

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Farmaceutyczny

mgr inż. Anna Sędziak

**Wpływ palenia tytoniu
i biernego narażenia na dym
na cykl miesięczkowy kobiet**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Pracę wykonano
w Laboratorium Badań Środowiskowych
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Ewa Florek

Poznań 2012

Słowa kluczowe: palenie tytoniu, kobiety, kotynina,
hormony płciowe

Składam serdeczne podziękowania
Pani Promotor prof. dr hab. Ewie Florek
za życzliwą pomoc i opiekę naukową
oraz cenne wskazówki merytoryczne
przy wykonywaniu pracy

Dziękuję
Panu Dziekanowi Wydziału Farmaceutycznego
prof. dr hab. Lucjuszowi Zaprutko
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej
na Wydziale Farmaceutycznym
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Serdecznie dziękuję
Pracownikom Katedry i Zakładu Toksykologii
za życzliwą atmosferę jaka towarzyszyła
w czasie wykonywania pracy

Serdecznie dziękuję
Panu Kierownikowi Centralnego Laboratorium
Ginekologiczno – Położniczego Szpitala Klinicznego
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
dr n.farm. Markowi Chuchrackiemu
za wiarę, serdeczność i wsparcie

Serdecznie dziękuję
mojej Rodzinie
za siłę, którą od nich czerpałam
podczas pisania pracy

Dedykuję niniejszą pracę mojemu Ojcu

Spis treści

I.	WSTĘP	11
II.	ENDOKRYNOLOGIA CYKLU MIESIĄCZKOWEGO KOBIET	13
2.1.	Budowa i klasyfikacja hormonów	13
2.1.1.	Hormony gonadotropowe	19
2.1.2.	Hormony steroidowe jajnika – estrogeny, progesteron.....	20
2.2.	Budowa i czynności układu podwzgórze – przysadka – jajnik.....	22
2.3.	Hormony steroidowe jajnika – synteza, przemiany metaboliczne, biodegradacja .	31
2.3.1.	Synteza estradiolu i progesteronu	31
2.3.2.	Przemiany metaboliczne i biodegradacja estrogenów	37
2.4.	Fizjologiczne skutki działania hormonów gonadotropowych i steroidowych	41
2.5.	Cykl miesięczkowy	45
2.5.1.	Cykl jajnikowy	48
2.5.2.	Cykl endometrialny	51
2.5.3.	Cykl szyjkowy	52
III.	DYM TYTONIOWY	53
3.1.	Dym tytoniowy – charakterystyka fizyko-chemiczna.....	53
3.2.	Losy dymu tytoniowego w organizmie	58
3.2.1.	Wchłanianie	58
3.2.2.	Dystrybucja.....	59
3.2.3.	Metabolizm	60
3.2.4.	Wydalenie	64
IV.	CEL PRACY	66
V.	METODYKA BADAŃ.....	67
5.1.	Metodyka oznaczania metabolitu nikotyny – kotyniny – walidacja metody	67
5.1.1.	Przygotowanie materiału	67
5.1.2.	Przygotowanie wzorca wewnętrznego.....	67
5.1.3.	Parametry walidacyjne	68

5.1.4. Ustalenie czasów retencji	68
5.1.5. Granica wykrywalności LOD i granica oznaczalności LOQ.....	68
5.1.6. Liniowość.....	69
5.1.7. Powtarzalność metody.....	70
5.2. Metodyka oznaczania metabolitu nikotyny – kotyniny	71
5.2.1. Oznaczenie i zasada testu - przygotowanie próbki – ekstrakcja kotyniny z surowicy techniką ciecz – ciecz.	71
5.2.2. Analiza metodą HPLC	72
5.3. Metodyka oznaczania hormonu folikulotropowego za pomocą testu Elecsys FSH	73
5.3.1. Przygotowanie materiału	74
5.3.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe.....	74
5.3.3. Odczynniki - roztwory robocze	75
5.3.4. Kalibracja metody	76
5.3.5. Kontrola jakości metody	76
5.3.6. Granice i zakresy pomiarowe	76
5.3.7. Precyzja	77
5.3.8. Oznaczenie i zasada testu.....	77
5.4. Metodyka oznaczania hormonu luteinizującego za pomocą testu Elecsys LH.	78
5.4.1. Przygotowanie materiału	78
5.4.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe.....	79
5.4.3. Odczynniki - roztwory robocze	79
5.4.4. Kalibracja metody	80
5.4.5. Kontrola jakości metody	81
5.4.6. Granice i zakresy pomiarowe	81
5.4.7. Precyzja	82
5.4.8. Oznaczenie i zasada testu.....	82
5.5. Metodyka oznaczania 17-β estradiolu za pomocą testu Elecsys Estradiol II	83
5.5.1. Przygotowanie materiału	83

5.5.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe.....	83
5.5.3. Odczynniki - roztwory robocze	84
5.5.4. Kalibracja metody	85
5.5.5. Kontrola jakości metody	86
5.5.6. Granice i zakresy pomiarowe	86
5.5.7. Precyzja	87
5.5.8. Oznaczenie i zasada testu.....	87
5.6. Metodyka oznaczania progesteronu za pomocą testu Elecsys Progestrone II.....	88
5.6.1. Przygotowanie materiału	88
5.6.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe.....	88
5.6.3. Odczynniki - roztwory robocze	89
5.6.4. Kalibracja metody	90
5.6.5. Kontrola jakości metody	90
5.6.6. Granice i zakresy pomiarowe	91
5.6.7. Precyzja	91
5.6.8. Oznaczenie i zasada testu.....	92
5.7. Analiza statystyczna wyników	92
VI. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	94
6.1. Dane demograficzne, status płodności i rozrodczości	94
6.1.1. Grupa pacjentek niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego..	94
6.1.2. Pacjentki biernie narażone na działanie dymu tytoniowego w środowisku (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)	100
6.1.3. Pacjentki palące tytoń	106
6.1.4. Zestawienie danych demograficznych pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń	112
6.2. Status biernego narażenia na dym i palenia tytoniu wśród pacjentek	129
6.2.1. Poziom kotyniny w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na dym tytoniowy (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)	131

6.2.2. Poziom kotyniny w surowicy krwi pacjentek palących tytoń	133
6.3. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek	136
6.3.1. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek niepalących	137
6.3.2. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)	142
6.3.3. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek palących tytoń	148
6.4. Podsumowanie parametrów toksykologicznych.....	154
6.4.1. Zmiany poziomów kotyniny w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego .	154
6.4.2. Zmiany poziomów hormonów w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego.....	156
6.4.3. Zbadanie zależności poziomu hormonów względem biernego narażenia na dym i palenia tytoniu w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego	164
6.4.4. Zbadanie zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poszczególnymi hormonami.....	167
VII. DYSKUSJA	169
Podsumowanie	184
VIII. WNIOSKI.....	187
IX. STRESZCZENIE	188
X. SUMMARY.....	192
XI. PIŚMIENNICTWO	196

I. WSTĘP

Palenie tytoniu należy do najpoważniejszych współczesnych zagrożeń cywilizacyjnych. Wynika to zarówno z rozpowszechnienia tego zjawiska, jak i ze strat ponoszonych przez społeczeństwa. W chwili obecnej istnieje znaczna wiedza na temat istoty tych zagrożeń i ich realnych skutków. Szczególnie niekorzystny wpływ palenia tytoniu został wykazany w wielu badaniach klinicznych i epidemiologicznych w populacji kobiet w wieku prokreacyjnym.

Nałóg palenia tytoniu oraz narażenie na toksyczne działanie środowiskowego dymu tytoniowego (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS) stanowi w świecie zjawisko powszechne. Dzięki nasilonym i przeprowadzonym na światową skalę kampaniom antytytoniowym (MPOWER-Ex-Smokers are Unstoppable) wzrasta świadomość negatywnych skutków zdrowotnych stosowania tej używki. Tytoń jest nadal legalnym produktem konsumpcyjnym. Większość szkodliwych skutków palenia tytoniu ujawnia się po wielu latach od rozpoczęcia jego stosowania.

Palenie tytoniu wśród kobiet jest zróżnicowane geograficznie. Najwięcej kobiet pali w Europie i Azji Centralnej. Na świecie, stanowią one około 200 milionów osób palących. W krajach rozwiniętych pali 25% kobiet, natomiast w krajach rozwijających się tylko 7%. Przewiduje się, że do 2025 roku odsetek kobiet palących wzrośnie średnio z 8% do 20%. W Polsce palenie tytoniu jest zjawiskiem powszechnym – 34% kobiet paliło tytoń w swoim życiu, obecnie pali od 20% do 29,9% w zależności od regionu Polski, średnio 25,6%. W badaniach Światowej Organizacji Zdrowia przeprowadzonych w Polsce wykazano dynamiczny wzrost rozpowszechnienia palenia tytoniu wśród dziewcząt. Dowiedziono, że 57% dziewcząt w Polsce kiedykolwiek zapaliło papierosa, a 11% z nich próbowało zapalić pierwszego papierosa jeszcze przed 10 rokiem życia.

Na świecie około 50% kobiet palących tytoń kontynuuje palenie w czasie ciąży, podczas, gdy w większości państw zachodnich prawie jedna czwarta przyszłych matek podtrzymuje ten nałóg w ciąży. W Polsce, w badaniach przeprowadzonych w populacji kobiet w wieku prokreacyjnym 22% zadeklarowało czynne palenie tytoniu.

Palenie tytoniu przez członków rodziny oraz w miejscu pracy jest źródłem biernego narażenia na dym tytoniowy, co również ma negatywny wpływ na zdrowie. Według danych WHO, w 2010 roku w Polsce na bierne palenie narażonych było 43,6% kobiet.

Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy kobiet w wieku prokreacyjnym stanowi bardzo poważny problem toksykologiczny. Wpływa niekorzystnie na ich cykl miesięczkowy powodując zaburzenia jego cykliczności i skracając czas jego trwania. Nikotyna i jej główny metabolit - kotynina, negatywnie wpływają na gametogenezę, transport jajowodowy, owulację, zapłodnienie, zagnieżdżenie się zapłodnionej komórki jajowej, a także na tworzenie się łożyska. W efekcie palenia tytoniu i biernego narażenia na dym tytoniowy obserwuje się obniżenie ekspresji genu kodującego receptory dla folikulotropiny powodując spadek poziomu tego hormonu wytwarzanego przez komórki ziarniste. Inaktywacja aromatazy poprzez alkaloidy dymu tytoniowego prowadzi do obniżonej produkcji 17β -estradiolu. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obecne w dymie tytoniowym wywołują zmiany w działaniu enzymów mikrosomalnych cytochromu P450 CYP19 hamując aromatazę w komórkach ziarnistych. Efekt hamowania jest proporcjonalny do ilości wchłoniętego dymu tytoniowego. Powstają metabolity 17β -estradiolu o obniżonej aktywności estrogenowej, które usuwane są szybko z organizmu. Zredukowany poziom estrogenów powoduje zakłócenia regularności cyklu menstruacyjnego, a także przedwczesną menopauzę.

Pod wpływem alkaloidów dymu tytoniowego zachodzą zmiany w poziomach hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu oraz progesteronu. Dotychczasowe badania najczęściej obejmowały rejestrację zmian jednego hormonu płciowego w cyklu miesięczkowym kobiet pod wpływem dymu tytoniowego lub dokonywano oceny zmian poziomu hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu i progesteronu w poszczególnych jego fazach.

Obserwacje życia codziennego budzą niepokój, że tytoń jest zjawiskiem o narastającym nasileniu, także w populacji kobiet, szczególnie tych w wieku prokreacyjnym. Jest to nie tylko problem medyczny, ale i społeczny, a także ekonomiczny.

II. ENDOKRYNOLOGIA CYKLU MIESIĄCZKOWEGO Kobiet

2.1. Budowa i klasyfikacja hormonów

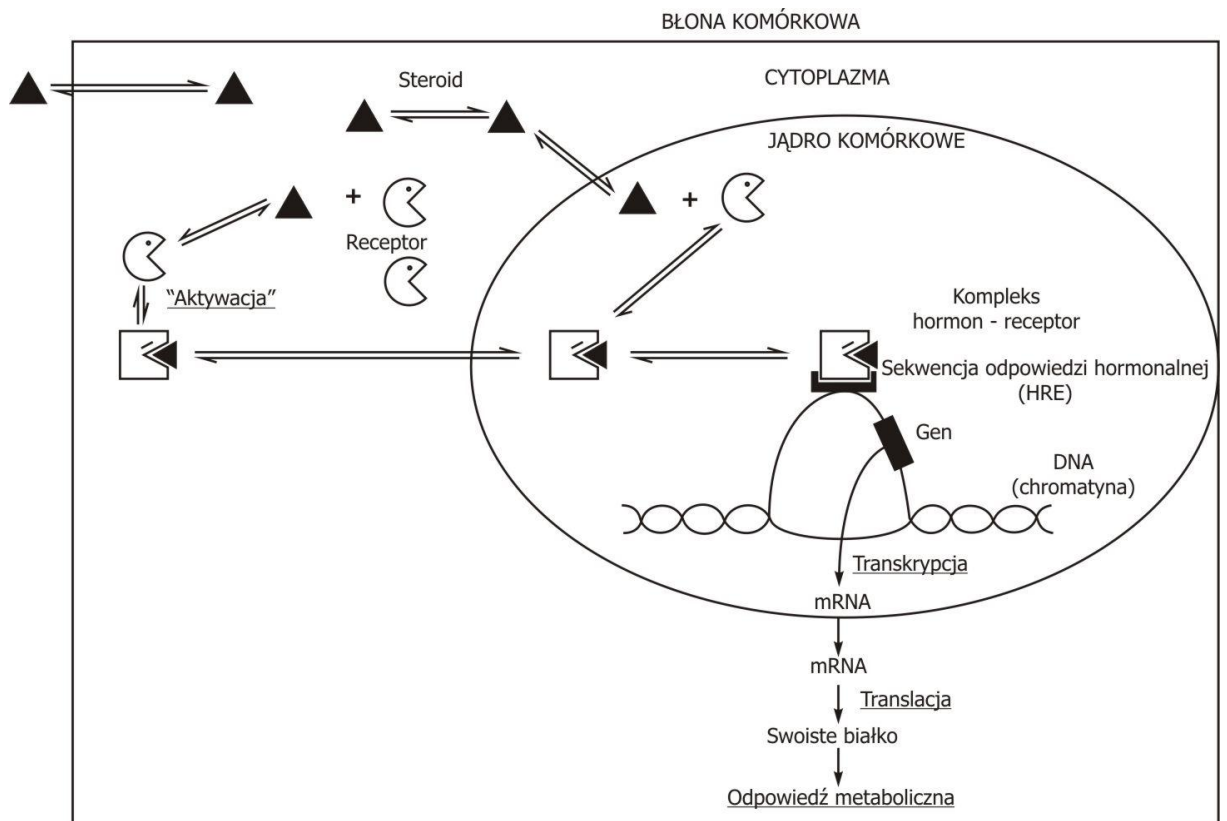
Hormony są chemicznymi nośnikami informacji przekazywanej pomiędzy komórkami danego organizmu lub wewnątrz danej komórki, działającymi poprzez receptor. Zazwyczaj definiowane, jako substancje uwalniane przez gruczoły wydzielania wewnętrznego (endokryjne) i transportowane przez krew do tkanek, gdzie wykazują swoje działanie. Polega ono na regulowaniu określonych czynności poprzez łączenie się hormonów z cząsteczkami wybranych receptorów. Przyłączając się do receptorów powodują zmianę ich konformacji. Są więc allosterycznymi efektorami [Greenspan and Gardner, 2004].

Stężenie hormonów w płynie pozakomórkowym jest najczęściej bardzo małe i waha się w granicach 10^{-15} – 10^{-9} [mol/l]. Stężenia te są mniejsze od stężeń strukturalnie podobnych do hormonów cząsteczek takich jak steroidy, aminokwasy, peptydy czy białka. Z tego powodu komórki docelowe muszą w sposób bardzo precyzyjny rozróżnić określony hormon przez swoisty receptor. Taką zdolność posiadają komórki receptorowe. Receptory są białkami komórkowymi, które odpowiadają za dwa rodzaje czynności, czyli za rozpoznawanie, a także za aktywowanie procesu sygnałowego. Mają zdolność odróżniania hormonu od wszystkich innych cząsteczek, na które są ekspozowane oraz przekształcania informacji powstałej w wyniku połączenia hormonu z receptorem na zdarzenie poreceptorowe (czynność śródkomórkowa). Podwójna funkcja receptorów leży u podstaw tzw. sprzężenia receptorowo – efektorowego stanowiącego pierwszy etap amplifikacji odpowiedzi hormonalnej. Odróżnia to receptorowe komórki docelowe od białek nośnikowych osocza, ponieważ białka nośnikowe nie indukują określonego sygnału hormonalnego [Greenspan and Gardner, 2004; Murray i wsp., 2004].

Receptory hormonów steroidowych mają wiele domen czynnościowych tj. wiązania z hormonem, wiązania z określonym obszarem łańcucha DNA, pobudzania

bądź hamowania procesu transkrypcji genu oraz określania powinowactwa do innych białek.

Hormon steroidowy wiąże się ze śródkomórkowym receptorem wywołując zmianę konformacyjną. Następnie kompleks ten wiąże się do swoistego fragmentu nici DNA, tj. do sekwencji odpowiedzi hormonalnej (hormon response element). W wyniku tej interakcji dochodzi do aktywacji lub supresji ograniczonej liczby genów [Murray i wsp., 2004]. Wiązania hormonów przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1 Wiązanie hormonów steroidowych

Źródło: [Murray i wsp., 2004]

Zjawisko interakcji między hormonem, a jego receptorem można określić ilościowo przy użyciu radioaktywnych ligandów wykazujących właściwości wiązania hormonów.

Pod względem chemicznym hormony stanowią niejednorodną grupę związków. Z tego powodu dzielą się na hormony o budowie białkowej (polipeptydy

i oligopeptydy), hormony steroidowe oraz będące pochodnymi aminokwasów. Hormony polipeptydowe są bezpośrednimi produktami translacji specyficznych informacyjnych RNA, produktami rozszczepiania większych białek prekursorowych albo zmodyfikowanymi peptydami, natomiast hormony steroidowe są, tak jak witamina D₃, pochodnymi cholesterolu [Greenspan and Gardner, 2004; Murray i wsp., 2004,].

Klasyfikacji hormonów można dokonać biorąc pod uwagę ich strukturę chemiczną, rozpuszczalność w różnych środowiskach, lokalizację receptora hormonalnego lub rodzaj sygnału będącego pośrednikiem w działaniu hormonu w obrębie komórki.

W tabeli 1 przedstawiono podział hormonów pod względem ich rozpuszczalności, wiązania z białkami nośnikowymi, lokalizację receptora, a także charakter drugiego przekaźnika.

Tab. 1 Cechy ogólne poszczególnych klas hormonów

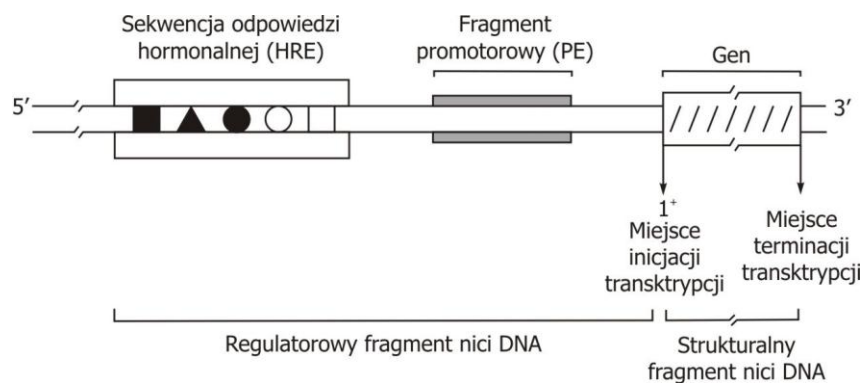
	Grupa I	Grupa II
Rodzaj hormonu	hormony steroidowe, jodotyroniny, kalcytriol	hormony polipeptydowe. białkowe lub glikoproteinowe, aminy katecholowe
Rozpuszczalność	lipofilowe	hydrofilowe
Związane z białkami przekaźnikowymi	tak	nie
Osoczowy okres półtrwania	długi (godziny do dni)	krótki (minuty)
Lokalizacja receptora	śródkomórkowa	w błonie plazmatycznej
Charakter drugiego przekaźnika	kompleks receptor – hormon	cAMP, cGMP, Ca ²⁺ . metabolity złożonych fosfoinozytydów, kaskady kinazowe

Źródło: [Murray i wsp., 2004]

Hormony I grupy, do których należą hormony steroidowe mają właściwości lipofilne i są (w większości) pochodnymi cholesterolu. Po wydzieleniu do krwi są wiązane z białkami transportowymi (nośnikowymi). Cząsteczki tych hormonów, które nie zostały związane z białkami nośnikowymi, łatwo przechodzą przez błony plazmatyczne wszystkich komórek, łącząc się z receptorami cytoplazmatycznymi lub

jądrowymi w komórkach docelowych. Dla tej grupy hormonów kompleks złożony z hormonu i jego receptora stanowi śródkomórkowy przekaźnik.

Lipofilne cząsteczki przenikają przez błony cytoplazmatyczne wszystkich komórek, wiążą się ze swoistym receptorem wysokiego powinowactwa w komórkach docelowych. Kompleks złożony z hormonu i receptora ulega aktywacji w wyniku czego następuje zmiana jego wielkości, konformacja oraz ładunek powierzchniowy. Zależy to od temperatury i siły jonowej środowiska. Powstaje kompleks zdolny do wiązania się z chromatyną. Kompleks hormon – receptor wiążąc się ze swoistym fragmentem DNA (jest on określany, jako tzw. element, bądź sekwencja odpowiedzi hormonalnej (ang. hormone response element, HRE) aktywuje lub inaktywuje transkrypcję określonych genów. Hormony steroidowe wpływają głównie na transkrypcję genów. Żeby proces ten był możliwy geny te muszą znajdować się w obszarach „otwartej” transkrypcyjnie chromatyny. Rycina 2 przedstawia model wymagań strukturalnych niezbędnych dla kontroli procesu hormonalnej regulacji transkrypcji genu przez hormony steroidowe.



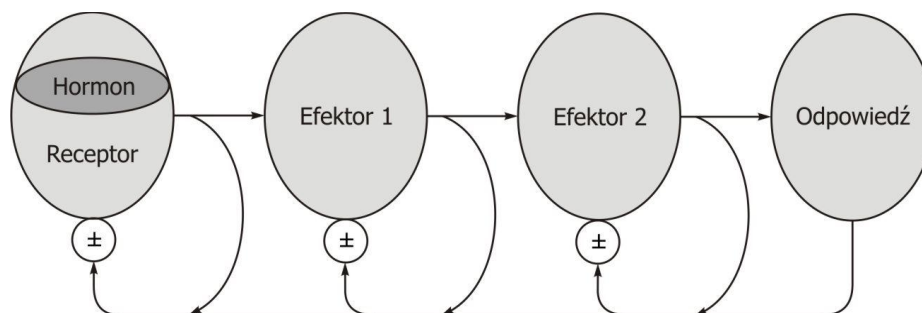
Ryc. 2 Wymagania strukturalne niezbędne dla procesu hormonalnej regulacji transkrypcji genu

Źródło: [Murray i wsp., 2004]

Receptory steroidów, które nie są połączone z ligandem są związane z tzw. białkami szoku termicznego. Przyłączenie liganda powoduje dysocjację w/w białek tworząc HRE.

Pod wpływem hormonów następuje odpowiedź, która jest regulowana. Zazwyczaj hormony łączące się z receptorami komórkowymi podlegają tzw. regulacji

„w dół” reaktywności zachodzące przy udziale homologicznego liganda poprzez przyłączenie go do pokrewnego receptora i tłumienie transkrypcji genu receptora. Regulacja „w górę” wywołana jest przez receptory heterologiczne. Przykładem jest proces transkrypcji progesteronu silnie pobudzany przez estrogeny. Regulację reaktywności przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 3 Schemat regulacji aktywności na działanie hormonów poprzez homologiczne kompleksy

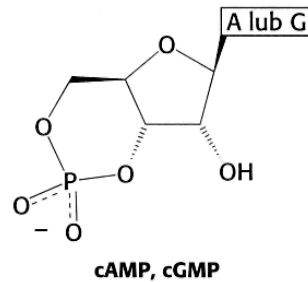
Źródło: [Greenspan, Gardner, 2004]

Regulacja reaktywności na działanie hormonów przez homologiczne kompleksy hormon-receptor może występować na wielu różnych poziomach. Na rycinie zilustrowano pętle sprzężeń zwrotnych, które są zwykle ujemne, choć mogą być również dodatnie, i które regulują reaktywność poprzez wpływ na receptor, efektor czy „odgałęzienia” odpowiedzi do jakichkolwiek elementów tejże sieci odpowiedzi. Znaki „plus-minus” na powyższej rycinie oznaczają, że działanie może być pobudzające lub hamujące.

Druga grupa hormonów, przedstawiona w tabeli 1 to związki rozpuszczalne w wodzie, wiążące się z receptorami błony plazmatycznej komórek docelowych. Komunikacja ze śródkomórkowymi procesami metabolicznymi odbywa się za pośrednictwem tzw. drugiego przekaźnika (w tym przypadku hormon określany jest jako pierwszy przekaźnik). Dla lutropiny i folikulotropiny drugim przekaźnikiem jest cAMP.

Wiele hormonów, dla których drugim przekaźnikiem jest wspomniany cAMP, oddziałuje na transkrypcję. Czynnikiem spełniającym rolę kompleksu hormon steroidowy – receptor jest białko określane, jako „białko wiążące sekwencje HRE

powstałe pod wpływem cyklicznego AMP - cAMP", czyli CREB. Są to cząsteczki wewnątrzkomórkowe, których stężenie zmienia się pod wpływem sygnału zewnętrznego i powoduje przeniesienie informacji do wnętrza komórki [Murray i wsp., 2004; Berg i wsp., 2005].

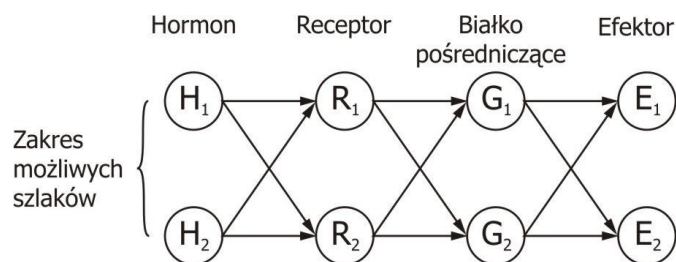


Ryc. 4 Cząsteczki sygnałowe drugiego rzędu

Źródło: [Berg i wsp., 2005]

Cząsteczki stanowiące drugi przekaźnik (zwane również cząsteczkami sygnałowymi drugiego rzędu) są to wewnątrzkomórkowe cząsteczki. Ich stężenie zmienia się pod wpływem sygnału zewnętrznego przenosząc informację do wnętrza komórki. Mają możliwość swobodnej dyfuzji do innych przedziałów komórkowych np. do jądra komórkowego, przez co mogą wpływać np. na ekspresję genów. Powodują aktywację enzymów czy kanałów błonowych, przez co automatycznie wywołują reakcję powstawania nowych cząsteczek sygnałowych. Efektem współdziałania cząsteczek sygnałowych jest również wzmożenie siły sygnału.

Drugie przekaźniki podlegają regulacji różnych receptorów, które znajdują się na powierzchni komórki mogące wykorzystywać te same HRE czy kompleksy czynnika transkrypcyjnego. Dzięki temu zmniejszona jest liczba niezbędnych szlaków zmniejszając jednocześnie możliwość potencjalnych interferencji, a także prawdopodobieństwa nieprawidłowej wymiany informacji pomiędzy szlakami sygnalizacyjnymi, co prowadzi do błędnej interpretacji pojawienia się w komórce cząsteczek sygnałowych drugiego rzędu [Murray i wsp., 2004; Berg i wsp., 2005].



Ryc. 5 Możliwe szlaki przekazywania sygnałów hormonalnych

Źródło: [Greenspan and Gardner, 2004]

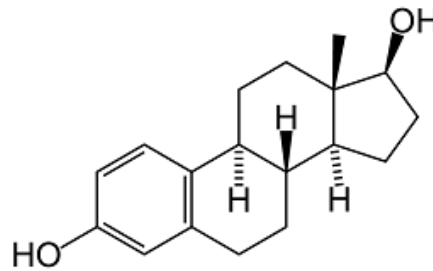
Każdy hormon może działać przez jeden bądź więcej receptorów. Każdy kompleks hormon-receptor może działać poprzez jedno lub więcej białek pośredniczących (białka G lub inne mechanizmy sygnałowe), i każde białko pośredniczące lub enzym aktywowany przez kompleksy hormon-receptor może wpływać na jedną lub więcej czynności efektora [Greenspan and Gardner, 2004]. Przedstawiono to na rycinie 5.

2.1.1. Hormony gonadotropowe

Lutropina (LH) i folikulotropina (FSH) są uwalniane przez przedni płat przysadki mózgowej w odpowiedzi na działanie gonadoliberyny (GnRH). Są to glikoproteiny o masie cząsteczkowej ok. 30 000 D [Winters and Moore, 2010]. Oba te hormony zbudowane są z podjednostek α (89 aminokwasów) i β (115 aminokwasów). Podjednostka α jest identyczna dla obu pod względem sekwencji aminokwasowych, spełnia rolę nośnika, przyczynia się do akumulacji cAMP, a także aktywuje cyklozę adenylową. Natomiast podjednostka β nadaje im biologiczną specyficzność, jej sekwencje aminokwasowe są unikalne dla każdego z hormonów, jest odpowiedzialna za rozpoznawanie i integrację z receptorami komórek efektorowych. Jej unikalność wynika z różnic w transkrypcji w efekcie działania różnych genów kodujących różne białka [Frohman et al., 1995; Bernard et al., 2010].

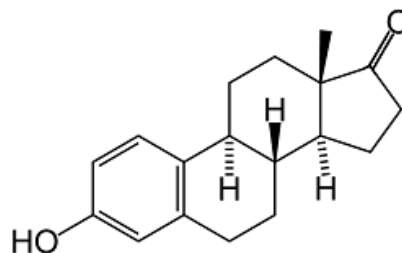
2.1.2. Hormony steroidowe jajnika – estrogeny, progesteron

Estrogeny są 18-węglowymi steroidami o strukturze estradu. Najbardziej aktywnym, naturalnym estrogenem jest 17β – estradiol (E_2) w 95% produkowany przez komórki ziarniste. Pozostała ilość estradiolu pochodzi z nadnerczy z konwersji obwodowej z estronu, a podczas ciąży syntetyzowany jest przez łożysko. Budowę chemiczną hormonu przedstawiono na rycinie 6.



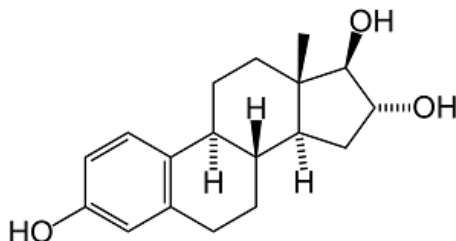
Ryc. 6 Wzór chemiczny 17β – estradiolu

Drugim, pod względem aktywności biologicznej estrogenem jest estron (E_1). Pochodzi z obwodowej konwersji androstendionu w wyniku głównie wątrobowego metabolizmu E_2 , a znikoma ilość jest produkowana w jajniku [Warenik – Szymankiewicz, 1996; Murray i wsp., 2004]. Budowę chemiczną estronu przedstawiono na rycinie 7.



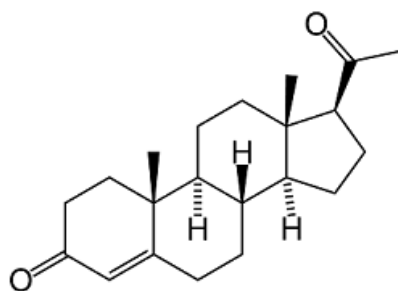
Ryc. 7 Wzór chemiczny estronu

Najmniejszą aktywnością biologiczną charakteryzuje się estriol (E_3) pochodzący z wątroby metabolizującej estradiol i estron. [Adashi, 1994; Słomko, 2008]. Budowę chemiczną estriolu przedstawiono na rycinie 8.



Ryc. 8 Wzór chemiczny estriolu

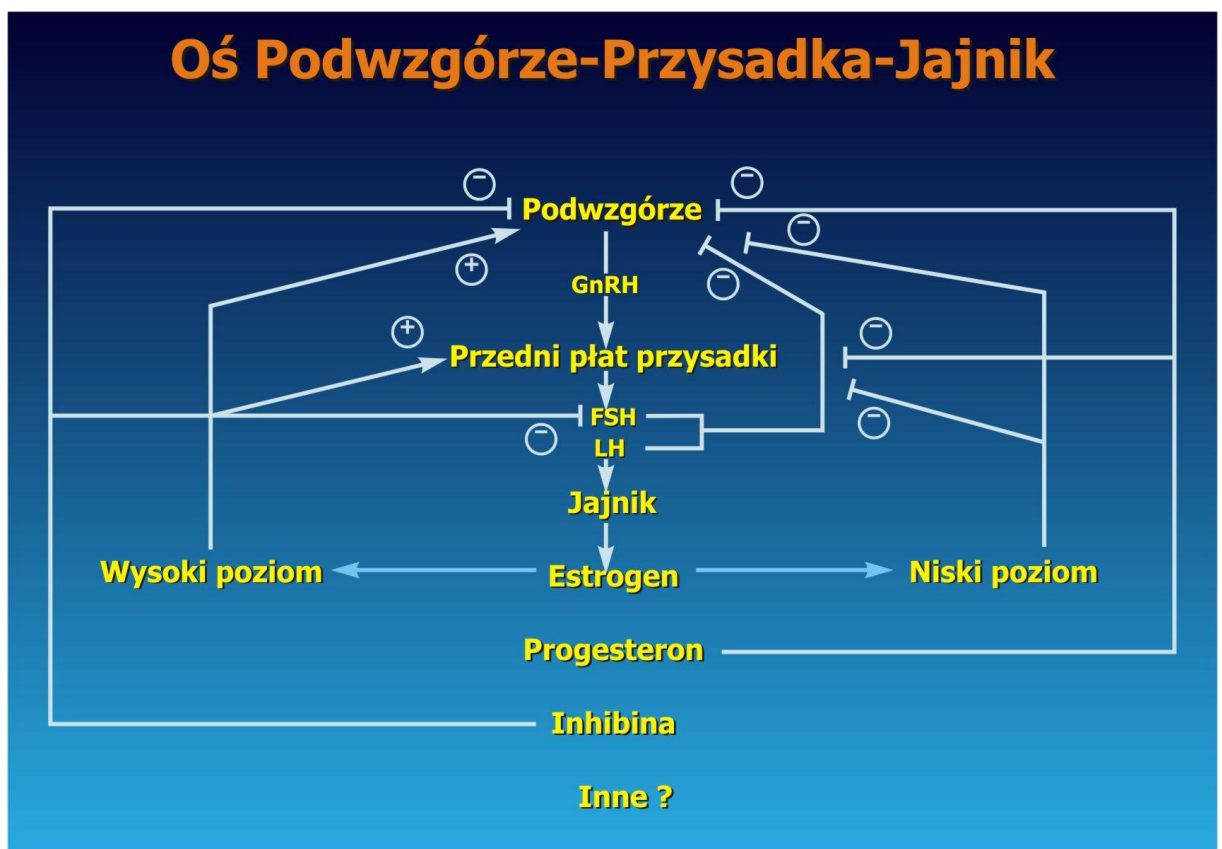
Progesteron jest 21-węglowym steroidem niełączącym się (w przeciwieństwie do estradiolu) przez globulinę, która wiążące hormony płciowe SHBG. Swoicie związana jest z transkorytyną (CBG), natomiast z albuminami występuje w połączeniu nieswoistym [Collin and Gandar, 1991; Stouffer, 2003]. Podstawowa struktura cząsteczki jest oparta na budowie pregnanu. Syntetyzowany jest przez ciało żółte, w niewielkiej ilości przez nadnercza natomiast w okresie ciąży jego syntezę przejmuje głównie łożysko [Murray i wsp., 2004; Słomko, 2008]. Budowę chemiczną progesteronu przedstawiono na rycinie 9.



Ryc. 9 Wzór chemiczny progesteronu

2.2. Budowa i czynności układu podwzgórze – przysadka – jajnik

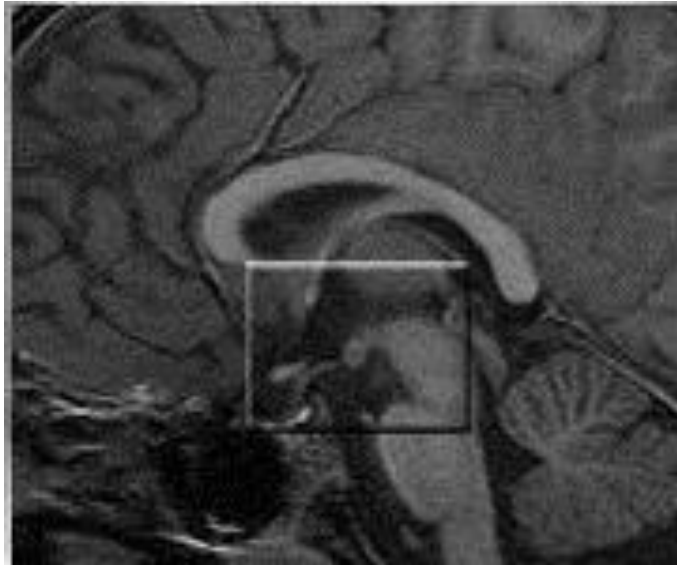
Podwzgórze i przysadka mózgowa są jednostkami czynnościowymi, pełniącymi funkcję regulacyjną gruczołów dokrewnych, takich jak tarczyca, kora nadnerczy, a także gonady, jak również kontrolną nad wieloma funkcjami fizjologicznymi organizmu człowieka. Układ podwzgórze – przysadka - gonady stanowi przykład regulacji neuroendokrynologicznej, gdzie podstawę stanowią wzajemne oddziaływania pomiędzy układem nerwowym a wewnątrzwydzielniczym. Hormony przysadki mają istotne znaczenie dla rozrodu, wzrostu, metabolizmu, stresu i rozwoju, a także adaptacji ze środowiskiem zewnętrznym. Podlegają neurohormonalnej regulacji centralnego układu nerwowego (głównie GnRH), a także związane są neuroendokrynnymi ścieżkami z podwzgórzem [Smith and Jennes, 2001; Greenspan and Gardner, 2004; Sam and Frohman, 2008]. Schematyczne funkcjonowanie osi podwzgórze – przysadka - jajnik przedstawiono na rycinie 10.



Ryc. 10 Oś podwzgórze – przysadka - jajnik

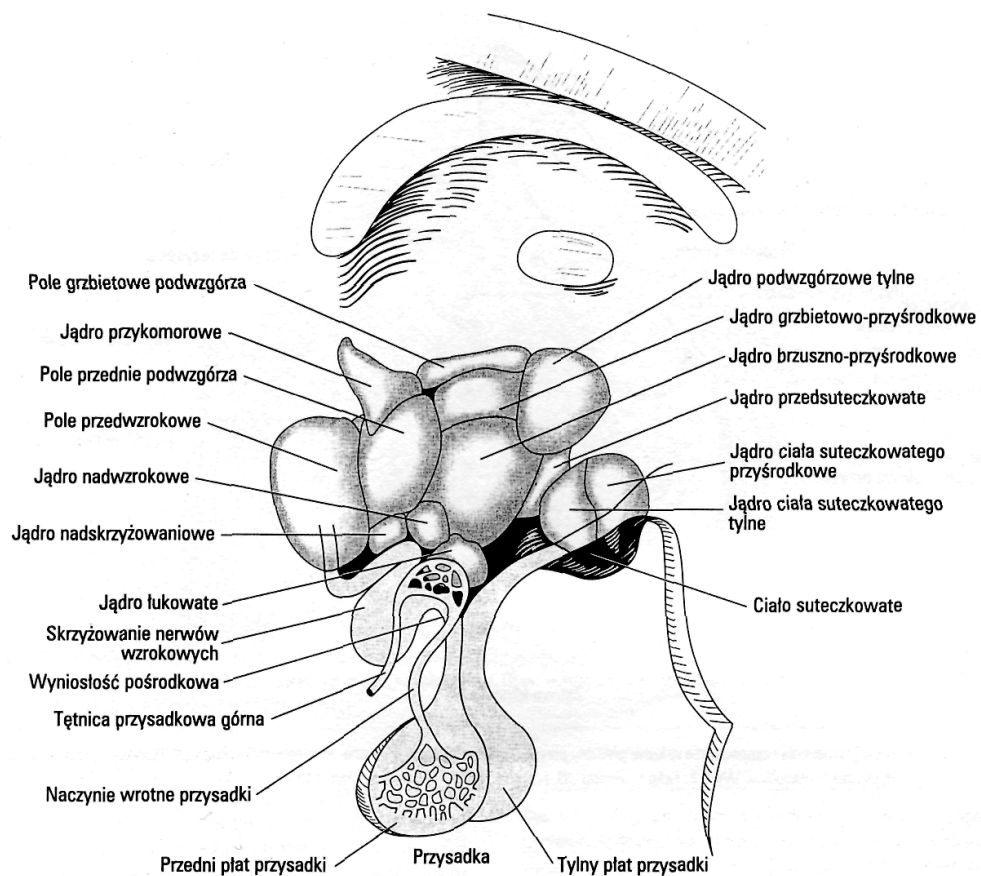
Oś podwzgórze – przysadka – gonady rozwija się w okresie płodowym, natomiast jej dojrzewanie i różnicowanie odbywa się przez całe dzieciństwo, okres dojrzewania, życie dorosłe aż do późnej starości. Działanie osi możliwe jest dzięki temu, że zarówno komórki nerwowe, jak i gruczołowe zaangażowane w komunikację międzykomórkową posiadają wspólne cechy, takie jak wydzielanie neuroprzekaźników chemicznych (neurotransmitterów lub hormonów – peptydy czy aminy), a także aktywność elektryczną. Jeden z peptydów przysadki PACAP (ang. adenylate - cyclase activating polypeptide) jest w sposób szczególny identyfikowany jako podwzgórzowy aktywator cAMP komórek przysadki. Komórki gonadotropowe i folikulotropowe są źródłem przysadkowego PACAP, które jako jedyne uaktywniają jemu specyficzne receptory. Komunikacja międzykomórkowa zachodzi na zasadzie czterech różnych mechanizmów, tj. komunikacji nerwowej dzięki połączeniom synaptycznym, komunikacji endokrynnej poprzez krążące we krwi hormony, komunikacji parakrynnej poprzez przekaźniki dyfundujące w płynie międzykomórkowym do komórek docelowych, a także dzięki komunikacji autokrynnej poprzez przekaźniki dyfundujące do płynu międzykomórkowego oddziałując na wydzielające je komórki [Greenspan and Gardner, 2004; Frohman, 2008; Winters and Moore, 2010].

Część międzymózgowia tworząca dno i dolną część ścian bocznych III komory mózgu to podwzgórze. Najniższa część III komory dzieli podwzgórze na części przednią i podstawną (stanowi ją guz popielaty – łac. tuber cinereum). Środkową część guza popielatego stanowi wyniosłość pośrodkowa, której lejek (łac. infundibulum) łączy podwzgórze z przysadką. W skład guza popielatego wchodzi 3 rodzaje komórek różniące się ilością jąder, a także pigmentacją. Stanowi to podstawę badań osób starszych i chorób mózgu. Uszkodzenia guza popielatego są odpowiedzialne za występowanie płasawicy Huntingtona, chorobę Alzheimera i Parkinsona [Braak and Braak, 1987; Braak and Braak, 1992; Skabała, 2008]. Na rycinie 11 przedstawiono wynik rezonansu magnetycznego przedstawiający lokalizację podwzgorza.



Ryc. 11 Lokalizacja podwzgórza – wynik rezonansu magnetycznego

Źródło: [Freeman, 2003]



Ryc.12 Schematyczne przedstawienie budowy podwzgórza u człowieka,

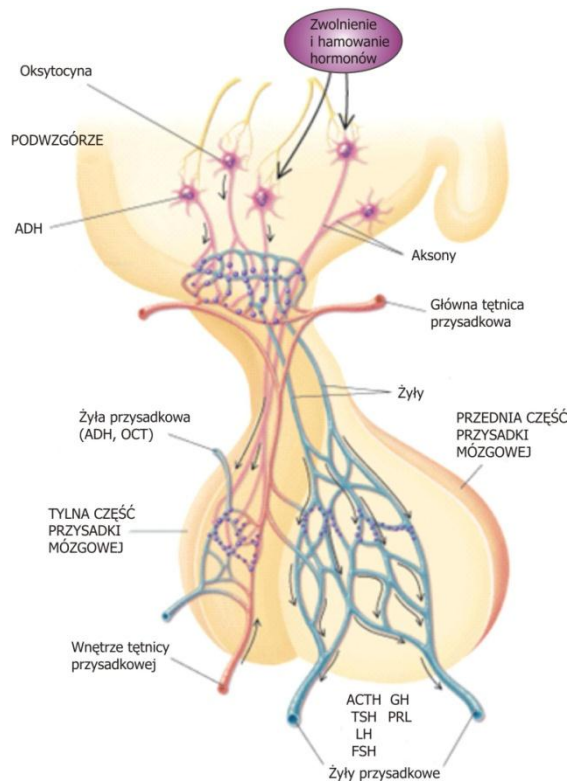
z uwzględnieniem naczyń wrotnych przysadki

Źródło: [Greenspan and Gardner, 2004]

Podwzgórze, schematycznie przedstawione na rycinie 12, stanowi nadrzędny ośrodek regulacji hormonalnej organizmu. Kontrola wydzielania hormonów odbywa się w systemie przekazu bodźców nerwowych do układu wrotnego przysadki. Jądra biorące udział w kontroli wydzielania przedniego płata przysadki zgrupowane są w okolicy podstawno – przyśrodkowej (głównym przedstawicielem jest jądro łukowate). Aksony tych neuronów przebiegają drogą guzowo – lejkową i docierają do okołowłośniczkowych pętli naczyń krwionośnych części przyśrodkowej. Tylny płat przysadki jest połączony i regulowany przez drogi: nadwzrokowo – przysadkową i przykomorowo – przysadkową poprzez jądra nadwzrokowe i przykomorowe [Braak and Braak, 1987; Sam and Frohman, 2008; Skabała, 2008].

Przysadka mózgowa położona jest w tzw. siodle tureckim (w zagłębieniu kości klinowej). Gruczoł otoczony jest oponą twardą, za pomocą której przyczepiony jest do wyrostków klinowych kości klinowej czaszki. Przedni płat stanowiący ok. 75% masy gruczołu, zbudowany jest z komórek kwasochłonnych, zasadochłonnych i chromofobowych jednak nie posiada nerwowych połączeń z podwzgórzem. Odpowiedzialny jest za wydzielanie somatotropiny STH lub hGH, tyreotropiny, adrenokortykotropiny ACTH, hormonu melanotropowego, prolaktyny, gonadotropiny: lutropiny i folikulotropiny [Kerdelhué et al., 1988; Pisarski i wsp., 2001; Greenspan and Gardner, 2004].

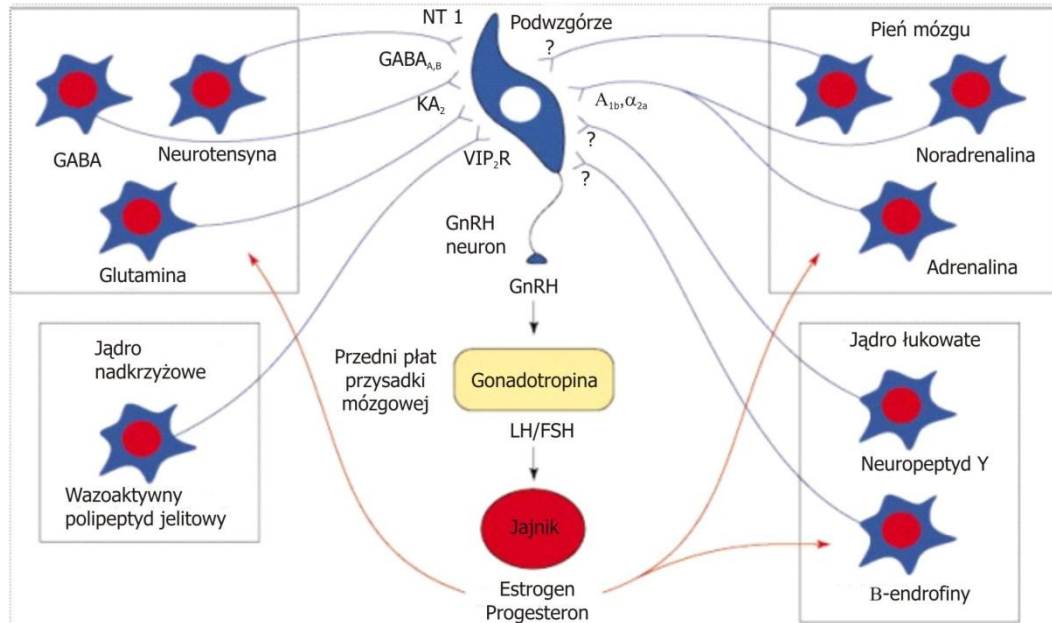
Tylny płat przysadki stanowiący ok. 25% masy gruczołu, zbudowany jest z komórek nerwowych i substancji glicynowej. Odpowiedzialny jest za wydzielanie wazopresyny i oksytocyny. Struktura przysadki przedstawiona jest na rycinie 13.



Ryc. 13 Struktura przysadki mózgowej

Przysadka jest organem bardzo silnie unaczynionym. Źródłem krwi są tętnice przysadkowe górne, środkowe i dolne. Tętnice górne tworzą sieć naczyń włosowatych w wyniosłości pośrodkowej podwzgórza, przechodzą w żyły wrotne docierające w dół szypuły, aż do przedniego płata. Tam rozgałęzia się w sieć naczyń włosowatych, łączących się w naczynia żyłne. Tylny płat przysadki jest zaopatrywany w krew bezpośrednio ze środkowych i dolnych tętnic przysadkowych. Kanaly żyłne przebiegają przez zatokę jamistą do zatoki skalistej i dolnej aż do żyły szyjnej [Terasawa, 2001; Sam and Frohman, 2008]. Dzięki takiemu układowi żylnemu hormony przedniego płata przysadki docierają do krążenia ogólnego. Z naczyniami włosowatymi łączą się zakończenia nerwowe przysadki. Układ naczyń krążenia wrotnego pozwala na kontrolowanie czynności przedniego płata przysadki [Ogura et al. 2001; Dudas and Merchenthaler, 2005]. Należy pamiętać, że pomiędzy przysadką a podwzgórzem możliwy jest wsteczny przepływ krwi, co w konsekwencji umożliwia wystąpienie bezpośredniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy hormonami przysadki a ich neuroendokrynną kontrolą. Neurony LHRH posiadają endogeniczny mechanizm generujący impulsy. Do neuroprzekaźników zalicza się m. in. neurotensynę (NE), neuropeptyd Y - NPY, GABA, glutaminian (GAL), kortykotropinę (CRH), endogenne

białka (EOP), substancję P, β -endorfiny, katecholaminy (CA), leptynę [Braak and Braak, 1987; Greenspan and Gardner, 2004]. Schemat interakcji neurohormonalnej przedstawiono na rycinie 14.



Ryc. 14 Schemat interakcji neurohormonalnej

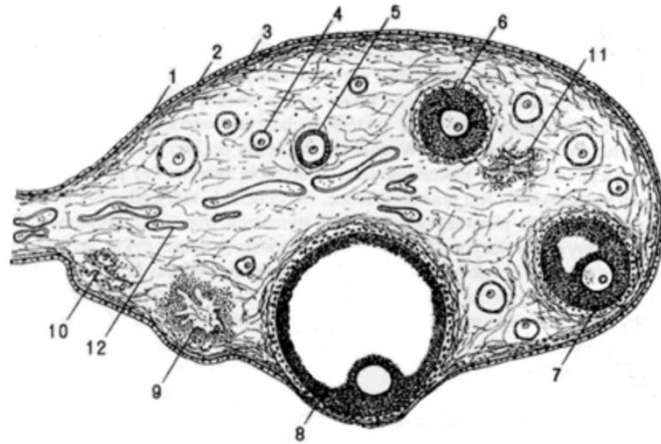
Zmiany oscylacyjne potencjału błonowego i stężenia Ca^{2+} również mają wpływ na pulsacyjne wydzielanie LH. Ca^{2+} – bound calmodulin powoduje interakcje enzymami i aktywatorami supresyjnymi np. z cyklooksygenazą (COX-2) diacyloglicerolem (DAG).

Jajnik jest parzystym narządem gruczołowym o zmiennej masie w zależności od dnia cyklu miesięczkowego. Jajniki usytuowane są wewnątrztrzewnowo, przytwierdzone do tylnej powierzchni więzadła szerokiego macicy za pomocą krezki (fałd otrzewnowy), więzadła właściwego jajnika i więzadła wieszadłowego. Sfałdowana powierzchnia jajnika (sfałdowanie jest zależne od wieku kobiety) pokryta jest nabłonkiem mezotelialnym. Położony jest na błonie podstawnej, pod którą znajduje się błona biaława zbudowana z tkanki łącznej włóknistej. W jajniku wyodrębnia się część korową i część rdzenną. Część korowa zbudowana jest z podścieliska łącznotkankowego swoistego dla jajnika oraz mezenchymalnych niezróżnicowanych komórek, które pod wpływem lutropiny przekształcają się w komórki tkanki pościeliska [Buffet and Bouchard, 2001; Oktem et al., 2008]. W tej części jajnika rozmieszczone są komórki jajowe. Komórki jajowe położone obwodowo opłaszczone są komórkami

nabłonkowymi, tworząc oocyt I rzędu. Jądro komórki jajowej jest w fazie zablokowanego pierwszego podziału mejotycznego. Część rdzenna, bogato unaczyniona i unerwiona, zbudowana jest z bardziej włóknistej tkanki łącznej [Greenspan and Gardner, 2004; Skabała, 2008].

Po osiągnięciu przez kobietę dojrzałości płciowej w jajniku rozpoczyna się cykliczny proces dojrzewania pęcherzyków. W fazie folikularnej cyklu miesięczkowego dojrzewa ok. 20-30 pęcherzyków pierwotnych. Komórki nabłonka, przylegające tworzą warstwę ziarnistą odpowiedzialną za syntezę estrogenów. Na zewnątrz błony ziarnistej tworzy się druga osłonka zbudowana z dużych komórek o kwasochłonnej cytoplazmie, bogata w substancje lipidowe i bogato unaczyniona – osłonka tkalna odpowiedzialna za syntezę androgenów. Całkowicie dojrzały pęcherzyk jajnika nosi nazwę pęcherzyka jajnikowego, czyli pęcherzyka Graffa. Pęka on w połowie cyklu miesięczkowego i uwalnia komórkę jajową do jamy otrzewnowej [Buffet et al.,1998; Buffet and Bouchard, 2001]. Przed pęknięciem pęcherzyka Graffa komórka jajowa wydziela pierwsze ciało kierunkowe, zawierające 23 chromosomy i przekształca się w oocyt II rzędu. Po uwolnieniu komórki jajowej pęcherzyk jajnikowy przekształca się w ciało żółte ulegające proliferacji (luteinizacji), w skutek czego powstają komórki luteinowe. Jeśli komórka jajowa nie zostanie zapłodniona to ciało żółte przekształca się w ciało białawe, natomiast w przypadku zapłodnienia z ciała żółtego powstaje ciało żółte ciężowe syntetyzujące hormony steroidowe w okresie ciąży – progesteron oraz estrogeny [Karck and Keck, 2002; Greenspan and Gardner, 2004]. Na rycinie 16 przedstawiono budowę jajnika, w skład którego wchodzi:

- 1-nabłonek powierzchniowy
- 2-błaszka podstawna
- 3-błona biaława
- 4-pęcherzyk jajnikowy pierwotny
- 5,6-pęcherzyk jajnikowy wzrastający
- 7- pęcherzyk jajnikowy dojrzewający
- 8- pęcherzyk jajnikowy dojrzały
- 9-ciało żółte
- 10-ciało białawe
- 11-pęcherzyki arteryjne
- 12-naczynia krwionośne



Ryc. 16 Budowa jajnika – schemat

Źródło: [Pisarski, 1998]

Nabłonek powierzchniowy (1), spoczywa na blaszce podstawnej (2), pod którą leży błona biaława (3). W części korowej narządu znajdują się pęcherzyki jajnikowe: pierwotne (4), wzrastające (5-6), dojrzewające (7) i dojrzałe (8), a także ciało żółte (9) i białawe (10) oraz pęcherzyki atrezyjne (11). W części rdzennej jajnika położone są liczne naczynia krwionośne (12) [Pisarski, 1998].

Gonadotropiny są wydzielane w zależności od płci w sposób stały (toniczny – obserwowany u mężczyzn), w sposób cykliczny (w przypadku kobiet) oraz w sposób pulsacyjny (u obu płci). Ponad 70% pulsów FSH pokrywa się czasowo z pulsami LH, po pulsach lutropiny (u kobiet) w 80% następują pulsy estradiolu, natomiast w fazie przedmiesiączkowej pulsacyjne wydzielanie LH wpływa na wydzielanie progesteronu przez ciało żółte [Słomko, 2008].

Głównym czynnikiem regulującym wydzielanie folikulotropiny i lutropiny jest decapeptyd gonadoliberyna GnRH podlegająca dodatniemu i ujemnemu sprzężeniu zwrotnemu z estrogenami, progesteronem i testosteronem, zależna również od powinowactwa i ilości receptorów (rhFSH, rhLH). Regulacja osi podwzgórze – przysadka – jajnik odbywa się na podstawie trzech rodzajów pętli sprzężeń zwrotnych, czyli pętli długiej, krótkiej i ultrakrótkiej. Pętla długa obejmuje kontrolę sprzężenia zwrotnego, pomiędzy aktywnością jajnika a podwzgórzem i przysadką. Pętla krótka kontroluje sprzężenie pomiędzy przysadką a podwzgórzem (niski poziom gonadoliberyny w krążeniu powoduje proporcjonalne pobudzenie syntezy i wydzielania folikulotropiny

i lutropiny z przysadki). Pętla ultrakrótką harmonizuje syntezę hormonów w zależności od ich wewnątrzkomórkowego stężenia [Pisarski i wsp., 2001].

Cechą charakterystyczną wydzielania gonadoliberyny, a w konsekwencji i gonadotropin, jest pulsacyjność (wydzielanie epizodyczne) występująca w przedziałach czasowych w zależności od fazy cyklu miesięczkowego. W efekcie pulsów wydzielania następuje uwolnienie do krążenia ogólnego niewielkich ilości hormonów. Odpowiednia amplituda i częstotliwość pulsów warunkują właściwe funkcjonowanie układu [Owen, 1975; Evans et al. 1994; Herbison, 1997; Herbison, 1998; Moderachai Shemesh, 2001]. Rytm wydzielniczy lutropiny w poszczególnych fazach cyklu miesięczkowego przedstawiony jest w tabeli 2.

Tab. 2 Pulsacyjne wydzielanie LH w cyklu miesięczkowym

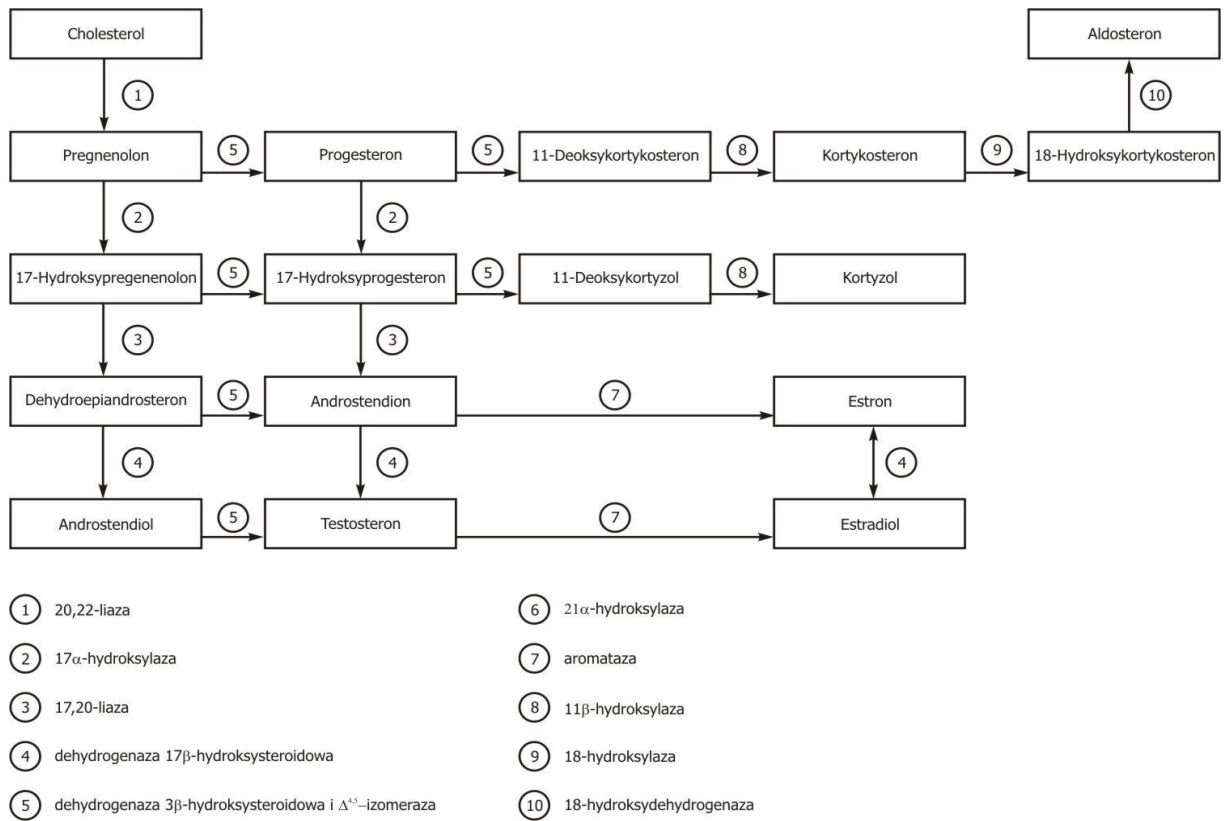
Faza cyklu miesięczkowego	Częstotliwość [min.]	Amplituda [UI/L]
Wczesna faza pomiesiączkowa	94	6,5
Późna faza pomiesiączkowa	71	7,2
Wczesna faza przedmiesiączkowa	103	14,0
Późna faza przedmiesiączkowa	216	7,6

Regulatorem częstotliwości pulsów jest sprzężenie zwrotne ze steroidami, zarówno dodatnie, jak i ujemne. W czasie cyklu miesięczkowego estrogeny pobudzają wydzielanie gonadoliberyny, co skutkuje wzrostem wydzielania lutropiny i folikulotropiny. Wzrost stężenia estrogenów w czasie fazy folikularnej powoduje wzrost stężenia FSH i LH. Estrogeny są głównym czynnikiem wpływającym na funkcjonowanie neuronów odpowiedzialnych za wydzielanie GnRH, przez co wpływa na wahania aktywności wydzielniczej i biosyntezy LH i FSH. Progesteron zwiększa czas trwania wzrostu stężenia tych hormonów, wzmagając działanie estrogenów. Wysokie stężenie LH podczas owulacji wpływa na przemianę komórek pęcherzykowych w ciało żółte – strukturę odpowiedzialną za wydzielanie progesteronu. Pulsy są wynikiem zmian w interakcji między stymulacją adrenergiczną i hamującym działaniem kwasu gamma-aminomasłowego, natomiast w reakcji ujemnego sprzężenia zwrotnego pośredniczą neurony produkujące endogenne opioidy [Mahesh and Brann, 1992; Greenspan and Gardner 2004; Skabała 2008].

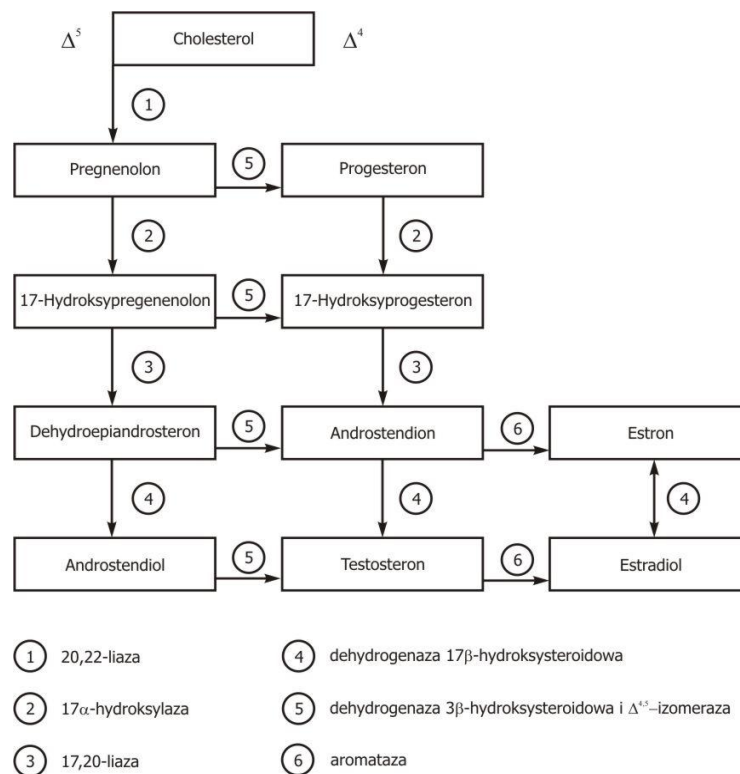
2.3. Hormony steroidowe jajnika – synteza, przemiany metaboliczne, biodegradacja

2.3.1. Synteza estradiolu i progesteronu

Za syntezę hormonów steroidowych odpowiedzialne są nadnercza, gonady, łożysko, a także w układ nerwowy (w niewielkich ilościach). Podlega ogólnemu schematowi specyficznemu dla poszczególnych tkanek i różnic w ekspresji poszczególnych enzymów uczestniczących w tym procesie. Steroidogenezę jajnikową od nadnerczowej odróżnia deficyt 21-hydrolazy i 11 β -hydroksylazy. W mózgu ekspresja enzymów regulowana jest podczas rozwoju, a także, w zależności od lokalizacji procesu, reguluje syntezę specyficznych neurotransmiterów. W wytwarzaniu właściwych neurosteroidów w sposób skoordynowany współpracują komórki neuronowe, jak i neuroglejowe. Neurosteroidy, poza regulacją steroidogenezy spełniają również rolę w zespole napięcia przedmiesiączkowego, depresji oraz są silnymi czynnikami przeciwlękowymi. Również gonadotropina GnRH i jej receptory zlokalizowane w różnych regionach mózgu reguluje ekspresją kluczowych genów i syntezę cholesterolu [Greenspan and Gardner, 2004; Rosati, et al., 2011]. Steroidogenezę nadnerczową i jajnikową przedstawiają kolejno ryciny 17 i 18.



Ryc. 17 Schemat podstawowy steroidogenezy nadnerczowej



Ryc. 18 Schemat podstawowy steroidogenezy jajnikowej

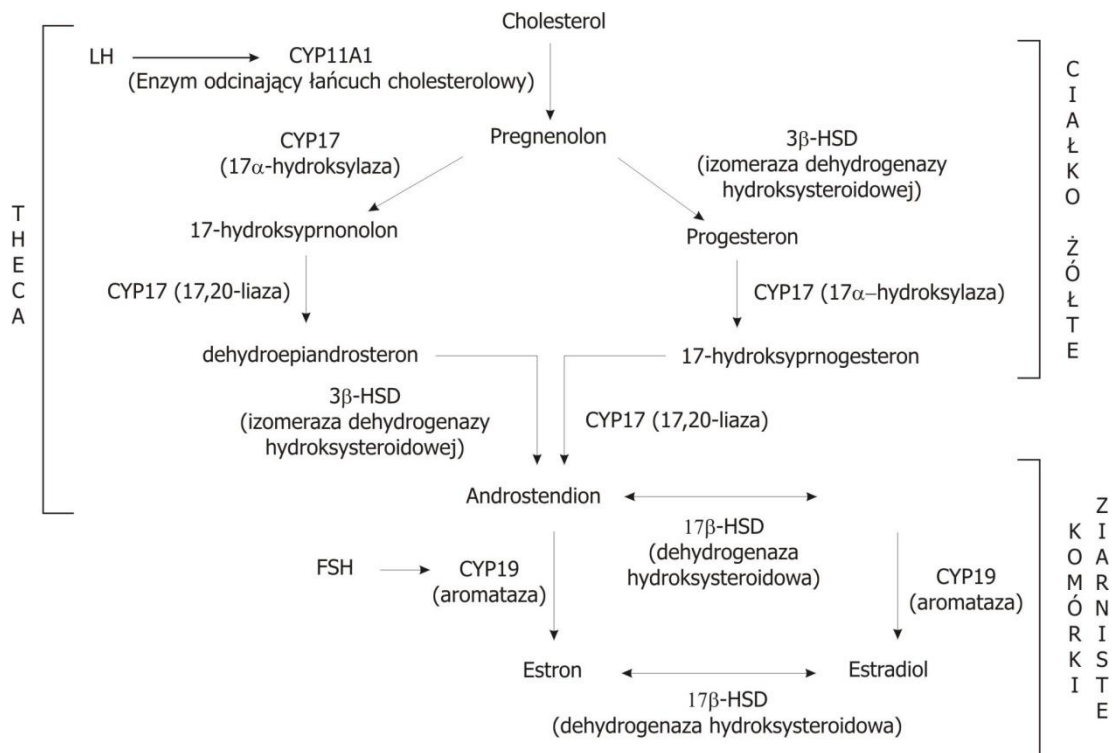
Steroidy zostały opisane nazwami zarówno chemicznymi, jak i zwyczajowymi. Otrzymują również literowe skróty nadawane w momencie ich pierwotnego zidentyfikowania metodą chromatograficzną. Wszystkie steroidy wywodzą się z pregnonolonu. Pregnonolon oraz naturalnie występujące progestageny, glikokortykoidy i mineralokortykoidy zawierają 21 atomów węgla i określane są, jako steroidy C-21. Androgeny i estrogeny posiadają 19 atomów węgla i z tego powodu określane są, jako steroidy C-19 [Christenson and Strauss, 2002].

Prekursorem wszystkich hormonów steroidowych jest cholesterol. Pochodzi on z trzech źródeł: syntezy de novo z octanu, puli estrów cholesterolu w tkankach, w których zachodzi steroidogeneza, a także z pokarmu. Około 80% cholesterolu pochodzi z diety i jest transportowany w osoczu ludzi w cząstkach lipoprotein o małej gęstości (LDL). Wychwyt cholesterolu zachodzi głównie dzięki zjawisku endocytozy poprzez pośredniczące receptory. Prekursorem hormonów jest wolny cholesterol. Cholesterol ulega estryfikacji do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przy udziale acylotransferazy acyl-CoA: cholesterol (ACAT), te z kolei są hydrolizowane do wolnego kwasu tłuszczowego przez esterazę cholesterolową [Christenson and Devoto, 2003].

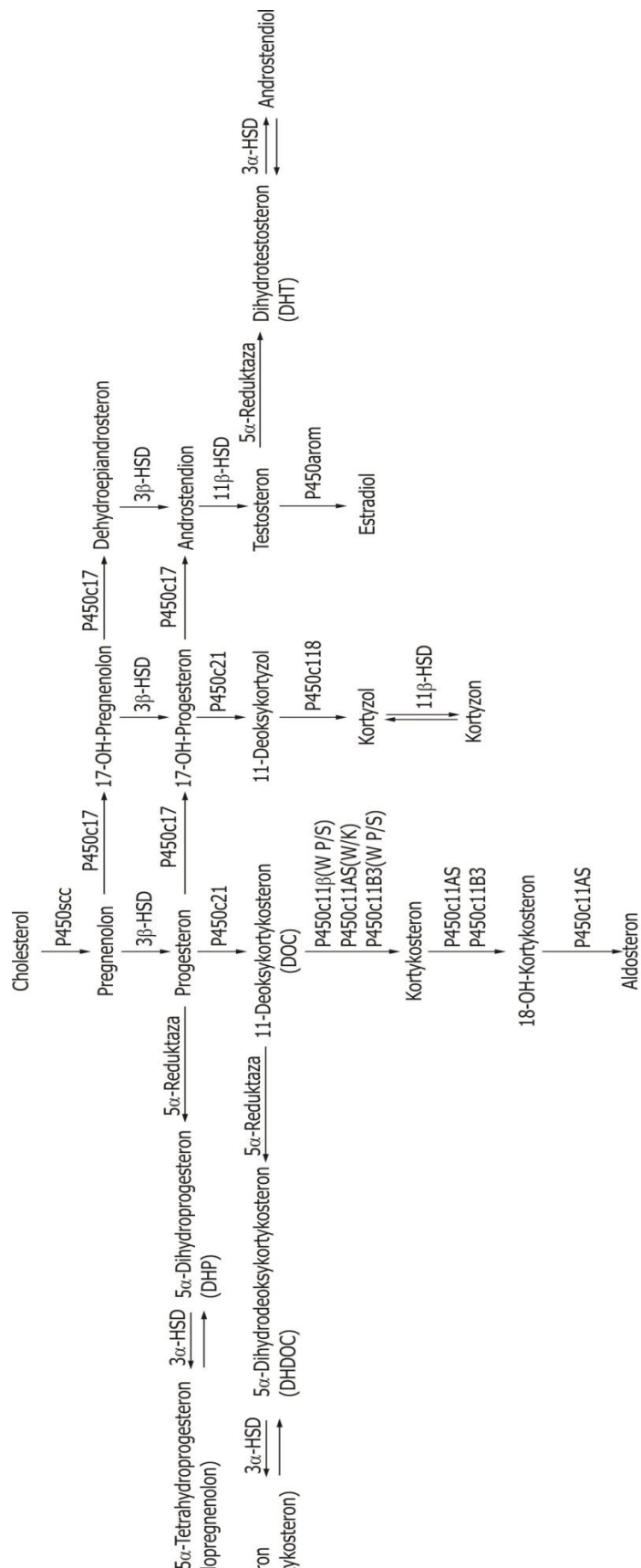
Cholesterol jest przenoszony przez cytoplazmę do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Proces ten jest regulowany aktywnością białka StAR o natychmiastowym działaniu (ang. steroidogenic acute regulator). Za odcięcie bocznego łańcucha cholesterolowego odpowiedzialny jest P450scc (20,22 – liaza) pod wpływem Cd^{2+} (stymulujący również syntezę progesteronu), gen dla niego jest zlokalizowany na 15 chromosomie. Powstaje pregnenolon. Dalsze przemiany odbywają się dwoma równoległymi szlakami w zależności od fazy cyklu miesięczkowego. W fazie folikularnej dominuje szlak Δ^5 (dehydroepiandroteronowy), natomiast w fazie lutealnej szlak Δ^4 (progesteronowy) [Christenson and Strauss, 2000; Greenspan and Gardner, 2004; Smida et al. 2004].

W steroidogenezie biorą udział enzymy z grupy dehydrogenaz lub oksydaz cytochromu P₄₅₀ (w większości). P_{450c} 17 jest pojedynczym enzymem, którego gen zlokalizowany jest na 10 chromosomie i w zależności od czynników zachowuje się jak 17-hydroksylaza lub jak 17, 20-liaza. P450arom (aromataza) jest enzymem o kluczowym znaczeniu dla syntezy estrogenów z androgenowych prekursorów, gen ją

kodujący (CYP-19) zlokalizowany jest na 15 chromosomie [Lorence, et al. 1990; Massanyi, et al. 1999; Słomko, 2008].



Ryc. 19 Główne szlaki steroidogenezy w jajniku z uwzględnieniem miejsc, w których zachodzą procesy



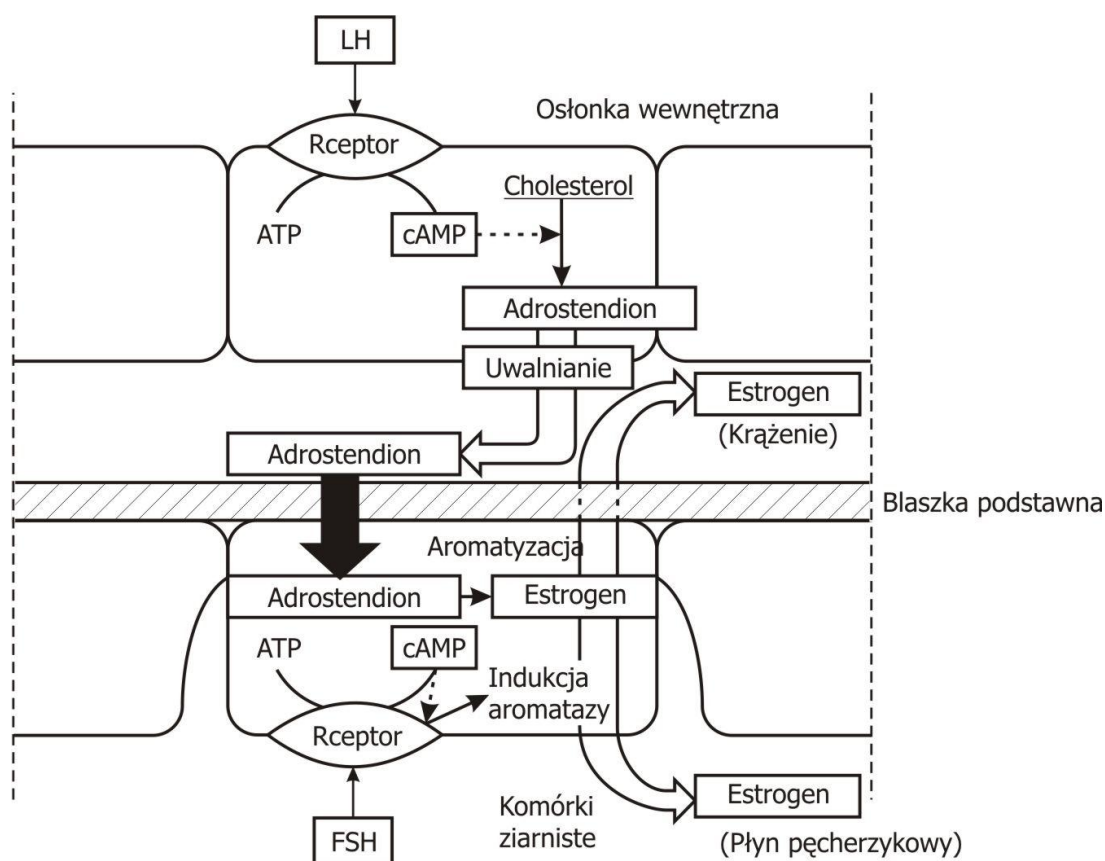
Główne szlaki steroidogenezy

W klasycznych tkankach charakteryzujących się zdolnością do wydzielania wewnętrznego steroidogeneza przebiega zgodnie ze szlakami przedstawionymi na rycinie 20. Wytwarzane są również inne steroidy, takie jak siarczany steroidów i pochodne lipidowe. Nazwy każdego enzymu umieszczono przy każdej reakcji. Ich symbole zostały przedstawione w tabeli 3.

Tab. 3 Symbole enzymów biorących udział w steroidogenezie

Nazwa enzymu	Symbol
Desmolaza	CYP11A1
Dehydrogenaza 3-β-hydroksysteroidowa	3-β-HSD
17-α-hydroksylaza	CYP17A1
21-hydroksylaza	CYP21A2
11-β-hydroksylaza	CYP11B1
Syntaza aldosteronu	CYP11B2
Aromataza	CYP19

Próba wyjaśnienia mechanizmów regulujących fizjologiczną produkcję estradiolu w jajniku jest teoria dwóch komórek. Zakłada, że prekursorzy androgenne, które są syntetyzowane w komórkach tkalnych pod wpływem ekspresji enzymu P_{450C 17}. W komórkach ziarnistych możliwe jest wykorzystanie androgenów, jako substratu do aromatyzacji do estrogenów. Aktywnym enzymem jest tu aromataza, natomiast brak jest ekspresji P_{450C 17}. Komórki tkalne, posiadające receptory dla LH stymulowane przez cAMP, przy których dochodzi do inicjalizacji przemian cholesterolu. W konsekwencji tych przemian komórki otoczki uwalniają androgeny: androstendion i testosteron, przenikające do komórek ziarnistych. Na drodze aromatyzacji, zachodzącej w wyniku połączenia się FSH ze swoistymi receptorami, przy udziale cAMP następuje synteza estrogenów (20-40 µg/ dobę). Schemat ten opisuje rycina 21 [Miller, 1998; Skabała, 2008].



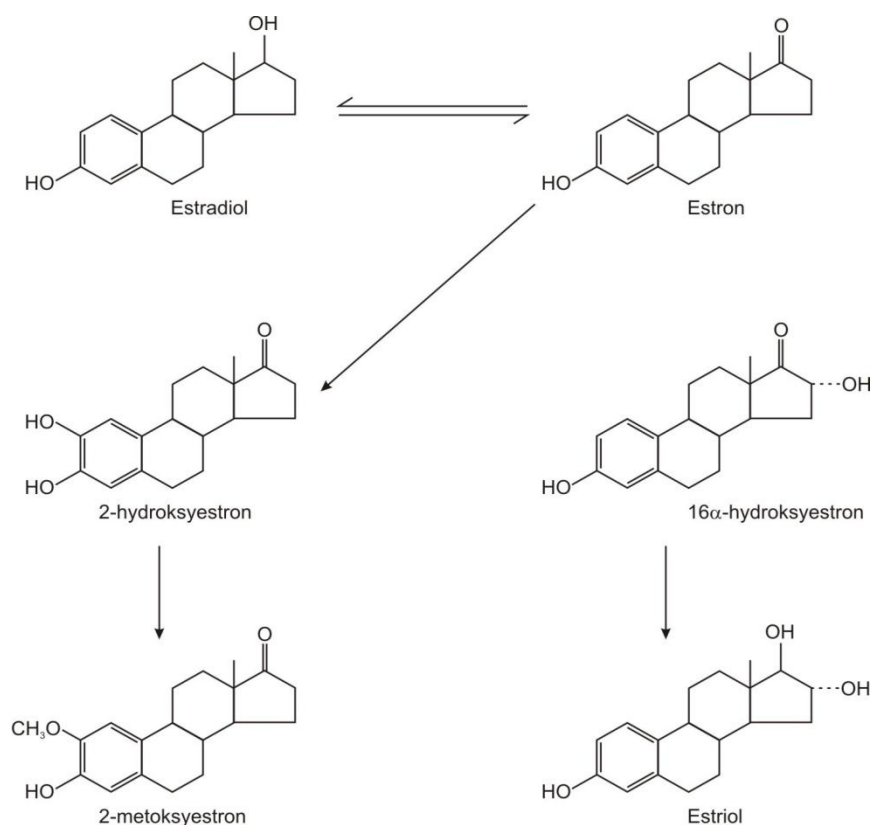
Ryc. 21 Schemat teorii dwóch komórek

W początkowej fazie cyklu, pod wpływem stymulacji FSH, komórki ziarniste rozpoczynają produkcję estrogenów. Estradiol wraz z FSH jest odpowiedzialny za wzrost liczby receptorów dla FSH w komórkach ziarnistych (wpływ aktywiny), jak również receptorów dla LH. Wzrastająca ilość estradiolu jest w konsekwencji również czynnikiem hamującym wydzielania folikulotropiny (wpływ inhibiny i folistatyny), aż do poziomu poniżej wartości progowej niezbędnej do wywierania stymulującego wpływu na komórki ziarniste. Insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insulin-like growth factor IGF) nasila od stymulacji LH produkcję androgenów w komórkach otoczki oraz indukuje aromatazę [Mlynarcikova, et al.,2005; Słomko, 2008].

2.3.2. Przemiany metaboliczne i biodegradacja estrogenów

Metabolizm estrogenów zależy jest od wielu czynników m.in. od masy ciała (ilości tkanki tłuszczowej), aktywności hormonów tropowych, kortykosteroidów,

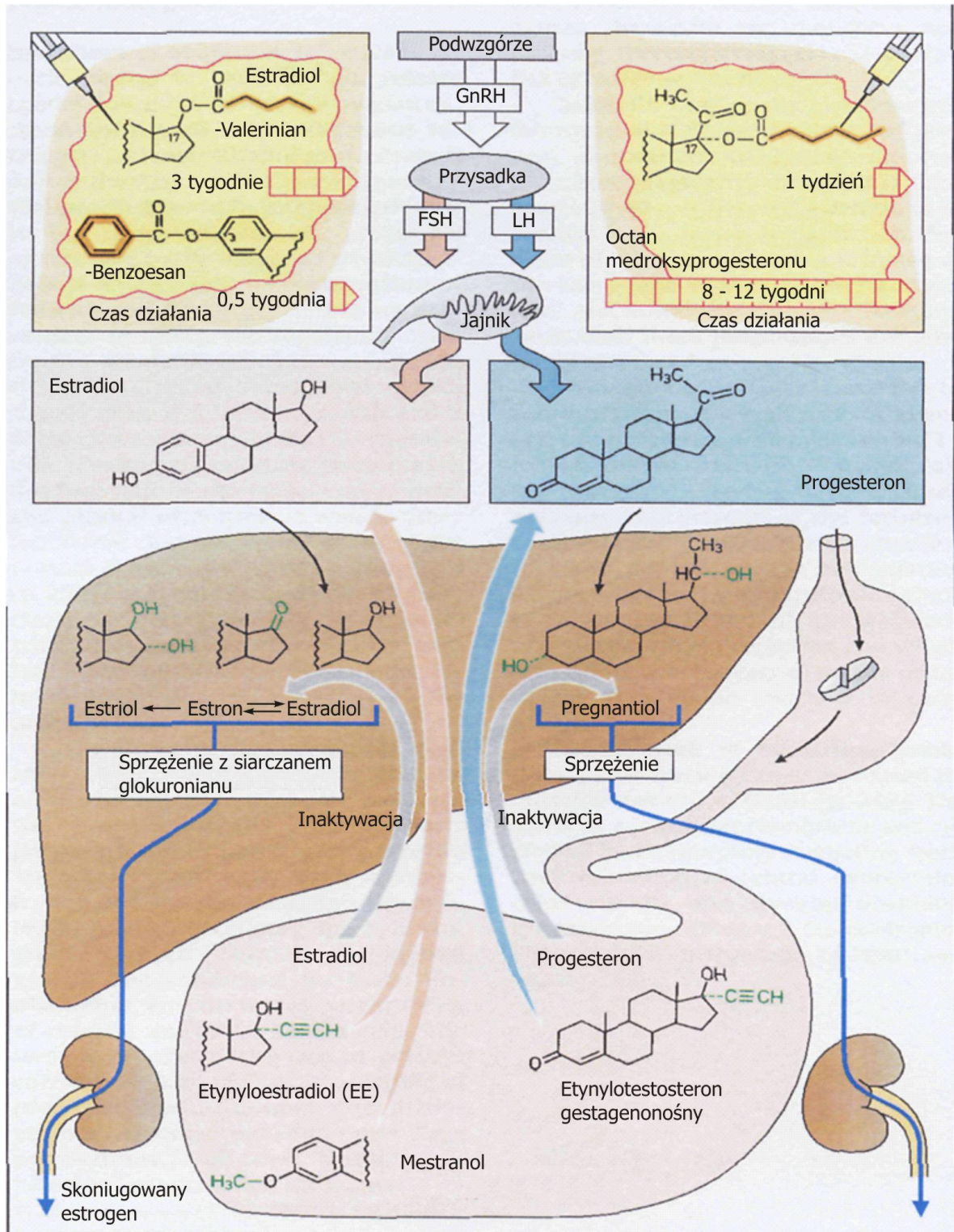
progesteronu, a przede wszystkim od wydolności wątroby. Estradiol będący w krążeniu ogólnym ulega w wątrobie szybkiej konwersji pod wpływem dehydrogenazy 17α -hydroksysteroidowej. Pewna część estronów wraca do krążenia ogólnego, natomiast pozostała jest przekształcana do estriolu lub do estronu katecholowego [Skabała, 2008; Słomko, 2008]. Metaboliczne szlaki hormonów steroidowych są przedstawione na rycinie 22.



Ryc. 22 Metabolizm hormonów steroidowych jajnika

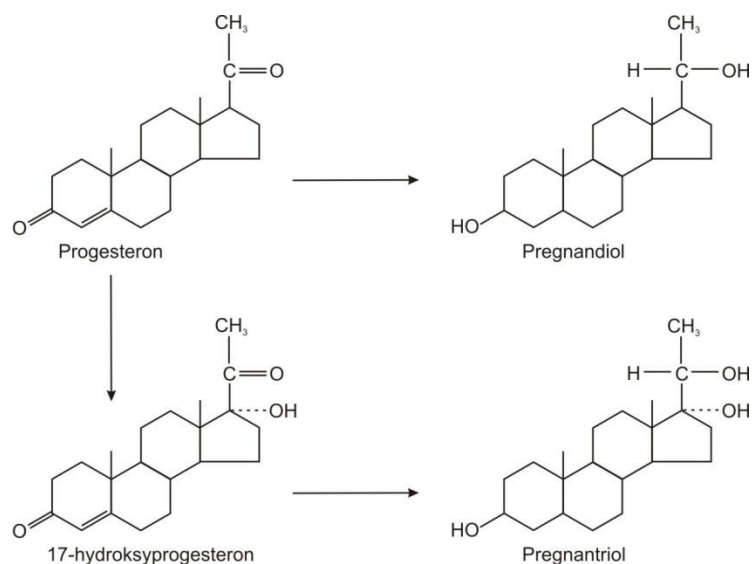
Podwójnie koniugowany estriol ulega w 80% resorpcji i po ponownym przetworzeniu w wątrobie część z nich dostaje się ponownie do krążenia obwodowego, część jest wydzielana do żółci, a pozostała część wydalana z moczem. Estrogeny katecholowe powstają w dużej części w wątrobie, natomiast ich aktywne cząsteczki są obecne w podwzgórzu, przysadce i obwodowych, estrogenowrażliwych narządach docelowych. Ich okres półtrwania jest krótki, ulegają degradacji w wątrobie, mózgu, nerkach oraz erytrocytach w skutek metyzacji, a następnie koniugacji z kwasem glukuronowym lub siarkowym. Większość z nich tworzy siarczan estronu. Około 50% połączonych estrogenów, nierozpuszczalnych w wodzie i niewiążących się z białkami

nośnikowymi, wydalanych jest przez nerki z ominięciem wtórnego metabolizmu wątrobowego. W niewielkiej ilości wydalone są z kałem a także z żółcią [Devoto, et al., 2002; Greenspan and Gardner 2004]. Estradiol i progesteron, wraz z pochodnymi i usytuowaniem w poszczególnych narządach przedstawia rycina 23.



Ryc. 23 Estradiol, progesteron i jego pochodne

Progesteron występujący w surowicy krwi jest w przeważającej części (95-98%) związany z białkami – albuminami (nieswoiście), globuliną wiążącą kortyzol (CBG), a także z globuliną wiążącą hormony płciowe SHBG (swoiście). Procentowy stosunek wiązania z poszczególnymi białkami jest zmienny i zależy od fazy cyklu miesięczkowego, a także podlega zmianom w okresie ciąży. W fazach przedmiesiączkowej i pomiesiączkowej w większości związany jest z albuminami (aż do ok. 79%), a w ok.17% związany z CBG i ok.0,6% z SHBG. Procentowy stosunek wiązania z tymi białkami nie zmienia się bez względu na ilość wytworzonego i krążącego progesteronu w krążeniu ogólnym. W okresie ciąży wzrasta ilość progesteronu związanego z CBG natomiast spada odsetek hormonu związanego z albuminami do ok.54%. Schemat metabolizmu progesteronu przedstawiono na rycinie 24.



Ryc. 24 Metabolizm progesteronu

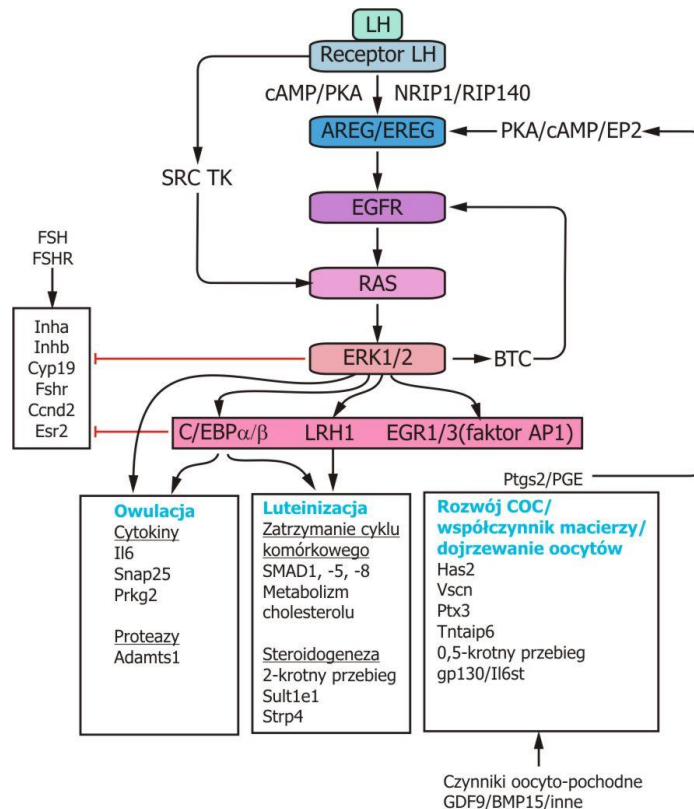
Progesteron jest szybko usuwany z krążenia ogólnego, jego okres półtrwania wynosi ok. 5 minut, a jego metabolizm zachodzi głównie na hepatocytach. Ok. 35% progesteronu jest metabolizowane do glukuronianu 20-pregnanoliu i usuwane z moczem. Produktem pośrednim jest 5 α -dwuhydroksyprogesteron, który po przemianach i połączeniu z resztami kwasu siarkowego jest wydzielany do żółci i wydalany z kałem [Heintz Lüllmann et al. 2000]. Kolejnym produktem metabolizmu progesteronu jest, występujący w ciałku żółtym, łożysku, macicy i wątrobie płodu, 20 α -hydroksyprogesteron. Uważa się, że pobudza on przysadkę do wydzielania

gonadotropin. Gonadotropiny są pobudzane do wydzielania LH również przez $17\ \alpha$ -hydroksyprogesteron – metabolit progesteronu wydzielany przez jajniki [Greenspan and Gardner, 2004; Skabała, 2008; Słomko, 2008].

2.4. Fizjologiczne skutki działania hormonów gonadotropowych i steroidowych

W przysadce mózgowej produkowane są gonadotropiny: lutropina (LH) i folikulotropina (FSH). Głównym ich zadaniem jest oddziaływanie na jajnik pobudzając go do wytwarzania steroidów płciowych oraz do gametogenezy. FSH odpowiedzialna jest za pobudzenie procesów wzrostowych jąder u mężczyzn, wydzielanie białka wiążącego androgeny, w komórkach Sertoliego przyczyniając się w ten sposób do zapewnienia wysokiego stężenia testosteronu, a tym samym do podtrzymania procesu spermatogenezy. LH u mężczyzn jest niezbędne do indukcji wydzielania testosteronu przez komórki śródmiąższowe jąder [Herbison, 1998; Buffet and Bouhard, 2001].

U kobiet lutropina pobudza wytwarzanie hormonów steroidowych w jajniku (estrogenów i progesteronu), owulację, wyrzut komórki jajowej z jajnika, rozwój ciała żółtego oraz pobudza je do wydzielania progesteronu [Bańkowski, 2004; Słomko, 2008]. Wpływ lutropiny na proces luteinizacji i owulacji przedstawiono na rycinie 25.



Ryc. 25 Wpływ hormonu lutropowego na luteinizację i owulację

Folikulotropina wpływa na proliferację komórek ziarnistych, rozwój pęcherzyka Graafa, produkcję płynu pęcherzykowego, jak również na wydzielanie estrogenów, produkcję swoistego białka wiążącego androgeny i inhibinę. Wraz z estrogenami stymuluje pojawienie się receptorów dla lutropiny [Bernard et al., 2010; Richards and Pangas, 2010].

Hormony folikulotropowy i lutropowy związane z receptorami i aktywnym białkiem G powodują aktywację cykazy adenylowej i polifosfatazy oraz są odpowiedzialne za indukcję tworzenia aromatazy [Karck and Keck, 2002; Greenspan and Gardner, 2004; Shemesh, 2001].

Estrogeny produkowane głównie w jajniku, korze nadnerczy swojego działania nie ograniczają tylko do wpływu na cykl płciowy kobiety, lecz również wpływają na przemiany metaboliczne organizmu człowieka [Słomko, 2008; Riggs et al., 2000]. Odpowiedzialne są głównie za rozwój tkanek niezbędnych w procesie reprodukcji, syntezę rRNA, tRNA, mRNA i DNA. W okresie dojrzewania płciowego warunkują ukształtowanie drugo- i trzeciorzędowych cech płciowych wpływając na rozwój

pochwy, macicy, jajowodów, zewnętrznych narządów płciowych. Estradiol odpowiedzialny jest za wzrost i rozłożenie tkanki tłuszczowej w sposób charakterystyczny dla żeńskiej budowy ciała, głównie w obrębie bioder i gruczołów sutkowych (rozwój podścieliska łącznotkankowego i tkanki tłuszczowej) [Cato et al., 2000; Pisarski, 2001]. Wpływa na proliferację nabłonka kanalików i pęcherzyków gruczołowych w obrębie gruczołów sutkowych. Jest odpowiedzialny za występujące w macicy zmiany wzrostowe ze zwiększeniem ilości mitoz w podścielisku. Następuje wzrost masy mięśniowej w macicy, natomiast poprzez pobudzenie syntezy prostaglandyn, wpływających na zwiększenie pobudliwości skurczowej zarówno macicy, jak i kurczliwości i perystaltyki jajowodów. Estrogeny są również odpowiedzialne za wydzielanie przez nabłonek szyjki macicy przezroczystego śluzu bogatego w mukopolisacharydy i sole, umożliwiającego penetrację przez plemniki. Równocześnie z tym procesem następuje rozluźnienie błony mięśniowej okężnej szyjki macicy [Conneely, 2001; Lachowicz - Ochędalska, 2004]. W pochwie estrogeny powodują wzrost, dojrzewanie, a także złuszczenie się jej nabłonka z równoczesnym zwiększeniem liczby dojrzałych komórek w warstwach powierzchniowych. Następuje obniżenie pH jej środowiska. Wraz z prostaglandynami mogą być przyczyną zniszczenia ciała żółtego. Głównie 17- β estradiol indukuje szczyt wydzielania LH na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego. Estrogeny są również odpowiedzialne za zwiększenie pigmentacji skóry w okolicy narządów płciowych, jak i brodawek sutkowych, a także wpływają na miękkość skóry [Adashi, 1994; Auger, 2004; Skabała, 2008; Katsu, et al. 2010].

Poza działaniem typowym dla regulacji rozrodczej człowieka estrogeny posiadają również działanie ogólnoustrojowe. Zwiększają wydzielanie kalcytoniny, przez co pobudzają działanie osteoblastyczne. Powodują hamowanie działania osteolitycznego parathormonu (PTH) na kości. Niedobory estrogenów powstające w okresie menopauzy w wyniku utraty cykliczności czynnościowej osi podwzgórze – przysadka – jajnik są powodem zwiększenia ryzyka wystąpienia osteoporozy [Johnston, 1996; Kłóś et al., 2001; Bjelica et al., 2003; Clarke, 2004]. Estrogeny wpływają na procesy krzepnięcia krwi poprzez zwiększenie stężenia czynnika II, VII, IX, X, plazminogenu oraz adhezję płytek i osłabienie działania heparyny. Wykazują wpływ na reaktywność naczyń wieńcowych, sekrecję tlenu azotu, a także wydzielanie endoteliny i tromboksanu. Powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych również poprzez wpływ na prostacyklinę, poprawę ukrwienia i odżywienia tkanek (w połączeniu z działaniem

innych czynników) [Rosner et al., 1991; Ruggiero and Likis, 2002]. Zmieniają profil lipidowy u kobiet. Wpływają na zwiększenie oksydacji alkoholu. Dodatkowo estrogeny oddziałują na syntezę tłuszczów, białek, zasad purynowych i pirymidynowych poprzez zmianę działania kofaktorów transhydrogenazy NADPH/NAD. Te hormony steroidowe jajnika biorą udział w biosyntezie białek wiążących hormony gruczołu tarczowego - transkorytyny (TBG) i nadnerczy (CBG) oraz wpływają na stężenie glukozy i insuliny poprzez działanie na funkcjonowanie komórek beta w wątrobie. Połączenia z globuliną i transkorytiną, charakteryzujące się silnym powinowactwem, wysoką swoistością wiązań przekładającą się na ich aktywność biologiczną stanowią rodzaj rezerwuaru zapobiegającego nagłym zmianom stężenia tego hormonu [Karck and Keck, 2002; Wood, 2005]. Regulują procesy energetyczne organizmu oraz działają na ośrodek termoregulacji powodując stabilizację temperatury ciała. Poprzez wpływ na zatrzymanie wody i sodu w organizmie powodują zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych, wzmagają nawodnienie tkanek, wpływają na poprawę krążenia, a tym samym poprawiają elastyczność skóry i stan błon śluzowych. Korzystnie wpływają na stan psychiczny i emocjonalny kobiety, wzmagają libido. Przewlekłe narażenia na wolny estradiol zwiększa prawdopodobieństwo nowotworów estrogenozależnych [Greenspan and Gardner 2004; Hirai, 2005; Fortunati and Catalano, 2006].

Drugim ważnym hormonem steroidowym wytwarzanym głównie przez jajnik jest progesteron. Wykazuje on wielokierunkowe działanie zarówno synergistyczne, jak i antagonistyczne z estrogenami. Wpływa na zmiany w błonie śluzowej macicy uprzednio przygotowanej przez estrogen w każdym cyklu miesięcznym. Powoduje wzrost podścieliska, pobudza wydzielanie gruczołów z jednoczesnym blokowaniem przerostu endometrium (wywołanym przez estrogeny) [Conneely et al. 2003; Brinton et al., 2008; Słomko, 2008]. Również wpływa na redukcję receptorów estrogenowych i progesteronowych (indukowanych przez estrogeny) oraz osłabia reakcję tkanek na działanie obu hormonów. Dzięki temu umożliwia implantację zapłodnionego jaja. Utrzymanie go możliwe jest dzięki przekrwieniu i rozpulchnieniu mięśnia macicy, a także zniesieniu samoistnej lub indukowanej reaktywności skurczowej macicy. Po działaniu estrogenów na śluz szyjkowy umożliwiający zapłodnienie, progesteron wywołuje zwiększenie jego gęstości, kaszkowatość uniemożliwiający tym samym przenikliwość dla plemników [Pisarski et al., 2001; Okubo and Honjo, 2006]. W gruczołach sutkowych pobudza wzrost pęcherzyków gruczołowych i ogranicza nadmierny wzrost nabłonka przewodów. Jest to działanie synergistyczne z estrogenami

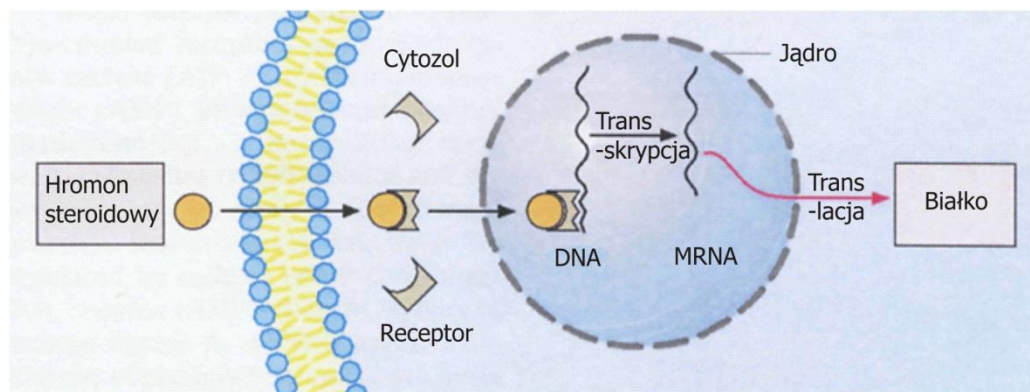
[Zalanyi, 2001; Greenspan and Gardner, 2004; Tajima et al., 2006]. Gestagen wywiera działanie ogólnoustrojowe. Wywołuje zmiany metaboliczne węglowodanów (obniżając działanie hipoglikemiczne insuliny, a także zwiększając stężenie glikogenu w tkankach), białek (obniża wartości stężeń aminokwasów w surowicy) i lipidów. Wpływa na obniżenie napięcia mięśni gładkich układu moczowego. W kanalikach nerkowych progesteron współzawodniczy z aldosteronem przez co zmniejszone jest wchłanianie zwrotne jonów sodowych. Konsekwencją jest wzrost wydzielania aldosteronu przez korę nadnerczy. Zwiększone jest również wydzielanie fosforu. Innym działaniem ogólnoustrojowym progesteronu jest jego wpływ na funkcjonowanie ośrodków oddechowych. Antyandrogenne działanie progesteronu wpływa na stan skóry człowieka. Progesteron wraz z steroidami pochodnymi wykazuje również działanie nasenne, a także powoduje obniżenie nastroju poprzez działanie depresyjne na ośrodkowy układ nerwowy i jest współodpowiedzialny za zespół napięcia przedmiesiączkowego. Wpływa na funkcje poznawcze zwiększając pamięć wzrokową. Pobudza formowania kości, a także na zmniejsza obrót kostny [Karck and Keck, 2002; Stouffer, 2003; Skabała, 2008].

2.5. Cykl miesięczkowy

Żeński układ rozrodczy jest regulowany w sposób cykliczny przez hormony płciowe, a zmiany te noszą nazwę cyklu miesięczkowego. Towarzyszą mu w sposób związany cykliczne zmiany jajnikowe (cykl jajnikowy), endometrium (cykl endometrialny), śluzu szyjkowego (cykl szyjkowy). Cykl ten jest uwarunkowany działaniem osi podwzgórze – przysadka – jajnik. Podwzgórze syntetyzuje gonadoliberynę. Częstość pulsacji wydzielniczych gonadoliberyny jest wyższa w fazie folikularnej (co 70-90 minut), niż w fazie lutealnej (100–200 minut). Przyspieszenie pulsów wydzielania gonadoliberyny zwiększa ilość wydzielania FSH, natomiast zwalnia syntezę lutropiny. Wzrost ilości wytwarzanej folikulotropiny powoduje wzrost syntezy estrogenów z androgenowych prekursorów pod wpływem aromatazy. Hormony steroidowe jajnika zmniejszają natomiast wydzielanie folikulotropiny i lutropiny na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego poprzez obniżenie zdolności komórek zasadochłonnych przedniego płata przysadki do ich syntezy. Estradiol na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego w drugiej części fazy folikularnej powoduje

zwiększenie wydzielania lutropiny, a w konsekwencji wydzielania progesteronu. Funkcjonowanie osi polega na tym, że podwzgórze i przysadka odpowiadają za interakcje pomiędzy neuronową i hormonalną regulacją funkcji jajnika. Gonadoliberyna wrażliwa na bodźce nerwowe, stymuluje przysadkę do syntezy gonadotropin, natomiast mechanizmy sprzężenia zwrotnego przysadki kontrolują podwzgórze. W przebiegu cyklu miesięczkowego kobiet biorą udział czynniki hormonalne, a także neurotransmitery i neuromodulatory pozostające ze sobą we wzajemnych zależnościach [Garrel, 1996; Hirai, 2005; Fortunati and Catalano, 2006].

W trakcie prawidłowo przebiegającego cyklu miesięczkowego nie są zauważalne wahania ilości białek wiążących hormony steroidowe. Produkcja tych białek zachodzi głównie w wątrobie i jest regulowana poprzez poziomy estrogenów i progesteronu. Związanie steroidów wpływa na redukcję klirensu metabolicznego białek, stabilizując ich poziom w poszczególnych fazach cyklu miesięczkowego, wpływając na szybkość konwersji obwodowej i szybkość wiązania z właściwymi receptorami komórkowymi [Alecozay et al., 1988; Fortunati, 1999; Brinton et al., 2008]. Receptorowe wiązanie steroidów z białkami przedstawiono na rycinie 26.



Ryc. 26 Wiązanie steroidów z białkami za pomocą receptorów

Średnio, cykl jajnikowy trwa 28 dni. Jednak jest to czasookres uwarunkowany osobniczo i waha się od 19-35 dni. Dzieli się na fazę miesięczkową trwającą 1-5 dni, folikularną 6-13 dni, owulacyjną ok. 14 dnia cyklu oraz lutealną między 15-28 dniem. W ten sposób przebiega prawidłowy, niezakłócony cykl miesięczkowy. W zależności od długości cyklu (18-35 dni) następuje zmiana długości poszczególnych faz [Johnson et al., 1993; Buffet et al., 1998].

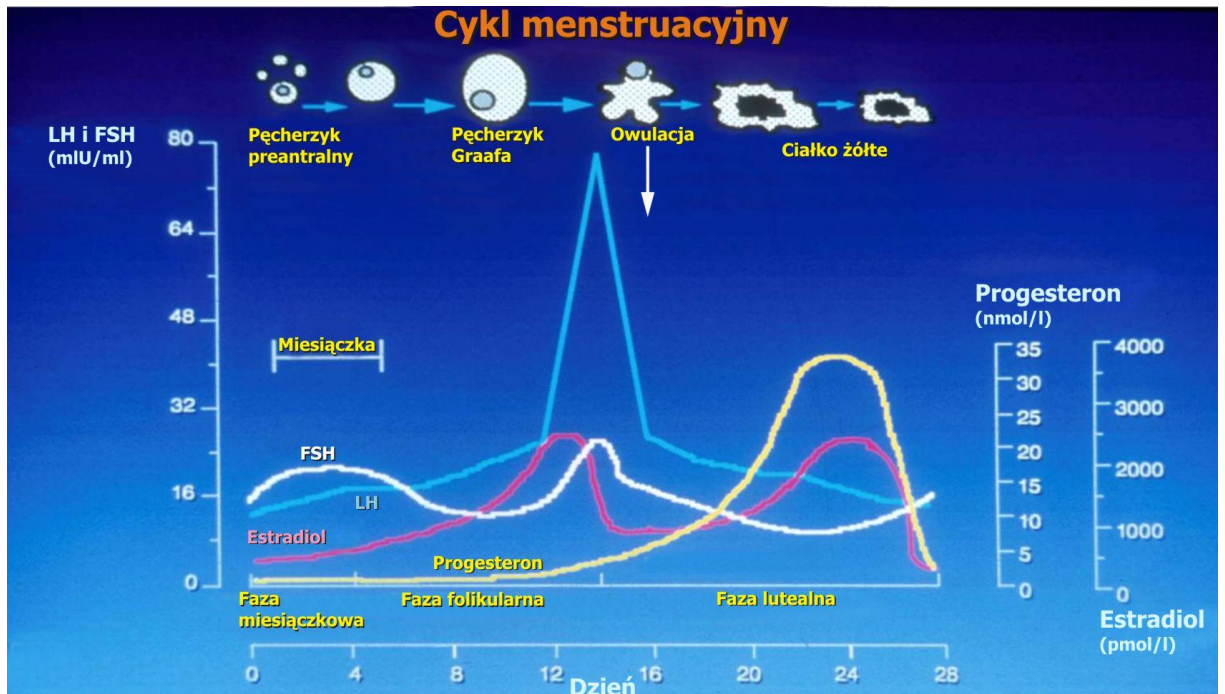
W fazie miesięczkowej dochodzi do kształtowania ciała białego z ciała żółtego z poprzedniego cyklu miesięczkowego. Endometrium (warstwa czynnościowa) zostaje złuszczone. Z reszty elementów warstwy podstawowej rozpoczyna się regeneracja nabłonka. Poziomy hormonów folikulotropowego, luteinizującego i 17β -estradiolu obserwowane są na niskim poziomie. Progesteron wytwarzany przez korę nadnerczy oraz ciało żółte pozostałe jeszcze z poprzedniego cyklu kształtuje się również na niskim poziomie. W wyniku wydzielania przez przedni płat przysadki folikulotropiny następuje pobudzenie pęcherzyków pierwotnych do dojrzewania [Buffet and Bouchard, 2001; Zeleznik, 2001].

W fazie folikularnej następuje rozrost błony śluzowej i zwiększenie unaczynienia macicy. Następuje proliferacja nabłonka gruczołowego w połączeniu ze zwiększeniem pęcherzyka dojrzewającego (pęcherzyka dominującego), który aktywuje pętlę sprzężenia zwrotnego. Wraz z FSH współdziałają estrogeny na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego. Następuje wzrost ilości estradiolu. Zauważalny jest wzrost podścieliska [Pisarski, 2001; Hillier, 2002].

Około 14 dnia cyklu, w 24-36 godzin po pikie maksymalnego stężenia estradiolu następuje wyrzut hormonu luteinizującego powodujący po około 12 godzinach uwolnienie komórki jajowej. Jest to efekt działania prostaglandyny E₂ i F₂ powodujący ukończenie podziału mejotycznego, pęknięcie pęcherzyka Graafa i uwolnienie komórki jajowej. Szczyt wydzielania lutropiny wpływa na zwiększenie syntezy progesteronu. Prowadzi to do zmian pulsacyjnego wydzielania gonadoliberyny, zmiany w endometrium, a także zmiany struktury śluzu szyjkowego macicy. Wysokie stężenie 17β -estradiolu na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego powoduje zahamowanie wydzielania folikulotropiny i luteiny [Słomko, 2008].

W fazie lutealnej zanikają pozostałe pęcherzyki i wzrastają komórki ziarniste. Komórki podścieliska rozrastają się, wzrasta grubość błony śluzowej i nabłonka gruczołowego z gromadzeniem przez nie substancji odżywczych. Powstanie ciała żółtego powoduje wzrost wydzielania progesteronu, którego szczyt przypada na 8-9 dzień po owulacji. Następuje spadek wydzielania 17β -estradiolu, a potem progesteronu. Gdy funkcja hormonalna ciała żółtego kończy się następują zmiany wsteczne w błonie śluzowej macicy, zapadają się jamy gruczołowe, następuje obrzęk podścieliska rozdzielanie i deitengracja jego komórek, powstają nacieki limfocytów

i granulocytów. Ciało żółte przekształca się w ciało białe – kolejny cykl miesięczkowy [Lüllmann et al. 2000; Greenspan and Gardner, 2004]. Schematyczny przebieg cyklu miesięczkowego przedstawiono na rycinie 27.



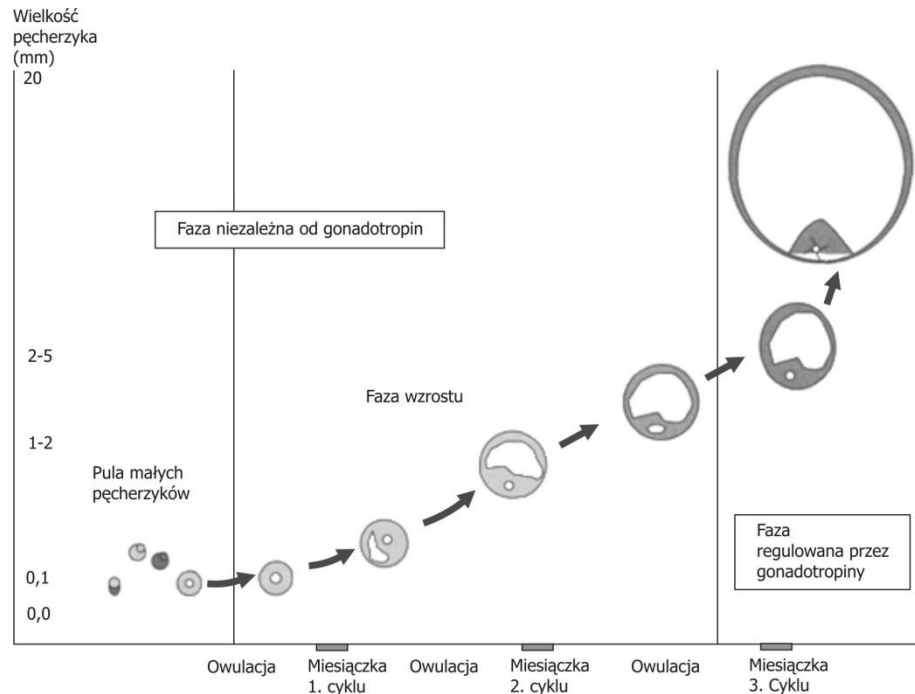
Ryc. 27 Przebieg cyklu miesięczkowego

2.5.1. Cykl jajnikowy

Powstawanie pęcherzyków w jajniku rozpoczyna się w życiu płodowym. W momencie urodzenia ilość komórek jajowych wynosi średnio ok. 2 mln. W okresie rozrodczym owulacji ulega ok. 400 komórek jajowych (owulacje monofolikularne). Niekiedy obserwowane jest przedwczesne upośledzenie czynności jajników (w odróżnieniu od przedwczesnego wygasania czynności jajników). Liczba komórek jajowych obecnych w jajniku determinowana jest ich ilością w momencie narodzin. Ich pula wyczerpuje się u zdrowych kobiet ok. 50 roku życia.

Cykl jajnikowy kobiet obejmuje fazę rekrutacji, selekcji, dominacji owulacji i wytwarzania ciała żółtego.

Przygotowanie pęcherzyków zaczyna się ok. 85 dni przed rozpoczęciem się fazy rekrutacji. Jest to okres gonadotropinozależny. Poszczególne fazy rozwoju pęcherzyka jajnikowego przedstawiono na rycinie 28.



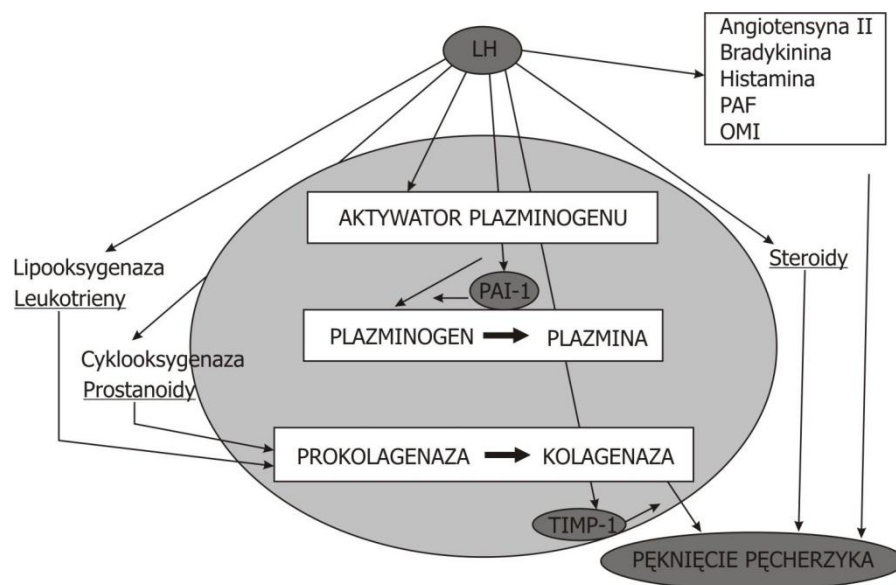
Ryc. 28 Rozwój pęcherzyka jajnikowego – faza zależna i niezależna od gonadotropin

Rozwój pęcherzyka jest wynikiem działania stymulującego folikulotropiny. Pęcherzyk pierwotny przechodzi w pęcherzyk prenatalny. Komórka jajowa otoczona przejrzystą osłonką powiększa się, następuje proliferacja komórek ziarnistych zdolnych w tym momencie do produkcji estrogenów. Dalsza proliferacja komórek ziarnistych następuje we współdziałaniu FSH i estrogenów. Następuje rekrutacja 3-7 pęcherzyków antralnych. Powstaje jeden pęcherzyk antralny w efekcie uformowania jamki z płynem pęcherzykowym. Komórki ziarniste otaczające komórkę jajową tworzą wzgórek jajonośny. Zwiększenie ilości androgenów w płynie pęcherzykowym (zawiera duże ilości estrogenów a małe androgenów) prowadzi do zmian degradacyjnych w pęcherzyku.

Kolejnym etapem cyklu jest wybranie pęcherzyka dominującego, który powoduje zwiększenie wydzielania estradiolu. Konsekwencją jest aktywacja pętli sprzężenia zwrotnego, ujemnego. Pęcherzyk dominujący odpowiada za funkcjonowanie osi podwzgórze – przysadka – jajnik. Rozrasta się i zwiększa się ukrwienie warstwy tkalnej. Rozwija się pęcherzyk przedowulacyjny. Towarzyszy temu wzrost wydzielania

estrogenów ze szczytem na 24-36 godzin przed owulacją. Obserwowany jest maksymalny pik lutropiny, inicjującej proces luteinizacji, a także stymulowane jest oddzielenie ciała kierunkowego. Zachodzą dalsze etapy podziału mejotycznego.

Owulacja, czyli jajczkowanie, uzależniona jest od mechanizmów hormonalnych i enzymatycznych przy udziale czynników auto- i parakrynych. Wymaga odpowiednich stężeń estradiolu i hormonu lutropowego, jak również innych czynników. Mechanizmy odpowiedzialne za jajczkowanie przedstawiono na rycinie 29.



Ryc. 29 Mechanizmy odpowiedzialne za proces owulacji

Rozpoczyna się wydzielanie progesteronu powodującego destabilizację ścian pęcherzyka (efekt degeneracji kolagenu). Hormony folikulotropowy i lutropowy wraz z progesteronem stymulują aktywność enzymów proteolitycznych. Gonadotropiny zwiększają uwalnianie histaminy. Komórki ziarniste i tkalne produkują aktywator plazminogenu, powstają kompleksy plazminy i wzrasta stężenie prostaglandyn w płynie pęcherzykowym. Efektem jest pęknięcie ściany pęcherzykowej [Eppig, 2001; Gleicher, 2005].

Ostatnią fazą cyklu jajnikowego jest faza lutealna. Zwiększające się wakuole i akumulacja luteiny przygotowują pęcherzyk do waskularyzacji ciała żółtego. Szczyt waskularyzacji przypada na maksymalny poziom wydzielania progesteronu. Faza lutealna jest fazą stałą, czternastodniową [Brannianj and Stouffer, 1991]. W przypadku

braku zapłodnienia komórki jajowej, po upływie 10-11 dni od jajczkowania, rozpoczyna się regresja ciała żółtego. W przypadku zapłodnienia jego funkcja jest podtrzymywana do ok. 10 tygodnia ciąży przez hCG. Po tym okresie steroidogenezę przejmuje łożysko [Fritz, 1992; Słomko, 2008].

2.5.2. Cykl endometrialny

W odpowiedzi na cykl jajnikowy w endometrium, zbudowanym morfologicznie z części podstawowej i czynnościowej, zachodzą zmiany w fazach: miesięczkowej, proliferacyjnej i sekrecyjnej. Warstwa czynnościowa jest odpowiedzialna za przygotowanie macicy do implantacji, natomiast faza podstawowa jest odpowiedzialna za regenerację endometrium po złuszczeniu miesięczkowym

Faza miesięczkowa trwająca w 1-5 dniu cyklu miesięczkowego charakteryzuje się złuszczeniem się warstwy czynnościowej endometrium macicy. Prostaglandyny, biorące w niej udział odpowiadają za obkurczenie tętniczek spiralnych i czynność skurczową macicy. Nagły skurcz tętnic łukowatych w warstwie mięśniowej jest bezpośrednią przyczyną miesięczki. Powoduje to przepełnienie krwią światło naczyń włosowatych i miejscowe wylewy.

W fazie proliferacyjnej następuje wzrost endometrium. Jest to efekt wahania stężenia estrogenów i zmian związanych z rozwojem pęcherzyka w jajniku. Odnawiający się nabłonek pokrywa ranę miesięczkową. Następuje zwiększenie ilości i objętości gruczołów, ich podział, zmiany w ich formie przestrzennej, obecność polisacharydów i unaczynienie. Następuje pogrubienie warstwy endometrium i jej pofałdowanie [Speroff and Fritz, 2005; Słomko, 2008].

Pomiędzy 15 a 28 dniem cyklu miesięczkowego trwa faza sekrecyjna. Podczas niej progesteron powoduje dalszy rozrost błony śluzowej, a także zmiany gruczołowe. Tkanka łączna podścieliska staje się obrzęknięta, a jej komórki gromadzą glikogen, białka i lipidy. Fibroblasty wypełniają się ziarnistościami glikogenowymi tworząc komórki doczesnowe, które wykazują wysoką aktywność fosfatazy kwaśnej i β -glukuronidazy. W komórkach zrębu pojawiają się komórki tuczne, limfocyty

i granulocyty. Następuje przygotowanie się do prawidłowego zagnieżdżenia się zapłodnionej komórki jajowej. Jest to faza pseudodoczesnowa. Po zapłodnieniu następuje osadzenie się blastocysty – reakcja doczesnowa. W przypadku braku zapłodnienia następują zmiany degeneracyjne endometrium polegające na zapadaniu się gruczołów, naciekaniu leukocytów i krwawe wylewy (charakterystyczne cechy niedokrwienia), prowadząc w konsekwencji do menstruacji [Traczyk i Trzebski, 2001].

2.5.3. Cykl szyjkowy

Zmiany w strukturze i ilości śluzu szyjkowego są zależne i zmienne w kolejnych fazach cyklu miesięczkowego. Faza folikularna charakteryzuje się stopniowym zwiększaniem się jego ilości w odpowiedzi na działanie estrogenów. Śluz okołooowulacyjny jest przezroczysty z niewielką ilością komponentów komórkowych. Dzięki takiej strukturze ułatwiona jest penetracja plemników. Dominujący w kolejnej fazie cyklu miesięczkowego progesteron powoduje zmętnienie śluzu, całkowite ograniczenie przepuszczalności dla plemników, a także silne wzbogacenie w substancje komórkowe [Katz et al. 1997; Słomko, 2008].

III. DYM TYTONIOWY

3.1. Dym tytoniowy – charakterystyka fizykochemiczna

Podstawowym surowcem do produkcji wyrobów tytoniowych są rośliny z rodzaju *Nicotiana* L., należące do rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), która obejmuje ok. 100 gatunków [Jussieu, 2001]. Nikotyna występuje również w innych roślinach należących do tej rodziny tj. w pomidorach, bakłażanach, ziemniakach czy pieprzu. Obecna jest również w zielonej herbacie. Występuje w postaci soli jabłczanów i cytrynianów (ok. 4% zawartości). Obecnie w przemyśle tytoniowym wykorzystywane są dwa gatunki, które są naturalnymi hybrydami czyli tytoń szlachetny (wirgilijski) – *Nicotiana tabacum* (*N. fruticosa* L.) uznawany za gatunek uprawowy oraz tytoń machorka - *Nicotiana rustica* L. [Szweykowscy A., J., 1993; Wojcińska M. i wsp., 2002].

Wydzielanie dymu tytoniowego jest skutkiem niecałkowitego spalania, podczas którego zachodzą procesy pirolizy, pirosyntezy, dehydratacji, redukcji, kondensacji, sublimacji, a także destylacji warunkujące jego skład [Viala, 1998; Piekoszewski i Florek, 2001].

Analiza składu dymu tytoniowego wykazała zawartość ponad 4300 zidentyfikowanych związków chemicznych. Dodatkowo wykazano istnienie kilkuset niezidentyfikowanych substancji. Różnorodność chemiczna składu dymu tytoniowego zależy od rodzaju tytoniu, użytych substancji pomocniczych dodanych w celu zmiany działania, osłabienia działania drażniącego a także zmiany walorów organoleptycznych [Hoffmann and Wynder, 1994; Florek, 2000; Piekoszewski i Florek, 2006].

Podczas spalania tytoniu wyróżnia się dwa strumienie dymu tytoniowego. Strumień główny (ang. mainstream smoke, MS) powstaje podczas palenia wyrobów tytoniowych w temperaturze 800-900°C i jest inhalowany przez osobę palącą, natomiast strumień boczny (ang. sidestream smoke, SS) powstaje pomiędzy zaciąganiem się papierosem, a generowany jest w temperaturze około 600°C. Główny

i boczny strumień dymu jest generowany w równych ilościach z palącego się papierosa [WHO Air Quality Guidelines, 1998; Piekoszewski and Florek, 2001]. Temperatura generowania dymu tytoniowego ma bezpośredni wpływ na zróżnicowanie w składzie ilościowym obu strumieni bez wpływu na skład jakościowy. Na rozbieżności mają wpływ również, poza wymienionymi wcześniej, warunki, w jakich dokonywano jego oceny analitycznej, jak i procedury stosowane w oznaczaniu [Viala, 1998; WHO 1998; Florek i Piekoszewski, 2006].

Tab. 4 Właściwości fizykochemiczne dymu tytoniowego – strumienia głównego (MS) oraz bocznego (SS) – dane dotyczą papierosów bez filtra

Parametr	Strumień główny MS	Strumień boczny SS
Temp. stożka papierosa (°C)	860-900°C	500-650°C
Temp. wciąganego dymu (°C)	20-50°C *	20-60°C **
pH	5,8-6,2***	6,8-7,5***
Ilość cząstek/cm ³	5x10 ⁹	10 ⁵ -10 ⁶
Średnica cząstek (µm)	0,2 (0,1-1,0)	0,5 (0,1-1,5)
Ilość polidispersyjnych cząstek stałych/cm ³	2-3x10 ¹⁰	n.o.
Masa całkowita (mg)	500	n.o.
Masa fazy cząstkowej dymu	20-30	25-40

* pierwsze zaciągnięcie 20°C, ostatnie zaciągnięcie 50°C

** 8 mm z wypalonego stożka

*** tytoń typu Virginia lub mieszanka tytoniu; tytoń papierosowy ciemny pH MS 6,6-7,1, pH SS 7,5-8,7

n.o. nie określono

Źródło: [Florek i Piekoszewski, 2006]

Ze względu na stan skupienia składników rozróżnia się trzy frakcje dymu tytoniowego:

- Fazę gazową – stanowią ją substancje gazowe głównego strumienia dymu (500-600 zidentyfikowanych składników) obejmujące 85-95% jego całkowitej masy [Florek i Piekoszewski, 2006]. Głównie są to: azot, tlenek węgla, amoniak, formaldehyd, cyjanowodór, tlenki azotu, aldehyd octowy, lotne N-nitrozoaminy specyficzne dla tytoniu, pirydyna, nikotyna, kotynina, węglowodory tj., 1,3 – butadien, izopren, toluen

- fetylobenzen, ksilen oraz wolne rodniki [Hoffmann and Wynder, 1994; Piekoszewski, Florek, 2001]
- Fazę parową – w jej skład wchodzi m.in.: toluen, benzen, hydrazyna, kwas mrówkowy, aceton, kwas octowy i tlenki azotu
- Fazę cząstkową – aerozol o średnicy cząstek 0,1-0,8 μm , stanowią ją ok. 3500 składników chemicznych, głównie alkaloidy pirydynowe (nikotyna stanowiąca 85-90% ogólnej masy alkaloidów zawarta liściach tytoniu), WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (naftalen, piren, benzo(a)antracen, fenantren, benzo(a)piren, benzo(a)fluoranteny), alkohole (solanesol), fenole (fenol, katechol), pierwiastki promieniotwórcze (^{210}Po), kwasy organiczne, N-nitrozoaminy specyficzne dla tytoniu (N-nitrozonikotyna i keton-4-(metylonitrozoamino)-4-(3-pirydylo)masłowy), fitosterole, wolne rodniki i składniki nieorganiczne (potas, wapń, nikiel, ołów, selen, cynk i kadm) [IARC, 1986; Viala, 1998; Florek i Korniak, 2003].

W dymie tytoniowym, poza nikotyną i kotyniną, znaczną część stanowią kancerogeny o działaniu rakotwórczym, potwierdzonym badaniami klinicznymi. Należą tu głównie WWA powstające w procesie piroksyntezy, obecne głównym i bocznym strumieniu dymu tytoniowego, a także N-nitrozoaminy specyficzne dla tytoniu (NAST), powstające w wyniku suszenia i palenia tytoniu. Spośród 60 zidentyfikowanych związków rakotwórczych w dymie tytoniowym, 40 posiada działanie kancerogenne potwierdzone badaniami klinicznymi i na zwierzętach [Hoffmann and Wynder, 1994; Florek, 2000].

Najważniejsze toksyczne i kancerogenne składniki powstające podczas spalania papierosa przedstawione są w tabeli nr 5.

Tab. 5 Substancje kancerogenne znajdujące się w dymie tytoniowym

Kancerogen	Stężenie /papieros	Właściwości kancerogenne
		Grupa
Benzo(a)antracen	20-70 ng	2A
Benzo(a)piren	20-40 ng	2A
Indeni(1,2,3-cd)piren	4-20 ng	2B
Dibenzo(a,j)akrydyna	3-10 ng	
Furan	18-37 ng	2B
N-Nitrozodimetyloamina	2-180 ng	2A
N-Nitrozodietyloamina	ND-2,8 ng	2A
N-Nitrozopirolidyna	3-110 ng	2B
4-(Metylnitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanol	80-770 ng	2B
2-Naftyloamina	1-334 ng	1
4-Aminobifenyl	2-5,6 ng	1
2-amino-9H-pirydo(2,3-b)indol	25-260 ng	2B
2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b)pirydyna	11-23 ng	2A
Aldehyd mrówkowy	70-100 µg	2A
Aldehyd octowy	500-1400 µg	2B
1,3-Butadien	20-75 µg	2B
Benzen	20-70 µg	1
Akrylonitryl	3-15 µg	2A
Chlorek winylu	11-15 ng	1
DDT	800-1200 µg	2B
DDE	200-370 µg	2B
Katechol	100-360 µg	2B
Tlenek etylenu	7 µg	1
Tlenek propylenu	12-100 µg	2B
Hydrazyna	24-43 ng	2B
Arsen	40-120 µg	1
Nikiel	ND-600 ng	1
Chrom (6 ⁺)	4-70 ng	1

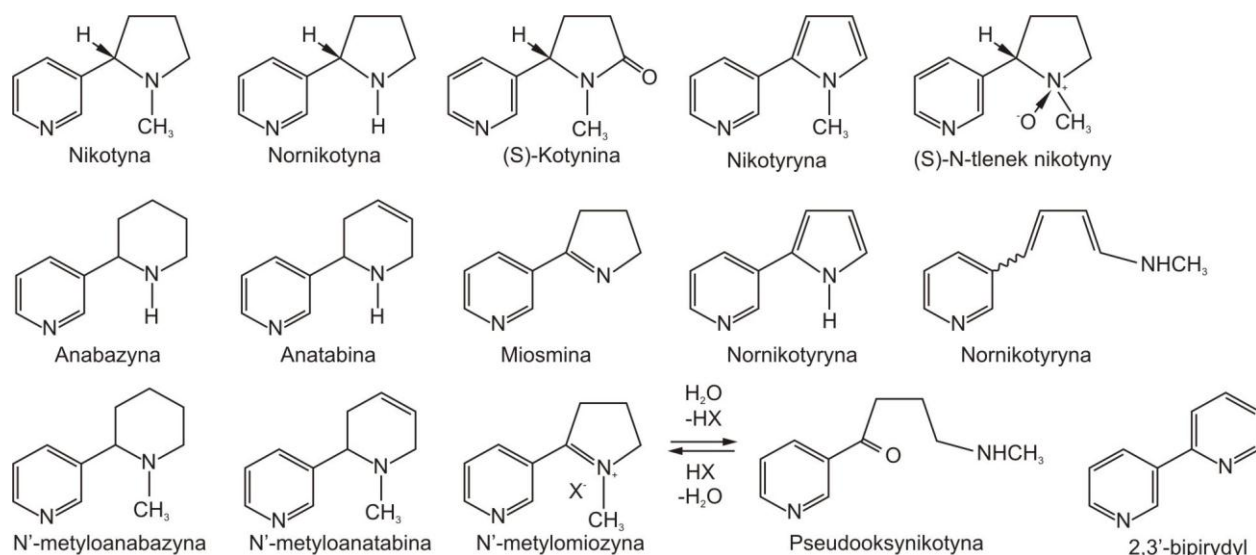
Kadm	7-350 ng	1
Kobalt	0,13-0,2 ng	2B
Ołów	34-85 ng	2B
Polon-210	0,03-1,0 pCi	1

OBJAŚNIENIA: 1 – kancerogen u ludzi; 2A – prawdopodobny kancerogen u ludzi; 2B – możliwy kancerogen u ludzi

Źródło: [Florek i Piekoszewski, 2007]

Środowiskowy dym tytoniowy (ang. Environmental Tobacco Smoke ETS), na który narażone są osoby niepalące przebywające wśród palących, jest sumą składników strumienia bocznego oraz dymu wydychanego przez palacza, stanowiąc odpowiednio 80-96% oraz 4-20% [Piekoszewski i Florek, 2006].

Liście tytoniu zawierają duże ilości alkaloidów zawierających pierścień pirydynowy, głównie nikotynę. Występuje ona w ok. 4% w postaci soli kwasu jabłkowego i cytrynowego. Najważniejsze alkaloidy wchodzące w skład liści tytoniu przedstawiono na rycinie 30.



Ryc. 30 Najważniejsze alkaloidy wchodzące w skład liści tytoniu

Źródło: [Hukkanen et al., 2005]

Nikotyna jest, pod względem chemicznym, zbudowaną z pierścienia pirydynowego i piroolidynowego trzeciorzędową silnie zasadową aminą. W produktach naturalnych występuje w postaci dwóch stereoizomerów: aktywnego biologicznie [S], działającego na receptory cholinergiczne oraz izomeru powstającego w bardzo małych ilościach w wyniku racemizacji (palenia tytoniu) [R] [Yildiz, 2004].

Pod względem fizycznym nikotyna, w temperaturze pokojowej, jest płynną, oleistą substancją o brązowym zabarwieniu będącym efektem utleniania do kwasu nikotynowego oraz o ostrym zapachu, specyficznym dla tytoniu [Haustein, 2003]. Miesza się z wodą w równych ilościach. W rozpuszczalnikach organicznych wykazuje bardzo dużą rozpuszczalność. Dzięki tym właściwościom łatwa jest jej ekstrakcja z roztworów wodnych. Temperatura wrzenia wynosi 274,5°C [Yildiz, 2004].

3.2. Losy dymu tytoniowego w organizmie

3.2.1. Wchłanianie

Szybkość wchłaniania nikotyny jest zależna od produktu tytoniowego. Wchłanianie nikotyny odbywa się w jamie ustnej, przez skórę, pęcherzyki płucne, w przewodzie pokarmowym i zwrrotnie w pęcherzu moczowym. Szybkość wchłaniania nikotyny przez błony biologiczne jest uzależniona od kwasowości środowiska. Wraz ze wzrostem pH środowiska ilość nienaładowanej nikotyny wzrasta, natomiast z obniżeniem pH łączy się wzrost ilości nikotyny naładowanej. Nienaładowane zasady organiczne mają charakter lipidowy, czyli są rozpuszczalne w tłuszczach, natomiast naładowane zasady organiczne są hydrofilowe (dobrze rozpuszczalne w wodzie). Wynika z tego, że szybkość wchłaniania nikotyny przez błony biologiczne wzrasta wraz ze wzrostem pH roztworu wodnego, natomiast obniża się wraz z jego spadkiem [Yildiz, 2004].

Nikotyna jest absorbowana przez błonę śluzową jamy ustnej (głównie policzków) przede wszystkim w przypadku palaczy nie zaciągających się dymem tytoniowym, jednak ze względu na pH w jamie ustnej jest ona wchłaniana

w niewielkim stopniu, zależnym od długości czasu, w którym dym jest w niej utrzymywany [Yildiz, 2004]. W przypadku osób zaciągających się dymem zasadniczą drogą wchłaniania są pęcherzyki płucne. Ze względu na dużą ilość pęcherzyków i dużą powierzchnię z tego wynikającą, a także niewielką grubość bariery powietrze – krew wchłanianie zarówno fazy gazowej i parowej dymu tytoniowego zachodzi szybko i z dużą wydajnością. Ilość nikotyny zaabsorbowanej zależna jest również od stężenia nikotyny w dymie [Florek i Piekoszewski, 2006]. Z przewodu pokarmowego nikotyna wchłaniana jest w nieznacznym stopniu. W pęcherzu moczowym zachodzi natomiast absorpcja zwrotna nikotyny. Jest ona uzależniona od pH moczu. W przypadku obniżenia pH moczu poniżej 6,0 resorpcja jej zostaje całkowicie zahamowana [Yildiz, 2004].

3.2.2. Dystrybucja

Składniki dymu tytoniowego, w zależności od pojemności minutowej serca i przepływu narządowego krwi, są rozprowadzane po całym organizmie. Większość z nich w ciągu kilku minut dochodzi do serca, wątroby, mózgu i nerek oraz innych dobrze ukrwionych narządów na zasadzie dyfuzji biernej. Wysokie stężenie nikotyny obserwowane jest w krwi tętniczej, płucach i mózgu, niskie w tkankach mięśniowej i tłuszczowej, natomiast w zależności od pH jest obecna w żołądku, gruczołach ślinowych i pęcherzu moczowym. Po wypaleniu papierosa stężenie nikotyny w surowicy zwiększa się do 20-30 ng/ml, natomiast kotynina osiąga wartości w przedziale 250-300 ng/ml, a w ciągu następnych 10 minut, w wyniku dystrybucji do tkanek zmniejsza się jej ilość o połowę [Jauniaux, et al., 1999]. Podczas następnych 1-2 godzin następuje utlenienie w wątrobie do kotyniny i dalsze obniżenie stężenia [Benowitz, 1986; Florek i Piekoszewski, 2006]. Z porównania wartości stężeń w surowicy i moczu wynika, że są one około 5-6 razy wyższe w moczu niż w surowicy [Piekoszewski, Florek, 2001]. Ilość nikotyny zaabsorbowana w ciągu dnia, jako rezultat palenia papierosów zależna jest od liczby wypalonych papierosów, zawartości nikotyny w pojedynczym papierosie, ilości i głębokości zaciągnięć. W ciągu kilku godzin osoba uzależniona może osiągnąć poziom nikotyny w osoczu postrzegany, jako wystarczający na cały dzień.

3.2.3. Metabolizm

Główne szlaki powstawania poszczególnych metabolitów nikotyny podlegają zróżnicowaniu, a czynnikami na to wpływającymi jest płeć, wiek, uwarunkowania rasowe i etniczne, dieta, szybkość, z jaką są metabolizowane ksenobiotyki uwarunkowana osobniczo, a także intensywność ekspozycji na dym tytoniowy. U osób wolno metabolizujących ksenobiotyki przeważającym metabolitem jest trans -3-hydroksykotynina natomiast, u osób szybko metabolizujących – kotynina [Florek i Piekoszewski, 2006].

Nikotyna zawarta w dymie tytoniowym jest w 70-80% metabolizowana do kotyniny w wątrobie [Hukkanen et al., 2005]. Największa ilość enzymów metabolizujących składniki dymu tytoniowego obecna jest w wątrobie, pęcherzykach płucnych, jelicie cienkim, nerkach a także w łożysku [Florek, Marszałek, 1999; Florek, Piekoszewski, 2010]. W niewielkim stopniu jest metabolizowana w płucach, nerkach i mózgu [Benowitz, 1996; Benowitz and Jakobs , 2001; Florek i Piekoszewski, 2006].

Biotransformacja nikotyny obejmuje dwie fazy:

1. Fazę pierwszą – podczas której następuje przekształcenie substancji pierwotnej w bardziej polarne związki na drodze utleniania, redukcji i hydrolizy
2. Fazę drugą – prowadzącą do powstania nieaktywnych, przygotowanych do wydalenia związków, m.in. kwasów merkapturowych i tiocyjanianów, dzięki reakcjom sprzęgania z substancjami endogennymi (kwasem glukuronowym, siarkowym) na drodze metylacji, acetylacji, poprzez sprzęganie z aminokwasami czy glutationem.

Dym tytoniowy zawierający ok. 4300 związków chemicznych jest w organizmie metabolizowany przy udziale monooksygenaz, czyli systemu oksygenaz funkcji mieszanej. W mikrosomach następuje aktywacja metaboliczna, natomiast reakcje tam zachodzące mogą powodować inaktywację szkodliwych składników dymu tytoniowego na drodze reakcji utleniania składników dymu tytoniowego przy udziale monooksygenaz z grupy cytochromu P450. Głównym enzymem uczestniczącym

w metabolizmie nikotyny jest izoenzymem cytochromu P450 CYP2A6, który odpowiada za utlenianie nikotyny i kotyniny. Szybkość utleniania jest ściśle skorelowana z immunochemicznie określonym poziomem CYP2A6 w komórkach wątroby. Z tego wynika, że jego aktywność jest najwyższa w mikrosomach w wątrobie ludzkiej [Berkman, et al., 1995; Nakajima, et al., 1996]. Konkurencyjnym inhibitorem CYP2A6 jest kumaryna, dlatego w jej obecności utlenianie nikotyny i kotyniny zostaje zahamowane [Messina, et al., 1997; Le Gal, et al., 2003]. Również metoksalen będący inhibitorem CYP2A6 zmniejsza metabolizm nikotyny podanej doustnie oraz poziom trans -3'-hydroksykotyniny w moczu osób palących. Jest on bowiem aktywny w tworzeniu trans -3'-hydroksykotyniny oraz 5'-hydroksykotyniny, a także nornikotyny z kotyniny [Hukkanen, et al., 2005; Hecht, et al., 2000]. Wykazano niewielkie działanie izoenzymu CYP2E1 w metabolizowaniu nikotyny *in vitro*, szczególnie w obecności jej wysokich stężeń [Le Gal, et al., 2003]. Wskazano również aktywność w błonie śluzowej dróg oddechowych, głównie jamy nosowej izoenzymu CYP2A13 [Hukkanen, et al., 2005]. Izoenzym CYP2B6 uczestniczy w C-oksydacji nikotyny w tkankach wątroby. Autorzy innych badań pokazują również aktywność izoenzymu CYP2D6

Pierwszym etapem metabolizmu nikotyny jest jej przemiana do jonu iminowego, pozostającego w równowadze ilościowej z 5-hydroksynikotyną, a następnie przekształcenie go do kotyniny – głównego metabolitu na drodze C-oksydacji. Przemiany te rozpoczynają reakcje hydroksylacji i oksydacji pierścienia pirolidynowego, natomiast drugi etap przemiany zachodzi pod wpływem cytoplazmatycznej oksydazy aldehydowej. Raloksyfen, będący niekompetycyjnym inhibitorem oksydazy aldehydowej może powodować zahamowanie powstawania kotyniny. Za te reakcje odpowiedzialne są enzymy mikrosomalne z grupy cytochromu P-450 (izoenzym CYP2A6) [Hukkanen et al., 2005; Yildiz, 2004]. Pierścień pirolidynowy ulega stopniowej degradacji do kwasu 3-pirydynylooctowego. Kotynina wydalana jest z moczem w postaci niezmienionej jedynie w ok. 15% [Florek i Piekoszewski, 2006]. Pozostała kotynina ulega dalszym przemianom głównie do 3-hydroksykotyniny [Benowitz, 1996]. Szybkość metabolizmu nikotyny jest uwarunkowana szybkością w pierwszym jego etapie, dlatego osoby charakteryzujące się defektem C-oksydacji wykazują zwykle dłuższy czas biologicznego półtrwania nikotyny.

Okolo 4-7% nikotyny jest metabolizowane na drodze utleniania do N-tlenku nikotyny [Benowitz et al., 1994] przy udziale wątrobowych monooksygenaz

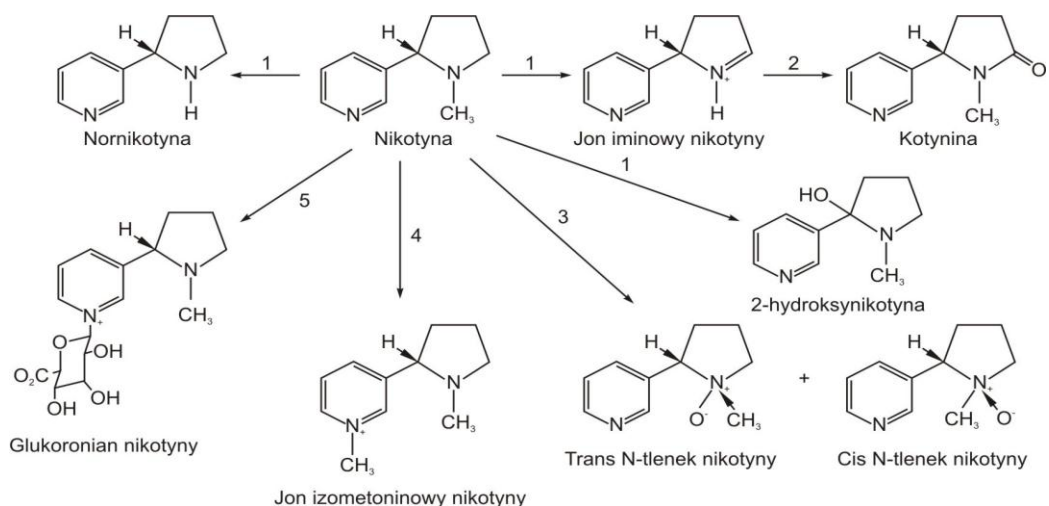
flawinowych (FMO3), selektywnie działających dla izomerów trans. Zawierają one flawinę, i są aktywne pomimo braku aktywności enzymów z grupy cytochromu P450 [Cashman, Zang, 2002]. Potwierdziły to badania dożylnego lub przezskórnego podania nikotyny oraz oznaczenie obecnego w moczu tylko formy trans N-tlenku nikotyny. N-tlenek nikotyny nie jest dalej metabolizowany, natomiast może być powrotnie redukowany do nikotyny [Yildiz, 2004; Hukkanen et al., 2005]. Ilość N-tlenku nikotyny jest redukowana w jelicie grubym człowieka przez bakterie tam bytujące. Tę hipotezę potwierdziły badania polegające na dożylnym podaniu substancji, która to całkowicie została wydalona z moczem w niezmienionej postaci. N-tlenek nikotyny podany doodbytniczo powoduje pojawienie się kotyniny w moczu, natomiast podany doustnie skutkuje obecnością w moczu zarówno kotyniny, jak i nikotyny [Hukkanen et al., 2005]. N-tlenek nikotyny jest wydalany z moczem w ilości 2-3% metabolitów wydalanych z moczem przez osoby palące.

Nornikotyna jest metabolitem nikotyny obecnym również w tej formie w liściach tytoniu, obserwowana jest bowiem zarówno u czynnych palaczy, jak i u osób stosujących nikotynę przezskórną [Benowitz et al., 1994; Hukkanen et al., 2005]. Powstaje na drodze N-demetylacji przy udziale cytochromu P450. Półproduktem jest jon iminowy. Również kotynina jest przekształcana do nornikotyny. Kotynina ma jednak zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg, jednak w tym miejscu nie ulega biotransformacji. Obecność nornikotyny w mózgu jest efektem metabolizmu mózgowej nornikotyny na drodze C-oksydacji [Crooks, et al., 1996]. Nornikotyna jest metabolizowana w wątrobie do 4-okso-4-(3-pirydylo)-butanoamidu, który pozostaje w stanie równowagi z 5'-hydroksykotyniną. W powstawaniu obu metabolitów uczestniczy izoenzym CYP2A6 z grupy cytochromu P450. 5-hydroksykotynina jest obecna w moczu palaczy w 1,2-1,6% ogólnej liczby metabolitów kotyniny [Hukkanen, et al., 2005].

Oprócz przemian nikotyny związanych z utlenianiem pierścienia piroolidinowego, nikotyna metabolizowana jest na drodze metylacji azotu pierścienia pirydynowego, przy udziale S-adenozylu-L-metioniny jako źródła grupy metylowej podczas reakcji. Katalizatorem tej reakcji jest amino-N-metylotransferaza wątrobowa, w wyniku czego powstaje jon izometoninowy. N-metylotransferaza aminowa aktywna jest szczególnie w tarczycy, nadnerczach i płucach również uczestniczy w przemianach nikotyny. Drugą drogą jest glukuronidyzacja. Przebiega ona w wątrobie i jest katalizowana przez

difosforan glukuronylotransferazy urydyny. Trans-3'-hydroksykotynina sprzęgana jest z kwasem glukuronowym w postaci O-glukuronidu. Procesy te zostały wykryte w wątrobie, jednak nie został ten metabolit oznaczony w moczu ze względu na małą jego stabilność lub zbyt niskie stężenie [Kuehl and Murphy, 2003]. Około 3-5% nikotyny jest konwertowane do glukuronidu nikotyny, a następnie wydalane z moczem [Seaton and Vessel, 1993]. Glukuronylotransferazy biorą udział w drugiej fazie biotransformacji nikotyny i kotyniny sprzęgając metabolity z kwasem glukuronowym [Hetch et al., 1999a; Nakajima, et al., 2002]. Koniugaty nikotyny i jej metabolitów z kwasem glukuronowym posiadają zwiększoną rozpuszczalność w wodzie [Byrd, et al., 1992].

Cytochrom P450 bierze również udział w hydroksylacji 2'-hydroksynikotyny, będącej półproduktem powstawania 4-metyloamino-1-(3-pirydylo)-1,2-butanonu [Hech, et al., 2000]. W kolejnych etapach powstaje kwas 4-okso-4-(3-pirydylo)butanowy oraz kwas 4-hydroksy-4-(3-pirydylo)butanowy. Około 10-15% nikotyny jest wydalana w tej postaci z moczem [Hecht et al., 1999a]. Po podaniu kotyniny mniej niż 0,5% podanej dawki wydalana jest z moczem, co potwierdza pochodzenie wymienianych metabolitów z przemian nikotyny [Hukkanen, et al., 2005]. 4-metyloamino-1-(3-pirydylo)-1,2-butanon może mieć znaczenie w przekształcaniu się w kancerogenne nitrozoaminy, jednak ta hipoteza nie została potwierdzona doświadczalnie [Hecht et al., 1999b]. Kwas 4-hydroksy-4-(3-pirydylo)butanowy jest w dalszych etapach metabolizowany do produktu ostatecznego, jakim jest kwas 3-pirydylooctowy, stanowiący końcowy produkt [McKennis et al., 1964]. Schemat metabolizmu nikotyny przedstawiono na rycinie 31.



Ryc. 31 Schemat metabolizmu nikotyny

Źródło: [Hukkanen et al., 2005; Tutka, 2005]

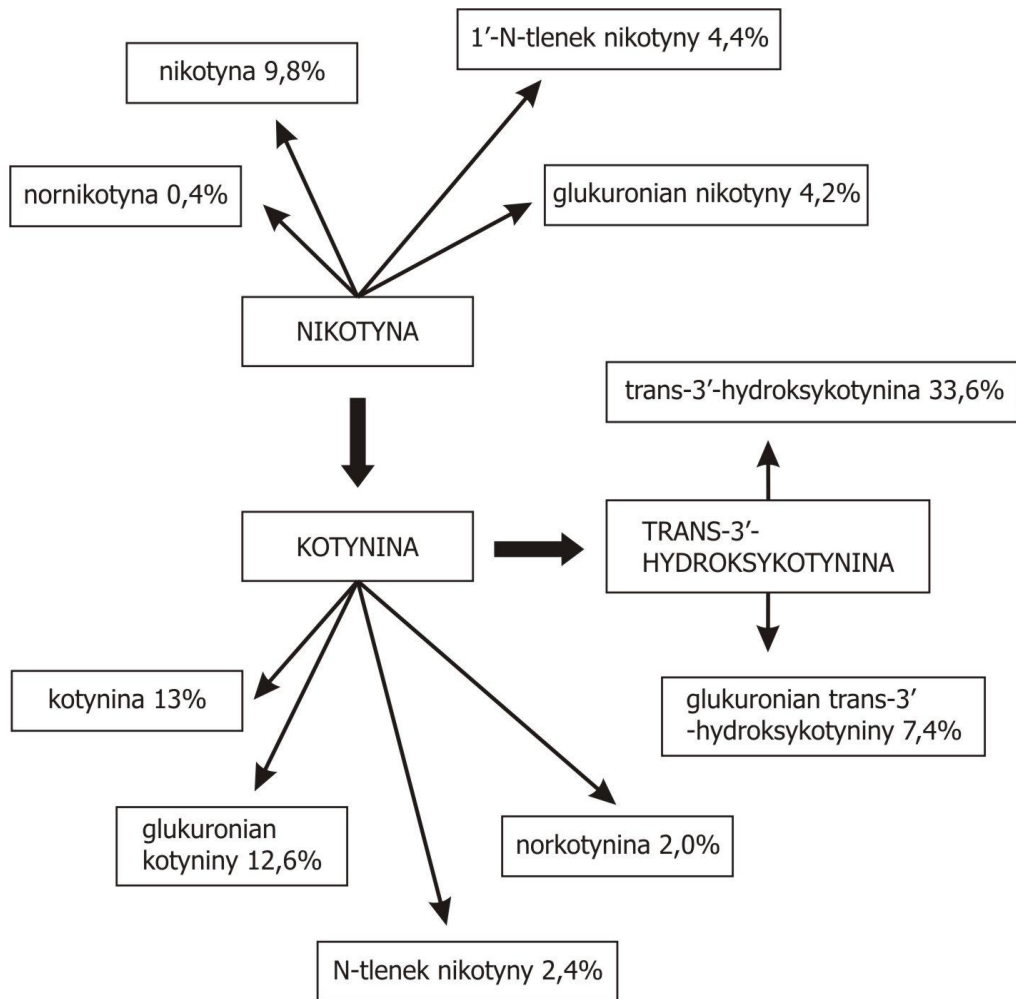
3.2.4. Wydalanie

Nikotyna jest wydalana z moczem (około 90% przyjętej dawki), kałem, zółcią, śliną, potem i przenika do mleka, a także jest kumulowana we włosach [Kintz et al., 1992; Benowitz, 1994; Al.-Delaimy, 2002; Yildiz, 2004]. Do mleka matek palących i biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego przenikają substancje toksyczne w formie rozpuszczonej i związanej z białkami osocza [Florek i Piekoszewski, 2006].

Przemianie do kotyniny ulega w organizmie ok. 70-80% dawki przyjętej nikotyny. Ok. 4-7% przyjętej dawki nikotyny jest wydalane w postaci N-tlenku nikotyny, a 3-5% w postaci glukuronidu [Benowitz, 1994; Hukkanen al., 2005]. W 10-15% kotynina przenika do moczu w postaci niezmienionej. Pozostała część jest metabolizowana w 33-40% do trans-3'-hydroksykotyniny, 12-17% do glukuronianu oraz 7-9% glukuronianu trans-3'-hydroksykotyniny [Hukkanen et al., 2005;].

Całkowity klirens nikotyny wynosi ok. 1200 ml/min. Kotynina jest metabolizowana wolniej, a jej klirens wynosi 45 ml/min., natomiast w przypadku trans-3'-hydroksykotyniny wynosi 82 ml/min. [Benowitz, 2003; Dempsey, et al., 2004].

Procentowy udział poszczególnych wydalanych metabolitów z przyjętej dawki nikotyny przedstawiono na rycinie 32.



Ryc. 32 Procentowy udział poszczególnych metabolitów nikotyny w wydalaniu przyjętej dawki

Źródło: [Florek et al., 2007]

Wykazano, że sekrecja nikotyny i jej metabolitów jest zależna od szybkości konsumpcji nikotyny, kwasu askorbinowego, który wzmacnia jej działanie, a także od pH moczu [Becket, et al., 1965; Dawson, 1999; Yildiz, 2004].

IV. CEL PRACY

Palenie tytoniu jest ważnym, dominującym czynnikiem sprawczym zaburzeń rozrodu, przebiegu ciąży, a także wpływu na potomstwo. Aktualne doniesienia wskazują na negatywny wpływ dymu tytoniowego na gametogenezę, owulację, transport jajowodowy, zapłodnienie, zagnieżdżenie się zapłodnionej komórki jajowej i tworzenie łożyska. Obserwuje się obniżoną produkcję 17β -estradiolu w wyniku inaktywacji aromatazy przez alkaloidy dymu tytoniowego. Zauważa się efekt obniżenia ekspresji genu kodującego receptory dla hormonu folikulotropowego (FSH) oraz zmniejszenie ilości wytwarzanej folikulotropiny w komórkach ziarnistych. W wyniku interakcji pomiędzy nikotyną a wazopresyną dochodzi do obkurczenia naczyń osłonki tkalnej i zmniejszenia biodostępności gonadotropin dla środowiska wewnętrznego gonadotropin. W wyniku takich zmian następuje obniżenie wydzielania hormonu lutropowego (LH). Alkaloidy dymu tytoniowego wpływają cytotoksycznie na komórki ziarniste ciała żółtego, przez co następuje zahamowanie wydzielania progesteronu. Palenie tytoniu wpływa negatywnie na cykl miesięczkowy powodując zaburzenia w jego cykliczności.

Opracowane dotychczas wnioski oparte są na fragmentarycznych badaniach zajmujących się zazwyczaj jedną fazą cyklu lub nawet pojedynczym hormonem. Brak jest kompleksowej oceny poziomu hormonów w poszczególnych fazach cyklu, w szczególności w odniesieniu do kobiet palących tytoń.

Celem pracy była ocena wpływu dymu tytoniowego na cykl miesięczkowy kobiet palących i biernie narażonych poprzez wykonanie w surowicy krwi oznaczeń poziomów hormonów płciowych – folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu i progesteronu w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego.

W pracy wyznaczono stężenia kotyniny – biomarkera ekspozycji na dym w surowicy krwi pacjentek wszystkich grup badanych, łącznie z niepalącymi, celem weryfikacji deklaracji kobiet dotyczących statusu palenia tytoniu.

V. METODYKA BADAŃ

5.1. Metodyka oznaczania metabolitu nikotyny – kotyniny – walidacja metody

Kotyninę oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową (HPLC) z użyciem norefedryny, jako wzorca wewnętrznego. Analiza chromatograficzna została poprzedzona ekstrakcją badanego związku z surowicy badanych pacjentek z wykorzystaniem techniki ciecz – ciecz.

5.1.1. Przygotowanie materiału

Materiał biologiczny pobrano od pacjentek w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego za pomocą zestawów aspiracyjno – próżniowych zgodnie z wymaganiami producenta systemów do pobierania krwi. Surowicę po odwirowaniu jednokrotnie zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C. Próbki z widocznym zmętnieniem, widocznymi strontami po odmrożeniu podlegały ponownemu wirowaniu.

5.1.2. Przygotowanie wzorca wewnętrznego

Wzorzec wewnętrzny przygotowano przez rozcieńczenie roztworu norefedryny o stężeniu 1mg/ml metanolem do uzyskania stężenia 10 µg/ml.

5.1.3. Parametry walidacyjne

Przed rozpoczęciem badań dokonano walidacji metody wyznaczając granice wykrywalności, granicę oznaczalności, liniowość i powtarzalność w ciągu dnia oraz pomiędzy dniami.

5.1.4. Ustalenie czasów retencji

W celu wyznaczenia czasu retencji dla kotyniny i norefedryny przygotowano roztwory tych związków w fazie ruchomej w stężeniu 1 µg/ml. Przygotowany w ten sposób roztwór wzorcowy wprowadzono na kolumnę chromatograficzną i oznaczono w warunkach podanych poniżej.

Czasy retencji wynosiły:

- norefedryna jako wzorzec wewnętrzny 3,1 min.
- kotynina 5,5 min.

5.1.5. Granica wykrywalności LOD i granica oznaczalności LOQ

Granice wykrywalności i oznaczalności wyznaczono dla różnych stężeń kotyniny w surowicy. Za granicę wykrywalności (LOD) przyjęto wartość stosunku sygnału do szumu $S/N = 5$.

Za granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto najmniejsze stężenie analitu możliwe do wykrycia i oznaczenia na akceptowalnym poziomie precyzji i poprawności = 15 ng/ml.

Dla kotyniny wartości LOD i LOQ przedstawiono w tabeli 6.

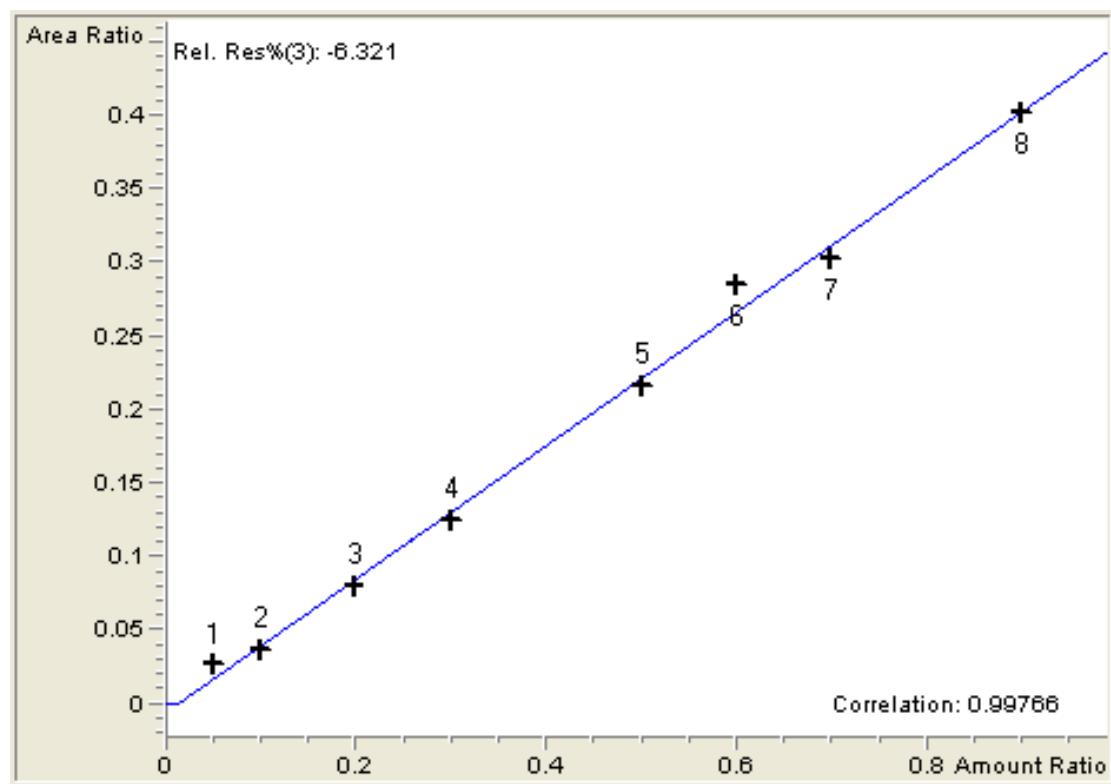
Tab. 6 Granica wykrywalności i oznaczalności kotyniny

Parametr	Kotynina
Granica wykrywalności LOD [ng/ml]	5
Granica oznaczalności LOQ [ng/ml]	15

5.1.6. Liniowość

Zakres liniowości metody oznaczono z zastosowaniem serii wzorców z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Wzorzec wewnętrzny przygotowano przez rozcieńczenie roztworu norefedryny o stężeniu 1mg/ml metanolem do uzyskania stężenia 10 µg/ml. Roztwory kalibracyjne sporządzono przez dodanie do surowicy odpowiedniej ilości substancji wzorcowych. Wartości stężeń roztworów kalibracyjnych wynosiły: 25, 50, 100, 150, 250, 300, 350 i 450 ng/ml.

Krzywą kalibracyjną, przedstawiającą zależność stosunku pola powierzchni pików chromatograficznego analitu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego od stężenia kotyniny opisano równaniem $y = ax+b$. Krzywą kalibracyjną dla kotyniny przedstawiono na rycinie 33.



Ryc. 33 Krzywa kalibracyjna dla kotyniny

5.1.7. Powtarzalność metody

Powtarzalność metody badano dla dwóch stężeń kotyniny, analizując próby w trzy elementowej serii. Badano próby surowicy z dodatkiem wzorca w danym dniu i w różnych dniach. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Tab. 7 Powtarzalność oznaczania kotyniny w surowicy w danym dniu i pomiędzy dniami

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

5.2. Metodyka oznaczania metabolitu nikotyny – kotyniny

5.2.1. Oznaczenie i zasada testu - przygotowanie próbki – ekstrakcja kotyniny z surowicy techniką ciecz – ciecz.

5.2.1.1. Aparatura i sprzęt

Do przygotowania próbek surowicy użyto następującej aparatury i sprzętu:

- Blok grzewczy TB-951U JWElectronic
- Wirówka MPW 220 (Mechanika Precyzyjna)
- Wytrząsarka Vortex TH-3S (Techno Certel).

5.2.1.2. Tok ekstrakcji

Ekstrakcję prowadzono w 15 ml probówkach typu Falcon:

- 1 ml surowicy doprowadzono do pH=8 przy użyciu 0,1 mol/l roztworu wodorotlenku sodowego
- Dodano 50 µl roztworu norefedryny
- Dodano 5 ml mieszaniny dichlorometan–n-propanol w stosunku 9:1
- Probówkę wytrząsano przez 15 minut
- Próby wirowano przez 15 minut przy 5000 obr./min.
- Pobrano 4 ml warstwy dichlorometan: n-propanol i przeniesiono do szklanych fiolek o pojemności 7 ml
- Ekstrakt z dodatkiem 100 µl 0,035 mol/l kwasu chlorowodorowego w metanolu, odparowano w strumieniu sprężonego powietrza w temperaturze 40°C
- Suchą pozostałość rozpuszczona została w 150 µl fazy ruchomej.

5.2.2. Analiza metodą HPLC

5.2.2.1. Aparatura i sprzęt

- chromatograf cieczowy HPLC Agilent 1200 RR
- detektor diodowy - Diode Array Detector
- kolumna do HPLC RP-Select B, 105 mm x 4,6 mm, 5 µm (Merck)

Faza ruchoma:

Roztwór A – 9,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 ml tri etyloaminy rozpuszczono w 1 litrze wody – pH=4,1 ustalone przy użyciu kwasu ortofosforowego

Roztwór B – acetonitryl

5.2.2.2. Warunki pracy chromatografu HPLC

- Do rozdziału substancji zastosowano kolumnę i prekolumnę do HPLC RP-Select B, 105 mm x 4,6 mm, 5 µm firmy Merck
- W czasie pracy chromatografu przepływ fazy ruchomej był stały i wynosił 1 ml/min.
- Rozdział chromatograficzny prowadzono w warunkach gradientowych. Przebieg gradientu przedstawiono w tabeli 8.

Tab. 8 Przebieg gradientu fazy ruchomej podczas analizy kotyniny

Czas [min.]	% roztworu B
0	8
3	10
7	10
8	8
10	8

Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl, przed każdym nastrzykiem igła była przemywana fazą ruchomą, szybkość pobierania próbki i nastrzyku wynosiła 200 µl/min.

Na chromatografie uzyskano następujące czasy retencji oznaczanych substancji:

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

5.3. Metodyka oznaczania hormonu folikulotropowego za pomocą testu Elecsys FSH

Hormon folikulotropowy oznaczano za pomocą metody elektrochemiluminescencji „ECLIA” na analizatorze Cobas e 601 z zastosowaniem zestawu do ilościowego oznaczania *in vitro* stężenia FSH surowicy ludzkiej.

Metoda Elecsys FSH wykorzystuje przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu FSH. Reakcje krzyżowe z LH, TSH, hCG, hGH i hPL są nieistotne.

5.3.1. Przygotowanie materiału

Materiał biologiczny pobrano od pacjentek w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego za pomocą zestawów aspiracyjno – próżniowych zgodnie z wymaganiami producenta systemów do pobierania krwi. Surowicę po odwirowaniu jednokrotnie zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C. Próbkę z widocznym zmętnieniem, widocznymi strontami po odmrożeniu podlegały ponownemu wirowaniu. Przed oznaczeniem surowicę, kalibratory i surowice kontrolne doprowadzono do temperatury 20-25°C. Oznaczenie po tym procesie zostało dokonane na analizatorze w ciągu 2h.

5.3.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe

Oznaczenia wykonano na analizatorze Cobas e 601 firmy Roche Diagnostics. Do analizatorów typu MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 stosowano następujące, specyficzne akcesoria:

- FSH CalSet II, do sporządzenia 4 x 1 ml
- PreciControl Universal, do sporządzenia 2 x 3 ml PreciControl Universal 1 i 2
- ProCell M - 2 x 2 l bufor systemowy
- CleanCell M - 2 x 2 l płyn płuczący
- PC/CC- Cups, 12 pojemników do wstępnego podgrzania ProCell M i CleanCell M przed użyciem
- ProbeWash M - 12 x 70 ml roztwór myjący do płukania podczas finalizacji i zmiany odczytnika
- PreClean M, 5 x 600 ml płyn myjący mieszaninę reakcyjną przed detekcją
- AssayCups/AssayTips Combimagazine M – 48 x 84 naczynka reakcyjne/końcówki, torby na zużyte materiały
- Wasteliner, torby na zużyte materiały

- SysClean Adapter M.

Akcesoria do wszystkich analizatorów:

- Elecsys SysClean - 5 x 100 ml płyn czyszczący.

5.3.3. Odczynniki - roztwory robocze

Do oznaczeń stosowano dwa rodzaje roztworów:

M – mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w objętości 6,5 ml, a także konserwant, który stanowiły mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w stężeniu 0,72 mg/ml

R1 – przeciwciała przeciwko FSH znakowane biotyną w objętości 10 ml, a także konserwant, w skład którego wchodziły biotynylowane monoklonalne przeciwciała przeciwko anty-FSH w stężeniu 0,5 mg/l; bufor MES 50 mmol/l; pH 6,0; konserwant

R2 – przeciwciała anty-FSH znakowane kompleksem rutenu Ru (bpy_3^{2+}), a także monoklonalne przeciwciała (mysie) anty-FSH znakowane kompleksem rutenu 0,8 mg/l, bufor MES 50 mmol/l, pH 6,0; konserwant.

Odczynniki, które stanowiły całość gotową do użycia przechowywano w temperaturze 2-8°C. Wszystkie dane niezbędne do przeprowadzenia oznaczenia zapisano w postaci kodu kreskowego odpowiednio dla danego odczynnika.

Stabilność zestawów wynosiła:

- Zamknięte, przechowywane w temperaturze 2-8°C – do ustalonej przez producenta daty ważności odczynnika
- Po otwarciu odczynnika w temperaturze 2-8°C – do 12 tygodni
- Na pokładzie analizatora – do 8 tygodni.

5.3.4. Kalibracja metody

Metoda standaryzowana była wobec Enzymun – Test FSH. Enzymun – Test FSH standaryzowany był wobec 2nd IRP WHO Referene Standard 78/ 549. Wzorcowa krzywa kalibracyjna była dostosowywana do danego analizatora przy użyciu Elecsys FSH CalSet II. Wszystkie dane kalibracyjne dla danej serii odczynników umieszczonych w każdym zestawie zapisano w postaci kodu kreskowego. Każdorazowo kalibrację była przeprowadzano dla nowej serii odczynnika w ciągu 24h od umieszczenia go na pokładzie analizatora. W przypadku stosowania tej samej serii odczynnika ponowną kalibrację była stosowano po upływie 1 miesiąca (28 dniach). W przypadku stosowania na analizatorze tego samego zestawu odczynnikowego ponowną kalibrację wykonywano była po 7 dniach. Ponowną kalibrację stosowano również w przypadku odchyień tj. np., gdy wyniki kontroli jakości wykaczały poza ustalone zakresy [Thienpont et al. 1988].

5.3.5. Kontrola jakości metody

Do przeprowadzania kontroli jakości stosowane były odczynniki kontrolne dostarczone przez producenta analizatora Elecsys PreciControl Universal 1 i 2. Kontrole dla różnych zakresów stężeń przeprowadzano równolegle do próbek badanych, co najmniej w odstępach 24 – godzinnych, raz dla danego zestawu kalibracyjnego, a także po każdej serii odczynnika. Częstotliwość i zakres kontroli dostosowano do wymogów laboratorium. Uzyskane wartości mieściły się w granicach odchylenia 2S. W przypadku odchyień poza dopuszczalne zakresy stosowane były wdrożone procedury naprawcze.

5.3.6. Granice i zakresy pomiarowe

Zakres pomiarowy dla metody wyznaczony był przez dolną granicę wykrywalności oraz najwyższy punkt krzywej wzorcowej i wynosił 0,100 – 200 mIU/ml. Wartości poniżej dolnej granicy wykrywalności podawane były, jako <100 mIU/ml.

Za dolną granicę wykrywalności (czułość analityczna) przyjęto najniższe mierzalne stężenie oznaczanej substancji, które można odróżnić od zera, obliczane jako wartość powyżej dwóch odchyłeń standardowych najniższego wzorca (kalibrator wzorcowy, wzorzec 1 + 2 OS, badanie powtarzalności, n = 21).

Wartości powyżej zakresu pomiarowego podawano jako > 200 mIU/ml.

5.3.7. Precyzja

Precyzję określono w oparciu o odczynniki Elecsys, zlewkowaną surowicę ludzką oraz próbki kontrolne zgodnie z modyfikowanym protokołem Clinical and Laboratory Standards Institute.

5.3.8. Oznaczenie i zasada testu

W celu optymalnego dokonania oznaczenia należy stosować się do zaleceń producenta analizatora. Odczynniki wymagane do oznaczeń, po wyjęciu z lodówki doprowadzane do temperatury 20° – 25° C, umieszczano w rotorze odczynnikowym analizatora unikając tworzenia piany. Analizator automatycznie kontrolował temperaturę odczynników na pokładzie, ich otwieranie i zamykanie.

Całkowity czas wykonania oznaczenia przez analizator wynosił 18 min. Podczas 1 inkubacji antygen próbki (40 µl) tworzył kompleks immunologiczny typu sandwich z biotynylowanymi monoklonalnymi przeciwciałami swoistymi dla FSH oraz monoklonalnymi przeciwciałami swoistymi dla FSH znakowanymi kompleksem rutenu. Podczas 2 inkubacji po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną kompleks wiązał się z fazą stałą dzięki powinowactwu biotyny i streptawidyny. Następnie mieszanina reakcyjna przenoszona była do komory pomiarowej, w której mikrocząsteczki przyciągane były do powierzchni elektrody za pomocą magnesu. Niezwiązane substancje usuwane były za pomocą buforu ProCell. Napięcie przyłożone

do elektrody indukowało reakcję chemiluminescencji i emisję fotonu, mierzoną za pomocą fotopowielacza.

Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla analizatora w oparciu o kalibrację dwupunktową oraz krzywą wzorcową zawartą w kodzie kreskowym odczytnika.

5.4. Metodyka oznaczania hormonu luteinizującego za pomocą testu Elecsys LH

Hormon luteinizujący oznaczano za pomocą metody elektrochemiluminescencji „ECLIA” na analizatorze Cobas e 601 z zastosowaniem zestawu do ilościowego oznaczania *in vitro* stężenia LH w surowicy ludzkiej lub osoczu.

W metodzie Elecsys LH wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu LH. Dwa swoiste biotynylowane przeciwciała wykrywają epitopy składające się z dwóch podjednostek, podczas gdy przeciwciała znakowane kompleksem rutenu wykrywają epitop podjednostki β . Dzięki temu test Elecsys LH wykazuje jedynie nieznaczne reakcje krzyżowe z FSH, TSH, hCG, hGH i hPL.

5.4.1. Przygotowanie materiału

Materiał biologiczny pobrano od pacjentek w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego za pomocą zestawów aspiracyjno – próżniowych zgodnie z wymaganiami producenta systemów do pobierania krwi. Surowicę po odwirowaniu jednokrotnie zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C . Próbkę z widocznym zmętnieniem, widocznymi strontami po odmrożeniu podlegały ponownemu wirowaniu. Przed oznaczeniem surowicę, kalibratory i surowice kontrolne doprowadzono do temperatury $20-25^{\circ}\text{C}$. Oznaczenia po tym procesie dokonano na analizatorze w ciągu 2h.

5.4.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe

Oznaczenia wykonano na analizatorze Cobas e 601 firmy Roche Diagnostics. Do analizatorów typu MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 stosowano następujące, specyficzne akcesoria:

- LH CalSet II, do sporządzenia 4 x 1 ml
- PreciControl Universal, do sporządzenia 2 x 3 ml PreciControl Universal 1 i 2
- ProCell M - 2 x 2 l bufor systemowy
- CleanCell M - 2 x 2 l płyn płuczący
- PC/CC- Cups, 12 pojemników do wstępnego podgrzania ProCell M i CleanCell M przed użyciem
- ProbeWash M - 12 x 70 ml roztwór myjący do płukania podczas finalizacji i zmiany odczynnika
- AssayCups/AssayTips Combimagazine M - 48 x 84 naczynka reakcyjne/końcówki, torby na zużyte materiały
- Wasteliner, torby na zużyte materiały
- SysClean Adapter M.

Akcesoria do wszystkich analizatorów:

- Elecsys SysClean - 5 x 100 ml płyn czyszczący.

5.4.3. Odczynniki - roztwory robocze

Do oznaczeń stosowano dwa rodzaje roztworów:

M – mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w objętości 6,5 ml, a także konserwant, który stanowiły mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w stężeniu 0,72 mg/ml

R1 – przeciwciała przeciwko LH znakowane biotyną w objętości 10 ml, a także konserwant, w skład którego wchodziły biotynylowane monoklonalne przeciwciała przeciwko anty-LH w stężeniu 2 mg/l; bufor TRIS 50 mmol/l; pH 8,0; konserwant

R2 – przeciwciała anty-LH znakowane kompleksem rutenu Ru (bpy_3^{2+}), a także monoklonalne przeciwciała (mysie) anty-LH znakowane kompleksem rutenu 0,3 mg/l, bufor TRIS 50 mmol/l, pH 8,0; konserwant.

Odczynniki, które stanowiły całość gotową do użycia przechowywano w temperaturze 2-8°C. Wszystkie dane niezbędne do przeprowadzenia oznaczenia zapisano w postaci kodu kreskowego odpowiednio dla danego odczynnika.

Stabilność zestawów wynosiła:

- Zamknięte, przechowywane w temperaturze 2-8°C – do ustalonej przez producenta daty ważności odczynnika
- Po otwarciu odczynnika w temperaturze 2-8°C – do 12 tygodni
- Na pokładzie analizatora – do 8 tygodni.

5.4.4. Kalibracja metody

Metoda standaryzowana była wobec drugiego standardu międzynarodowego (NIBSC) 80/552. Wzorcową krzywą kalibracyjną dostosowywano do danego analizatora przy użyciu Elecsys LH CalSet II. Wszystkie dane kalibracyjne dla danej serii odczynników umieszczonych w każdym zestawie zapisano w postaci kodu kreskowego. Każdorazowo kalibrację przeprowadzano dla nowej serii odczynnika w ciągu 24h od umieszczenia go na pokładzie analizatora. W przypadku stosowania tej samej serii odczynnika ponowną kalibrację stosowano po upływie 1 miesiąca (28 dniach). W przypadku stosowania na analizatorze tego samego zestawu odczynnikowego ponowną kalibrację wykonywano po 7 dniach. Ponowną kalibrację stosowano również w przypadku odchyień tj. np., gdy wyniki kontroli jakości wykroczyły poza ustalone zakresy [Thienpont et al.1988].

5.4.5. Kontrola jakości metody

Do przeprowadzania kontroli jakości stosowano odczynniki kontrolne dostarczone przez producenta analizatora Elecsys PreciControl Universal 1 i 2. Kontrole dla różnych zakresów stężeń przeprowadzono równolegle do próbek badanych, co najmniej w odstępach 24 – godzinnych, raz dla danego zestawu kalibracyjnego, a także po każdej serii odczynnika. Częstotliwość i zakres kontroli dostosowano do wymogów laboratorium. Uzyskane wartości mieściły się w granicach, jakich odchylenia 2S. W przypadku odchyień poza dopuszczalne zakresy stosowane były wdrożone procedury naprawcze.

5.4.6. Granice i zakresy pomiarowe

Zakres pomiarowy dla metody wyznaczony był przez dolną granicę wykrywalności oraz najwyższy punkt krzywej wzorcowej i wynosił 0,100 – 200 mIU/ml. Wartości poniżej dolnej granicy wykrywalności podawane były jako <0,095 nmol/l lub < 0,100 mIU/ml.

Za dolną granicę wykrywalności (czułość analityczna) przyjmowano najniższe mierzalne stężenie oznaczanej substancji, które można odróżnić od zera, obliczane, jako wartość powyżej dwóch odchyień standardowych najniższego wzorca (kalibrator wzorcowy, wzorzec 1 + 2 OS, badanie powtarzalności, n = 21).

Wartości powyżej dolnej granicy wykrywalności podawano jako < 0,100 mIU/ml. Wartości powyżej zakresu pomiarowego podawano jako > 200 mIU/ml.

5.4.7. Precyzja

Precyzję określono w oparciu o odczynniki Elecsys, zlewkowaną surowicę ludzką oraz próbki kontrolne zgodnie z modyfikowanym protokołem Clinical and Laboratory Standards Institute.

5.4.8. Oznaczenie i zasada testu

W celu optymalnego dokonania oznaczenia stosowano się do zaleceń producenta analizatora. Odczynniki wymagane do oznaczeń, po wyjęciu z lodówki doprowadzono do temperatury 20° – 25° C, umieszczano w rotorze odczynnikowym analizatora unikając tworzenia piany. Analizator automatycznie kontrolował temperaturę odczynników na pokładzie, ich otwieranie i zamykanie.

Całkowity czas wykonania oznaczenia przez analizator wynosił 18 min. Podczas 1 inkubacji antygen próbki (20 µl) tworzył kompleks immunologiczny typu sandwich z biotynylowanymi monoklonalnymi przeciwciałami przeciw LH oraz monoklonalnymi przeciwciałami przeciw LH znakowanymi kompleksem rutenu. Podczas 2 inkubacji po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną kompleks wiązał się z fazą stałą dzięki powinowactwu biotyny i streptawidyną. Następnie mieszanina reakcyjne przenoszona była do komory pomiarowej, w której mikrocząsteczki przyciągane były do powierzchni elektrody za pomocą magnesu. Niezwiązane substancje usuwane były za pomocą buforu ProCell. Napięcie przyłożone do elektrody indukowało reakcją chemiluminescencji i emisję fotonu, mierzoną za pomocą fotopowielacza.

Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla analizatora w oparciu o kalibrację dwupunktową oraz krzywą wzorcową zawartą w kodzie kreskowym odczynnika.

5.5. Metodyka oznaczania 17- β estradiolu za pomocą testu Elecsys Estradiol II

17 β -estradiol oznaczano za pomocą metody elektrochemiluminescencji „ECLIA” na analizatorze Cobas e 601 z zastosowaniem zestawu do ilościowego oznaczania *in vitro* 17 β -estradiolu w surowicy ludzkiej. Metoda ta jest metodą kompetycyjną stosującą swoiste przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko 17 β -estradiolowi. Uwolniono z próbki przez mesterolon endogenny estradiol współzawodniczy z dodaną, znakowaną kompleksem rutenu, pochodną estradiolu o miejsca wiązania na biotynyłowanym przeciwciele.

5.5.1. Przygotowanie materiału

Materiał biologiczny pobrano od pacjentek w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego za pomocą zestawów aspiracyjno – próżniowych zgodnie z wymaganiami producenta systemów do pobierania krwi. Surowica po odwirowaniu została jednokrotnie zamrożona i przechowywana w temperaturze -70°C. Próbkę z widocznym zmętnieniem, widocznymi strontami po odmrożeniu ponownie wirowano. Przed oznaczeniem surowica, kalibratory i surowice kontrolne doprowadzono do temperatury 20-25°C. Oznaczenia po tym procesie dokonano na analizatorze w ciągu 2h.

5.5.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe

Oznaczenia wykonano na analizatorze Cobas e 601 firmy Roche Diagnostics.

Do analizatorów typu MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 stosowano następujące, specyficzne akcesoria:

- Estradiol II CalSet II, do sporządzenia 4 x 1 ml

- PreciControl Universal do sporządzenia 2 x 3 ml z PreciControl Universal1 i 2 lub
- PreciControl Universal, do sporządzenia 2 x 3 ml z PreciControl Universal 1 i 2
- PreciControl Universal, do sporządzenia 2 x 3 ml PreciControl Universal 1 i 2
- ProCell M - 2 x 2 l bufor systemowy
- CleanCell M - 2 x 2 l płyn płuczący
- 12 pojemników do wstępnego podgrzania ProCell M i CleanCell M przed użyciem
- ProbeWash M - 12 x 70 ml roztwór myjący do płukania podczas finalizacji i zmiany odczynnika
- PreClean M - 5 x 600 ml płyn myjący mieszaninę reakcyjną przed detekcją
- AssayCups/AssayTips Combimagazine M - 48 x 84 naczynka reakcyjne/końcówki, torby na zużyte materiały
- Wasteliner, torby na zużyte materiały
- SysClean Adapter M.

Akcesoria do wszystkich analizatorów:

- Elecsys SysClean - 5 x 100 ml płyn czyszczący
- Elecsys SysClean - 5 x 100 ml płyn czyszczący.

5.5.3. Odczynniki - roztwory robocze

Do oznaczeń stosowano dwa rodzaje roztworów:

M – mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w objętości 6,4 ml, a także konserwant, który stanowiły mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w stężeniu 0,72 mg/ml

R1 – przeciwciała przeciwko estradiolowi znakowane biotyną w objętości 8 ml, a także konserwant, w skład którego wchodziły biotynyłowane poliklonalne przeciwciała przeciwko estradiolowi w stężeniu 45 ng/ml: mesterolone 130 ng/ml, bufor MES 50 nmol/l o pH 6,0

R2 – pochodna estradiolu znakowana kompleksem rutenu Ru (bpy_3^{2+}), a także konserwant, w skład którego wchodziła pochodna estradiolu znakowana kompleksem rutenu w stężeniu 2,75 ng/ml oraz bufor MES 50 nmol/l o pH 6,0

Odczynniki stanowiły całość gotową do użycia, przechowywano w temperaturze 2-8°C. Wszystkie dane niezbędne do przeprowadzenia oznaczenia zapisano w postaci kodu kreskowego odpowiednio dla danego odczynnika.

Stabilność zestawów wynosiła:

- Zamknięte, przechowywane w temperaturze 2-8°C – do ustalonej przez producenta daty ważności odczynnika
- Po otwarciu odczynnika w temperaturze 2-8°C – do 12 tygodni
- Na pokładzie analizatora – do 8 tygodni.

5.5.4. Kalibracja metody

Metodę standaryzowano wobec ID – GC/MS (chromatografia gazowa z izotopowym rozcieńczeniem/ spektrofotometria masowa). Wzorcową krzywą kalibracyjną dostosowywano do danego analizatora przy użyciu Elecsys Estradiol II CalSet II. Wszystkie dane kalibracyjne dla danej serii odczynników umieszczonych w każdym zestawie zapisano w postaci kodu kreskowego. Każdorazowo kalibrację przeprowadzano dla nowej serii odczynnika w ciągu 24h od umieszczenia go na pokładzie analizatora. W przypadku stosowania tej samej serii odczynnika ponowną kalibrację stosowano po upływie 1 miesiąca (28 dniach). W przypadku stosowania na analizatorze tego samego zestawu odczynnikowego ponowną kalibrację wykonywano po 7 dniach. Ponowną kalibrację stosowano również w przypadku odchyień tj. np., gdy wyniki kontroli jakości wykraczały poza ustalone zakresy [Thienpont et al. 1988].

5.5.5. Kontrola jakości metody

Do przeprowadzania kontroli jakości stosowano odczynniki kontrolne dostarczone przez producenta analizatora Elecsys PreciControl Universal 1 i 2. Kontrole dla różnych zakresów stężeń przeprowadzano równolegle do próbek badanych, co najmniej w odstępach 24 – godzinnych, raz dla danego zestawu kalibracyjnego, a także po każdej serii odczynnika. Częstotliwość i zakres kontroli dostosowano do wymogów laboratorium. Uzyskane wartości mieściły się w granicach odchylenia 2S. W przypadku odchyień poza dopuszczalne zakresy stosowano wdrożone procedury naprawcze.

5.5.6. Granice i zakresy pomiarowe

Zakres pomiarowy dla metody wyznaczony był przez dolną granicę wykrywalności oraz najwyższy punkt krzywej wzorcowej i wynosił 18,4 – 15781 pmol/l. Wartości poniżej dolnej granicy wykrywalności podawane były jako <18,4 pmol/l lub < 5,00 pg/ml po zastosowaniu przelicznika (analizator automatycznie dokonywał obliczeń stężenia badanej substancji w materiale biologicznym w jednostkach pmol/l; pg/ml; ng/l lub dodatkowo nmol/l zgodnie ze współczynnikiem przeliczeniowym:

$$\text{pmol/l} \times 0,273 = \text{pg/ml}$$

$$\text{pg/ml} \times 3,67 = \text{pmol/l}.$$

Za dolną granicę wykrywalności (czułość analityczna) przyjęto najniższe stężenie substancji, które można odróżnić od zera, obliczane jako wartość powyżej dwóch odchyień standardowych najniższego wzorca (kalibrator wzorcowy, wzorzec 1 + 2 OS, badanie powtarzalności, n = 21).

Wartości powyżej zakresu pomiarowego podano jako > 15781 pmol/l lub >4300 pg/ml.

Czułość funkcjonalna, czyli najniższe stężenie oznaczanej substancji, mierzone w powtórnych oznaczeniach ze współczynnikiem zmienności precyzji pośredniej pomiędzy seriami $\leq 20\%$ wynosiło 44 pmol/L (12pg/ml).

5.5.7. Precyzja

Precyzję określono w oparciu o odczynniki Elecsys, zlewkową surowicę ludzką oraz próbki kontrolne zgodnie z modyfikowanym protokołem Clinical and Laboratory Standards Institute.

5.5.8. Oznaczenie i zasada testu

W celu optymalnego dokonania oznaczenia zastosowano się do zaleceń producenta analizatora. Odczynniki wymagane do oznaczeń, po wyjęciu z lodówki doprowadzano do temperatury 20°C i umieszczano w rotorze odczynnikowym analizatora unikając tworzenia piany. Analizator automatycznie kontrolował temperaturę odczynników na pokładzie, ich otwieranie i zamykanie.

Całkowity czas wykonania oznaczenia przez analizator wynosił 18 min. Podczas 1 inkubacji antygen próbki (35 μ l) tworzył kompleks immunologiczny ze swoistym dla estradiolu biotynylowanym przeciwciałem. Ilość powstałego kompleksu zależna była od stężenia oznaczanej substancji w próbce. Podczas 2 inkubacji cały kompleks wiązał się z fazą stałą dzięki reakcji biotyny ze streptawidyną. Po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną i pochodnej estradiolu znakowanej kompleksem rutenu. Dotychczas wolne miejsca biotynylowanych przeciwciał były zajmowane z utworzeniem kompleksu przeciwciało – haptenu. Następnie mieszanina reakcyjna przenoszona była do komory pomiarowej, gdzie mikrocząsteczki przyciągane były do powierzchni elektrody za pomocą magnesu, a następnie niezwiązane substancje usuwane były za pomocą buforu ProCell. Napięcie przyłożone do elektrody indukowało reakcję chemiluminescencji i emisję fotonu mierzoną za pomocą fotopowielacza. Wyniki odczytywano za pomocą krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla danego analizatora w oparciu o kalibrację 2 – punktową oraz krzywą wzorcową zawartą w kodzie kreskowym odczynnika [Lichtenberg et al. 1992].

5.6. Metodyka oznaczania progesteronu za pomocą testu Elecsys Progestrone II

Progesteron oznaczano za pomocą metody elektrochemiluminescencji „ECLIA” na analizatorze Cobas e 601 z zastosowaniem zestawu do ilościowego oznaczania *in vitro* stężenia progesteronu surowicy ludzkiej. Metoda ta jest metodą kompetycyjną.

5.6.1. Przygotowanie materiału

Materiał biologiczny pobrano od pacjentek w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego za pomocą zestawów aspiracyjno – próżniowych zgodnie z wymaganiami producenta systemów do pobierania krwi. Surowicę po odwirowaniu jednokrotnie zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C. Próbkę z widocznym zmętnieniem, widocznymi strontami po odmrożeniu podlegały ponownemu wirowaniu. Przed oznaczeniem surowicę, kalibratory i surowice kontrolne doprowadzono do temperatury 20-25°C. Oznaczenia po tym procesie dokonano na analizatorze w ciągu 2h.

5.6.2. Aparatura i akcesoria dodatkowe

Oznaczenia wykonano na analizatorze Cobas e 601 firmy Roche Diagnostics. Do analizatorów typu MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 stosowano następujące, specyficzne akcesoria:

- Progesterone II CalSet II, do sporządzenia 4 x 1 ml
- PreciControl Universal, do sporządzenia 2 x 3 ml PreciControl Universal 1 i 2
- Elecsys Diluent Estradiol/Progesteron, 2 x 22ml rozcieńczalnika próbek
- ProCell M - 2 x 2 l bufor systemowy
- CleanCell M - 2 x 2 l płyn płuczący

- 12 pojemników do wstępnego podgrzania ProCell M i CleanCell M przed użyciem
- ProbeWash M - 12 x 70 ml roztwór myjący do płukania podczas finalizacji i zmiany odczynnika
- PreClean M - 5 x 600 ml płyn myjący mieszaninę reakcyjną przed detekcją
- AssayCups/AssayTips Combimagazine M - 48 x 84 naczynka reakcyjne/końcówki, torby na zużyte materiały
- Wasteliner, torby na zużyte materiały
- SysClean Adapter M.

Akcesoria do wszystkich analizatorów:

Elecsys SysClean - 5 x 100 ml płyn czyszczący.

5.6.3. Odczynniki - roztwory robocze

Do oznaczeń stosowano dwa rodzaje roztworów:

M – mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w objętości 6,5 ml, a także konserwant, który stanowią mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną w stężeniu 0,72 mg/ml

R1 – przeciwciała przeciwko progesteronowi znakowane biotyną w objętości 10 ml, a także konserwant, w skład którego wchodzi biotynylowane monoklonalne przeciwciała przeciwko progesteronowi w stężeniu 15 mg/l: bufor fosforanowy 25 mmol/l; pH 7,0; konserwant

R2 – pochodna progesteronu znakowana kompleksem rutenu Ru (bpy_3^{2+}), a także konserwant, w skład którego wchodzi progesteron pochodzenia roślinnego połączony z syntetycznym peptydem znakowanym kompleksem rutenu w stężeniu 10 ng/ml oraz bufor fosforanowy 25 mmol/l o pH 7,0.

Odczynniki stanowiły całość gotową do użycia, były przechowywane w temperaturze 2-8°C. Wszystkie dane niezbędne do przeprowadzenia oznaczenia zapisano w postaci kodu kreskowego odpowiednio dla danego odczynnika.

Stabilność zestawów wynosiła:

- Zamknięte, przechowywane w temperaturze 2-8°C – do ustalonej przez producenta daty ważności odczynnika
- Po otwarciu odczynnika w temperaturze 2-8°C – do 12 tygodni
- Na pokładzie analizatora – do 8 tygodni.

5.6.4. Kalibracja metody

Metodę standaryzowano wobec ID – GC/MS (chromatografia gazowa z izotopowym rozcieńczeniem/ spektrofotometria masowa). Wzorcową krzywą kalibracyjną dostosowywano do danego analizatora przy użyciu Elecsys Progesterone II CalSet II. Wszystkie dane kalibracyjne dla danej serii odczynników umieszczonych w każdym zestawie zapisano w postaci kodu kreskowego. Każdorazowo kalibrację przeprowadzano dla nowej serii odczynnika w ciągu 24h od umieszczenia go na pokładzie analizatora. W przypadku stosowania tej samej serii odczynnika ponowną kalibrację była stosowano po upływie 1 miesiąca (28 dniach). W przypadku stosowania na analizatorze tego samego zestawu odczynnikowego ponowną kalibrację wykonywano po 7 dniach. Ponowną kalibrację stosowano również w przypadku odchyień tj. np., gdy wyniki kontroli jakości wykaczały poza ustalone zakresy [Thienpont et al.1988].

5.6.5. Kontrola jakości metody

Do przeprowadzania kontroli jakości stosowane były odczynniki kontrolne dostarczone przez producenta analizatora Elecsys PreciControl Universal 1 i 2. Kontrole dla różnych zakresów stężeń były przeprowadzane równolegle do próbek badanych, co najmniej w odstępach 24 – godzinnych, raz dla danego zestawu kalibracyjnego, a także po każdej serii odczynnika. Częstotliwość i zakres kontroli była dostosowana do wymogów laboratorium. Uzyskane wartości mieściły się w granicach odchylenia 2S. W przypadku odchyień poza dopuszczalne zakresy stosowano wdrożone procedury naprawcze.

5.6.6. Granice i zakresy pomiarowe

Zakres pomiarowy dla metody wyznaczony był przez dolną granicę wykrywalności oraz najwyższy punkt krzywej wzorcowej i wynosił 0,095 – 191 nmol/l. Wartości poniżej dolnej granicy wykrywalności podawane były jako <0,095 nmol/l lub < 0,030 ng/ml po zastosowaniu przelicznika (analizator automatycznie dokonywał obliczeń stężenia badanej substancji w materiale biologicznym w jednostkach pmol/l; pg/ml; ng/l lub dodatkowo nmol/l zgodnie z współczynnikiem przeliczeniowym:

$$\text{nmol/l} \times 0,314 = \text{ng/ml}$$

$$\text{ng/ml} \times 3,18 = \text{nmol/l}.$$

Za dolną granicę wykrywalności (czułość analityczna) przyjęto najniższe stężenie substancji, które można było odróżnić od zera, obliczane jako wartość powyżej dwóch odchyłeń standardowych najniższego wzorca (kalibrator wzorcowy, wzorzec 1 + 2 OS, badanie powtarzalności, n = 21).

Wartości powyżej dolnej granicy wykrywalności podano jako > 191 nmol/l lub >60,0 ng/ml.

Czułość funkcjonalna, czyli najniższe stężenie oznaczanej substancji, mierzone w powtórnych oznaczeniach ze współczynnikiem zmienności precyzji pośredniej pomiędzy seriami $\leq 20\%$ wynosiło 48 nmol/L (12 pg/ml).

5.6.7. Precyzja

Precyzję określono w oparciu o odczynniki Elecsys, zlewkową surowicę ludzką oraz próbki kontrolne zgodnie z modyfikowanym protokołem Clinical and Laboratory Standards Institute.

5.6.8. Oznaczenie i zasada testu

W celu optymalnego dokonania oznaczenia zastosowano się do zaleceń producenta analizatora. Odczynniki wymagane do oznaczeń, po wyjęciu z lodówki doprowadzano do temperatury 20° – 25° C, umieszczano w rotorze odczynnikowym analizatora unikając tworzenia piany. Analizator automatycznie kontrolował temperaturę odczynników na pokładzie, ich otwieranie i zamykanie.

Całkowity czas wykonania oznaczenia przez analizator wynosił 18 min. Podczas 1 inkubacji 30 µl próbki inkubowane było z danazolem w celu uwolnienia progesteronu. Inkubacja zachodziła w obecności biotynylowanego monoklonalnego przeciwciała swoistego dla progesteronu oraz jego pochodnej znakowanej kompleksem rutenu. Progesteron w próbce konkurował ze znakowaną pochodną progesteronu o miejsca wiązania na przeciwciele. Podczas 2 inkubacji po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną kompleks wiązał się z fazą stałą dzięki powinowactwu biotyny i streptawidyny. Ilość znakowanej pochodnej progesteronu związanej z fazą stałą była odwrotnie proporcjonalna do zawartości progesteronu w próbce. Mieszanina reakcyjna przenoszono do komory pomiarowej, gdzie mikrocząsteczki przyciągane były do powierzchni elektrody za pomocą magnesu. Niezwiązane substancje usuwane były za pomocą buforu. Napięcie przyłożone do elektrody indukowało reakcję chemiluminescencji i emisję fotonu, która była mierzona przy pomocy fotopowielacza. Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla analizatora w oparciu o kalibrację 2-punktową oraz krzywą wzorcową zawartą w kodzie kreskowym odczynnika.

5.7. Analiza statystyczna wyników

Informacje zawarte w kwestionariuszu ankiety, po uprzednim zakodowaniu poddano analizie statystycznej. Parametry wyrażone w skali nominalnej, takie jak: czas ekspozycji na działanie dymu tytoniowego, ilość wypalanych dziennie papierosów, wiek, masa ciała, wzrost, posiadanie dzieci, rok ostatniego porodu, palenie podczas ciąży, przebyte poronienia, przyczyna poronienia, planowanie ciąży, czas, kiedy

planowana jest ciąża, stosowanie leków, resekcja tarczycy, rok, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka, zaburzenia cyklu miesięczkowego obecnie i w przeszłości oraz długość cyklu miesięczkowego opisano licznosciami w poszczególnych kategoriach i odpowiadającymi im wartościami procentowymi.

Parametry takie jak: stężenie kotyniny w surowicy krwi badanych pacjentek, poziomy hormonów folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu i progesteronu opisano średnią arytmetyczną, medianą, wartościami minimalną i maksymalną, dolnym i górnym kwartylem oraz odchyleniem standardowym. Sprawdzono zgodności ww. parametrów z rozkładem normalnym. Ze względu na zaobserwowany brak normalności rozkładu zastosowano analizę wariancji ANOVA z testem Friedmana w celu porównania zmian w czasie dla poszczególnych hormonów. W przypadku wyników istotnych statystycznie dokonano ich sprawdzenia testem wielokrotnych porównań Dunna.

Analizy porównawczej poziomu hormonów folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu, progesteronu oraz poziomu kotyniny w surowicy krwi względem palenia papierosów dokonano (ze względu na brak normalności rozkładu) nieparametrycznym testem Kruskala – Wallisa.

Ze względu na brak normalności rozkładu analizy zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poszczególnymi hormonami dokonano przy zastosowaniu współczynnika korelacji rangowej R_s Spearmana.

VI. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

6.1. Dane demograficzne, status płodności i rozrodczości

W badaniach wzięło udział 156 pacjentek w wieku rozrodczym, które zgłosiły się do Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pacjentki nie stosowały hormonalnych środków antykoncepcyjnych.

Kobiety zostały podzielone na trzy grupy w zależności od stopnia narażenia na działanie dymu tytoniowego. Wyróżnione grupy to pacjentki niepalące i nienarażone na działanie dymu tytoniowego, kobiety biernie palące oraz palące tytoń.

Na wstępie każdą pacjentkę poproszono o wypełnienie ankiety, w której zawarto pytania dotyczące statusu socjoekonomicznego, stanu zdrowia, narażenia na działanie dymu tytoniowego, a także obserwacji przebiegu cyklu miesięczkowego.

Od każdej respondentki pobierano krew, w której dokonano oznaczeń poziomu hormonu folikulotropowego (FSH), lutropowego (LH), 17 β -estradiolu i progesteronu oraz kotyniny – głównego metabolitu nikotyny. Materiał biologiczny pobierano w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego. Krew odwirowano w celu uzyskania surowicy krwi. Poddano ją jednokrotnemu zamrożeniu w temperaturze -70°C, do momentu wykonania oznaczeń.

6.1.1. Grupa pacjentek niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego

Grupę pacjentek niepalących obejmowały 42 kobiety, co stanowi 26,92% badanej populacji.

W grupie pacjentek niepalących 25 osób było w zakresie wiekowym 20-29 lat, co stanowiło 59,52% populacji, 15 - w wieku 30-39 lat (35,72%) oraz jedna w wieku powyżej 40-tego roku życia (2,38% populacji). Jedna pacjentka nie podała wieku. Zestawienie wieku respondowanych kobiet przedstawiono w tabeli 9.

Tab. 9 Rozkład respodowanych pacjentek niepalących względem wieku

Wiek pacjentek [rok życia]	Odsetek [%]
20-29	59,52
30-39	35,72
>40	2,38
brak danych	2,38

Wśród pacjentek niepalących wyróżniono 4 kobiety o masie ciała w przedziale 40-49 kg, co stanowiło 9,52% badanej populacji. W przedziale 50-59 kg było 13 pacjentek (30,95%), w zakresie 60-69 kg - 17 pacjentek (14,48%). W populacji pacjentek o masie ciała 70-79 kg wyróżniono 6 kobiet (14,29%). Tylko 1 pacjentka deklarowała masę ciała powyżej 80 kg. Stanowiło to 2,38% badanej populacji uczestniczek niepalących. Również jedna pacjentka nie podała w ankiecie swojej masy ciała (tabela 10).

Tab. 10 Masa ciała pacjentek niepalących

Masa ciała pacjentek [kg]	Odsetek [%]
40-49	9,52
50-59	30,95
60-69	40,48
70-79	14,29
80-89	2,38
brak danych	2,38

W badanej populacji kobiet 7 osób miało wzrost w przedziale 1,50-1,59 m (16,67%). W zakresie 1,60-1,69 m - 18 osób (42,86%). Respondentek mających wzrost w przedziale 1,70-1,79 m było 16 (38,09%). Jedna pacjentka nie podała wzrostu (2,38%). Powyższe dane przedstawiono w tabeli 11.

Tab. 11 Rozkład wzrostu respondowanych pacjentek niepalących

Wzrost pacjentek [m]	Odsetek [%]
1,50-1,59	16,67
1,60-1,69	42,86
1,70-1,79	38,09
brak danych	2,38

W zależności od statusu posiadanych dzieci 11 kobiet zadeklarowało przebyty poród, (26,19%), 30 - nie posiadało dziecka (71,43%), natomiast jedna osoba nie podała informacji (2,38%) (tabela 12).

Tab. 12 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących względem posiadania dzieci

Posiadanie dziecka	Odsetek [%]
tak	26,19
nie	71,43
brak danych	2,38

Kobiety niepalące biorące udział w badaniach rodziły w latach 1995-2006.

W odniesieniu do informacji o przebyłym poronieniu 6 z ankietowanych pacjentek niepalących poroniły (14,29%), 36 kobiet nie dotyczył ten problem (80,95%). Dwie kobiety tj. 4,76% nie odpowiedziały na zadane pytanie. Zestawienie powyższych danych zaprezentowano w tabeli 13.

Tab. 13 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących z zależności od przebytych poronień

Przebyte poronienia	Odsetek [%]
tak	14,29
nie	80,95
brak danych	4,76

Z sześciu pacjentek niepalących, które poroniły tylko jedna (16,67%) знаła przyczynę poronienia (tabela 14).

Tab. 14 Zestawienie danych nt znajomości przyczyn przebytego poronienia przez pacjentki niepalące

Przyczyna poronienia	Odsetek [%]
znana	16,67
nieznana	83,33

Pacjentki biorące udział w badaniach, będąc w wieku rozrodczym zostały zapytane o planowanie ciąży. W chwili badania ciążę planowało 12 kobiet (44,44%), 6 pacjentek planowało ciążę w okresie kilku najbliższych lat (29,63%). Ośmiu kobiet planuje ciążę, jednak nie potrafiło odpowiedzieć na pytanie, kiedy to ma nastąpić (29,63%). Jedna pacjentka nie odpowiedziała na zadane pytanie. Zestawienie powyższych danych zaprezentowano w tabeli 15.

Tab. 15 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących względem terminu planowania ciąży

Planowanie ciąży	Odsetek [%]
obecnie	44,44
czas określony, odległy	22,23
czas nieokreślony	29,63
brak danych	3,7

W grupie pacjentek niepalących żadna z osób badanych nie stosowała hormonalnych środków antykoncepcyjnych.

Wśród badanych kobiet 5 pacjentek stosowało na stałe leki (11,91%), pozostałe 36 osób (85,71%) nie były poddane żadnej terapii. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 16.

Tab. 16 Procentowe dane dotyczące stałego stosowania leków w populacji pacjentek niepalących

Stale stosowanie leków	Odsetek [%]
tak	11,91
nie	85,71
brak danych	2,38

Wśród pacjentek niepalących biorących udział w badaniu żadna nie przeżyła resekcji tarczycy.

Pacjentki biorące udział w badaniu wykazywały znaczną rozpiętość wieku, w którym wystąpiła u nich pierwsza miesiączka. W 10 roku życia wystąpiła ona u 3 badanych (7,15%), w 11 roku życia wystąpiła u jednej pacjentki (2,38%), u siedmiu osób (16,67%) pojawiła się w 12 roku życia, a w wieku 13 lat rozpoczęło miesiączkować 12 kobiet (28,57%). W 14 roku życia rozpoczęło miesiączkować 11 ankietowanych (26,19%). Jako piętnastolatki miesiączkowały 4 respondentki (9,52%). W 16, 17 i 18 roku życia miesiączkowały odpowiednio po 1 pacjentce (2,38%). Zestawienie przedstawiono w tabeli 17.

Tab. 17 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących względem wieku, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka

Wiek, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka [rok życia]	Odsetek [%]
10	7,15
11	2,38
12	16,67
13	28,57
14	26,19
15	9,52
16	2,38
17	2,38
18	2,38
brak danych	2,38

U respondowanych 15 kobiet wystąpiły wcześniej zaburzenia cyklu miesięczkowego (35,71%). U pozostałych pacjentek nie zaobserwowano jego zaburzeń. Zestawienie zaprezentowano w tabeli 18.

Tab. 18 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących względem wcześniej występujących zaburzeń miesięczkowania

Wcześniej występujące zaburzenia cyklu miesięczkowego	Odsetek [%]
tak	35,71
nie	61,91
brak danych	2,38

Przyczyny wcześniej występujących zaburzeń miesięczkowania dotyczyły nieregularności cyklu w przypadku 13 kobiet, co stanowiło 86,66% populacji kobiet niepalących, u których takie zaburzenia deklarowano. W jednym przypadku znana była przyczyna zmian długości cyklu miesięczkowego (choroba ogólna) i jeden przypadek dotyczył wtórnego zaniku miesiączki. Dane zaprezentowano w tabeli 19.

Tab. 19 Rozkład respondowanych pacjentek niepalących względem przyczyn występowania zaburzeń cyklu miesięczkowego

Przyczyny występowania zaburzeń cyklu miesięczkowego	Odsetek [%]
nieregularność	40
zmiany długości	46,66
zdiagnozowana choroba	6,67
wtórny zanik	6,67

Aktualnie 3 pacjentki niepalące podały, że występują u nich zaburzenia długości cyklu miesięczkowego, co stanowiło 7,14% ogólnej liczby respondentek. Pozostałe (z wyjątkiem jednej kobiety, która nie podała informacji) opisało swój cykl miesięczkowy jako regularny. Zestawienie przedstawiono w tabeli 20.

Tab. 20 Rozkład aktualnie występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego wśród pacjentek niepalących

Aktualnie występujące zaburzenia cyklu miesięczkowego	Odsetek [%]
tak	7,14
nie	90,48
brak danych	2,38

Długość cyklu miesięczkowego niepalących uczestniczek badania stanowiła również czynnik zmienny. Pięć z kobiet podało, że aktualnie długość cyklu miesięczkowego nie przekracza 28 dni (11,90%). Cykl miesięczkowy o długości 28-29 dni występował u 20 osób (47,62%), natomiast tylko u 13 pacjentek (30,96%) cykl miesięczkowy trwał dłużej niż 30 dni. Dwie z respondowanych kobiet (4,76%) podały długość krwawienia miesięcznego jako długość trwania cyklu. Również dwie osoby (4,76%) nie zaprezentowały czasookresu trwania cyklu miesięczkowego. Zestawienie przedstawiono w tabeli 21.

Tab. 21 Długości trwania cyklu miesięczkowego w grupie kobiet niepalących

Długość cyklu miesięczkowego	Odsetek [%]
błędnie podane dane	4,76
<28	11,9
28-29	47,62
>30	30,96
brak danych	4,76

6.1.2. Pacjentki biernie narażone na działanie dymu tytoniowego w środowisku (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)

Grupę pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego stanowiło 49 osób - 31,41% ogólnej liczby kobiet biorących udział w badaniu.

W grupie pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego 43 były w zakresie wieku 20-29 lat, co stanowiło 87,76% populacji, 3 - w wieku 30-39 lat (6,12%) oraz dwie w wieku powyżej 40 roku życia (4,08%). Jedna pacjentka zadeklarowała wiek poniżej 20 roku życia. Zestawienie wieku respondowanych kobiet przedstawiono w tabeli 22.

Tab. 22 Rozkład pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego względem wieku

Wiek pacjentek [rok życia]	Odsetek [%]
<20	2,04
20-29	87,76
30-39	6,12
>40	4,08

Wśród pacjentek biernie narażonych na działanie dymu wyróżniono dwie kobiety o masie ciał w przedziale 40-49 kg, co stanowiło 4,08% badanej respondowanych. W przedziale 50-59 kg było 16 kobiet (32,65%), w zakresie 60-69 kg - 19 respondowanych (38,78%). W populacji kobiet o masie ciała 70-79 kg wyróżniono 8 osób (16,63%). Tylko 4 pacjentki deklaryowały masę ciała powyżej 80 kg. Stanowiło to 8,16% badanej populacji uczestniczek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 23.

Tab. 23 Masa ciała kobiet biernie narażonych na ETS

Masa pacjentek [kg]	Odsetek [%]
40-49	4,08
50-59	32,65
60-69	38,78
70-79	16,33
80-89	8,16

W badanej populacji kobiet dwie z nich miały wzrost w przedziale 1,50-1,59 m (4,09%). W zakresie 1,60-1,69 m – było 31 osób (63,26%). Respondentek mających wzrost w przedziale 1,70-1,79 m było 5 (30,61%). Jedna pacjentka nie podała wzrostu (2,04%) (tabela 24).

Tab. 24 Rozkład wzrostu respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS

Wzrost pacjentek [m]	Odsetek [%]
1,50-1,59	4,09
1,60-1,69	63,26
1,70-1,79	30,61
brak danych	2,04

W zależności od statusu posiadanych dzieci 6 kobiet zadeklarowało przebyty poród, (6,12%), 46 - nie posiadało dziecka (93,88%). Zestawienie powyższych danych przedstawiono w tabeli 25.

Tab. 25 Posiadanie dziecka przez pacjentki biernie narażone na ETS

Posiadanie dziecka	Odsetek [%]
tak	6,12
nie	93,88

Kobiety biernie narażone na działanie dymu tytoniowego biorące udział w badaniach rodziły w latach 2003-2007.

W odniesieniu do informacji o przebytych poronieniach, jedna z ankietowanych pacjentek biernie narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego poroniła (2,04%), 46 kobiet nie dotyczył ten problem (93,88%). Dwie kobiety tj. 4,08% nie odpowiedziały na zadane pytanie. Dane zestawiono w tabeli 26.

Tab. 26 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS względem przebytych poronień

Przebyte poronienia	Odsetek [%]
tak	2,04
nie	93,88
brak danych	4,08

Pacjentka, która jako jedyna poroniła w grupie biernie narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego знаła przyczynę poronienia.

Pacjentki biorące udział w badaniach, będąc w wieku rozrodczym zostały zapytane o planowanie ciąży. W chwili badania planowało ciążę 5 kobiet (16,13%), 22 pacjentki planowało ciążę w okresie kilku najbliższych lat (70,97%). Dwie kobiety planują ciążę, jednak nie potrafiły odpowiedzieć na pytanie, kiedy to ma nastąpić (6,45%). Dwie pacjentki nie odpowiedziały na zadane pytanie. Zestawienie danych zaprezentowano w tabeli 27.

Tab. 27 Planowanie ciąży przez pacjentki biernie narażone na działanie ETS

Planowanie ciąży	Odsetek [%]
obecnie	16,13
czas określony, odległy	70,97
czas nieokreślony	6,45
brak danych	6,45

W grupie pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego żadna nie stosowała hormonalnych środków antykoncepcyjnych w czasie badań. Jedna z kobiet poinformowała o wcześniejszym stosowaniu terapii hormonalnej, lecz zapewniła o zaprzestaniu ponad 3 lata przed rozpoczęciem badań.

Wśród badanych kobiet 6 pacjentek stosowało na stałe leki (12,24%), pozostałe 43 osoby (87,76%) nie były poddane żadnej terapii (tabela 28).

Tab. 28 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażone na ETS względem stałego stosowania leków

Stale stosowanie leków	Odsetek [%]
tak	12,24
nie	87,76

Wśród pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego biorących udział w badaniu 2 przebyły resekcją tarczycy, co stanowi 4,08%, natomiast pozostałe 47 nie. Pacjentki po przebytej resekcji tarczycy deklarowały stałe przyjmowanie hormonalnej terapii zastępczej i wyrównane poziomy hormonów tropowych.

Kobiety biorące udział w badaniu wykazywały znaczną rozpiętość wieku, w którym wystąpiła u nich pierwsza miesiączka. W 10 roku życia wystąpiła ona u dwóch (4,08%), w 11 roku życia wystąpiła u 3 pacjentek (6,12%), u 11 osób (22,45%) pojawiła się w 12 roku życia, a w wieku 13 lat rozpoczęło miesiączkować 17 pacjentek (34,69%). W 14 roku życia rozpoczęło miesiączkować 9 kobiet (18,38%). Jako piętnastolatki miesiączkowała 6 respondowanych (12,24%). W 16 roku życia miesiączkowała jedna osoba (2,04%). Zestawienie przedstawiono w tabeli 29.

Tab. 29 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS względem wieku, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka

Wiek, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka [rok życia]	Odsetek [%]
10	4,08
11	6,12
12	22,45
13	34,69
14	18,38
15	12,24
16	2,04

U respondowanych 12 kobiet wystąpiły wcześniej zaburzenia cyklu miesiączkowego (24,49%). U pozostałych pacjentek nie zaobserwowano zaburzeń cyklu miesiączkowego. Zestawienie przedstawiono w tabeli 30.

Tab. 30 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażone na ETS względem wcześniej występujących zaburzeń miesiączkowania

Wcześniej występujące zaburzenia cyklu miesiączkowego	Odsetek [%]
tak	24,49
nie	75,51

Przyczyny wcześniej występujących zaburzeń miesiączkowania dotyczyły nieregularności cyklu w przypadku 11 kobiet, co stanowiło 83,34% populacji kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego, u których takie zaburzenia deklarowano. W jednym przypadku znana była przyczyna zmian długości cyklu

miesiączkowego (choroba ogólna) i jeden przypadek dotyczył wtórnego zaniku miesiączki. Zestawienie przedstawiono w tabeli 31.

Tab. 31 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS względem przyczyn występowania zaburzeń cyklu miesiączkowego

Przyczyny występowania zaburzeń cyklu miesiączkowego	Odsetek [%]
nieregularność	50,00
zmiany długości	33,34
zdiagnozowana choroba	8,33
wtórny zanik	8,33

Aktualnie 6 pacjentek biernie inhalujących tytoń podało, że występują u nich zaburzenia długości cyklu miesiączkowego, co stanowiło 12,24% ogólnej liczby respondowanych. Pozostałe opisały swój cykl miesiączkowy jako regularny. Zestawienie zaprezentowano w tabeli 32.

Tab. 32 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS względem aktualnie występujących zaburzeń cyklu miesiączkowego

Aktualnie występujące zaburzenia cyklu miesiączkowego	Odsetek [%]
tak	12,24
nie	87,76

Długość cyklu miesiączkowego biernie narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego uczestniczek badania stanowiła również czynnik zmienny. Szesnaście z kobiet podało, że aktualnie długość cyklu miesiączkowego nie przekracza 28 dni (32,65%). Cykl miesiączkowy o długości 28-29 dni występował u 18 osób (36,74%), natomiast tylko u 15 pacjentek (30,61%) cykl miesiączkowy trwał dłużej niż 30 dni. Zestawienie przedstawiono w tabeli 33.

Tab. 33 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na ETS względem długości trwania cyklu miesięczkowego

Długość trwania cyklu miesięczkowego [dni]	Odsetek [%]
<28	32,65
28-29	36,74
>30	30,61

6.1.3. Pacjentki palące tytoń

Grupę pacjentek palących tytoń stanowiły 62 kobiety - 40,35% ogólnej liczby badanych.

W grupie osób palących tytoń 39 osób było w zakresie wiekowym 20-29 lat co stanowiło 61,90% populacji, 18 - w wieku 30-39 lat (28,57%) oraz jedna w wieku poniżej 20 roku życia (1,59% populacji). Jedna pacjentka nie podała wieku (tabela 34).

Tab. 34 Rozkład pacjentek palących tytoń względem wieku

Wiek pacjentek [rok życia]	Odsetek [%]
>20	1,59
20-29	61,9
30-39	28,57
brak danych	7,94

Wśród pacjentek palących tytoń wyróżniono 5 kobiet o masie ciała w przedziale 40-49 kg, co stanowiło 7,94% badanej populacji. W przedziale 50-59 kg było 27 pacjentek (42,86%), w zakresie 60-69 kg - 19 osób (30,17%). W populacji pacjentek o masie ciała 70-79 kg wyróżniono 6 kobiet (9,52%). Tylko dwie pacjentki deklarowały masę ciała w zakresie 80 - 89 kg. Stanowiło to 3,17% badanych. U dwóch kobiet masa ciała wynosiła powyżej 90 kg (3,17%) (tabela 35).

Tab. 35 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem posiadanej masy ciała

Masa ciała pacjentek [kg]	Odsetek [%]
40-49	7,94
50-59	42,86
60-69	30,17
70-79	9,52
80-89	3,17
>90	3,17
brak danych	3,17

W badanej populacji kobiet 2 osoby miały wzrost w przedziale 1,50-1,59 m (3,17%). W zakresie 1,60-1,69 m - 18 osób (42,86%). Respondentek mających wzrost w przedziale 1,70-1,79 m było 42 (66,67%). Kobiety o wzroście w zakresie 1,70-1,79 m było 13 (20,64%). Cztery z kobiet było wyższych aniżeli 1,80 m (6,35%). Dwie pacjentki nie podały wzrostu (3,17%) (tabela 36).

Tab. 36 Wzrost respondowanych pacjentek palących tytoń

Wzrost pacjentek [m]	Odsetek [%]
1,50-1,59	3,17
1,60-1,69	66,67
1,70-1,79	20,64
>1,80	6,35
brak danych	3,17

W zależności od statusu posiadanych dzieci 14 kobiet zadeklarowało przebyty poród, (22,22%), 46 - nie posiadało dziecka (73,02%). Trzy kobiety nie podały informacji na temat statusu posiadanych dzieci. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 37.

Tab. 37 Posiadanie dzieci w grupie kobiet palących tytoń

Posiadanie dziecka	Odsetek [%]
tak	22,22
nie	73,02
brak danych	4,76

Kobiety palące tytoń, biorące udział w badaniach rodziły w latach 1995-2008.

W odniesieniu do informacji o przebytych poronieniach dwie z ankietowanych pacjentek palących tytoń poroniły (3,17%), 53 kobiety nie dotyczył ten problem (84,13%). Osiem osób tj. 12,70% nie odpowiedziało na zadane pytanie (tabela 38).

Tab. 38 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem przebytych poronień

Przebyte poronienia	Odsetek [%]
tak	3,17
nie	84,13
brak danych	12,70

Jedna pacjentka, która poroniła w grupie palących tytoń знаła przyczynę poronienia.

Tab. 39 Znajomości przyczyny poronienia w grupie kobiet palących tytoń

Przyczyna poronienia	Odsetek [%]
znana	50,00
nieznana	50,00

Pacjentki biorące udział w badaniach, będąc w wieku rozrodczym zostały zapytane o planowanie ciąży. W chwili badania planowało ciążę 5 kobiet (14,71%), 23 pacjentki planowało ciążę w okresie kilku najbliższych lat (67,65%). Trzy kobiety planują ciążę, jednak nie potrafiły odpowiedzieć na pytanie, kiedy to ma nastąpić (8,82%). Zestawienie powyższych danych zaprezentowano w tabeli 40.

Tab. 40 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem terminu planowania ciąży

Planowanie ciąży	Odsetek [%]
obecnie	14,71
czas określony, odległy	67,65
czas nieokreślony	8,82
brak danych	8,82

W grupie pacjentek palących tytoń żadna z kobiet nie stosowała hormonalnych środków antykoncepcyjnych w czasie badań.

Wśród badanych kobiet 6 pacjentek zażywało na stałe leki (9,53%), pozostałe 54 osoby (85,71%) nie były poddane żadnej terapii. Trzy kobiety nie udzieliły informacji na ten temat (tabela 41).

Tab. 41 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem stałego stosowania leków

Stale stosowanie leków	Odsetek [%]
tak	9,53
nie	85,71
brak danych	4,76

Wśród pacjentek palących tytoń biorących udział w badaniu żadna nie przeżyła resekcji tarczycy, co stanowi 100% badanej populacji pacjentek palących.

Pacjentki biorące udział w badaniu wykazywały znaczną rozpiętość wieku, w którym wystąpiła u nich pierwsza miesiączka. W 11 roku życia wystąpiła pierwsza miesiączka u 2 osób (3,17%), u 14 kobiet pojawiła się w 12 roku życia (22,22%), a w wieku 13 lat rozpoczęło miesiączkować 18 pacjentek (28,57%). W 14 roku życia rozpoczęło miesiączkować 14 kobiet (25,40%). Jako piętnastolatki miesiączkowało 5 respondowanych (7,94%). W 16 roku życia miesiączkowały cztery osoby (6,35%). Jedna kobieta (3,17%) zaobserwowała swoją pierwszą miesiączkę w 18 roku życia. Jedna osoba nie podała informacji (tabela 42).

Tab. 42 Wiek, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka u pacjentek palących tytoń

Wiek, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka [rok życia]	Odsetek [%]
11	3,17
12	22,22
13	28,57
14	25,4
15	7,94
16	6,35
18	1,59
brak danych	4,76

U respondowanych 16 kobiet wystąpiły wcześniej zaburzenia cyklu miesiączkowego (25,40%). U pozostałych pacjentek nie zaobserwowano ich. Zestawienie przedstawiono w tabeli 43.

Tab. 43 wcześniej występujące zaburzenia cyklu miesiączkowego w grupie kobiet palących tytoń

Wcześniej występujące zaburzenia cyklu miesiączkowego	Odsetek [%]
tak	25,40
nie	73,01
brak danych	1,59

Aktualnie 52 pacjentki palące tytoń podały, że występują u nich zaburzenia długości cyklu miesiączkowego, co stanowiło 82,54% ogólnej liczby respondowanych pacjentek palących tytoń. Pozostałe opisało swój cykl miesiączkowy jako regularny. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 44.

Tab. 44 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem aktualnie występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego

Przyczyny występowania zaburzeń cyklu miesięczkowego	Odsetek [%]
nieregularność	56,25
zmiany długości	12,5
zdiagnozowana choroba	6,25
wtórny zanik	12,5
brak danych	12,5

Długość cyklu miesięczkowego palących tytoń uczestniczek badania stanowiło również czynnik zmienny. Czternaście z kobiet podało, że aktualnie długość cyklu miesięczkowego nie przekracza 28 dni (22,22%). Cykl miesięczkowy o długości 28-29 dni występował u 22 osób (34,92%), natomiast u 20 pacjentek (31,75%) cykl miesięczkowy trwał dłużej niż 30 dni. Trzy z ankietowanych kobiet nie podało informacji na temat długości trwania cyklu miesięczkowego (3,17%). Dwie z respondowanych kobiet (4,76%) podały długość krwawienia miesięcznego jako długość trwania cyklu. Dane zestawiono w tabeli 45.

Tab. 45 Rozkład respondowanych pacjentek palących tytoń względem długości trwania cyklu miesięczkowego

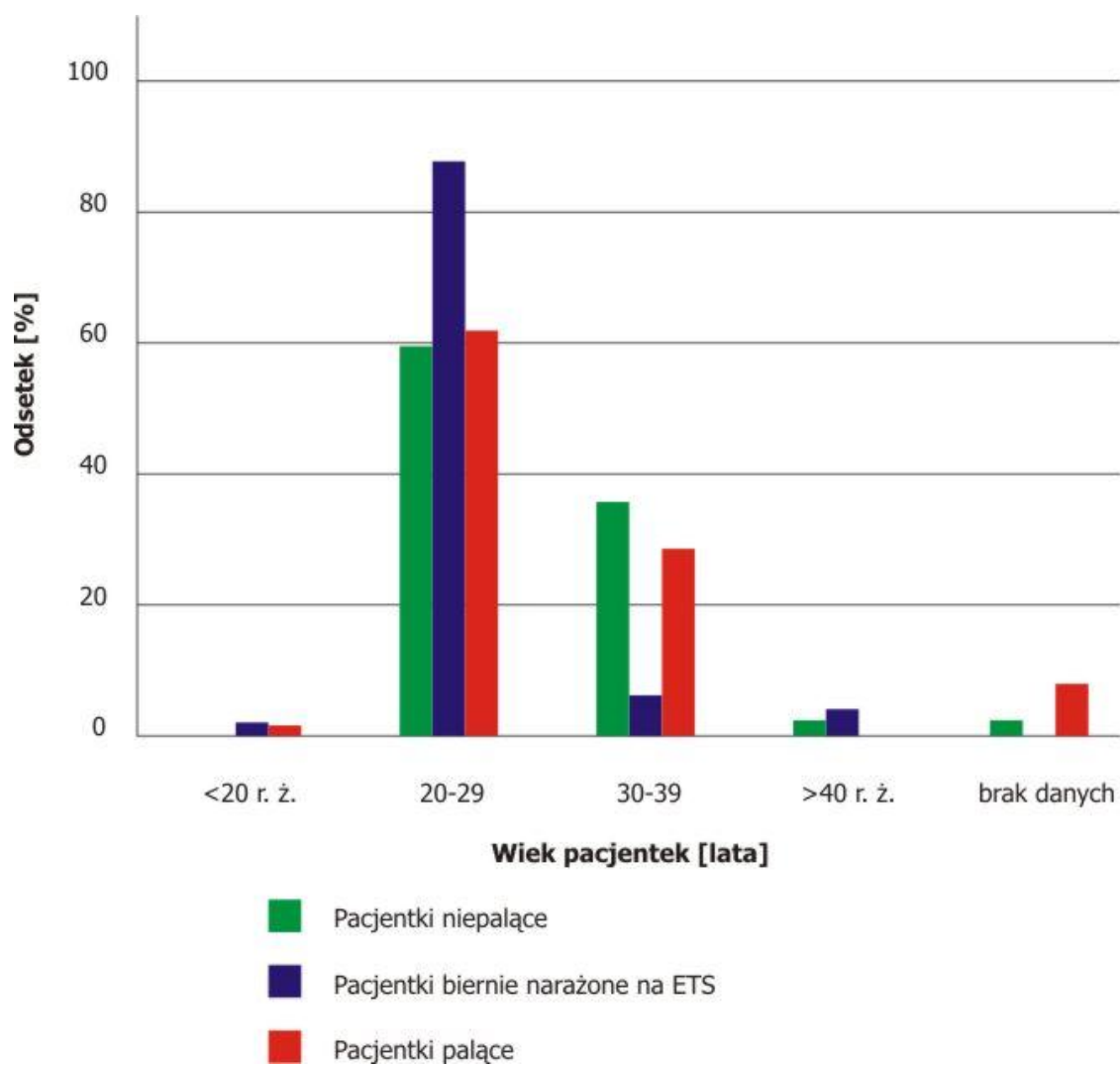
Długość cyklu miesięczkowego [dni]	Odsetek [%]
błędnie określona długość	4,76
<28	22,22
28-29	34,92
>30	31,75
brak danych	6,35

6.1.4. Zestawienie danych demograficznych pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń

Dokonano zestawienia pacjentek ze wszystkich grup badawczych względem wieku. Najwięcej respondowanych kobiet było w wieku 20-29 lat. Zestawienie to przedstawiono w tabeli 46 i na rycinie 34.

Tab. 46 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie ETS oraz palących tytoń względem wieku

Wiek pacjentek [rok życia]	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
<20	0	2,04	1,59
20-29	59,52	87,76	61,90
30-39	35,72	6,12	28,57
>40	2,38	4,08	0
brak danych	2,38	0	7,94

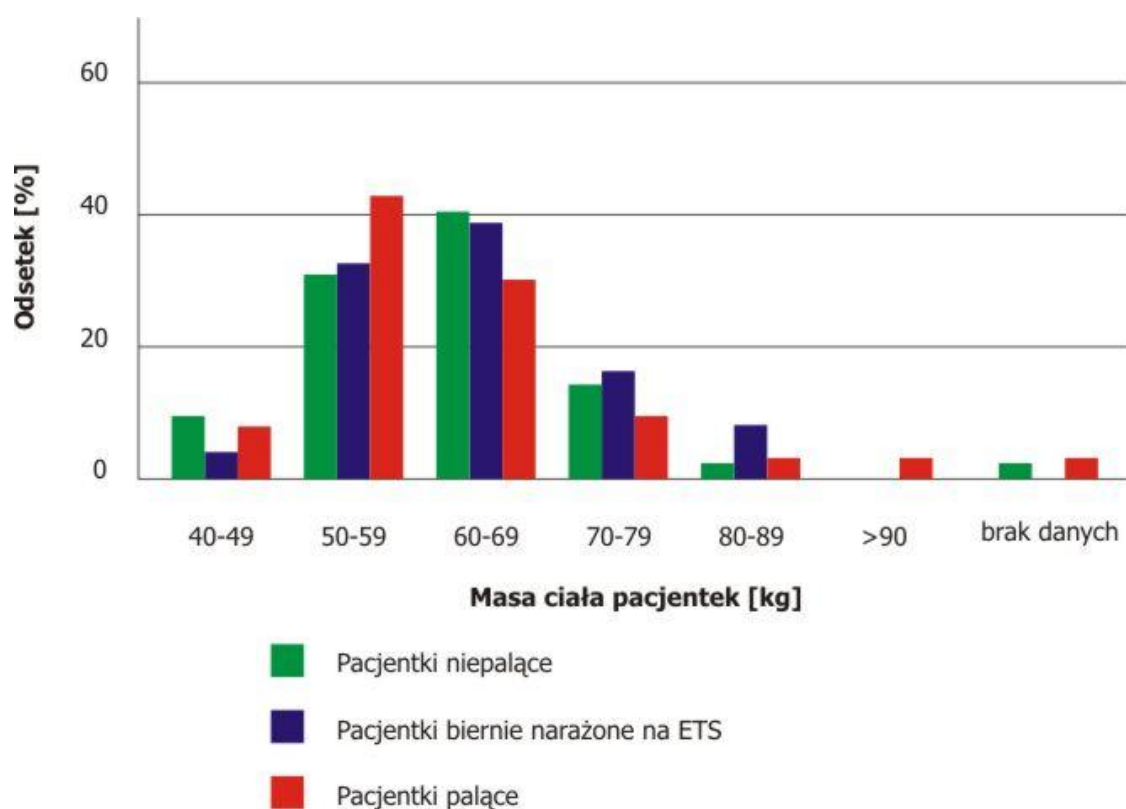


Ryc. 34 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie ETS oraz palących tytoń względem wieku

Zestawienie danych ankietowanych pacjentek uczestniczących w badaniach względem posiadanej masy ciała wskazuje, że największą grupę stanowią populacje o masie 50-69 kg we wszystkich grupach badawczych. Zestawienie przedstawiono w tabeli 47 oraz na rycinie 35.

Tab. 47 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem masy ciała

Masa ciała pacjentek [kg]	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
40-49	9,52	4,08	7,94
50-59	30,95	32,65	42,86
60-69	40,48	38,78	30,17
70-79	14,29	16,33	9,52
80-89	2,38	8,16	3,17
>90	0	0	3,17
brak danych	2,38	0	3,17

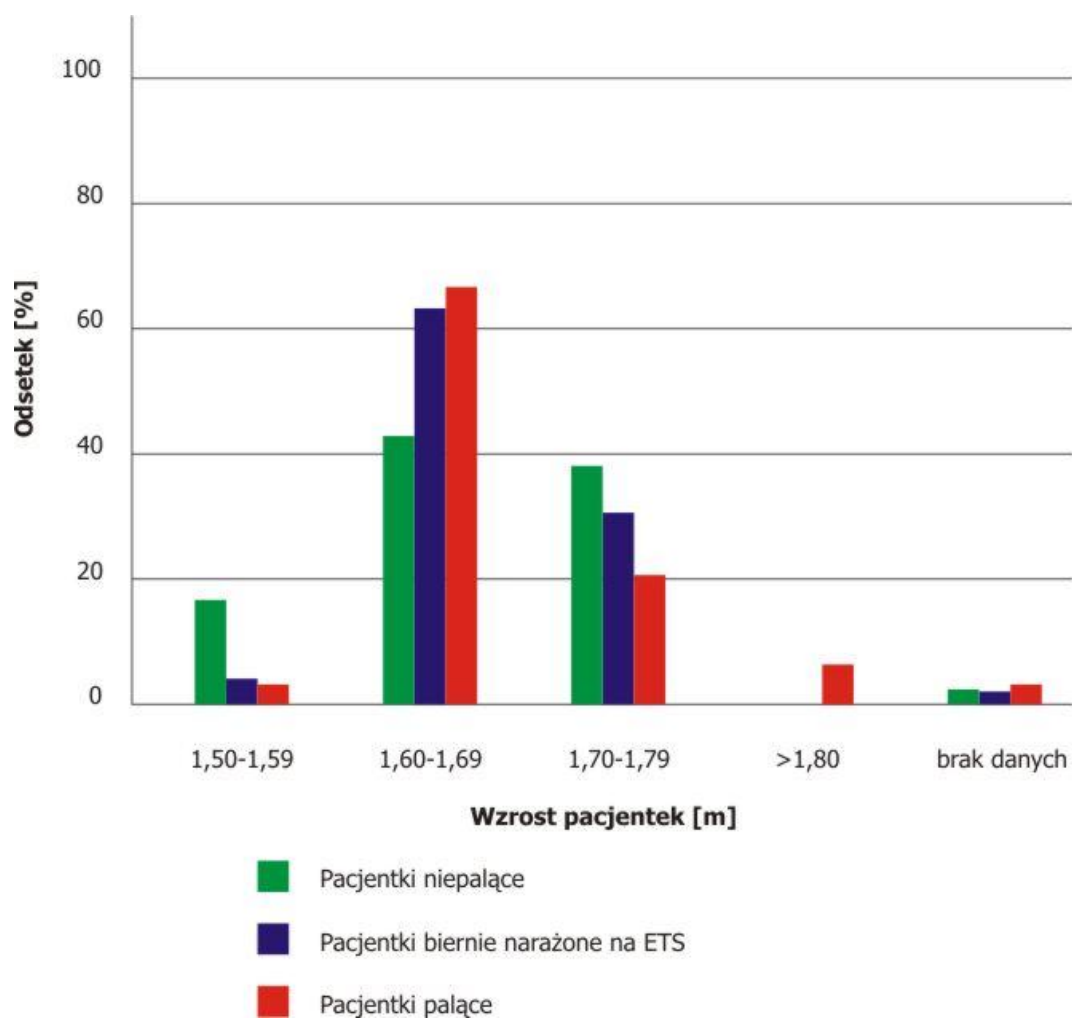


Ryc. 35 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem masy ciała

Porównano grupy kobiet niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń względem wzrostu. Największą populację stanowią pacjentki mające 1,60-1,69 m. (tabela 48, rycina 36).

Tab. 48 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wzrostu

Wzrost pacjentek [m]	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
1,50-1,59	16,67	4,09	3,17
1,60-1,69	42,86	63,26	66,67
1,70-1,79	38,09	30,61	20,64
>1,80	0	0	6,35
brak danych	2,38	2,04	3,17

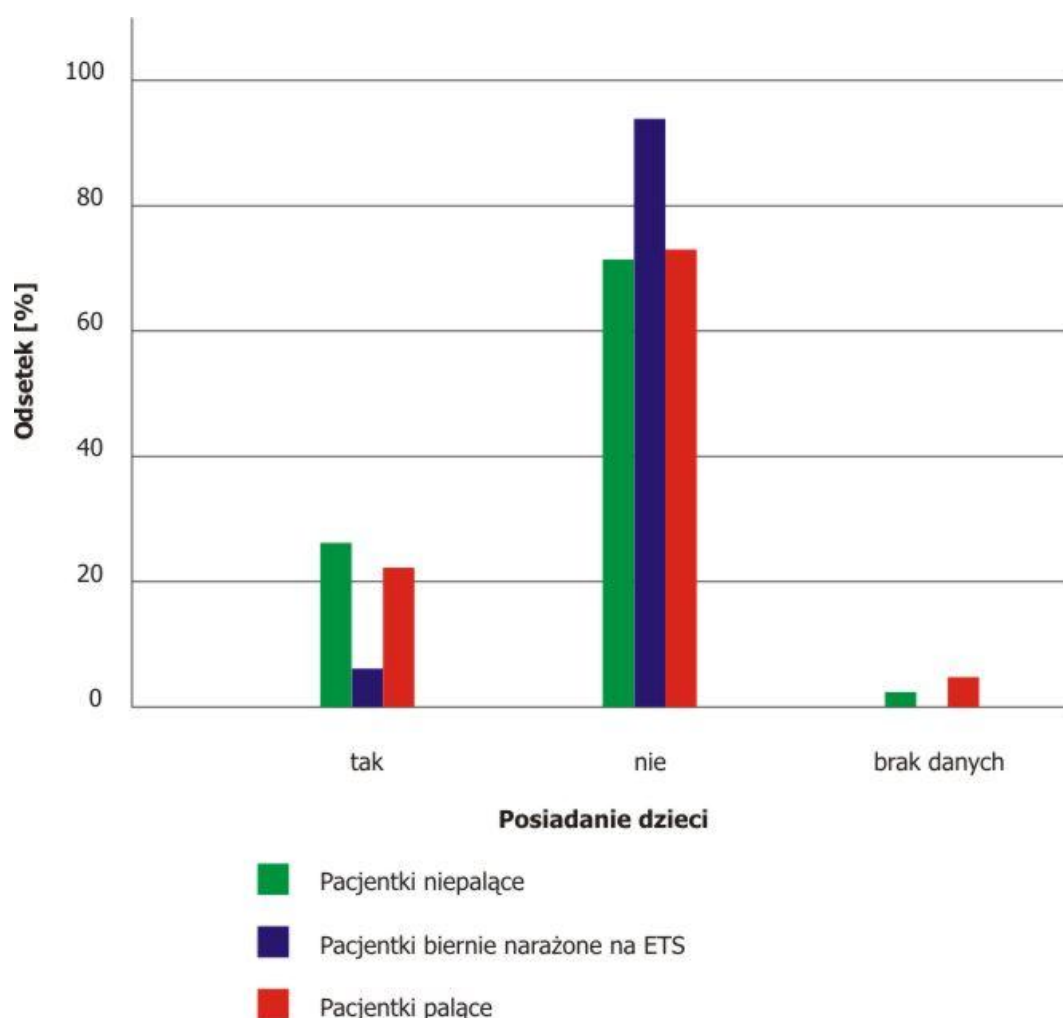


Ryc. 36 Rozkład pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wzrostu

Zgodnie z deklaracjami najliczniejszą grupą wśród pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego, jak również palących tytoń stanowiły kobiety nie posiadające dziecka. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 49 oraz na rycinie 37.

Tab. 49 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń posiadających dziecko

Posiadanie dziecka	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
tak	26,19	6,12	22,22
nie	71,43	93,88	73,02
brak danych	2,38	0	4,76



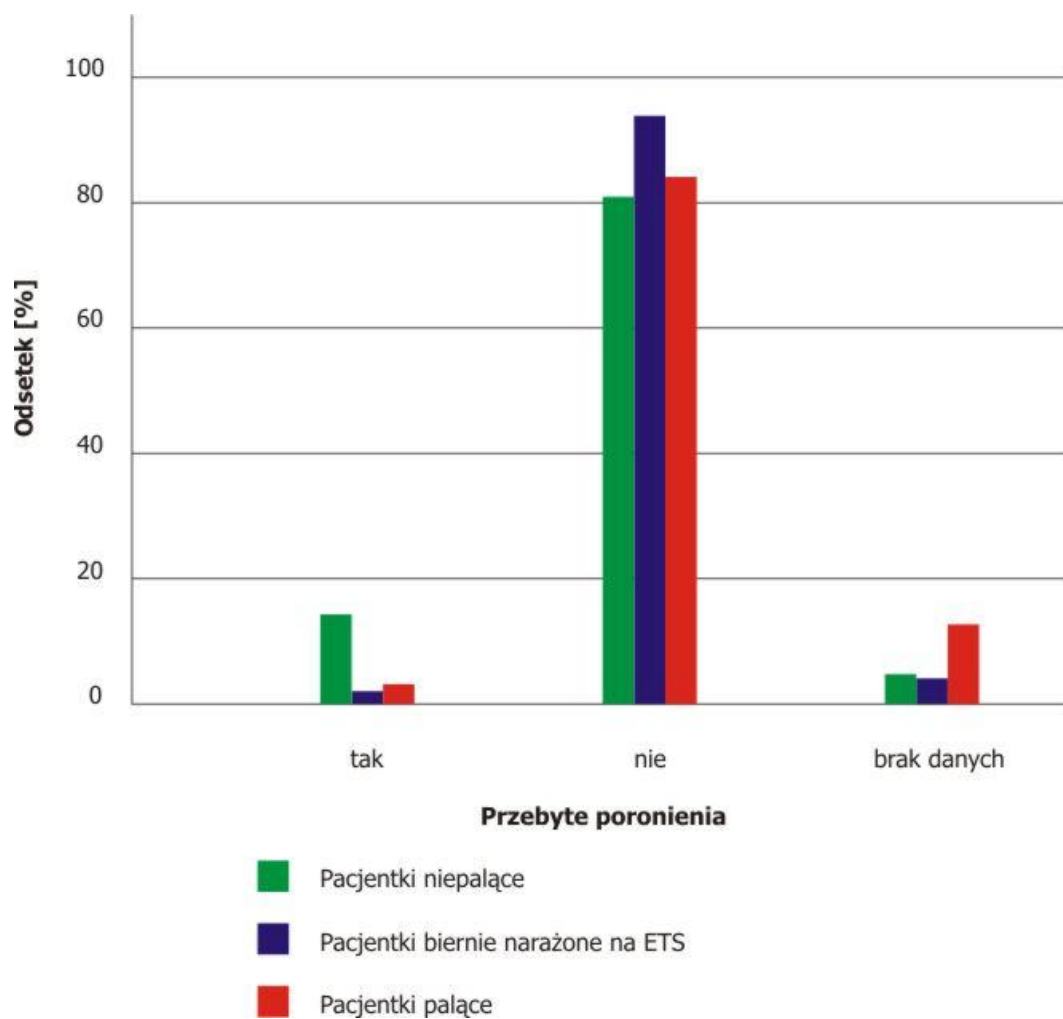
Ryc. 37 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń posiadających dziecko

Z danych ankietowych uzyskanych od pacjentek wynika, że zdecydowana większość kobiet (zarówno niepalących, biernie narażonych na działanie dymu

tytoniowego, jak również palących tytoń) nie przebyła poronienia (tabela 50, rycina 38).

Tab. 50 Przebyte poronienia w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Przebyte poronienia	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
tak	14,29	2,04	3,17
nie	80,95	93,88	84,13
brak danych	4,76	4,08	12,70

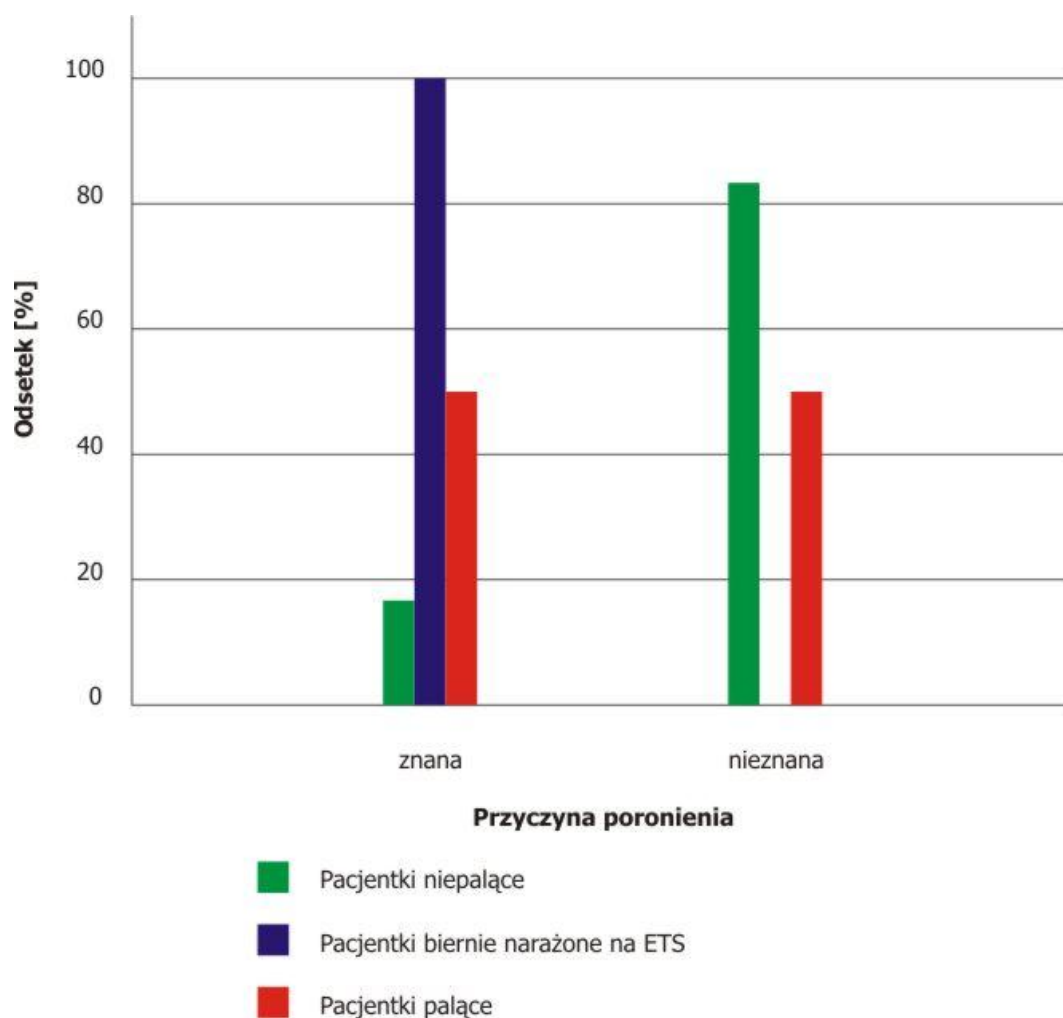


Ryc. 38 Przebyte poronienia w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Wśród pacjentek niepalących, które poroniły zdecydowana większość nie znała przyczyny, natomiast wśród osób palących połowa nie posiadała wiedzy na dany temat. Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 51 oraz na rycinie 39.

Tab. 51 Znajomość przyczyny przebytego poronienia w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Przyczyna poronienia	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
znana	16,67	100	50,00
nieznana	83,33	0	50,00

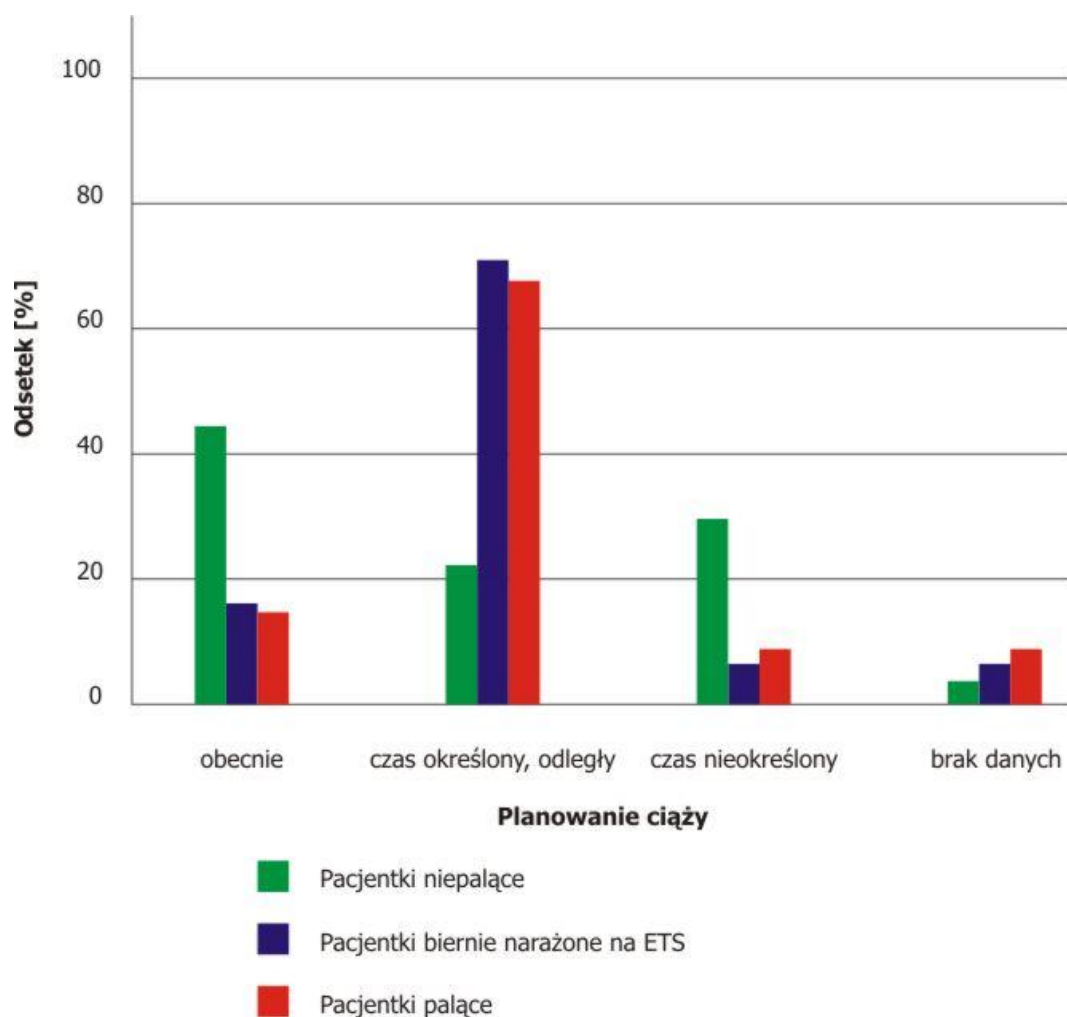


Ryc. 39 Znajomość przyczyny przebytego poronienia w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Wśród pacjentek niepalących większość planuje ciążę w obecnym czasie, a w przypadku pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń planuje ciążę w czasie dość odległym, ale określonym tj. w ciągu kilku najbliższych lat. Dane przedstawiono w tabeli 52 oraz na rycinie 40.

Tab. 52 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem czasu planowania ciąży

Planowanie ciąży	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
obecnie	44,44	16,13	14,71
czas określony, odległy	22,23	70,97	67,65
czas nieokreślony	29,63	6,45	8,82
brak danych	3,7	6,45	8,82



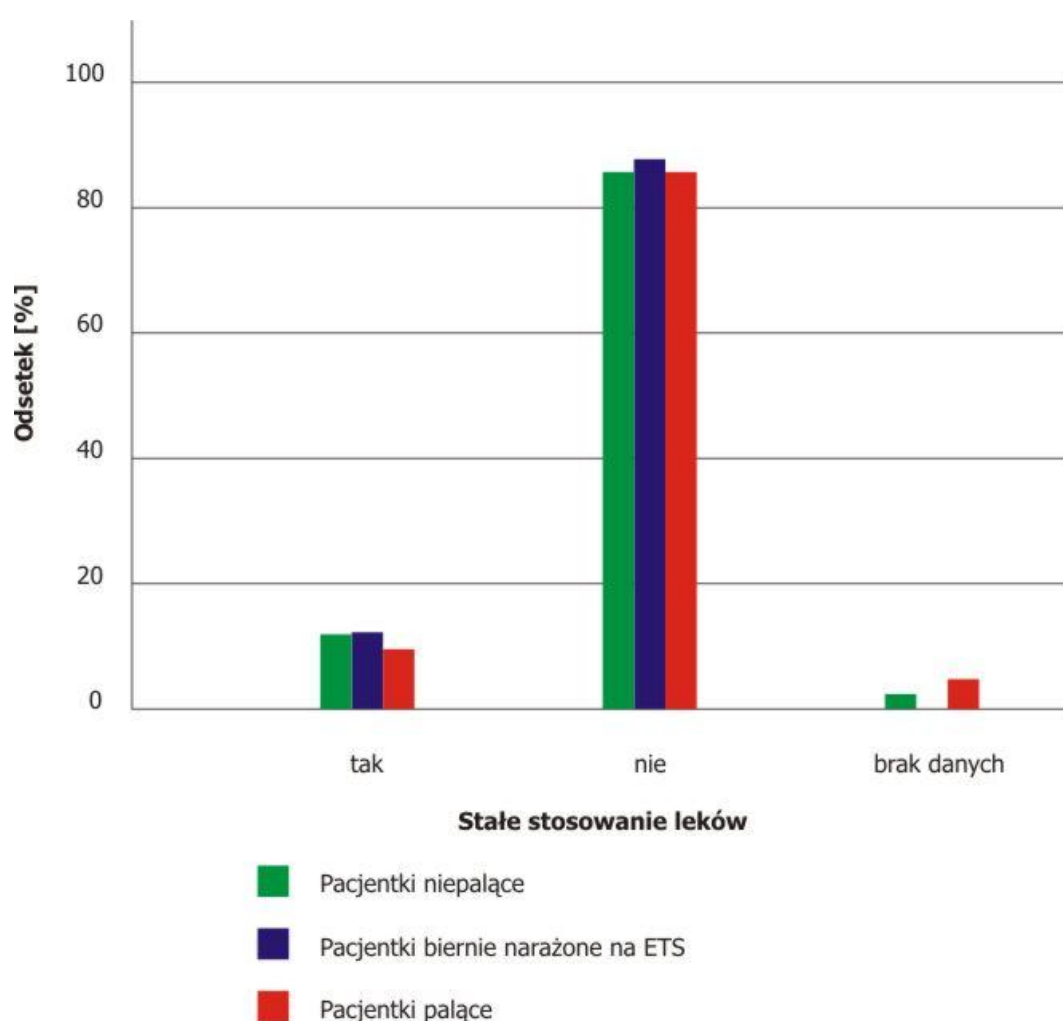
Ryc. 40 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem czasu planowania ciąży

Wszystkie ankietowane pacjentki nie stosowały antykoncepcji hormonalnej, co było podstawowym warunkiem udziału w badaniach. Jedna ze wszystkich kobiet podała, że stosowała antykoncepcję hormonalną, jednak miało to miejsce ponad trzy lata przed przystąpieniem do programu badawczego.

We wszystkich grupach badawczych kobiet, w większości zadeklarowano brak stałego stosowania leków, co przedstawiono w tabeli 53 oraz na rycinie 41.

Tab. 53 Stałe stosowanie leków w grupie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Stałe stosowanie leków	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
tak	11,91	12,24	9,53
nie	85,71	87,76	85,71
brak danych	2,38	0	4,76



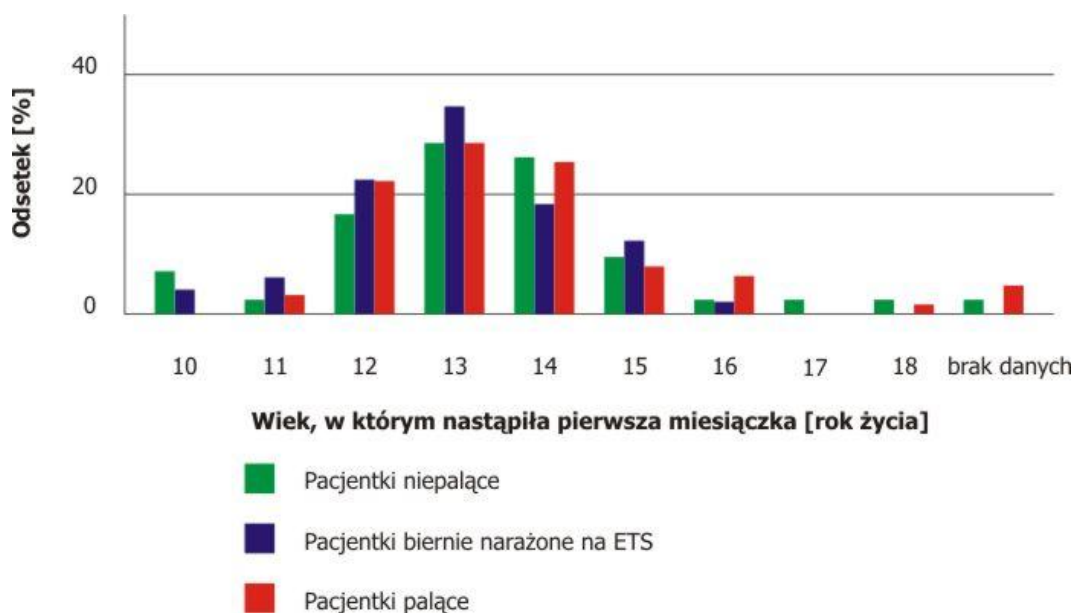
Ryc. 41 Stałe stosowanie leków w grupie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Zgodnie z danymi uzyskanymi od respondowanych pacjentek tylko jedna osoba, z grupy biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego przebyła resekcję tarczycy.

Zdecydowana większość kobiet rozpoczęła miesiączkowanie pomiędzy 12 a 14 rokiem życia. Zestawienie to przedstawiono w tabeli 54 oraz na rycinie 42.

Tab. 54 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wieku, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka

Wiek, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka [rok życia]	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
10	7,15	4,08	0
11	2,38	6,12	3,17
12	16,67	22,45	22,22
13	28,57	34,69	28,57
14	26,19	18,38	25,40
15	9,52	12,24	7,94
16	2,38	2,04	6,35
17	2,38	0	0
18	2,38	0	1,59
brak danych	2,38	0	4,76

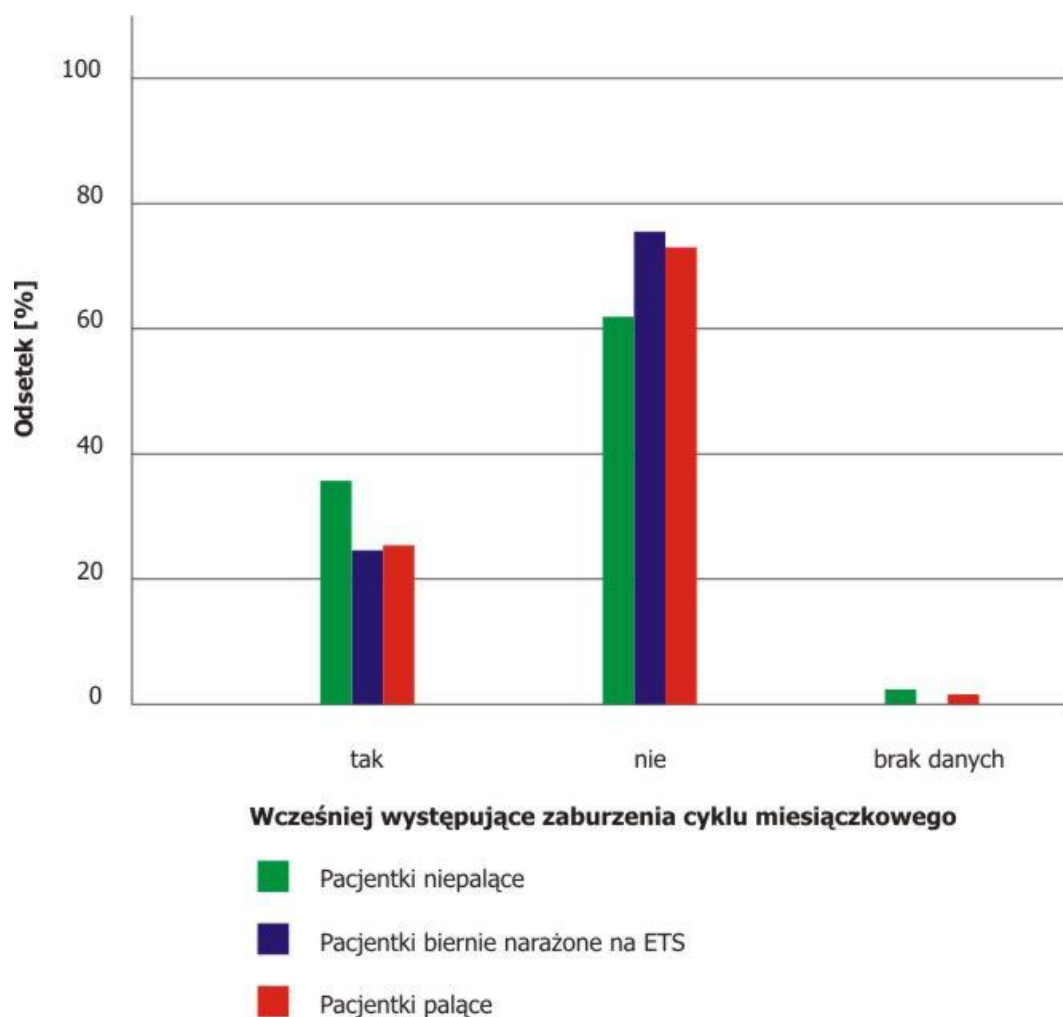


Ryc. 42 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wieku, w którym wystąpiła pierwsza miesiączka

Dokonano porównania kobiet niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń w zależności od zaistnienia wcześniejszych zaburzeń cyklu miesięczkowego. U większości respondowanych osób nie wystąpiły wcześniej takie zaburzenia, co przedstawiono w tabeli 55, a także na rycinie 43.

Tab. 55 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wcześniej występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego

Wcześniej występujące zaburzenia cyklu miesięczkowego	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
tak	35,71	24,49	25,40
nie	61,91	75,51	73,01
brak danych	2,38	0	1,59

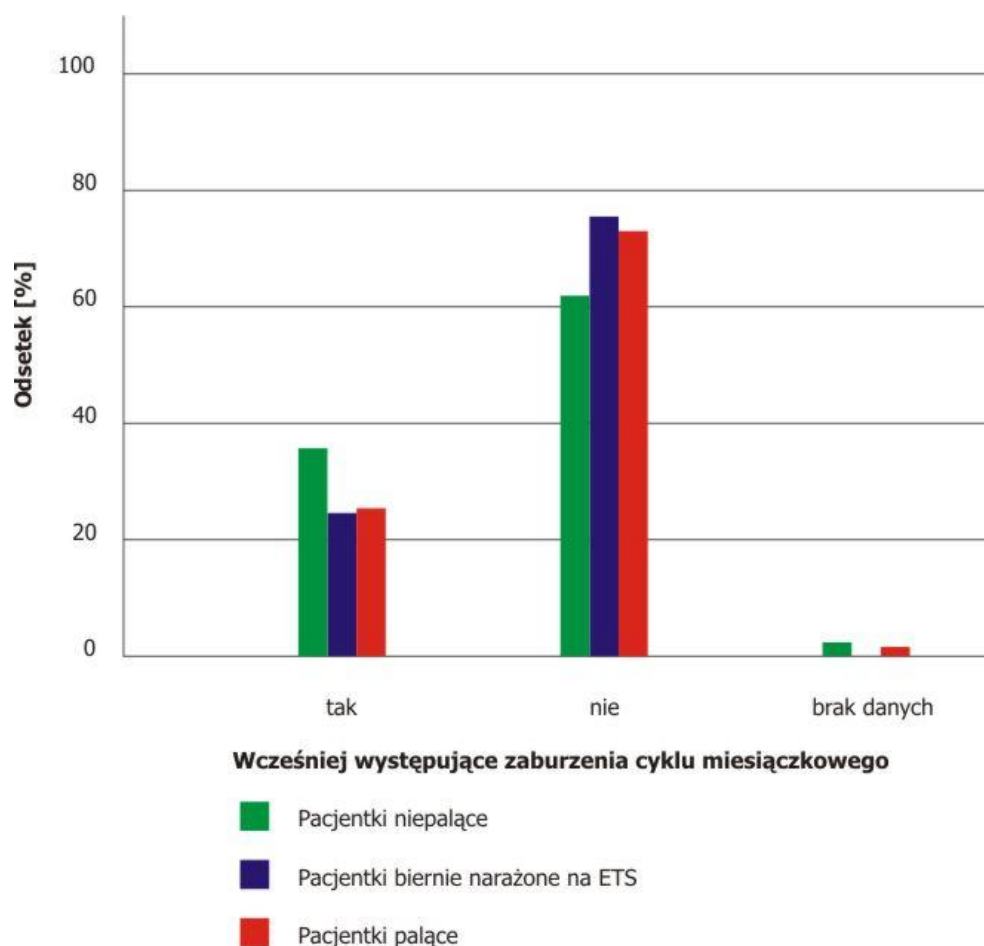


Ryc. 43 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem wcześniej występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego

Zdecydowana większość kobiet we wszystkich grupach badawczych deklarowała, że zaburzenia przebiegu cyklu miesięczkowego polegały na braku jego regularności (zmianach długości). Zestawienie danych przedstawiono w tabeli 56 oraz na rycinie nr 44.

Tab. 56 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem przyczyn występowania wcześniej zaistniałych zaburzeń cyklu miesięczkowego

Przyczyny występowania zaburzeń cyklu miesięczkowego	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
nieregularność	40,00	50,00	56,25
zmiany długości	46,66	33,34	12,50
zdiagnozowana choroba	6,67	8,33	6,25
wtórny zanik	6,67	8,33	12,50
brak danych	0	0	12,50

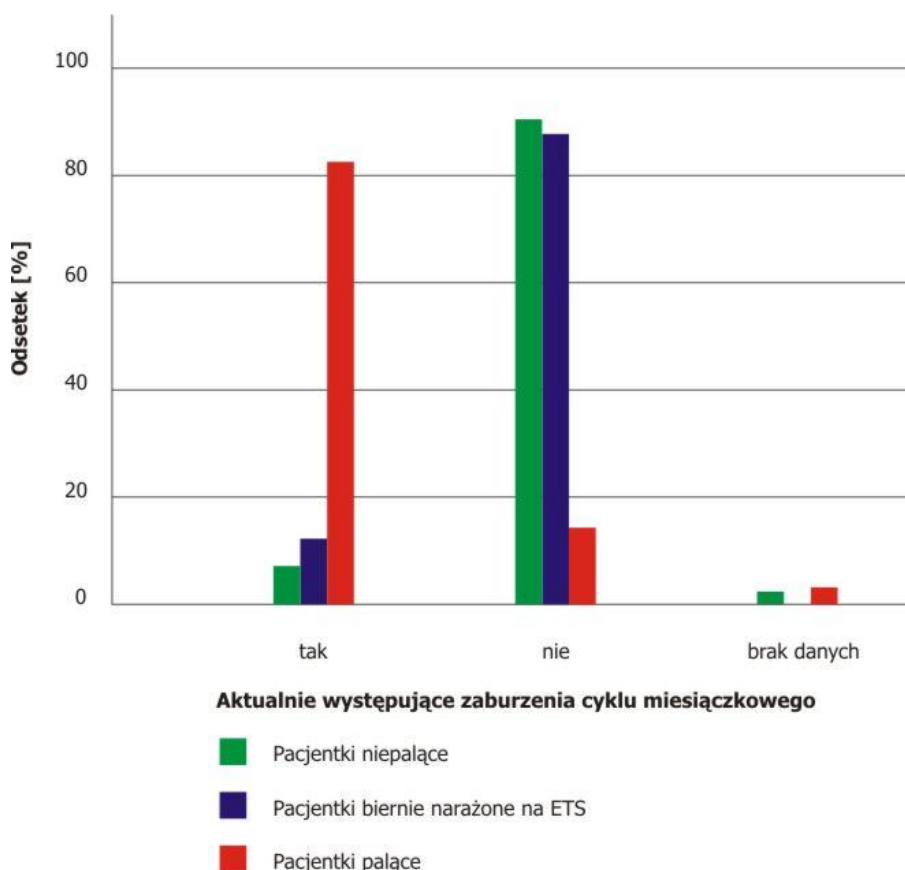


Ryc. 44 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem przyczyn występowania wcześniej zaistniałych zaburzeń cyklu miesięczkowego

Wśród respondowanych osób niepalących oraz biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego w zdecydowanej większości nie obserwowano zaburzeń cyklu miesięczkowego. Zmiany w długości cyklu miesięczkowego stwierdzono u kobiet palących tytoń. (tabela 57, rycina 45).

Tab. 57 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem aktualnie występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego

Aktualnie występujące zaburzenia cyklu miesięczkowego	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
tak	7,14	12,24	82,54
nie	90,48	87,76	14,29
brak danych	2,38	0	3,17

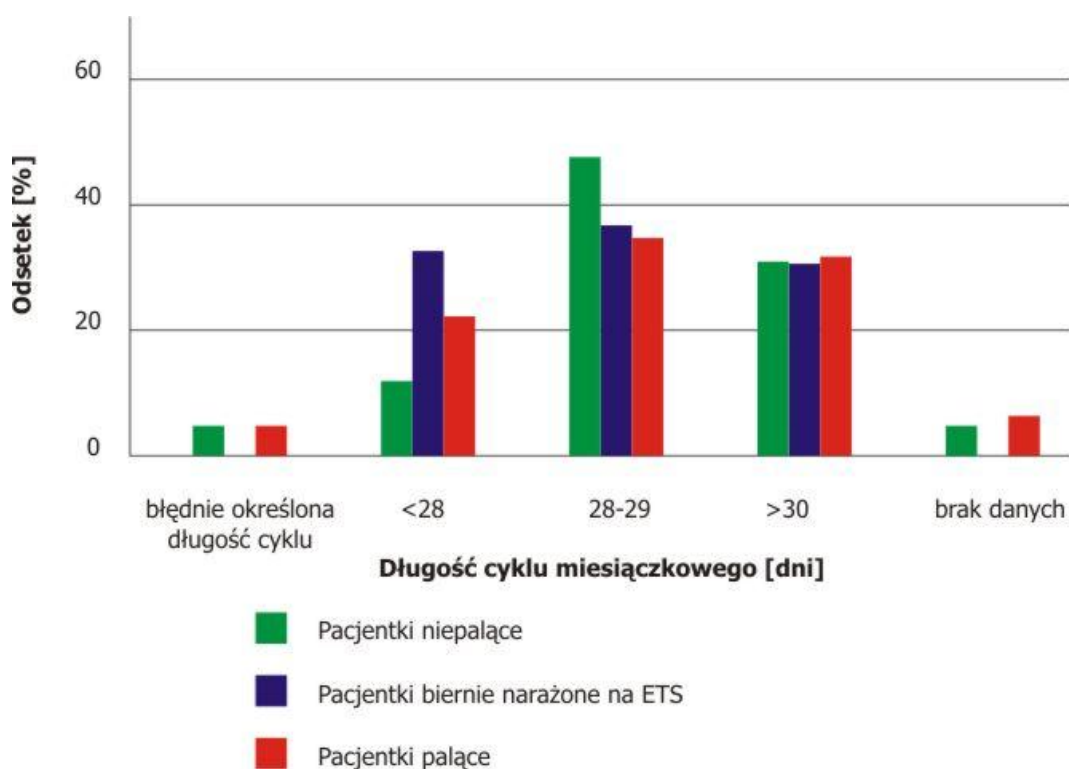


Ryc. 45 Zestawienie pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń względem aktualnie występujących zaburzeń cyklu miesięczkowego

Długości cyklu miesięczkowego badanych kobiet we wszystkich grupach badawczych przedstawiono to w tabeli 58 oraz na rycinie 46.

Tab. 58 Długość trwania cyklu miesięczkowego w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

Długość cyklu miesięczkowego	Pacjentki niepalące	Pacjentki biernie narażone na ETS	Pacjentki palące tytoń
	Odsetek [%]		
błędnie określona długość	4,76	0	4,76
<28	11,9	32,65	22,22
28-29	47,62	36,74	34,92
>30	30,96	30,61	31,75
brak danych	4,76	0	6,35



Ryc. 46 Długość trwania cyklu miesięczkowego w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na ETS oraz palących tytoń

6.2. Status biernego narażenia na dym i palenia tytoniu wśród pacjentek

Podziału pacjentek na grupy badawcze dokonano na podstawie danych ankietowych uzyskanych od kobiet oraz na podstawie wyników badań poziomu kotyniny, jako głównego metabolitu nikotyny w surowicy krwi. Po przeprowadzeniu oznaczeń poziomu kotyniny 13 pacjentek przesunięto. Osoby deklarujące niepalenie zakwalifikowano do grupy kobiet palących tytoń. Taka zmiana wynikała z wysokich poziomów kotyniny w surowicy krwi.

W celu oznaczenia poziomu kotyniny w surowicy krwi kobiet badanych dokonano trzykrotnego pobrania krwi w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego.

Grupę kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego stanowi 49 pacjentek- 31,41%.

Respondentki biernie narażone na działanie dymu tytoniowego deklarowały różny czas ekspozycji. Trzynaście z nich (26,53%) podało, że przebywa w środowisku osób palących tytoń nie dłużej niż 1 godzinę dziennie, 7 (14,29%) eksponowanych było przez około 2 godziny na dobę, jedna kobieta (2,04%) była narażona przez 3 godziny dziennie, 3 respondowane pacjentki (6,12%) podały, że przebywały w środowisku osób palących tytoń 4 godziny na dobę. Sześć kobiet (12,25%) deklarowało pięciogodzinną ekspozycję, dwie kobiety (4,08%) 6-godzinną, jedna (2,04%) przebywała w środowisku dymu tytoniowego 7 godzin, natomiast 16 pacjentek (32,65%) deklarowało czas ekspozycji dłuższy niż 8 godzin dziennie. Zestawienie czasu narażenia na działanie dymu tytoniowego respondowanych pacjentek przedstawiono w tabeli 59.

Tab. 59 Rozkład respondowanych pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego względem czasu ekspozycji na ETS

Czas ekspozycji na ETS [godz.]	Odsetek [%]
1	26,53
2	14,29
3	2,04
4	6,12
5	12,25
6	4,08
7	2,04
>8	32,65

Grupę pacjentek palących tytoń stanowią 62 osoby- 40,35.

Pacjentki palące tytoń deklarowały zróżnicowaną ilość wypalanych papierosów w ciągu doby. 27 z nich (43,55%) podało, że wypalały dziennie nie więcej niż 5 papierosów, 18 (29,03%) podało, że wypalało 6-10 papierosów na dobę, 7 (11,29%) wypalało 11-15 papierosów dziennie. Ta sama ilość kobiet (11,29%) wypalała 16-20 papierosów na dobę, a jedynie 3 kobiety (4,84%) deklarowały powyżej 20 papierosów przez 24 godziny. Zestawienie ilości wypalanych dziennie papierosów przez respondowane pacjentki zaprezentowano w tabeli 60.

Tab. 60 Rozkład respondowanych pacjentek palących względem ilości wypalanych papierosów

Ilość wypalanych dziennie papierosów [szt.]	Odsetek [%]
<5	43,55
6-10	29,03
11-15	11,29
16-20	11,29
>20	4,84

6.2.1. Poziom kotyniny w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na dym tytoniowy (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)

Dokonano oznaczenia poziomu kotyniny w surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 61.

Tab. 61 Poziome stężenia kotyniny w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na dym tytoniowy

Lp.	Kotynina [ng/ml]		
	Dzień cyklu		
	1	14	21
1	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
2	b.s.	b.s.	p.g.o.
3	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
4	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
5	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
6	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
7	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
8	b.s.	p.g.o.	p.g.o.
9	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
10	p.g.o.	p.g.o.	b.s.
11	p.g.o.	p.g.o.	b.s.
12	15,04	b.s.	p.g.o.
13	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
14	b.s.	p.g.o.	p.g.o.
15	b.s.	b.s.	b.s.
16	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
17	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
18	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
19	b.s.	b.s.	47,52

20	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
21	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
22	41,09	p.g.o.	p.g.o.
23	16,54	p.g.o.	p.g.o.
24	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
25	p.g.o.	p.g.o.	36,66
26	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
27	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
28	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
29	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
30	32,79	p.g.o.	16,79
31	p.g.o.	b.s.	p.g.o.
32	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
33	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
34	p.g.o.	p.g.o.	b.s.
35	p.g.o.	b.s.	p.g.o.
36	20,76	p.g.o.	17,12
37	b.s.	b.s.	p.g.o.
38	31,14	34,27	p.g.o.
39	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
40	b.s.	p.g.o.	78,37
41	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
42	b.s.	p.g.o.	p.g.o.
43	b.s.	b.s.	b.s.
44	b.s.	b.s.	b.s.
45	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
46	b.s.	b.s.	b.s.
47	b.s.	p.g.o.	b.s.
48	p.g.o.	p.g.o.	12,11
49	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
N	17	18	19
Średnia	3,30	0,00	2,50
Mediana	0,00	0,00	0,00
Min.	0,00	0,00	0,00

Maks.	41,09	0,00	47,52
Dolny kwartył	0,00	0,00	0,00
Górny kwartył	0,00	0,00	0,00
±SD	10,40	0,00	10,90

Objaśnienia: p.g.o.- poza granicą oznaczalności

b.s.- brak surowicy

W surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego nie dokonano oznaczeń poziomu kotyniny w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego odpowiednio u 12, 10, 8 pacjentek. Stężenie kotyniny w pobieranym materiale biologicznym w badanych dniach cyklu miesięczkowego poniżej granicy oznaczalności otrzymano odpowiednio u 31, 38, 35 osób. W pozostałych sześciu przypadkach w 1 dniu cyklu miesięczkowego, jednym w 14 dniu i sześciu w 21 dniu otrzymano odpowiednio średnie stężenia kotyniny $3,30 \pm 10,40$ ng/ml, $0,00 \pm 0,00$ ng/ml oraz $2,50 \pm 10,90$ ng/ml (tabela 61).

6.2.2. Poziom kotyniny w surowicy krwi pacjentek palących tytoń

Dokonano oznaczenia poziomu kotyniny w surowicy krwi kobiet palących tytoń w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 62.

Tab. 62 Poziomy stężenia kotyniny w surowicy krwi pacjentek palących tytoń

Lp.	Kotynina [ng/ml]		
	Dzień cyklu		
	1	14	21
1	31,96	b.s.	b.s.
2	p.g.o.	216,78	b.s.
3	b.s.	50,85	59,3
4	p.g.o.	41,47	8,69
5	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
6	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
7	p.g.o.	p.g.o.	b.s.
8	p.g.o.	10,46	b.s.
9	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
10	19,49	72,8	108,68
11	3,16	3,36	p.g.o.
12	29,06	9,49	18,78
13	p.g.o.	p.g.o.	159,07
14	b.s.	p.g.o.	p.g.o.
15	53,41	p.g.o.	8,39
16	8,38	22,4	59,19
17	20,98	2,11	6,74
18	16,04	18,49	19,69
19	b.s.	b.s.	b.s.
20	p.g.o.	71,19	b.s.
21	14,9	b.s.	p.g.o.
22	p.g.o.	b.s.	p.g.o.
23	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
24	p.g.o.	283,67	256,00
25	113,14	p.g.o.	b.s.
26	b.s.	b.s.	b.s.
27	45,81	19,1	b.s.
28	11,41	21,22	13,81
19	121,93	15,98	52,61

30	p.g.o.	p.g.o.	22,43
31	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
32	68,26	128,69	53,91
33	496,44	243,27	66,63
34	p.g.o.	b.s.	p.g.o.
35	p.g.o.	p.g.o.	58,47
36	b.s.	b.s.	b.s.
37	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
38	270,16	50,74	271,82
39	b.s.	b.s.	b.s.
40	b.s.	b.s.	82,15
41	b.s.	p.g.o.	88,00
42	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
43	381,04	25,98	22,51
44	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
45	b.s.	b.s.	b.s.
46	389,03	p.g.o.	p.g.o.
47	p.g.o.	p.g.o.	p.g.o.
48	p.g.o.	b.s.	313,17
49	b.s.	b.s.	b.s.
50	p.g.o.	p.g.o.	70,07
51	b.s.	p.g.o.	393,58
52	p.g.o.	p.g.o.	47,48
53	p.g.o.	p.g.o.	24,04
54	b.s.	p.g.o.	31,81
55	p.g.o.	p.g.o.	399,46
56	56,77	p.g.o.	p.g.o.
57	50,84	85,46	38,22
58	p.g.o.	p.g.o.	82,16
59	p.g.o.	p.g.o.	14,84
60	b.s.	p.g.o.	103,43
61	36,94	p.g.o.	p.g.o.
62	18,68	180,06	46,55
N	49	51	50

Średnia	46,08	32,96	68,35
Mediana	0,00	0,00	22,47
Min.	0,00	0,00	0,00
Maks.	496,44	283,67	449,83
Dolny kwartył	0,00	0,00	0,00
Górny kwartył	31,96	25,98	66,63
±SD	108,02	66,20	112,51

Objaśnienia: p.g.o.- poza granicą oznaczalności

b.s.- brak surowicy

W surowicy krwi kobiet palących tytoń nie dokonano oznaczeń poziomu kotyniny w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego odpowiednio u 13, 12, 13 pacjentek. Stężenie kotyniny w pobieranym materiale biologicznym w badanych dniach cyklu miesięczkowego poniżej granicy oznaczalności otrzymano odpowiednio u 27, 29, 17 osób. W pozostałych 22 przypadkach w 1 dniu cyklu miesięczkowego, 21 w 14 dniu i 32 w 21 dniu otrzymano odpowiednio średnie stężenia kotyniny $46,08 \pm 108,02$ ng/ml, $32,96 \pm 66,20$ ng/ml oraz $63,35 \pm 112,51$ ng/ml (tabela 61).

6.3. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek

W surowicy krwi pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego a także palących tytoń dokonano oznaczeń hormonów lutropowego, folikulotropowego, 17 β -estradiolu, a także progesteronu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego.

6.3.1. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek niepalących

Kobiety, które deklarowały niepalenie oraz brak narażenia na działanie środowiskowego dymu tytoniowego stanowią grupę kontrolną. Wyniki oznaczeń hormonów przedstawiono w tabeli 63.

Tab. 63 Wyniki poziomu hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek niepalących

Lp.	FSH [mIU/ml]			LH [mIU/ml]			17 β -estradiol [pg/ml]			Progesteron [ng/ml]		
	Dzień cyklu											
	1	14	21	1	14	21	1	14	21	1	14	21
1	4,98	5,52	5,57	2,16	4,37	10,09	15,55	105,6	34,48	0,44	0,49	0,28
2	5,06	3,76	2,28	7,10	5,74	1,09	28,24	69,80	316,50	0,53	5,84	16,23
3	5,55	4,5	4,21	4,52	8,41	13,16	42,00	106,50	93,87	0,48	0,37	2,30
4	2,50	4,41	6,25	4,54	1,70	6,11	103,30	30,77	102,7	14,11	0,77	1,81
5	5,50	4,60	4,09	4,55	8,20	8,98	36,50	98,52	185,68	0,35	0,67	4,58
6	5,56	4,75	3,02	5,23	8,90	4,56	32,48	87,27	42,58	0,47	0,95	0,76
7	6,00	4,87	3,49	7,58	9,47	9,40	34,11	82,53	9,40	0,72	0,52	7,99
8	4,99	3,28	3,43	4,89	11,67	8,51	43,27	384,40	173,50	0,90	1,08	18,28
9	2,60	4,55	2,09	4,56	15,28	6,02	57,28	209,20	125,40	0,45	0,98	22,60
10	5,92	4,81	2,59	4,41	8,94	2,63	53,04	96,52	304,50	0,41	2,25	26,35
11	7,34	8,29	4,70	5,04	5,60	5,00	43,78	227,40	39,29	0,03	0,03	0,03
12	8,67	5,59	3,43	6,26	7,56	5,62	56,76	64,27	384,10	0,77	0,77	0,59
13	5,04	4,84	2,09	5,70	7,08	0,83	36,01	133,10	233,40	0,34	0,62	8,09
14	5,22	7,12	6,10	3,65	5,44	5,76	57,10	134,80	63,72	0,72	2,14	1,20

15	3,77	5,59	b.s.	2,15	7,56	b.s.	40,05	64,27	b.s.	0,69	0,78	b.s.
16	13,19	50,77	14,04	11,79	35,57	40,35	8,99	5,00	321,50	0,23	0,03	0,09
17	9,23	6,32	5,63	8,90	12,75	7,43	40,63	75,00	87,24	0,44	2,10	7,04
18	4,10	7,67	4,74	4,57	13,59	2,51	52,83	77,56	54,35	1,86	0,94	0,79
19	4,74	7,23	6,63	3,31	12,18	4,30	33,3	118,10	39,55	0,80	2,41	0,85
20	4,47	1,99	1,68	7,38	9,49	7,09	18,56	260,40	205,90	0,46	0,41	29,86
21	7,36	2,54	5,39	5,93	3,51	8,15	57,07	91,76	43,31	0,36	16,99	2,81
22	4,08	4,64	9,79	4,21	7,52	34,41	40,09	49,69	449,70	0,62	0,37	0,98
23	4,89	3,22	5,31	11,35	3,04	6,31	78,84	110,70	40,10	2,24	11,94	0,55
24	4,95	8,46	4,71	4,36	30,42	4,99	51,57	134,00	26,09	0,89	1,22	0,75
25	2,75	3,86	3,54	1,79	6,99	9,67	26,12	42,66	88,79	0,44	0,49	1,52
26	6,40	9,80	4,16	8,34	52,49	3,99	23,76	308,30	28,53	0,82	0,83	0,56
27	5,24	3,18	1,84	5,78	5,83	2,89	37,60	225,40	100,30	0,62	0,50	5,85
28	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.
29	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.	b.s.
30	7,25	10,60	8,08	4,18	14,25	5,20	35,62	124,50	40,10	0,80	2,50	8,20
31	6,92	8,37	7,06	4,50	7,88	22,99	17,30	57,18	318,00	0,99	1,06	0,91
32	8,02	4,25	2,90	12,10	12,09	7,60	40,01	74,56	140,70	0,51	5,24	8,66
33	6,57	8,41	6,67	4,47	7,93	22,43	19,10	53,27	329,6	1,02	0,98	1,00
34	7,72	4,11	2,82	11,66	11,58	7,44	39,77	82,77	143,8	0,60	5,95	8,77

35	5,20	4,78	1,33	3,14	8,07	1,51	29,64	132,10	231,20	0,93	0,94	12,64
36	6,35	4,70	5,93	3,34	13,30	3,38	39,64	306,30	39,23	1,12	1,07	1,15
37	3,58	4,67	0,58	4,92	48,31	0,31	27,20	495,20	378,20	0,55	0,92	15,29
38	6,58	4,12	7,56	37,68	9,48	6,60	377,70	170,70	30,32	1,49	0,73	0,69
39	6,06	7,47	7,27	16,84	6,50	7,99	52,11	26,31	33,52	0,87	0,65	0,69
40	4,95	4,15	3,44	4,51	7,39	8,91	32,83	155,40	117,40	0,69	0,71	9,08
41	6,63	4,62	2,29	3,28	8,30	5,40	33,63	164,00	143,20	1,05	0,80	11,99
42	2,22	3,53	1,71	1,76	5,78	0,54	26,84	130,50	106,60	0,77	0,83	5,91
N	40	40	39	40	40	39	40	40	39	40	40	39
Średnia	5,75	6,34	4,48	5,63	12,14	9,12	41,19	180,04	157,20	1,03	2,40	5,95
Mediana	5,37	4,68	4,16	4,80	8,92	6,02	39,89	108,60	109,20	0,61	0,96	1,52
Min.	2,50	0,57	0,58	1,79	0,27	0,31	8,99	5,00	9,40	0,03	0,03	0,03
Maks.	13,19	50,77	14,04	12,10	52,49	46,04	103,30	798,40	514,60	14,11	16,99	29,86
Dolny kwartył	4,81	4,17	2,59	4,28	7,035	3,17	31,06	74,78	42,580	0,44	0,65	0,85
Górny kwartył	6,65	6,72	5,93	6,88	13,02	9,40	52,20	226,40	223,40	0,85	2,12	8,47
±SD	1,98	7,50	2,55	2,60	11,01	10,37	17,89	179,16	133,94	2,16	3,87	7,72

Objaśnienia: b.s.- brak surowicy

W grupie kobiet niepalących stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom hormonu folikulotropowego $5,75 \pm 1,98$ mIU/ml (poziom minimalny – 2,50 mIU/ml, poziom maksymalny – 13,19 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych osób oznaczono średni poziom FSH $6,34 \pm 7,50$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,57 mIU/ml, poziom maksymalny – 54,20 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik folikulotropiny $4,48 \pm 2,55$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,58 mIU/ml, poziom maksymalny – 14,04 mIU/ml) (tabela 63).

W omawianej grupie osób w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego średni poziom hormonu lutropowego $5,63 \pm 2,60$ mIU/ml (poziom minimalny – 1,79 mIU/ml, poziom maksymalny – 12,10 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom lutropiny $12,14 \pm 11,01$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,27 mIU/ml, poziom maksymalny – 52,54 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik LH $9,12 \pm 10,38$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,31 mIU/ml, poziom maksymalny – 46,04 mIU/ml) (tabela 63).

Również w tej grupie dokonano oznaczeń 17β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Odpowiednio otrzymano wartości średnie: $41,14 \pm 17,89$ pg/ml (poziom minimalny – 8,90 pg/ml, poziom maksymalny – 116,00 pg/ml), $180,04 \pm 179,16$ pg/ml (poziom minimalny – 5,00, poziom maksymalny – 798,40 pg/ml), $157,20 \pm 133,95$ pg/ml (poziom minimalny – 9,40 pg/ml, poziom maksymalny – 514,60 pg/ml) (tabela 63).

W grupie kobiet niepalących stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom progesteronu $1,03 \pm 2,16$ ng/ml (poziom minimalny – 0,03 ng/ml, poziom maksymalny – 14,12 ng/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom $2,40 \pm 3,87$ ng/ml (poziom minimalny – 0,03 ng/ml, poziom maksymalny – 16,99 ng/ml), natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik progesteronu $5,95 \pm 7,72$ ng/ml (poziom minimalny – 0,03 ng/ml, poziom maksymalny – 29,86 ng/ml) (tabela 63).

6.3.2. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego (ang. Environmental Tobacco Smoke, ETS)

Dokonano oznaczeń poziomów hormonów lutropowego, folikulotropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy kobiet biernie narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego. Wyniki oznaczeń hormonów przedstawiono w tabeli 64.

Tab. 64 Wyniki poziomu hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego

Lp.	FSH [mIU/ml]			LH [mIU/ml]			17 β -estradiol [pg/ml]			Progesteron [ng/ml]		
	Dzień cyklu											
	1	14	21	1	14	21	1	14	21	1	14	21
1	5,78	3,06	5,92	6,13	7,85	9,02	58,22	148,00	104,50	0,99	3,50	4,34
2	3,40	4,83	6,71	0,79	6,81	31,11	15,79	43,69	231,20	0,84	1,18	0,93
3	5,72	6,24	5,09	4,51	5,18	8,11	31,52	101,60	133,70	0,42	0,33	5,75
4	1,49	3,75	2,91	1,33	1,40	5,08	164,80	47,58	202,40	12,10	0,46	0,40
5	9,64	6,89	9,44	7,92	11,37	9,13	34,46	258,90	69,33	0,90	0,60	19,92
6	5,70	6,00	5,15	4,55	5,20	8,20	31,50	101,20	123,90	0,77	0,35	6,20
7	1,88	4,94	5,56	3,55	6,78	11,17	36,67	47,50	72,48	1,80	1,37	1,50
8	1,56	3,56	2,67	1,20	1,52	5,55	125,50	44,20	200,10	12,70	0,54	0,49
9	6,79	15,17	3,18	3,82	18,64	4,92	36,48	147,40	115,00	1,71	1,18	9,41
10	6,98	7,86	3,02	5,32	32,56	4,25	33,70	197,50	56,80	0,67	0,97	2,77
11	5,54	8,35	2,25	4,98	25,60	2,78	34,20	199,90	102,70	0,56	0,56	0,67
12	4,44	7,82	3,74	5,73	14,13	8,27	54,89	56,57	235,50	0,87	0,90	0,86
13	2,02	3,34	4,16	3,28	6,20	5,86	19,30	74,86	52,85	0,28	1,29	0,35
14	5,22	7,12	6,10	3,65	5,44	5,76	57,10	134,80	63,72	0,72	2,14	1,20

15	6,80	5,07	2,86	4,45	9,19	5,06	40,89	67,34	141,40	0,34	3,62	9,14
16	1,89	6,12	7,26	0,32	2,03	13,91	26,36	92,80	483,10	0,67	0,72	0,89
17	8,15	10,28	5,02	5,53	25,09	10,86	34,59	313,10	146,50	0,57	0,50	11,14
18	6,18	11,32	7,48	5,42	34,92	5,03	27,94	188,40	27,79	0,77	1,01	0,77
19	5,91	3,48	2,23	4,25	7,73	3,44	35,18	213,50	105,20	0,51	0,48	3,59
20	6,24	16,78	2,59	4,23	59,82	4,74	42,74	372,90	134,10	0,65	0,89	28,93
21	2,18	4,62	2,44	4,29	4,96	2,22	19,71	145,1	75,11	0,90	0,62	3,22
22	5,34	5,58	3,93	3,05	3,49	4,28	39,20	46,38	73,42	0,36	0,31	7,84
23	5,48	b.s.	3,34	4,90	b.s.	11,19	22,60	b.s.	236,10	0,42	b.s.	1,65
24	3,23	10,15	2,98	4,21	44,94	6,62	47,69	466,20	284,10	1,76	1,70	19,31
25	5,61	7,86	3,09	6,21	13,14	8,09	44,45	46,98	204,70	0,87	0,90	0,86
26	4,28	8,98	2,90	1,24	1,67	8,09	104,80	34,90	189,70	13,90	0,23	0,43
27	5,53	9,73	3,65	4,98	12,87	19,19	22,69	52,47	23,10	0,48	0,89	1,65
28	7,43	18,36	3,10	4,29	42,05	1,98	21,00	326,40	54,90	0,70	0,70	2,51
29	0,57	11,76	7,48	5,19	33,98	5,03	60,44	188,40	43,90	0,77	1,01	0,77
30	8,09	16,94	2,76	5,14	56,80	4,33	185,60	372,90	132,80	0,87	0,87	4,65
31	6,67	12,10	2,77	18,74	44,09	6,67	52,68	466,20	287,70	1,76	1,87	21,80
32	5,34	4,31	7,89	3,90	10,31	4,78	39,20	136,50	76,90	0,87	0,31	7,84
33	2,18	5,90	2,76	4,56	12,98	2,22	21,7	88,97	65,80	0,90	0,62	3,22
34	6,14	11,32	7,48	5,42	34,92	5,03	27,94	188,40	27,79	0,77	1,01	0,77

35	4,97	7,36	7,57	2,78	5,71	8,28	26,75	39,11	33,85	0,73	0,76	0,60
36	5,19	4,38	3,77	4,51	7,64	9,40	29,13	160,00	120,30	0,65	0,79	9,93
37	3,98	10,03	2,00	2,22	33,65	1,29	31,24	279,20	149,30	0,59	1,10	6,60
38	6,06	7,47	7,27	16,84	6,50	7,99	52,11	26,31	33,52	0,87	0,65	0,69
39	4,95	4,15	3,44	4,51	7,39	8,91	32,83	155,40	117,40	0,69	0,71	9,08
40	6,63	4,62	2,29	3,28	8,30	5,40	33,63	164,00	143,20	1,05	0,80	11,99
41	2,22	3,53	1,71	1,76	5,78	0,54	26,84	130,50	106,60	0,77	0,83	5,91
42	5,23	4,34	3,60	3,50	6,59	4,13	31,95	209,10	91,79	0,72	0,93	17,30
43	4,93	3,76	5,27	8,22	11,49	7,81	41,95	73,98	19,75	0,12	3,05	0,21
44	3,22	2,90	5,04	3,12	2,98	2,99	65,15	58,08	23,26	3,09	1,78	0,81
45	5,60	14,14	6,37	4,35	37,48	2,67	33,04	320,3	35,33	1,44	1,03	1,66
46	6,11	4,75	1,79	7,05	11,89	2,30	42,95	134,10	187,40	2,14	1,07	8,28
47	2,21	3,39	1,73	1,65	5,48	0,51	18,26	131,70	107,80	0,82	0,77	6,07
48	5,06	3,46	3,46	3,40	6,78	4,00	32,87	210,90	99,98	0,77	0,98	17,94
49	5,65	4,56	5,74	6,75	10,92	6,71	53,70	138,90	51,99	2,10	1,10	2,13
N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
Średnia	4,95	6,92	4,53	4,01	13,45	7,67	45,49	138,33	134,13	1,82	1,07	5,47
Mediana	5,62	6,06	4,04	4,27	7,27	5,65	34,88	118,20	110,10	0,75	0,80	2,99
Min.	1,49	3,06	2,23	0,32	1,40	2,22	15,79	43,69	27,79	0,28	0,31	0,35
Maks.	9,64	16,78	9,44	7,92	59,82	31,11	164,80	372,90	483,10	12,70	3,62	28,93

Dolny kwartyl	2,18	4,62	2,86	3,28	5,18	4,74	31,50	56,57	72,48	0,56	0,50	0,86
Górny kwartyl	6,24	7,86	5,92	5,32	18,64	9,02	42,74	197,50	146,50	0,90	1,18	7,84
±SD	2,30	3,66	2,00	1,85	14,32	6,01	34,61	92,35	97,07	3,45	0,91	7,11

Objaśnienia: b.s.- brak surowicy

W grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom hormonu folikulotropowego $4,95 \pm 2,30$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,57 mIU/ml, poziom maksymalny – 9,64 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom FSH $6,92 \pm 3,66$ mIU/ml (poziom minimalny – 2,90 mIU/ml, poziom maksymalny – 18,36 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik folikulotropiny $4,53 \pm 2,00$ mIU/ml (poziom minimalny – 1,71 mIU/ml, poziom maksymalny – 9,44 mIU/ml) (tabela 64).

W omawianej grupie osób średni poziom hormonu lutropowego $4,01 \pm 1,85$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,32 mIU/ml, poziom maksymalny – 18,74 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom lutropiny $13,45 \pm 14,32$ mIU/ml (poziom minimalny – 1,40 mIU/ml, poziom maksymalny – 65,80 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik LH $7,67 \pm 6,01$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,51 mIU/ml, poziom maksymalny – 31,11 mIU/ml) (tabela 64).

Również w tej grupie dokonano oznaczeń 17β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Odpowiednio otrzymano wartości średnie: $45,49 \pm 34,61$ pg/ml (poziom minimalny – 15,79 pg/ml, poziom maksymalny – 185,60 pg/ml), $138,33 \pm 92,35$ pg/ml (poziom minimalny – 26,31 pg/ml, poziom maksymalny – 466,20 pg/ml), $134,13 \pm 97,07$ pg/ml (poziom minimalny – 19,75 pg/ml, poziom maksymalny – 483,10 pg/ml) (tabela 64).

W grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom progesteronu $1,82 \pm 3,44$ ng/ml (poziom minimalny – 0,12 ng/ml, poziom maksymalny – 13,90 ng/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom $1,07 \pm 0,91$ ng/ml (poziom minimalny – 0,23 ng/ml, poziom maksymalny – 3,62 ng/ml), natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik progesteronu $5,47 \pm 7,11$ ng/ml (poziom minimalny – 0,21 ng/ml, poziom maksymalny – 26,83 ng/ml) (tabela 64).

6.3.3. Poziomy hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek palących tytoń

Dokonano oznaczeń poziomów hormonów lutropowego, folikulotropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy kobiet palących tytoń. Wyniki oznaczeń hormonów przedstawiono w tabeli 65.

Tab. 65 Wyniki poziomu hormonów lutropowego (LH), folikulotropowego (FSH), 17 β -estradiolu i progesteronu w surowicy krwi pacjentek palących tytoń

Lp.	FSH [mIU/ml]			LH [mIU/ml]			17 β -estradiol [pg/ml]			Progesteron [ng/ml]		
	Dzień cyklu											
	1	14	21	1	14	21	1	14	21	1	14	21
1	6,03	5,67	0,78	3,98	7,92	2,75	36,00	78,50	75,20	0,50	10,80	19,60
2	5,97	5,04	1,81	4,77	8,18	3,86	33,46	63,19	152,70	0,67	13,51	18,99
3	5,55	4,90	2,78	3,50	7,90	4,68	37,20	189,00	125,00	0,78	2,90	16,30
4	5,24	5,70	3,75	2,03	10,44	5,59	42,65	241,20	183,20	0,92	0,83	12,62
5	5,89	5,50	2,00	4,65	8,17	3,33	29,80	125,60	158,40	0,76	10,50	17,00
6	3,27	4,80	1,90	4,57	12,90	4,33	42,90	129,70	198,50	0,98	7,67	14,28
7	6,57	4,66	2,40	4,60	13,98	3,21	44,70	367,20	152,00	0,47	1,02	15,40
8	5,87	6,47	2,94	5,06	9,80	1,27	43,28	163,20	49,35	0,79	1,73	1,90
9	4,89	3,89	1,90	4,95	14,02	3,12	42,80	257,90	197,30	0,44	0,98	15,90
10	3,30	6,51	4,46	5,59	11,25	21,29	113,20	45,58	149,40	2,88	1,50	1,37
11	2,79	2,31	2,56	2,30	4,21	4,33	43,78	194,40	172,20	2,63	13,56	13,40
12	6,63	4,91	2,35	4,03	14,44	2,79	46,53	656,92	161,90	0,55	1,04	16,77
13	5,09	3,33	2,73	2,93	4,65	5,18	50,31	126,00	116,90	0,60	2,00	7,11
14	5,57	5,17	3,05	4,10	11,15	7,07	17,78	71,58	180,30	1,03	4,20	5,98

15	3,70	3,66	2,59	4,64	11,07	7,43	59,21	115,30	269,90	0,83	8,14	12,45
16	6,02	5,02	2,34	3,98	14,02	2,77	42,80	178,30	174,20	0,57	1,23	16,88
17	6,73	3,15	3,32	10,78	10,84	5,31	55,87	392,50	216,60	0,47	0,39	13,11
18	4,60	6,34	5,85	4,88	26,70	4,99	28,33	331,00	35,54	0,40	0,54	1,27
19	5,74	2,99	2,76	7,68	8,27	4,34	36,01	328,20	140,50	1,35	1,10	10,27
20	6,04	b.s.	b.s.	5,86	b.s.	b.s.	39,12	b.s.	b.s.	0,56	b.s.	b.s.
21	3,23	2,83	3,49	4,12	10,37	15,50	134,30	509,70	552,60	0,99	1,02	12,79
22	3,45	2,98	3,65	3,97	9,87	12,76	132,70	467,10	551,00	0,78	1,09	11,70
23	4,60	6,34	5,85	4,88	26,70	4,99	28,33	331,00	35,54	0,40	0,54	1,27
24	4,70	2,97	2,78	19,58	8,27	4,33	78,97	322,80	141,80	1,35	1,20	10,27
25	6,57	5,70	3,76	6,88	11,04	5,64	57,46	243,90	187,20	0,95	0,87	12,76
26	7,09	6,85	0,78	3,87	6,15	2,76	36,90	58,81	76,40	0,40	10,60	19,80
27	7,01	4,87	2,33	4,90	14,56	2,90	80,32	662,90	175,20	0,56	0,98	17,01
28	4,60	8,54	5,85	4,88	26,14	4,80	28,34	407,20	35,54	0,42	0,45	1,20
29	6,82	10,13	5,54	24,71	27,03	20,61	79,80	104,90	180,30	0,89	0,86	0,73
30	6,79	4,41	2,58	2,45	8,76	3,62	55,18	57,71	115,90	1,22	2,29	7,93
31	7,96	4,50	4,47	6,69	9,77	10,84	32,70	164,30	139,50	0,84	0,86	8,04
32	6,60	4,69	2,20	3,18	8,12	5,25	35,51	162,50	132,50	0,98	0,82	10,93
33	6,52	9,45	2,93	6,94	6,87	1,98	28,80	85,48	104,20	0,46	3,59	9,27
34	6,38	3,50	2,08	4,26	8,96	3,01	23,21	83,13	250,00	0,41	2,26	9,84

35	5,48	6,66	4,94	5,42	37,26	5,11	49,86	385,70	41,15	0,90	1,36	0,89
36	6,27	9,18	5,26	17,29	26,73	20,46	48,50	105,60	176,90	0,96	0,78	0,85
37	6,85	4,32	2,53	2,78	8,82	3,67	45,80	59,68	121,50	1,02	2,29	7,49
38	6,58	4,12	7,56	37,68	9,48	6,60	377,70	170,70	30,32	1,49	0,73	0,69
39	6,63	4,62	2,29	3,28	8,30	5,40	33,63	164,00	143,20	1,05	0,80	11,99
40	6,43	9,12	2,94	6,79	6,65	1,98	29,01	90,76	100,30	0,51	4,22	9,61
41	6,39	3,47	2,04	4,38	8,70	2,92	26,92	82,88	257,00	0,35	2,37	9,72
42	16,57	14,63	4,81	5,58	15,85	3,02	30,90	31,02	104,20	0,83	1,70	11,87
43	4,16	4,27	3,53	6,99	8,33	5,03	293,00	170,60	86,44	0,71	12,46	3,06
44	7,09	7,88	2,97	9,38	16,53	4,81	19,45	180,70	186,70	0,88	1,32	13,81
45	6,79	b.s.	b.s.	7,26	b.s.	b.s.	19,23	b.s.	b.s.	0,49	b.s.	b.s.
46	5,48	6,66	4,94	5,42	37,26	5,11	49,86	385,70	41,15	0,90	1,36	0,89
47	16,40	13,99	4,68	5,59	15,51	2,89	27,34	24,05	92,76	0,78	1,73	12,41
48	7,86	2,88	2,99	16,88	4,65	4,70	200,20	204,80	186,20	1,62	15,52	13,82
49	6,89	2,67	2,22	17,43	3,89	4,01	189,70	199,40	154,91	1,54	16,90	6,40
50	5,54	13,36	2,43	6,15	52,54	3,99	40,56	357,80	106,50	0,93	0,63	4,03
51	5,20	5,10	4,90	4,06	4,39	2,38	29,48	75,04	132,70	0,46	0,80	6,39
52	5,35	13,61	3,30	3,74	47,72	4,78	60,54	528,70	143,70	0,42	1,34	4,34
53	7,65	2,27	2,35	7,70	5,07	4,99	35,53	250,00	248,40	0,27	15,80	14,59
54	7,61	5,20	3,30	4,71	7,42	7,48	37,84	190,90	160,10	0,57	0,57	15,36

55	6,18	8,59	3,20	2,52	12,54	3,20	82,04	124,50	29,15	0,89	0,64	8,15
56	12,56	54,20	12,04	10,90	35,55	18,65	8,90	5,99	300,21	0,21	0,90	0,80
57	4,28	4,28	6,80	5,21	1,90	6,11	116,00	35,70	110,70	14,12	5,42	1,81
58	6,35	4,23	2,04	6,96	15,24	2,86	62,26	770,70	119,60	0,40	1,57	0,85
59	5,42	3,84	3,51	5,28	9,93	10,09	35,17	205,60	105,40	0,78	0,96	8,09
60	4,27	5,02	6,84	6,37	20,35	12,86	13,37	297,50	31,67	0,56	0,79	0,53
61	4,17	7,09	4,98	3,58	10,73	17,48	42,33	45,32	44,25	0,42	0,32	8,15
62	5,67	14,28	6,87	4,09	65,80	2,98	32,90	298,70	33,20	1,09	1,02	1,99
N	62	60	60	62	60	60	62	60	60	62	60	60
Średnia	6,19	6,72	3,61	6,77	14,83	6,17	60,58	219,31	147,92	1,03	3,42	9,04
Mediana	6,02	5,02	2,98	4,89	10,40	4,74	42,49	174,50	141,15	0,78	1,27	9,66
Min.	2,79	2,27	0,78	2,03	1,90	1,27	8,90	5,99	29,15	0,21	0,32	0,53
Maks.	16,57	54,20	12,04	37,68	65,80	21,29	377,70	770,00	552,60	14,12	16,90	19,80
Dolny kwartyl	5,09	4,00	2,35	4,03	8,17	3,07	30,90	84,30	86,53	0,47	0,85	2,52
Górny kwartyl	6,73	6,75	4,74	6,88	15,37	5,87	57,46	325,50	180,30	0,98	3,24	13,60
±SD	2,41	6,94	1,89	5,89	12,46	4,93	63,05	169,89	99,69	1,76	4,53	5,89

Objaśnienia: b.s.- brak surowicy

W grupie kobiet palących tytoń stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom hormonu folikulotropowego $6,19 \pm 2,41$ mIU/ml (poziom minimalny – 2,79 mIU/ml, poziom maksymalny – 16,57 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom FSH $6,72 \pm 6,94$ mIU/ml (poziom minimalny – 2,31 mIU/ml, poziom maksymalny – 14,63 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik folikulotropiny $3,61 \pm 1,89$ mIU/ml (poziom minimalny – 0,78 mIU/ml, poziom maksymalny – 7,56 mIU/ml) (tabela 65).

W omawianej grupie osób średni poziom hormonu lutropowego $6,77 \pm 5,89$ mIU/ml (poziom minimalny – 2,03 mIU/ml, poziom maksymalny – 37,68 mIU/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom lutropiny $14,83 \pm 12,46$ mIU/ml (poziom minimalny – 3,89 mIU/ml, poziom maksymalny – 37,26 mIU/ml). Natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik LH $6,17 \pm 4,93$ mIU/ml (poziom minimalny – 1,27 mIU/ml, poziom maksymalny – 21,29 mIU/ml) (tabela 65).

Również w tej grupie dokonano oznaczeń 17β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Odpowiednio otrzymano wartości średnie: $60,59 \pm 63,05$ pg/ml (poziom minimalny – 17,78 pg/ml, poziom maksymalny – 377,70 pg/ml), $219,31 \pm 169,89$ pg/ml (poziom minimalny – 24,05 pg/ml, poziom maksymalny – 662,90 pg/ml), $147,92 \pm 99,69$ pg/ml (poziom minimalny – 30,32 pg/ml, poziom maksymalny – 552,60 pg/ml) (tabela 65).

W grupie kobiet palących tytoń stwierdzono w 1 dniu cyklu miesięczkowego średni poziom progesteronu $1,03 \pm 1,76$ ng/ml (poziom minimalny – 0,35 ng/ml, poziom maksymalny – 2,88 ng/ml). W 14 dniu cyklu miesięczkowego badanych oznaczono średni poziom $3,42 \pm 4,53$ ng/ml (poziom minimalny – 0,39 ng/ml, poziom maksymalny – 16,90 ng/ml), natomiast w 21 dniu otrzymano średni wynik progesteronu $9,05 \pm 5,89$ ng/ml (poziom minimalny – 0,69 ng/ml, poziom maksymalny – 19,80 ng/ml) (tabela 65).

6.4. Podsumowanie parametrów toksykologicznych

6.4.1. Zmiany poziomów kotyniny w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego

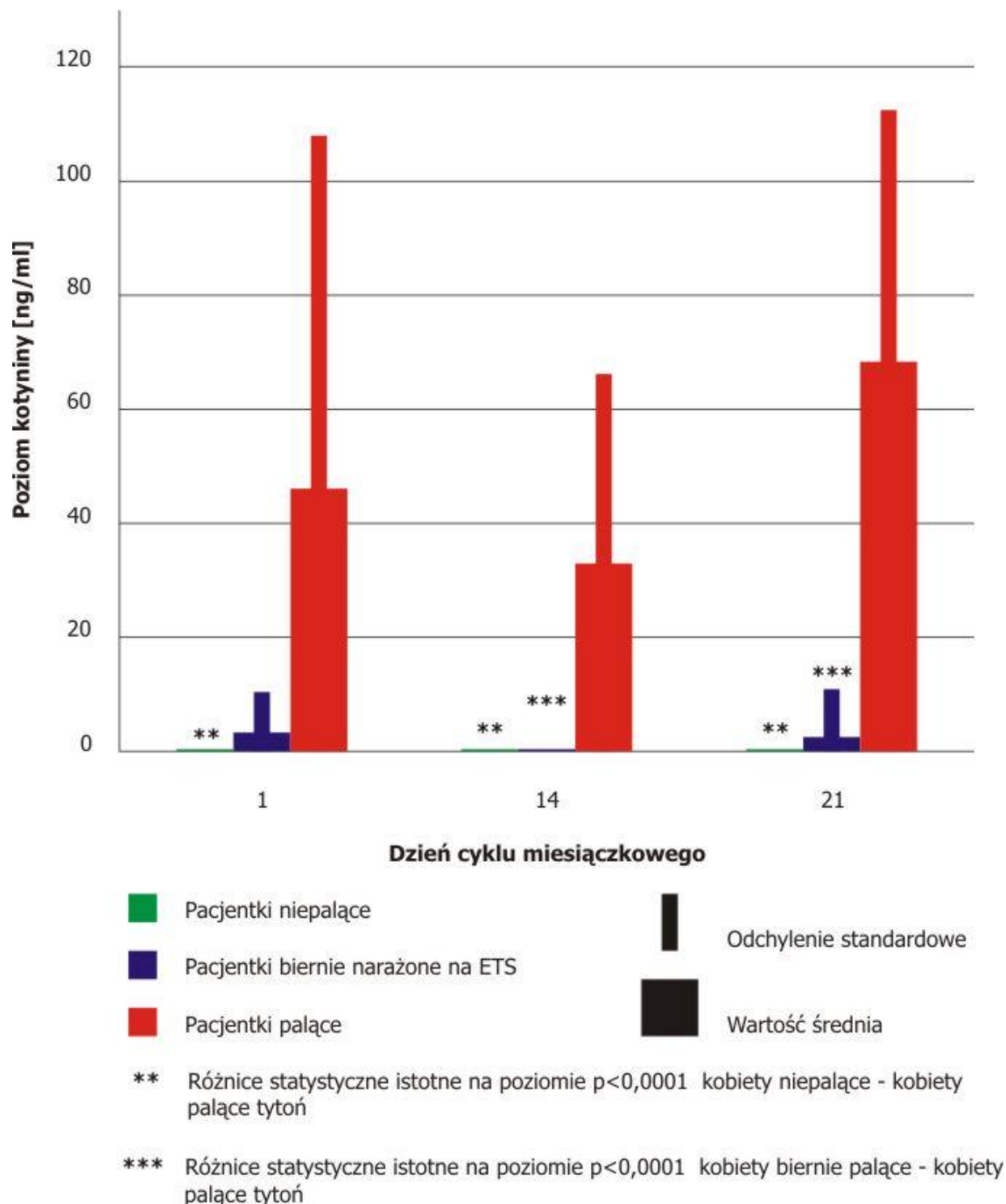
Na podstawie badań toksykologicznych przeprowadzonych w surowicy krwi kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego nie stwierdzono obecności głównego metabolitu nikotyny – kotyniny (rycina 47).

Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano oceny zależności pomiędzy stężeniem kotyniny w grypach pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie. Stwierdzono, że poziomy kotyniny w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego różnią się pomiędzy grupami pacjentek niepalących oraz palących tytoń.

W przeprowadzonych badaniach dokonano również oceny zależności pomiędzy stężeniem kotyniny w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń w czternastym dniu cyklu miesięczkowego. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie. Stwierdzono, że poziomy kotyniny w czternastym dniu cyklu miesięczkowego różnią się pomiędzy grupami pacjentek niepalących a kobietami palącymi tytoń. Również zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy kobietami niepalącymi a biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego.

W badaniach dokonano oceny zależności pomiędzy stężeniem kotyniny w grupach pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie. Stwierdzono, że poziomy kotyniny w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego różnią się pomiędzy grupami pacjentek niepalących, a osobami palącymi tytoń, a także pomiędzy grupą kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i grupą palącą tytoń.

Stężenia kotyniny w poszczególnych dniach cyklu miesięczkowego (1, 14, 21) w surowicy krwi pacjentek niepalących, biernie narażonych na dym i palących tytoń zaprezentowano na rycinie 47.



Ryc. 47 Zmiany poziomów kotyniny w czasie w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego

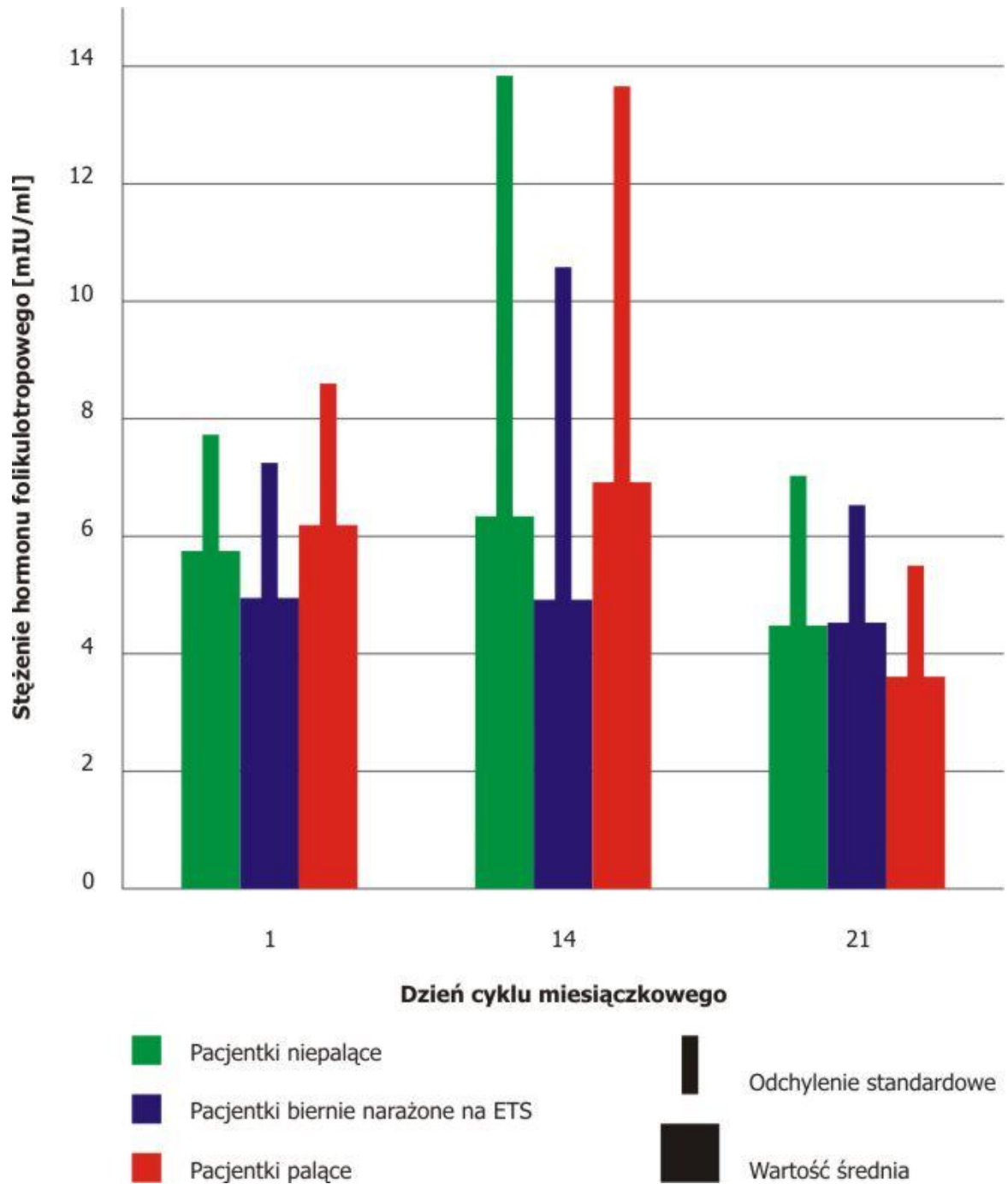
6.4.2. Zmiany poziomów hormonów w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego

6.4.2.1. Hormon folikulotropowy (FSH)

W grupie kobiet niepalących oraz nienarażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie hormonu folikulotropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności drugim pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu, oraz różnice istotne statystycznie na pierwszym poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu.

W grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie hormonu folikulotropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności pierwszym pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu, oraz różnice istotne statystycznie na pierwszym poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu.

Również w grupie kobiet palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu folikulotropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu, oraz różnice istotne statystycznie na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu folikulotropowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu. Zmiany poziomu hormonu folikulotropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 48.



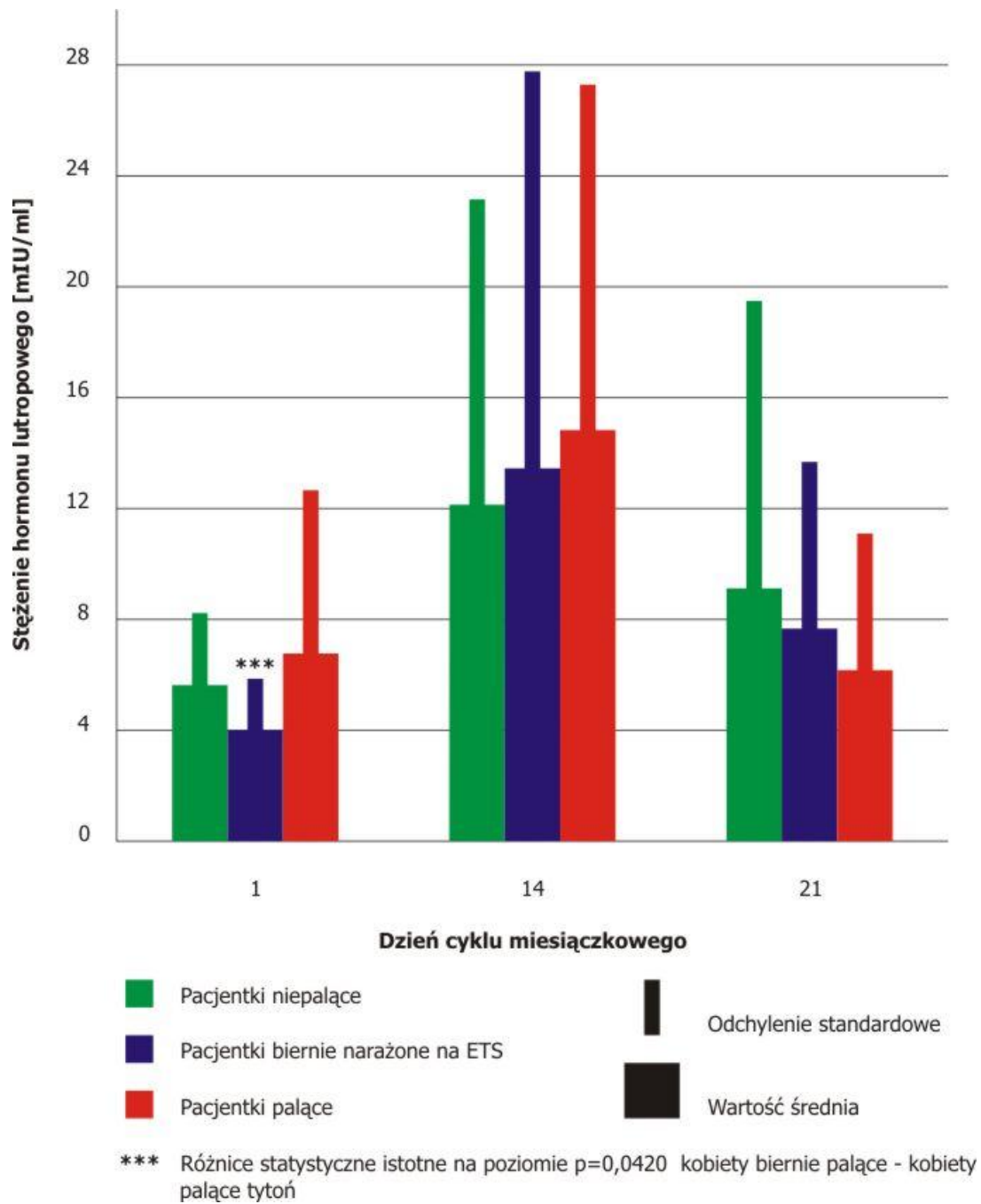
Ryc. 48 Zmiany poziomu hormonu folikulotropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy

6.4.2.2. Hormon lutropowy LH

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności drugim pomiędzy poziomem hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu, oraz różnice istotne statystycznie na pierwszym poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu lutropowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu.

W grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na drugim poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu lutropowego pierwszym a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego.

Również w grupie kobiet palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem hormonu lutropowego czternastym a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego. Zmiany poziomu hormonu lutropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 49.



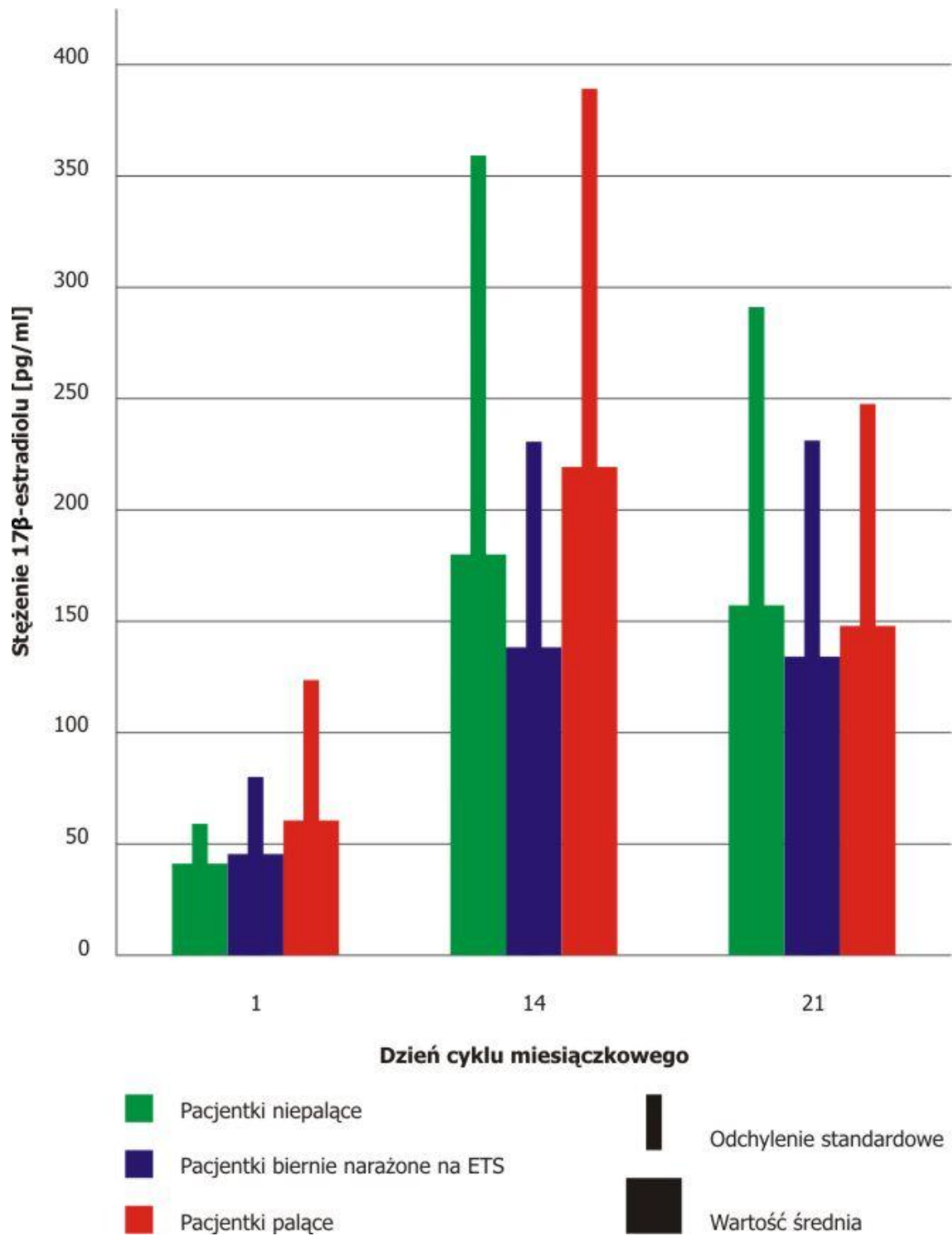
Ryc. 49 Zmiany poziomu hormonu lutropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy

6.4.2.3. 17 β -estradiol

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie 17 β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu czternastym, a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego.

W grupie kobiet narażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie 17 β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu czternastym a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego.

Również w grupie kobiet palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie 17 β -estradiolu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem 17 β -estradiolu czternastym a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego. Zmiany poziomu 17 β -estradiolu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 50.



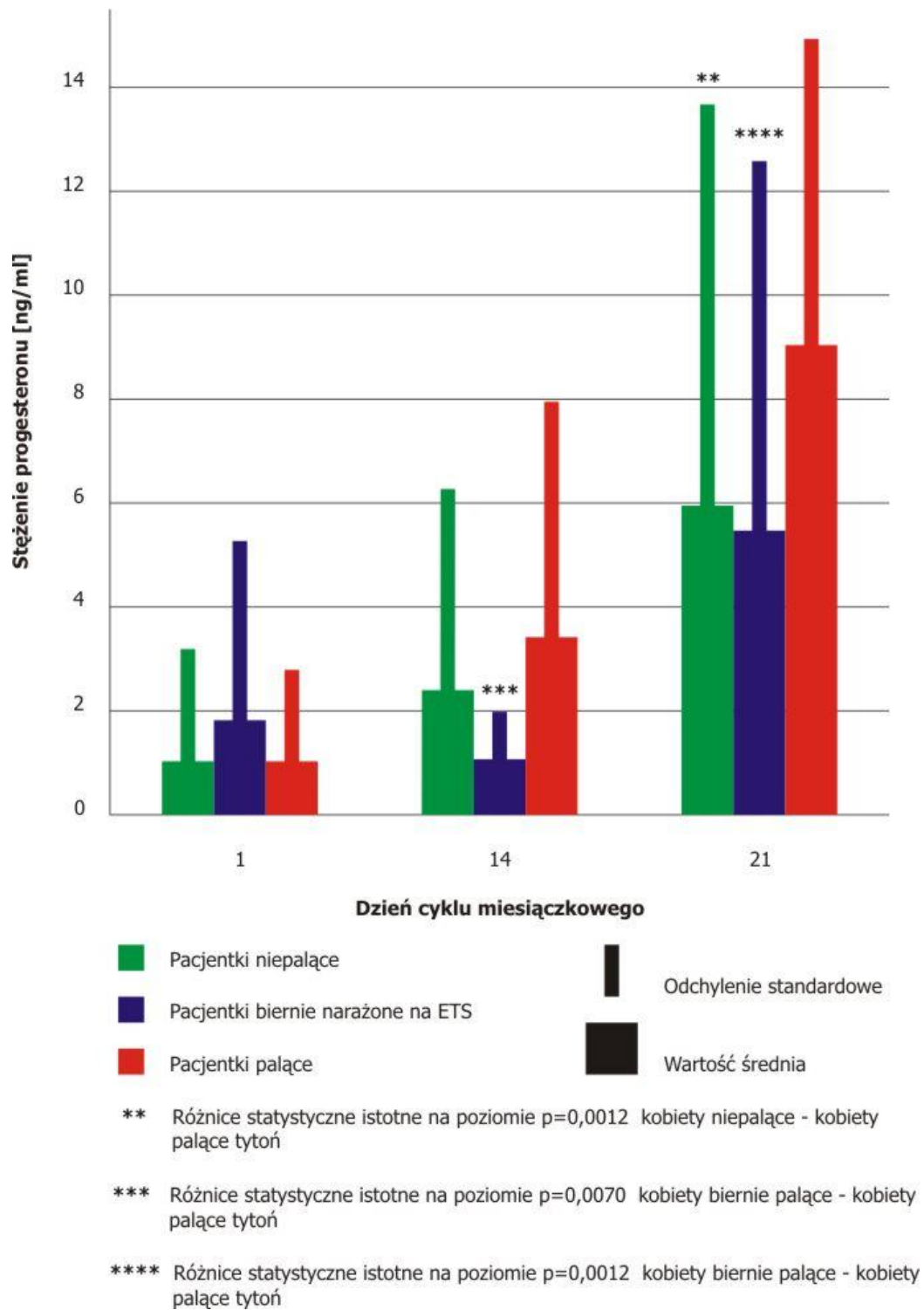
Ryc. 50 Zmiany poziomu 17β-estradolu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy

6.4.2.4. Progesteron

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności drugim pomiędzy poziomem progesteronu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu.

W grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności pierwszym pomiędzy poziomem progesteronu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a dwudziestym pierwszym dniem cyklu.

Również w grupie kobiet palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Stwierdzono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności drugim pomiędzy poziomem progesteronu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego a czternastym dniem cyklu. Zaobserwowano również różnice statystycznie istotne na trzecim poziomie istotności pomiędzy poziomem progesteronu czternastym a dwudziestym pierwszym dniem cyklu miesięczkowego oraz różnice statystycznie istotne na poziomie istotności trzecim pomiędzy poziomem progesteronu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego, a dwudziestym pierwszym dniem cyklu. Zmiany poziomu progesteronu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 51.



Ryc. 51 Zmiany poziomu progesteronu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy

6.4.3. Zbadanie zależności poziomu hormonów względem biernego narażenia na dym i palenia tytoniu w czasie w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego

6.4.3.1. Hormon folikulotropowy (FSH)

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu folikulotropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie FSH w czternastym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu folikulotropowego w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. Zmiany poziomu hormonu folikulotropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 48.

6.4.3.2. Hormon lutropowy LH

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Zaobserwowano istnienie różnic

istotnych statystycznie. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że poziomy hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego różni się pomiędzy grupami pacjentek biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego oraz palącymi.

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

Również w grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie hormonu lutropowego w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. Zmiany poziomu hormonu lutropowego oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 49.

6.4.3.3. 17 β -estradiol

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie 17 β -estradiolu w pierwszym, czternastym i dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w żadnym z omawianych dni. Zmiany poziomu 17 β -estradiolu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 50.

6.4.3.4. Progesteron

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w czternastym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Zaobserwowano istnienie różnic istotnych statystycznie. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że poziomy progesteronu w czternastym dniu cyklu miesięczkowego różnią się pomiędzy grupami pacjentek palących a biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego

W grupie kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń dokonano oceny zmian w poziomie progesteronu w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego względem ekspozycji i palenia tytoniu. Zaobserwowano istnienie różnic istotnych statystycznie. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że poziomy progesteronu w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego różnią się pomiędzy grupami pacjentek niepalących i palących, a także niepalącymi i biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego. Zmiany poziomu progesteronu oraz zależności pomiędzy stężeniami hormonów względem narażenia na ekspozycję lub dym tytoniowy przedstawiono na rycinie 51.

6.4.4. Zbadanie zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poszczególnymi hormonami

Ponieważ wyniki oznaczenia kotyniny u pacjentek niepalących wynoszą 0 nie można zbadać oczekiwanych zależności w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego.

W pierwszym dniu cyklu miesięczkowego w grupie kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego dokonano oceny zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poziomami hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu. Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie.

W pierwszym dniu cyklu miesięczkowego w grupie pacjentek palących tytoń dokonano oceny zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poziomami hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu. Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie.

Ponieważ wyniki oznaczenia kotyniny u pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego wynoszą 0 nie można zbadać oczekiwanych zależności w 14 dniu cyklu miesięczkowego.

W czternastym dniu cyklu miesięczkowego w grupie osób palących tytoń dokonano oceny zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poziomami hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu. Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie

Także w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego w grupie pacjentek biernie narażonych na ETS dokonano oceny zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poziomami hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu. Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie

W dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego dokonano również oznaczenia zależności pomiędzy poziomem kotyniny a poziomami hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu i progesteronu w grupie kobiet palących. Stwierdzono istnienie zależności istotnych statystycznie. Ponieważ R_s posiada

wartość ujemną, to należy stwierdzić, że wzrost poziomu 17β -estradiolu we krwi powoduje spadek poziomu kortyniny we krwi.

VII. DYSKUSJA

Pomimo wzrastającej świadomości społeczeństwa dotyczącej skutków zdrowotnych jakie niesie za sobą palenie tytoniu oraz bierne inhalowanie dymu tytoniowego, a także prowadzonych na szeroką, światową skalę kampanii antynikotynowych nałóg ten stanowi w świecie nadal zjawisko powszechne.

Z Raportu FCA (Framework Convention Alliance) opublikowanego w 2010 r. wynika, że obecnie na świecie pali tytoń 1 miliard ludzi, natomiast 1,8 miliarda osób niepalących jest narażonych na działanie środowiskowego dymu tytoniowego [FCA, 2010]. Mackay i Eriksen w Raporcie podają, że aktualnie na świecie pali 250 milionów (22,9%) kobiet. Liczba osób palących tytoń zmniejsza się w krajach bogatych (m. in. w USA, Wielkiej Brytanii, Japonii) natomiast nadal wzrasta w krajach rozwijających się [Mackay and Eriksen, 2002].

Poddanie analizie liczby wypalanych wyrobów tytoniowych w ostatnich dwudziestu latach w Europie prowadzi do obserwacji tendencji spadkowej nawet o 1/5, przeciwnie do krajów rozwijających się, w których widoczny jest wzrost spożycia tychże wyrobów, nawet o 3,5% w ciągu roku. Komisja Europejska w swoim Raporcie donosi, że 28% Europejczyków w wieku 15 lat i starszych pali [Komisja Europejska, 2012]. Według przewidywań liczba ta będzie wzrastała i osiągnie prawdopodobnie około 1,6 miliarda osób w 2025 roku [Peto et al., 1992; WHO, 1997; Peto et al., 2006].

Polska od ponad 20 lat jest jednym z krajów o najwyższym na świecie spożyciu tytoniu. Dane statystyczne określają, że ok. 21% dorosłych kobiet pali tytoń. Główny Inspektorat Sanitarny w 2011 roku przedstawił Raport, z którego wynika, że 23% kobiet pali tytoń. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia aż 57% dziewcząt w Polsce paliło papierosa, a 11% z nich miało kontakt z papierosem przed ukończeniem 10 roku życia [Florek i wsp. 2001; Piekoszewski i Florek, 2006; Florek i Piekoszewski, 2010]. Uzależnienie to dotyka ludzi niezależnie od wykształcenia, zamożności czy warstwy społecznej. Coraz częstszymi konsumentami wyrobów tytoniowych są kobiety młode, wykształcone, dbające o urodę i zdrowie [Andrews and Heath, 2003].

Globalnie szacuje się, że na działanie środowiskowego dymu tytoniowego narażonych jest ok. 50 milionów kobiet, co wywiera negatywne skutki zdrowotne [Raupach et al., 2006; Flouris et al., 2008]. Palenie tytoniu przez członków rodziny, a także w miejscu pracy, kawiarniach, restauracjach i pubach może być znaczącym źródłem biernego narażenia na dym tytoniowy [Pirkle et al., 1996; Ownby et al., 2000; Kaufman et al., 2002]. Z danych WHO z 2010 roku wynika, że 40,2% dorosłych (43,6% osób inhalujących tytoń to kobiety) narażonych jest na działanie środowiskowego dymu tytoniowego w domu. Badania przeprowadzone w Wielkopolsce w populacji kobiet w wieku prokreacyjnym wykazały, że 22% z ankietowanych było osobami palącymi tytoń, natomiast 66% respondowanych kobiet wskazywało na bierne narażenie na dym. Kobiety biernie palące deklarowały narażenie na dym tytoniowy w domu (35%), w pracy (27%), a także podczas spotkań towarzyskich i w czasie rekreacji (44%) [Florek i wsp., 2001; Florek i Piekoszewski, 2007].

Badania dowodzą, że w krajach rozwiniętych niepłodność dotyczy co 10-15 pary. Najczęściej przyczyną jest palenie tytoniu wśród kobiet, ze względu na toksyczny wpływ składników dymu tytoniowego na homeostazę hormonalną, gametogenezę, owulację, transport jajowodowy, zapłodnienie i implantację zapłodnionej komórki [Zeneset al., 1997; Billert i Florek, 2010].

Celem badań była ocena wpływu palenia tytoniu, a także biernego narażenia na działanie dymu tytoniowego na cykl miesięczkowy kobiet poprzez wykonanie oznaczeń poziomów hormonów lutropowego, folikulotropowego, 17β -estradiolu oraz progesteronu w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. Oceniony został również poziom kotyniny, głównego metabolitu nikotyny w surowicy krwi badanych kobiet.

Grupę badawczą stanowiło 156 kobiet. Do badań zostały zakwalifikowane pacjentki zdrowe, które nie stosowały antykoncepcji hormonalnej, nie miały zaburzeń pracy tarczycy. Do badania włączono pacjentki, które przebyły resekcję, całkowitą bądź częściową tarczycy jednak poziomy hormonów tarczycowych były wyrównane.

W badaniach własnych kobiety podzielono na trzy grupy badawcze w zależności od stopnia narażenia na działanie dymu tytoniowego: kobiety niepalące, biernie narażone na działanie dymu oraz palące. Pacjentki zostały zakwalifikowane do poszczególnych grup na podstawie deklaracji uzyskanych podczas przeprowadzania

wywiadu (kwestionariusz zawierający 21 pytań). Potwierdzeniem prawidłowego przyporządkowania pacjentek do poszczególnych grup było przeprowadzone badanie poziomu kotyniny (głównego metabolitu nikotyny) w surowicy krwi badanych kobiet w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. W wyniku analizy uzyskanych wyników poziomu kotyniny w surowicy krwi badanych osób dokonano przesunięcia pacjentek z grupy osób niepalących do grupy kobiet palących tytoń ze względu na wysokie stężenia tego metabolitu. Zmiany dokonano w 13 przypadkach. Obecność kotyniny w surowicy krwi pacjentek mogła być wynikiem okazjonalnego palenia tytoniu przez te kobiety. Obecna w surowicy krwi kotynina może w sposób znaczący wpływać na zmiany w poziomach oznaczanych hormonów: folikulotropowego, lutropowego, 17 β - estradiolu czy progesteronu.

W badaniach epidemiologicznych oceny palenia tytoniu lub biernego narażenia na dym, autorzy dokonywali na podstawie przeprowadzanych wywiadów. Obserwowane były w tych pracach nieprawidłowości wynikające z błędnej samooceny respondowanych pacjentów, nieprawidłowo lub niedokładnie zadanych pytań, błędnie dokonanej oceny narażenia na dym przez ankietowanych, a także niewiarygodnych odpowiedzi. Z tego powodu badania ankietowe, choć bardzo rzadko, są uzupełniane i potwierdzane badaniami toksykologicznymi poprzez oznaczenie jednego lub kilku biomarkerów o różnej specyficzności [Benowitz, 1996; Benowitz, 1999; Piekoszewski i Florek, 2001; Florek et al., 2007]. Uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają rezultaty innych autorów, które również wskazują na konieczność oznaczania biomarkerów dla uznania wiarygodności odpowiedzi respondentów udzielanych w kwestionariuszach na temat palenia lub biernego narażenia na dym tytoniowy [Cummings et al., 1990; Perez-Stalbe et al., 1992]. W badaniach przeprowadzonych przez Florek i współpracowników w Ginekologiczno – Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu również wykazano wysokie poziomy kotyniny u kobiet deklarujących niepalenie [Florek i wsp., 2004]. Wyniki badań, w których określono wysokie stężenia kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny oraz ich glukuronidów w moczu kobiet ciężarnych nie deklarujących palenie tytoniu potwierdzają konieczność weryfikacji danych ankietowych uzyskanych od kobiet biorących udział w projekcie [Kędziora i wsp., 2007]. W badaniach przeprowadzonych przez Seńczuk i wsp. dokonano oceny poziomu kotyniny w moczu kobiet, które deklarowały niepalenie tytoniu. Badanie dowiodło, że pacjentki były biernie narażone na dym tytoniowy [Florek i wsp., 2006; Seńczuk i wsp., 2007].

W grupie kobiet deklarujących palenie tytoniu, u których średnio poziomy kotyniny wynosiły 46,08 ng/ml, 32,96 ng/ml, 68,35ng/ml odpowiednio w pierwszym, czternastym i dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego, obserwowano pacjentki, u których poziom kotyniny wyznaczono poniżej granicy oznaczalności. Fakt ten można wytłumaczyć małą liczbą wypalanych papierosów oraz dłuższym okresem, który upłynął od wypalenia ostatniego papierosa do pobrania krwi pacjentki. Dwa najważniejsze związki zawarte w kawie i tytoniu, nikotyna i kofeina, mogą wpływać na swoje stężenia w organizmie, jak i na działanie farmakodynamiczne. Interakcje były przedmiotem badań wielu autorów [Benowitz and Jacob, 2001; Florek i wsp., 2009].

Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy wśród kobiet w wieku prokreacyjnym stanowi bardzo poważny problem toksykologiczny. Nikotyna jest alkaloidem tytoniu, który może być wykorzystywany do oceny narażenia na składniki dymu tytoniowego jednak ze względu na zbyt krótki biologiczny okres półtrwania nie znalazł zastosowania w praktyce [Benowitz et al., 2002]. Wielu badaczy dokonuje oceny kotyniny (metabolitu nikotyny) posiadającej biologiczny okres półtrwania ok. 17 godzin jako biomarkera aktywnego i biernego palenia [Naidong et al., 2001; St. Charles et al., 2006; Wiergowski i wsp., 2006]. W wielu badaniach wykazano korelacje pomiędzy poziomem kotyniny a liczbą wypalanych papierosów w ciągu dnia [Radwan, 2000]. Soldin i wsp. w przeprowadzonych badaniach wykazali rozbieżności pomiędzy deklaracjami pacjentów dotyczącymi palenia tytoniu lub biernego narażenia na dym tytoniowy a poziomami kotyniny w surowicy krwi wynikające ze świadomego, bądź nieświadomego przeszacowania narażenia na dym lub z przekroczenia limitu 24 godzin od ekspozycji [Soldin et al., 2011]. Przydatność kotyniny do oceny narażenia na działanie dymu tytoniowego jest wykorzystywana i potwierdzana przez wielu badaczy [Wall et al., 1988; Benowitz, 1999; Benowitz et al., 2009a; Benowitz et al., 2009b].

W badaniach własnych 87,76% kobiet w grupie biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego było w wieku 20-29 lat. Podobny rozkład wiekowy (około 75%) osób biernie narażonych dym tytoniowy odnotowano w badaniach Hanke i wsp., a także Adamek [Hanke i wsp., 1999; Adamek, 2004].

Populacja kobiet palących tytoń, biorących udział w badaniach własnych również była największą w tej grupie wiekowej i stanowiła 61,90%. Główny Urząd

Statystyczny w Europejskim Ankietowym Badaniu Zdrowia w 2009 roku potwierdził, że najczęściej palenie tytoniu obserwowano w tej grupie wiekowej kobiet [GUS, 2010].

W badaniach własnych stwierdzono, że największą grupą pacjentek niepalących (40,48%) oraz biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego (38,78%) stanowiły kobiety o masie ciała 60-69 kg, natomiast wśród osób palących tytoń większość respondentek (42,86%) miało masę ciała w zakresie 50-59 kg.

W badaniach Wierzejewskiej i wsp. wskazano istnienie mechanizmu, poprzez który nikotyna może brać udział w regulacji masy ciała wpływając na zwiększanie wydatku energetycznego organizmu i zmniejszone łaknienie [Wierzejewska i Jarosz, 2008]. Lazurova i Dravecka wykazały w badaniach, że bardzo niska oraz bardzo wysoka masa ciała są w równym stopniu odpowiedzialne za występowanie zaburzeń cyklu miesięczkowego ze względu na zmiany metabolizmu estrogenów [Lazurova and Dravecka, 2002]. W badaniach Pasaquali i Gambineri wykazano, że otyłość może prowadzić do zaburzeń funkcji jajników i wydzielania androgenów, a w konsekwencji do niepłodności [Pasaquali and Gambineri, 2006]. Również w pracach Allahbadii i Merchant podkreślali wpływ otyłości na występowanie zaburzeń cyklu miesięczkowego [Allahbadia and Merchant, 2008]. Gallicchio i wsp. obserwowali, że u kobiet bardzo otyłych poziom 17β -estradiolu jest niższy w porównaniu z pacjentkami o wyrównanej masie ciała [Gallicchio et al., 2005].

Większość kobiet biorących udział w badaniach nie rodziła przed rozpoczęciem programu badawczego. W grupie niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń było to odpowiednio 71,43%, 93,88% oraz 73,02%. Również zdecydowana większość kobiet biorących udział w badaniach deklarowała chęć posiadania dziecka, jednak nie planowała porodu w najbliższej przyszłości. Zaobserwowano, że przesunięcie granicy wiekowej odpowiedniej do urodzenia pierwszego dziecka na wiek późniejszy niż 20-29 lat koreluje z doniesieniami innych autorów. Stanowi to społeczny problem, który powoduje zmniejszenie szansy u zwlekających z decyzją o macierzyństwie kobiet na urodzenie zdrowego potomstwa [Florek i wsp. 2008].

Badacze podkreślają, że aktualne uwarunkowania społeczno-ekonomiczne powodują, że kobieta odkłada decyzję o macierzyństwie, aż do momentu osiągnięcia

odpowiedniej pozycji materialnej i zawodowej. Stąd kobiety rodzą pierwsze dziecko w znacznie późniejszym wieku. Neels i wsp. w przeprowadzonych badaniach stwierdzili, że aktualna sytuacja socjoekonomiczna w Europie, a także wysokie bezrobocie spowodowało, że większość wykształconych osób planuje urodzenie pierwszego dziecka po 30 roku życia. Często niesie to za sobą poważne implikacje zdrowotne [Neels et al., 2012].

W badaniach własnych odnotowano dane dotyczące poronienia w poszczególnych grupach badawczych – niepalących, biernie narażonych i palących tytoń, których odsetek wynosił odpowiednio 14,29%, 2,04% i 3,17%.

Arffin i wsp. wykazali, że kobiety biernie narażone na działanie dymu tytoniowego częściej narażone są na poronienia [Arffin et al., 2012]. Blanco-Muñoz i wsp. stwierdzili wzrost częstości występowania poronień w grupie kobiet palących tytoń [Blanco-Muñoz et al., 2009]. Baba ze wsp. potwierdził te wyniki w swych badaniach wskazując palenie tytoniu jako czynnik ryzyka poronień w I trymestrze ciąży [Baba et al., 2011]. Również dowiedziono negatywny wpływ na przebieg ciąży i rozrój płodu u kobiet palących i biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego [Król i wsp., 2009; Adamek i wsp., 2009; Florek i Piekoszewski, 2010].

Większość pacjentek biorących udział w badaniach własnych we wszystkich grupach (niepalące 28,57%, biernie narażone na działanie dymu tytoniowego 34,69% oraz palące 28,57%) zaobserwowało wystąpienie pierwszej miesiączki w 13 roku życia.

Zaworski w badaniach przeprowadzonych w latach 2004-2006 wskazał, że obecnie obniżył się wiek pierwszej miesiączki i przypada na 13,3 rok życia [Zaworski, 2008]. Adair prowadząc badania w Północnej Karolinie określił, że pierwsza miesiączka u dziewcząt najczęściej występuje w 13 roku życia. Wyniki tych badań korelują z wynikami przeprowadzonych badań własnych [Adair, 2001].

W pracy do oznaczenia poziomu kotyniny – głównego metabolitu nikotyny w surowicy krwi pacjentek biorących udział w badaniach wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczonej z detekcją diodową po uprzedniej ekstrakcji techniką ciec-ciecz.

Do tej pory opracowano wiele metod oznaczania kotyniny w materiale biologicznym (surowica, mocz, ślina, włosy), jednak najczęściej stosowane są metody chromatograficzne z różnymi detektorami (spektrofotometryczne, diodowe, masowe) [Piekoszewski i wsp., 2009; Florek i wsp., 2009; Talhout et al., 2011]. Metody immunologiczne wykorzystywane do wyznaczania poziomów kotyniny są rzadziej stosowane ze względu na reakcje krzyżowe z innymi metabolitami nikotyny powodujące wyniki fałszywie dodatnie [Benowitz et al., 2002; Stanek i wsp., 2007]. Zasadnicze różnice pomiędzy wymienionymi technikami analitycznymi wynikają z czułości danej metody. Ma to wymierny efekt w przypadku zastosowanego do oznaczeń materiału biologicznego. Taką rozbieżność w oczekiwanej ilości metabolitu nikotyny, jakim jest kotynina obserwuje się w porównaniu surowicy, śliny i moczu, w którym jego stężenie może być nawet kilka razy wyższe [Bentley et al., 1999].

W badaniach własnych zaobserwowano znaczną ilość pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego (31, 38, 35 osób odpowiednio w pierwszym, czternastym i dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego), u których wyniki poziomu kotyniny były poza granicą oznaczalności. Wskazywało to, że kobiety były biernie narażone na działanie dymu tytoniowego w niewielkim stopniu oraz, że pobranie krwi nastąpiło po dłuższym okresie od ostatniej ekspozycji na dym. Przyspieszony metabolizm nikotyny spowodował uzyskane w badaniach własnych wyniki stężenia kotyniny - głównego metabolitu nikotyny. Również w przypadku pacjentek palących tytoń odnotowano wyniki poza granicą oznaczalności. Oznaczenia na tym poziomie mogły być spowodowane wydłużonym okresem od zapalenia ostatniego papierosa do pobrania krwi do badań.

Szybkość metabolizmu i eliminacji nikotyny i jej metabolitu - kotyniny jest uwarunkowana osobniczo, ale również wieloma czynnikami. Wśród czynników wpływających na szybkość eliminacji nikotyny z organizmu wymienia się czynniki fizjologiczne, takie, jak dieta, wysiłek fizyczny (powodują zmiany w przepływie wątrobowym krwi wpływając na szybkość eliminacji). W wieku podeszłym obniża się aktywność izoenzymu CYP2A6, co powoduje obniżenie klirensu nikotyny nawet o 23%. Istnieją różnice pomiędzy kobietami a mężczyznami w metabolizowaniu nikotyny. Kobiety wykazują krótszy okres biologicznego półtrwania dla kotyniny [Benowitz et al., 2009]. Dokonano porównania stosunku nikotyny do kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny i wykazano znacznie niższe wartości kotyniny u kobiet. Potwierdza to

wskazanie na szybszy metabolizm nikotyny [Hukkanen et al., 2005; Kędziora i wsp., 2007].

Kendall wraz ze współpracownikami wykazali również znaczne rozbieżności pomiędzy deklarowanym narażeniem na dym tytoniowy a uzyskanymi poziomami kotyniny w surowicy krwi. Świadczy to o tym, iż ekspozycja na dym tytoniowy miała miejsce w ponad 24 godzinny odstęp czasowy od pobrania materiału biologicznego do badań [Kendall et al., 2007].

W badaniach własnych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie hormonu folikulotropowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego w surowicy krwi kobiet niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń.

Zaobserwowano również niewielki wzrost poziomu hormonu folikulotropowego w grupie pacjentek palących tytoń w porównaniu do kobiet biernie narażonych na działanie dymu. Zmiany te jednak nie były znaczące. Średnio poziom folikulotropiny u osób palących wynosił 6,19 mIU/ml, natomiast u badanych biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego wynosił 4,95 mIU/ml.

Windham i wsp. dokonali oznaczenia nikotyny i kotyniny w próbkach moczu grupy badanych kobiet, zbieranych w ciągu 5 dni w celu potwierdzenia bądź zaprzeczenia prawdziwości samooceny prowadzonej przez respondentki. W moczu również dokonano oznaczeń hormonu folikulotropowego. Poziomy folikulotropiny wzrastały w sposób odpowiedni dla fazy lutealnej, w fazie folikularnej przebiegały w sposób fizjologiczny, aż do piku w okresie okołooowulacyjnym. W przypadku osób palących tytoń poziomy folikulotropiny kształtowały się rytmicznie, jednak oznaczone stężenia hormonu były wyższe, niż w przypadku kobiet niepalących. W przypadku osób, które były narażone na niewielkie działanie dymu tytoniowego poziomy hormonu folikulotropowego niewiele różniły się od wyników uzyskanych w grupie niepalących [Windham et al., 2005].

Badania Freour'a i wsp. oparte na analizie 384 cykli miesięczkowych kobiet wykazały, że wyższy poziom folikulotropiny i estradiolu jest obserwowany wśród kobiet niepalących w korelacji z osobami palącymi tytoń [Freour et al., 2010; Freour et al., 2011].

Jósiak i wsp. w swoich badaniach wskazali na obniżoną ekspresję genu receptora folikulotropiny (FSHR) prowadząc do zmniejszenia ilości receptorów na powierzchni komórek ziarnistych. Następstwem tego jest utrudnione przekazywanie sygnału do wnętrza komórki powodujące ograniczenie wydzielania, a tym samym aromatyzację androgenów. Badania zostały przeprowadzone w grupie kobiet uczestniczących w programie zapłodnienia pozaustrojowego [Jósiak i wsp., 2006].

Plante i wsp. oznaczali poziomy hormonu antymulerowskiego (AMH) jako wykładnika zwiększenia wydzielania folikulotropiny przez pęcherzyk jajnikowy. Badanie przeprowadzono wśród 284 kobiet, w wieku 38-42 lat. Wykazano, że aktywne palenie wiąże się ze spadkiem ilości wydzielanego AMH, co bezpośrednio odpowiadało obniżeniu poziomu hormonu folikulotropowego [Plante et al., 2010].

Skrócenie fazy folikularnej jako efektu wyższego stężenia folikulotropiny obserwowali w swoich badaniach Cramer i wsp oraz De Souza i wsp. [Cramer et al., 1994; De Souza et al., 1998]. Wzrost FSH powodował szybszą rekrutację i rozwój pęcherzyków, przyspieszając tym samym owulację [Fukuda et al., 2001]. Skrócenie jednak fazy folikularnej może prowadzić do nieprawidłowego rozwoju pęcherzyków, co niesie za sobą nieprawidłową funkcję ciała żółtego i upośledzenie wydzielania progesteronu [Tuppala et al., 1991; Wuttke et al., 2001]. Wynika z tego, że dym tytoniowy wpływa bezpośrednio na skrócenie cyklu miesięczkowego, zaburzenia wydzielania FSH i progesteronu, a także przyczynia się do zmniejszenia płodności zdrowych kobiet. Mechanizm tego zjawiska nie jest do końca poznany. Obniżona produkcja progesteronu przez ciało żółte, które szczególnie wrażliwe jest na toksyczne działanie alkaloidów dymu tytoniowego powoduje wzrost stężenia folikulotropiny w fazie folikularnej w wyniku działania pętli sprzężenia zwrotnego [Florek i wsp., 2008].

W badaniach własnych zaobserwowano zmiany istotne statystycznie w poziomie hormonu lutropowego w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego, w grupach pacjentek biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń. U kobiet palących poziom tego hormonu był o około 40% wyższy aniżeli w grupie osób biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego. Najprawdopodobniej był to efekt sprzężenia zwrotnego, reakcji na wyższe poziomy estradiolu i progesteronu, jako reakcji kory nadnerczy na bodziec, jakim jest palenie.

Odnotowano również wzrost poziomu hormonu lutropowego w fazie folikularnej w grupie kobiet palących tytoń w stosunku do poziomu tego hormonu u niepalących, jednak nie potwierdzono wyższych poziomów LH w fazie lutealnej dla którejkolwiek z badanych grup.

Duskova i wsp. przeprowadzili badania oceniające wpływ przewlekłego narażenia na dym tytoniowy na stężenia hormonów płciowych w surowicy krwi. Grupę badaną stanowiły kobiety w wieku 31-45 roku życia, w fazie lutealnej i folikularnej przewlekle narażone na toksyczne działanie dymu tytoniowego. Badacze wykazali wyższy poziom oznaczanego hormonu lutropowego w fazie lutealnej, jak również niższe stężenia estradiolu [Duskova et al., 2011].

Badania te potwierdziły wcześniejsze wyniki otrzymane przez Backera i wsp. [Backer et al., 1999].

W badaniach własnych oznaczono średnie wartości 17β -estradiolu w grupie kobiet niepalących w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego na poziomie odpowiednio 41,14 pg/ml; 180,04 pg/ml oraz 157,20 pg/ml, w grupie pacjentek biernie narażonych na toksyczne działanie dymu tytoniowego w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego odpowiednio na poziomie 45,49 pg/ml; 138,33 pg/ml i 134,13 pg/ml, a także w grupie osób palących tytoń w tych samych okresach czasowych na poziomie odpowiednio 60,58 pg/ml; 219,31 pg/ml i 147,92 pg/ml. Nie wykazano zmian statystycznie istotnych w poziomie 17β -estradiolu u kobiet niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego oraz palących tytoń podczas trwania cyklu miesięczkowego.

Soldin i wsp. przeprowadzili badania, których celem było wykazanie zależności pomiędzy czynnym i biernym paleniem tytoniu a poziomami hormonów steroidowych. Badania zostały przeprowadzone w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego 300 respondentek. Ocena stopnia narażenia na dym tytoniowy oparta była zarówno na podstawie przeprowadzonej ankiety, jak również na wyznaczeniu poziomów kotyniny. Wyniki badań wskazywały na niższe poziomy estradiolu, estronu i estriolu w surowicy kobiet palących i biernie narażonych na toksyczne działanie dymu tytoniowego w porównaniu z kobietami niepalącymi [Soldin et al., 2011].

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na zmianę szybkości eliminacji ksenobiotyków zawartych w tytoniu jest wpływ enzymów z grupy cytochromu P450 będącego również odpowiedzialnym za zwiększony metabolizm estrogenów [Siegfried, 2010]. Dym tytoniowy jest ściśle powiązany z aktywnością izoenzymów CYP1A1 i CYP1A2. Spink i wsp. wykazali, że w efekcie palenia tytoniu obserwowany jest deficyt estrogenów, który może być spowodowany wzrostem hydroksylacji w pozycjach C-2, C-4, C-15 α i C-6 α 17 β -estradiolu poprzez aktywację CYP1A [Spink et al., 1992; Tanko et al., 2004; Florek i wsp., 2008].

Składniki dymu tytoniowego (nikotyna, kadm, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) osłabiają funkcje jajników, zaburzają syntezę i metabolizm estrogenów. Sugeron General's Report donosi o wpływie nikotyny i jej metabolitów na endokrynne zdrowie kobiet [Sugeron General's Report, 1988]. Badania *in vitro* wykazały obniżoną produkcję i metabolizm 17 β -estradiolu przez pęcherzyki Graffa, na które oddziaływano alkaloidami dymu tytoniowego [Tansavadi et al., 2004]. Nikotyna i jej pochodne powodują inaktywację aromatazy odpowiadającej za konwersję androgenów do estrogenów [Splangler, 1999; Tanko and Christiansen, 2004]. W swoich badaniach Barbieri i wsp. również wykazali wpływ dymu papierosowego na hamujące działanie aromatazy, co jest przyczyną powstawania metabolitów estradiolu o obniżonej aktywności estrogenowej, które są szybko usuwane z krążenia [Barbieri et al., 1986a]. Palenie ma znaczący wpływ na 2-hydroksylację szlaku metabolizmu estradiolu, co prowadzi do zwiększonej produkcji 2-hydroksyestrogenu. Powstałe związki charakteryzują się niską aktywnością estrogenową i są szybko usuwane z krążenia [Kapoor and Jones, 2005].

Raval i wsp. przeprowadzili oznaczenia estradiolu metodą radioimmunologiczną ELISA w surowicy szczurów poddanych efektowi niedokrwienia pozornego i w wyniku działania soli i dymu tytoniowego. Badania wykazały, że w grupie poddanej działaniu nikotyny obserwowany był wyraźny spadek poziomu estradiolu począwszy od 4, a utrzymujący się niezmiennie do 16 dnia cyklu menstruacyjnego szczurzych samic [Raval et al., 2011].

Badania eksperymentalne przeprowadzone przez Florek i wsp. w surowicy krwi samic szczurów z uwzględnieniem fazy cyklu płciowego zwierząt korelowały z wynikami badań własnych. W badaniach nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem kotyniny,

a poziomem 17 β -estradiolu w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na dym tytoniowy [Florek i wsp., 2008].

Baron i wsp. w badaniach nad chorobami Alzheimera i Parkinsona oraz innymi powikłaniami wynikającymi z nadmiernego wydzielania estrogenów wskazali na korzystny wpływ ekspozycji na dym tytoniowy, który powoduje obniżenie poziomu estrogenów we krwi. Wskazuje na potencjalne działanie nikotyny na metabolizm estrogenów, jej toksyczne działanie na pęcherzyki jajnikowe lub na zakłócenia regulacji hormonalnej przysadki mózgowej [Baron et al, 1990]. Niższe poziomy estradiolu we krwi fińskich kobiet palących w korelacji z kobietami niepalącymi opisali również w swoich badaniach Saarni i wsp. [Saarni et al., 2009].

Badania przeprowadzone przez Paszkowskiego wykazały znamienne niższe stężenia 17 β -estradiolu w przedowulacyjnym pęcherzyku Graffa u kobiet palących w porównaniu grupą niepalącą. Badanie to wskazywał na negatywny wpływ dymu tytoniowego na endokrynne funkcje pęcherzykowe [Paszkowski, 2001]. Badania te korelują z doniesieniami Van Voorhisa i Dawsona [Van Voohris and Dawson, 1996].

Obniżona aktywność estrogenów we krwi i ich biodostępność wynika również ze stymulującego wpływu dymu tytoniowego na stężenie białka selektywnie wiążącego hormony płciowe (SHBG) [Daniel et al., 1992; Paszkowski i Wrona, 2005].

Substancje toksyczne zawarte w dymie tytoniowym powodują skurcze drobnych naczyń krwionośnych docierających do pęcherzyków jajnikowych, przez co upośledzają stymulację efektorów przez gonadotropiny. Wpływ metabolitów dymu tytoniowego na funkcje jajnika jest długotrwały i zależny od dawki [Tziomaios and Charsoulis, 2004]. Zredukowany poziom estrogenów powoduje zakłócenia regularności cyklu menstruacyjnego, a także przedwczesną menopauzę.

Przeprowadzone badania własne nie wykazały różnic istotnych statystycznie w poziomach zarówno 17 β -estradiolu i progesteronu w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego w grupach kobiet niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń.

Florek i wsp. w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach również nie wykazali różnic istotnych statystycznie w poziomie 17β -estradiolu w czasie trwania cyklu pomiędzy grupami szczurów nienarażonych i narażonych na dym tytoniowy [Florek i wsp. 2008].

Różnice istotne statystycznie wykazano w poziomie progesteronu pomiędzy grupami pacjentek palących tytoń a biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego w czternastym dniu cyklu miesięczkowego. Poziom progesteronu u kobiet palących tytoń w fazie owulacyjnej był prawie dwukrotnie wyższy aniżeli w przypadku osób biernie narażonych na działanie dymu. Badania te potwierdziły wyniki w fazie owulacyjnej w zakresie progesteronu otrzymane przez Zumoff'a [Zumoff et al., 1990].

Przeprowadzone badania własne wykazały również istotne zmiany pomiędzy poziomem progesteronu w dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego pomiędzy osobami palącymi tytoń i niepalącymi oraz pomiędzy kobietami niepalącymi i biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego. Średnio poziom progesteronu w grupie kobiet palących tytoń był prawie dwukrotnie wyższy niż u pacjentek pozostałych dwóch grup badawczych.

Obecność kotyniny w płynie pęcherzykowym komórek ziarnistych została potwierdzona eksperymentalnie w badaniach przeprowadzonych przez Micelli i wsp., a także korelacja poziomów tego metabolitu nikotyny w płynie pęcherzykowym i surowicy krwi kobiet palących tytoń. Potwierdzono negatywny wpływ kotyniny na potencjał rozwojowy dojrzewających oocytów. Wykazano hamujący wpływ nikotyny i M- nikotyny na uwalnianie progesteronu przez komórki ziarniste człowieka [Micelli et al., 2005]. Hamowanie wydzielania progesteronu przez nikotynę i jej metabolity jest efektem zaburzeń gospodarki prostaglandynowej ciała żółtego, hamowania jej wydzielania. Prostaglandyna $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$) powoduje indukcję strukturalnej i funkcjonalnej regresji ciała żółtego, natomiast prostaglandyna E_2 (PG E_2) wykazuje właściwości lutropowe oraz powoduje ekspresję genów dla enzymów biorących udział w steroidogenezie. Konsekwencją tych zaburzeń jest obniżony poziom progesteronu zarówno w fazie lutealnej, jak i we wczesnej ciąży [Zenes et al., 1990; Miceli et al., 1997; Mazela i wsp., 2010]. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obecne w dymie tytoniowym wywołują zmiany w działaniu enzymów mikrosomalnych cytochromu P450 CYP19 hamując aromatazę w komórkach ziarnistych. Efekt

hamowania jest proporcjonalny do dawki wchłoniętego dymu tytoniowego [Kendall et al., 2007].

Badania te były zgodne z badaniami zespołu Bodis'a, który wykazał, zależny od dawki, wzrost wydzielania estradiolu w fazie lutealnej, który wpływa hamująco na wydzielanie progesteronu [Bodis et al., 1997].

Również wpływem metabolitów dymu tytoniowego (benzo(a)pirenu) na folikulogenezę, steroidogenezę, a także dojrzewanie oocytów u myszy zajęli się Sadeu i Foster. Badania wykazały niekorzystny wpływ benzo(a)pirenu na rozwój i przetrwanie pęcherzyków jajnikowych, co widoczne było poprzez spadek poziomów 17 β -estradiolu, jednak nie zaobserwowano zmian w poziomie progesteronu [Sadeu and Foster, 2011].

Florek i wsp. w badaniach eksperymentalnych na szczurach szczepu Wistar wykazali podwyższone poziomy progesteronu w fazie Proestrus. Towarzyszyły temu minimalne poziomy kotyniny, spowodowane prawdopodobnie zwolnionym metabolizmem nikotyny lub przyspieszoną biotransformacją kotyniny, wynikające z zaburzeń wątrobowego metabolizmu nikotyny i kotyniny [Florek i wsp., 2008].

Badania Soldin'a wykazały również istotne statystycznie różnice pomiędzy poziomami progesteronu wśród kobiet palących i niepalących. [Soldin et al., 2011].

W badaniach własnych nie zaobserwowano różnic w poziomach hormonu folikulotropowego i 17 β -estradiolu w całym cyklu miesięczkowym pomiędzy grupami pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń. Zaobserwowano różnice w poziomie hormonu lutropowego w surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego a osobami palącymi tytoń. Poziom lutropiny był niższy w grupie badanych biernie narażonych na dym tytoniowego (4,01 mIU/ml \pm 1,85 mIU/ml) w porównaniu z grupą palących tytoń (6,77 mIU/ml \pm 5,89 mIU/ml). Wykazano również niższe poziomy progesteronu w surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego (1,07 ng/ml \pm 0,91 ng/ml) aniżeli w grupie osób palących tytoń (3,42 ng/ml \pm 4,53 ng/ml) w 14 dniu cyklu miesięczkowego. W 21 dniu cyklu wykazano wyższe poziomy progesteronu w grupie pacjentek palących tytoń (9,04 ng/ml \pm 5,89 ng/ml) w porównaniu z kobietami

niepalącymi i biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego (odpowiednio 5,95 ng/ml \pm 7,72 ng/ml i odpowiednio 5,47 ng/ml \pm 7,11).

Flouris i wsp. w swoich badaniach wykazali negatywny wpływ biernego narażenia na dym tytoniowy na wydzielanie hormonów płciowych u kobiet. Badania obejmowały populację 28 osób, z których połowa była narażona na działanie dymu tytoniowego. Oznaczono poziomy kotyniny w surowicy krwi oraz w moczu i uzyskano 10-krotnie wyższe poziomy kotyniny w moczu aniżeli we krwi. Oznaczenia poziomu hormonów płciowych w surowicy krwi badanych pacjentek dokonano metodą elektrochemiluminescencji. Stwierdzono zmniejszone poziomy 17 β -estradiolu i progesteronu, lutropiny i folikulotropiny u osób biernie inhalujących dym tytoniowy [Flouris et al., 2008].

Zumoff i wsp. przeprowadzili badania, w których udział wzięło 8 kobiet palących tytoń i 8 niepalących w wieku 20-35 lat o regularnych cyklach miesięczkowych. Warunkiem udziału w eksperymencie był m.in. brak antykoncepcji hormonalnej, a także prawidłowy poziom hormonów tyreotropowych. Oznaczeń poziomów progesteronu, estradiolu i hormonu lutropowego dokonano w poszczególnych dniach podczas całego cyklu miesięcznego metodą radioimmunologiczną RIA. Całkowita długość cyklu, a także poszczególnych faz w obu grupach badanych kobiet nie różniły się. Badania nie wykazały różnic w poziomach estradiolu, progesteronu hormonu lutropowego w fazie lutealnej i przedowulacyjnej pomiędzy obiema grupami pacjentek. W fazie owulacyjnej poziom progesteronu był wyższy w grupie kobiet palących w porównaniu z osobami niepalącymi aż o 37%. U pacjentów obu grup poziom estradiolu w fazie owulacyjnej wzrastał, aczkolwiek u kobiet narażonych na działanie metabolitów nikotyny był wyższy. Już podczas fazy folikularnej przed okresem szybkiego wzrostu około owulacyjnego poziom estradiolu był wyższy nawet o 23% w grupie kobiet palących tytoń. W fazie folikularnej stężenia hormonu lutropowego były niższe w grupie osób palących tytoń w porównaniu do grupy pacjentek niepalących [Zumoff et al., 1990].

Florek i wsp. w przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych potwierdzają negatywny wpływ dymu tytoniowego na przebieg cyklu płciowego szczurów, pomimo, że cykl ten przebiegał w dużo szybszym czasie i trwał 4-5 dni. W eksperymencie wykazano, że całkowicie prawidłowy cykl wystąpił jedynie u 29 % samic. Zaburzenia

związane z wydłużeniem więcej niż w jednej fazie zaobserwowano u 42 % szczurzy, natomiast zanik fazy obserwowany był u 29 % zwierząt [Florek i wsp., 2008].

Sakai i wsp. przeprowadzili badania, których celem była ocena związku pomiędzy napięciem przedmiesiączkowym a paleniem tytoniu u młodych japońskich kobiet. Jednocześnie zaobserwowano, że palenie tytoniu nie wpływa na długość krwawienia miesięcznego, jednak dowiedziono, że kobiety niepalące charakteryzował normalny, regularny cykl miesięczkowy, natomiast u pacjentek palących był on wydłużony [Sakai et al., 2010].

Wyniki badań własnych pozwoliły na porównanie zmian hormonalnych zachodzących w cyklu miesięczkowym kobiet niepalących, biernie narażonych na dym i palących tytoń.

Podsumowanie

W badaniach własnych kobiety podzielono na trzy grupy badawcze w zależności od stopnia narażenia na działanie dymu tytoniowego: **kobiety niepalące, biernie narażone na działanie dymu oraz palące tytoń**. Pacjentki zostały zakwalifikowane do poszczególnych grup na podstawie deklaracji uzyskanych podczas przeprowadzania wywiadu. Potwierdzeniem prawidłowego przyporządkowania pacjentek do poszczególnych grup było przeprowadzone badanie poziomu kotyniny (głównego metabolitu nikotyny) w surowicy krwi badanych kobiet w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego. W wyniku analizy uzyskanych wyników poziomu kotyniny w surowicy krwi badanych osób dokonano przesunięcia pacjentek z grupy osób niepalących do grupy kobiet palących tytoń ze względu na wysokie poziomy tego metabolitu.

W grupie kobiet deklarujących palenie tytoniu, u których średnio poziomy kotyniny wynosiły 46,08 ng/ml, 32,96 ng/ml, 68,35ng/ml odpowiednio w pierwszym, czternastym i dwudziestym pierwszym dniu cyklu miesięczkowego, obserwowano pacjentki, u których poziom kotyniny wyznaczono poniżej granicy oznaczalności.

W grupie kobiet **niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego** zaobserwowano prawidłowe zmiany w poziomie hormonu folikulotropowego zachodzące podczas cyklu miesięczkowego. Widoczny był wyższy

poziom FSH w 14 dniu (6,34 mIU/ml), w porównaniu z pierwszym i dwudziestym pierwszym dniem cyklu (wynoszą odpowiednio - 5,75 mIU/ml i 4,48 mIU/ml).

Poziom hormonu lutropowego w grupie kontrolnej przebiegał również w sposób prawidłowy. Niskie stężenia LH obserwowano w 1 dniu cyklu miesięczkowego (5,63 mIU/ml), najwyższe w 14 dniu cyklu (12,14 mIU/ml), a następnie spadek w 21 dniu cyklu miesięczkowego (9,12 mIU/ml).

Otrzymane wyniki stężenia 17 β -estradiolu w surowicy krwi wskazywały na prawidłowo przebiegający cykl miesięczkowy. Kształtowały się na poziomie: 41,14 pg/ml w pierwszym dniu cyklu, 180,04 pg/ml w 14 oraz 157,20 pg/ml w 21 dniu cyklu miesięczkowego.

Niski poziom progesteronu (1,03 ng/ml) obserwowany był w 1 dniu cyklu miesięczkowego, który wzrastał w 14 dniu cyklu miesięczkowego (2,40 ng/ml). Najwyższe stężenia (5,95 ng/ml) odnotowano w 21 dniu cyklu miesięczkowego.

Poziomy hormonu folikulotropowego w grupie **kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego** wyniosły w 1, 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego odpowiednio: 4,95 mIU/ml, 6,92 mIU/ml oraz 4,53 mIU/ml.

Obserwowano niskie poziomu hormonu lutropowego w 1 dniu cyklu miesięczkowego (4,01 mIU/ml), wzrost w 14 dniu (13,45 mIU/ml), a następnie spadek w 21 dniu (7,67 mIU/ml). Zmiany zachodzące w poziomach tych hormonów są zbliżone do tych w surowicy krwi kobiet niepalących.

Otrzymane wyniki stężenia 17 β -estradiolu w surowicy krwi wskazują na prawidłowo przebiegający cykl miesięczkowy. Stężenie hormonu kształtowało się na poziomie: 45,49 pg/ml w pierwszym dniu cyklu, 138,33 pg/ml w 14 oraz 134,13 pg/ml w 21 dniu cyklu.

Niski poziom progesteronu (1,82 ng/ml) obserwowany był w 1 dniu cyklu miesięczkowego w grupie badanych kobiet biernie inhalujących dym, który wzrastał w 14 dniu (1,07 ng/ml). Najwyższe stężenia (5,47 ng/ml) odnotowano w 21 dniu cyklu miesięczkowego.

W grupie **kobiet palących tytoń** obserwowano niewielkie zmiany w poziomach hormonu folikulotropowego w 1 i 14 dniu cyklu miesięczkowego (6,19 mIU/ml; 6,72 mIU/ml), a następnie wyraźny spadek stężenia FSH w 21 dniu (3,61 mIU/ml).

Poziom hormonu lutropowego w grupie kobiet palących tytoń przebiegał w sposób odmienny niż w przypadku kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego. Niskie poziomy LH obserwowane były w 1 dniu cyklu miesięczkowego (6,77 mIU/ml), najwyższe w 14 dniu (14,83 mIU/ml), a następnie bardzo silny spadek w 21 dniu cyklu miesięczkowego (1,27 mIU/ml).

Stężenia 17 β -estradiolu w surowicy krwi kształtowały się na poziomie: 60,59 pg/ml w pierwszym dniu cyklu, 219,31 pg/ml w 14 dniu oraz 147,92 pg/ml w 21 dniu cyklu.

Niski poziom progesteronu (1,03 ng/ml) obserwowany był w 1 dniu cyklu miesięczkowego w grupie badanych kobiet palących, który wzrastał w 14 dniu (3,42 ng/ml). Najwyższe stężenia (9,05 ng/ml) odnotowano w 21 dniu cyklu miesięczkowego.

W badaniach własnych nie zaobserwowano różnic w poziomach hormonu folikulotropowego i 17 β -estradiolu w całym cyklu miesięczkowym pomiędzy grupami pacjentek niepalących, biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i palących tytoń. Zaobserwowano różnice w poziomie hormonu lutropowego w surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego a osobami palącymi tytoń. Poziom lutropiny był niższy w grupie badanych biernie narażonych na dym tytoniowy w porównaniu z grupą palących tytoń. Wykazano również niższe poziomy progesteronu w surowicy krwi kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego aniżeli w grupie osób palących tytoń w 14 dniu cyklu miesięczkowego. W 21 dniu cyklu wykazano wyższe poziomy progesteronu w grupie pacjentek palących tytoń w porównaniu z kobietami niepalącymi i biernie narażonymi na działanie dymu tytoniowego.

VIII. WNIOSKI

1. Wykazano konieczność wykorzystania biomarkerów ekspozycji – kotyniny, w ocenie wiarygodności deklaracji pacjentek dotyczących palenia lub niepalenia tytoniu.
2. Statystycznie istotny wzrost poziomu hormonu lutropowego w 1 dniu cyklu miesięczkowego w grupie pacjentek palących może powodować zaburzenie mechanizmu owulacji i prowadzić do niewydolności fazy lutealnej.
3. Stwierdzono wyższe, statystycznie istotne stężenia progesteronu w 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego w surowicy krwi pacjentek palących w porównaniu z grupą kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i niepalących. Przypuszcza się, że poziom te są wynikiem dłuższego cyklu miesięczkowego oraz zaburzeń jego regularności deklarowanymi przez badane kobiety.
4. Statystycznie istotnemu wzrostowi poziomu 17β -estradiolu towarzyszyły obniżone stężenia kotyniny w surowicy krwi kobiet palących tytoń (R_S ujemne). Prawdopodobnie jest to spowodowane zwolnionym metabolizmem nikotyny, bądź przyspieszoną biotransformacją kotyniny.
5. Palenie tytoniu może być ważnym, dominującym, pojedynczym czynnikiem sprawczym zaburzeń rozrodu, stąd istnieje konieczność prowadzenia przez służby medyczne edukacji kobiet w wieku prokreacyjnym, a nawet wdrożenia leczenia uzależnienia od tytoniu, co z sukcesem realizowano w populacji pacjentek biorących udział w badaniach.

IX. STRESZCZENIE

Palenie tytoniu należy do najpoważniejszych współczesnych zagrożeń cywilizacyjnych. Wynika to zarówno z rozpowszechnienia tego zjawiska, jak i ze strat ponoszonych przez społeczeństwa. Szczególnie niekorzystny wpływ palenia tytoniu został wykazany w wielu badaniach klinicznych i epidemiologicznych w populacji kobiet w wieku prokreacyjnym.

Palenie tytoniu wśród kobiet jest zróżnicowane geograficznie. Najwięcej kobiet pali w Europie i Azji Centralnej. Na świecie, stanowią one około 200 milionów osób palących. W krajach rozwiniętych pali 25% kobiet, natomiast w krajach rozwijających się tylko 7%. W Polsce palenie tytoniu jest zjawiskiem powszechnym – 34% kobiet paliło tytoń w swoim życiu, obecnie pali od 20% do 29,9% w zależności od regionu Polski, średnio 25,6%. W latach dwutysięcznych w populacji kobiet w wieku prokreacyjnym 22% zadeklarowało czynne palenie tytoniu. W badaniach Światowej Organizacji Zdrowia przeprowadzonych w Polsce wykazano dynamiczny wzrost rozpowszechnienia palenia tytoniu wśród dziewcząt. Dowiedziono, że 57% dziewcząt w Polsce kiedykolwiek zapaliło papierosa, a 11% z nich próbowało zapalić pierwszego papierosa jeszcze przed 10 rokiem życia.

Według danych WHO, w 2010 roku w Polsce na bierne palenie narażonych było 43,6% kobiet.

Palenie tytoniu oraz bierne narażenie na dym tytoniowy kobiet w wieku prokreacyjnym stanowi bardzo poważny problem toksykologiczny.

Pod wpływem alkaloidów dymu tytoniowego zachodzą zmiany w poziomach hormonu folikulotropowego, lutropowego, 17 β -estradiolu oraz progesteronu.

Wpływa to negatywnie na gametogenezę, transport jajowodowy, owulację, zapłodnienie, zagnieżdżenie się zapłodnionej komórki jajowej, a także na tworzenie się łożyska.

Celem pracy była ocena wpływu dymu tytoniowego na cykl miesięczkowy kobiet palących i biernie narażonych poprzez wykonanie w surowicy krwi oznaczeń poziomów hormonów płciowych – folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu i progesteronu w 1, 14, 21 dniu cyklu miesięczkowego.

W pracy wyznaczono stężenia kotyniny – biomarkera ekspozycji na dym w surowicy krwi pacjentek wszystkich grup badawczych, łącznie z niepalącymi celem weryfikacji deklaracji kobiet dotyczących statusu palenia tytoniu.

W badaniach wzięło udział 156 pacjentek w wieku rozrodczym, które zgłosiły się do Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pacjentki nie stosowały hormonalnych środków antykoncepcyjnych, czynność tarczycy była prawidłowa.

Na wstępie każdą pacjentkę poproszono o wypełnienie ankiety, w której zawarto pytania dotyczące statusu socjoekonomicznego, stanu zdrowia, narażenia na działanie dymu tytoniowego, a także obserwacji przebiegu cyklu miesięczkowego.

Materiał biologiczny do badań stanowiła surowica krwi kobiet.

Kobiety zostały podzielone na trzy grupy w zależności od stopnia narażenia na działanie dymu tytoniowego: pacjentki niepalące i nienarażone na działanie dymu tytoniowego, kobiety biernie palące oraz palące tytoń. Kwalifikacji do poszczególnych grup badawczych dokonano na podstawie deklaracji pacjentki i wyznaczenia stężenia kotyniny - głównego metabolitu nikotyny, w surowicy krwi.

Kotyninę oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją diodową DAD po uprzedniej ekstrakcji techniką ciec-ciecz z użyciem norefedryny, jako wzorca wewnętrznego.

Oznaczenia stężeń hormonów przeprowadzono metodą elektrochemiluminescencji ECLIA

Dokonano analizy statystycznej uzyskanych wyników badań. Podstawowe parametry socjoekonomiczne opisano licznosciami w poszczególnych kategoriach i odpowiadającymi im wartościami procentowymi.

Sprawdzono zgodność stężenia kotyniny i poziomu hormonów folikulotropowego, lutropowego, 17β -estradiolu i progesteronu z rozkładem normalnym. Ze względu na zaobserwowany brak normalności rozkładu zastosowano analizę wariacji ANOVA z testem Friedmana w celu porównania zmian w czasie dla poszczególnych hormonów. W przypadku wyników istotnych statystycznie dokonano ich sprawdzenia testem wielokrotnych porównań Dunna. Analizy porównawczej poziomu hormonów i kotyniny w surowicy krwi względem palenia papierosów dokonano (ze względu na brak normalności rozkładu) nieparametrycznym testem Kruskala – Wallisa.

W celu analizy zależności pomiędzy poziomem kotyniny a stężeniami poszczególnych hormonów zastosowano współczynnik korelacji rangowej R_s Spearmana.

W pracy wykazano konieczność wykorzystania biomarkerów ekspozycji – kotyniny, w ocenie wiarygodności deklaracji pacjentek dotyczących palenia lub niepalenia tytoniu.

Na podstawie badań toksykologicznych przeprowadzonych w surowicy krwi kobiet niepalących i nienarażonych na działanie dymu tytoniowego nie stwierdzono obecności głównego metabolitu nikotyny – kotyniny. Średnie stężenie metabolitu w surowicy krwi u kobiet biernie narażonych i aktywnie palących kształtowało się na poziomach odpowiednio 2,9 ng/ml i 49,13 ng/ml.

Poziom hormonu lutropowego w surowicy krwi wzrastał w 1 dniu cyklu miesięczkowego u pacjentek palących (zależność statystycznie istotna) mogąc powodować zaburzenie mechanizmu owulacji i prowadzić do niewydolności fazy lutealnej.

Stwierdzono wyższe, statystycznie istotne stężenia progesteronu w 14 i 21 dniu cyklu miesięczkowego w surowicy krwi pacjentek palących w porównaniu z grupą

kobiet biernie narażonych na działanie dymu tytoniowego i niepalących. Przypuszcza się, że poziomy te są wynikiem dłuższego cyklu miesięczkowego oraz zaburzeń jego regularności deklarowanymi przez badane.

Zaobserwowano, że wzrostowi poziomu estradiolu towarzyszyły statystycznie istotne, obniżone stężenia kotyniny w surowicy krwi kobiet palących tytoń (R_s ujemne). Prawdopodobnie jest to spowodowane zwolnionym metabolizmem nikotyny, bądź przyspieszoną biotransformacją kotyniny.

Palenie tytoniu może być ważnym, dominującym, pojedynczym czynnikiem sprawczym zaburzeń rozrodu stąd istnieje konieczność prowadzenia przez służby medyczne edukacji kobiet w wieku prokreacyjnym, a nawet wdrożenia leczenia uzależnienia od tytoniu, co z sukcesem realizowano w populacji pacjentek biorących udział w badaniach.

X. SUMMARY

Key words: tobacco smoke, women, cotinine, sex hormones

Tobacco smoking belongs to the most serious contemporary hazards associated with civilization. This reflects both the wide spread of the phenomenon and losses suffered by a society. A particularly disadvantageous effect of tobacco smoking has been demonstrated in several clinical and epidemiological trials on population of women at the procreative age.

Tobacco smoking by women manifests a geographic variability. The highest fraction of smoking women has been documented in Europe and Central Asia. Worldwide, such women form a population of around 200 million smokers. In developed countries 25% women smoke tobacco while in developing countries such a fraction is restricted to just 7%. In Poland tobacco smoking is a common phenomenon: 34% women smoked tobacco some time in their life, currently 20% to 29.9% of them smoke, depending on region of the country (mean of 25.6%). In this century 22% of women at the procreative age declared active tobacco smoking. Studies of World Health Organization conducted in Poland demonstrated a dynamic increase in frequency of tobacco smoking among girls: 57% of girls admitted smoking a cigarette at least once, 11% attempted to smoke their first cigarette before their 10th year of age.

According to WHO data, in the year of 2010 43.6% women in Poland were passively exposed to tobacco smoke.

Smoking of tobacco and passive exposure to tobacco smoke exposes women at the procreative age to a very serious toxicological hazard.

Alkaloids of tobacco smoke induce changes in levels of folliculotropic, luteotropic hormones, of 17β -estradiol and progesterone.

This exerts harmful effects on gametogenesis, transport in fallopian tube, ovulation, fertilization, implantation of the fertilized ovum and also on development of

placenta. The aim of this study was examination of tobacco smoke impact on menstrual cycle in smoking women and women exposed passively to tobacco smoke by determination of serum levels of folliculotropic hormone, luteotropic hormone, 17β -estradiol and progesterone on days 1, 14, and 21 of menstrual cycle.

Serum levels of cotinine, the biomarker of exposure to tobacco smoke were estimated in patients of all the research groups, including non-smokers, in order to verify declarations of women related to smoking/not smoking. The investigations were conducted on 156 women of reproductive age, who reported to the Gynaecological/Obstetrical Hospital, Poznan University of Medical Sciences in Poznań. The patients used no hormonal contraceptive agents; function of their thyroids manifested no abnormalities.

At first, every patient was asked to fill a questionnaire with questions related to her socioeconomic status, health condition, exposure to tobacco smoke and observations related to her menstrual cycle. The investigated material involved serum of the patients.

The women formed three groups differing in intensity of exposure to tobacco smoke, including women not smoking and not exposed to passive tobacco smoke, women exposed to passive smoke and active smokers. Qualification of patients to individual groups was based patient's declaration and on estimation of cotinine concentration, the principal metabolite of nicotine in serum.

Cotinine was estimated using highly potent liquid chromatography (HPLC) with diode detection DAD following a liquid/liquid extraction using norephedrine as an inner standard.

Hormone concentrations were estimated using electro-chemiluminescence (ECLIA).

The obtained results of studies were subjected to statistical analysis, principal socioeconomic parameters were presented by numerical forces in individual categories and corresponding percentages.

Concentrations of cotinine, folliculotropic, luteotropic hormones, 17β -estradiol and progesterone were found to be distributed in a manner incompatible with the

normal distribution., Therefore, ANOVA analysis of variance was applied, with Friedman's test for comparison of time-related alterations in concentrations of individual hormones. In the case of statistically significant alterations this was corroborated using Dunn's test of multiple comparisons. The comparative analysis of serum hormone and cotinine concentrations, as related to tobacco smoking (due to the absence of normal distribution of the results) took advantage of the non-parametric Kruskal-Wallis test.

The relationship between cotinine level and concentrations of individual hormones took advantage of the rank correlation index of RS Spearman. The study demonstrated need for use of exposure biomarker, cotinine in verification of reliability related to declarations of patients pertaining their smoking/non-smoking status.

Toxicological investigations on sera of non-smoking women and women not exposed to tobacco smoke failed to detect the principal nicotine metabolite, cotinine. In sera of women exposed to passive tobacco smoke or actively smoking mean concentration of the metabolite amounted to, respectively, 2.9 ng/ml and 49.13 ng/ml. Serum level of luteotropic hormone increased in the first day of menstrual cycle in smoking patients (a significant relationship), being capable of disturbing ovulation mechanism and leading to insufficiency of the luteal phase.

In smoking patients a significantly higher progesterone concentrations were documented in days 14 and 21 of the menstrual cycle, as compared to women exposed to passive smoke and to non-smokers. It is assumed that the levels reflected a longer menstrual cycle or disturbances in its regular character, declared by the examined women.

In women smoking tobacco, increased levels of estradiol were accompanied by statistically significant lowered cotinine concentrations in serum (negative RS). Probably, this reflected a slowed down nicotine metabolism or an accelerated biotransformation of cotinine.

Tobacco smoking may be an important, dominant single causal agent of generative disturbances. This points to the need for education of women in procreative

period of life by the health service and even for implementation of an appropriate treatment which would block tobacco dependency, which was successfully implemented in the population of women participating in the studies.

XI. PIŚMIENICTWO

1. Adamek R., Florek E., Bręborowicz G.H., Anholcer A., Kaczmarek E.: Świadomość zdrowotnych konsekwencji ekspozycji na dym tytoniowy oraz dostęp do informacji dotyczących szkodliwości dymu tytoniowego wśród kobiet ciężarnych. *Przegląd Lekarski* 2004, 61, 1012-1015.
2. Adair L.S.: Size at birth predicts age at menarche. *Pediatrics*, 2001, 107, 4, 59, 1-7.
3. Adamek R., Florek E., Piekoszewski W., Bręborowicz G.H., Anholcer A.: Active and passive exposure of pregnant women to tobacco smoke. *Archives of Perinatal Medicine*, 2009, 15, 89-94.
4. Adashi E.: Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, 1994, 9, 815-827.
5. Al-Delaimy W.K., Crane J., Woodward A.: Is the hair nicotine level a more accurate biomarker of environmental tobacco smoke exposure than urine cotinine. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2002, 56, 66-71.
6. Alecozay A.A., Selcer K.W., Clark J.R., Burns J.M., Norman R.L., Niswender G.D., Leavitt W.W.: Pattern of ovarian progesterone secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 1988, 39, 287-294.
7. Allahabadia G.N., Merchant L.: Polycystic ovary syndrome in the Indian Subcontinent. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2008, 26, 22-34.
8. Arffin F, Al-Bayaty FH, Hassan J.: Environmental tobacco smoke and stress as risk factors for miscarriage and preterm births. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2012, 21.
9. Atamanova T., Egart F., Zelenetskaia V.: Aldosterone and progesterone content and blood renin activity in women with idiopathic edema syndrome in various phases of menstrual cycle. *Problemy Endokrynologii*, 1979, 25, 32-36.
10. Auger A.P.: Steroid receptor control of reproductive behavior. *Hormones and Behavior*, 2004, 45, 168-172.
11. Augood C., Duckitt K., Templeton A.: Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 1998, 13, 1532-1539.
12. Baba S., Noda H., Nakayama M., Waguri M., Mitsuda N., Iso H.: Risk factors of early spontaneous abortions among Japanese: a matched case-control study. *Human Reproduction*, 2011, 26, 2, 466-472.

13. Backer L.C., Rubin C.S., Marcus M., Kieszak S.M., Schober S.E.: Serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels in women aged 35-60 in U.S. population: the Third National Health Examination Survey. *Menopause*, 1999, 6, 29-35.
14. Bańkowski E.: *Biochemia*. Elsevier Urban & Partner, Kraków, 2004.
15. Barbieri R., McShane P., Ryan K.: Constituents of cigarette smoke inhibit human granulosa cell aromatase. *Fertility and Sterility*, 1986, 46, 232-236.
16. Barbieri R., Gochberg J., Ryan K.: Nicotine, cotinine and anabasine inhibit aromatase in human trophoblast in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 1986a, 77, 1727-1733.
17. Baron J., La Vecchia C., Levi F.: The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, 1990, 162, 502-514.
18. Becket A.H., Rowland M., Triggs E.J.: Significance of smoking in investigation of urinary excretion rates of amines in man. *Nature*, 1965, 207, 200-201.
19. Benowitz N.L.: Clinical pharmacology of nicotine. *Annual Review of Medicine*, 1986, 37, 21-32.
20. Benowitz N.L., Porchet H., Sheiner L., Jacob P.: Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1988, 5, 23-28.
21. Benowitz N.L.: Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine*, 1988, 319, 1318-1330.
22. Benowitz N.L., Jacob III P., Fong I., Gupta S.: Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, 268, 296-303.
23. Benowitz N.L.: Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1996, 36, 597-613.
24. Benowitz N.L.: Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiologic Reviews*, 1996, 18, 2, 188-202.
25. Benowitz N.L.: Biomarkers of Environmental Tobacco Smoke Exposure. *Environ. Health Perspect*, 1999, 107, 2, 349-355.
26. Benowitz N.L., Jacob III P.: Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 51, 53-59.
27. Benowitz N.L., Jacob III P., Ahijevych K., Jarvis M.J., Hall S., LeHouezec J., Hansson A., Lichtenstein E., Henningfield J., Hopkins J., Tsoh J., Hurt R.D.,

- Velicer W.: Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine and Tobacco Research*, 2002, 4, 149–159.
28. Benowitz N.L., Pomerleau O.F., Pomerleau C.S., Jacob III P.: Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. *Nicotine and Tobacco Research*, 2003, 5, 621–624.
 29. Benowitz N.L., Hukkanen J., Jacob III P.: Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *The Handbook of Experimental Pharmacology*, 2009, 192, 29–60.
 30. Benowitz N.L.: Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease and Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2009a, 49, 57–71.
 31. Benowitz N.L., Dains K.M., Dempsey D., Herrera B., Yu L., Jacob III P.: Urine nicotine metabolite concentrations in relation to plasma cotinine during low-level nicotine exposure. *Nicotine and Tobacco Research*, 2009b, 11, 954–960.
 32. Bentley M.C., Abrar M., Kelk M., Cook J., Phillips K.: Validation of an assay for the determination of cotinine and 3-hydroxycotinine in human saliva using automated solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *The Journal of Chromatography B*, 1999, 19, 723, 1-2, 185-194.
 33. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
 34. Berkman C.E., Park S.B., Wrighton S.A., Cashman J.R.: In vitro-in vivo correlations of human (S)-nicotine metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 1995, 50, 565–570.
 35. Bernard D.J., Fortin J., Wang Y., Lamba P.: Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't and why you should care. *Fertility and Sterility*, 2010, 15, 93, 8, 2465-2485.
 36. Biczysko W., Wąsowicz M., Marszałek A., Florek E.: The entrance of surface active material to pulmonary capillaries in the lungs of newborn rats. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 1995, 33, 25-31.
 37. Billert H., Florek E.: Palenie papierosów a inne uzależnienia w ciąży – problem multidyscyplinarny. *Przegląd Lekarski*, 2010, 67, 1048-1051.
 38. Bjelica A., Kapamadzija A., Maticki-Sekulić M.: Sex hormones and female sexuality. *Medicinski Pregled*, 2003, 56, 446-450.

39. Blanco-Muñoz J., Torres-Sánchez L., López-Carrillo L.: Exposure to maternal and paternal tobacco consumption and risk of spontaneous abortion. *Public Health Reports*, 2009, 124, 2, 317-322.
40. Blank M.S., Fabbri A., Catt K.J., Dufau M.L.: Inhibition of luteinizing hormone release by morphine and endogenous opiates in cultured pituitary cells. *Endocrinology*, 1986, 118, 2097–2101.
41. Bloch B., Bugnon C., Lenys D., Fellmann D.: Description of neurons immunoreactive to anti-beta-endorphin immune serum present in the infundibular nucleus in man. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences Abbreviation*, 1978, 287, 309–312.
42. Blumenfeld Z., Kuhn R.W., Jaffe R.B.: Corticotropin-releasing factor can stimulate gonadotropin secretion by human fetal pituitaries in superfusion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1986, 154, 606–612.
43. Bodis J., Hanf V., Torok A., Tinnenberg H.R., Borsay P., Szabo I.: Influence of nicotine on progesterone and estradiol production of cultured human granulosa cells. *Early Pregnancy*, 1997, 3, 34-37.
44. Bollinger C.T., Fagerstrom K.O.: *The Tobacco Epidemic*. Kager, Basel, 1997, 7, 95-96.
45. Braak H., Braak E.: Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region). *Anatomy and Embryology*, 1987, 175, 315-330.
46. Braak H., Braak E.: Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region). *Progress in Brain Research*, 1992, 93, 3-14.
47. Brannian J., Stouffer R.: Cellular approaches to understanding the function and regulation of the prima the Corpus luteum. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 1991, 9, 341.
48. Brinton R., Thompson R., Foy M., Baudry M., Wang J., Finch C., Morgan T., Pike C., Mack W., Stanczyk F., Nilsen J.: Progesterone receptors - form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2008, 29, 313-339.
49. Buffet N., Bouchard P.: The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiology International*, 2001, 18, 893-919.
50. Buffet N., Djakoure C., Maitre S., Bouchard P.: Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1998, 19, 151-186.
51. Byrd G.D., Chang K.M., Greene J.M., deBethizy J.D.: Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine and trans-3-

- hydroxycotinine in smokers. *Drug Metabolism and Disposition*, 1992, 20, 192–197.
52. Chamara – Pawlińska R., Szwed A.: Palenie papierosów a wiek menopauzy naturalnej u kobiet w Polsce. *Przegląd Lekarski*, 2004, 61, 10, 1003-1005.
 53. Cashman J.R., Zhang J.: Interindividual differences of human flavincontaining monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30, 1043–1052.
 54. Cato A.C.B., Nesti A., Mink S.: Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE*, 2000, 138, 9-20.
 55. Christenson L.K., Devoto L.: Cholesterol transport and steroidogenesis by the Corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1, 90, 1-9.
 56. Christenson L.K., Strauss J.F.: Human genetic defects that influence cholesterol metabolism in steroidogenic tissues. In *Genetics of Steroid Biosynthesis and Function*, CRC Press, Edinburch, UK, 2002.
 57. Christenson L.K., Strauss J.F.: Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1529, 175-187.
 58. Clarke R.: Human breast cell proliferation and its relationship to steroid receptor expression. *Climacteric*, 2004, 7, 129-137.
 59. Collin D., Gandar R.: The corpus luteum and progesterone secretion. *Revue Francaise de Gynecologie et D Obstetrique*, 1991, 86, 563-565.
 60. Conneely O.M.: Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology*, 2001, 142, 2194 – 2199.
 61. Conneely O., Mulac - Jericevic B., Lydon J.: Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, 2003, 68, 771-778.
 62. Cramer D.W., Barbieri R.L., Xu H., Reichardt J.K.V.: Determinants of basal follicle-stimulating hormone levels in premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1994, 79, 1105-1109.
 63. Crooks P.A., Li M., Dwoskin L.: Metabolites of nicotine in rat brain after peripheral nicotine administration: Cotinine, Nornicotine and Norcotinine. *Drug Metabolism and Disposition*, 1996,25, 1, 47-54.
 64. Cummings K.M., Markello S.J., Mahoney M., Bhargava A.K., McElroy P.D., Marshall J.R.: Measurement of current exposures to environmental tobacco smoke. *Archives of Environmental Health*, 1990, 45, 74-79.

65. Daniel M., Martin A., Drinkwater D.: Cigarette smoking, steroid hormones and bone mineral density in young women. *Calcified Tissue Research*, 1992, 50, 300-305.
66. Dawson E.B., Evans D.R., Harris W.A., McGanity W.J.: The effect of ascorbic acid supplementation on the nicotine metabolism of smokers. *Preventive Medicine*, 1999, 6, 451-454.
67. Dempsey D., Tutka P., Jacob III P., Allen F., Schoedel K., Tyndale R.F., Benowitz N.L.: Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 76, 64-72.
68. Depa - Martynów M., Pawelczyk L., Taszarek - Hauke G., Jósiak M., Derwich K., Jędrzejczak P.: Wpływ palenia tytoniu na wyniki leczenia niepłodności u kobiet zakwalifikowanych do programu zapłodnienia pozaustrojowego IVF-ICSI. *Przegląd Lekarski*, 2005, 62, 10, 973-975.
69. Depa - Martynów M., Jędrzejczak P., Taszarek - Hauke G., Jósiak M., Derwich K., Pawelczyk L.: Wpływ palenia papierosów na jakość komórek jajowych oraz stan zarodków w przebiegu programu zapłodnienia pozaustrojowego. *Przegląd Lekarski*, 2006, 63, 10, 838-840.
70. De Souza M.L., Miller B.E., Loucks A.B., Luciano A.A., Pescatello L.S., Campbell C.G., et al.: High frequency of luteal phase deficiency and anovulation in recreational woman runners: blunted elevation in follicle-stimulating hormones reserved during luteal-follicular transition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998, 83, 4220-4232.
71. Devoto L., Kohen P., Vega M., Castro O., González R., Retamales I., Carvallo P., Christenson L., Strauss J.: Control of human luteal steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 25, 137-141.
72. Dudas B., Merchenthaler I.: Three-Dimensional Representation of the Neurotransmitter Systems of the Human Hypothalamus: Inputs of the Gonadotrophin Hormone-Releasing Hormone Neuronal System. *Journal of Neuroendocrinology*, 2006, 18, 79-95.
73. Dudas B., Mihaly A., Merchenthaler I.: Topography and associations of luteinizing hormone-releasing hormone and neuropeptide Y-immunoreactive neuronal systems in the human diencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, 2000, 427, 593-603.
74. Duskova M., Simunkova K., Hill M., Velikova M., Kubatova J., Kancheva L., Kazihnitkova H., Hruskovicova H., Postpisilova H., Racz B., Salatova M.,

- Cirmanova V., Kralikova E., Starka L., Parizek A.: Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and neuroactive steroids in premenopausal women. *Physiological Research*, 2012, 61, 97-111.
75. Elenbogen A., Lipitz S., Mashiach S., Dor J., Levran D., Ben - Rafael Z.: The effect of smoking on outcome of in-vitro fertilization - embryo transfer. *Human Reproduction*, 1991, 6, 242-244.
 76. Eppig J.J.: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 2001, 122, 829-838.
 77. Evans J.J.: Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocrinology Review*, 1999, 20, 46-67.
 78. Evans N.P., Dahl G.E., Glover B.H., Karsh F.J.: Central regulation of pulsatile gonadotropin - releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*, 134, 1806-1811.
 79. Florek E., Bręborowicz G.H., Lechowicz W., Wachowiak A., Basior A., Wolna M., Hubert A., Seńczuk M.: Kotynina w moczu matki i noworodka oraz w surowicy krwi pępowinowej i łożysku jako marker narażenia płodu na dym tytoniowy. *Przegląd Lekarski*, 2006, 63, 900-906.
 80. Florek E.: Palenie tytoniu a płodność kobiet. *Ginekologia Praktyczna*, 1996, 4, 25-26.
 81. Florek E.: Analiza naukowych dowodów wpływu wymuszonego "biernego palenia" na zdrowie. Instytut Onkologii, Warszawa, 2000.
 82. Florek E.: Zdrowotne skutki narażenia kobiet na dym tytoniowy w środowisku. Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna, Poznań, 2000.
 83. Florek E., Marszałek A.: An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Human and Experimental Toxicology*, 1999, 18, 272-278.
 84. Florek E., Marszałek A., Piekoszewski W., Wrzosek J., Opala T., Moczko J.: Występowanie narażenia na dym tytoniowy wśród kobiet w wieku produkcyjnym. *Ginekologia praktyczna*, 2001, 7, 60, 16-21.
 85. Florek E., Piekoszewski W.: Interakcje leków z dymem tytoniowym. Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, 2006.
 86. Florek E., Piekoszewski W., Bręborowicz G.H., Kornacka M.K., Lechowicz W., Kulza M.: Biomarkers of carcinogenic compounds of tobacco smoke constituents

- in the urine of delivering women. *Archives of Perinatal Medicine*, 2007, 13, 55-60.
87. Florek E., Janicki R., Piekoszewski W., Kulza M., Sędziak A., Chuchracki M.: Wpływ dymu tytoniowego na poziom hormonów płciowych – model zwierzęcy. *Przegląd Lekarski*, 2008, 65, 10, 508-513.
 88. Florek E., Piekoszewski W., Kulza M., Szindzikaszwilli T., Gomółka E., Chuchracki M., Sędziak A.: Interaction between Tobacco smoke and alcohol in animal models. *Pharmacological Reports*, 2008, 60, 985-990.
 89. Florek E., Enko J., Piekoszewski W.: Papieros i kawa – interakcje farmakokinetyczne nikotyny i kofeiny. *Przegląd Lekarski* 2009, 66, 10, 866-868.
 90. Florek E., Piekoszewski W., Seńczuk-Przybyłowska M., Stanaszek R.: Hair as a material for study of medicaments and psychoactive substances. *Archives of Perinatal Medicine*, 2009, 15, 72-82.
 91. Florek E., Piekoszewski W.: Palenie tytoniu a ciąża. W: G. H. Bręborowicz (Red.): *Ciąża wysokiego ryzyka*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 2010.
 92. Florek E., Piekoszewski W., Hubert A., Kornacka M.K.: Active and Passive Smoking during Pregnancy on Newborn Health. Ed. Thomas C. Jeffries, Nova Science, Hauppauge NY USA, 2007, 9, 193-239.
 93. Florek E., Piekoszewski W.: Wpływ zanieczyszczenia środowiska na płodność kobiet i przebieg ciąży. *Przegląd Ginekologiczno-Położniczy*, 2007, 7, 41-89.
 94. Flouris A.D., Metsiosis G.S., Jamurtas A.Z., Koutedakis Y.: Sexual dimorphism in the acute effects of secondhand smoke on thyroid hormone secretion, inflammatory markers and vascular function. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 2008, 294, 456- 462.
 95. Fortunati N.: Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner. *The Journal of Endocrinology Investigation*, 1999, 22, 223-234.
 96. Fortunati N., Catalano M.: Sex hormone - binding globulin (SHBG) and estradiol cross-talk in breast cancer cells. *Hormone and Metabolic Research* 2006, 38, 236-240.
 97. Freour T., Dessolle L., Jean M., Masson D., Barriere P.: Predictive value of ovarian reserve markers in smoking and non-smoking women undergoing IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, 2010, 20, 6, 857-860.
 98. Freour T., Masson D., Dessolle L., Allaoua D., Dejoie T., Mirallie S., Jean M., Barriere P.: Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to

- women smoking status and stimulation regimen. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2012, 285, 4, 1177-1182.
99. Frias J., Puertas A., Ruiz E., Ortega E.: Effect of corticotrophin releasing factor (CRF) injected into the median eminence on LH secretion in male rats. *Neurochemical Research*, 1997, 22, 171–174.
 100. Fritz M.A., McLachlan R.I., Cohen N.L., Dahl K.D., Bremner W.J., Soules M.R.: Onset and characteristics of the midcycle surge in bioactive and immunoactive luteinizing hormone secretion in normal women: influence of physiological variations in periovulatory ovarian steroid hormone secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1992, 75, 2, 489-493.
 101. Frohman L.A., Feling P., Baxter J.D.: Disorders of the anterior pituitary. *Endocrinology and Metabolism*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, USA, 1995.
 102. Freeman J.L.: The anatomy and embryology of the hypothalamus in relation to hypothalamic hamartomas. *Epileptic Disorders*, 2003, 5, 4, 177-86.
 103. Fukuda M., Fukuda K., Andersen C.Y., Byscov A.G.: Characteristics of human ovulation in natural cycles correlated with age and achievement of pregnancy. *Human Reproduction*, 2001, 16, 2501-2507.
 104. Gallicchio L., Visvanathan K., Miller S.R., Babus J., Lewis L.M., Zacur H., Flaws J.A.: Body mass, estrogen levels and hot flashes in midlife women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005, 193, 4, 1353-1360.
 105. Garrel D.: Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: nutritional modulation and clinical implications. *Hormon Research*, 1996, 45, 245-251.
 106. Gerbase M., Schindler C., Zellweger J., Künzli N., Downs S., Brändli O., Schwartz J., Frey M., Burdet L., Rochat T., Ackermann-Liebrich U., Leuenberger P.: Respiratory effects of environmental tobacco exposure are enhanced by bronchial hyperreactivity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, 174, 1125-1131.
 107. Gleicher Norbert M.D.: Starzenie się jajników. Czy jest procesem fizjologicznym?. *Ginekologia po dyplomie*, 2005, 7, 6, 40, 22-28.
 108. Główny Urząd Statystyczny: Europejskie ankietowe badanie zdrowia. 2009.
 109. Greenberg G., Thompson S., Meade T.: Relation between cigarette smoking and use of hormonal replacement therapy for menopausal symptoms. *The Journal of Epidemiology and Community Health*, 1987, 41, 26–29.

110. Greenspan F.S., Gardner D.G.: Endokrynologia ogólna i kliniczna. Czelej Sp. z o.o., Lublin, 2004.
111. Hanke W., Kalinka J., Florek E.: Passive smoking and pregnancy outcome in central Poland. *Human and Experimental Toxicology*, 1999, 18, 265-271.
112. Hannover Bjarnason N., Christansen C.: The influence of thinnes and smoking on bone loss and response to hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000, 85, 2, 590-596.
113. Harlow B.L., Wisc L.A., Otto M.W., Soares C.N., Cohen L.S.: Depression and its influence on reproductive endocrine and menstrual cycle markers associated with perimenopause. *Archives of General Psychiatry*, 2003, 1, 60, 29-36.
114. Havern R.L., Whisnant C.S., Goodman R.L.: Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biology of Reproduction*, 1991, 44, 476-482.
115. Haustein K.O.: Tobacco or health? Springer – Verlag: Weslin, Heidelberg, New York, 2003.
116. Hecht S.S., Carmella S.G., Murphy S.E.: Effects of watercress consumption on urinary metabolites of nicotine in smokers. *Cancer Epidemiological Biomarkers and Prevetion*, 1999a, 8, 907-913.
117. Hecht S.S., Carmella S.G., Chen M., Dor Koch J.F., Miller A.T., Murphy S.E., Jensen J.A., Zimmerman C.L., Hatsukami D.K.: Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Research*, 1999b, 59, 590- 596.
118. Hecht S.S., Hochalter J.B., Villalta P.W., Murphy S.E.: 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.*, 2000, 97, 12493-12497.
119. Henschler D., Tabak S.: *Pharmacologie und Toxikologie*, 6. Auflage Herausgeber W. Forth, Henschler D., Rummel W., Starke K., Wissenschaftsverlag. Mannheim – Leipzig – Wien - Zürich, 1992, 809-815.
120. Herbison A.E.: Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin - releasing hormone neurons. *Endocrine Review*, 1998, 19, 302-330.
121. Herbison A.E.: Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Review of Reproduction*, 1997, 2, 1-6.

122. Hidalgo - Diaz C., Castano J.P., Lopez - Pedrera R., Malagon M.M., Garcia - Navarro S., Gracia - Navarro F.A.: Modulatory role for substance P on the regulation of luteinizing hormone secretion by cultured porcine gonadotrophs. *Biology of Reproduction*, 1998, 58, 678–685.
123. Hillier S.: Role of LH in folliculogenesis during the menstrual cycle. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2002, 31, 12-14.
124. Hirai A.: Corticosteroid-binding globulin (CBG): measurement and its clinical implication. *Nippon Rinsho*, 2005, 63, 353-357.
125. Hoffmann D., Wynder E.: Aktives und passives Rauchen. *Lehrbuch der Toxikologie. B. I. Wiss-verlag*, 1994, 589-605.
126. Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz N.L.: Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Review*, 2005, 57, 79–115.
127. Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. WHO Collaborative study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet*, 1996, 348, 498-505.
128. Jaffe J.H.: Drug addiction ad drug abuse: Nicotine and tobacco. In: Gimán A.G., Goldman L.S., Rall T.W. ad Murrad S. (Eds): *Goodman and Gilman’s the Pharmacological basis of therapeutics*. New York, Macmillan, 1985, 554-558.
129. Jauniaux E., Gulbis B., Acharya G., Thiry P., Rodeck Ch.: Maternal Tobacco Exposure and Cotinine Levels in Fetal Fluid in the First Half of Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 1999, 93, 25-29.
130. Jędrychowski W.: Rola palenia tytoniu w powstawaniu nienowotworowych chorób płuc. W: *Zdrowotne następstwa palenia tytoniu w Polsce*. Zatoński W., Przewoźniak K., Ariel Sp. z o.o., Warszawa, 1992, 147-175.
131. Joad J., Ji C., Kott K., Bric J., Pinkerton K.: In utero and postnatal effects of sidestream cigarette smoke exposure on lung function, hyperresponsiveness and neuroendocrine cells in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995, 132, 63-71.
132. Johnston A.: Estrogen - pharmacokinetics and pharmacodynamics with special reference to vaginal administration and the new estradiol formulation. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 1996, 163, 16-25.
133. Johnson M., Carter G., Grint C., Lightman S.: Relationship between ovarian steroids, gonadotrophins and relaxin during the menstrual cycle. *Acta Endocrinology*, 1993, 129, 121-125.

134. Jósiak M., Jędrzejczak P., Depa - Martynów M., Pawelczyk L.: Ekspresja genu receptora folitropiny w komórkach ziarnistych u pacjentek palących i niepalących papierosów uczestniczących w programie zapłodnienia pozaustrojowego. *Przegląd Lekarski*, 2006, 63, 834-837.
135. Jussieu A.L.: Mapacho (*Nicotiana tobaccum*) Solanaceae. Analysis, preparation and use of *Nicotiana tobaccum* from Historical. *Ethno & Economic Botany Series Vol. 2*, 2001.
136. Kalra S.P.: Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrinology Review*, 1993, 14, 507-538.
137. Kandeel F.R., Swerdloff R.S.: The interaction between beta-endorphin and gonadal steroids in regulation of luteinizing hormone (LH) secretion and sex steroid regulation of LH and proopiomelanocortin peptide secretion by individual pituitary cells. *Endocrinology*, 1997, 138, 649-656.
138. Kapoor D. and Jones T.H.: Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, 2005, 152, 491-499.
139. Karck U., Keck C.: Physiology of ovarian function. *Therapeutische Umschau*, 2002, 59, 153-158.
140. Katsu Yoshinao, Kaoru Kubokawa, Hiroshi Urushitani, Taisen Ignuchi.: Estrogen – Dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via bot estrogen and androgen response elements. *Endocrinology* 2010, 151, 920, 639-648.
141. Katz D., Slade D., Nakajima S.: Analysis of preovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Advances in Contraception*, 1997, 13, 143-151.
142. Kaufman F.L., Kharrazi M., Delorenze G.N., Eskenazi B., Bernert J.T.: Estimation of environmental tobacco smoke exposure during pregnancy using a single question on household smokers versus serum cotinine. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 2002, 12, 4, 286-295.
143. Kendall A., Folkard E.J., Dowsett M.: Influences of circulating oestrogens in postmenopausal women: relationship with breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 103, 99-109.
144. Kerdelhué B., Parnet P., Lenoir V., Schirar A., Gaudoux F., Levasseur M., Palkovits M., Blacker C., Scholler R.: Interactions between 17 beta-estradiol and the hypothalamo-pituitary beta-endorphin system in the regulation of the cyclic

- LH secretion. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1988, 30, 161-168.
145. Kędziora H., Florek E., Piekoszewski W., Bręborowicz G.H., Anholcer A., Gomółka E., Kulza M., Stanek A.: Stężenie kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny oraz ich glukuronidów w moczu kobiet ciężarnych palących tytoń. *Przegląd Lekarski*, 2007, 64, 10, 740-743.
146. Kintz P., Ludes B., Mangin P.: Evaluation of nicotine and cotinine in human hair. *Journal of Forensic Sciences*, 1992, 1, 37, 72-76.
147. Klonoff - Cohen H.: Female and male lifestyle habits and IVF: what is known and unknow. *Human Reproduction Update*, 2005, 11, 179-203.
148. Kłóś J., Ceremużyński L., Herbaczyńska - Cedro K.: Obniżony poziom hormonów płciowych u kobiet z chorobą niedokrwienną serca przed menopauzą. *Kardiologia Polska*, 2001, 55, 305-307.
149. Knox K.L., Bauer - Dantoin A.C., Levine J.E., Schwartz N.B.: Unmasking of neuropeptide-Y inhibitory effects on in vitro gonadotropin secretion from pituitaries of metestrous, but not proestrous rats. *Endocrinology*, 1995, 136, 187-194.
150. Król M., Florek E., Kornacka M.K., Bokinić R., Piekoszewski W.: Stan kliniczny noworodka a stopień narażenia na dym tytoniowy w życiu płodowym. *Przegląd Lekarski*, 2009, 66, 548-553.
151. Kuehl G. E. and Murphy S. E.: N-Glucuronidation of trans-3'-hydroxycotinine by human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, 16, 1502-1506.
152. Kulza M.: Wpływ uzależnienia alkoholowego na metabolizm i farmakokinetykę nikotyny i alkoholu etylowego w narażeniu łącznym. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Medyczny, Poznań, 2011.
153. Lachowicz – Ochędalska A.: Membrane receptors for estradiol – new way of biological action. IV Konferencja Sekcji Endokrynologii Molekularnej PTE, Materiały konferencyjne. Poznań, 2004, 322-326.
154. Lackmann G., Salzberger U., Töllner U., Chen M., Carmella S., Hecht S.: Metabolites of a tobacco-specific carcinogen in urine from newborns. *The Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91, 459-465.
155. Lazurova I., Dravecka I.: Obesity and disorders of the menstrual cycle. *Vnitřní Lékarství*, 2002, 48, 349-352.

156. Leonardelli J., Tramu G.: Immunoreactivity for beta-endorphin in LH-RH neurons of the fetal human hypothalamus. *Cell and Tissue Research*, 1979, 203, 201–207.
157. Lichtenberg V., Schulte – Baukloh A., Lindner Ch., Braendle W.: Discrepancies between results of serum 17- β -Oestradiol E2 determinations carried out using different immunoassay kits in women receiving oestrogen replacement therapy. *Laboratory Medicine*, 1992, 16, 412 – 416.
158. Le Gal A., Dreano Y., Lucas D., Berthou F.: Diversity of selective environment al substrates for human cytochrome P450 2A6: alkoxyethers, nicotine, coumarin, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosobenzylmethylamine. *Toxicology Letters*, 2003, 144, 77–91.
159. Li P.H.: Catecholamine inhibition of luteinizing hormone secretion in isolated pig pituitary cells. *Biology of Reproduction*, 1989, 40, 914–919.
160. Lopez F.J., Merchenthaler I., Ching M., Wisniewski M.G., Negro - Vilar A., Galanin A.: Hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, USA, 1991, 88, 4508–4512.
161. Lorence M.C., Corbin C.J., Kamimura M., Mahendoroo M.S., Mason J.I.: Structural analysis of the gene encoding human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4-isomerase. *Molecular Endocrinology*, 1990, 4, 1850-1855.
162. Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: *Color Atlas of Pharmacology*. Thieme Flexibook , 2000.
163. Mackay J., Eriksen M.: *The Tobacco Atlas*. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 2002, 24-35.
164. Mahesh V., Brann D.: Interaction between ovarian and adrenal steroids in the regulation of gonadotropin secretion. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 41, 495-513.
165. Massanyi P., Bardos L., Opper K., Hluchy S., Kovacik J., Csicsai G., Toman R.: Distribution of cadmium in selected organs of mice: effects of cadmium on organ contents of retinoids and beta-carotene. *Acta Physiologica Hungarica*, 1999, 86, 99-104.
166. Mazela J. Merritt T.A., Florek E., Gadzinowski J.: Wpływ nikotyny na dziecko w pierwszym roku życia – warto rzucić palenie. *Przegląd Lekarski*, 2010, 67, 1045-1047.
167. McKinlay S.: The normal menopause transition: an overview. *Maturitas*, 1996, 23, 137-145.

168. Meireles S.I., Esteves G.H., Hirata Jr. R., Peri S., Devarajan K., Slifker M., Mosier S.L., Peng J., Vadhanam M.V., Hurst H.E., Neves J., Reis L.F., Gairola C.G., Gupta R.C., Clapper M.L.: Early changes in gene expression induced by tobacco smoke: Evidence for the importance of estrogen within lung tissue. *Cancer Preview Research*. Philadelphia, 2010, 3, 6, 707-717.
169. Messina E.S., Tyndale R.F., Sellers E.M.: Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-Oxidation by Human Liver Microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997, 283, 1608-1614.
170. Michell E.A., Ford R.P., Stewart A.W., Taylor B.J., Becroft D.M., Scragg R., Hassell I.B., Barry D.M., Allen E.M.: Smoking and sudden infant death syndrome. *Pediatrics*, 1993, 91, 893-896.
171. Miceli F., Minici F., Tropea A., Catino S., Orlando M., Lamanna G., Sagnella F., Tiberi F., Bompiani A., Mancuso S., Lanzone A., Apa R.: Effects of nicotine on human luteal cells in vitro: a possible role on reproductive outcome for smoking women. *Biology of Reproduction*, 2005, 72, 628-632.
172. Miller W.: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Review*, 1988, 9, 295-318.
173. Mlynarcikova A., Fickova M., Scsukova S.: Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocrine Regulations* 2005, 39, 20-31.
174. Moderachai S.: Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproductions*, 2001, 121, 835-842.
175. Mueck A.O., Seeger H.: Smoking, estradiol metabolism and hormone replacement therapy. *Current Medicinal Chemistry Cardiovascular and Hematological Agents*, 2005, 3, 45-54.
176. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell W.W.: *Biochemia Harpera* . Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004.
177. Naidong W., Shou W., Chen Y., Jiang X.: Novel liquid chromatographic–tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous–organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids. *The Journal of Chromatography B*, 2001, 754, 387–399.
178. Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K., Yokoi T., Nagashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kamataki T., Kuroiwa Y.: Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, 277, 1010–1015.

179. Nakajima M., Kuroiwa Y., Yokoi T.: Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metabolism Review*, 2002, 34, 865–877.
180. Navot D., Drews M., Bergh P., Guzman I., Karstaedt A., Scott R., Garrisi G., Hofmann G.: Age-related decline in female fertility is not due to iminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertility and Sterility*, 1994, 61, 97-101.
181. Need A.G., Kemp A., Giles N., Morris H.A., Horowitz M., Nordin B.E.: Relationship between intestinal calcium absorption, serum vitamin D metabolites and smoking in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 2002, 13, 83-88.
182. Neels K, Theunynck Z, Wood J.: Economic recession and first births in Europe: recession-induced postponement and recuperation of fertility in 14 European countries between 1970 and 2005. *International Journal of Public Health*, 2012, 26.
183. O'Conner J.L., Wade M.F., Brann D.W., Mahesh V.B.: Direct anterior pituitary modulation of gonadotropin secretion by neuropeptide Y role of gonadal steroids. *Neuroendocrinology*, 1993, 58, 129–135.
184. Koji Ogura, Mintoru Irahara, Machiko Kiyokawa, Michiko Tezuka, Toshiya Matsuzaki, Toshiyuki Yasui, Masaharu Kamada and Toshihiro Aono: Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *European Journal of Endocrinology*, 2001, 144, 653 – 658.
185. Oktem O., Oktay K.: The ovary - anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1127, 1-9.
186. Okubo T., Honjo H.: Structure, productive part and synthesis of progesterone. *Nippon Rinsho*, 2006, 64, 421-425.
187. Owen John A. Jr. MD: Physiology of the menstrual cycle. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1975, 28, 333-338.
188. Ownby D.R., Johnson C.C., Peterson E.L.: Passive cigarette smoke exposure in infants: importance of nonparenteral sources. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 2000, 154, 1237-1241.
189. Pasaquali R., Gambineri A.: Metabolic effect of obesity on reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006, 12, 5, 542-551.
190. Paszkowski T.: Wpływ palenia tytoniu na zawartość estradiolu w przedowulacyjnym płynie pęcherzykowym. *Ginekologia Polska*, 2001, 72, 989-992.

191. Paszkowski T., Janeczek L.: Stres oksydacyjny po menopauzie. Menopauza., Biblioteka Naukowa Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki. Warszawa, 2000, 3, 51-56.
192. Paszkowski T., Wrona W.: Hormonalna terapia zastępcza u kobiet uzależnionych od dymu tytoniowego. Przegląd Menopauzalny, 2005, 4, 68-72.
193. Parazzini F., Tozzi L., Mezzopane R., Luchini L., Marchini M., Fedele L.: Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of primary dysmenorrhea. Epidemiology, 1994, 5, 469-472.
194. Perez–Stable E.J., Martin G., Martin B.V., Benowitz N.L.: Misclassification of smoking status by self – reported cigarette consumption. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1992, 45, 53-57.
195. Petersen S.L., Ottem E.N., Carpenter C.D.: Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. Biology of Reproduction, 2003, 69, 1771–1778.
196. Peto R., Lopez A.D., Boreham J., Hun M., Health C. Jr.: Mortality from tobacco in developed countries. Indirect estimates from national vital statistics. Lancet, 1992, 339, 1268-1278.
197. Peto R., Lopez A.D., Boreham J., Thun M.: Mortality from smoking in developed countries 1950-2000: indirect estimates from national vital statistics. Oxford University Press, 2006.
198. Piekoszewski W., Florek E.: Markery narażenia na dym tytoniowy. Katedra i Zakład Toksykologii Akademia Medyczna, Poznań, 2001.
199. Piekoszewski W., Florek E.: Tytoń w liczbach na początku nowego stulecia. Przegląd Lekarski 2006, 63, 823-826.
200. Piekoszewski W., Florek E., Kulza M., Wilimowska J., Loba U.: Opracowanie metody oznaczania metabolitów nikotyny w moczu. Przegląd Lekarski, 2009, 66, 10, 593-597.
201. Pirkle J.L., Flegal K.M., Bernert J.T., Brody D.J., Etzel R.A., Maurer K.R.: Exposure of the US population to environmental tobacco smoke: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1991. Journal of the American Medical Association 1996, 275, 1233-1240.
202. Pisarski T. (red.): Fitopatologia jajnika . Termedia, Poznań, 1998.
203. Pisarski T. (red.): Położnictwo i ginekologia. PZWL, Warszawa, 2001.

204. Plante B.J., Cooper G.S., Baird D.D., Steiner A.Z.: The impact of smoking on antimullerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause*, 2010, 17, 3, 571-576.
205. Poindexter A.N. 3rd, Dildy G.A., Brody S.A., Snabes M.C., Brodyand S.A.: The effects of a long-acting progestin on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in women with normal menstrual cycles. *Contraception*, 1993, 48, 1, 37-45.
206. Quensel M., Agardh C.D., Nilsson - Ehle P.: Nicotine does not affect plasma lipoprotein concentrations in healthy men. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1989, 49, 149-153.
207. Radwan J.: Wpływ palenia tytoniu na płodność. *Ginekologia Praktyczna*, 2000, 1, 44, 34-36.
208. Rama S., Hemontolor M., Olenick M.: Prostaglandin E2 in human placenta: its vascular effects and activation of prostaglandin E2 formation by nicotine and cotinine. *Pharmacology*, 1999, 58, 70-86.
209. Rapuri P.B., Gallanger J.C., Balhorn K.E., Ryschon K.L.: Smoking and bone metabolism in elderly woman. *Bone*, 2000, 27, 429-436.
210. Raupach T., Schafer K., Konstantinides S., Andreas S.: Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *European Heart Journal*, 2006, 27, 368-392.
211. Raval A.P., Hirisch N., Dave K.R., Yavagal D.R., Bramlett H., Saul I.: Nicotine and estrogen synergistically exacerbate cerebral ischemic injury. *Neurosciens*, 2011, 181, 216-225.
212. US Department of Health and Human Services Smoking and women's health. Report of the Surgeon General, Rockville, US DHHS, 2001.
213. Richards J.S., Pangas S.A.: The ovary: Basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010,4, 963-972.
214. Riggs B.: The mechanism of estrogen regulation of bone resorbtion. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106, 1203-1204.
215. Rosati F., Sturli N., Cungi M. C., Morello M., Villanelli F., Bartolucci G., Finocchi C., Peri A., Danza G.: Gonadotropin – Releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH – SY5Y cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 124, 3-5, 77-83.
216. Rosner W., Hryb D., Khan M., Nakhla A., Romas N.: Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1991, 40, 813-820.

217. Roth L., Daunderer M., Korman K. (Hrsg), Giftpflanzen – Pflanzengifte: Vorkommen – Wirkung - Therapie. Nicotin, S. IV – 3 – N, 3-5 Ecomed Verlag, Landsberg, 1984.
218. Ruggiero R., Likis F.: Estrogen - physiology, pharmacology and formulations for replacement therapy. *The Journal of Midwifery and Women's Health*, 2002, 47, 130-138.
219. Sadeu J.C., Foster W.G.: Effect of in vitro exposure to benzo(a)pyrene, a component of cigarette smoke, on folliculogenesis, steroidogenesis and oocyte nuclear Maturation. *Reproductive Toxicology*, 2011, 31, 4, 402-408.
220. Saarni S.E., Pietilainen K., Kantonen S., Rissanen A., Karpio J.: Association of smoking in adolescence with abdominal obesity in adulthood: a follow-up study of 5 birth cohorts of Finnish twins. *The American Journal of Public Health*, 2009, 99, 2, 348-354.
221. Sajdak S., Witczak K., Sroka Ł., Samulak D.: Wpływ palenia tytoniu na zdrowie ginekologiczne kobiety. *Przegląd Lekarski*, 2005, 62, 10, 1154-1158.
222. Sakai H., Kawamura C., Cardenas X., Ohashi K.: Premenstrual and menstrual symptomatology in young adult Japanese females who smoke tobacco. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2011, 37, 4, 325-330.
223. Sam S., Frohman L.: Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2008, 37, 1-22.
224. Sanchez - Criado J.E., Bellido C., Aguilar R., Garrido - Gracia J.C.: Antiprogestin RU486 blunts the stimulatory effect of galanin on LH secretion from rat pituitaries in vitro in an estrous cycle stagedependent manner. *Neuroscience Letters*, 2001, 305, 73–75.
225. Schaison G., Couzinet B.: Steroid control of gonadotropin secretion. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1991, 40, 1-3, 417-20.
226. Seaton M.J., Vesell E.S.: Variables affecting nicotine metabolism. *Pharmacology and Therapeutics*, 1993, 60, 461–500.
227. Seńczuk M., Florek E., Piekoszewski W., Stanaszek R., Bręborowicz G.H., Anholcer A., Kulza M., Kornacka M.K.: Nikotyna we włosach noworodków, jako wskaźnik palenia tytoniu przez kobiety w czasie ciąży – badania wstępne. *Przegląd Lekarski*, 2007, 64, 10, 729-731.
228. Shamgochian M.D., Leeman S.E.: Substance P stimulates luteinizing hormone secretion from anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology*, 1992, 131, 871–875.

229. Sheung P., Steinetz B.G., Iasano S.G., Zelikoff J.T.: Hormonal Changes Accompanying cigarette Smoke – Induced preterm births in mouse model. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2006, 231, 1403-1409.
230. Siegfried J.M.: Early changes in pulmonary gene expression following tobacco exposure shed light on the role of estrogen metabolism in lung carcinogenesis. *Cancer Previews Research (Philadelphia)*, 2010, 3, 6, 692-695.
231. Skabała P.: *Endokrynologia Ginekologiczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
232. Słomko Z.: *Ginekologia endokrynologiczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
233. Smida A.D., Valderrama X.P., Agnostini M.C., Furlan M.A., Chedrese J.: Cadmium stimulates transcription of the cytochrome p450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cell. *Biology of Reproduction*, 2004, 70, 25-31.
234. Smith M.J., Jennes L.: Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, 2001, 122, 1–10.
235. Soldin O.P., Makambi K.H., Soldin S.J., O'Mara D.M.: Steroid hormone levels associated with passive and active smoking. *Steroids*, 2011, 76, 7, 653-659.
236. Spaczyński M.: *Onkologia ginekologiczna*. Wydawnictwa Medyczne Urban and Partner, Wrocław, 1997.
237. Spangler J.: Smoking and hormone-related disorders. *Primary Care*, 1999, 3, 499-511.
238. Speroff L., Fritz M.: *The uterus. Clinical gynaecologic endocrinology and infertility*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005.
239. Spink D.C., Eugster H.P., Lincoln D.W. 2nd, Schuetz J.D., Johnson J.A.: 17 β -estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: A comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 293, 342-348.
240. Stanek A., Piekoszewski W., Bręborowicz G.H., Anholcer A., Chuchracki M., Gomółka E., Kulza M., Kędziora H.: Zastosowanie metody enzymoimmunologicznej do oznaczania kotyniny w moczu. *Przegląd Lekarski*, 2007, 64, 10, 734-736.
241. Stillman R., Rosenberg M., Sachs B.: Smoking and reproduction. *Fertility and Sterility*, 1986, 46, 545-566.

242. St. Charles F.K., Krautter G.R., Dixon M., Mariner D.C.: A comparison of nicotine dose estimates in smokers between filter analysis, salivary cotinine and urinary excretion of nicotine metabolites. *Psychopharmacology*, 2006, 189, 345–354.
243. Stouffer R.: Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum - beyond steroidogenesis. *Human Reproduction Update*, 2003, 9, 99-117.
244. Surgeon General's Report: The Health Consequences of Smoking: Nicotine Addiction: A Report of the Surgeon General. 1988.
245. Szwejkowscy A., J.: Słownik botaniczny. Wiedza Powszechna, 1993, 663-664.
246. Szczurowicz A., Świercz G., Witek K., Szczurowicz A., Jarosiński B.: Niepłodność mechaniczna w populacji kobiet kielecczyzny. *Ginekologia Polska*, 1993, 10, 483-487.
247. Tajima K., Fukuda S., Kotsuji F.: Regulation of progesterone production in the corpus luteum. *Nippon Rinsho*, 2006, 64, 426-429.
248. Talhout R., Schulz T., Florek E., van Benthem J., Wester P., Opperhuizen A.: Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 2011, 8, 613-628.
249. Tanko L., Christiansen C.: An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners. *Menopause*, 2004, 11, 104-109.
250. Targovnik J. H.: Nicotine, corticotrophin and smoking withdrawal symptoms: literature review and implications for successful control of nicotine addiction. *Clinical Therapeutics*, 1989, 11, 846-853.
251. Tasavadi K., McClain B., Herrington D.M.: The effect of smoking on estradiol metabolism. *Minerva Ginecologica*, 2004, 56, 1, 105-114.
252. Terasawa E.: Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons - mechanism of pulsatile LHRH release. *Vitamins and Hormones*, 2001, 63, 91-129.
253. Thienpont L., Verseghe P.G., Van Brussel K.A., De Leeheer A.P.: Estradiol – 17-β Quantified in Serum by Isotope Dilution – Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 1988, 34, 10, 2066-2069.
254. Thind K.K., Goldsmith P.C.: Infundibular gonadotropin-releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys. *Neuroendocrinology*, 1988, 47, 203–216.
255. Traczyk W.Z., Trzebski A.: Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001.

256. Tuppala M., Bjorses U.M., Stenman U.H., Wahlstrom T., Ylikorkala O.: Luteal phase defect In habitu al abortion: Progesterone in saliva. *Fertility and Sterility*, 1991, 56, 41-44.
257. Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M.: Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*, 2005, 57, 143-153.
258. Tziomaios K., Charsoulis F.: Endocrine effect of tobacco smoking. *Clinical Endocrinology*, 2004, 61, 664-674.
259. US Department of Health and Human Services Smoking and women's health. Report of the Surgeon General, Rockville, US DHHS, 2001.
260. Van Voorhis B., Dawson J., Stovall D., Sparks A., Syrop C.: The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstetrics and Gynecology*, 1996, 88, 785-791.
261. Viala A., Tab-tabagisme W.: *Éléments de toxicology*. Tec. Doc. Lavisier, Editions Medicales Internationales, Paris, Cachan, 1998, 437-454.
262. Wald N., Baron J.: Smoking and hormone-related disorders. Oxford University Press, 1990.
263. Wall M.A., Johnson J., Jacob III P., Benowitz N.L.: Cotinine in the Serum, Saliva and Urine of Nonsmokers, Passive Smokers and Active Smokers. *The American Journal of Public Health*, 1988, 78, 699-701.
264. Warenik – Szymankiewicz A.: Kliniczna perinatologia i ginekologia. *PTMP*, 1996, 16, 91-100.
265. Wąsowicz M., Żurawski P., Florek E., Seńczuk W., Biczysko W.: Retardation of lung development after Materna cigarette smoking and low protein diet In Animals model. *Polish Journal of Pathology*, 1994, 45, 155.
266. WHO; www.who.un.org.pl; 19.08.2009.
267. World Health Organization. Tobacco or health: A global status report. WHO, Geneva, 1997.
268. Wiergowski M., Nowak-Banasik L., Morkowska A., Galer-Tatarowicz K., Szpiech B., Korolkiewicz R., Sein-Anand J.: Problematyka oznaczania nikotyny i kotyniny w ludzkim materiale biologicznym w aspekcie badań toksykologicznych. *Przegląd Lekarski*, 2006, 63, 892-896.
269. Wierzejewska R., Jarosz M.: Czy palenie tytoniu jest skuteczne w kontroli masy ciała – przegląd piśmiennictwa. *Przegląd Lekarski*, 2008, 65, 10, 413-742.

270. Windham G.C., Mitchell P., Anderson M., Lasley B.L.: Cigarette smoking and effects on hormone function in premenopausal women. *Environmental Health Perspectives.*, 2005, 113, 10, 1285-1290.
271. Winter E., Wang J., Davies M.: Early pregnancy. W: WHO Women and tobacco epidemic - challenges for the 21st century. WHO/NMH/TFI 2001.
272. Winters S.J., Moore J.P. Jr.: PACAP, An autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *BOR Papers in Press*, 2010, 29.
273. Wojcińska M., Gawron-Gzella A., Dudek M., Matławska I.: Gatunki z rodzaju *Nicotiana L.* – rośliny ozdobne, lecznicze czy trujące. *Kobieta i tytoń. Aktualne badania w Polsce*, 2002, 275 – 285.
274. Wood C.: Estrogen - hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2005, 12, 67-76.
275. Wuttke W., Ptizel L., Seidlova-Wuttke, Hinney B.: LH pulses and the corpus luteum: the luteal phase deficiency (LPD). *Vitamins and Hormones*, 2001, 63, 131-158.
276. Yildiz D.: Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon*, 2004, 43, 619–632.
277. Zalanyi S.: Progesterone and ovulation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2001, 98, 152-159.
278. Zaprutko L., Wrzeciono U.: *Chemia związków naturalnych*. Uniwersytet Medyczny, Poznań, 2001.
279. Zaworski B.: Wiek menarche dziewcząt z terenu województwa pomorskiego w XX i na początku XXI wieku. *Słupskie Prace Biologiczne*, 2008, 5, 137-150.
280. Zeleznik A.: Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2001, 8, 24-25.
281. Zenes M., Reed T., Casper R.: Effects of cigarette smoking and age on maturation on human oocytes. *Human Reproduction*, 1997, 12, 1736-1741.
282. Zumoff B., Miller L., Levit C.D., Miller E.H., Heniz U., Kalin M., Denmar H., Jandorek R., Rosenfeld R.S.: The effect of smoking on serum progesterone, estradiol and luteinizing hormone levels over a menstrual cycle in normal women. *Steroids*, 1990, 55, 507-511.

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.:

**„Wpływ palenia tytoniu i biernego narażenia na dym na cykl miesięczkowy
kobiet ”**

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis

.....
.....