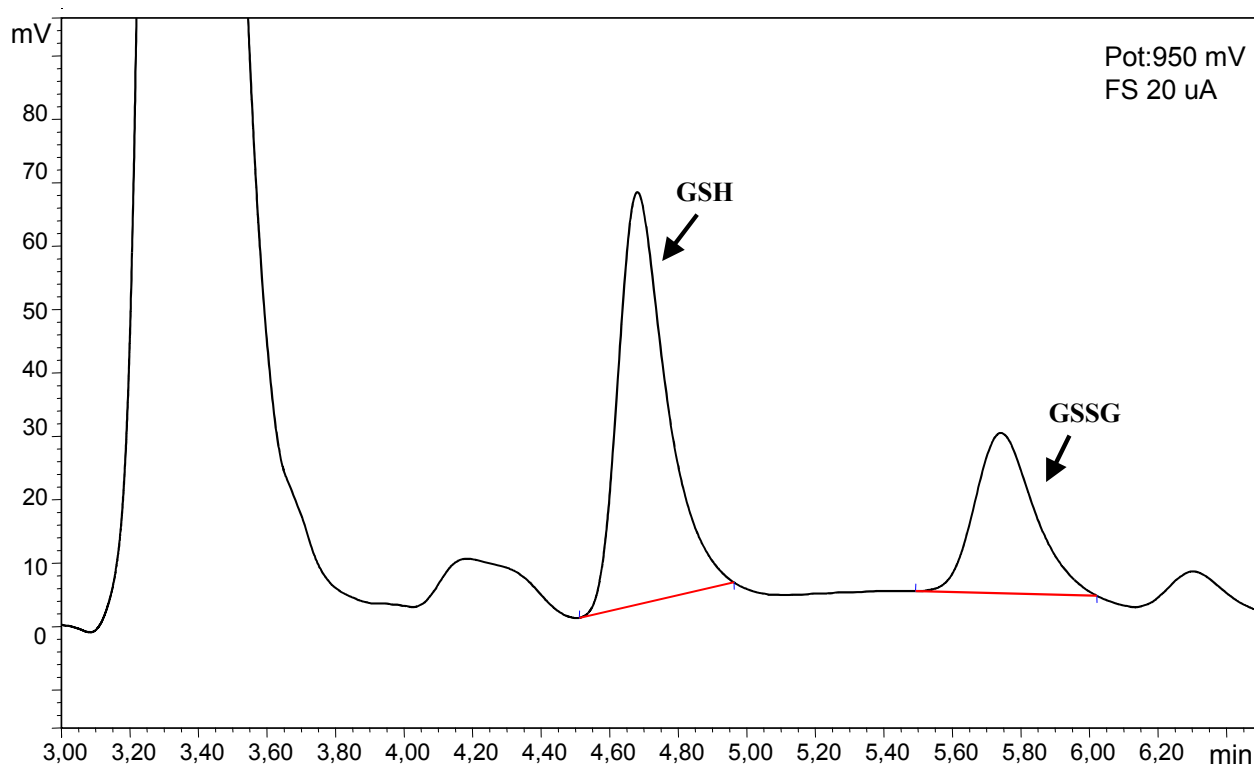
Do pojedynczego oznaczenia pobierano 0,5 ml osocza, otrzymanego przez odwirowanie krwi pełnej (15 min. 4000 obr/min.). Próbkę odbiałczano, dodając nadmiar 0,8 mol/l kwasu chlorowego (VII) z 1 mmol/l EDTA (0,8 ml do 0,5 ml osocza). Proces odbiałczania prowadzono w obniżonej temperaturze przez 15 minut. Następnie próbki odwirowywano (5 min. 15000 obr/min), a roztwór nad osadem (supernatant) zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu wykonania analizy HPLC. Przygotowanie każdej próbki powtarzano 2-krotnie.

Tabela 5. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji ($n = 9$) glutationu zredukowanego (GSH) oraz utlenionego (GSSG) w osoczu oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	GSH	GSSG
zakres oznaczalności [$\mu\text{mol/l}$]	0,5 - 7	0,4 - 5
wyraz wolny	0,0814	0,0218
współczynnik kierunkowy prostej	4,02	1,57
współczynnik korelacji (r)	0,9996	0,9993
granica wykrywalności [$\mu\text{mol/l}$]	0,158	0,117
granica oznaczalności [$\mu\text{mol/l}$]	0,496	0,353

Poprawność metody

Do trzech serii próbek krwi (po 3 próbki w każdej) dodawano wzrastające stężenia roztworów wzorcowych obu form glutationu, odpowiadające 1 $\mu\text{mol/l}$ dla pierwszej serii, 3 $\mu\text{mol/l}$ dla drugiej serii oraz 5 $\mu\text{mol/l}$ dla trzeciej serii. Średnia wartość odzysku dla pierwszej serii wynosiła $92,6 \pm 0,7\%$ dla GSH oraz $91,1 \pm 0,9\%$ GSSG, dla drugiej serii $94,8 \pm 0,7\%$ dla GSH oraz $93,2 \pm 1,1\%$, a dla trzeciej serii: $95,7 \pm 0,6\%$ dla GSH oraz $96,1 \pm 1,2\%$.



Rycina 11. Przykładowy chromatogram próbki osocza z oznaczonym stężeniem glutationu zredukowanego (GSH, t_R 4,7 min., 3,12 $\mu\text{mol/l}$) i utlenionego (GSSG, t_R 5,7 min, 2,18 $\mu\text{mol/l}$), zakres sygnału 20 μA .

3.2.6. Oznaczanie stężenia kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu

Zasada oznaczenia

Stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF) oznaczono w osoczu z dodatkiem kwasem L-askorbowego, po odbiałczaniu próbek, metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną kulometryczną i UV-Vis, opierając się na metodach Lankelma i Van der Klejna (1980) oraz Kohashi i Inoue (1986), w modyfikacji własnej [Marszałł, Czarnowski 2007].

Odczynniki

- Kwas 5-metylotetrahydrofoliowy, Sigma Aldrich;
- Kwas L-askorbowy, Sigma Aldrich;
- Kwas chlorowy (VII), 70 %, Merck;
- Sól disodowa kwasu etylenodiaminoczteroosowego (EDTA), POCh;
- Wodorofosforan sodu, siedmiowodny, Sigma Aldrich;
- Kwas o-fosforowy 85 %, Riedel-de-Haën;
- Metanol, HPLC Analyzed, J.T. Baker;
- Woda dejonizowana 18 m Ω , Millipore Milli-Q.

Aparatura

- Przygotowanie próby: probówki heparynowe do próżniowego pobierania krwi Vacuette, Austria; wirówki MPW-300, MPW-50, Mechanika Precyzyjna W-wa, Vortex, IKA, Niemcy;
- Przygotowanie fazy ruchomej: pehametr N 5172, Teleko, Polska, system próżniowego sączenia fazy ruchomej, Kontem Ultra-ware, Niemcy, sączki membranowe 0,22 μm , Millipore;
- Zestaw HPLC: pompa P 580 (Dionex), piec termostatujący STH 585 (Dionex), wstrzykiwacz ręczny Rheodyne 7725i, detektor elektrochemiczny kulometryczny Coulochem II z zestawem elektrod analitycznych, model 5010 (ESA) i elektrodą ochronną, model 5020 (ESA), detektor UV-Vis DAD 340S (Dionex) oraz kolumna Thermo Hypersil ENV C18 5 μ (250 x 4,6 mm).

Przygotowanie próbek do oznaczenia

Do pojedynczego oznaczenia pobierano 0,5 ml osocza, otrzymanego przez odwirowanie krwi pełnej (15 min., 4000 obr./min). Do próbek osocza dodawano 0,1 ml 1 % roztworu wodnego kwasu L-askorbowego, który pełnił rolę stabilizatora i przeciwutleniacza. Po wymieszaniu (120 sek., 1000 obr./min.) dodawano 0,8 ml 0,4 mol/l kwasu chlorowego (VII) z dodatkiem 1 mmol/l EDTA, celem odbiałczenia. Proces odbiałczania prowadzono w obniżonej temperaturze przez 15 minut. Następnie próbki odwirowywano (5 min., 15000 obr/min) i sprawdzano pH roztworu nad osadem, przed zamrożeniem w ciekłym azocie. Optymalne pH próbki do oznaczenia tą metodą wynosi 3,5 – 4,5. Próbki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analizy HPLC. Przygotowanie każdej próbki powtarzano 2-krotnie.

Woltamogram hydrodynamiczny dla kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego

Odpowiedź detektora kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego była wyraźna przy potencjale +0,2 V, a efekt plateau występował przy potencjale +0,5 V. Na tej podstawie ustalono parametry detekcji elektrochemicznej: potencjał elektrody roboczej, pracującej jako elektroda osłaniająca +0,55 V, potencjał pierwszej elektrody roboczej, pracującej jako elektroda ekranująca +0,2 V, potencjał elektrody roboczej, z której zbierano właściwy sygnał +0,5 V. Z uwagi na niskie stężenia fizjologiczne 5-MTHF w osoczu [nmol/l], zakres sygnału ustalono na poziomie 500 nA. Czas potrzebny do ustalenia się linii podstawowej bez wyraźnego dryfu wynosił 2 dni.

Warunki chromatograficzne

Separacji chromatograficznej dokonywano w przebiegu izokratycznym, z prędkością przepływu fazy ruchomej 1 ml/min., na kolumnie Thermo Hypersil ENV C18 5 μ (250 x 4,6 mm). Mieszaninę eluującą stanowił 35 mM bufor fosforanowy z metanolem (85:15 v/v) o pH 4,8, uzyskanym za pomocą stężonego kwasu fosforowego, z dodatkiem 3mmol/l kwasu L-askorbowego. Rozdziały chromatograficzne wykonywano w temperaturze pokojowej. Detektor UV-Vis, który połączony był modułowo z detektorem elektrochemicznym, pełnił rolę pomocniczą w identyfikacji kwasu 5-MTHF w fortyfikowanych próbkach osocza ($\lambda_{\max}$ 290 nm) podczas badania dokładności zastosowanej metody.

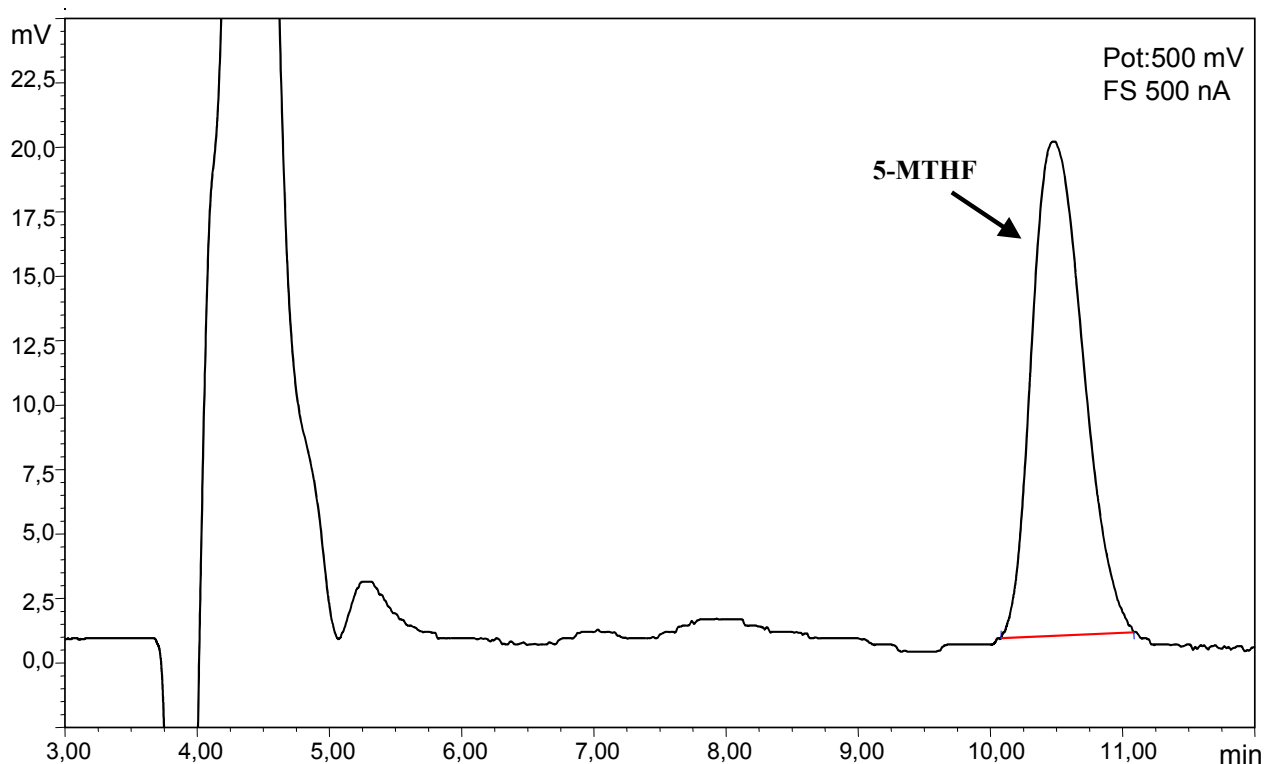
W czasie retencji kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (t_R 10,5 min.) nie obserwowano interferencji spowodowanej innymi substancjami. Całkowity czas analizy wyniósł 12,0 min. Przykładowy chromatogram próbki osocza przedstawiono na rycinie 12. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabeli 6.

Poprawność metody

Z uwagi na brak materiału referencyjnego dla oznaczeń elektrochemicznych kwasu 5-MTHF, poprawność metody zweryfikowano badając odzysk. Do pięciu serii próbek (po 5 każda) dodawano wzrastające ilości roztworu wzorcowego 5-MTHF, odpowiadające kolejno: 5, 10, 20, 30 i 50 nmol/l. Średnia wartość odzysku dla poszczególnych serii (od 1 do 5) wynosiła: $86,8 \pm 1,8\%$; $89,9 \pm 1,3\%$; $93,7 \pm 0,9\%$; $94,6 \pm 1,3\%$ oraz $93,8 \pm 1,7\%$.

Tabela 6. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji ($n = 9$) 5-MTHF w osoczu oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	5-MTHF
zakres oznaczalności [nmol/l]	2,5 - 50
wyraz wolny	0,11
współczynnik kierunkowy prostej	0,0634
współczynnik korelacji (r)	0,9997
granica wykrywalności [nmol/l]	0,789
granica oznaczalności [nmol/l]	2,367



Rycina 12. Przykładowy chromatogram próbki osocza z oznaczonym stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF, t_R 10,5 min., 18,75 nmol/l), zakres sygnału 500 nA.

3.2.7. Oznaczanie stężenia witaminy B₆ jako sumy pirydoksalu i fosforanu-5'-pirydoksalu oraz kwasu 4-pirydoksynowego w osoczu

Zasada oznaczenia

Stężenia pirydoksalu, fosforanu-5'-pirydoksalu i kwasu 4-pirydoksynowego oznaczano równocześnie metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną kulometryczną, sprzęgniętą z detekcją UV-Vis, po odbiałczeniu osocza kwasem chlorowym (VII) i doprowadzeniu próbek końcowych do pH 4,5.

Odczynniki

- Pirydoksalu chlorowodorek, Fluka;
- Pirydoksalu-5-fosforan, Fluka;
- Kwas 4-pirydoksynowy, Sigma Aldrich;
- Kwas chlorowy (VII), 70 %, Merck;
- Sól disodowa kwasu etylenodiaminoczteroocowego (EDTA), POCh;
- Wodorotlenek sodu, Sigma Aldrich;
- Wodorofosforan sodu, siedmiowodny, Sigma Aldrich;
- Kwas o-fosforowy 85 %, Riedel-de-Haën;

- Metanol, HPLC Analyzed, J.T. Baker;
- Woda dejonizowana 18 mΩ, Millipore Milli-Q.

Aparatura

- Przygotowanie próby: probówki heparynowe do próżniowego pobierania krwi Vacuette, Austria; wirówki MPW-300, MPW-50, Mechanika Precyzyjna W-wa, Vortex, IKA, Niemcy;
- Przygotowanie fazy ruchomej: pehametr N 5172, Teleko, Polska, system próżniowego sączenia fazy ruchomej, Kontem Ultra-ware, Niemcy, sączki membranowe 0,22 μm, Millipore;
- Zestaw HPLC: pompa P 580 (Dionex), piec termostatujący STH 585 (Dionex), wstrzykiwacz ręczny Rheodyne 7725i, detektor elektrochemiczny kulometryczny Coulochem II z zestawem elektrod analitycznych, model 5010 (ESA) i elektrody ochronnej, model 5020 (ESA), detektor UV-Vis DAD 340S (Dionex) oraz kolumna Thermo Hypersil BDS C18 5 μ (250 x 4,6 mm).

Przygotowanie próbek do oznaczenia

Pobierano 0,5 ml osocza, otrzymanego przez odwirowanie krwi pełnej (15 min., 4000 obr./min). Próbkę odbiałczano, dodając nadmiar 0,8 mol/l kwasu chlorowego (VII) z 1 mmol/l EDTA (0,8 ml do 0,5 ml osocza). Proces odbiałczania prowadzono w obniżonej temperaturze przez 15 minut. Następnie próbki odwirowywano (5 min., 15000 obr/min), zbierano roztwór nad osadem doprowadzono do pH 4,5 za pomocą 50 mmol/l NaOH. Następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze – 80 °C do czasu wykonania analizy HPLC. Przygotowanie każdej próbki powtarzano 3-krotnie.

Woltamogramy hydrodynamiczne dla pirydoksalu, fosforanu-5-pirydoksalu i kwasu 4-pirydoksynowego

Dla wszystkich trzech form witaminy B₆ uzyskano podobne odpowiedzi detektora, w zależności od przyłożonego napięcia do elektrod. Związki utleniały się przy potencjale +0,35 V, a efekt plateau występował przy potencjałach: +0,80 V dla pirydoksalu i fosforanu-5-pirydoksalu oraz +0,75 V dla kwasu 4-pirydoksynowego. Na tej podstawie ustalono parametry detekcji elektrochemicznej: potencjał elektrody roboczej, pracującej jako elektroda osłaniająca +0,85 V, potencjał pierwszej elektrody roboczej, pracującej jako elektroda ekranująca +0,35 V, potencjał elektrody roboczej, z której zbierano właściwy sygnał +0,80 V.

Z uwagi na niskie stężenia fizjologiczne badanych form witamin [nmol/l] oraz możliwość interferencji z innymi związkami obecnymi w próbkach (ze względu na wysoki

potencjał utleniający analitów), po ustaleniu odpowiednio dobranych warunków rozdziału chromatograficznego, zdecydowano o zmianie zakresu sygnału aparatu w trakcie analizy chromatograficznej, początkowo z 10 μ A do 1 μ A, docelowo do 200 nA dla pirydoksalu i fosforanu-5-pirydoksalu, potem ponownie do 1 μ A dla kwasu 4-pirydoksynowego, (ryc. 9,10). Czas potrzebny do ustalenia się linii podstawowej bez wyraźnego dryfu wynosił 3 dni.

Ponieważ stężenia analitów w każdej prezentowanej w pracy metodzie chromatograficznej są wyliczane na podstawie powierzchni pików chromatograficznych, a nie ich wysokości, ewentualny dryf linii podstawowej, o ile nie wpływa zasadniczo na jakość otrzymanych chromatogramów, nie ma większego znaczenia i jest normalnym zjawiskiem w detekcji elektrochemicznej [Flanagan, 2005]. Akwizycji wszystkich chromatogramów oraz ich integracji dokonywano za pomocą programu Chromeleon System 6,20 (Dionex).

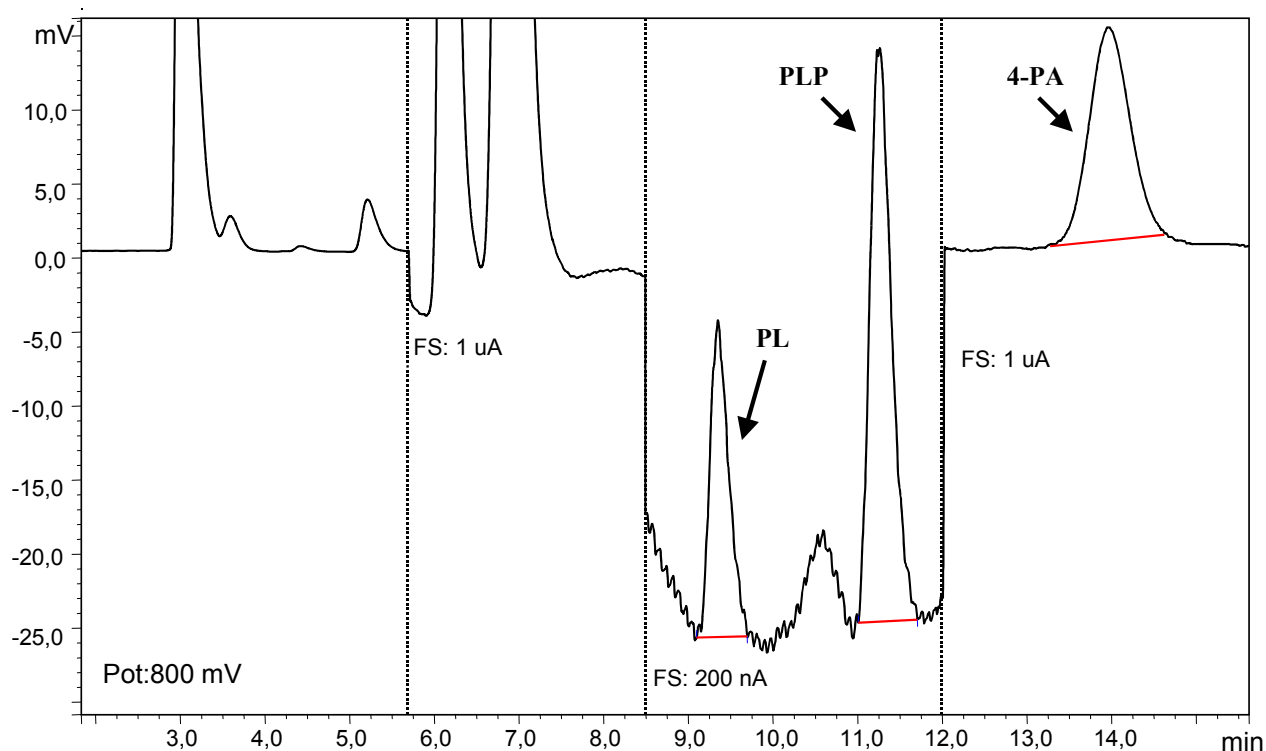
Warunki chromatograficzne

Separacji chromatograficznej dokonywano w przebiegu izokratycznym, z prędkością przepływu fazy ruchomej 1 ml/min., na kolumnie Thermo Hypersil BDS C18 5 μ (250 x 4,6 mm). Mieszaninę eluującą stanowił 40 mM bufor fosforanowy z metanolem (88:12 v/v) o pH 3,7, uzyskanym za pomocą stężonego kwasu fosforowego. Rozdziały chromatograficzne wykonywano w temperaturze pokojowej. Detektor UV-Vis, który połączony był modułowo z detektorem elektrochemicznym, pełnił rolę pomocniczą w identyfikacji oznaczanych związków w fortyfikowanych próbkach osocza, podczas badania poprawności zastosowanej metody.

W czasach retencji pirydoksalu (t_R 9,5 min.), fosforanu-5-pirydoksalu (t_R 11,5 min.), kwasu 4-pirydoksynowego (t_R 14,1 min.), nie obserwowano interferencji spowodowanej innymi substancjami. Całkowity czas analizy wyniósł 16,0 min. Przykładowe chromatogramy próbek osocza, wraz ze zmianami sygnału aparatu podczas trwania cyklu analizy, przedstawiono na rycinach 13 i 14. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji oraz granicę wykrywalności i oznaczalności metody przedstawiono w tabeli 7.

Poprawność metody

Poprawność metody zweryfikowano w oparciu o analizę pirydoksalu i fosforanu-5-pirydoksalu w certyfikowanym materiale referencyjnym Clin Chek[®] Plasma Control, Level I, II, III (Recipe, Niemcy), uzyskując zadowalający średni odzysk od 90,5 do 96,7% dla PL i 92,8 – 99,6% dla PLP z sześciu powtórzeń każdej oznaczanej serii. Wyniki analizy materiału referencyjnego zaprezentowano w tabeli 8.

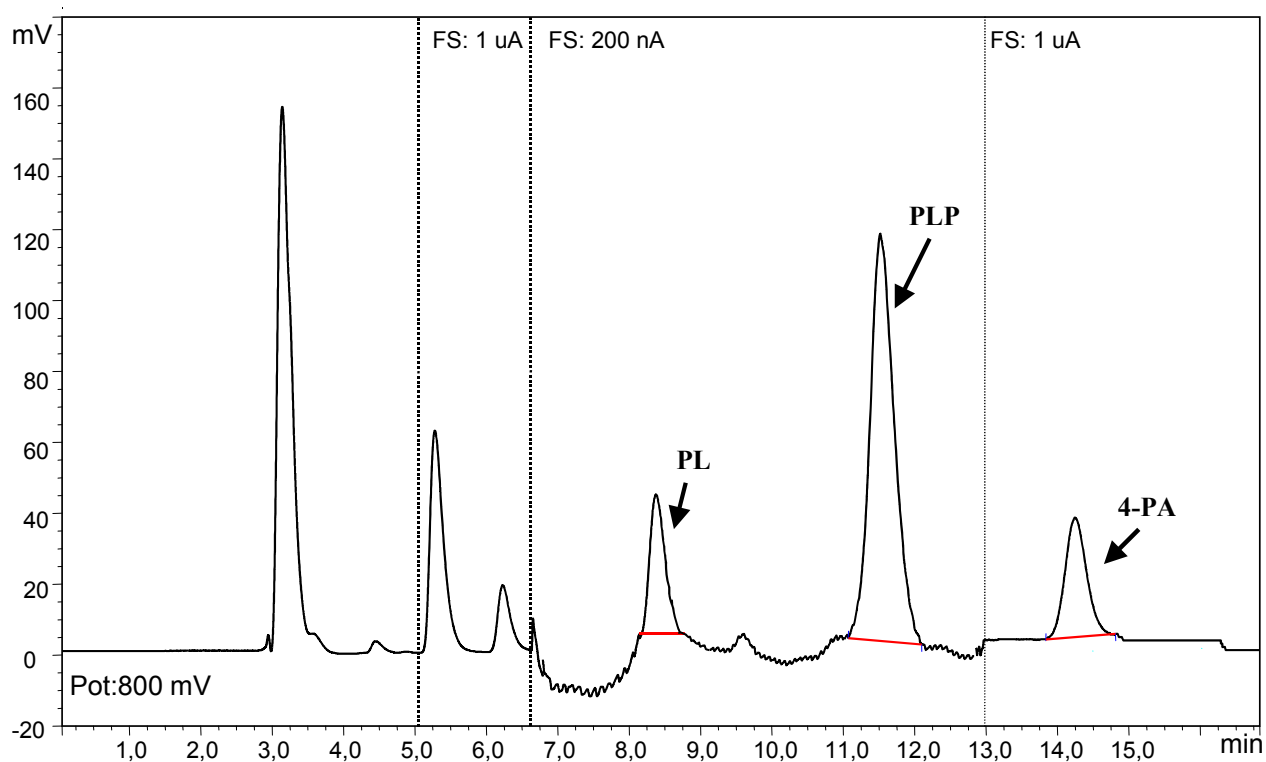


Rycina 13. Przykładowy chromatogram próbki osocza z oznaczonymi stężeniami pirydoksalu (PL, t_R 9,5 min., 10,78 nmol/l), fosforanu-5-pirydoksalu (PLP, t_R 11,5 min., 34,21 nmol/l), kwasu 4 –pirydoksynowego (4-PA, t_R 14,1 min, 62,09 nmol/l). Zakresy sygnału aparatu dla PL i PLP 200 nA, dla 4-PA 1 μ A.

Tabela 7. Parametry analityczne uśrednionych krzywych kalibracji ($n = 9^*$) PL, PLP i 4-PA w osoczu oraz granica wykrywalności i oznaczalności metody.

Parametr analityczny	PL	PLP	4-PA
Zakres oznaczalności [nmol/l]	1 - 70	20 - 200	15 - 300
Wyraz wolny	-0,427	0,016	-0,021
Współczynnik kierunkowy prostej	1,04	0,426	0,159
Współczynnik korelacji (r)	0,9994	0,9996	0,9993
Granica wykrywalności [nmol/l]	0,319	0,096	0,581
Granica oznaczalności [nmol/l]	0,971	0,292	1,844

*dla każdego oznaczanego związku wykonano 9 krzywych kalibracyjnych, po 3 krzywe dla 3 serii oznaczeń



Rycina 14. Przykładowy chromatogram próbki osocza materiału referencyjnego ClinCheck® Level II z oznaczonymi stężeniami pirydoksalu (PL, t_R 8,5 min., 63,2 nmol/l), fosforanu-5-pirydoksalu (PLP, t_R 11,5 min., 112,8 nmol/l), kwasu 4 –pirydoksynowego (4-PA, t_R 14,1 min, 106,73 nmol/l). Zakresy sygnału aparatu dla PL i PLP 200 nA, dla 4-PA 1 µA.

Tabela 8. Wyniki analizy pirydoksalu (PL) i fosforanu-5-pirydoksalu (PLP) w certyfikowanym materiale referencyjnym Clin Chek® Plasma Control, Level I, II, III.

Oznaczany związek /poziom oznaczenia	Liczba wykonanych prób (n)	Deklarowana zawartość witaminy x min ÷ max	Oznaczona zawartość witaminy x ± SD min ÷ max	RSD* [%]	Odzysk [%]
PL [nmol/l]					
Level I	6	29,4 (23,6 ÷ 35,3)	26,6 ± 2,1 (24,7 ÷ 29,7)	7,9	90,5
Level II	6	64,0 (51,2 ÷ 76,6)	61,9 ± 3,1 (56,7 ÷ 64,5)	5,0	96,7
Level III	6	98,1 (74,8 ÷ 118,0)	93,2 ± 2,6 (89,9 ± 95,1)	2,8	95,0
PLP[nmol/l]					
Level I	6	72,0 (57,5 ÷ 86,6)	69,4 ± 2,2 (66,9 ÷ 72,8)	3,2	96,4
Level II	6	113,0 (90,2 ÷ 136,0)	112,5 ± 3,6 (107,9 ÷ 118,9)	3,2	99,6
Level III	6	158,0 (127,0 ÷ 190,0)	146,6 ± 3,8 (141,2 ÷ 150,1)	2,6	92,8

*RSD – współczynnik zmienności

3.2.8. Obliczenia matematyczno-statystyczne

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono wykorzystując program Statistica 7,1 (wersja polska dla Windows, StastSoft® Kraków, Polska). Normalność rozkładu zmiennych zweryfikowano w oparciu o test W Shapiro-Wilka i Kołmogorowa-Smirnova. Wszystkie badane zmienne nie spełniały warunków rozkładu normalnego, w związku z czym stosowano nieparametryczne metody statystyczne. Wyniki badań zamieszczone w tabelach przedstawiano w postaci średnich arytmetycznych ± odchylenie standardowe. W celu sprawdzenia zależności pomiędzy badanymi grupami stosowano test U Manna – Whitneya. Zależności pomiędzy wartościami badanymi określano za pomocą współczynnika R-Spermana, z 95 % przedziałem ufności, zaznaczanym na rycinach w postaci przerywanych linii. Uzyskane wyniki uznawano za istotne statystycznie przy poziomie $p < 0,05$. Aby określić natężenie współzależności dwóch zmiennych, przyjęto następującą

skalę: $r = 0$ - zmienne nie są skorelowane; $0 < r_{xy} < 0,1$ – korelacja nikła; $0,1 < r_{xy} < 0,3$ – korelacja słaba; $0,3 < r_{xy} < 0,5$ – korelacja przeciętna; $0,5 < r_{xy} < 0,7$ – korelacja wysoka; $0,7 < r_{xy} < 0,9$ – korelacja bardzo wysoka; $0,9 < r_{xy} < 1,0$ – korelacja prawie pełna [Stanisz, 2006].

Ocenę wpływu czynników, na ustalonym poziomie istotności ($p < 0,05$), takich jak płeć, palenie tytoniu, czy dodatkowa suplementacja witaminami z grupy B na oznaczane parametry, przeprowadzano wykorzystując test ANOVA Kruskala-Wallisa, który w metodach nieparametrycznych jest odpowiednikiem jednoczynnikowej analizy wariancji.

W celu zobrazowania struktury danych, dotyczących znamiennych parametrów, posłużono się wielowymiarową techniką eksploracyjną – analizą czynnikową (metoda głównych składowych z rotacją varimax i normalizacją Kaisera). Analiza czynnikowa pozwala na zredukowanie dużej liczby zmiennych do niekorelujących ze sobą czynników, wzajemnie ortogonalnych [Stanisz 2005, Szefer 2007]. W tej metodzie statystycznej, czynniki generowane są kolejno, tak aby wyjaśnić jak najwięcej zmienności obserwowanych w zbiorze danych. W efekcie cała informacja zawarta w wielowymiarowym zbiorze skorelowanych zmiennych daje się zawrzeć w kilku pierwszych głównych składowych. Zgodnie z kryterium Kaisera ustalenia liczby czynników, w pracy pozostawiono główne składowe, które charakteryzowały się wartością własną większą niż 1.

4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

4.1. Charakterystyka osób zakwalifikowanych do badań

Ochotników zakwalifikowanych do badań przydzielono na podstawie oznaczonego stężenia kotyniny w moczu do grup: niepalących i nienarażonych na dym tytoniowy (grupa kontrolna), osób narażonych na dym tytoniowy (grupa biernych palaczy) oraz grupy czynnych palaczy. Parametry fizjologiczne badanych osób, takie jak wiek, płeć, wskaźnik masy ciała oraz oznaczone stężenie kreatyniny w moczu, przedstawiono w tabeli 9. Średnia wieku we wszystkich grupach była zbliżona i wynosiła odpowiednio 24,5; 26,1; 22,8 lat dla grupy niepalących, palaczy biernych i palaczy czynnych. Średnia wartość wskaźnika masy ciała była nieznacznie wyższa u palaczy czynnych od wartości granicznej ($25,0 \text{ kg/m}^2$), przyjmowanej w celu rozróżnienia osób z prawidłową masą ciała i nadwagą. Wyniki oznaczonego stężenia kreatyniny w moczu mieściły się w przedziale $0,6 - 1,4 \text{ }\mu\text{g/ml}$, przyjętym za przedział prawidłowy dla porannej zbiórki moczu.

W tabeli 10 przedstawiono średnie stężenia kotyniny w moczu oraz średnie wartości stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu dla wszystkich badanych grup, jak i dla wyodrębnionych grup kobiet i mężczyzn. Zarówno w grupie palaczy biernych, jak i czynnych odnotowano znamienny wzrost stężenia kotyniny w moczu, w porównaniu z grupą osób niepalących. Stężenie kotyniny w moczu w grupie biernych i czynnych palaczy wzrasta odpowiednio 11,5 - oraz 90,1 - krotnie w odniesieniu do grupy niepalących. Podobne relacje odnotowano w wypadku wartości stosunku stężeń kotynina/kreatynina – wzrost 12,5 - oraz 92,5 - krotny w odniesieniu do niepalących. Rozpatrując oddzielnie grupy kobiet i mężczyzn stwierdzono, że stężenie kotyniny oraz wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina są znacznie większe w grupie palących mężczyzn niż w grupie palących kobiet (wzrost odpowiednio 1,9 - oraz 2 - krotny).

Wykorzystując test ANOVA Kruskala–Wallisa, zaobserwowano statystycznie istotny wpływ płci ($H = 4,9$; $p < 0,05$) na stężenie kotyniny w moczu (ryc. 15). Współczynnik korelacji R-Spermana dla znamiennej ($p < 0,001$) zależności pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu, a stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu dla wszystkich osób badanych wynosi 0,921 (ryc. 16). Jest to więc korelacja prawie pełna.

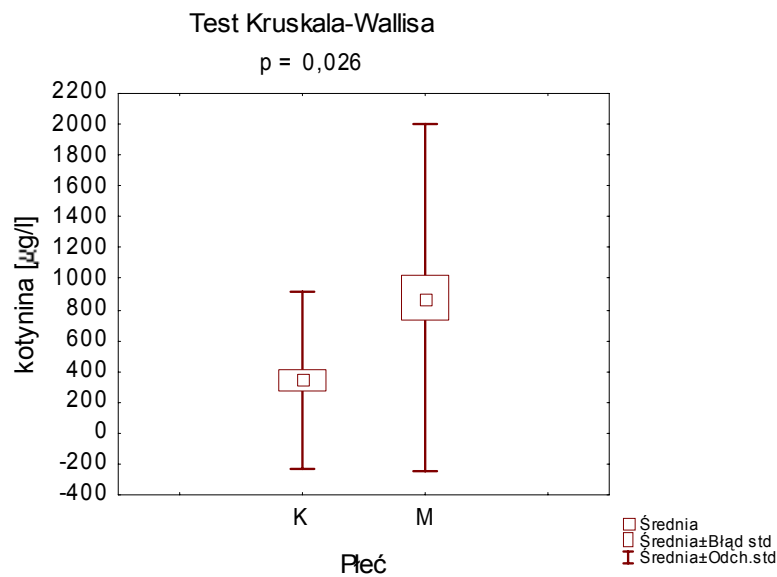
Tabela 9. Niektóre parametry fizjologiczne oraz stężenie kreatyniny w moczu osób badanych.

Parametr	Niepalący (n = 56)	Palacze bierni (n = 33)	Palacze czynni (n = 45)
Płeć (K/M)	34/22	20/13	20/25
Wiek (lata)	24,5 ± 2,7	26,1 ± 6,1	22,8 ± 3,7
Wskaźnik masy ciała [kg/m ²]	22,8 ± 4,1	24,4 ± 3,3	26,7 ± 2,7
Kreatynina w moczu [μg/ml]	1,21 ± 0,3	1,15 ± 0,2	1,19 ± 0,4

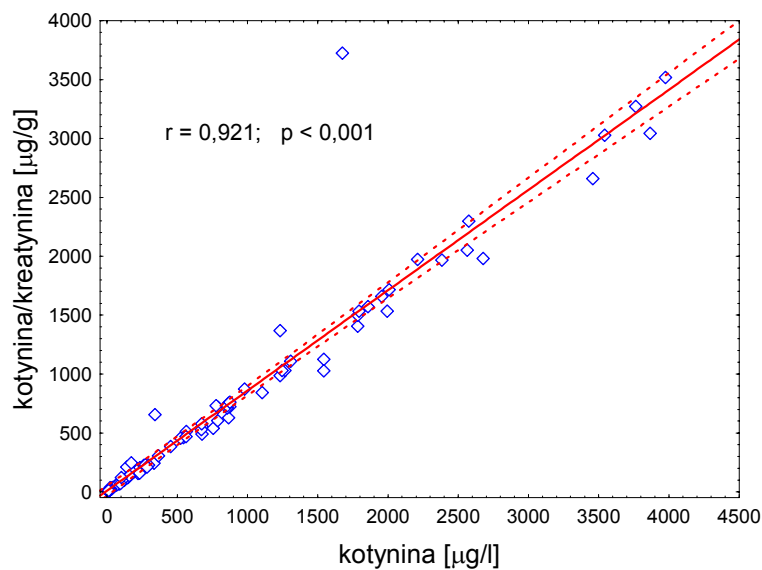
Tabela 10. Wyniki oznaczania stężenia kotyniny oraz wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Parametr - obiekt badań	Grupa		
	Niepalący x ± SD	Palacze bierni x ± SD	Palacze czynni x ± SD
	(min ÷ max)	(min ÷ max)	(min ÷ max)
	n	n	n
Kotynina [μg/l]			
Cała grupa	17,4 ± 8,1 (7,7 ÷ 43,8) 56	199,8 ± 95,5*** (61,2 ÷ 452,8) 33	1566,8 ± 980,4*** (523,2 ÷ 3974,2) 45
Kobiety	18,4 ± 9,7 (7,7 ÷ 43,8) 34	190,3 ± 17,7*** (83,8 ÷ 341,3) 20	1048,4 ± 737,9*** (523,2 ÷ 3457,1) 20
Mężczyźni	15,73 ± 4,6 (8,6 ÷ 26,8) 22	214,3 ± 118,6*** (61,2 ÷ 452,8) 13	1981,5 ± 963,3*** (674,4 ÷ 3974,2) 25
Kotynina/kreatynina [μg/g]			
Cała grupa	14,6 ± 7,7 (5,9 ÷ 38,1) 56	182,2 ± 112,9*** (53,2 ÷ 656,3) 33	1350,6 ± 898,3*** (454,9 ÷ 3723,3) 45
Kobiety	15,85 ± 9,1 (5,9 ÷ 38,1) 34	180,7 ± 124,3*** (66,9 ÷ 656,3) 20	857,2 ± 561,1*** (454,9 ÷ 2659,3) 20
Mężczyźni	12,63 ± 0,9 (6,72 ÷ 25,5) 22	184,4 ± 97,9*** (53,2 ÷ 383,8) 13	1745,4 ± 929,9*** (576,4 ÷ 3723,3) 25

*** p<0,001 w porównaniu z grupą niepalących; x ± SD wartość średnia i jej odchylenie standardowe [μg/l]; n - liczebność grupy



Rycina 15. Wynik testu ANOVA Kruskala-Wallisa wpływ płci na stężenie kotyniny w moczu [µg/l], K – kobiety, M – mężczyźni; ($H = 4,9$; $p < 0,05$).



Rycina 16. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu dla całej badanej grupy wraz z 95 % przedziałem ufności.

4.2. Stężenie homocysteiny w osoczu

Stężenie homocysteiny w osoczu przedstawiono w tabeli 11 oraz na rycinie 17 dla całych badanych grup osób, jak również, w poszczególnych grupach, oddzielnie dla kobiet i mężczyzn. Znamiennej różnicę stężenia homocysteiny zaobserwowano w całej grupie osób

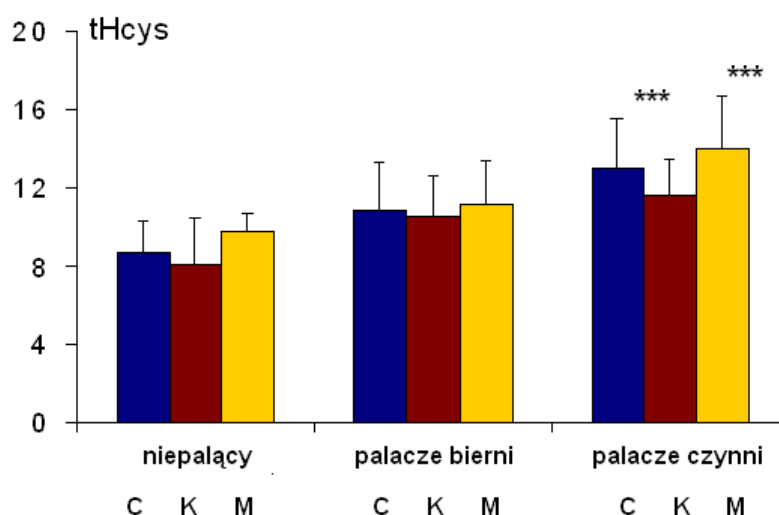
palących ($p < 0,001$), w odniesieniu do grupy niepalących. W badanych grupach, podzielonych według płci, zaobserwowano znamienne wyższe stężenia homocysteiny w grupie palących mężczyzn ($p < 0,001$).

Wykorzystując test ANOVA Kruskala – Wallisa zaobserwowano statystycznie istotny wpływ płci ($H = 13,8$; $p < 0,001$) oraz palenia tytoniu ($H = 41,9$; $p < 0,001$) na stężenie homocysteiny w osoczu (ryc. 18 A, B).

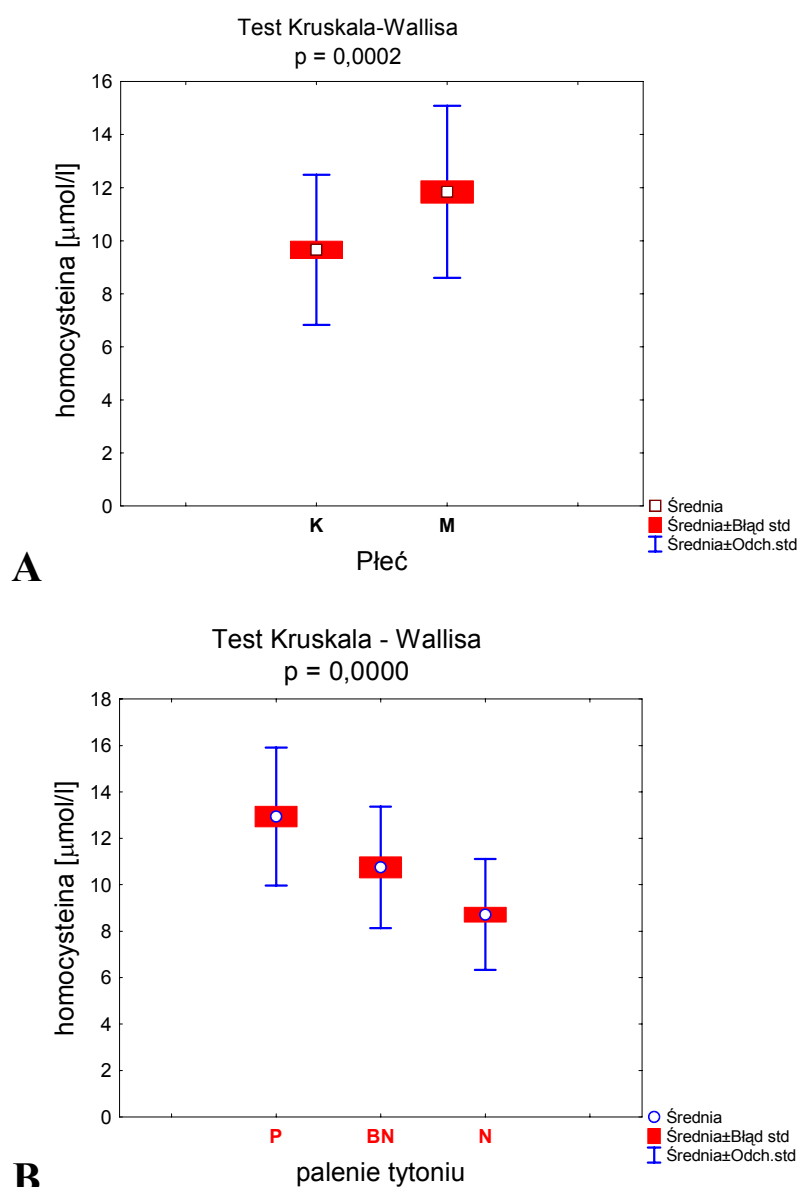
Tabela 11. Wyniki oznaczania całkowitego stężenia homocysteiny w osoczu.

Obiekt badań	Grupa		
	Niepalący	Palacze bierni	Palacze czynni
	$x \pm SD$ (min ÷ max)	$x \pm SD$ (min ÷ max)	$x \pm SD$ (min ÷ max)
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
Cała grupa	$8,72 \pm 2,38$ (3,55 ÷ 13,96) 56	$10,82 \pm 2,65$ (6,29 ÷ 15,81) 45	$12,94 \pm 2,97^{***}$ (7,98 ÷ 20,05) 45
Kobiety	$8,02 \pm 2,77$ (3,55 ÷ 11,72) 34	$10,51 \pm 2,57$ (7,43 ÷ 15,81) 20	$11,59 \pm 2,39$ (7,98 ÷ 15,93) 20
Mężczyźni	$9,79 \pm 2,18$ (5,92 ÷ 13,96) 22	$11,12 \pm 2,74$ (6,29 ÷ 15,53) 13	$14,02 \pm 2,98^{***}$ (7,98 ÷ 20,05) 25

*** $p < 0,001$ w porównaniu z grupą niepalących; $x \pm SD$ wartość średnia i jej odchylenie standardowe [$\mu\text{mol/l}$]; *n* - liczebność grupy



Rycina 17. Stężenie homocysteiny w osoczu [$\mu\text{mol/l}$] całej badanej grupy (C), w grupie kobiet (K) oraz mężczyzn (M).



Rycina 18. Wyniki testu ANOVA Kruskala-Wallisa: A - wpływ płci na stężenie homocysteiny w osoczu [$\mu\text{mol/l}$], K – kobiety, M – mężczyźni, ($H = 13,8$; $p < 0,001$); B – wpływ palenia tytoniu na stężenie homocysteiny w osoczu [$\mu\text{mol/l}$], P – palacze czynni, BN – biernie narażeni, N – niepalący; ($H = 41,9$; $p < 0,001$).

4.3. Korelacja pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu

W grupie kontrolnej nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu, a stężeniem kotyniny w moczu oraz stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu. Natomiast w całych grupach palaczy biernych i czynnych wykazano dodatnie wartości współczynnika korelacji R-Spearmana, które były znamienne (tab. 12).

Analizując odrębnie grupy kobiet i mężczyzn biernie narażonych, nie stwierdzono tych korelacji. W grupie palaczy czynnych, zarówno u kobiet jak i mężczyzn, wszystkie korelacje były dodatnie i znamienne, zarówno w odniesieniu do stężenia kotyniny w moczu, jak i stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu. Wartości współczynnika korelacji r w grupie palaczy czynnych oscylują na granicy korelacji wysokiej lub bardzo wysokiej, natomiast w grupie palaczy biernie narażonych są przeciętne. Analiza korelacji liniowej pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu i kotyniny w moczu, pokazana na rycinie 19, wyraźnie wskazuje na stopniowy wzrost stężenia tHcys w osoczu, w miarę zwiększania narażenia na dym tytoniowy.

4.4. Stężenie glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi oraz stosunek stężeń obu form glutationu

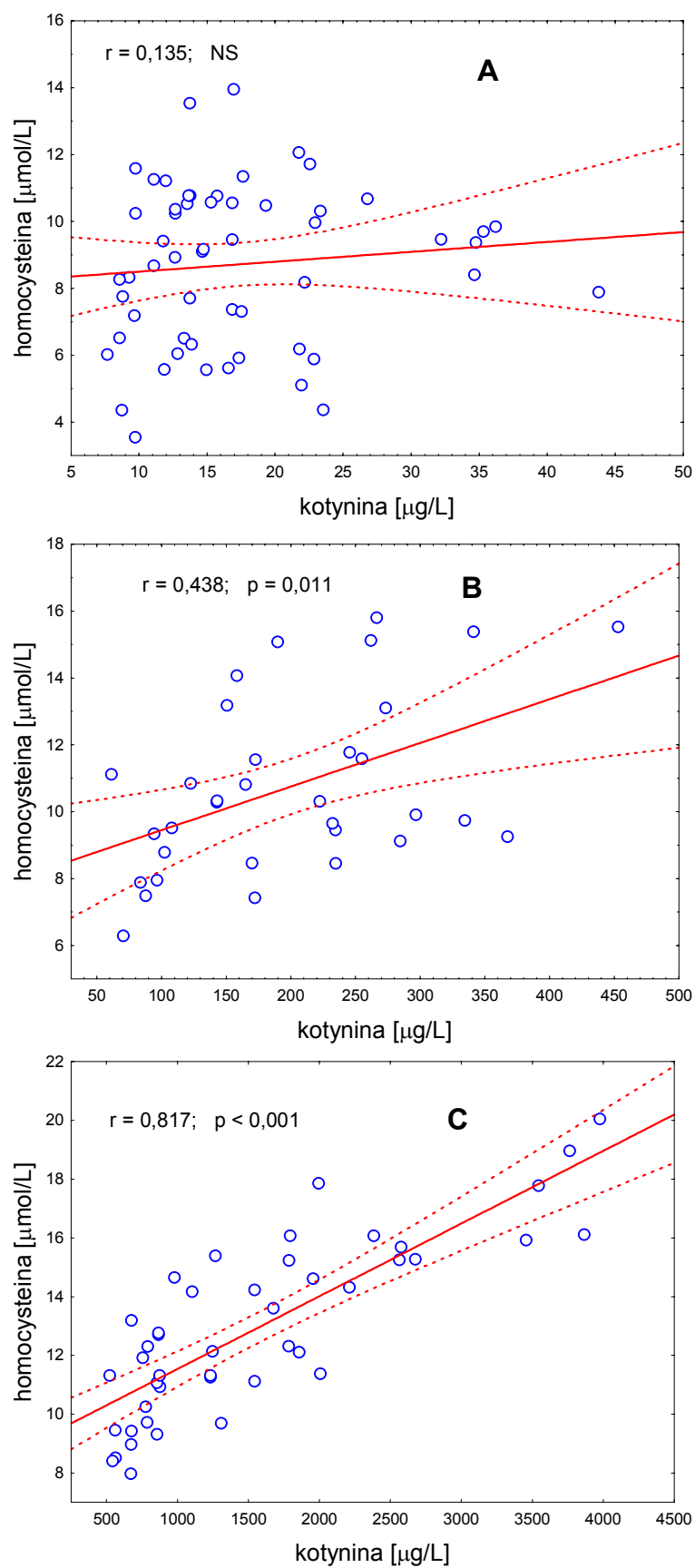
Wyniki oznaczenia stężenia glutationu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) we krwi oraz stosunek stężeń obu form glutationu przedstawiono w tabeli 13 i na rycinie 20. Podobnie jak w przypadku homocysteiny, stężenia obu form glutationu i stosunek ich stężeń analizowano w całych badanych grupach i oddzielnie w grupach kobiet i mężczyzn. W całej grupie palaczy biernych oraz w grupie mężczyzn biernie narażonych odnotowano niższe i znamienne stężenie GSH ($p < 0,05$). W całej grupie palaczy czynnych ($p < 0,01$), jak i oddzielnie w grupie kobiet i mężczyzn ($p < 0,05$), stężenia te też były niższe i znamienne.

Stężenie formy utlenionej glutationu było wyższe i znamienne i w całej grupie palaczy czynnych ($p < 0,001$), także w grupie kobiet ($p < 0,01$) oraz mężczyzn ($p < 0,001$). Analizując stosunek stężeń GSG do GSSH odnotowano znamienny i bardzo wysoki spadek w całej grupie palaczy czynnych oraz w grupach palących kobiet i mężczyzn ($p < 0,001$). W grupie palaczy biernie narażonych spadek ten jest mniejszy i znamienny dla całej grupy oraz dla grupy biernie narażonych mężczyzn ($p < 0,05$).

Tabela 12. Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa								
		Niepalący			Palacze bierni			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
Homocysteina [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina [$\mu\text{g/l}$]	Cała grupa	0,135	NS	$8,21 + 2,9 \cdot 10^{-2}x$	0,438	0,011	$8,14 + 1,3 \cdot 10^{-2}x$	0,817	<0,001	$9,07 + 2,5 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,224	NS	$7,01 + 5,5 \cdot 10^{-2}x$	0,426	NS	$7,64 + 1,5 \cdot 10^{-2}x$	0,668	0,0012	$9,23 + 2,3 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	0,041	NS	$9,75 + 3,4 \cdot 10^{-2}x$	0,384	NS	$8,69 + 1,1 \cdot 10^{-2}x$	0,824	<0,001	$9,02 + 2,5 \cdot 10^{-3}x$
Homocysteina [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	0,146	NS	$8,13 + 4,1 \cdot 10^{-2}x$	0,388	0,026	$8,62 + 1,2 \cdot 10^{-2}x$	0,777	<0,001	$9,57 + 2,5 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,296	NS	$6,67 + 7,9 \cdot 10^{-2}x$	0,272	NS	$8,64 + 1,0 \cdot 10^{-2}x$	0,661	0,0015	$9,14 + 2,9 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,017	NS	$9,58 - 3,2 \cdot 10^{-2}x$	0,473	NS	$8,36 + 1,5 \cdot 10^{-2}x$	0,712	<0,001	$10,02 + 2,3 \cdot 10^{-3}x$

NS – nieznamienna statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – stężenie homocysteiny, x – stężenie kotyniny lub wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej

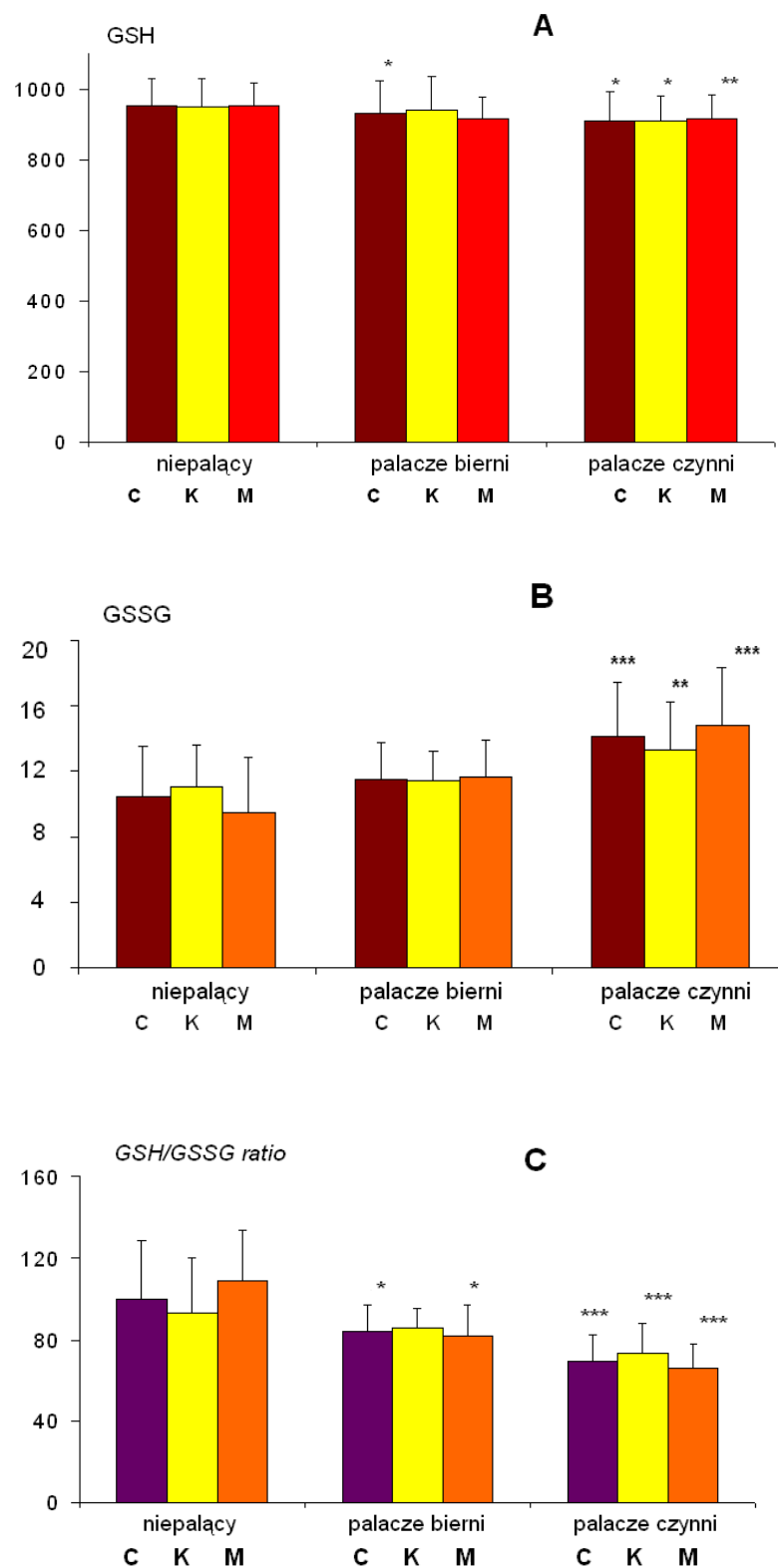


Rycina 19. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a stężeniem homocysteiny w osoczu całej grupy niepalących (A), biernie narażonych (B) i palaczy czynnych (C) wraz z 95 % przedziałem ufności.

Tabela 13. Wyniki oznaczania stężenia glutationu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) we krwi oraz stosunku stężeń formy zredukowanej do utlenionej (GSH/GSSG *ratio*).

Parametr - obiekt badań	Grupa		
	Niepalący	Palacze bierni	Palacze czynni
	$x \pm SD$	$x \pm SD$	$x \pm SD$
	(min ÷ max) <i>n</i>	(min ÷ max) <i>n</i>	(min ÷ max) <i>n</i>
GSH [$\mu\text{mol/l}$]			
Cała grupa	950,6 $\pm$ 56,0 (823,6 ÷ 1087,2) 56	930,7 $\pm$ 73,9* (834,9 ÷ 1106,2) 33	912,1 $\pm$ 58,7** (745,2 ÷ 1006,5) 45
Kobiety	949,5 $\pm$ 56,3 (823,6 ÷ 1087,2) 34	939,8 $\pm$ 81,1 (834,9 ÷ 1106,2) 20	907,1 $\pm$ 54,5* (745,2 ÷ 998,4) 20
Mężczyźni	952,2 $\pm$ 56,9 (843,7 ÷ 1067,2) 22	916,7 $\pm$ 61,8* (856,3 ÷ 1090,8) 13	915,9 $\pm$ 62,8* (784,9 ÷ 1006,5) 25
GSSG [$\mu\text{mol/l}$]			
Cała grupa	10,4 $\pm$ 3,1 (5,7 ÷ 18,5) 56	11,5 $\pm$ 2,6 (6,9 ÷ 16,7) 33	14,1 $\pm$ 3,4*** (8,3 ÷ 20,5) 45
Kobiety	11,0 $\pm$ 3,0 (5,7 ÷ 17,5) 34	11,4 $\pm$ 2,7 (7,3 ÷ 16,7) 20	13,3 $\pm$ 3,5** (8,5 ÷ 18,8) 20
Mężczyźni	9,5 $\pm$ 3,1 (6,3 ÷ 18,5) 22	11,6 $\pm$ 2,5 (6,9 ÷ 16,7) 13	14,8 $\pm$ 3,5*** (8,3 ÷ 20,5) 25
GSH/GSSG <i>ratio</i>			
Cała grupa	99,4 $\pm$ 29,6 (52,1 ÷ 170,6) 56	84,3 $\pm$ 19,0* (53,1 ÷ 136,3) 33	69,2 $\pm$ 20,9*** (41,9 ÷ 116) 45
Kobiety	93,3 $\pm$ 28,9 (52,1 ÷ 170,6) 34	85,6 $\pm$ 16,8 (62,4 ÷ 115,2) 20	73,1 $\pm$ 21,7*** (47,8 ÷ 114,5) 20
Mężczyźni	108,8 $\pm$ 28,6 (53,6 ÷ 165,1) 22	81,9 $\pm$ 22,5* (53,1 ÷ 136,3) 13	66,1 $\pm$ 20,1*** (41,9 ÷ 116) 25

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w porównaniu z grupą niepalących; $x \pm SD$ wartość średnia i jej odchylenie standardowe [$\mu\text{mol/l}$]; *n* - liczebność grupy



Rycina 20. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) - A, utlenionego (GSSG) - B we krwi oraz stosunek stężeń obu form glutationu – C w całej badanej grupie (C), w grupie kobiet (K) i mężczyzn (M).

4.5. Korelacja pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego, utlenionego we krwi i stosunkiem stężeń obu form a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu

W całej grupie osób niepalących wykazano dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego i stosunkiem stężeń GSH do GSSH a kotyniną oraz stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina (korelacja znamionna) oraz ujemne i znamienne korelacje pomiędzy stężeniem GSSG a kotyniną oraz stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu (tab. 14). Odwrotne korelacje – ujemne dla GSH i stosunku obu form glutationu oraz dodatnie dla GSSG w stosunku do stężenia kotyniny i stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu, zaobserwowano w grupach biernych i czynnych palaczy tytoniu.

Najsilniejsze znamienne korelacje uzyskano w całej grupie palaczy czynnych dla zależności GSSG oraz stosunku stężeń GSH/GSSG/kotynina i stosunku stężeń kotynina/kreatynina ($p < 0,001$). Na rycinie 21 przedstawiono przebieg korelacji liniowych pomiędzy stosunkiem stężeń we krwi obu form glutationu a stężeniem kotyniny w moczu dla całych grup osób niepalących, biernych i czynnych palaczy tytoniu.

4.6. Stężenie glutationu zredukowanego, utlenionego i całkowitego glutationu w osoczu

W tabeli 15 oraz na rycinie 22 przedstawiono wartości stężeń glutationu zredukowanego, utlenionego i całkowitego w osoczu. W całej badanej grupie nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w stężeniu glutationu zredukowanego w osoczu. Stężenia glutationu utlenionego oraz całkowitego glutationu (tGSH) w osoczu w grupie palaczy czynnych były wyższe i znamienne w stosunku do grupy niepalących. Największe i znamienne stężenia glutationu utlenionego i tGSH obserwowano w grupach mężczyzn palących ($p < 0,001$) oraz biernie narażonych ($p < 0,05$).

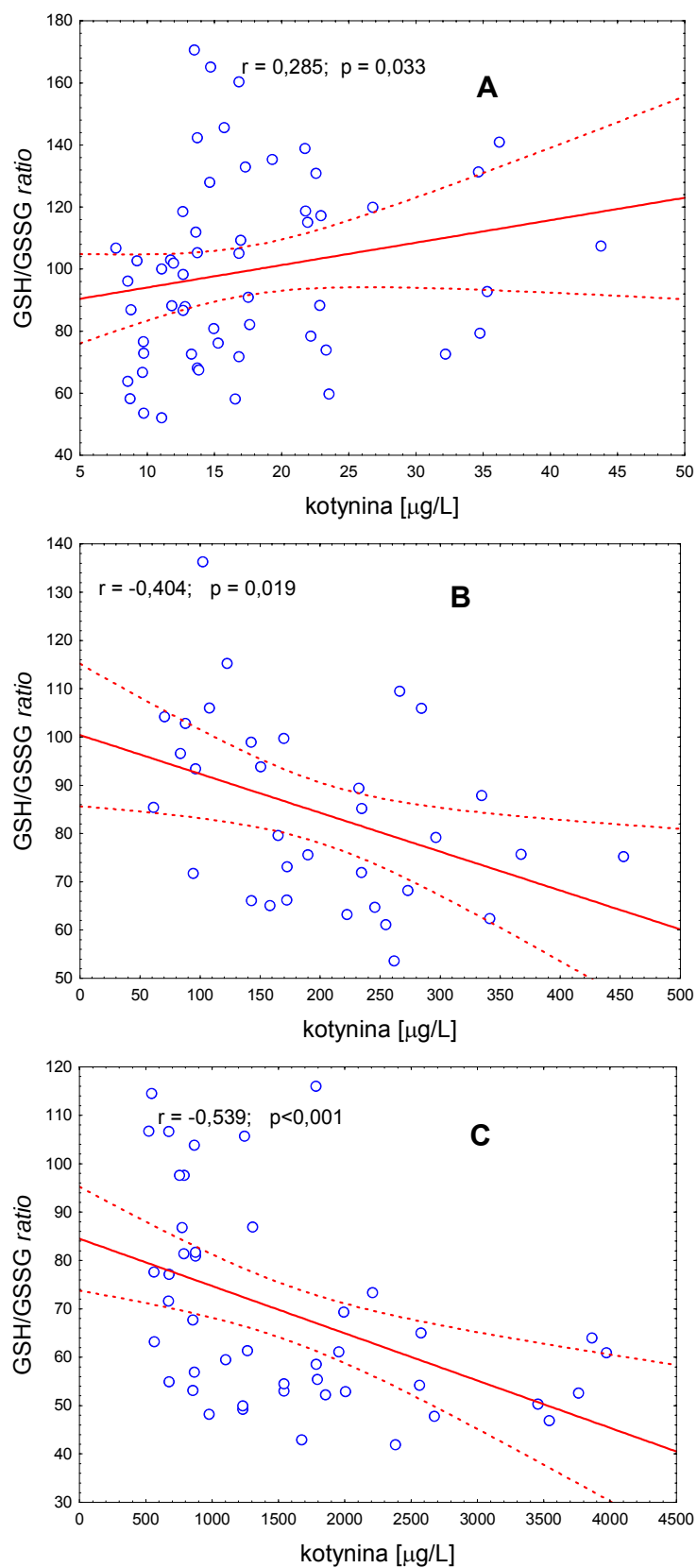
Wykorzystując test ANOVA Kruskala – Wallisa zaobserwowano statystycznie istotny wpływ płci na stężenie glutationu utlenionego w osoczu ($H = 20,9$; $p < 0,01$).

Tabela 14. Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniami glutationu zredukowanego (GSH), glutationu utlenionego (GSSG) oraz stosunkiem stężeń obu form glutationu (*ratio*) we krwi a stężeniem kotyniny oraz wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa								
		Niepalący			Palacze bierni			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
GSH [μmol/l] vs. kotynina [μg/l]	Cała grupa	0,019	NS	942,9 + 44,2 10 ⁻² x	-0,016	NS	942,8 – 6,1 10 ⁻² x	-0,137	NS	913,2 – 0,7 10 ⁻³ x
	Kobiety	-0,032	NS	946,6 + 16,2 10 ⁻² x	-0,005	NS	940,3 – 0,3 10 ⁻² x	-0,564	0,009	924,5 – 1,7 10 ⁻² x
	Mężczyźni	0,163	NS	909,7 + 2,7 x	-0,225	NS	933,2 – 7,7 10 ⁻² x	-0,05	NS	911,7 + 2,2 10 ⁻³ x
GSSG [μmol/l] vs. kotynina [μg/l]	Cała grupa	-0,286	0,033	11,9 – 8,6 10 ⁻² x	0,375	0,032	9,7 + 8,9 10 ⁻³ x	0,569	<0,001	11,2 + 1,9 10 ⁻³ x
	Kobiety	-0,297	NS	12,6 - 8,7 10 ⁻² x	0,416	NS	8,9 + 1,3 10 ⁻² x	0,628	0,003	10,4 + 2,8 10 ⁻³ x
	Mężczyźni	-0,307	NS	12,9 – 21,7 10 ⁻² x	0,275	NS	10,4 + 0,6 10 ⁻² x	0,452	0,023	11,7 + 1,6 10 ⁻³ x
GSH/GSSG vs. kotynina [μg/l]	Cała grupa	0,285	0,033	86,8 + 72,3 10 ⁻² x	-0,404	0,019	100,4 – 8,1 10 ⁻² x	-0,539	<0,001	84,5 – 9,8 10 ⁻³ x
	Kobiety	0,292	NS	79,6 + 74,6 10 ⁻² x	-0,516	0,020	104,7 – 9,9 10 ⁻³ x	-0,661	0,0015	88,8 – 1,5 10 ⁻² x
	Mężczyźni	0,378	NS	77,5 + 1,98 x	-0,187	NS	95,9 – 6,5 10 ⁻² x	-0,405	0,044	82,6 – 8,3 10 ⁻³ x

GSH [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	0,012	NS	$938,8 + 80,9 \cdot 10^{-2}x$	-0,138	NS	$938,2 - 4,110 \cdot 10^{-2}x$	-0,157	NS	$921,8 - 7,3 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	-0,033	NS	$942,0 + 47,5 \cdot 10^{-2}x$	-0,099	NS	$936,8 + 1,6 \cdot 10^{-2}x$	-0,454	0,044	$932,1 - 2,9 \cdot 10^{-2}x$
	Mężczyźni	0,141	NS	$903,7 + 3,84 x$	-0,434	NS	$950,4 - 1,8 \cdot 10^{-2}x$	-0,162	NS	$930,4 - 8,3 \cdot 10^{-3}x$
GSSG [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	-0,272	0,043	$11,8 - 9,4 \cdot 10^{-2}x$	0,322	NS	$9,9 + 8,4 \cdot 10^{-3}x$	0,572	<0,001	$11,3 + 2,1 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	-0,308	NS	$12,7 - 10,7 \cdot 10^{-2}x$	0,278	NS	$9,7 + 9,2 \cdot 10^{-2}x$	0,551	0,012	$10,3 + 3,5 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,348	NS	$16,3 - 38,2 \cdot 10^{-2}x$	0,264	NS	$10,5 + 6,4 \cdot 10^{-2}x$	0,531	0,006	$11,5 + 1,9 \cdot 10^{-3}x$
GSH/GSSG <i>ratio</i> vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	0,272	0,043	$86,9 + 85,3 \cdot 10^{-2}x$	-0,388	0,026	$99,3 - 6,6 \cdot 10^{-2}x$	-0,549	<0,001	$84,2 - 11,1 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,297	NS	$77,7 + 98,5 \cdot 10^{-2}x$	-0,430	NS	$97,1 - 6,2 \cdot 10^{-2}x$	-0,584	0,007	$90,1 - 19,9 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	0,398	NS	$83,9 + 1,96 x$	-0,286	NS	$95,8 - 7,5 \cdot 10^{-2}x$	-0,496	0,012	$83,4 - 9,9 \cdot 10^{-3}x$

NS – nieznamienna statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – stężenie glutationu zredukowanego, utlenionego lub stosunek stężeń obu jego form, x – stężenie kotyniny lub wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej

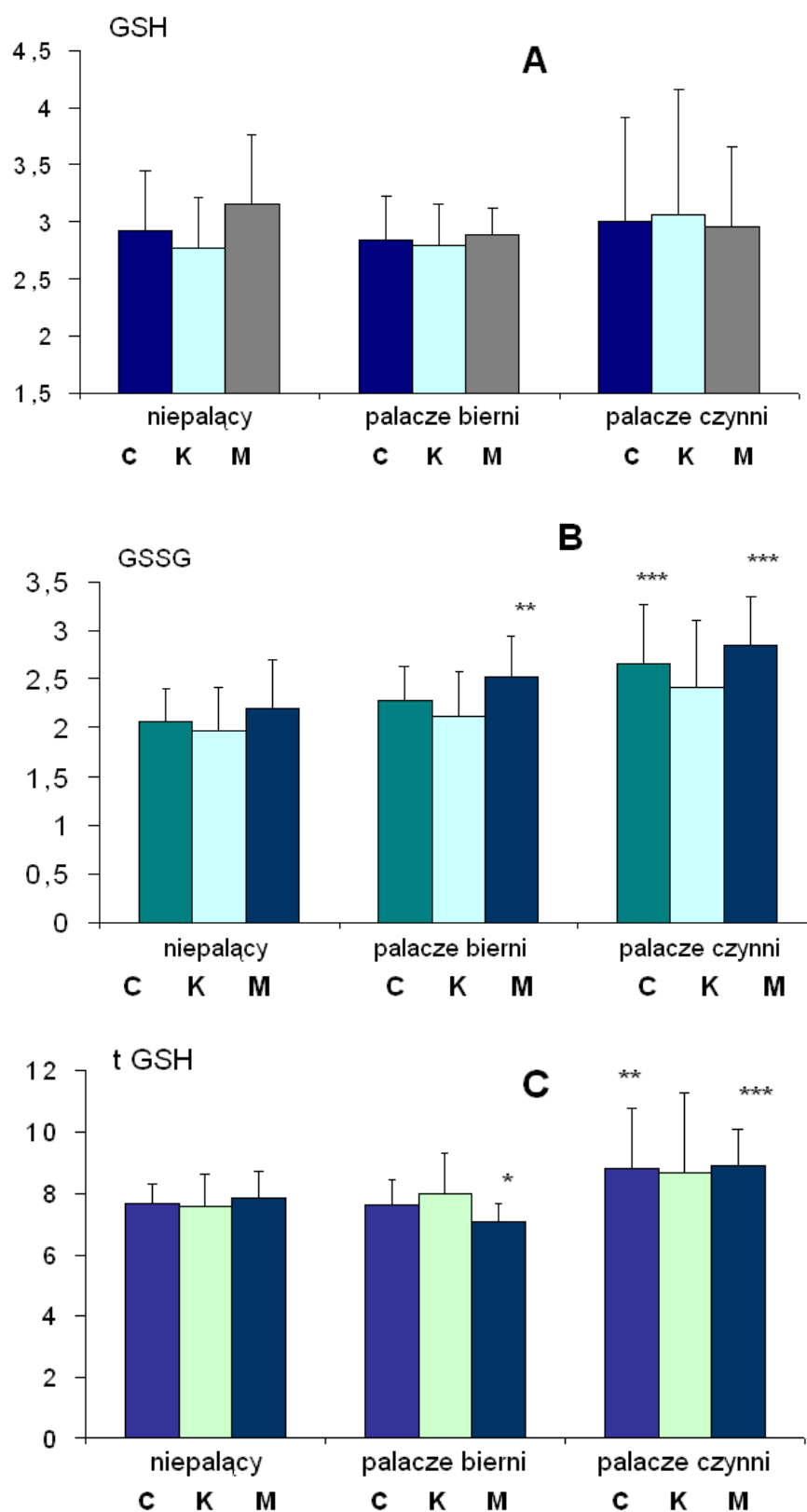


Rycina 21. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a stosunkiem stężeń glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH/GSSG *ratio*) we krwi całej grupy niepalących (A), biernie narażonych (B) i palaczy czynnych (C) wraz z 95 % przedziałem ufności.

Tabela 15. Wyniki oznaczania stężenia glutationu zredukowanego (GSH), utlenionego (GSSG) oraz całkowitego glutationu (tGSH) w osoczu.

Parametr - obiekt badań	Grupa		
	Niepalący	Palacze bierni	Palacze czynni
	x ± SD	x ± SD	x ± SD
	(min ÷ max) n	(min ÷ max) n	(min ÷ max) n
GSH [μmol/l]			
Cała grupa	2,92 ± 0,6 (1,79 ÷ 4,11) 56	2,84 ± 0,4 (1,96 ÷ 3,54) 33	3,01 ± 0,9 (1,75 ÷ 6,16) 45
Kobiety	2,77 ± 0,5 (1,79 ÷ 3,83) 34	2,79 ± 0,4 (1,96 ÷ 3,54) 20	3,06 ± 1,1 (1,96 ÷ 6,16) 20
Mężczyźni	3,15 ± 0,6 (1,89 ÷ 4,11) 22	2,89 ± 0,3 (2,31 ÷ 3,32) 13	2,96 ± 0,7 (1,75 ÷ 4,56) 25
GSSG [μmol/l]			
Cała grupa	2,06 ± 0,4 (1,14 ÷ 2,89) 56	2,28 ± 0,4 (1,56 ÷ 3,12) 33	2,66 ± 0,6*** (1,64 ÷ 3,89) 45
Kobiety	1,97 ± 0,4 (1,14 ÷ 2,83) 34	2,11 ± 0,4 (1,56 ÷ 3,06) 20	2,41 ± 0,7 (1,64 ÷ 3,87) 20
Mężczyźni	2,19 ± 0,5 (1,15 ÷ 2,89) 22	2,53 ± 0,4** (1,95 ÷ 3,12) 13	2,85 ± 0,5*** (2,06 ÷ 3,89) 25
t GSH [μmol/l]			
Cała grupa	7,67 ± 1,1 (5,06 ÷ 9,62) 56	7,62 ± 1,3 (5,38 ÷ 11,25) 33	8,77 ± 1,9** (5,21 ÷ 13,56) 45
Kobiety	7,56 ± 1,2 (5,06 ÷ 9,59) 34	7,97 ± 1,4 (5,38 ÷ 11,25) 20	8,66 ± 2,6 (5,21 ÷ 13,56) 20
Mężczyźni	7,83 ± 1,1 (5,21 ÷ 9,62) 22	7,08 ± 0,9* (5,54 ÷ 8,32) 13	8,86 ± 1,2*** (6,54 ÷ 11,58) 25

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 w porównaniu z grupą niepalących; x ± SD wartość średnia i jej odchylenie standardowe [μmol/l]; n - liczebność grupy



Rycina 22. Stężenie glutationu zredukowanego [$\mu\text{mol/l}$] (A), utlenionego [$\mu\text{mol/l}$] (B) oraz całkowitego glutationu w osoczu [$\mu\text{mol/l}$] (C) w całej badanej grupie (C), w grupie kobiet (K) oraz mężczyzn (M).

4.7. Korelacja pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego, utlenionego i całkowitego w osoczu a kotyniną w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu

W grupie kontrolnej i w grupie biernie narażonych palaczy nie stwierdzono znamiennych korelacji pomiędzy stężeniami oznaczanych form glutationu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu. Odnotowano natomiast korelacje przeciętne i wysokie oraz znamienne w grupie palaczy czynnych dla glutationu utlenionego i całkowitego a wielkością narażenia na dym tytoniowy ($p < 0,001$, tab. 16). Na rycinie 23 przedstawiono przebieg korelacji liniowej między stężeniem glutationu utlenionego w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu w badanych grupach niepalących, biernie narażonych i palących.

4.8. Stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu

Podobnie jak w przypadku oznaczeń kotyniny, homocysteiny oraz różnych form glutationu, stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF) w osoczu zaprezentowano oddzielnie w grupach kobiet i mężczyzn oraz całych badanych grupach (tab. 17, ryc. 24). Zaobserwowano znamienne niższe stężenia 5-MTHF w grupach biernie narażonych i czynnych palaczy oraz w grupach kobiet i mężczyzn ($p < 0,001$); w grupie kobiet palaczy czynnych poziom istotności był niższy ($p < 0,01$).

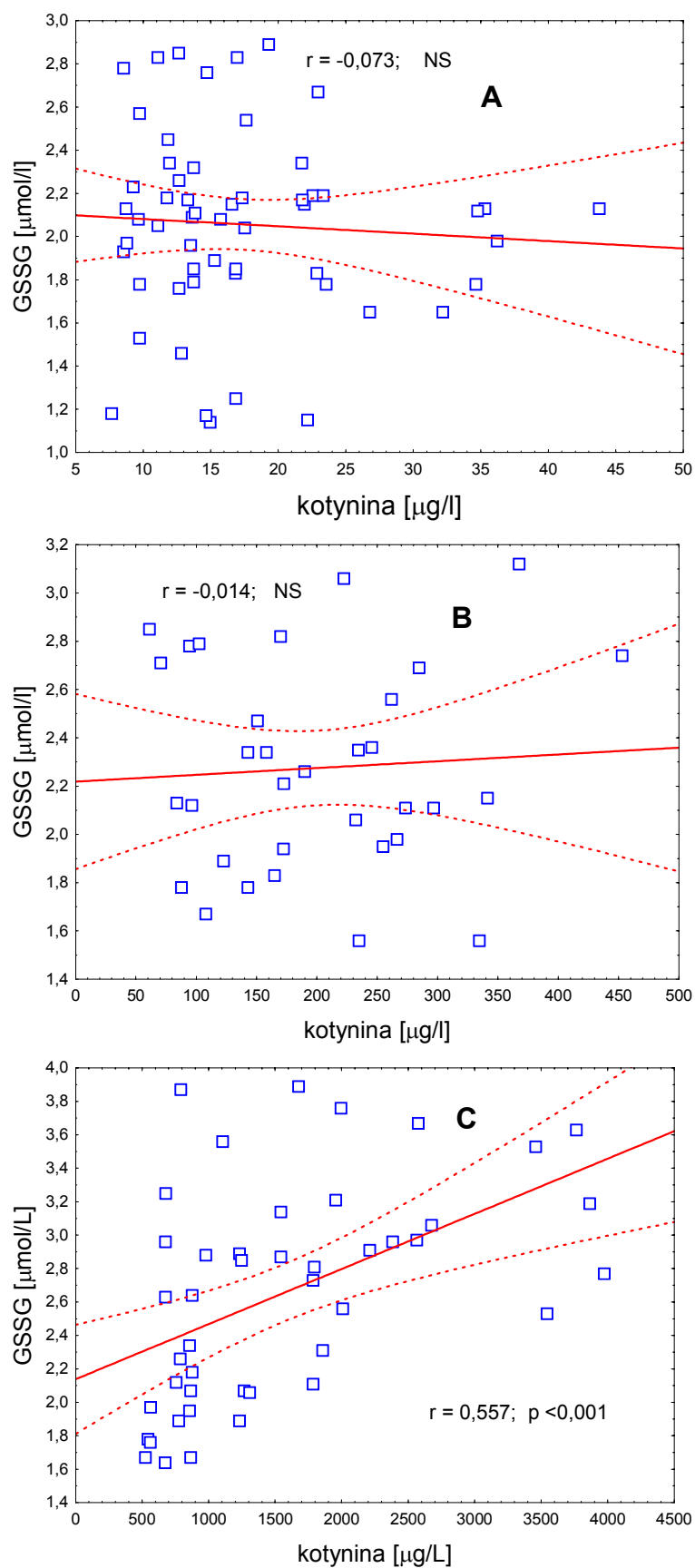
Wykorzystując test ANOVA Kruskala – Wallisa zaobserwowano statystycznie istotny wpływ płci ($H = 34,9$; $p < 0,001$), wpływ palenia tytoniu ($H = 48,7$; $p < 0,001$), natomiast nie wykazano wpływu suplementacji witamin z grupy B (0,13; NS) na stężenie 5-MTHF w osoczu. Wyniki testu przedstawiono na rycinie 25.

Tabela 16 . Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniem glutationu zredukowanego (GSH), utlenionego (GSSG) i całkowitego (tGSH) w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa								
		Niepalący			Palacze bierni			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
GSH [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina [$\mu\text{g/l}$]	Cała grupa	0,094	NS	$2,78 + 7,9 \cdot 10^{-3}x$	0,015	NS	$2,82 + 0,8 \cdot 10^{-3}x$	-0,010	NS	$3,18 - 0,1 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,098	NS	$2,57 + 11,1 \cdot 10^{-3}x$	0,265	NS	$2,58 + 1,2 \cdot 10^{-3}x$	0,066	NS	$2,85 + 0,2 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	0,197	NS	$2,85 + 1,9 \cdot 10^{-2}x$	-0,264	NS	$3,10 - 0,8 \cdot 10^{-3}x$	-0,232	NS	$3,47 - 0,3 \cdot 10^{-3}x$
GSSG [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina [$\mu\text{g/l}$]	Cała grupa	-0,073	NS	$2,11 - 3,4 \cdot 10^{-3}x$	-0,014	NS	$2,22 + 0,3 \cdot 10^{-3}x$	0,557	<0,001	$2,14 + 0,3 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	-0,004	NS	$1,92 + 2,8 \cdot 10^{-3}x$	0,108	NS	$2,10 + 0,1 \cdot 10^{-3}x$	0,501	0,024	$1,92 + 0,5 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,163	NS	$2,66 - 2,9 \cdot 10^{-2}x$	-0,165	NS	$2,55 - 0,8 \cdot 10^{-3}x$	0,442	0,027	$2,44 + 0,2 \cdot 10^{-3}x$
t GSH [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina [$\mu\text{g/l}$]	Cała grupa	-0,006	NS	$7,76 - 5,3 \cdot 10^{-3}x$	-0,208	NS	$8,08 - 2,3 \cdot 10^{-3}x$	0,474	<0,001	$7,51 + 0,8 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,036	NS	$7,63 - 2,9 \cdot 10^{-3}x$	-0,104	NS	$8,3 - 1,9 \cdot 10^{-3}x$	0,652	0,002	$6,1 + 2,5 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,005	NS	$7,86 - 2,4 \cdot 10^{-3}x$	-0,165	NS	$7,43 - 1,7 \cdot 10^{-3}x$	0,325	NS	$8,3 + 0,3 \cdot 10^{-3}x$

GSH [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	0,051	NS	$2,79 + 9,1 \cdot 10^{-3}x$	-0,083	NS	$2,82 + 0,8 \cdot 10^{-3}x$	0,034	NS	$3,14 - 0,1 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,066	NS	$2,55 + 11,4 \cdot 10^{-3}x$	0,182	NS	$2,69 + 0,5 \cdot 10^{-3}x$	<0,001	NS	$2,92 + 0,2 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	0,111	NS	$2,95 + 1,6 \cdot 10^{-2}x$	-0,522	NS	$3,18 - 1,6 \cdot 10^{-3}x$	-0,274	NS	$3,42 - 0,3 \cdot 10^{-3}x$
GSSG [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	-0,121	NS	$2,12 - 4,5 \cdot 10^{-3}x$	-0,082	NS	$2,28 - 4,1 \cdot 10^{-3}x$	0,586	<0,001	$2,39 + 0,3 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,031	NS	$1,89 + 4,6 \cdot 10^{-3}x$	-0,126	NS	$2,12 - 0,7 \cdot 10^{-3}x$	0,506	0,023	$1,87 + 0,6 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,333	NS	$2,78 - 4,7 \cdot 10^{-2}x$	-0,187	NS	$2,55 - 0,1 \cdot 10^{-3}x$	0,547	0,005	$2,33 + 0,3 \cdot 10^{-3}x$
tGSH [$\mu\text{mol/l}$] vs. kotynina/kreatynina [$\mu\text{g/g}$]	Cała grupa	-0,006	NS	$7,61 + 4,4 \cdot 10^{-3}x$	-0,193	NS	$7,50 + 0,5 \cdot 10^{-3}x$	0,517	<0,001	$8,54 + 0,2 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	0,114	NS	$7,38 + 1,2 \cdot 10^{-2}x$	-0,281	NS	$7,80 + 0,9 \cdot 10^{-3}x$	0,724	<0,001	$5,80 + 3,3 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,102	NS	$8,11 - 2,3 \cdot 10^{-2}x$	-0,027	NS	$7,12 - 0,3 \cdot 10^{-3}x$	0,042	0,036	$8,10 + 0,4 \cdot 10^{-3}x$

NS – nieznamienista statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – stężenie glutationu zredukowanego, utlenionego lub całkowitego, x – stężenie kotyniny lub wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej

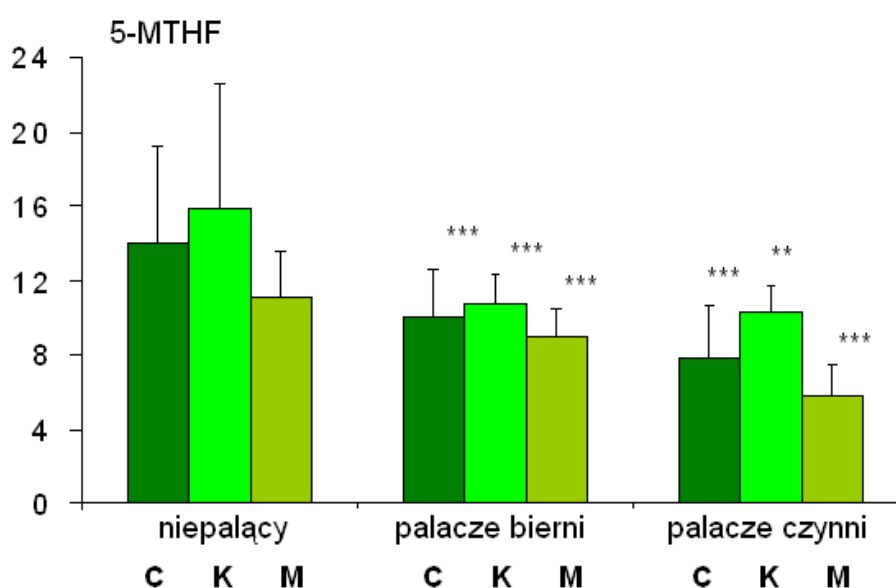


Rycina 23. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a stężeniem glutationu utlenionego (GSSG) w osoczu w całej badanej grupie niepalących (A), biernie narażonych (B) i palaczy czynnych (C) wraz z 95 % przedziałem ufności.

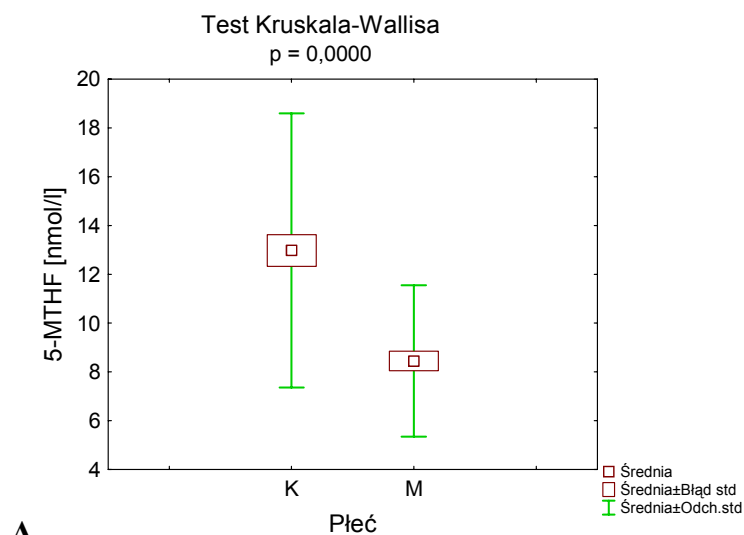
Tabela 17. Wyniki oznaczania stężenia kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu.

Obiekt badań	Grupa		
	Niepalący	Palacze bierni	Palacze czynni
	$x \pm SD$ (min ÷ max)	$x \pm SD$ (min ÷ max)	$x \pm SD$ (min ÷ max)
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
Cała grupa	$13,99 \pm 5,2$ (7,89 ÷ 37,74) 56	$10,03 \pm 2,6^{***}$ (5,67 ÷ 19,2) 45	$7,84 \pm 3,1^{***}$ (2,55 ÷ 18,49) 45
Kobiety	$15,88 \pm 6,7$ (8,95 ÷ 37,74) 34	$10,69 \pm 2,8^{***}$ (5,67 ÷ 19,2) 20	$10,32 \pm 2,7^{**}$ (6,26 ÷ 18,49) 20
Mężczyźni	$11,08 \pm 2,5$ (7,89 ÷ 18,23) 22	$9,0 \pm 1,7^{***}$ (6,24 ÷ 11,67) 13	$5,85 \pm 1,8^{***}$ (2,55 ÷ 9,32) 25

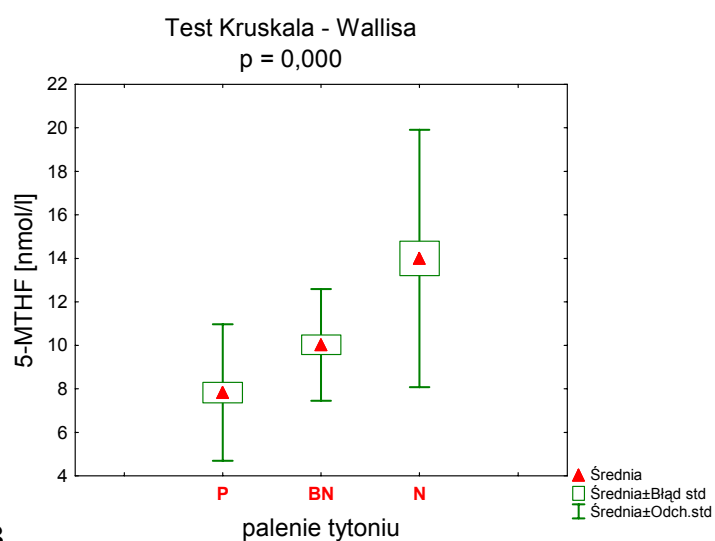
*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ w porównaniu z grupą niepalących; $x \pm SD$ wartość średnia i jej odchylenie standardowe [nmol/l]; *n* - liczebność grupy



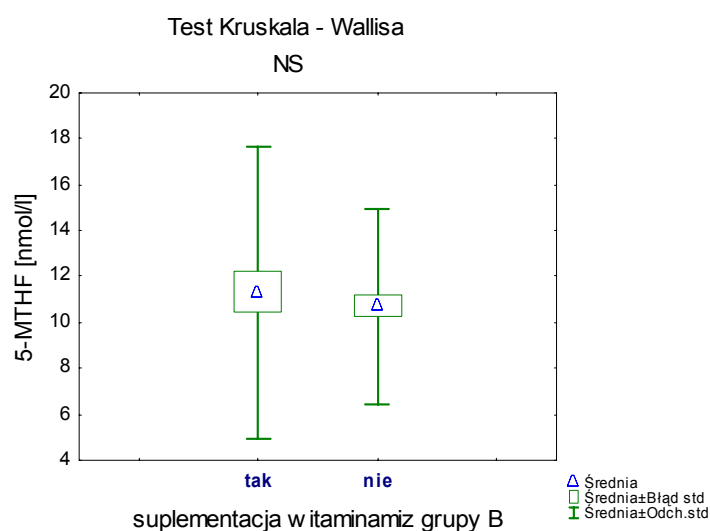
Rycina 24. Stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu [nmol/l], w całej badanej grupie (C), grupie kobiet (K) oraz mężczyzn (M).



A



B



C

Rycina 25. Wyniki testu ANOVA Kruskala-Wallisa: A - wpływ płci na stężenie 5-MTHF w osoczu [nmol/l], K – kobiety, M – mężczyźni, ($H = 34,9$; $p < 0,001$); B – wpływ palenia tytoniu na stężenie 5-MTHF w osoczu [nmol/l], P – palacze czynni, BN – biernie narażeni, N – niepalący; ($H = 48,7$; $p < 0,001$); C – suplementacja witaminami z grupy B na stężenie 5-MTHF w osoczu [nmol/l] ($H = 0,13$; NS).

4.9 Korelacja pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu

Istotne statystycznie korelacje ujemne, oscylujące na granicy przeciętnych i wysokich, zaobserwowano w całych grupach czynnych palaczy, zarówno w stosunku do stężenia kotyniny, jak i stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu (tab. 18). Nie odnotowano w poszczególnych grupach kobiet i mężczyzn czynnych palaczy zależności stężenia 5-MTHF, w stosunku do stężenia kotyniny oraz stosunku stężeń kotynina/kreatynina .

Na rycinie 26 przedstawiono przebieg korelacji liniowej pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego a kotyniną dla wszystkich badanych grup.

4.10. Korelacja pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu a stężeniem homocysteiny w osoczu

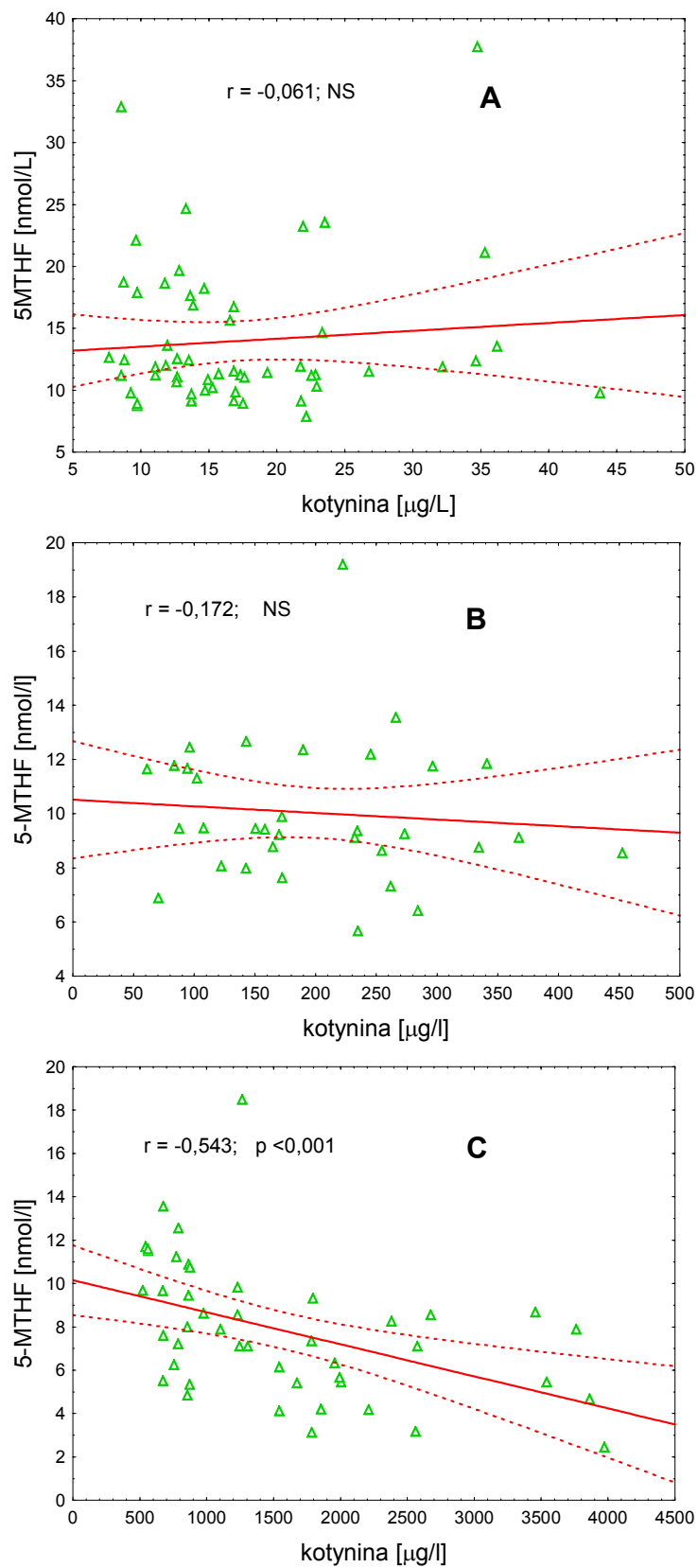
Znamienne korelacje ujemne pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego a homocysteiną w osoczu uzyskano dla całej grupy łącznie niepalących i biernie narażonych oraz dla palaczy czynnych (tab. 19). Ujemne współczynniki korelacji oscylują na granicy słabych i przeciętnych. Na rycinie 27 przedstawiono graficznie zależność pomiędzy stężeniem 5-MTHF a stężeniem homocysteiny w osoczu.

Mimo, że wyznaczona wartość współczynnika korelacji jest znamienna w grupie palaczy czynnych, a jej wartość pozwala zakwalifikować uzyskaną korelację do grupy przeciętnych, to jednak inny przebieg krzywej regresji nakazuje bardzo ostrożną interpretację uzyskanych wyników.

Tabela 18 . Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF) w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa								
		Niepalący			Palacze bierni			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
5-MTHF [nmol/l] vs. kotynina [μg/l]	Cała grupa	-0,061	NS	$12,68 + 6,4 \cdot 10^{-2}x$	-0,172	NS	$10,51 - 2,4 \cdot 10^{-3}x$	-0,543	<0,001	$10,15 - 1,5 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	-0,108	NS	$15,41 + 2,6 \cdot 10^{-2}x$	0,095	NS	$9,73 + 5,1 \cdot 10^{-3}x$	-0,299	NS	$10,96 - 0,6 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	0,032	NS	$11,82 - 4,7 \cdot 10^{-2}x$	-0,443	NS	$10,26 - 5,9 \cdot 10^{-3}x$	-0,201	NS	$6,72 - 0,4 \cdot 10^{-3}x$
5-MTHF [nmol/l] vs. kotynina/kreatynina [μg/g]	Cała grupa	0,314	0,018	$12,33 + 1,6 \cdot 10^{-2}x$	-0,287	NS	$10,27 - 1,3 \cdot 10^{-3}x$	-0,552	<0,001	$9,99 - 1,6 \cdot 10^{-3}x$
	Kobiety	-0,177	NS	$15,98 - 6,2 \cdot 10^{-3}x$	-0,133	NS	$10,48 + 1,2 \cdot 10^{-3}x$	-0,228	NS	$10,91 - 0,7 \cdot 10^{-3}x$
	Mężczyźni	-0,243	NS	$15,38 - 3,4 \cdot 10^{-2}x$	-0,424	NS	$10,34 - 7,3 \cdot 10^{-3}x$	-0,192	NS	$6,55 - 0,4 \cdot 10^{-3}x$

NS – nieznamienne statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego, x – stężenie kotyniny lub wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej

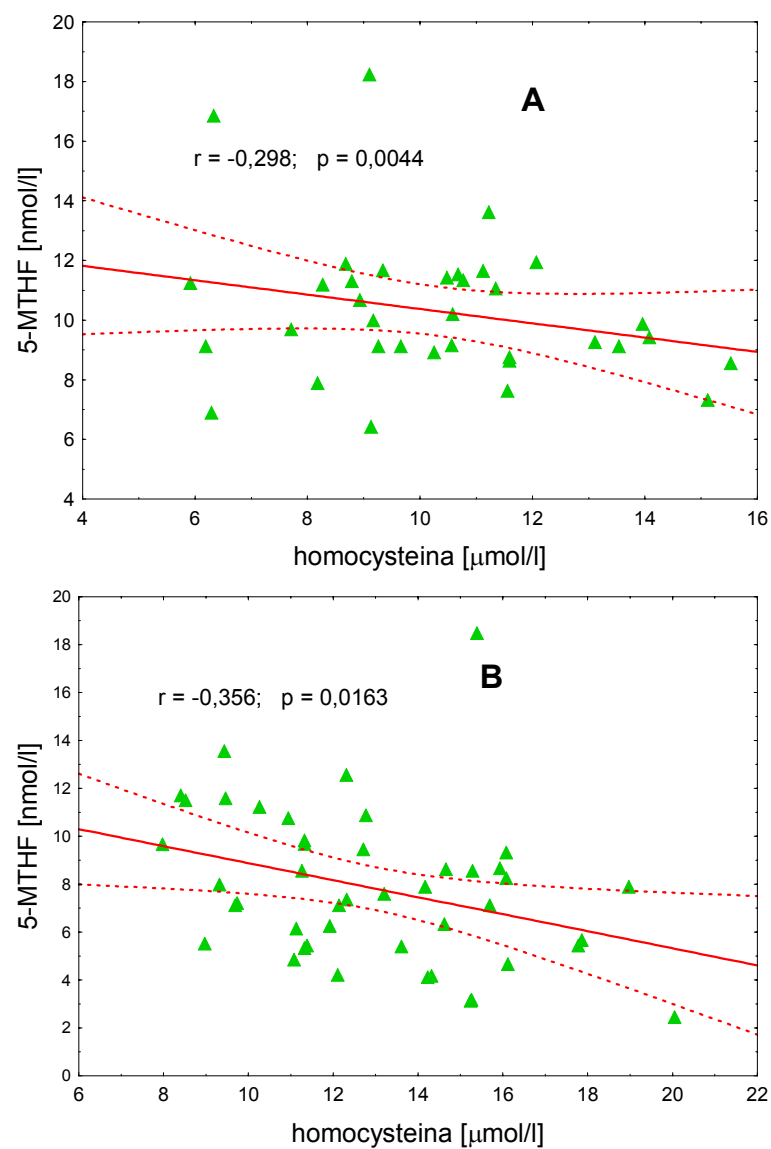


Rycina 26. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (5-MTHF) w osoczu całej grupy niepalących (A), biernie narażonych (B) i palaczy czynnych (C) wraz z 95 % przedziałem ufności.

Tabela 19. Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniem 5-metylotetrahydrofolianu a stężeniem homocysteiny w osoczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa					
		Niepalący i bierni palacze			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
5metylotetrahydrofolian [nmol/L] vs. Homocysteina [μmol/L]	Cała grupa	-0,298	0,0044	18,92 – 6,7 10 ⁻² x	-0,356	0,0163	12,43 – 3,6 10 ⁻² x
	Kobiety	-0,323	0,0171	20,24 – 7,0 10 ⁻² x	-0,287	0,044	14,3 – 0,4 x
	Mężczyźni	-0,172	NS	12,78 – 2,4 10 ⁻² x	-0,023	NS	6,71 – 0,6 10 ⁻² x

NS – nieznamienista statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego, x – stężenie homocysteiny, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej



Rycina 27. Zależność pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu a stężeniem 5-metylotetrahydrofolianu w osoczu w całej grupie niepalących i biernie narażonych (A) i palaczy czynnych (B) wraz z 95 % przedziałem ufności.

4.11. Stężenie pirydoksalu, fosforanu 5-pirydoksalu i kwasu 4-pirydoksynowego w osoczu

Wyniki oznaczenia aktywnych form witaminy B₆ w osoczu (pirydoksalu – PL i fosforanu 5-pirydoksalu - PLP) oraz metabolitu pirydoksyny – kwasu 4-pirydoksynowego (4-PA) przedstawiono w tabeli 20 i na rycinie 28. Zaobserwowano wyższe stężenia pirydoksalu u kobiet biernie narażonych ($p<0,001$) i palących czynnie ($p<0,01$) oraz niższe stężenia tej formy witaminy B₆ u mężczyzn biernie narażonych ($p<0,01$) i czynnych palaczy ($p<0,001$). Mniejsze i znamienne stężenia PLP zanotowano także w grupie kobiet biernie narażonych i palących oraz w całej grupie biernie narażonych ($p<0,05$), w stosunku do niepalących. Stężenie 4-PA było mniejsze i znamienne u kobiet palących ($p<0,001$) oraz biernie narażonych ($p<0,01$), w stosunku do niepalących.

Wykorzystując test ANOVA Kruskala – Wallisa zaobserwowano statystycznie istotny wpływ palenia tytoniu ($H = 6,6$; $p<0,05$) oraz wpływ suplementacji witaminami z grupy B ($H = 8,85$; $p<0,05$) na sumę stężeń pirydoksalu i fosforanu 5-pirydoksalu, jak również na stężenie 4-PA ($H = 54,6$; $p<0,001$). Wyniki testu przedstawiono na rycinie 29.

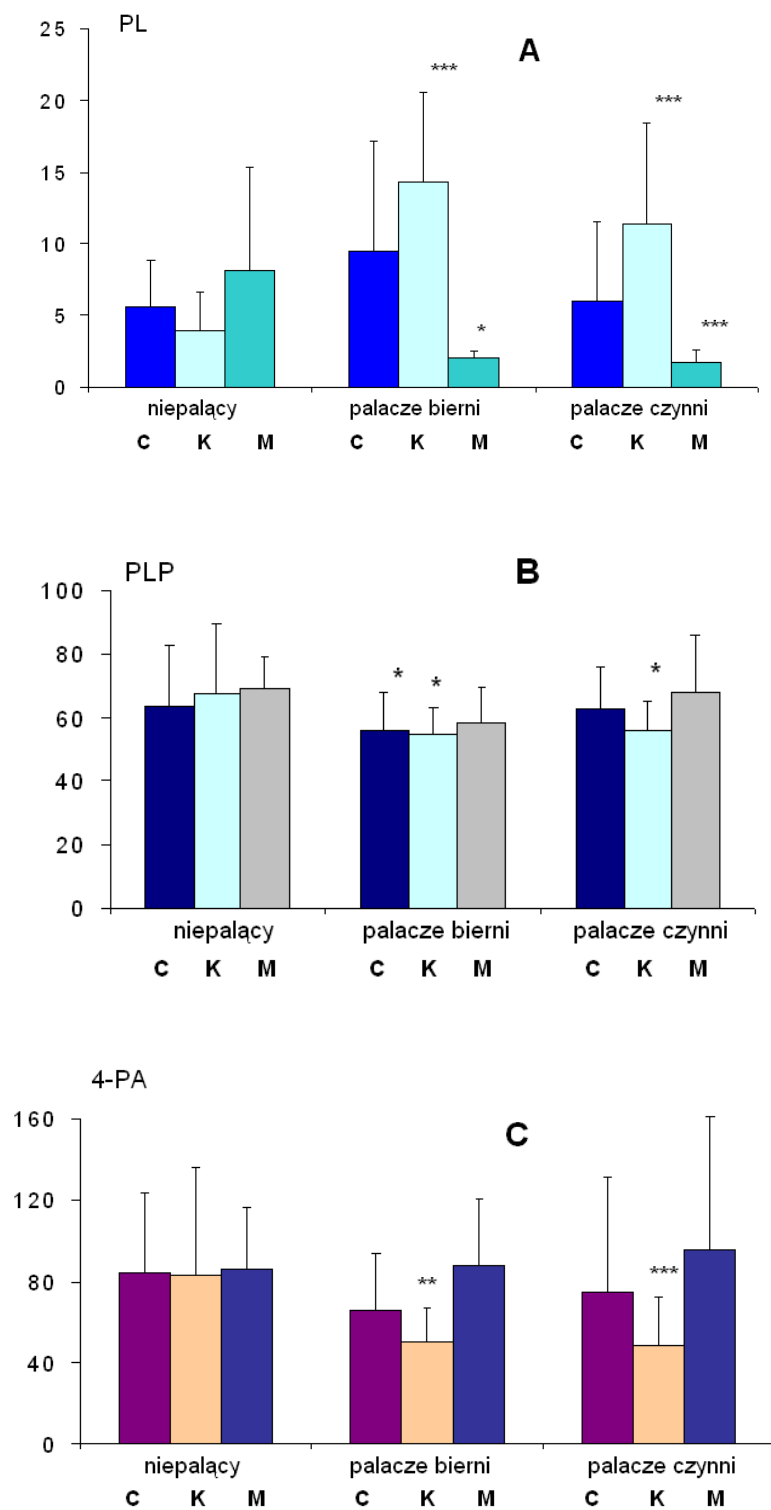
4.12. Korelacja pomiędzy stężeniem pirydoksalu i fosforanu 5-pirydoksalu w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu

W przeciwieństwie do otrzymanych wcześniej wyników, nie zaobserwowano znamiennych korelacji pomiędzy oznaczanymi formami witaminy B₆ a stężeniem kotyniny i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu. Otrzymane wyniki, jak również brak korelacji pomiędzy stężeniami PL i PLP a stężeniem kotyniny w moczu badanych grup, przedstawiono w tabeli 21 i na rycinie 30.

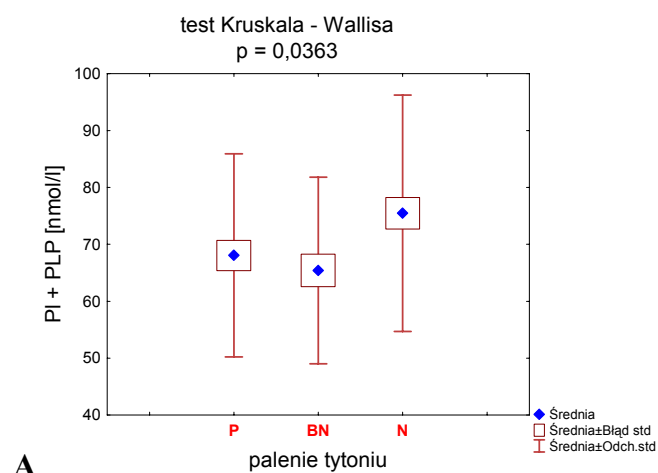
Tabela 20. Wyniki oznaczania stężenia pirydoksalu (PL), fosforanu-5-pirydoksalu (PLP) oraz kwasu 4-pirydoksynowego (4-PA) w osoczu

Parametr - obiekt badań	Grupa		
	Niepalący	Palacze bierni	Palacze czynni
	x ± SD (min ÷ max) n	x ± SD (min ÷ max) n	x ± SD (min ÷ max) n
PL [nmol/l]			
Cała grupa	5,61 ± 4,74 (1,87 ÷ 22,43) 56	9,49 ± 7,66 (1,45 ÷ 31,18) 33	5,99 ± 6,3 (1,07 ÷ 23,97) 45
Kobiety	3,99 ± 3,1 (1,87 ÷ 13,56) 34	14,36 ± 5,9*** (10,78 ÷ 31,18) 20	11,35 ± 6,2*** (2,13 ÷ 23,97) 20
Mężczyźni	8,12 ± 7,1 (1,18 ÷ 22,43) 22	2,01 ± 0,4** (1,45 ÷ 2,89) 13	1,72 ± 0,72*** (1,07 ÷ 3,42) 25
PLP [nmol/l]			
Cała grupa	68,30 ± 19,4 (23,56 ÷ 127,78) 56	56,01 ± 14,9* (23,39 ÷ 78,65) 33	62,56 ± 17,7 (34,56 ÷ 124,56) 45
Kobiety	67,58 ± 22,2 (23,56 ÷ 127,78) 34	54,53 ± 14,3* (23,39 ÷ 78,65) 20	55,93 ± 14,9* (34,56 ÷ 93,39) 20
Mężczyźni	69,41 ± 14,3 (34,56 ÷ 96,56) 22	58,29 ± 16,1 (33,85 ÷ 78,32) 13	67,87 ± 18,1 (43,23 ÷ 124,56) 25
4-PA [nmol/l]			
Cała grupa	84,24 ± 46,9 (26,23 ÷ 248,43) 56	66,29 ± 36,67 (16,84 ÷ 223,45) 33	74,82 ± 56,3 (16,78 ÷ 264,2) 45
Kobiety	83,18 ± 52,5 (26,23 ÷ 243,83) 34	50,62 ± 20,1** (16,84 ÷ 96,67) 20	49,03 ± 25,9*** (16,78 ÷ 107,53) 20
Mężczyźni	85,87 ± 37,6 (97,85 ÷ 165,3) 22	87,88 ± 45,2 (44,62 ÷ 223,45) 13	95,46 ± 65,4 (32,16 ÷ 264,2) 25

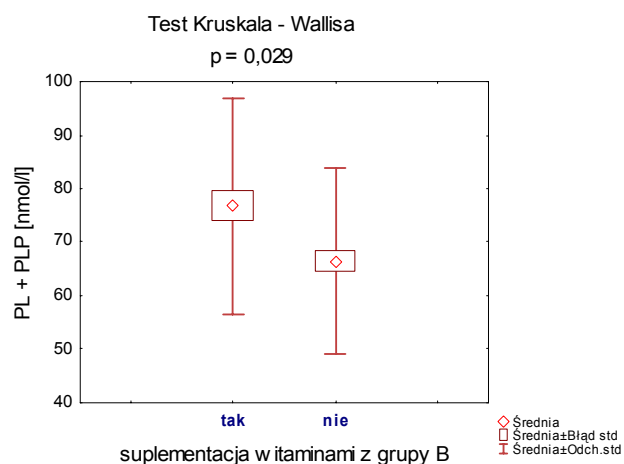
***p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 – w porównaniu grupą niepalących; x ± SD wartość średnia i jej odchylenie standardowe [nmol/l]; n - liczebność grupy



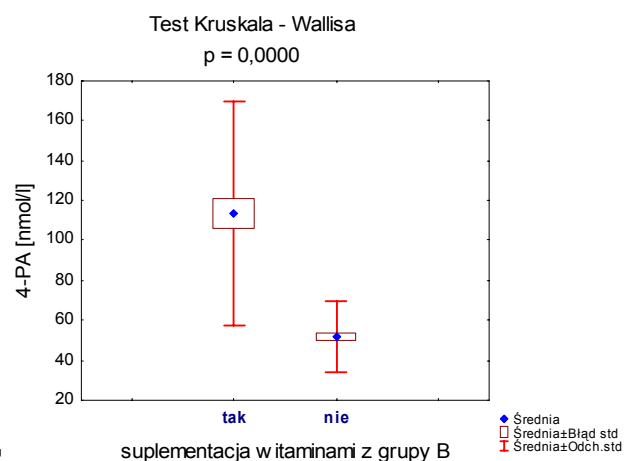
Rycina 28. Stężenie pirydoksalu [nmol/l] (PL), fosforanu-5-pirydoksalu [nmol/l] (PLP) oraz kwasu 4-pirydoksynowego [nmol/l] (4-PA) w osoczu, w całej badanej grupie (C), grupie kobiet (K) i mężczyzn (M).



A



B



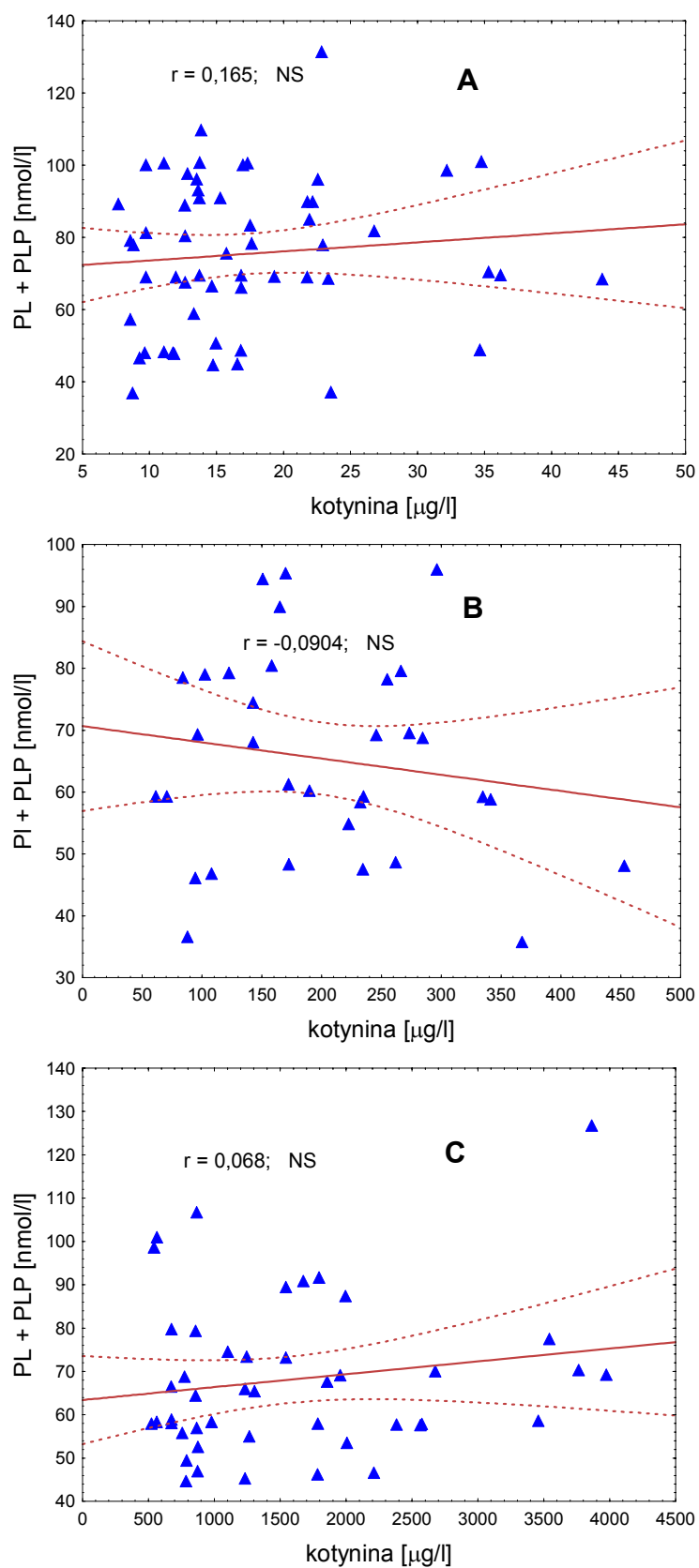
C

Rycina 29. Wyniki testu ANOVA Kruskala-Wallisa: A - wpływ palenia tytoniu na sumę stężeń PL i PLP w osoczu [nmol/l], ($H = 6,6$; $p < 0,05$); B i C wpływ suplementacji witaminami z grupy B na sumę stężeń PL i PLP oraz 4-PA w osoczu [nmol/l], ($H = 8,85$; $p < 0,05$ oraz $H = 54,6$ $p < 0,001$).

Tabela 21. Współczynnik korelacji R-Spearmana (r), poziom istotności (p) i równanie regresji liniowej dla zależności pomiędzy stężeniem witaminy B₆ (suma pirydoksalu (PL) i fosforanu-5-pirydoksalu (PLP)) w osoczu a stężeniem kotyniny w moczu oraz wartością stosunku stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

Zależność	Obiekt badań	Grupa								
		Niepalący			Palacze bierni			Palacze czynni		
		r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹	r	p	r-nie regresji ¹
PL + PLP [nmol/l] vs. kotynina [μg/l]	Cała grupa	0,165	NS	$71,12 + 2,5 \cdot 10^{-2}x$	-0,0904	NS	$70,66 - 2,6 \cdot 10^{-2}x$	0,068	NS	$63,41 + 0,3 \cdot 10^{-2}x$
	Kobiety	0,269	NS	$12,79 + 7,9 \cdot 10^{-2}x$	-0,0241	NS	$68,68 - 1,4 \cdot 10^{-3}x$	-0,204	NS	$71,49 - 0,4 \cdot 10^{-2}x$
	Mężczyźni	-0,012	NS	$84,12 - 1,4 \cdot 10^{-2}x$	-0,256	NS	$67,76 - 3,6 \cdot 10^{-2}x$	0,123	NS	$55,11 + 0,7 \cdot 10^{-2}x$
PL + PLP [nmol/l] vs. kotynina/kreatynina [μg/g]	Cała grupa	0,186	NS	$70,46 + 3,4 \cdot 10^{-2}x$	-0,152	NS	$69,83 - 2,4 \cdot 10^{-2}x$	0,105	NS	$62,85 + 0,4 \cdot 10^{-2}x$
	Kobiety	0,297	NS	$62,04 + 5,8 \cdot 10^{-2}x$	-0,0566	NS	$71,16 - 1,2 \cdot 10^{-2}x$	-0,131	NS	$72,54 - 0,6 \cdot 10^{-2}x$
	Mężczyźni	0,003	NS	$82,75 - 6,4 \cdot 10^{-2}x$	-0,388	NS	$69,65 - 5,2 \cdot 10^{-2}x$	0,218	NS	$55,24 + 0,81 \cdot 10^{-2}x$

NS – nieznamienista statystycznie; ¹ – równanie regresji liniowej $y = a + bx$, gdzie y – suma stężeń pirydoksalu i fosforanu-5-pirydoksalu, x – stężenie kotyniny lub wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina, a – wyraz wolny, b – współczynnik kierunkowy prostej



Rycina 30. Zależność pomiędzy stężeniem kotyniny w moczu a sumą stężeń pirydoksalu (PL) oraz fosforanu-5-pirydoksalu (PLP) w osoczu całej grupy niepalących (A), biernie narażonych (B) i palaczy czynnych (C) wraz z 95 % przedziałem ufności.

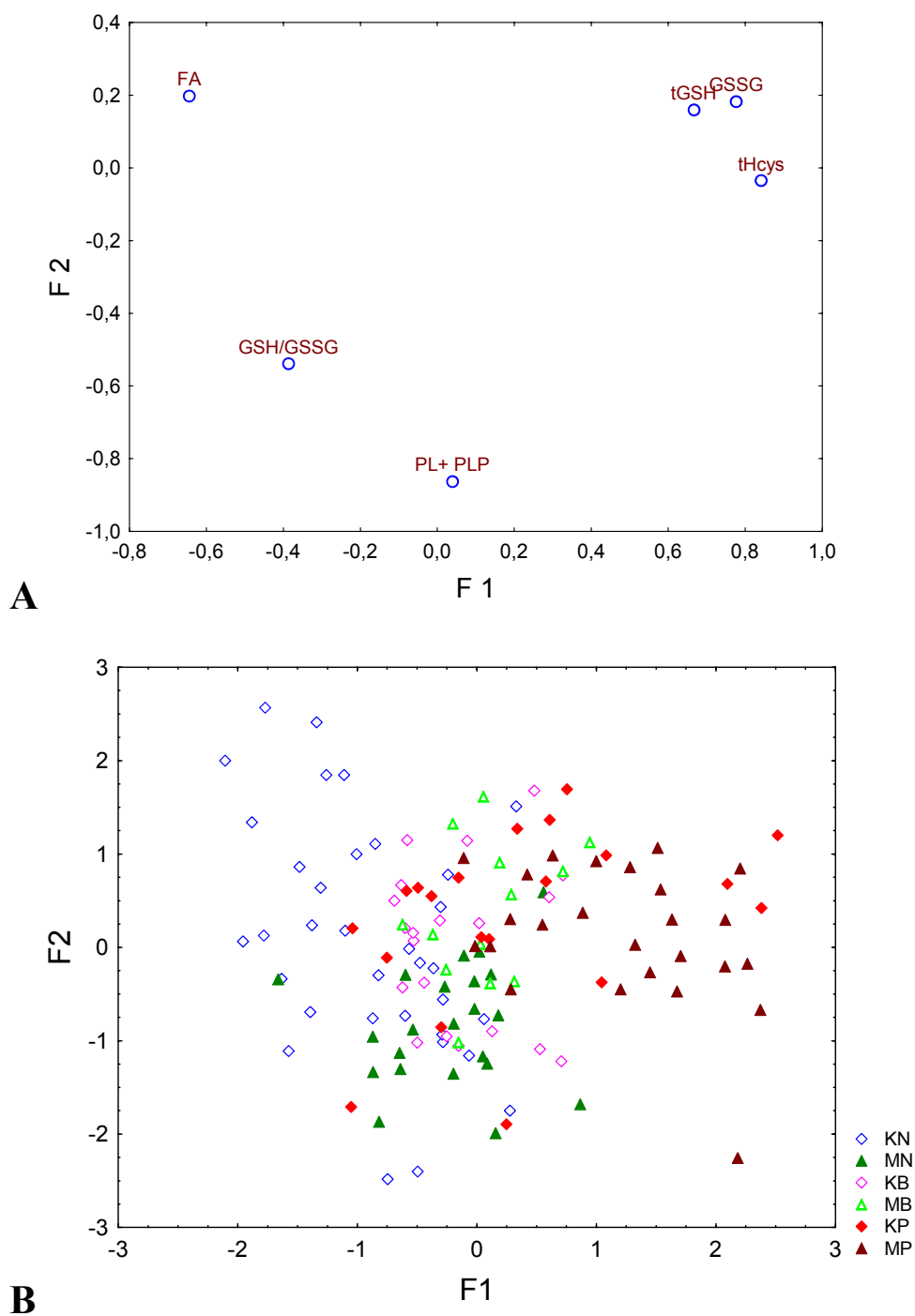
4.13. Analiza czynnikowa

Aby graficznie zobrazować strukturę danych, dotyczących wszystkich znamiennych parametrów zależnych od płci i palenia tytoniu, takich jak stężenia całkowitej homocysteiny (tHcys), glutationu utlenionego (GSSG) i całkowitego w osoczu (tGSH), stosunek stężeń obu form glutationu we krwi (GSH/GSSG), suma stężeń pirydoksalu i fosforanu 5'-pirydoksalu (PL+PLP) i kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego (FA), przeprowadzono analizę czynnikową. Przestrzeń czynnikowa została wykreślona na dwuwymiarowym wykresie rozrzutu z etykietami punktów- zmiennych. Wyniki przedstawiono na rycinie 31.

Czynniki F1 i F2 opisują 57,6 % całkowitej zmienności z wartościami własnymi, wynoszącymi odpowiednio 2,38 i 1,08. Obiekty opisane wyższymi wartościami F1 (36,7 % całkowitej zmienności) odpowiadają grupom kobiet i mężczyzn palących (punkty czerwone i brązowe), podczas gdy wyższym wartościom czynnika F2 (17,9 % całkowitej zmienności) przypisana jest grupa kobiet niepalących (punkty niebieskie), (ryc. 31 B).

Ładunki czynnikowe, odpowiedzialne za ten stan, to dla wyższych wartości F1 - tHcys, tGSH oraz GSSG, podczas gdy dla F2 – głównie kwas 5-metylotetrahydrofoliowy.

Zastosowanie analizy czynnikowej pozwoliło, na zidentyfikowanie wzajemnie ortogonalnych czynników o największej wariancji w obrębie oryginalnych wyników oznaczeń i przeprowadzenie rzutowania danych w przestrzeń o mniejszej liczbie wymiarów, utworzonych z podzbioru składowych o największej wariancji. Analiza czynnikowa pozwoliła na rozróżnienie osób palących od biernie narażonych i niepalących. Różnica ta jest mocno nasiloną w obrębie grupy palących mężczyzn (punkty brązowe) oraz niepalących kobiet (punkty niebieskie).



Rycina 31. Rozmieszczenie punktów w układzie współrzędnych czynnikowych F1 i F2, odpowiadającym ładunkom czynnikowym (A) oraz poszczególnym próbkom (B); (KN – kobiety niepalące, MN – mężczyźni niepalący; KB – kobiety biernie narażone, MB – mężczyźni biernie narażeni, KP – kobiety palące, MN – mężczyźni palący).

5. DYSKUSJA

5.1. Ocena narażenia na dym tytoniowy w oparciu o oznaczone stężenie kotyniny, stosunek stężeń kotynina/kreatynina w moczu oraz wywiad ankietowy

Oznaczanie kotyniny w płynach ustrojowych jest powszechnie stosowaną metodą, wykorzystywaną w ocenie narażenia na środowiskowy dym tytoniowy (ETS) oraz w różnicowaniu populacji ludzi na osoby niepalące i nie narażone, palące oraz biernie narażone. Pozwala również zweryfikować dane pochodzące z kwestionariuszy ankiet o niepaleniu lub narażeniu na dym tytoniowy [Piekoszewski, Florek, 2001]. Za bardzo wiarygodną ocenę narażenia na dym tytoniowy, zalecaną również przez komisję ekspertów powołaną w ramach *Society for Research on Nicotine and Tobacco*, uznaje się pomiar stężenia kotyniny w surowicy lub moczu [SRNT, 2002]. Stężenia kotyniny w ślinie i surowicy są porównywalne, natomiast w moczu poziom głównego metabolitu nikotyny jest 5-6 razy wyższy. Wydalenie kotyniny z moczem zależy od sprawności funkcjonowania nerek oraz pH moczu. Stąd wielu autorów sugeruje przeliczanie stężenia kotyniny na kreatyninę [Baidoo i in., 2003; Dempsey i in., 2000; Greaves i in. 2001; Hatsukami i in., 1997; Kuo i in., 2002; Sobczak 2005b; SRNT, 2002]. W badaniach mających na celu porównanie narażenia kobiet i mężczyzn na dym tytoniowy badacze zaznaczają, że podawanie stężenia kotyniny w przeliczeniu na kreatyninę może dawać niecałkowicie rzeczywiste wyniki ze względu na różnicę masy ciała, a co za tym idzie poziom kreatyniny [Piekoszewski, Florek, 2001].

W pracy stwierdzono, że stężenie kotyniny i stosunek stężeń kotynina/kreatynina są ściśle ze sobą skorelowane. Współczynnik korelacji R-Spearmana dla znamiennej zależności ($p < 0,001$) jest bardzo wysoki i wynosi 0,921 (ryc. 16). Jest to więc korelacja prawie pełna [Stanisz 2006]. Stąd wyznaczone zależności, oparte na wartościach stężenia kotyniny i stosunku stężeń kotynina/kreatynina, dla większości zmiennych wykazały podobną tendencję zmian i zbliżone wartości współczynników R-Spearmana, zarówno dla całych badanych grup, jak i oddzielnie kobiet i mężczyzn. Wydaje się być zatem słuszne przeliczanie stężenia kotyniny na kreatyninę oraz posługiwanie się zarówno stężeniem kotyniny, z uwzględnieniem gęstości moczu jak i stosunkiem stężeń kotynina/kreatynina w moczu, co potwierdza wcześniejsze doniesienia, wskazujące na jednakową wartość obu metod [Heavner i in. 2006; Sobczak i in. 2004; SRNT 2002].

Wywiad ankietowy, stosowany w doświadczeniu, zweryfikowano na podstawie oznaczenia stężenia kotyniny w moczu. Za umowne wartości graniczne stężenia kotyniny w moczu, które określają przynależność do badanej grupy osób, przyjęto stężenie kotyniny do 50 µg/l moczu dla rozróżnienia osób niepalących od biernie narażonych i do 500 µg/l moczu dla rozróżnienia biernych i czynnych palaczy. Wartość stężenia kotyniny do 50 µg/l moczu jest rekomendowana przez *Society for Research on Nicotine and Tobacco* [SRNT, 2002], natomiast granica 500 µg/l jest uznawana za właściwą przez wielu autorów [Greaves i in., 2001; Holl i in., 1998; Savitz i in., 2001; Sobczak i in. 2004; de Weerd i in. 2002].

Z uzyskanych danych wynika, że co piąta kobieta i co ósmy mężczyzna, którzy nie przyznawali się do palenia tytoniu lub przebywania w otoczeniu osób palących, byli biernie ekspozowani na dym lub okazjonalnie palili tytoń. A zatem wysoka wartość graniczna stężenia kotyniny poniżej 500 µg/l moczu pozwala na zakwalifikowanie do grupy biernie narażonych osoby silnie ekspozowane na dym tytoniowy, jak również okazjonalnych palaczy.

Średnie stężenie kotyniny w moczu w grupie biernie narażonych osób wynosiło 199,8 µg/l moczu i było nieznacznie wyższe w grupie biernie narażonych mężczyzn, w stosunku do kobiet (tab. 10). W stosunku do osób niepalących zaobserwowano 11,5-krotny wzrost dla całej grupy biernych palaczy. Natomiast średnie stężenie kotyniny w moczu w grupie palących wynosiło 1566,8 µg/l moczu, tj. 90,1-krotnie więcej niż w grupie niepalących. Zaobserwowano również bardzo wysoki wzrost, prawie dwukrotny, stężenia kotyniny w grupie palących mężczyzn w stosunku do palących kobiet. Analizując uzyskane wartości stężenia kotyniny można stwierdzić, że są one zbliżone do wartości podawanych w literaturze, np. 1028 µg/l [Doctor i in., 2002]; 1235 µg/l [Czarnywojtek i in., 2006]; 2158 µg/l [Sobczak i in., 2004], 2671 µg/l [Holl i in, 1998]. Wyższe stężenia uzyskiwane przez innych autorów są wynikiem różnic w doborze grup badanych.

Prawie dwukrotnie wyższe stężenie kotyniny w moczu u palących mężczyzn, w stosunku do kobiet, pozwala potwierdzić hipotezę, że mężczyźni są znacznie „silniejszymi” palaczami niż kobiety. Badania prowadzone przez grupę Eissenberga oraz Patterson potwierdzają, że kobiety palą częściej słabsze papierosy niż mężczyźni oraz że inhalacja dymu tytoniowego u kobiet jest płytsza niż u mężczyzn [Eissenberg i in., 1999; Patterson i in., 2003]. Picciotto z kolei zwraca uwagę na charakterystyczny sposób palenia tytoniu przez kobiety – pozostawianie dużego niedopałka, podczas gdy

mężczyźni spalają większą część papierosa, mocniej zaciągając się dymem tytoniowym i doprowadzając w ten sposób do organizmu wyższe stężenia substancji toksycznych [Picciotto, 2004]. Stąd też tak wysokie stężenia kotyniny w moczu palących mężczyzn.

5.2. Wpływ palenia tytoniu na stężenie homocysteiny w osoczu

Podwyższone stężenie całkowitej homocysteiny w osoczu jest uznanym, czułym markerem niedoboru folianów i kobalamin, a także niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (CVD) i naczyniowo-mózgowych [Gupta i in., 2005; JAMA 2002; Splaver i in., 2004; Refsum i in. 2004; Troughton i in., 2007].

Liczne doniesienia z badań epidemiologicznych i klinicznych, prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu, w większości potwierdzają niekorzystny wpływ palenia tytoniu na poziom homocysteiny. Randomizowane badania, obejmujące 1128 mężczyzn i 1154 kobiety, przeprowadzone w Grecji w latach 2000 – 2001 wykazały znamienny wzrost stężenia homocysteiny, zależny od ilości wypalanych papierosów oraz płci – wyższe wartości uzyskano dla mężczyzn w stosunku do kobiet (14,5 $\mu\text{mol/l}$ vs. 10,5 $\mu\text{mol/l}$) [Panagiotakos i in., 2005]. Również w badaniach przeprowadzonych w 19 ośrodkach naukowych wybranych z 10 krajów europejskich stwierdzono znamienne wyższe stężenia tego aminokwasu u czynnych palaczy tytoniu, niż u osób niepalących [O’Callaghan i in., 2002]. W doświadczeniu Stahl’a i wsp. badano wpływ palenia tytoniu na stężenie całkowitej homocysteiny u chorych na schizofrenię, w którym uzyskano znamienny wzrost tHcys, w porównaniu z niepalącymi [Stahl 2004].

Wyniki niektórych prac nie są jednak jednoznaczne. Niektórzy autorzy nie stwierdzają żadnych zależności pomiędzy paleniem tytoniu, a stężeniem homocysteiny. Przykładem może być praca Mc Donalda i Walkera, w której badane jest stężenie homocysteiny u palących kobiet w ciąży. W grupie kontrolnej obserwowano wyższe i znamienne stężenia niż w badanej (7,9 $\mu\text{mol/l}$ vs. 5,6 $\mu\text{mol/l}$) [Mc Donald, Walker 2001]. Należy zwrócić także uwagę na fakt, że bardzo nieliczne badania wyróżniają grupę biernie narażonych osób, bowiem klasyfikacja badanych oparta jest zwykle na wywiadzie ankietowym.

W niniejszej pracy, w całej badanej grupie osób palących oraz w grupie palących mężczyzn, uzyskano znamienne wyższe stężenia homocysteiny, w porównaniu z grupą niepalących (tab. 11, ryc. 17). Jednocześnie w tej grupie uzyskano wysokie współczynniki korelacji, przy wysokich poziomach istotności w odniesieniu zarówno homocysteiny do kotyniny, jak i stosunku stężeń kotynina/kreatynina.

Uzyskane wyniki pozwalają jednoznacznie wnioskować, że palenie tytoniu wpływa na podwyższone stężenie homocysteiny w osoczu.

Należy tutaj zaznaczyć, że palenie tytoniu jest jedną z wielu przyczyn, które mogą podwyższać poziom homocysteiny. W badaniach przeprowadzonych w wielu krajach wykazano, że styl życia oraz związany z nim sposób żywienia, picie alkoholu, spożywanie dużej ilości kawy, mała aktywność fizyczna wpływają na stężenie homocysteiny [Panagiotakos i in., 2005]. Polskie badania Sygnowskiej i Waśkiewicz, wykonane na reprezentatywnej grupie palących mieszkańców Warszawy w wieku 20 - 74 lata, liczącej 649 mężczyzn i 657 kobiet wykazały, że sposób żywienia osób palących, zwłaszcza mężczyzn, jest bardziej aterogenny, niż niepalących [Sygnowska i Waśkiewicz, 2001].

W odniesieniu do grupy biernie narażonych nie zaobserwowano znamienych różnic w stężeniu całkowitej homocysteiny, zarówno w całej grupie, jak i oddzielnie w grupach kobiet i mężczyzn w stosunku do grupy niepalących (tab. 12, ryc. 19). Jednocześnie w całej tej grupie uzyskano przeciętne współczynniki korelacji, znamienne ($p < 0,011$ i $p < 0,026$), zarówno w stosunku homocysteiny do kotyniny, jak i stosunku stężeń kotynina/kreatynina, natomiast niezmiennie i nieistotne dla poszczególnych grup kobiet i mężczyzn. Świadczyć może to o słabszym wpływie środowiskowego dymu tytoniowego na procesy metaboliczne, regulujące stężeniem homocysteiny [Sobczak 2005b].

5.3. Wpływ palenia tytoniu na stężenia glutationu zredukowanego i utlenionego we krwi i osoczu

Liczne badania naukowe prowadzone od lat 70-tych XX wieku dowodzą, że składniki zawarte w dymie tytoniowym wpływają niekorzystnie na poziom wewnątrzkomórkowych tioli, szczególnie na poziom glutationu [Leuchtenberger i in., 1974; Eiserich i in., 1995; Wooten i in., 2006]. W badaniach Eiserich i wsp. wykazano, że ekspozycja na dym tytoniowy może powodować obniżenie stężenia białek, powiązanych grupami sulfhydrylowymi o 60 % [Eiserich i in., 1995 *a,b*]. W 2004 roku na kongresie CORESTA w Kyoto, Cohours i wsp. przedstawili mechanizm interakcji szkodliwego rodnika $NO^{\bullet}$ z glutationem zredukowanym oraz z reaktywnymi aldehydami fazy gazowej dymu tytoniowego [Cahours i in., 2004]. Z kolei w badaniach Reddy i wsp. udowodniono, że utrata wewnątrzkomórkowego GSH jest ściśle związana z reakcją składników fazy parowej dymu tytoniowego, głównie z akroleiną. W

konsekwencji tej interakcji dochodzi do powstawania wysoce niebezpiecznego dla komórek glutationu utlenionego (GSSG), który może powodować glutatiolację białek, co wywołuje z kolei zmiany w statusie redokсовym tioli [Reddy i in., 2004]. Stąd Mascher i wsp. proponują oznaczanie kwasu 3-hydroksypropylmerkapturowego w moczu, metabolitu akroleiny, jako biomarkera ekspozycji na dym tytoniowy [Mascher i in., 2001]. Nie zawsze jednak, wraz ze spadkiem zredukowanej formy glutationu, rośnie forma utleniona. W badaniach zespołu Parka udowodniono, że składniki dymu tytoniowego, reagując z grupą -SH glutationu, powodują powstawanie kilkunastu różnych S-konjugatów GSH, czyli tioeterów GSH [Park i in., 1998]. Wytworzenie niebezpiecznych S-konjugatów GSH ze składnikami dymu tytoniowego, zarówno na drodze nieenzymatycznej, jak i w obecności S-transferazy glutationowej powoduje dodatkową utratę wewnątrzkomórkowej puli GSH. Należy tutaj także zaznaczyć, że obniżone stężenia niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy, do których należy glutation, są dowodem na to, że stres oksydacyjny wystąpił, ale nie świadczą o uszkodzeniu komórkowych makrocząsteczek. Są one dowodem na odpowiedź badanego układu na stres oksydacyjny [Wooten i in., 2006].

Prezentowane w pracy wyniki z oznaczeń, zarówno glutationu utlenionego i zredukowanego we krwi pełnej, jak i w osoczu oraz całkowite stężenie glutationu w osoczu, wydają się potwierdzać niekorzystny wpływ dymu tytoniowego na oznaczane parametry (tab. 13, 15, ryc. 20, 22) W całej grupie palaczy czynnych ($p < 0,01$), jak i oddzielnie w grupie kobiet i mężczyzn, stężenie formy utlenionej glutationu we krwi było znamienne i wyższe niż w grupie niepalących. Stosunek stężeń GSH/GSSG w stanie równowagi między pro- i antyoksydantami wynosi w większości komórek ok. 100. Spotykane w literaturze dane dotyczące tej wartości we krwi, charakteryzują się dużą różnorodnością i kształtują między 5,7 - 511 [Pastore i in., 2003]. Analizując stosunki stężeń GSG do GSSH, odnotowano znamienne i bardzo wysoki spadek tych wartości w całej grupie palaczy czynnych oraz w grupach palących kobiet i mężczyzn (ryc. 21C, $p < 0,001$). W grupie palaczy biernie narażonych spadek ten był mniejszy i znamienne dla całej grupy oraz grupy narażonych mężczyzn (ryc. 21B). Również w osoczu stężenia glutationu utlenionego oraz całkowitego były wyższe i znamienne w grupach eksponowanych na dym tytoniowy. Najsilniejsze zależności obserwowano w grupach palących mężczyzn, czyli u „silnych” palaczy tytoniu. Można zatem przypuszczać, że pierwszą linię obrony organizmu przed krótko żyjącymi wolnymi

rodnikami, inhalowanymi do płuc z dymem tytoniowym, spełnia zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy glutation.

5.4. Wpływ palenia tytoniu na stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu

Dotychczasowe doniesienia naukowe sugerują, że palenie tytoniu wpływa niekorzystnie na stężenia folianów w płynach ustrojowych [Ortega i in., 1994; Piyathilake i in., 1994; McDonald i in., 2001]. W badaniach przeprowadzonych we Włoszech wykazano, że wypalanie powyżej 9 papierosów dziennie obniża stężenie folianów we krwi nawet o 30 %, w porównaniu z niepalącymi [Cafolla i in., 2000]. Szczególną uwagę poświęca się wpływowi dymu tytoniowego na stężenie kwasu foliowego u kobiet w ciąży. Relton i Rankin zwracają uwagę na obniżoną masę urodzeniową dzieci kobiet palących [Relton i Rankin 2005]. Autorzy sugerują, że za obniżone stężenie kwasu foliowego we krwi kobiet palących i ciężarnych odpowiada kilka jednocześnie występujących mechanizmów. A mianowicie: oddziaływanie zawartych w dymie tytoniowym cyjanowodoru i tlenku siarki (IV) z hydroksykobalaminą i wytworzenie cyjanokobalaminy i sulfokobalaminy, które nie pełnią roli koenzymów oraz wpływ wolnych rodników, zawartych w dymie tytoniowym, na komórki, a co za tym idzie, zmiana zdolności metabolizowania i magazynowania folianów. Liczni autorzy sugerują, że z obniżeniem stężenia folianów u palaczy związane są złe nawyki żywieniowe oraz brak dodatkowej suplementacji kwasem foliowym [Ortega i in., 1997; Pagan i in., 2001]. Rydlewicz i wsp. podkreślają, że podaż 926 µg kwasu foliowego (dieta plus dodatkowa suplementacja) pokrywa dzienne zapotrzebowanie dorosłej osoby na tę witaminę, chroniąc jednocześnie przed skutkami jej niedoboru [Rydlewicz i in., 2002]. Obecnie uważa się, że suplementacja kwasem foliowym ma szczególne znaczenie u kobiet w okresie ciąży, gdyż zapobiega uszkodzeniom cewy nerwowej i innym zniekształceniom płodu [Kloeblen 1999; Rosenquist i in., 1996; Smith 2002].

Uzyskane w pracy wyniki (tab.17, ryc.24) wskazują na znamienne mniejsze stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu w grupie biernie narażonych i czynnych palaczy, w porównaniu ze stężeniem tego związku w grupie niepalących. Na podstawie liniowych korelacji, wyznaczonych pomiędzy stężeniami kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego a stężeniem kotyniny w moczu, u osób zakwalifikowanych do grupy czynnych palaczy, można stwierdzić, że wraz ze wzrostem narażenia na dym

tytoniowy, zmniejsza się znamienne stężenie tej formy kwasu foliowego w osoczu (tab.18, ryc.26).

5.5. Zależność pomiędzy kwasem foliowym a homocysteiną

Jedną z dróg obronnych organizmu przed nagromadzeniem się we krwi zbyt dużej ilości homocysteiny jest jej ponowna metylacja do nietoksycznej metioniny. Donorem grupy metylowej dla enzymu metylotransferazy jest kwas 5-metylotetrahydrofoliowy. Grupę metylową odbiera aktywna forma witaminy B₁₂ – metylokobalamina. Tak, jak podano w części teoretycznej pracy, dodanie do pożywienia kwasu foliowego może obniżyć podwyższoną lub prawidłową wartość stężenia homocysteiny, chroniąc organizm przed jej niekorzystnym działaniem. Zależności pomiędzy stężeniami kwasu foliowego i homocysteiny, wykazane przez Lucocka i wsp. pod koniec lat 90-tych XX wieku, stanowią uznany marker podaży folianów [Lucock i in., 1999; Bolander-Gouaille i Bottiglieri 2003].

W pracy wykazano korelację pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego a homocysteiną w osoczu (tab. 19, ryc. 27). Ponieważ nie uzyskano wcześniej (pkt. 5.4.) znamiennych korelacji pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu a kotyniną w moczu dla osób niepalących i biernie narażonych, zdecydowano o połączeniu tych dwóch grup w jedną.

Wyznaczone wartości współczynników korelacji są w badanych grupach znamienne. W grupie palaczy czynnych uzyskano korelację przeciętną, zgodnie ze skalą korelacji Stanisza [Stanisz 2006]. Jednak przebieg krzywej regresji nakazuje bardzo ostrożną interpretację uzyskanych wyników z następujących powodów. Po pierwsze należy pamiętać, że u czynnych palaczy tytoniu obecny w dymie tlenek azotu (II) inaktywuje metylokobalaminę oraz syntazę metioninową. Może dojść do niedoboru witaminy B₁₂, a kwas foliowy pozostanie związany w postaci 5-metylotetrahydrofolianu. Wynikiem tej reakcji jest niezdolność organizmu do remetylacji homocysteiny do metioniny [Sobczak 2005b]. Niewłaściwie sformułowany wniosek mógłby prowadzić do stwierdzenia, że stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego u palaczy czynnych powinno być wyższe niż u niepalących, a tak nie jest. Ponadto, zgodnie z wytycznymi międzynarodowej komisji *IUPAC – Union of Biochemistry* - do pełnej interpretacji wyników należy przyjąć co najmniej sumę kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego oraz 5,10-metylenotetrahydrofolianu w

osoczu [Quinlivan 2006]. Oznaczenie obu tych form kwasu foliowego, z wykorzystaniem detektora kulometrycznego typu *Coulochem II*, niestety nie było możliwe w tym doświadczeniu.

5.6. Wpływ palenia tytoniu na stężenie witaminy B₆ w osoczu

Jak wspomniano w części teoretycznej pracy, witamina B₆ jest kofaktorem transsulfuracji homocysteiny do cystationiny i dalej cysteiny. Aktywność enzymów, biorących udział w tych przemianach (β -syntaza cystationinowa i γ -cystationaza), jest uzależniona od ilości fosforanu-5'-pirydoksalu (aktywnej formy witaminy B₆). Według McCarty'ego, składniki dymu tytoniowego pośrednio wpływają na transsulfurację homocysteiny [McCarty 2000]. Dym tytoniowy wpływa bowiem na zwiększenie produkcji interleukiny 6 (IL6), która stymuluje aktywność fosfatazy pirydoksalu w hepatocytach. W konsekwencji zmniejsza się stężenie fosforanu pirydoksalu, co wiąże się z obniżeniem aktywności β -syntazy cystationinowej [Sobczak 2005b]. Zdaniem Balda, związkami odpowiedzialnymi za dezaktywację witaminy B₆ są tlenek i disiarczek węgla [Bald 2003]. W doświadczeniu prowadzonym przez zespół Iqbal i wsp. opisano zmniejszone stężenie witaminy B₆ u palaczy tytoniu [Iqbal i in., 2005]. W projekcie badawczym *INTERMAP*, obejmującym 17 populacji osób palących i niepalących, zwrócono szczególną uwagę na różnice w stylu życia oraz nawyki żywieniowe osób palących, które zasadniczo wpływają na oznaczane u nich stężenia witamin z grupy B [Dyer i in., 2003].

W badaniach własnych zaobserwowano mniejsze i znamienne stężenia fosforanu-5'-pirydoksalu w grupach biernie narażonych i czynnie palących kobiet (tab. 20, ryc. 28). Nie zaobserwowano natomiast znamiennych korelacji pomiędzy oznaczanymi formami witaminy B₆ a biomarkerami narażenia na dym tytoniowy (tab. 21, ryc. 30). Brak tych korelacji można wytłumaczyć wspomnianymi wyżej nawykami żywieniowymi w poszczególnych grupach. Weryfikując dane ankietowe dotyczące sposobu i częstości konsumpcji wybranych produktów spożywczych zauważono, że osoby palące znacznie rzadziej spożywały świeże warzywa i owoce, które są cennym źródłem witamin z grupy B, niż osoby niepalące i biernie narażone. W przeprowadzonym doświadczeniu oznaczano także nieaktywny metabolit witaminy B₆ – kwas 4-pirydoksynowy, który jest uznanym indykatorem spożycia pirydoksyny [Coburn 2000, Bisp i in., 2002]. Jako ciekawostkę można potraktować fakt występowania

wyższych stężeń tego kwasu w osoczu u osób dodatkowo suplementujących witaminę B₆ w postaci preparatów farmaceutycznych i suplementów diety (ryc. 29 C).

5.7. Wykorzystanie detekcji elektrochemicznej kulometrycznej w HPLC do oznaczeń tioli i witamin z grupy B prezentowanych w pracy

Matryce wielu próbek biologicznych, nawet po ich przygotowaniu, bywają na tyle skomplikowane, że niemożliwe jest zastosowanie do ich analizy końcowej prostych metod chromatograficznych. Detekcja elektrochemiczna w HPLC charakteryzuje się bardzo dużą wykrywalnością, porównywalną z detekcją fluorescencyjną, stosowaną powszechniej w oznaczeniach witamin i tioli [Flanagan i in., 2005]. Jednak podstawową zaletą tej detekcji jest możliwość pominięcia, niejednokrotnie czasochłonnego i trudnego, procesu derywatyzacji w procesie przygotowania próbki do analizy.

Wiąże się to z obniżeniem kosztów przeprowadzanych doświadczeń oraz zmniejszeniem ilości stosowanych, często toksycznych odczynników, jak również z możliwością szybszej obróbki materiału biologicznego, co ma istotne znaczenie w analizie biotioli.

Metoda oznaczania tioli z zastosowaniem detektora kulometrycznego pozwala na jednoczesne wykrywanie i oznaczanie tioli i disiarczków symetrycznych i mieszanych. Do wad zastosowanej metody można zaliczyć dość czasochłonną i uciążliwą obsługę celki detekcyjnej, która przy długoterminowym wykorzystywaniu łatwo może ulec zanieczyszczeniu lub zużyciu elektrod pracujących. Może przyczynić się to do uzyskiwania niższych wyników oznaczeń końcowych [Flanagan i in., 2005]. Odpowiednio zoptymalizowane warunki chromatograficzne oraz staranne czyszczenie elektrod po wykonaniu analizy, w znacznym stopniu minimalizują ten problem.

Niewątpliwą zaletą detektora kulometrycznego jest możliwość oznaczenia różnych form kwasu foliowego w materiale biologicznym. Foliiany są grupą związków, które utleniają się przy znacznie niższych wartościach prądowych, niż inne anality, np. tiole; stąd wybór tej detekcji do oznaczeń wydaje się być jak najbardziej słuszny. Wadą detektora kulometrycznego typu *Coulochem II* jest niemożliwość oznaczenia więcej niż jednej formy kwasu foliowego, przy zastosowaniu danego potencjału, z uwagi na typ elektrod analitycznych (dwie elektrody węglowe ułożone szeregowo). W tego typu oznaczeniach częściej stosuje się detektory elektrochemiczne typu *CoulArray*,

zbudowane z kilku lub kilkunastu elektrod ułożonych szeregowo [Svendsen 1993; Bagley i Selhub 2000; Quinlivan i in. 2006]. W związku z powyższym zdecydowano o oznaczeniu kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego jako najważniejszego analogu kwasu foliowego, występującego w osoczu, którego obecność jest ściśle związana z metabolizmem homocysteiny.

W pracy posłużono się także metodą jednoczesnego oznaczenia pirydoksalu, fosforanu-5'-pirydoksalu i kwasu 4-pirydoksynowego w osoczu z wykorzystaniem detekcji elektrochemicznej kulometrycznej. Wszystkie oznaczane formy witaminy B₆ utleniają się przy dość wysokich wartościach prądowych (+0,8 V), zbliżonych do oznaczeń tioli. Odpowiedni dobór warunków chromatograficznych oraz modułowe połączenie detektora elektrochemicznego z detektorem UV-Vis, który pracował jako detektor skanujący, eliminują możliwość popełnienia błędu w odczytach chromatogramów. Do wad metody można zaliczyć uciążliwość zmiany zakresu sygnału aparatu w trakcie trwania analizy chromatograficznej, kilkudniowe ustalanie się linii bazowej bez wyraźnego dryfu oraz stosunkowo długi czas pojedynczej analizy. Zmiana zakresu sygnału aparatu umożliwia jednak pewny odczyt bardzo niskiego stężenia oznaczanych związków (nmol/l).

5.8. Ocena kondycji zdrowotnej respondentów biorących udział w badaniu

Głównym celem przeprowadzonego wywiadu ankietowego wśród osób zakwalifikowanych do badania była ocena narażenia na środowiskowy dym tytoniowy, którą zweryfikowano w oparciu o oznaczanie stężenia kotyniny w moczu. Dodatkowo, kierując się wzrastającą edukacją zdrowotną społeczeństwa, w wywiadach pytano o częstotliwość wykonywania podstawowych badań lekarskich, takich jak: pomiar ciśnienia tętniczego krwi, badanie poziomu glukozy we krwi, badanie poziomu cholesterolu we krwi oraz wykonywanie ogólnego badania moczu. Pytano również o znajomość całkowitego poziomu cholesterolu we krwi oraz znajomość grupy krwi.

Wyniki uzyskanych danych są bardzo niepokojące. Tylko 28 % respondentów wykonywało pomiar ciśnienia krwi i ogólne badanie moczu raz w roku lub kilka razy w roku. Badanie poziomu cholesterolu we krwi oraz poziomu glukozy raz w roku deklarowało 19,5 % ankietowanych, większość (71 %) stanowiły kobiety. W ogóle badań poziomu cholesterolu („odpowiedź nie pamiętam kiedy”) nie wykonywało aż 53 % ankietowanych. Tylko 8,5 % potrafiło podać aktualny poziom swojego cholesterolu we krwi. Swoją grupę krwi potrafiło określić tylko 68 % ankietowanych.

Ustosunkowując się do tych wyników nasuwają się dwa problemy. Pierwszy dotyczy może stosunkowo niskiej świadomości społecznej w zakresie podstawowej profilaktyki zdrowotnej, drugi ewentualnej niedostępności do wykonywania tego typu badań. Nie stanowi to jednak tematu tej rozprawy. Być może odpowiedzią jest tutaj stosunkowo niski wiek ochotników (średni wiek badanych wynosił $24,4 \pm 2,2$ lata). Niepokojący jest jednak fakt uzyskania takich wyników ponieważ problemem współczesnej medycyny jest przedwczesna umieralność, zwłaszcza u ludzi młodych i w średnim wieku.

6. WNIOSKI

1. Zawartość kotyniny w moczu oraz wartość stosunku stężeń kotyniny do kreatyniny są równocennymi i diagnostycznie użytecznymi biomarkerami w ocenie ekspozycji na dym tytoniowy.
2. Stężenie homocysteiny w osoczu można uznać także za czuły biomarker w ocenie narażenia na dym tytoniowy, ponieważ wzrost jej stężenia w osoczu jest proporcjonalny do wielkości ekspozycji.
3. Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy osłabia barierę antyoksydacyjną organizmu poprzez niekorzystny wpływ na potencjał redukcyjny buforu glutationowego we krwi (GSH/GSSG) oraz wzrost stężenia glutationu utlenionego w osoczu.
4. Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy wpływają niekorzystnie na stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu.
5. Nie stwierdzono zależności pomiędzy narażeniem na dym tytoniowy a stężeniem witaminy B₆.
6. Osoby palące powinny dodatkowo suplementować kwas foliowy w celu normalizacji osoczowych stężeń homocysteiny i kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego.

7. STRESZCZENIE

Palenie tytoniu jest niewątpliwie, jednym z najważniejszych czynników wpływających niekorzystnie na stan zdrowia. Wiele badań epidemiologicznych i klinicznych potwierdza, że palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy, zwiększa ryzyko zachorowania na nowotwory, choroby układu krążenia, choroby płuc i wiele innych stanów chorobowych, o charakterze ostrym i przewlekłym. Stąd z paleniem tytoniu związana jest przedwczesna umieralność, zwłaszcza u ludzi młodych i w średnim wieku. Wykazano także, niekorzystny wpływ dymu tytoniowego na stężenia antyoksydantów komórkowych oraz na stężenie proaterogennej homocysteiny, uznanego czynnika ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz naczyniowo-mózgowych.

Celem pracy była ocena ekspozycji na dym tytoniowy u osób palących i niepalących oraz zbadanie wpływu palenia tytoniu, na osoczowe stężenia homocysteiny i kofaktorów jej metabolicznych przemian, do nietoksycznych tioli: kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego oraz witaminy B₆. W pracy, badano także aktywność glutationowego buforu redoks we krwi i osoczu osób palących, biernie narażonych i niepalących, aby potwierdzić upośledzenie bariery antyoksydacyjnej ustroju, wywołane przez dym tytoniowy. Stopień narażenia na dym tytoniowy badanych osób określano poprzez stężenie kotyniny w moczu i stosunek stężeń kotynina/kreatynina w moczu.

W doświadczeniu uczestniczyło 134 ochotników (74 kobiety i 60 mężczyzn), w przedziale wiekowym od 19 do 45 lat (średnia wieku $24,4 \pm 2,2$ lata). Na podstawie wartości stężeń kotyniny w moczu badane osoby podzielono na grupę niepalących i nie ekspozowanych na dym tytoniowy (grupa kontrolna), biernie narażonych i grupę czynnych palaczy. Za umowne wartości graniczne stężenia kotyniny, odróżniające osoby niepalące i nie ekspozowane na dym tytoniowy, przyjęto wartość poniżej 50 µg/l, natomiast dla odróżnienia biernych od czynnych palaczy przyjęto wartość <500 µg/l.

Stężenie kreatyniny w moczu oznaczano metodą labolatoryjną, natomiast stężenia pozostałych parametrów biochemicznych (kotyniny, homocysteiny, glutationu, kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego, witaminy B₆, oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Stwierdzono, że stężenie kotyniny w moczu oraz wartość stosunku stężeń kotynina/kreatynina są ze sobą związane, na co wskazuje wysoki współczynnik korelacji R-Spermana (0,921). Wykazano znamienne wyższe stężenia kotyniny w moczu, osób palących i biernie narażonych na dym tytoniowy.

Uzyskane wyniki oznaczeń stężenia homocysteiny, pozwalają jednoznacznie wnioskować, że palenie tytoniu wpływa na podwyższenie jej stężenie w osoczu. W grupie osób biernie palących, współczynnik korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu i stopniem narażenia na dym tytoniowy, w postaci stężenia kotyniny w moczu, ma wartość przeciętną ($r = 0,438$). Z kolei u czynnych palaczy stwierdzono znamienne wyższe stężenia homocysteiny w osoczu ($p < 0,001$), przy jednoczesnym wzroście współczynnika korelacji ($r = 0,817$).

Udowodniono, że palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy, osłabia barierę antyoksydacyjną organizmu, poprzez niekorzystny wpływ na potencjał redukcyjny buforu glutationowego we krwi (GSH/GSSG) oraz wzrost stężenia glutationu utlenionego w osoczu.

Wykazano, że palenie tytoniu wpływa niekorzystnie na stężenie kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego w osoczu. W grupach palaczy czynnych i biernych stwierdzono znamienne ($p < 0,001$) i mniejsze stężenia tego kwasu. Współczynniki korelacji pomiędzy stężeniem kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego a stopniem narażenia na dym tytoniowy, wyrażonym poprzez stężenie kotyniny w moczu, mieściły się w przedziale wartości słabych, dla grupy biernie narażonych ($r = -0,172$) oraz przeciętnych ($r = -0,543$), dla palaczy czynnych. Nie stwierdzono natomiast, zależności pomiędzy narażeniem na dym tytoniowy a stężeniem witaminy B₆.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że oznaczanie stężenia kotyniny w moczu, także przeliczanie na g wydalanej kreatyniny, są równocennymi i użytecznymi wskaźnikami narażenia na dym tytoniowy. Stężenie homocysteiny w osoczu można uznać także za czuły biomarker w ocenie narażenia na dym tytoniowy, ponieważ wzrost jej stężenia w osoczu jest proporcjonalny do wielkości ekspozycji. Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy, wpływają niekorzystnie na równowagę oksydoredukcyjną bufora glutationowego, który inaktywuje wolne rodniki, pochodzące z dymu tytoniowego. Toksyczne działanie dymu tytoniowego wpływa także niekorzystnie, na osoczowe stężenia kwasu 5-metylotetrahydrofoliowego.

8. PIŚMIENNICTWO

Adamek R., Adamek A.M., Florek E., Anholcer A.: Ocena wpływu biernego narażenia kobiet na dym tytoniowy w czasie ciąży na masę urodzeniową i parametry życiowe noworodka. *Gin. Prakt.*, 2003; 11 (2): 24.

Bagley P.J., Selhub J.: Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection. *Clin. Chem.*, 2000; 46 (3): 404.

Baker R.R. a, Massey E.D., Smith G.: An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 2004; 42 (1): 53.

Baker R.R. b, da Silva J.R.P., Smith G.: The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry, part I: Flavours and additives. *Food Chem. Toxicol.*, 2004; 42 (1): 3.

Baker R.R. c, da Silva J.R.P., Smith G.: The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry, part II: Casing ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, 2004; 42 (1): 39.

Baidoo E.E.K., Clench M.R., Smith R.F., Tetler L.W.: Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2003; 796: 303.

Bald E.: Homocysteina, niegdyś egzotyczny metabolit. Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii, red. Włodek L. Wyd. UJ, Kraków, 2003.

Barnoya J., Glantz S.A.: Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. *Circulation*, 2005; 111: 2684.

Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Bates C., Jarvis M., Connolly G.: Tobacco additives: cigarette engineering and nicotine addiction. 1999, (<http://www.ash.org.uk/html/regulation/html/additives.html>).

Benowitz N.L.: Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.*, 1996; 18: 188.

Benowitz N.L., Pomerleau O.F., Pomerleau C.S., Jacob III P.: Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. *Nic. Tobacco Res.* 2003; 5: 1.

Bergmark C., Mansoor M.A., Svardsal A., de Faire U.: Redox status of plasma homocysteine and related aminothiols in smoking and nonsmoking young adults. *Clin. Chem.*, 1997; 43 (10): 1997.

Bisp M.R., Bor M.V., Heinsving E-M., Kall M.A., Nexø E.: Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in plasma: development and evaluation of high-performance liquid chromatographic assay. *Anal. Biochem.*, 2002; 305: 82.

Bolander-Gouaille C., Bottiglieri T.: Homocysteine related vitamins and neuropsychiatric disorders. Springer, France, 2003.

Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A.: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 168.

Bonita R., Duncan J., Truelsen T., Jackson R.T., Beaglehole R.: Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. *Tob. Control.*, 1999; 8 (2): 156.

Brattström L., Wilcken D.E.L., Öhrvik J., Brudin L.: Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. *Circulation*, 1998; 98: 2520.

Cafolla A., Dragoni F., Girelli G., Tosti M.E., Costante A., Pastorelli D. et al.: Folate status in Italian blood donors: relation to gender and smoking. *Haematologica*, 2000; 85 (7): 694.

Celik H., Ayar A., Tug N., Cikim G., Kilic N., Parmaksiz C.: Effect of tibolone on plasma homocysteine levels in postmenopausal women. *Fertil. Steril.*, 2002; 78 (2): 347.

Ceppa F., El Jahiri Y., Mayaudon H., Dupuy O., Burnat P.: High-performance liquid chromatographic determination of cotinine in isocratic mode. *J. Chromatogr B.*, 2000; 746: 115.

Chango A., Boisson F., Barbé F., Quilliot D., Droesch S., Pfister M. et al.: The effect of 677C→T and 1298A→C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br. J. Nutrition*, 2000; 83: 593.

Church D.F., Pryor W.A.: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.*, 1985; 64: 111.

Coburn S.P.: Vitamin B6, chapt. 8. *Modern Analytical methodologies in fat- and water soluble vitamins.* ed. Song W.O., Beecher G.R., Eitenmiller R.D., John Wiley & Sons, Canada, 2000.

Cohours X., Renault H., Dubois M., Marchand V., Dumery B.: Oxidative effects of cigarette smoke: assessment by fast cell-free method. The CORESTA congress, Kyoto, Japan, 2004.

Cravo M.L., Camilo M.E.: Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B6 and B12 status. *Nutrition*, 2006; 16: 196.

Czarnywojtek A., Zgorzalewicz-Stachowiak M., Florek E., Piekoszewski W., Warmuz-Stangierska I., Kulińska-Niedziela I. i in.: The level of cotinine – marker of tobacco smoking, in patients in hyperthyroidism. *Endokrynol. Pol.*, 2006; 57(6): 612.

Dalton M.L., Gadson Jr P.F., Wrenn R.W., Rosenquist T.H.: Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEB J.*, 1997; 11: 703.

Dempsey D., Jacob III P., Benowitz N.L.: Nicotine metabolism and elimination kinetics in newborn. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000, 67: 458.

Dempsey D., Tutka P., Jacob III P., Allen F., Schoedel K., Tyndale R.T. et al.: Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, 76: 64.

Denicola A., Radi R.: Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology*, 2005; 208: 273.

Doctor P.B., Gokani V.N., Kulkarni P.K., Parikh J.R., Saiyed H.N.: Determination of nicotine and cotinine and tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2004, 804: 323.

DRI 1998: Dietary Reference Intake for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Washington D.C., National Academy Press, USA, 1998.

Drzewoski J., Czupryniak L., Chwatko G., Bald E.: Hyperhomocysteinemia in poorly controlled Type 2 diabetes patients. *Diab. Nutr. Metab.*, 2000; 13: 319.

Duda-Chodak A., Tuszyński T.: Wpływ reaktywnych wolnych rodników na organizmy żywe. Przeciwwutleniacze w żywności – aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne WNT, Warszawa 2007.

Dusitanond P., Eikelboom J.W., Hankey G.J., Thom J., Glimore G., Loh K. et al.: Homocysteine – lowering treatment with folic acid, cobalamin, and pyridoxine does not reduce blood marker of inflammation, endothelial dysfunction, or hypercoagulability in patients with previous transient ischemic attack of stroke. *Stroke*, 2005; 36: 144.

Dyer A.R., Elliott P., Stamler J., Chan Q., Ueshima H., Zhou B.F., for the INTERMAP Research Group. Dietary intake in male and female smokers, ex-smokers and never-smokers: The INTERMAP Study. *J. Hum. Hyperten.*, 2003; 17: 641.

Ebbert J.O., Dale L.C., Nirelli L.M., Schroeder D.R., Moyer T.P., Hurt R.D.: Cotinine as a biomarker of systemic nicotine exposure in spit tobacco users. *Addictiv. Behav.*, 2004; 29: 349.

Eiserich J.P. a, van der Vliet A., Handelman G.J., Halliwell B., Cross C.E.: Dietary antioxidants and cigarette smoke induced biomolecular damage; a complex interaction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62: 140.

Eiserich J.P. b, O'Neill C.A., Cross C.E., Halliwell B., Reznick A.Z., van der Vliet A.: Effects of thiols on cigarette smoke-induced biomolecular damage. Chapt.3 (19). ed. Packer L., Cadenas E. *Biothiols in health and disease*. Marcel Decker USA, 1995.

Eissenberg T., Adams C., Riggins III E.C., Liknes M.: Smokers' sex and the effect of tobacco cigarettes: subject-rated and physiological measures. *Nicotine Tob. Res.*, 1999; 1: 317.

Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G., Cottrell B., McGregor G.R., Wallace D.C.: Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999; 28 (5): 754.

FDA1996a: Foulke J.: Folic acid to fortify U.S. food products to prevent birth defects. Washington DC: US Food and Drug Administration, 1996.

FDA1996b: <http://vm.cfsan.fda.gov/~Ird/fr96305c.html>.

Finkelstein J.D., Martin J.J.: Homocysteine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000; 32: 385.

Fiorina P., Lanfredini M., Montanari A., Peca M.G., Veronelli A., Mello A. et al.: Plasma homocysteine and folate and related to arterial blood pressure in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.*, 1998; 11: 1100.

Flanagan R.J., Perrett D., Whelpton R.: Electrochemical detection in HPLC. Analysis of drugs and poisons. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.

Florek E., Marszalek A.: An experimental study of the influence of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1999; 18: 272.

Ghosheh O.A., Browne D., Rogers T., de Leon J., Dwoskin L., Crooks P.A.: A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3'-hydroxycotinine and caffeine in the plasma of smokers. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000; 23: 543.

Greaves R., Trotter L., Brennecke S., Janus E.: A simple high-pressure liquid chromatography cotinine assay: validation of smoking status in pregnant women. *Ann. Clin. Biochem.*, 2001; 38: 333.

Gupta M., Sharma P., Garg G., Kaur K., Bedi G.K., Vij A.: Plasma homocysteine: an independent or an interactive risk factor for coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta*, 2005; 352: 121.

Hanke W., Sobala W., Kalinka J.: Environmental tobacco smoke exposure among pregnant women; impact on fetal biometry at 20 – 24 weeks of gestation and newborn child's birth weight. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 2004; 77: 47.

Hatsukami D.K., Grillo M., Pentel P.R., Oncken C., Bliss R.: Safety of cotinine in humans: physiologic, subjective and cognitive effects. *Pharm. Biochem. Behav.*, 1997; 57 (4): 643.

Heavner D.L., Morgan W.T., Sears S.B., Richardson J.D., Byrd G.R., Ogden M.W.: Effect of creatinine and specific gravity normalization techniques on xenobiotic biomarkers in smokers' spot and 24-h urines. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 40: 928.

Holl R.W., Grabert M., Heinze E., Debatin K.M.: Objective assessment of smoking habits by urinary cotinine measurement in adolescents and young adults with type 1 diabetes. *Diab. Care*, 1998; 21 (50): 787.

Iqbal M.P., Ishaq M., Kazmi K.A., Yousuf F.A., Mehboobali N., Ali S.A.et al.: Role of vitamins B6, B12, folic acid on hyperhomocysteinemia in a Pakistani population of patients with acute myocardial infraction. *Nutr. Met. Cardiol. Diseases*, 2005; 15: 100.

Isobe C., Marata T., Sato C., Tarayama Y.: Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci.*, 2005; 77: 1836.

Jakubowski H.: Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinulation in humans. *J. Nutr.*, 2000, 130: 377S.

JAMA 2002: Clarke R., Collins R., Leington D., Donald A., Kuller S. et al.: A Meta Analysis. Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic hearth disease and stroke. *JAMA*, 2002; 288: 2015.

Jauniaux E., Gulbis B., Acharya G., Thiry P., Rodeck C.: Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 1999; 93: 25.

Khuder S.A.: Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*, 2001; 31: 139.

Klatt P., Lamas S.: Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 4928.

Kloeblen A.S., Thompson N.J., Miner K.R.: Predicting breast-feeding intention among low-income pregnant women: a comparison of two theoretical models. *Health Edu. Behav.*, 1999; 5: 675.

Kohashi M., Inoue K., Sotobayashi H., Iwai K.: Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 1986; 382: 303.

Kosecik M., Erel O., Sevinc E., Selek S.: Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int. J. Cardiol.*, 2005; 100: 61.

Kuo H.W., Sang J.S., Chiu M-C.: Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Chromatogr. B*, 2002; 768: 297.

Lankelma J., van der Klein E., Jansen M.J.T.: Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid in plasma and spinal fluid by high-performance liquid chromatography, using on-column concentration and electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 1980; 182: 35.

Larkin M.: Klimer McCully: pioneer of the homocysteine theory. *Lancet*, 1998; 352: 1364.

Law M.R., Wald N.J.: Environmental tobacco smoke and ischemic heart disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2003; 46: 31.

Lebiedzińska A. Ocena żywności jako elementu środowiska człowieka w oparciu o badania zawartości witamin z grupy B – implikacje analityczne. *Rozpr. hab.*, AM Gdańsk, 2007.

Lenton K.J., Therriault H., Fülöp T., Payette H., Wagner J.R.: Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogen.*, 1999; 20 (4): 607.

Leuchtenberger C., Leuchtenberger R., Zbinden I.: Gas vapour phase constituents and SH reactivity of cigarette smoke influence lung cultures. *Nature*, 1974; 247: 565.

Loscalzo J.: Homocysteine and dementias. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 466.

Lucock M.D., Daskalakis I., Schorach C.J., Lumb C.H., Oliver M., Devitt H. et al.: Folate-homocysteine interrelations: potential new markers of folate status. *Mol. Gen. Metabol.*, 1999; 67: 23.

Łazarkiewicz J.W., Ziembowicz A., Matyja E., Stafiej A., Ziemiańska E.: Homocysteine-evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated both by NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.*, 2003; 28: 259.

Maier W., Cosentino F., Lutolf R.B., Fleisch M., Seiler C., Hess O.M. et al.: Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2000; 35: 173.

Mangoni A.A.: Folic acid, inflammation, and atherosclerosis: False hopes or the need for better trials? *Clin. Chim. Acta*, 2006; 367: 11.

Mansoor M.A., Svardal A.M., Ueland P.M.: Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.*, 1992; 200: 218.

Mascher D.G., Mascher H.J., Scherer G., Schmid E.R.: High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of 3-hydroxypropylmercapturic acid in human urine. *J. Chromatogr. B*, 2001; 750: 163.

Mayer E., Jacobsen D.W., Robinson K.: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1996; 27: 517.

McCarty M.F.: Increased homocyst(e)ine associated with smoking, chronic inflammation, and aging may reflect acute-phase induction of pyridoxal phosphatase activity. *Med. Hypothesis*, 2000; 55 (4): 289.

McDonald S.D., Walker M.C.: Homocysteine levels in pregnant women who smokes cigarettes. *Med. Hypotheses*, 2001; 57 (6): 792.

Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R.J., James S.J.: A New HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. *J. Nutr. Biochem.*, 1999; 10: 490.

Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Yi P., James S.J.: Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alternations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations. *Clin. Chem.*, 2000; 46 (2): 265.

Moat S.J., Lang D., McDowell I.F.W., Clarke Z.L., Madhavan A.K., Lewis M.J. et al.: Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.*, 2004; 15: 64.

Moszczyński P., Pyć R.: Biochemia witamin. Część 1. Witaminy grupy B i koenzymy. Wyd. Naukowe PWN, Łódź, 1998.

Müller F., Svardal A.M., Aukrust P., Berge R.K., Ueland P.M., Froland S.S.: Elevated plasma concentration of reduced homocysteine in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996; 63: 242.

Naruszewicz M., Klinke M., Bukowska H., Bobnis M.: Elevated homocyst(e)ine increased ability of human aortic cells to oxidize LDL. *Artherosclerosis*, 1997; 134: 13.

Naruszewicz M., Klinke M., Dziewianowski K., Staniewicz A., Bukowska H.: Homocysteine, fibrinogen and lipoprotein (a) levels are simultaneously reduced in patients with chronic renal failure treated with folic acid, pyridoxine and cyanocobalamin. *Metabolism*, 2001; 50: 131.

Nowicka G.: Badania genetyczne w naukach żywieniowych: witaminy a stabilność genomu. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2005; 79.

Nygård O., Vollset S.E., Fersum H.: Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*, 1995; 274: 1526.

O'Callaghan P., Meleady R., Fitzgerald T., Graham I., the European COMAC group.: Smoking and plasma homocysteine. *Eur. Heart J.*, 2002, 23: 1580.

Ortega R.M., Lopez-Sobaler A.M., Gonzales-Gross M.M.: Influence of smoking on folate intake and blood folate concentrations in the group of elderly Spanish men. *Am. J. Coll. Nutr.*, 1994; 13: 68.

Ortega R.M., Requejo A.M., Andres P., Lopez-Sobaler A.M., Quintas M.F., Redondo M.R. et al.: Dietary intake and cognitive function in group of elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 66: 803.

Osganian S.K., Meir J., Stampfer J., Spiegelman D., Rimm E., Cutler J.A. et al.: Distribution and factors associated with serum homocysteine levels in children. *JAMA*, 1999; 281: 1189.

Pagan K., Hou J., Goldenberg R.L., Cliver S.P., Tamura T.: Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine and B vitamins in mild pregnancy. *Clin. Chim. Acta*, 2001; 306: 103.

Panagiotakos D.B., Pitsavos Ch., Zeimbekis A., Chryschoou Ch., Stefanadis Ch.: The association between lifestyle-related factors and plasma homocysteine levels in healthy individuals from the "ATTICA" Study. *Int. J. Cardiol.*, 2005; 91: 471.

Park E.M., Park Y.M., Gwak Y.S.: Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 25 (1): 79.

Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 333: 19.

Patterson F., Benowitz N.L., Shields P., Kaufmann V., Jepson Ch., Wileyto P. et al.: Individuals differences in nicotine intake per cigarette. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 468.

Perry I.J., Refsum H., Morris R.W., Ebrahim S.B., Ueland P.M., Shaper A.G.: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged. *Lancet*, 1995; 346: 1395.

Picciotto M.R.: Nicotine as the modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends in Pharmacol Sci.*, 2004; 24 (9): 493.

Piekoszewski W., Florek E.: Markery narażenia na dym tytoniowy. *Wyd. AM Poznań* 2001.

Piekoszewski W., Florek E.: Tytoń w liczbach na początku nowego stulecia. *Przegl. Lek.*, 2006; 63 (10): 823.

Piyathilake C.J., Macaluso M., Hine R.J., Richards E.W., Ktumdieck C.L.: Local and systemic effect of cigarette smoking on folate and vitamin B12. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1994; 60: 559.

Pryor W.A.: Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use for electron spin resonance. *Free Radic. Med. Biol.*, 1992; 13: 359.

Pryor W.A., Stone K., Zang L.Y., Bermudez E.: Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998; 11:441.

Quinlivan E.P., Hanson A.D., Gregory J.F.: The analysis of folate and its metabolic precursor in biological samples. *Anal. Biochem.*, 2006; 348: 163.

Rasmusen K., Møller J.: Total homocysteine measurement in clinical practice. *Am. Clin. Biochem.*, 2000; 37: 627.

Reddy S., Finkelstein E.I., Wong P.S., Phung A., Cross C.E., van der Vliet A.: Identification of glutathione modification by cigarette smoke. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 33:1490.

Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M., Nexø E., Clarke R., McPartlin J. et al.: Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin. Chem.*, 2004; 50: 3.

Refsum H., Ueland P.M., Nygård O., Vollset S.E.: Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann. Rev. Med.*, 1998; 49: 31.

Relton C.L., Rankin J.: Folic acid – The challenge of in planned pregnancy and social deprivation. *BMJ*, 2005; 330: 574.

Roggli V.L., Sanders L.L.: Asbestos content of lung tissue and carcinoma of the lung: a clinicopathologic correlation and mineral fiber analysis of 234 cases. *Ann. Occup. Hyg.*, 2000; 44 (2): 109.

Rosenquist T.H., Ratashak S.A., Selhub J.: Homocysteine induces congenital defects on the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 15277.

Ruggeri S., Vahteristo L.T., Aguzzi A., Finglas P., Carnovale E.: Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1999; 855: 237.

Rydlewicz A., Simpson J.A., Taylor R.J., Bond C.M., Golden M.H.N.: The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *Q. J. Med.*, 2002; 95: 27.

Sajdak S., Witczak K., Sroka L., Samulak D.: Wpływ palenia tytoniu na zdrowie ginekologiczne kobiety. *Przegl. Lek.*, 2005; 62 (10): 1154.

Sassi S., Cosmi B., Palareti G., Legnani C., Grossi G., Musilesi S. et al.: Influence of age, sex, and vitamin status on fasting and post-methionine load plasma homocysteine levels. *Hematologica*, 2002; 87: 957.

Savitz D.A., Die N., Terry Jr J.W., Zhou H., Trop Jr M.: Smoking and pregnancy outcome among African-American and white women Central North Carolina. *Epidemiology*, 2001; 12: 636.

Schafer F.Q., Buettner G.R.: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.*, 2001; 30 (11): 1191.

Seshardi S., Beiser A., Shellub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B. et al.: Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer disease. *N. Eng. J. Med.*, 2002; 78: 3.

Sies H.: Glutathione and its role in celllural functions. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999; 27: 916.

Smith AD.: Homocysteine, B vitamins, and cognitive deficit in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 75 (5): 785.

Smith N.C., Dunnett M., Mills P.C.: Simultaneous quantification of oxidized and reduced gluatathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, 1995; 673: 35.

Sobczak A. a, Wardas W., Zielińska-Danch W., Szoltysek-Boldys I.: Biomarkery narażenia na dym tytoniowy. *Przegl. Lek.*, 2005; 62 (10): 1192.

Sobczak A. b, : Kotynina, homocysteina i alfa-tokoferol jako markery przewlekłego narażenia na dym tytoniowy. *Rozprawa hab.*, 2005; ŚAM Katowice.

Sobczak A., Golka B., Szoltysek-Boldys I. The effects of tobacco smoke on plasma alpha and gamma-tocopherol levels in passive and active cigarette smoker. *Toxicol. Let.*, 2004; 151: 429.

Song L., Davis W., Abrams S.M., Hemiup J., Kazim A,L., Cummings K.M. et al.: Sensitive and rapid method for the determination of urinary cotinine in non-smokers: an application for studies assessing exposures to second hand smoke (SHS). *Anal. Chim. Acta*, 2005; 545: 200.

Splaver A., Lamas G.A., Hennekens C.H.: Homocysteine and cardiovascular disease: Biological mechanism, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *Progres in Cardiol. Am. J. Health*, 2004; 148: 34.

Sprinz H., Schwinn J., Naumov S., Brede O.: Mechanism of thiyl radical-catalyzed isomerization of unsaturated fatty acid residues in homogeneous solution and in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000; 1483: 91.

SRNT (Society for Research on Nicotine and Tobacco), Subcommittee on Biochemical Verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob. Res.*, 2002; 4: 149.

Stahl Z., Belmaker R.H., Friger M., Levine J.: Nutritional and life style determinants of plasma homocysteine. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2004; 15: 291.

Stanisz A.: Biostatystyka. Wyd. UJ, Kraków 2005.

Stanisz A.: Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem *STATISTICA PL* na przykładach z medycyny. Tom 1. Statystyki podstawowe. Statsoft Polska, Kraków, 2006.

Stipanuk M.H.: Sulphur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.*, 2004; 24: 539.

Svendsen C.N.: Multi-electrode array detectors in high-performance liquid chromatography: a new dimension in electrochemical analysis. *Analyst*, 1993; 118: 123.

Svenungsson E., Jensen-Urstad K., Heimbürger M., Silveira A., Hamsten A., de Faire U. et al.: Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation*, 2001; 104 (16): 1887.

Sygnowska E., Waśkiewicz A.: Sposób żywienia a postawy wobec palenia tytoniu – badanie pol monica bis. Instytut Żywności i Żywienia, XXXIII, 1, Warszawa, 2006.

Szefer P.: Chemometric techniques in analytical evaluation of food quality. Mineral components in food. ed. Szefer P., Nriagu J.O. CRC Press Taylor & Francis Group, London, New York, 2007.

Tricker A.R.: Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphism, and smoking behavior. *Toxicology*, 2003; 183: 151.

Troughton J.A., Woodside J.V., Young I.S., Arveiler D., Amouyel P., Ferrières J. et al.: Homocysteine and coronary heart disease risk in the PRIME study. *Arteriosclerosis*, 2007; 191: 90.

Trypień K., Wielkoszyński T., Janoszka B., Dobosz C., Bodzek D., Stęplewski Z.: Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary metabolites. *J. Chromatogr. A*, 2000; 870: 29.

Trypień K., Wielkoszyński T., Kowalska M., Mańka G., Dobosz C.: Ocena częstości występowania kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny w wybranych próbkach płynów ustrojowych. *Przegl. Lek.*, 2006; 63 (10): 987.

Ueland P.M.: Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin. Chem.*, 1995; 41: 340.

Ullegaddi R., Powers H.J., Gariballa S.E.: B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischemic stroke. *Clin. Sci.*, 2004; 107: 477.

Undas A.: Nowe biologiczne czynniki ryzyka miażdżycy. *Forum Profil.*, 2007; 2 (7): 2.

Valkonen V.P., Laaksonen R.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clin. Chim. Acta*, 2004; 348: 9.

Van der Put N.M.J., Gabreëls F., Stevens E.M.B., Smeitink J.A.M., Trijbels F.J.M. et al.: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.*, 1998; 62:1044.

Van Guldener C., Denker A.J.M., Stehouwer C.D.A.: Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 339: 478.

Vasquez-Vivar J., Martasek P., Whittset J., Joseph J., Kalyanaraman B.: The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogs controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem. J.*, 2002; 362: 733.

Vollset S.E., Nygård O., Refsum H., Erland P.M.: Coffee and homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71 (2) 403.

de Weerd S., Kuster J.E.T.G., Cikot R.J.L.M., Steegers E.A.P.: Variation of serum and urine cotinine in passive and active smokers and applicability in preconceptional smoking cessation counseling. *Env. Res. Sec.*, 2002; 90: 119.

Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R.: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.*, 1998; 64: 169.

Whincup P.H., Gilg J.A., Emberson J.R., Jarvis M.J., Feyerabend C., Bryant A. et al.: Passive smoking and risk of coronary heart disease and stroke: prospective study with cotinine measurement. *BMJ*, 2004; 329 (7459): 200.

WHO1999 a: International consultation on ETS and Child Health – 1999: http://www.who.int/tobacco/health_impact/youth/ets/en/print/html.

WHO1999 b: WHO MONICA Project. MONICA smoking questionnaires 1999, <http://www.ktl.fi/publications/monica/smoking/qa30.html>.

WHO2000: The Worldwide Tobacco Epidemic – effective evidence-based treatment. Expert meeting 1999, Rochester, Minnesota, USA. Tobacco Free Initiative, WHO, 2000.

Wiergowski M., Nowak-Banasik L., Morkowska A., Galer-Tatarowicz K., Szpiech B., Korolkiewicz R. i in.: Problematyka oznaczania nikotyny i kotyniny w ludzkim materiale biologicznym w aspekcie badań toksykologicznych. *Przegl. Lek.*, 2006; 63 (10): 892.

Winterbourn Ch.C.: Concerted antioxidant activity of glutathione and superoxide dismutase. Chapt I (6). ed. Packer L., Cadenas E. *Biothiols in health and disease*, Marcel Dekker, USA, 1995.

Włodek L.: Glutathione. Antyoksydacyjne i detoksykacyjne właściwości, biologiczna i farmakologiczna regulacja biosyntezy. Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii, rozdz. 4; red. Włodek L, Wyd. UJ Kraków, 2003.

Wooten J.B., Chouchame S., McGrath T.E.: Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress, chapt. 2. ed. Halliwell B.B., Poulsen H.E. *Cigarette smoke and oxidative stress*. Springer, Germany, 2006.

Wouters M.G., Moorres M.T., van der Moorten M.J., Blom H.J., Boers G.H., Schellekens L.A. et al.: Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1995; 25: 801.

Yagisawa M., Doi Y., Uenohara T., Toda M., Shigematsu N., Nakata R.: Betaine supplementation suppresses plasma homocysteine level elevation induced by folate deficiency in rats. *Nutr Res*, 2006; 26: 266.

You R.X., Thrift A.G., McNeil J.J., Davis S.M., Donnan G.A.: Ischemic stroke risk and passive smoke exposure spouses' cigarette smoking. Melbourne Stroke Risk Factor Study (MERFS) Group. *Am. J. Public Health*. 1999; 89 (4): 572

Zang E.A., Wynder E.L.: Reevaluation of the confounding effect of cigarette smoking on the relationship between alcohol use and lung cancer risk with larynx cancer used as positive control. *Prev. Med.*, 2001; 32: 359.

Zang L.Y., Stone K., Pryor W.A.: Detection of free radicals in aqueous extract of cigarette tar by electron spin response. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 161.

Zatoński W.: Rozwój sytuacji zdrowotnej w Polsce na tle innych krajów Europy Środkowej i Wschodniej. Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 2001.

Zatoński W.: Leczenie zespołu uzależnienia od nikotyny. Materiały z kursu szkoleniowego, Gdańsk, 2007.

Ziemiański S.: Normy żywienia człowieka – fizjologiczne podstawy. Wyd. PZWL Warszawa 2001.

ZAŁĄCZNIK

– WZÓR ANKIETY WYPEŁNIANEJ PRZEZ UCZESTNIKÓW BADANIA:

Katedra i Zakład Toksykologii
Akademia Medyczna w Gdańsku

Temat badań: Ekspozycja na dym tytoniowy a poziom homocysteiny i jej kofaktorów we krwi i moczu u osób palących i niepalących.

Ankieta numer.....

1. Płeć żeńska ☐ męska ☐

2. Rok urodzenia.....

3. Wzrost(cm). 4. Masa ciała.....(kg).

5. Czy w Pana/Pani najbliższej rodzinie były lub są przypadki zachorowania na nowotwory?

☐ tak* ☐ nie

*proszę podać stopień pokrewieństwa.....

6. Czy jest Pan/Pani aktywny(a) fizycznie (np. bieganie, pływanie, jazda na rowerze, energiczny spacer, gimnastyka, jazda konno)?

☐ nie

☐ tak, od 20 do 60 min. 1 raz w tygodniu

☐ tak, od 20 do 60 min. 2 - 3 razy w tygodniu

☐ tak, od 20 do 60 min. 4 - 6 razy w tygodniu

☐ tak, od 20 do 60 min. codziennie

7.A. Czy przyjmuje Pan/Pani preparaty zawierające witaminy z grupy B i/lub sole mineralne

☐ tak* ☐ nie

*proszę o podanie nazwy preparatu.....

7.B. Z jaką częstotliwością przyjmuje Pan/Pani suplementy diety lub preparaty farmaceutyczne:

☐ codziennie

☐ okresowo

☐ w okresie rekonwalescencji

8. Czy pali Pan/Pani papierosy?

☐ tak

☐ nie

☐ nie, ale paliłem(am)

9. Czy przebywa Pan/Pani w otoczeniu osób palących?

☐ tak, proszę podać ile czasu dziennie..... ☐ nie

Część dla osób czynnie palących papierosy:

8.A. Ile średnio papierosów pali Pan/Pani w ciągu doby:.....

8.B. Jaka jest zawartość nikotyny w wypalanych przez Pana/Panią papierosach lub jakiej marki papierosy Pan/Pani pali najczęściej:.....

8.C. O jakiej porze zapala Pan/Pani pierwszego papierosa:

☐ do 30 min. po przebudzeniu się

☐ od 30 do 60 min. po przebudzeniu się

☐ później niż godzinę, ale nie dłużej niż 6 godz. po przebudzeniu się

☐ palę najwcześniej po 6 godzinach po przebudzeniu się

Część dotycząca sposobu żywienia (dla palących i niepalących)

9. Czy stosuje Pan/Pani specjalny rodzaj diety

☐ tak* ☐ nie

proszę podać rodzaj stosowanej diety.....

10. Ile dziennie spożywa Pan/Pani posiłków:

☐ dwa ☐ trzy ☐ cztery ☐ pięć

11.A. Czy dojada Pan/Pani pomiędzy posiłkami?

☐ tak* ☐ nie ☐ czasami*

11.B. * Jaki jest to rodzaj produktów?

☐ słodkie ☐ owoce ☐ kanapki

12. Jaka jest w przybliżeniu częstotliwość spożywania wybranych grup produktów spożywczych

Produkty spożywcze	1 raz dziennie	2 razy dziennie	Rzadziej niż 1 raz w tygodniu	1 raz w tygodniu	2 – 3 razy w tygodniu	nigdy
Produkty zbożowe						
Produkty mleczne						
Mięso						
Ryby						
Warzywa, owoce surowe						
Warzywa, owoce przetworzone						
Herbata						
Kawa						
Napoje gazowane						
Napoje alkoholowe						

13. Czy dodatkowo soli Pan/Pani potrawy?

☐ tak, zawsze ☐ czasami, niektóre ☐ nie

14. Czym słodzi Pan/Pani napoje?

☐ cukier ☐ miód naturalny ☐ słodziki ☐ nie słodzę

15. Jak ocenia Pan/Pani własny sposób żywienia?

☐ racjonalny ☐ jednostronny ☐ zróżnicowany

16. Z jaką częstotliwością wykonuje Pan/Pani badania lekarskie:

Badanie lekarskie	Raz w roku	Kilka razy w roku	Raz na kilka lat	Nie pamiętam kiedy
Pomiar ciśnienia tętniczego krwi				
Badanie poziomu glukozy we krwi				
Badanie				

poziomu cholesterolu we krwi				
Badanie ogólne moczu				

17. Czy zna Pan/Pani stężenie całkowitego cholesterolu we krwi:

[] tak* [] nie

* proszę podać wartość.....mg/dl

18. Czy zna Pan/Pani swoją grupę krwi?

[] tak* [] nie

*proszę podać.....

DZIĘKUJEMY ZA WYPEŁNIENIE ANKIETY