

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJANA PRAH KRUMPAK

## MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJANA PRAH KRUMPAK

**Določanje kotinina v urinu, kot biološkega označevalca  
izpostavljenosti nikotinu iz tobaka**

**Determination of urine cotinine as a biomarker of  
nicotine exposure to tobacco**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

### ***Zahvala***

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za izkazano strokovno pomoč, vzpodbudo in nasvete pri opravljanju magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Stanki Sever, dipl. ing. lab. biomed., in Veri Troha Poljančič, lab. teh., za pomoč pri zbiranju in analizi vzorcev ter vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastajanju magistrske naloge. Na tem mestu bi se rada zahvalila tudi doc. dr. Mariji Prezelj, spec. med. biokem., za vzpodbudne besede tekom mojega študija.

Nenazadnje se moram za vzpodbudo, podporo in potrpljenje med časom študija zahvaliti tudi možu Andreju in sinu Janu, ki sem ju prikrajšala za kar nekaj skupnih trenutkov.

### ***Izjava***

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom Določanje kotinina v urinu, kot biološkega označevalca izpostavljenosti nikotinu iz tobaka izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Marjana Prah Krumpak

Ljubljana, 2012

**Predsednik komisije:** prof. dr. Janko Kos

**Mentor:** prof. dr. Joško Osredkar

**Član komisije:** doc. dr. Janez Mravljak

# **KAZALO VSEBINE**

|   |            |
|---|------------|
| <b>KAZALO SLIK .....</b>  | <b>I</b>   |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>  | <b>II</b>  |
| <b>KAZALO GRAFIKONOV .....</b>  | <b>III</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>POVZETEK .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>1 UVOD .....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 RAZŠIRJENOST KAJENJA PO SVETU IN PRI NAS .....                                  | 2          |
| 1.2 UKREPI ZA PREPREČEVANJE KAJENJA .....   | 2          |
| 1.3 TOBAK .....   | 4          |
| 1.3.1 Zgodovina tobaka .....  | 4          |
| 1.4 ŠKODLJIVE SNOVI V CIGARETI .....  | 6          |
| 1.5 VPLIV KAJENJA NA ZDRAVJE LJUDI .....  | 6          |
| 1.5.1 Bolezni, ki jih povzročajo kajenje .....                                      | 7          |
| 1.6 PASIVNO KAJENJE .....   | 9          |
| 1.6.1 Škodljivi učinki pasivnega kajenja .....                                      | 10         |
| 1.7 NIKOTIN .....   | 10         |
| 1.7.1 Toksičnost nikotina .....   | 12         |
| 1.7.2 Odvisnost od nikotina .....   | 12         |
| 1.8 FARMAKODINAMIKA NIKOTINA .....  | 13         |
| 1.9 FARMAKOKINETIKA NIKOTINA .....  | 14         |
| 1.9.1 Absorpcija nikotina .....   | 14         |
| 1.9.2 Porazdelitev nikotina po tkivih .....   | 15         |
| 1.9.3 Metabolizem nikotina .....  | 16         |
| 1.9.3.1 Presnovne poti nikotina in njegovi presnovki .....                          | 16         |
| 1.9.4 Kotonin .....   | 18         |
| 1.9.4.1 Metabolizem kotinina .....  | 19         |
| 1.9.5 Kvantitativni vidik metabolizma nikotina (kotinina) .....                     | 19         |
| 1.9.6 Izločanje nikotina (kotinina) .....   | 20         |
| 1.9.6.1 Dejavniki, ki vplivajo na presnovo ter izločanje nikotina in kotinina ..... | 21         |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 1.9.6.1.1 | Prehrana .....  | 21        |
| 1.9.6.1.2 | Starost .....   | 21        |
| 1.9.6.1.3 | Cirkadiani ritmi .....  | 22        |
| 1.9.6.1.4 | Spol .....  | 22        |
| 1.9.6.1.5 | Patološka stanja .....  | 22        |
| 1.9.6.1.6 | Zdravila .....  | 22        |
| 1.9.6.1.7 | Kajenje .....   | 22        |
| 1.9.6.1.8 | Rasne in etnične razlike .....  | 23        |
| 1.10      | BIOLOŠKI OZNAČEVALCI IZPOSTAVLJENOSTI TOBAČNEMU DIMU ....                           | 23        |
| 1.10.1    | NIKOTIN kot biološki označevalec izpostavljenosti tobačnemu dimu .....              | 24        |
| 1.10.2    | KOTININ kot biološki označevalec izpostavljenosti tobačnemu dimu .....              | 24        |
| 1.10.3    | Izbor bioloških vzorcev za določanje koncentracije kotinina .....                   | 25        |
| 1.10.4    | Izbor bioloških vzorcev za ugotavljanje izpostavljenosti otrok tobačnemu dimu ..... | 26        |
| 1.10.5    | Namen določanja kotinina .....  | 27        |
| 1.11      | METODE DOLOČANJA BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV IZPOSTAVLJENOSTI TOBAČNEMU DIMU .....       | 27        |
| 1.11.1    | Metode določanja kotinina .....   | 28        |
| 1.11.1.1  | Hitri testi .....   | 28        |
| 1.11.1.2  | Kromatografske metode .....   | 28        |
| 1.11.1.3  | Encimskoimunski testi .....   | 29        |
| <b>2</b>  | <b>NAMEN NALOGE .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3</b>  | <b>EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>  | <b>32</b> |
| 3.1       | MATERIAL ZA ANALIZO .....   | 32        |
| 3.2       | METODE DOLOČANJA .....  | 32        |
| 3.2.1     | Metoda določanja koncentracije kreatinina v urinu .....                             | 32        |
| 3.2.1.1   | Reagenti, kalibratorji, kontrole .....  | 33        |
| 3.2.1.2   | Aparature in pribor .....   | 33        |
| 3.2.1.3   | Princip metode .....  | 33        |
| 3.2.1.4   | Stabilnost vzorca .....   | 33        |
| 3.2.1.5   | Podajanje rezultatov .....  | 34        |
| 3.2.2     | Metoda določanja koncentracije kotinina v serumu in urinu .....                     | 34        |
| 3.2.2.1   | Cotinine Direct ELISA Kit (Calbiotech, ZDA) .....                                   | 35        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2.1.1 Reagenti, kalibratorji, kontrole .....          | 35        |
| 3.2.2.1.2 Aparature in pribor .....                       | 35        |
| 3.2.2.1.3 Princip metode.....                             | 35        |
| 3.2.2.1.4 Opis analitskega postopka.....                  | 36        |
| 3.2.2.1.5 Značilnosti metode.....                         | 37        |
| 3.2.2.2 Cotinine ELISA Kit (Abraxis, ZDA) .....           | 38        |
| 3.2.2.2.1 Reagenti, kalibratorji, kontrole .....          | 38        |
| 3.2.2.2.2 Aparature in pribor .....                       | 38        |
| 3.2.2.2.3 Princip metode.....                             | 38        |
| 3.2.2.2.4 Opis analitskega postopka.....                  | 39        |
| 3.2.2.2.5 Značilnosti metode.....                         | 40        |
| 3.3 STATISTIČNA ANALIZA.....                              | 40        |
| <b>4 REZULTATI.....</b>                                   | <b>41</b> |
| 4.1 REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ KOTININA V URINU ..... | 41        |
| 4.2 NORMALNOST PORAZDELITVE VZORCEV.....                  | 42        |
| 4.3 KORELACIJA .....                                      | 42        |
| 4.4 GRAFIČNI PRIKAZI REZULTATOV MERITEV KOTININA.....     | 44        |
| <b>5 RAZPRAVA.....</b>                                    | <b>54</b> |
| <b>6 SKLEPI .....</b>                                     | <b>64</b> |
| <b>7 LITERATURA IN VIRI.....</b>                          | <b>66</b> |
| <b>8 PRILOGE.....</b>                                     | <b>70</b> |

## **KAZALO SLIK**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Slika 1:</b> Nicotiana rustica.....   | <b>4</b>  |
| <b>Slika 2:</b> Krištof Kolumb na Santi Marii leta 1492 .....                  | <b>5</b>  |
| <b>Slika 3:</b> Nikotin - 3D struktura.....                                    | <b>11</b> |
| <b>Slika 4:</b> Strukture tobačnih alkaloidov.....                             | <b>12</b> |
| <b>Slika 5:</b> Vezava nikotina na nAChR v mezolimbičnem predelu možganov..... | <b>14</b> |
| <b>Slika 6:</b> Glavne poti metabolizma nikotina.....                          | <b>18</b> |
| <b>Slika 7:</b> Kotinin - 3D struktura.....                                    | <b>19</b> |
| <b>Slika 8:</b> Kvantitativni vidik metabolizma nikotina .....                 | <b>20</b> |
| <b>Slika 9:</b> Analizator Personal LAB <sup>TM</sup> (Adaltis/Italija).....   | <b>34</b> |
| <b>Slika 10:</b> Primer umeritvene krivulje za kotinin .....                   | <b>36</b> |
| <b>Slika 11:</b> Shematski prikaz kompetitivne ELISE .....                     | <b>37</b> |

## **KAZALO PREGLEDNIC**

|  |           |
|--|-----------|
| <i><b>Preglednica I:</b> Deskriptivni podatki izmerjenih vrednosti kotinina izraženih v <math>\mu\text{g/l}</math> v urinu NK, PK, KA in KAB ter vrednosti kotinina v serumu KAB .....</i> | <b>41</b> |
| <i><b>Preglednica II:</b> Deskriptivni podatki izmerjenih vrednosti kotinina/kreatinin izraženih v <math>\mu\text{g/mmol}</math> v urinu NK, PK, KA in KAB .....</i>                       | <b>42</b> |
| <i><b>Preglednica III:</b> Test normalnosti porazdelitve podatkov v vzorcih seruma in urina kadilke abstinence in v 24-urnih vzorcih urina kadilcev .....</i>                              | <b>42</b> |
| <i><b>Preglednica IV:</b> Korelacija koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA) izražene v <math>\mu\text{g/mmol}</math> in števila dnevno pokajenih cigaret.....</i>   | <b>43</b> |
| <i><b>Preglednica V:</b> Korelacija koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA) izražene v <math>\mu\text{g/mmol}</math> in dnevnega vnosa nikotina .....</i>            | <b>43</b> |
| <i><b>Preglednica VI:</b> Korelacija koncentracije kotinina v urinu in koncentracije kotinina v serumu pri kadilki abstinence (KAB) .....</i>  | <b>44</b> |



## **KAZALO GRAFIKONOV**

|   |    |
|---|----|
| <b>Grafikon I:</b> Grafični prikaz izmerjenih povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina nekadilcev (NK), pasivnih kadilcev (PK) in kadilcev (KA) ter 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA)..... | 44 |
| <b>Grafikon II:</b> Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v vzorcih urina nekadilcev (NK).....   | 45 |
| <b>Grafikon III:</b> Grafični prikaz povprečnih koncentracij kotinina v vzorcih urina pasivnih kadilcev (PK) glede na povprečno koncentracijo kotinina v vzorcih urina nekadilcev (NK).....                     | 45 |
| <b>Grafikon IV:</b> Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v jutranjem (PK-1), opoldanskem (PK-2) in večernem (PK-3) urinu pri prvi (1 PK) in četrti (4 PK) pasivni kadilki .....                     | 46 |
| <b>Grafikon V:</b> Primerjava povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina matere kadilke (4 KA) in njenih hčera – pasivnih kadilk (1 PK in 4 PK) .....   | 46 |
| <b>Grafikon VI:</b> Grafični prikaz sprememb koncentracij kotinina v urinu v odvisnosti od časa dveh pasivnih kadilcev po triurni izpostavljenosti tobačnemu dimu (2 PK, 3 PK).....                             | 47 |
| <b>Grafikon VII:</b> Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v jutranjih, opoldanskih, večernih in 24-urnih (dnevni) vzorcih urina kadilcev (KA) .....   | 47 |
| <b>Grafikon VIII:</b> Grafični prikaz izmerjenih povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina kadilcev (KA).....  | 48 |
| <b>Grafikon IX:</b> Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA) .....   | 48 |
| <b>Grafikon X:</b> Grafični prikaz vpliva števila dnevno pokajenih cigaret na koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA).....  | 49 |
| <b>Grafikon XI:</b> Grafični prikaz vpliva dnevnega vnosa nikotina na koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA).....  | 49 |
| <b>Grafikon XII:</b> Krivulja sprememb koncentracij kotinina v urinu in serumu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinenci (KAB) .....  | 50 |
| <b>Grafikon XIII:</b> Krivulja sprememb koncentracij kotinina v serumu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinenci (KAB).....   | 50 |
| <b>Grafikon XIV:</b> Krivulja sprememb koncentracij kotinina v urinu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinenci (KAB).....   | 51 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Grafikon XV:</b> <i>Grafični prikaz kinetike izločanja kotinina pri kadilki abstinentki (KAB) – koncentracije izmerjene v serumu in urinu so izražene v %.....</i>  | <b>51</b> |
| <b>Grafikon XVI:</b> <i>Grafični prikaz idealne in izmerjene hitrosti izločanja kotinina pri kadilki abstinentki (KAB) v % (serum).....</i>  | <b>52</b> |
| <b>Grafikon XVII:</b> <i>Grafični prikaz idealne in izmerjene hitrosti izločanja kotinina pri kadilki abstinentki (KAB) v % (urin).....</i>  | <b>52</b> |
| <b>Grafikon XVIII:</b> <i>Grafični prikaz primerjave idealnega in teoretičnega razpolovnega časa (<math>t_{1/2}</math>) kotinina z izmerjenim časom v urinu in serumu kadilke abstinentke (spremljanje 5 dni).....</i> | <b>53</b> |

## SEZNAM OKRAJŠAV

|              |  |
|--------------|--|
| <b>AIDS</b>  | Sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome)                                     |
| <b>FDA</b>   | Ameriška vladna organizacija za zdravila in prehrano (angl.: Food and Drug Administration)                                   |
| <b>SZO</b>   | Svetovna zdravstvena organizacija (angl.: World Health Organisation – WHO)   |
| <b>ENSP</b>  | Evropska mreža za preprečevanje kajenja in rabe tobaka (angl.: European Network for Smoking and Tobacco Prevention)          |
| <b>NNT</b>   | nikotinska nadomestna terapija   |
| <b>FCTC</b>  | Okvirna konvencija Svetovne zdravstvene organizacije za nadzor nad tobakom (angl.: Framework Convention for Tobacco Control) |
| <b>KOPB</b>  | kronična obstruktivna pljučna bolezen  |
| <b>DNK</b>   | deoksiribonukleinska kislina   |
| <b>SIDS</b>  | sindrom nenadne smrti dojenčka (angl.: Sudden Infant Death Syndrome)   |
| <b>TDO</b>   | tobačni dim iz okolja (angl. Environment of Tobacco Exposure - ETS)  |
| <b>EPA</b>   | ameriška agencija za zaščito okolja (angl.: US Environmental Protection Agency)  |
| <b>NNK</b>   | 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon   |
| <b>NNAL</b>  | 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanol   |
| <b>nAChR</b> | nikotinski acetilholinski receptorji   |
| <b>ACh</b>   | acetilholin  |
| <b>CYP</b>   | citokrom   |
| <b>NNN</b>   | N'-nitrozonornikotin   |
| <b>AOX</b>   | aldehid oksidaza   |
| <b>FMO3</b>  | flavin vključujoče monooksigenaze 3  |
| <b>NNO</b>   | nikotin N'-oksid   |
| <b>UGT</b>   | uridin difosfat glukuronoziltransferaza  |
| <b>BO</b>    | biološki označevalec   |
| <b>TD</b>    | tobačni dim  |
| <b>KA</b>    | kadilec  |
| <b>PK</b>    | pasivni kadilec  |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>NK</b>              | nekadilec  |
| <b>HPLC</b>            | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)     |
| <b>GC/MS</b>           | plinska kromatografija z masno spektrometrija (angl.: Gas Chromatography with Mass Spectrometry) |
| <b>ELISA</b>           | encimskoimunski test (angl.: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)                                  |
| <b>KAB</b>             | kadilec abstinent  |
| <b>Ab</b>              | protitelo (angl.: Antibody)  |
| <b>Ag</b>              | antigen (angl.: Antigen)   |
| <b>HRP</b>             | hrenova peroksidaza  |
| <b>TMB</b>             | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin   |
| <b>OD</b>              | optična gostota (angl.: Optical density)   |
| <b>t<sub>1/2</sub></b> | razpolovni čas   |

## **POVZETEK**

Kajenje tobaka je še vedno naraščajoč problem današnje družbe. Tobak vsebuje alkaloid nikotin, ki pa ne predstavlja neposrednega vzroka za večino s tobakom povezanih bolezni, temveč povzroča zasvojenost, ki je vzrok ponavljajoče rabe tobačnih izdelkov, kar vodi do povečane izpostavljenosti različnim bioaktivnim snovem. Kajenje je vzrok za razvoj številnih bolezni kadilcev in nekadilcev, ki so hote ali nehote izpostavljeni tobačnemu dimu (TD). Kotinin, metabolit nikotina, je najbolj specifičen in najobčutljivejši biološki označevalec izpostavitve tobačnemu dimu. Kljub temu pa obstajajo številni dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo kotinina v telesu, zato sta interpretacija rezultatov in ločevanje med nekadilci (NK), pasivnimi kadilci (PK) in kadilci (KA) včasih težavni.

V nalogi smo na majhnem številu 24 preiskovancev želeli v grobem prikazati, kakšne so koncentracije kotinina v urinu NK, PK in KA, ki smo jih merili z imunološko kompetitivno tehniko ELISA. V poskusu, kjer je ena izmed preiskovank kadilk opustila kajenje za pet dni, smo z merjenjem koncentracije kotinina v serumu in urinu želeli spremljati kinetiko izločanja kotinina in ugotoviti, kakšen je razpolovni čas kotinina naše preiskovanke.

Potrdili smo navedbe v literaturi, da so koncentracije kotinina v urinu NK nižje od 3–5  $\mu\text{g/l}$ , pri PK nižje od 30  $\mu\text{g/l}$ , pri KA pa občutno višje, saj pri vseh kadilcih, vključenih v našo nalogo, presegajo 50  $\mu\text{g/l}$ , kar je tudi meja med abstinenco in kajenjem. Prav tako se je izkazalo, da otroci kadilcev, kot tudi pasivni kadilci, ki so le kratek čas izpostavljeni tobačnemu dimu, absorbirajo določen delež nikotina.

Koncentracije kotinina v vzorcih urina KA lahko dnevno zelo variirajo. Nanje vplivajo številni dejavniki. To so kadilske navade, individualne razlike v samem metabolizmu in izločanju kotinina, genetski dejavniki in številni drugi vplivi.

V nalogi smo poleg prikaza posameznih vrednosti kotinina v vzorcih urina KA želeli prikazati tudi korelacijo med številom dnevno pokajenih cigaret ter dnevnim vnosom nikotina in koncentracijo dnevno izločenega kotinina v urinu. Izkazalo se je, da v nobenem primeru ne gre za statistično značilne povezave med spremenljivkama ( $p > \alpha$ ). V obsežnejših člankih navajajo, da oba parametra lahko signifikantno vplivata na koncentracijo kotinina v telesu. Vzrok, da v našem primeru ni tako, je verjetno v zelo majhnem številu preiskovancev in številnih dejavnikih, ki lahko vplivajo na koncentracijo kotinina.

V zadnjem delu naše naloge smo želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med koncentracijami kotinina v urinu in serumu pri poskusu, kjer je preiskovanka, sicer

kadilka, za teden dni opustila kajenje, medtem pa vsak dan zjutraj oddala vzorec urina in krvi. Kot je navedeno v literaturi, smo uspeli pokazati, da so koncentracije kotinina v urinu približno 10-krat višje kot v serumu, kotinin pa lahko v vzorcih zaznamo še več dni po izpostavitvi. Prav tako se je izkazalo, da med koncentracijami kotinina v serumu in urinu obstaja zelo močna povezava, saj Pearsonov koeficient korelacije znaša kar 0,998 (Sig. = 0,0001;  $p < 0,05$ ). Tako smo zadostili našim pričakovanjem in potrdili navedbe obsežnejših študij. Kot zadnje nas je v poskusu pri KAB zanimalo, ali se njen razpolovni čas ( $t_{1/2}$ ) kotinina ujema s teoretičnim, ki je približno 20 ur. Povprečen razpolovni čas kotinina naše preiskovanke v urinu je 21,94 ur, v serumu pa 24,78 ur, kar pomeni, da je  $t_{1/2}$  v našem poskusu blizu vrednosti, ki jih navajajo v različnih literaturah.

Ob koncu poudarjamo, da smo v nalogi želeli le v grobem prikazati, kakšne so koncentracije kotinina v urinu, saj imamo v vsaki skupini le majhno število preiskovancev, dejavnikov, ki na koncentracije kotinina vplivajo, pa je ogromno.

## **1 UVOD**

Kajenje je velik, morda najpomembnejši in verjetno trajen javnozdravstveni problem sodobne družbe. V večini evropskih mest zaradi kajenja tobaka umre več ljudi kot zaradi škodljive rabe alkohola, prometnih nesreč, požarov, samomorov, mamil in sindroma pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS) skupaj (1). Kajenje je med dejavniki tveganja najpomembnejši vzrok smrti, ki pa ga lahko preprečimo (2). Nikotin, tobačni alkaloid, ne predstavlja neposrednega vzroka za večino s tobakom povezanih bolezni, temveč povzroča zasvojenost. Ta je vzrok kontinuirane rabe tobačnih izdelkov, kar vodi do povečane izpostavljenosti različnim bioaktivnim snovem. Mnoge od njih so rakotvorne in vodijo v prezgodnjo smrt (3).

Ameriška vladna organizacija za zdravila in prehrano (angl.: Food and Drug Administration – FDA) je nikotin v tobaku razglasila za drogo, ki povzroča psihofizično odvisnost (4). Odvisnost od tobaka in odtegnitveni sindrom sta opredeljena v Mednarodni klasifikaciji bolezni (MKB-10) pod šifro F17 v skupini »Duševne in vedenjske motnje zaradi uživanja psihoaktivnih snovi«. Tako je odvisnost od tobaka opredeljena kot bolezen, ki se kaže v nenehni želji po vnovičnem poseganju po tobaku, po izgubi nadzora nad številom pokajenih cigaret, podaljševanju časa, namenjenega kajenju, zvišani toleranci (potrebne so večje količine nikotina), odtegnitvenih simptomih (1). Poleg nikotina, ki vodi v pogubo, je v tobaku še več kot 4600 kemičnih spojin, od tega več kot 60 kancerogenih (5). Največ ljudi začne kaditi v rani mladosti, ko njihova zmožnost kritične presoje še ni dokončno izoblikovana. Prvo cigareto otrok prižge iz radovednosti (6). Večina otrok ve, kako je kajenje škodljivo, a vseeno nadaljujejo s to omamno pogubno razvado. Žal je kajenja med mladimi vse več. Hkrati je zelo pomembno vedeti, da zaradi izpostavljenosti tobačnemu dimu obolevajo in umirajo tudi nekadilci (7).

Zaradi tobaka vsako leto umre okoli 6 milijonov ljudi po svetu, od tega kar 600.000 nekadilcev, hkrati pa tobak povzroča ogromno gospodarsko škodo (8). Po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije – SZO (angl.: World Health Organisation – WHO) kajenje v razvitih državah povzroča kar 90 % pljučnega raka pri moških in 70 % pri ženskah, 15–20 % drugih vrst raka, 56–80 % kroničnih bolezni dihal in kar 22 % bolezni srca in ožilja. Vsak drugi kadilec umre zaradi bolezni, povezane s kajenjem. V Evropski uniji je kajenje vzrok za kar 650.000 smrti na leto (7). Predvideva se, da bo kajenje leta 2050 krivo za smrt treh milijonov ljudi letno v razvitem in sedmih milijonov ljudi letno v nerazvitem svetu (9).

## **1.1 RAZŠIRJENOST KAJENJA PO SVETU IN PRI NAS**

Po podatkih SZO danes kadi približno tretjina svetovne odrasle populacije. V Sloveniji kadi približno četrtnina prebivalcev starih nad 15 let (6). Vzroki za poseganje po tobaku so družba, zgled staršev, lahko depresija, anksioznost ali genetski dejavniki. Kajenje je pogostejše pri ljudeh z duševnimi motnjami (10).

Kajenje je bolj razširjeno med moškimi. Po podatkih Evropske mreže za kajenje in preprečevanje rabe tobaka (angl.: European Network for Smoking and Tobacco Prevention – ENSP) iz leta 2010 je prevalenca kajenja v Sloveniji 20,7 % , od tega 25,3 % pri moških in 16,8 % pri ženskah (11).

Večina kadilcev začne kaditi že v dobi adolescence, nekje okoli 18. leta, nekateri že prej. Raziskave kažejo, da tisti, ki začnejo kaditi že v mladosti, postanejo še huje odvisni od nikotina in še težje opustijo kajenje (5). Po podatkih iz zadnje mednarodne raziskave z naslovom »Z zdravjem povezano vedenje v šolskem obdobju« (HBSC 2010) je pri nas poskusilo kaditi nekaj manj kot 30 % mladih, starih od 11 do 15 let, med 15-letniki pa že kar 53 % (2).

Razširjenost kajenja je močno povezana s socialno-ekonomskim statusom. V preteklosti je bilo več kadilcev med izobraženimi in v visoki družbi. Večja ozaveščenost o zdravstvenih posledicah je pripeljala do tega, da veliko kadilcev skuša opustiti kajenje, kar je eden najpomembnejših korakov do boljšega počutja. Tako lahko preprečimo številne bolezni, kar pomeni ogromne zdravstvene koristi (5).

## **1.2 UKREPI ZA PREPREČEVANJE KAJENJA**

Ker je raba tobaka povezana z visokimi stroški, tako za družbo kot posameznika, imajo države številne razloge, da aktivno pristopijo k zmanjševanju kajenja. Ljudje imajo pravico do obveščeniosti o tem, kako je tobak zdravju škodljiv, države pa obveznost, da o tem poročajo in jih ščitijo pred tovrstno nevarnostjo. Drug zelo pomemben pristop politike je omogočiti svež zrak brez tobačnega dima vsem, ki ne kadijo. Poleg preprečevanja sta seveda nujno potrebni tudi vzpodbuda in pomoč s svetovanjem pri opustitvi kajenja (7).

Kar 70–80 % kadilcev namreč želi prenehati s kajenjem, vendar uspe le nekaterim. Farmakološki in vedenjski procesi pri odvisnosti od tobaka so podobni kot pri odvisnosti od heroina in kokaina (5). V zadnjih 50 letih potekajo številne raziskave z namenom ugotoviti škodljive učinke uporabe tobaka. Prav tako obstajajo številni programi in



inštitucije za pomoč pri odvijanju od kajenja. Obstajajo tudi načini zdravljenja s pomočjo nikotinske nadomestne terapije – NNT (angl.: Nicotine Replacement Therapy – NRT), ki so kadilcem pogosto v pomoč na poti do uspeha (12).

Številne države imajo zakonodajo, ki omejuje rabo tobaka in tobačnih izdelkov, ter regulative o tem, kdo in kje jih lahko kupuje in uporablja, bodisi s kajenjem, njuhanjem ali žvečenjem. SZO (ustanovljena leta 1948) od leta 1996 pospešeno nadzoruje uporabo tobačnih izdelkov v svetu in vsako leto izda smernice ter poroča o stanju svetovnega nadzora nad uporabo tobaka z namenom opozarjanja javnosti o njegovi nevarnosti. Številne znanstvene raziskave dokazujejo, da je izpostavljenost tobačnemu dimu škodljiva, smrtonosna in povzroča številne bolezni in invalidnost. SZO podaja smernice, kako se obraniti izpostavljenosti tobačnemu dimu. Ker ne obstaja najnižji oziroma varen odmerek izpostavljenosti, bi morali imeti vsi ljudje možnost, da se temu izognejo (8).

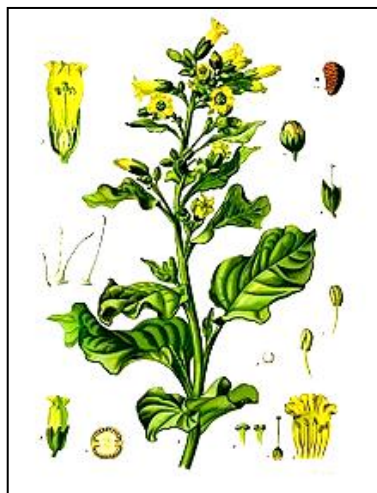
SZO je že leta 1987 razglasila 31. maj za svetovni dan brez tobaka. V letu 2011 je bila glavna tema Okvirna konvencija SZO za nadzor nad tobakom (angl.: Framework Convention for Tobacco Control – FCTC), ki je bila dokončno sprejeta leta 2003. FCTC je mednarodna pogodba in hkrati eno najmočnejših orodij za zmanjševanje epidemije rabe tobaka v svetu. Do danes jo je ratificiralo že 172 držav sveta, med njimi leta 2005 tudi Slovenija. Ta konvencija zavezuje države, ki jo ratificirajo, da v svojih zakonodajah in nacionalnih strategijah sprejmejo ukrepe za zmanjševanje povpraševanja po tobaku. Ti ukrepi so obveščanje in osveščanje javnosti, višanje cen in davkov na tobačne izdelke, zaščita pred izpostavljenostjo tobačnemu dimu v zaprtih in drugih javnih prostorih, nadzor in obveščanje javnosti o vsebini tobačnih izdelkov, napisi o škodljivosti tobačnih izdelkov za zdravje na embalaži, prepoved uporabljanja izrazov kot so "lahke", "ultra lahke" ipd. (vzbujajo zmoten vtis, da so cigarete manj škodljive), prepoved oglaševanja tobačnih izdelkov, promocije ali sponzorstva ter pomoč pri zdravljenju odvisnosti od tobaka. Hkrati pa konvencija prepoveduje prodajo tobačnih izdelkov mladoletnim osebam (2).

V Sloveniji smo že uvedli številne, dokazano učinkovite ukrepe, nazadnje v letu 2007 z »Zakonom o omejevanju uporabe tobačnih izdelkov«. Zakon omejuje kajenje v vseh zaprtih javnih prostorih in na delovnih mestih, hkrati pa prepoveduje prodajo tobačnih izdelkov mlajšim od 18 let. Prav tako je prepovedano oglaševanje tobačnih izdelkov. Na embalaži so obvezna, z zakonom določena zdravstvena opozorila, kot npr. »Kajenje povzroča hudo zasvojenost, zato ne začnite kaditi« ali pa »Kajenje resno škoduje vam in ljudem okoli vas. Opustite kajenje.« (13).

## 1.3 TOBAK

Tobak je rastlina, ki jo uvrščamo v družino razhudnikovk (Lat.: Solanaceae). Je poživilo, ki ga lahko gojimo (12). Obstaja več kot 70 vrst tobaka, med njimi pa sta navadni tobak (Lat.: *Nicotiana tabacum*) in kmečki tobak (Lat.: *Nicotiana rustica*) tisti, ki sta najpogosteje uporabljeni za izdelavo tobačnih izdelkov. Vsem vrstam je skupno, da vsebujejo nikotin, alkaloid, ki je poimenovan po Francozu Jeanu Nicotu. Nikotin povzroča hudo obliko odvisnosti. Nikotin je učinkovit insekticid. V preteklosti so ga uporabljali tudi kot zdravilo, in sicer kot analgetik pri zobobolu, bolečinah v ušesih ter občasno tudi za vroče obkladke (14).

Uporaba tobaka v obliki cigaret, cigar, pip ali tobaka za žvečenje in njuhanje, pa tudi izpostavljenost produktom zgorevanja tobaka s pasivnim, nehotenim kajenjem pomembno pripomore k obolevnosti in smrtnosti zaradi več kot 20 različnih bolezni (9).



**Slika 1:** *Nicotiana rustica*

Vir: [URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana\\_rustica](http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana_rustica)], 2011 (14)

### 1.3.1 Zgodovina tobaka

Prvi začetki rabe tobaka segajo daleč v zgodovino. Tobak izvira iz Amerike. Prva poročila o uporabi tobaka med domorodci segajo v prvo stoletje pred našim štetjem. Pripisovali so mu veliko zdravilno moč. Z odkritjem Amerike pa se je tobak razširil tudi po Evropi (5).

Zgodovinski viri navajajo, da je pojav tobaka v Evropi povezan z 12. oktobrom 1492, ko se je Krištof Kolumb izkrcal na enem od Bahamskih otokov. Domačini so mu ob izkrcanju izročali razna darila, med katerimi so bili tudi veliki posušeni listi takrat še neznanе rastline. Kolumb je v ladijski dnevnik zabeležil, da je srečeval moške in ženske, ki so imeli

v rokah ogenj in kadili. Cev so na eni strani prižgali, na drugi pa iz nje vdihavali dim. Tako so se omamljali, uspavali in odpravljali utrujenost. Ko se je Kolumb vrnil v Španijo, je poročal o tem nenavadnem početju (9,15).



**Slika 2:** Krištof Kolumb na Santi Marii leta 1492  
Vir: [URL: <http://images.google.com/>], 2011

Tobak je osvojil Evropo po zaslugi Jeana Nicota, po katerem je kasneje rastlina dobila tudi ime *Herba nicotiana*, katere glavni alkaloid je nikotin. Nicot je bil francoski poslanik na portugalskem dvoru. Leta 1560 je tobak poslal Katarini Medičejski, materi francoskega kralja, kot zdravilo za migreno. Priporočil ji je njuhanje v prah zdrobljenih tobačnih listov. Menili so, da je tobak rastlina, ki zdravi vse bolezni – »Herba panacea«. Seveda se je novica o tej vsestranskosti rastline hitro širila po Evropi. Druga pot, po kateri se je tobak širil po Evropi, je bila preko Anglije za časa kraljice Elizabete I. Leta 1586 je sir Francis Drake v Anglijo prinesel pipe in tako je kajenje prišlo v angleško visoko družbo. Kraljičin naslednik Jakob I., ki je vladal v začetku 17. stoletja, je bil velik nasprotnik tobaka. Uvedel je visok davek in celo uničeval nasade. Leta 1604 je napisal knjigo z naslovom »Nasprotovanje tobaku«, v kateri je zapisal: »Navada je ostudna očesu, sovražna nosu, škodljiva možganom, nevarna pljučem in s črnim smrdečim dimom je podobna strašnemu dimu pekla, kateri nima dna.« (9, 16).

Sredi 19. stoletja se je na Kubi začela razvijati tobačna industrija. Zaradi razvoja filmske industrije pa so se okoli leta 1940 pojavile tudi prve reklame, ki so prikazovale tobak kot vir užitkov. Epidemično širjenje se je začelo že kmalu po razvoju prve cigarete. Kajenje je najprej osvojilo moške, nato še ženske. Danes je kajenje najbolj razširjeno v Vzhodni Aziji, kjer kadi približno tretjina vsega prebivalstva (9, 15, 16).

V Sloveniji je začetek množičnega kajenja pomenila prva svetovna vojna, saj je avstroogrška vlada vojake na frontah redno oskrbovala s cigareti. Približno dve desetletji zatem je kajenje osvojilo še Slovenke (6).

#### **1.4 ŠKODLJIVE SNOVI V CIGARETI**

Tobačni dim vsebuje preko 4600 kemičnih spojin, med katerimi so številne strupene učinkovine in kar 60 rakotvornih spojin. Izpostavljenost strupom, kot so N-nitrozamini in policiklični aromatski ogljikovodiki je lahko vzrok neoplastičnih bolezni, raka na mehurju, težav z dihanjem, pljučnic (5). V cigaretah se nahajajo tudi cianid, benzen, benzo[a]piren, vinilklorid, formaldehid, metanol, acetilen, kadmij, polonij, amoniak. Mnogi izmed teh so rakotvorni. Zelo pomembna je tudi vsebnost katrana. Kar pretresljivo je slišati, da se v 10 letih kajenja po 10 cigaret dnevno na sluznico grla, sapnika in bronhijev odloži kar 1 kg katrana. Del se ga s kašljem izloči, drugi del pa ostane predvsem v pljučih, kar močno poveča možnost za nastanek pljučnega raka. Številne snovi v cigareti pa ne škodujejo le kadilcem, ampak tudi drugim v okolici. Okoli 85 % dima se širi v okolico, medtem ko kadilec drži prižgano cigareto v roki, in le 15 % ga kadilec vdihne. Pri vsakem tlenju in nepopolnem zgorevanju nastaja tudi ogljikov monoksid (CO), plin brez barve, vonja in okusa, ki ga s čutili ne zaznamo. Ko vstopi v kri, ima več kot 300-krat večjo afiniteto za vezavo na hemoglobin kot kisik. CO je povezan z aterosklerozo in boleznimi srca in ožilja (15).

Škodljivim učinkom kajenja sledi tudi slovenska zakonodaja. Zakon o omejevanju uporabe tobačnih izdelkov iz leta 2007 določa, da je maksimalna dovoljena vsebnost katrana v cigareti 10 mg, nikotina 1 mg in ogljikovega monoksida 10 mg (13).

#### **1.5 VPLIV KAJENJA NA ZDRAVJE LJUDI**

Na pojavnost bolezni vplivajo tako število pokajenih cigaret kot tudi leta kajenja, katerih vpliv je še večji. Kajenje povzroča 30–40 % vseh smrti in zmanjša povprečno življenjsko dobo za 10 let. Največji morilci pri človeku so pljučni rak, kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) in srčnožilne bolezni, saj skupaj predstavljajo kar 70 % vseh smrtnih primerov zaradi kajenja na svetu. Poleg močnega vpliva kajenja na zdravje kadilcev pa ima ta žal zelo velik vpliv tudi pri nekadilcih, ki so izpostavljeni tobačnemu dimu. Škodljive učinke izkazuje tudi pri otrocih in plodu. Kajenje v nosečnosti je lahko vzrok za nizko

porodno težo, nenadno smrt dojenčka, kognitivne motnje, motnje pomanjkanja pozornosti in večjo verjetnost za pričetek kajenja med odraščanjem (5).

### **1.5.1 Bolezni, ki jih povzroča kajenje**

Poleg srčnožilnih bolezni so s kajenjem povezane različne vrste raka (pljuč, grla, ustne votline, požiralnika, sečnega mehurja, jeter, trebušne slinavke, ledvic, želodca, materničnega vratu, levkemije), bolezni dihal (kronični bronhitis, emfizem), možganska kap ter številne druge bolezni (Crohnova bolezen, razjede, zlomi, siva mrena). Znano je tudi, da kadilci pogosteje trpijo zaradi duševnih motenj (shizofrenije, depresije in generalizirane anksiozne motnje). Verjetnost za pojav pljučnega raka je pri kadilcih kar 22-krat večja kot pri nekadilcih (17).

Kajenje je eden glavnih vzrokov oksidativnega stresa, saj cigaretni dim vsebuje tudi reaktivne zvrsti (radikali in ne-radikali). Ko je porušeno razmerje med oksidanti in reducenti v telesu, pride do oksidativnega stresa, posledica pa so hude poškodbe makromolekul. Oksidativni stres vodi do lipidne peroksidacije, oksidacije proteinov in poškodb DNK ter posledično do apoptoze celic ali celo do rakavih sprememb celic (18).

Kajenje povečuje tveganje za razvoj Burgerjeve bolezni (vnetje žil in živcev) in lahko privede do gangrene ter posledično amputacije prizadetega dela. Dokazano je tudi, da kajenje slabi sluh. Kadilci so 3-krat dovzetnejši za okužbe srednjega ušesa kot nekadilci. Kajenje pospeši srčni utrip, zviša krvni tlak, poveča tveganje za hipertenzijo in trombozo in vodi do srčnega infarkta ter možganske kapi. Tveganje za pojav srčnih strdkov in infarkta pa se še poveča pri kadilkah, ki jemljejo kontracepcijska sredstva. Ker se iz cigarete med zgorevanjem sprošča ogromno različnih snovi, je kajenje vzrok za porumenele prste, zobe, prezgodnje gube (6). Kajenje cigaret je tudi dejavnik tveganja za različne infekcije, osteoporozo, pooperativne zaplete, počasnejše celjenje ran, nastanek rane na želodcu in dvanajstniku ter sladkorne bolezni (10).

Nikotin deluje tudi na možgane. Ko so preučevali, kako lahko jeza oz. stres vplivata na kajenje in odvisnost od nikotina, so ugotovili, da se različne možganske regije različno odzovejo na različne koncentracije nikotina. Nikotin lahko kritično ureja možganska področja, vpliva na sam metabolizem in hitrost odziva na stresni dejavnik. Jeza in strah sta tako lahko ključna dejavnika za začetek kajenja in s tem odvisnost od nikotina (19). Kajenje pospeši metabolizem. Kadilci zato občutijo ugodje, sproščenost in so polni energije. Na srečo pa je proces spremembe metabolizma zaradi kajenja reverzibilen, saj se

lahko po prenehanju kajenja v približno enem letu ponovno uredi. Ker kajenje zmanjša koncentracijo O<sub>2</sub> v krvi, pospeši utrip srca. Srce mora zato hitreje črpati kri, da zadosti potrebam organov po O<sub>2</sub>. Ker srce težje poganja kri, telo pa potrebuje več energije, se takoj po kajenju v kri sprostijo zaloge glukoze in maščob, kar je glavni vzrok, da kadilci po kajenju čutijo več energije. Ko se pri kadilcih pojavi signal za lakoto, ga ti pogosto zamenjajo z željo po nikotinu (20).

Kajenje je lahko vzrok za okvaro semenčic in poškodbe DNK. Tako ima velik vpliv pri samem razvoju ploda, lahko pa povzroča tudi impotenco (10). Kajenje je pomemben dejavnik tveganja za razvoj neželenih učinkov pri nosečih materah, fetusu in novorojenčkih. Kajenje med nosečnostjo predstavlja veliko tveganje za nastanek spontanega splava, intrauterinega zaostanka v rasti, pljučne hipertenzije in posledično motenega dihanja, prenatalne smrti, sindroma nenadne smrti dojenčka (angl.: Sudden Infant Death Syndrome - SIDS), nevroloških motenj in motenj v razvoju. Kasneje v otroštvu pa so otroci podvrženi številnim respiratornim infektom, astmi, sinusitisu (21, 22). Številne raziskave so pokazale, da ima kajenje škodljive učinke na celotno telo. Če na kratko povzamemo, so to učinki na:

- **LASE:** smrdijo in se obarvajo,
- **MOŽGANE:** kap, odvisnost in pozabljanje,
- **NOS:** oslabljen voh,
- **USTA in ZOBE:** rak, slabši okus, sprememba barve zob, obloge, izguba zob, bolezni dlesni (npr. gingivitis),
- **PLJUČA in RESPIRATORNI TRAKT:** pljučni rak, kašljanje, sputum, oteženo dihanje, pljučnice, astma, KOPB, emfizem, zapleti tuberkuloze,
- **JETRA, LEDVICA in MEHUR:** rak,
- **REPRODUKTIVNE ORGANE:** pri moških neplodnost, impotenca, slabša kvaliteta sperme, manj semenčic, deformacija semenčic, pri ženskah pa zgodnejša menopavza, rak materničnega vratu, neplodnost,
- **OČI:** katarakte, slepota – degeneracija makule,
- **KOŽO:** gube, staranje, opekline (požari povzročeni s tobakom),
- **ROKE:** slaba prekrvavitev, hladni prsti, rumeni prsti od katrana,
- **SRCE:** poškodbe srca, infarkt,
- **TREBUH:** ulkusi, rak želodca, pankreasa, kolona, anevrizme aorte,

- **KOSTI:** osteoporoza, zlomi,
- **KOSTNI MOZEG:** levkemije,
- **IMUNSKI SISTEM:** oslabljen (12).

## 1.6 PASIVNO KAJENJE

Pasivno kajenje je definirano kot izpostavljenost nekadilcev tobačnemu dimu v okolju – TDO (angl.: Environment of Tobacco Exposure – ETS). Zaskrbljenost zaradi nevarnosti za zdravje nekadilcev se je povečala, odkar so ugotovili, da je kemična sestava dima, ki ga pasivno vdihne nekadilec, podobna sestavi dima, ki ga vdihuje aktivni kadilec. Med zgorevanjem cigarete se namreč sprošča nevarna mešanica kemičnih snovi. Tako nekadilci, imenovani pasivni kadilci, vdihujejo stranski dim, imenovan »sidestream«, ki se vije iz prižgane cigarete in dim, ki ga po vdihavanju izdihne kadilec, imenovan »mainstream«. Pri zgorevanju tobaka nastajajo dimni delci ter plinske organske in anorganske molekule. Tobačni dim vsebuje ogromno toksičnih spojin. Mnoge od teh so iritanti, mutagene snovi in dokazani kancerogeni (6).

TDO je po ameriški Agenciji za zaščito okolja (angl.: US Environmental Protection Agency – EPA) klasificiran v skupino kancerogenov A. V Ameriki je okoli 50–75 % nekadilcev izpostavljenih TDO bodisi v službi ali okolici bodisi doma (23).

Nekadilci so ogroženi zaradi pasivnega kajenja tako na javnih prostorih kot tudi v domačem okolju. Pogosto je koncentracija snovi, ki onesnažijo zrak v prostoru, mnogo večja kot v zunanjem zraku. Te koncentracije so lahko celo za 200–500 % večje kot v zunanjem zraku. Prva povezava pasivnega kajenja s pljučnim rakom je bila ugotovljena v študiji na Japonskem, pri nekadilkah (Takeshi Hirayama, 1981). Pasivno kajenje je med dejavniki tveganja, ki jih je mogoče povsem odpraviti, na tretjem mestu, takoj za aktivnim kajenjem in alkoholom. Prepoved kajenja tobaka pomembno zmanjša izpostavljenost TDO, vendar pa ga ne odstrani, če ni popolne prepovedi, ki je edina učinkovita izbira. To pa je težko izvedljivo, saj je največji problem ravno kajenje doma. Nujno potrebno je obvarovati vsaj naše najmlajše (6).

Najboljši in najpogosteje uporabljeni indikator izpostavitve TDO je kotinin, metabolit nikotina. Določamo ga tudi pri otrocih. Koncentracije kotinina v urinu otrok dobro opišejo kadilske navade staršev (24). Na srečo poročajo, da so se koncentracije kotinina v zadnjih

15 letih znižale kar za 70 %, za kar imata velike zasluge politika z omejevanjem tobaka in družba z osveščanjem ljudi (25).

### **1.6.1 Škodljivi učinki pasivnega kajenja**

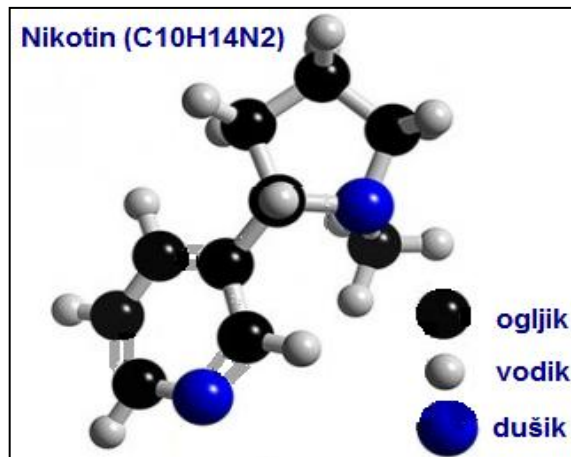
Akutni vplivi TDO na pasivnega kadilca so predvsem draženje nosu, oči in žrela, utrujenost, težave pri dihanju, kihanje, draženje kože, omotičnost, zaspanost, glavoboli, slabosti, pozabljivost. Nedvomno so dokazali, da sta pasivno kajenje oziroma izpostavljenost TDO vzročno povezana s pljučnim rakom pri odraslih ter ju lahko z vso gotovostjo opredelimo kot "znani humani kancerogen". Pri pasivnih kadilcih je 20–30 % večja verjetnost za razvoj pljučnega raka kot pri tistih nekadilcih, ki se ne gibljejo v okolju tobačnega dima. TDO je povezan tudi s povečano nevarnostjo za nastanek infekcij. Daljša izpostavljenost TDO poveča nevarnost za nastanek bolezni srca in ožilja (6).

SZO ocenjuje, da je zdravje skoraj polovice otrok ogroženo zaradi izpostavljenosti TDO. Pasivno kajenje ima velik vpliv na dogajanje v pljučih pri otrocih. Otroci, ki so kot pasivni kadilci izpostavljeni TDO, imajo pogoste infekcije respiratornega trakta in ušes, astmo, bronhitise ter znižane vse spirometrijske parametre. Otroški imunski sistem se namreč šele razvija (26). Ker imajo otroci majhna pljuča in dihajo hitreje kot odrasli, vdahnejo mnogo več škodljivih kemikalij kot odrasli v enakem času. Najbolj žalostno je, da se v primeru, ko kadijo njihovi starši, temu ne morejo izogniti. V neki raziskavi so ugotovili, da imajo dojenčki, rojeni materam, ki so bile izpostavljene pasivnemu kajenju med nosečnostjo, povečano število eritrocitov v krvi v primerjavi s kontrolno skupino, kar kaže na negativen učinek kajenja na fetalno oksigenacijo. Kajenje mater pa naj bi imelo bolj škodljiv vpliv na otroka kot kajenje očeta. To je moč razložiti z daljšim časom, ki ga otroci preživijo z mamo (6).

## **1.7 NIKOTIN**

Nikotin ( $C_{10}H_{14}N_2$ ) je tekoči alkaloid v tobaku. Je higroskopična, oljnata tekočina, ki se meša z vodo in prehaja skozi kožo. Predstavlja naravno zaščito rastline pred žuželkami, saj deluje kot insekticid. Nastaja v koreninah, nato pa se kopiči v listih tobaka. Predstavlja 5 % teže posušene rastline (14).



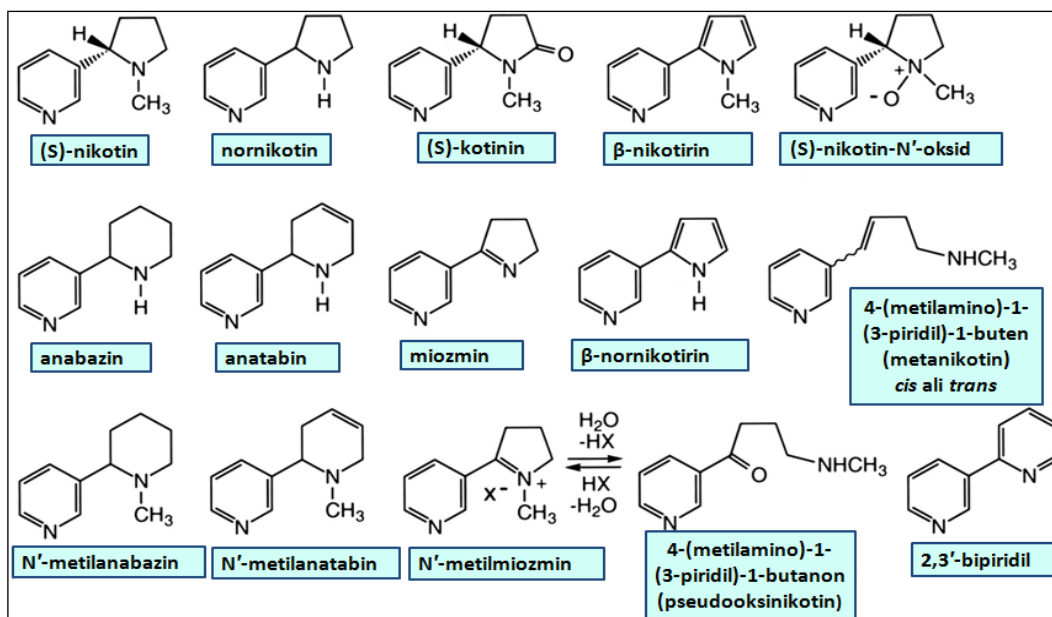


**Slika 3:** Nikotin - 3D struktura  
Vir: [URL: <http://images.google.com/>], 2011

Nikotin predstavlja približno 1,5 % teže cigarete in kar 95 % vseh alkaloidov v tobaku. Je optično aktivna snov. V tobaku se nahaja predvsem v obliki levosučnega (S) izomera, le 0,1– 0,6 % ga je v obliki desnosednega (R) izomera. Poleg nikotina najdemo v tobaku še druge alkaloidne, vendar v bistveno manjših količinah. To so naprimer nornikotin, anatabin in anabazin. Nekateri alkaloidi pa nastanejo z bakterijsko oksidacijo med obdelavo tobaka (miozmin, N''-metilmiozmin, kotinin, nikotirin, nikotin N'-oksid, 2,3'-bipiridil in metanikotin). Nikotin ni le v tobaku. V manjših količinah so ga našli tudi v paradižniku, krompirju in jajčevcih (27).

Z delovanjem dušikove(III) kisline na nikotin in ostale tobačne alkaloidne nastajajo dokazano kancerogene nitrozo spojine. Kot najbolj rakotvorni so N'-nitrozonornikotin, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) in 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) (3).

Nikotin je nedvomno najbolj škodljiva snov v cigaretah. Je snov z dvema obrazoma saj po eni strani deluje pomirjevalno, po drugi pa poživlja in vodi v hudo odvisnost (15).



Slika 4: Strukture tobačnih alkaloidov

Vir: [URL: : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953858/> ], 2011 (27)

### 1.7.1 Toksičnost nikotina

Nikotin, imenovan tudi toksin super, je eden najhujših strupov. Toksično deluje na periferno in centralno živčevje. 40–60 mg (0,5–1,0 mg/kg) je smrtni odmerek za odraslega človeka, 10 mg pa smrtni odmerek pri otroku (14). Nikotin je bolj toksičen od strihnina in kar trikrat bolj toksičen od arzenika (29).

V primeru zastrupitve povzroča številne neprijetnosti, med drugim tudi glavobol, slabost, bruhanje, zmedenost, utrujenost, porast krvnega tlaka, bradikardijo, atrijsko fibrilacijo, tremor, konvulzije, komo, paralizo mišic in smrt. Simptomi se pojavijo že v 15 minutah po zastrupitvi. Prav tako se simptomi lahko pojavijo pri nizkih odmerkih nikotina, kar je pogosto pri kadilcih, zlasti tistih, ki se s kajenjem srečajo prvič. Pri dolgotrajnem kajenju se kmalu razvije toleranca, tako da simptomi sčasoma izzvenijo (28).

### 1.7.2 Odvisnost od nikotina

Vsem vrstam tobaka je skupen nikotin, ki močno vpliva na možgane. Koliko nikotina bo prispelo v možgane, je odvisno od več dejavnikov, med drugim od načina kajenja, intenzivnosti vdihavanja. Nikotin povzroča dve vrsti odvisnosti, in sicer željo po kajenju ter odtegnitvene simptome, ko ne kadimo. Dolgotrajna izpostavljenost nikotinu povzroča spremembe v dopaminergičnem sistemu. V fazi abstinence, ko se kadilec odloči in skuša

prenehati s to nevarno razvado, se dopamin sprošča v manjših koncentracijah. Posledično se poveča izločanje kortikotropnega sproščujočega faktorja, kar povzroča neprijetne odtegnitvene simptome. Številna proučevanja so pokazala, da so vedenjski in farmakološki procesi odvisnosti od tobaka podobni tistim pri odvisnosti od heroina in kokaina. Tako je na podlagi dosedanjih dokazov jasno, da tobak predstavlja zelo hudo, resno in najbolj razširjeno obliko odvisnosti od mamil (5).

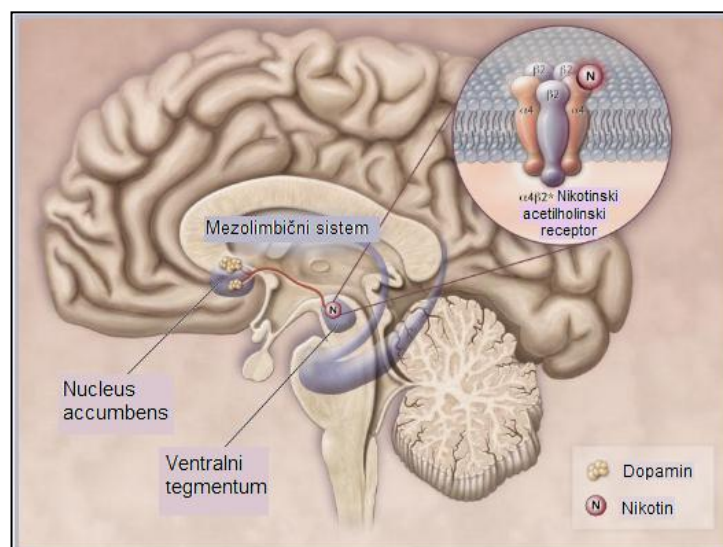
Odvisnost od nikotina je prava duševna bolezen, za katero ni zdravila. Pomembno je, da se vsak odvisnik zaveda, da je s trdno voljo pametnejši in močnejši od odvisnosti. Velja eno samo pisano pravilo: »Danes brez nikotina!«. Le en dim utegne biti usoden. Vedno se je treba zavedati, da gre za trajno bolezen. Znanost razlaga za to še vedno ne pozna. Večina kadilcev je zasvojenih (okoli 90 %), le peščica je takih (okoli 10 %), ki se kajenju zlahka odpovedo. Da so imuni na zasvojenost, je verjetno genetsko pogojeno. Na tem področju izvajajo mnoge študije (29).

Pomembno je, da se tisti, ki jim kajenje uspe opustiti, uprejo tej razvadi danes, jutri in za vedno.

## **1.8 FARMAKODINAMIKA NIKOTINA**

Farmakodinamika proučuje delovanje snovi in njene učinke na organizem. Ko nikotin po krvnem obtoku prispe do možganov, se veže na nikotinske holinergične receptorje (nAChR) v mezolimbicnem predelu. Ima namreč podobno zgradbo kot nevrottransmitter acetilholin (ACh). ACh aktivira centralni (možgani, hrbtenjača) in avtonomni (pljuča, srce) živčni sistem ter več kot 200 nevrokemičnih snovi v možganih, odgovornih za različne biološke funkcije. ACh omogoča prenos signalov od možganov do mišic, kontrolo osnovnih funkcij, na primer kontrolo bitja srca in dihanja. Bdi nad informacijami v možganih in ima pomembno vlogo pri učenju in spominu (32).

nAChR je sestavljen iz petih podenot. Vezava nikotina na površino dveh podenot nAChR povzroči odprtje od liganda odvisnih kanalčkov, kar omogoči prehod ionov (predvsem  $K^+$ ,  $Na^+$  in  $Ca^{2+}$ ), aktivacijo napetostnih kanalčkov in sproščanje nevrottransmitterjev, predvsem dopamina v mezolimbicni regiji, striatumu in sprednjem delu možganske skorje (10). Dopaminergične poti v možganih so odgovorne za to, da pijemo, ko smo žejni, in jemo, ko smo lačni. Zaradi teh poti čutimo ugodje, tesnobo in zadovoljstvo, hkrati pa omogočajo tudi, da si možgani zapomnijo, kako je zadoščeno posameznim željam (29).



**Slika 5:** Vezava nikotina na nAChR v mezolimbičnem predelu možganov  
 Vir: [URL: <http://www.nejm.org/search?q=Benowitz+NL+Nicotine+addiction.+Mechanisms+of+disease.>], 2011 (10)

Ravno učinkovanje nikotina na možgane je vzrok za fizično in fiziološko odvisnost, ki jo povzroča. Insula, ki je v možganski skorji med temporalnim in frontalnim delom, je odgovorna za občutek lakote in bolečine. Menijo, da je ta del možganov tisti, ki lahko ob kajenju pripelje do ugodja in je tako tudi odgovoren za nastanek odvisnosti. Ugotovili so, da so kadilci, ki so utrpeli poškodbe insule, takoj prenehali kaditi in tudi niso vnovič poskusili (33).

Poleg delovanja na možgane, deluje nikotin tudi na nadledvični žlezi. Veže se na nAChR v ganglijih sredice nadledvične žleze in tako pospešuje sproščanje adrenalina. Adrenalin deluje stimulatивно na celoten organizem. Pospeši namreč frekvenco dihanja in bitja srca. Poveča tudi koncentracijo glukoze v krvi in pospeši izločanje insulina. Tako poveča oskrbo z energijo, kar je tudi vzrok pospešenega metabolizma (33).

## 1.9 FARMAKOKINETIKA NIKOTINA

Ko govorimo o načinu delovanja nikotina in njegovih učinkih na naše telo, je seveda potrebno vedeti, kakšen je način vnosa, absorpcije, porazdelitve in metabolizma nikotina v našem telesu ter nenazadnje tudi, kako se nikotin iz telesa izloči.

### 1.9.1 Absorpcija nikotina

Nikotin preko tobačnega dima, ki ga vdihnemo, pride v pljučne mešičke, od tu pa se ga kar 82–92 % hitro absorbira v pljučni venski obtok, od koder vstopi v arterijsko cirkulacijo. V

10–20 sekundah po prvem vdihu cigarete preide krvno-možgansko pregrado, kar je hitreje kot v primeru intravenozne aplikacije (27, 30).

Nikotin lahko v telo vstopi tudi na druge načine, naprimer preko kože in sluznic ali pa z zaužitjem hrane, ki vsebuje manjše količine nikotina (krompir, paradižnik, melancani, ...). Nenazadnje so za njegov vstop v telo lahko krivi tudi pesticidi (31).

Absorpcija nikotina preko biološke membrane je odvisna od pH. Nikotin je šibka baza s pKa 8,0. V kislem mediju je v ioniziranem stanju in kot tak slabo prehaja biološke membrane. V želodcu je pri kislem pH večinoma v protonizirani (ionizirani) obliki, zato se tu slabo absorbira. Je pa zato njegova absorpcija večja v tankem črevesju, kjer je pH bolj alkalen in je nikotin posledično v neionizirani obliki. Nikotin se zelo dobro absorbira tudi skozi kožo, ki ima alkalen pH. To je lahko vzrok zastrupitve z nikotinom iz okolja. Posebej znana je poklicna bolezen zelenega tobaka ljudi na plantažah tobaka in v tobačnih predelovalnicah. Na pH temelji tudi proizvodnja farmacevtskih pripravkov za namen NNT. Različne farmacevtske oblike (obliži, žvečilni gumiji, nosni spreji, inhalatorji, podjezične tablete) so pripravljene tako, da imajo alkalen pH. Količina absorbiranega nikotina pa ni odvisna le od pH, temveč tudi od števila pokajenih cigaret, načina kajenja, vsebnosti nikotina v okoljskem zraku in drugih dejavnikov, o katerih bomo govorili v nadaljevanju (3, 27).

### **1.9.2 Porazdelitev nikotina po tkivih**

Nikotin ima kratek čas porazdelitve po tkivih (8 min). Po prihodu v pljučne mešičke nikotin hitro vstopi v kri, kjer je pri pH 7,4 kar 69 % ioniziranega, 31 % pa neioniziranega. Manj kot 5 % je vezanega na plazemske proteine. Na podlagi obdukcij so ugotovili, da imajo največjo afiniteto za nikotin jetra, ledvica, vranica in pljuča. Dobro se kopiči tudi v maščobah. V jetrih je tudi najvišja koncentracija kotinina, glavnega metabolita nikotina. V skeletnih mišicah sta koncentraciji nikotina in kotinina podobni koncentracijam v krvi. Nikotin se znatno akumulira tudi v želodčnem soku, slini in materinem mleku. Lahko prehaja skozi placento, zato ga lahko najdemo v serumu fetusa in amnijski tekočini celo v nekoliko višji koncentraciji kot v serumu matere. Z veliko afiniteto se veže na nikotinske holinergične receptorje v možganih. Teh imajo kadilci bistveno več od nekadilcev. Sam časovni potek kopičenja v možganih in drugih tkivih ter fiziološki učinki nikotina so odvisni od poti vnosa in odmerka (3, 27).

### 1.9.3 Metabolizem nikotina

Znanstveniki so kar nekaj desetletij proučevali metabolizem nikotina. Presnova nikotina v človeškem telesu poteka po različnih poteh, s številnimi encimi in v različnih organih. Produkti presnove so številni metaboliti. Presnova večinoma poteka v reakciji C-oksidacije v jetrih, deloma pa se nikotin presnavlja tudi v pljučih in ledvicah (34).

Sprva so mislili, da je izoenzim citokrom P450 2D6 primarni encim na presnovni poti nikotina. Pri nadaljnjih raziskavah so ugotovili, da to velja le pri nekaterih posameznikih in da je ključni encim presnove nikotina izoenzim citokrom P450 2A6. Z genotipizacijo so ugotovili, da na osnovi aktivnosti CYP2A6 lahko razlikujemo med kadilci in nekadilci (30).

Nedavne študije so pokazale, da so v metabolizmu nikotina lahko vpletene tudi druge izooblike CYP P450, kot npr. CYP2A13. Medtem, ko se CYP2A6 nahaja predvsem v jetrih, se CYP2A13 izraža predvsem v respiratornem traktu, možganih in drugih nehepatičnih tkivih. Glede na to, da metabolizem večine ksenobiotikov poteka v jetrih, menijo, da ima CYP2A13 neznatno vlogo v metabolizmu nikotina, čeprav ima višjo encimsko aktivnost kot CYP2A6. Je pa CYP2A13 verjetno pomemben pri metabolizmu nikotina v nehepatičnih tkivih in njegovi pretvorbi v kancerogena NNK in N'-nitrozornikotin – NNN, ki imata veliko vlogo pri razvoju pljučnega raka pri kadilcih (34).

#### 1.9.3.1 Presnovne poti nikotina in njegovi presnovki

Pri človeku je znanih šest primarnih presnovkov nikotina, ki nastanejo po različnih presnovnih poteh.

##### 1. Oksidacijska pot

Je glavna presnovna pot nikotina. Poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji se nikotin pod vplivom citokroma CYP2A6 pretvori v **nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -iminijev ion**, ki je v ravnotežju s 5'-hidroksinikotinom. V nadaljevanju se oksidira s citoplazemsko *aldehid oksidazo* – AOX v laktamski derivat **kotinin**, ki je kvantitativno najpomembnejši metabolit nikotina, saj se kar 70–80 % nikotina, ki vstopi v jetra, pretvori v omenjeni presnovek. V urinu tako zaznamo le manjši delež (10–15 %) nepresnovljenega nikotina. Druga oksidacijska pot presnove nikotina je posredovana s *flavin vključujočo monoooksigenazo 3* – FMO3. Produkt te presnovne poti je **nikotin N'-oksid** – NNO. Po tej poti se presnovi le 4–7 % nikotina. Zdi se, da se NNO ne presnavlja naprej, temveč se lahko reducira nazaj v nikotin in tako predstavlja neke vrste recikliranje nikotina v telesu (3, 27).

## **2. Neoksidacijska pot**

Tudi ta poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je metilacija dušika na piridinskem obroču. V tej reakciji nastane *izometonijev ion*, imenovan tudi *N-metil-nikotinijev ion*. Reakcija je katalizirana z *amin N-metiltransferazo*. Druga stopnja je reakcija glukuronidacije, ki je katalizirana z *uridin difosfat-glukuronoziltransferazo (UGT)*. Produkt te reakcije je *(S)-nikotin-N-β-glukuronid*. Okoli 3–5 % nikotina pri človeku se pretvori v glukuronid in se kot tak izloči v urinu (3, 27).

## **3. Oksidativna N-demetilacija**

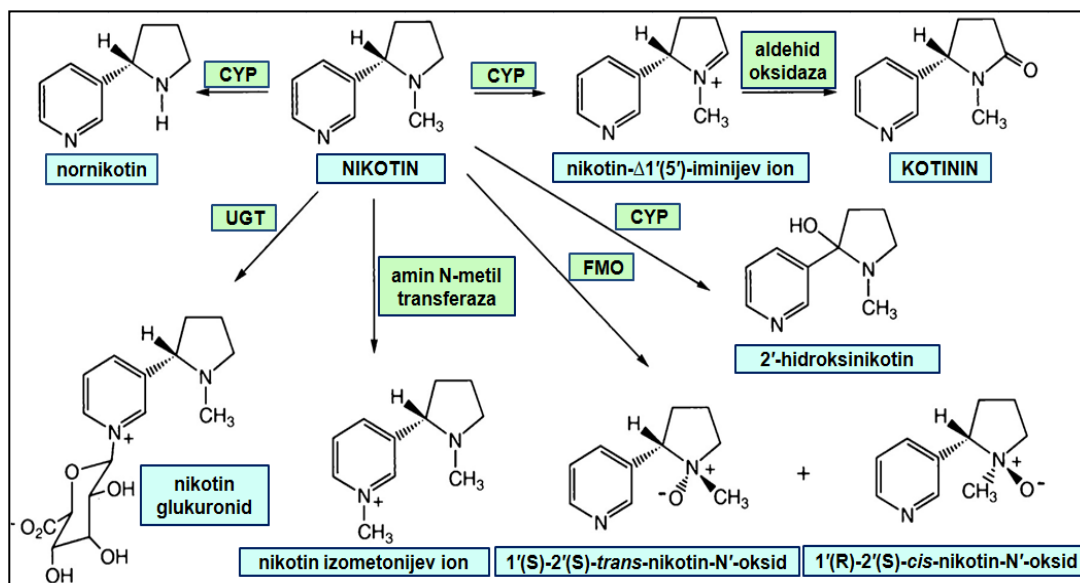
Je zelo pogosta presnovna pot ksenobiotikov, ki pa ima v metabolizmu nikotina pri ljudeh manjšo vlogo. Nikotin se lahko pretvori do *nornikotina*. Več kot 60 % *nornikotina* v urinu predstavlja presnovek nikotina, preostanek pa je direkten vnos *nornikotina* v telo, saj je tudi ta, kot nikotin, alkaloid, ki se nahaja v tobačnih listih (27).

## **4. Proces 2'-hidroksilacije**

To pot presnove nikotina so odkrili nedavno. Tudi ta reakcija je katalizirana s citokromskim encimskim sistemom P450. V procesu 2'-hidroksilacije nikotina nastane *4-(metilamino)-1-(3-piridil)-1-butanon*. Vmesni produkt te reakcije je *2'-hidroksinikotin*. Nastali 4-(metilamino)-1-(3-piridil)-1-butanon se presnovi še naprej v *4-okso-4-(3-piridil)butanojsko kislino* in *4-hidroksi-4-(3-piridil)butanojsko kislino*. Omenjena pot presnove je zanimiva zato, ker se 4-(metilamino)-1-(3-piridil)-1-butanon lahko pretvori v kancerogen 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon – **NNK**, čeprav endogenega nastajanja NNK iz nikotina pri ljudeh še niso zaznali (27).

Kot vidimo, so v metabolizmu nikotina poleg citokromov vključeni še nekateri drugi encimi. Genske variacije v encimih, ki sodelujejo pri presnovi nikotina in kotinina, lahko vodijo do zmanjšane presnove le-teh. Opisani so številni polimorfizmi encimov. Lahko gre za popolno neaktivne alele, popolno odsotnost gena (delecije alelov) ali pa za spremembo v le enem nukleotidu. V teh primerih je presnova močno zmanjšana ali celo onemogočena. Številni polimorfizmi lahko pripeljejo do zvečane ali pa zmanjšane aktivnosti encimov.

Encime, vključene v presnovne procese nikotina in njegovih presnovkov, bo treba v bodoče še boljše opredeliti, saj so nekatere presnovne pretvorbe na tej poti še vedno neznane. Prav tako je premalo raziskan zunaj jetrni metabolizem nikotina (3).



**Slika 6: Glavne poti metabolizma nikotina**

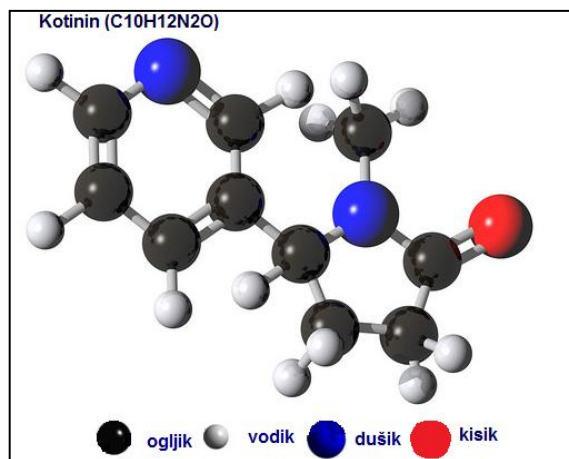
Vir: URL: [ <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/57/1/79.long> ], 2011 (3)

### 1.9.4 Kotinin

Kotinin je glavni metabolit nikotina. Sama beseda kotinin je anagram besede nikotin. Podobno kot nikotin se veže na nAChR in aktivira ter desenzibilizira nikotinske holinerģične receptorje v možganih, vendar z veliko manjšo afiniteto kot nikotin. Razpolovni čas kotinina v telesu je občutno daljši od nikotina, saj v povprečju znaša kar 20 ur. V telesu ga je mogoče zaznati do enega tedna po uporabi tobaka (14).

Kotinin nima farmakoloških učinkov. Ker je stopnja kotinina v krvi sorazmerna izpostavljenosti tobačnemu dimu, je merjenje tega presnovka nikotina odličen pokazatelj tovrstne izpostavljenosti. Znano je tudi, da mentol v cigaretah tekmuje z encimsko presnovo kotinina, tako da mentolovi cigareti ohranijo kotinin v telesu dlje (14).





**Slika 7:** Kotinin - 3D struktura  
Vir: [URL: <http://images.google.com/>], 2011

#### 1.9.4.1 Metabolizem kotinina

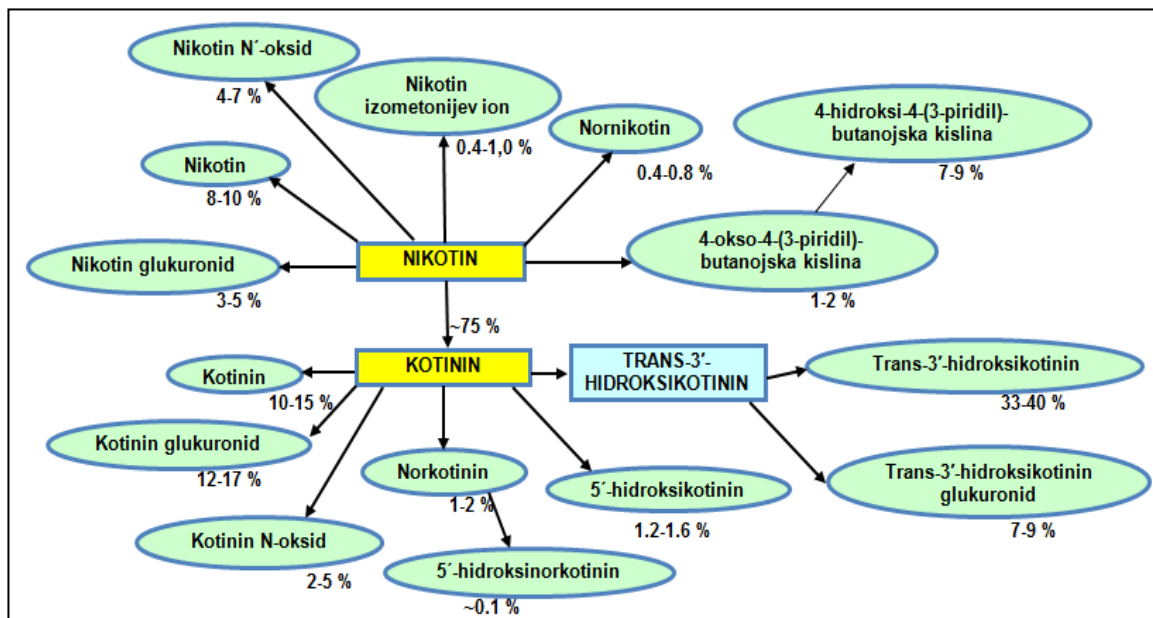
Strukturno so opisali številne presnovke kotinina. Pri človeku poročajo o šestih primarnih presnovkih kotinina. To so *3'-hidroksikotinin*, *5'-hidroksikotinin*, imenovan tudi alohidroksikotinin, *kotinin N'-oksid*, *kotinin metonijev ion*, *kotinin glukuronid* in *norkotinin* ali tako imenovani demetilcotinin. Tudi metabolizem kotinina v glavnem poteka s citokromi P450. S CYP2A6 se kotinin oksidira v 3'-hidroksikotinin, ki je najpomembnejši metabolit nikotina v urinu kadilcev. Kot se nikotin N'-oksid lahko reducira nazaj v nikotin, se tudi kotinin N'-oksid lahko s citokromi P450 reducira v kotinin (3, 27).

Obstajajo dokazi o različni presnovi kotinina glede na starost in raso pripadnost. Tudi povprečni ledvični in neledvični očistek kotinina je nižji pri temnopoltih Američanih kot pri belcih (31). Sicer pa je metabolizem kotinina še premalo pojasnjen in raziskave v tej smeri še potekajo (3,27).

#### 1.9.5 Kvantitativni vidik metabolizma nikotina (kotinina)

Kvantitativno je presnova nikotina dobro razjasnjena. Okoli 90 % celotnega odmerka nikotina lahko izmerimo kot nikotin in njegove presnovke v urinu. Okoli 70–80 % nikotina se pretvori v kotinin, 4–7 % se ga izloči kot nikotin N'-oksid, 3–5 % pa kot nikotin glukuronid. Le majhen delež nespremenjenega kotinina (10–15 % nikotina in ostalih presnovkov v urinu) se izloči z urinom. 3'-hidroksikotinin in glukuronid konjugat predstavljata 40–60 % nikotina v urinu. V urinu pa lahko zaznamo le 3'-hidroksikotinin

konjugat kot O-glukuronid. Celotni očistek nikotina je okoli  $1200 \text{ ml min}^{-1}$ . Neledvični očistek predstavlja 70 % pretoka v jetrih. Ob predpostavki, da se večina nikotina presnovi v jetrih, se kar 70 % nikotina izloči iz krvi ob vsakem prehodu skozi jetra. Metabolizem kotinina je precej počasnejši kot metabolizem nikotina. Očistek kotinina je  $45 \text{ ml min}^{-1}$  (27).



**Slika 8:** Kvantitativni vidik metabolizma nikotina  
Vir: URL: [ <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/57/1/79.long> ], 2011 (3)

### 1.9.6 Izločanje nikotina (kotinina)

Nikotin se iz telesa hitro izloči, saj je njegov  $t_{1/2}$  le 2 uri. Nikotin kot tudi kotinin se lahko izločata z urinom, blatom in potom.

Glavno pot izločanja nikotina predstavljajo ledvica. Preko ledvic se izloča z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo. Ima spremenljivo reabsorbcijo, ki je odvisna od pH urina. Ledvični očistek nikotina je pri nekontroliranem, kislem pH okoli 35–90 ml/min, lahko pa doseže tudi vrednost 600 ml/min v primeru zelo velikega pretoka urina skozi ledvice. Pri alkalnem pH, kjer prevladuje neionizirana oblika, je ledvični očistek 17 ml/min (27).

Z ledvičnim očistkom izgubimo okoli 2–35 % nepresnovljenega nikotina, 10–15 % se ga izloči v obliki kotinina. Slednji se v nadaljevanju presnovi v trans-3'-hidroksi kotinin, ki predstavlja glavno pot izločanja nikotina z urinom (30). Ledvični očistek kotinina je za razliko od nikotina veliko manj odvisen od pH in predstavlja manj pomembno pot izločanja kotinina iz telesa (3, 27).

### **1.9.6.1 Dejavniki, ki vplivajo na presnovo ter izločanje nikotina in kotinina**

Na metabolizem nikotina ter kotinina in njuno izločanje iz telesa vplivajo številni individualni dejavniki. Poleg **genetske variabilnosti** (npr. variante CYP2A6) so tu še **fiziološki vplivi** (prehrana, starost, biološki ritmi, spol, nosečnost, menstrualni cikel, bolezni ledvic), **vpliv zdravil** (induktorji in inhibitorji), **kajenje** ter **rasne in narodnostne razlike**. Ker se nikotin večinoma metabolizira v jetrih, je njegovo izločanje močno odvisno od jetrnega obtoka. Pretok je odvisen od vrste zaužite hrane in zdravil, ki motijo krvni obtok in vplivajo na metabolizem nikotina (3, 27).

V nadaljevanju na kratko opisujem vpliv nekaterih dejavnikov.

#### ***1.9.6.1.1 Prehrana***

Metabolizem nikotina in kotinina ter njuno izločanje sta odvisna od vrste obroka. Po obroku se jetrni pretok poveča za kar 30 %, očistek nikotina pa za 40 %. Mentol, ki je pogosta sestavina v hrani, zobnih pastah in cigaretah, zmerno inhibira s CYP2A6 posredovan metabolizem nikotina v jetrnih mikrosomih. V študijah so dokazali, da mentolove cigarete signifikantno inhibirajo presnovo nikotina v kotinin in glukuronidacijo nikotina. Tudi sok grenivke inhibira CYP2A6, ki katalizira poglavitno pot metabolizma nikotina. To so ugotovili pri nekadilcih, ki so jim peroralno aplicirali nikotin. Ta sok poveča tudi ledvični očistek nikotina in kotinina po neznanem mehanizmu. Uživanje vodne kreše pa poveča nastanek nikotin-, kotinin- ter 3'-hidroksikotinin glukuronidov pri kadilcih, nima pa vpliva na izločanje nikotina, kotinina in 3'-hidroksikotinina. Vpliva torej na nekatere UGT-encime, ne pa na s CYP2A6 posredovani metabolizem nikotina (3, 27).

#### ***1.9.6.1.2 Starost***

Starejši (> 65 let) imajo manjšo telesno maso, zato je pri njih volumen porazdelitve nikotina v telesu manjši. Celotni očistek nikotina je v primerjavi z mlajšimi odraslimi nižji kar za 23 %, ledvični očistek pa za 49 %. Vzrok je verjetno v zmanjšanem jetrnem pretoku. Novorojenčki, izpostavljeni tobačnemu dimu, imajo razpolovno dobo nikotina kar 4-krat večjo v primerjavi z odraslimi, razpolovni čas kotinina pa je približno enak v vseh obdobjih. Tako lahko sklepamo, da sta očistka nikotina in kotinina različno občutljiva na razlike v jetrnem pretoku. Očistek nikotina je torej bolj odvisen od jetrnega pretoka, očistek kotinina pa bolj od količine in aktivnosti metabolnih encimov (3,27).

#### ***1.9.6.1.3 Cirkadiani ritmi***

Med spanjem se zmanjša jetrni pretok. Posledično se zmanjša očistek nikotina. Očistek nikotina v dnevu variira za 17 %, najmanjši pa je med 18:00 in 3:00 uro zjutraj. Menstrualni cikel nima učinka na farmakokinetiko nikotina in kotinina pri zdravih nekadilkah. Spremembe metabolizma nikotina v različnih letnih časih v študijah niso proučevali (27).

#### ***1.9.6.1.4 Spol***

Študije so pokazale, da imajo ženske večji očistek nikotina in kotinina kot moški, razlika pa je še večja, če ženska jemlje kontracepcijska sredstva. Prav tako imajo ženske večje razmerje 3'-hidroksikotinin/kotinin v krvi in urinu, kar kaže na to, da je metabolizem nikotina pri ženskah hitrejši. V nosečnosti je očistek nikotina večji za 60 %, kotinina pa kar za 120 % v primerjavi z očistkom po porodu. Spremembe v očistku nikotina in kotinina so verjetno posledica spolnih hormonov, predvsem progesterona in estrogenov, ki naj bi inducirali CYP2A6. Vendar pa študije o tem še potekajo (3).

#### ***1.9.6.1.5 Patološka stanja***

Različne bolezni imajo vpliv na s CYP2A6 posredovani metabolizem nikotina. Tako hepatitis A inhibira delovanje kumarinov, okužbe z jetrnimi zajedalci (paraziti) pa jih inducirajo. Kumarini imajo pomembno vlogo pri aktivaciji encima CYP2A6. Tudi alkoholna bolezen jeter inhibira kumarine.

Bolezni ledvic so lahko vzrok za zmanjšan ledvični očistek nikotina in kotinina ter tudi za kar 50 % zmanjšan metabolični očistek nikotina. Zaradi okvare ledvic se lahko kopičijo uremični toksini, ki inhibirajo aktivnost encima CYP2A6 ali zmanjšajo njegovo izražanje v jetrih (3).

#### ***1.9.6.1.6 Zdravila***

Nekatera zdravila inducirajo delovanje encima CYP2A6, spet druga njegovo aktivnost inhibirajo. S tem vplivajo na metabolizem nikotina (27).

#### ***1.9.6.1.7 Kajenje***

Tudi samo kajenje vpliva na metabolizem nikotina. Snov v tobačnem dimu, ki inhibira metabolizem nikotina, je zaenkrat še neznan, bi pa to lahko bil  $\beta$ -nikotirin, tobačni alkaloid, za katerega so in vitro študije pokazale, da inhibira CYP2A6. Menijo, da ima

kajenje tudi inducirajoče učinke na glukuronidacijo. Povečalo naj bi izločanje 3'-hidroksi kotinin O-glukuronida, kako, pa še ni povsem pojasnjeno. Očistek nikotina je pri kadilcih počasnejši kot pri nekadilcih (3).

#### ***1.9.6.1.8 Rasne in etnične razlike***

Očistek kotinina je nižji pri temnopoltih kot pri belcih. Enako je kazalo za očistek nikotina, le da v tem primeru razlike niso bile statistično značilne. Tudi izločanje glukuronidov je manjše pri temnopoltih kot belcih, medtem ko je izločanje 3'-hidroksikotinina podobno. Zaradi počasnejšega metabolizma imajo temnopolti višje koncentracije kotinina v krvi kot belci (27).

## **1.10 BIOLOŠKI OZNAČEVALCI IZPOSTAVLJENOSTI TOBAČNEMU DIMU**

Raziskovalci se v različnih študijah poslužujejo različnih bioloških označevalcev (BO), ki so ključni za razumevanje bioloških procesov in mehanizmov, ki vodijo do neželenih učinkov na naše zdravje, hkrati pa nudijo pomoč pri epidemioloških študijah. Te študije temeljijo predvsem na samoporočanju. Obstaja kar nekaj različnih bolj ali manj specifičnih biooznačevalcev, ki so lahko pokazatelji izpostavljenosti TD (31).

Pomembno je, da je BO edinstven, specifičen, občutljiv in lahko določljiv. Samoporočanje mnogokrat ni verodostojno, saj mnogi prikrivajo svoje kadilske navade iz različnih vzrokov (npr. mladostniki zaradi prisotnosti staršev, učiteljev...). Priporočilo za objektivnejšo oceno izpostavljenosti TD, tako zaradi aktivnega kot zaradi pasivnega kajenja, je vsekakor določanje različnih BO. To so različne snovi, ki so v tobaku ali nastajajo med zgorevanjem tobaka. Tako merimo npr. koncentracijo CO, ki nastane pri zgorevanju tobaka, KCN, ki se pretvarja v tiocianat, ali pa tobačne alkaloide, kot so anabazin, anatabin in seveda nikotin oziroma njegovi metaboliti, še posebej kotinin. Mnogi od njih so nespecifični in lahko še zlasti pri nizkih koncentracijah dajo napačne rezultate (35).

Novejši BO je solanesol, ki se nahaja v vrsti razhudnikovk, kamor sodi tudi tobak. Ta snov se nahaja v delcih tobačnega dima. Alkaloida v tobaku, anabazin in anatabin, sta specifična označevalca rabe tobaka pri ljudeh, ki so na NNT. Za te ljudi je značilno, da v telesu nimajo anabazina, ki je tobačni alkaloid in se torej ne nahaja v farmacevtskih oblikah za NNT (31). Eden izmed BO izpostavljenosti TD je tudi merjenje aduktov toksičnih substanc

tobaka in TD s proteini in DNK. Poškodbe DNK lahko privedejo do apoptoze celic ali do karcinoma (31, 35). Pomembni BO kancerogenosti so metaboliti N-nitrozaminov, ki so dokazani kancerogeni in izhajajo iz tobačnih alkaloidov. Najbolj kancerogen je NNK, snov, ki povzroča adenokarcinom pljuč in tako igra pomembno vlogo pri razvoju pljučnega raka pri kadilcih (31).

Pomembno je vedeti, da je koncentracija BO odvisna od samega odmerka, absorpcije, porazdelitve, kopičenja, presnove in izločanja nikotina (35).

### **1.10.1 NIKOTIN kot biološki označevalec izpostavljenosti tobačnemu dimu**

Ker nikotin v telesu hitro razpada, saj ima razpolovno dobo le nekaj ur, se ga v krvi in urinu redkeje določa. Nikotin že v dveh urah pade na polovico količine, ki se absorbira med kajenjem, zato je čas odvzema in hitrosti merjenja koncentracije zelo pomemben. Merjenje koncentracije nikotina v plazmi je le ena izmed možnosti ugotavljanja izpostavljenosti TD. Pogosteje se ga določa v lasih, saj je to neinvazivna metoda, s katero lahko ugotavljamo izpostavljenost TDO za daljše časovno obdobje (31).

Lasje so v različnih epidemioloških študijah pogosto uporabljeni biološki material za merjenje koncentracije nikotina, ki je v lasih kar 10-krat višja kot pa koncentracija kotinina (36). Na koncentracijo nikotina v lasih vplivajo individualne variacije, razlike v barvi las in hitrosti rasti las. Verjetno se nikotin veže na melanin. Temnolasi imajo torej v lasih višje koncentracije nikotina (27).

Nikotin se nahaja tudi v nekaterih drugih rastlinah (paradižnik, krompir, cvetača, črni čaj). To pomeni, da bi tudi to lahko motilo določanje nikotina oz. njegovih presnovkov. Tako bi lahko nekoga pomotoma opredelili za kadilca ali pasivnega kadilca. Vendar pa bi za to morali pojesti več kilogramov take zelenjave na dan ali popiti več litrov čaja (35, 37).

Tudi nekateri pesticidi vsebujejo nikotin, kar je lahko še en vir lažnih rezultatov, ki bi lahko nakazovali kajenje (38).

### **1.10.2 KOTININ kot biološki označevalec izpostavljenosti tobačnemu dimu**

Ker imamo zelo specifične in občutljive metode za določanje kotinina, je le-ta najpomembnejši in najboljši BO za ugotavljanje izpostavljenosti TD. V nasprotju z nikotinom ima kotinin daljši razpolovni čas ( $t_{1/2} = 16-22$  ur). Tako lahko z merjenjem

koncentracije kotinina v plazmi ali urinu ugotavljamo izpostavljenost za 2–3 dni nazaj. Ugotovili so, da so koncentracije kotinina pri kadilcih precej višje kot pri nekadilcih (31). Okoli 70–80 % absorbiranega nikotina se pretvori v kotinin, okoli 10–15 % cirkulirajočega kotinina pa se izloči z urinom. Koncentracije kotinina v krvi so približno 10-krat večje od koncentracij nikotina (35). V krvi kadilcev je namreč kotinina približno 250–300 µg/l, za razliko od nikotina, ki ne presega 20 µg/l. Strastni kadilci dosegajo koncentracije kotinina v krvi tudi do 900 µg/l. Ker ima kotinin daljšo razpolovno dobo kot nikotin, so nihanja v koncentraciji kotinina veliko manjša kot nikotina (3).

### **1.10.3 Izbor bioloških vzorcev za določanje koncentracije kotinina**

Izbor bioloških vzorcev za določanje koncentracije kotinina je širok. Izbira vzorca za merjenje koncentracije kotinina je seveda odvisna od raziskovalno epidemioloških vprašanj. Pomembno je, da ta vprašanja obravnavamo že pri načrtovanju raziskav, ko nas zanimajo npr. razširjenost kajenja, opuščanje kajenja ali pa posledice pasivnega kajenja (37).

Študije so pokazale močno povezavo med koncentracijami kotinina v serumu, plazmi, urinu in slini, zato je merjenje kotinina v kateremkoli izmed naštetih matriksov dober pokazatelj škodljive rabe tobaka in izpostavljenosti tobačnim izdelkom (27).

Kljub nekoliko slabši povezavi kotinina v urinu s serumskim nikotinom kotinin najpogosteje določamo kar v urinu, saj so koncentracije dovolj visoke, postopek odvzema vzorca pa neinvaziven (39). Prednost dajemo merjenju kotinina v vzorcih 24-urnega urina, ki bolje kaže na kronično izpostavitvev nikotinu kot pa kotinin v plazmi ali serumu. V vzorcu 24-urnega urina se izloči približno 5 % nespremenjenega nikotina, 10 % se ga izloči v obliki kotinina, 35 % pa v obliki hidrosikotinina. Manj kot 5 % je drugih metabolitov nikotina (38).

Koncentracijo kotinina v urinu zaradi različne dnevne sestave in koncentriranosti urina najpogosteje preračunamo na koncentracijo kreatinina. Vendar pa so nedavne študije pokazale, da je ta korak skoraj nepotreben, saj razmerje med kotininom in kreatininom v urinu celo slabše kolerira s koncentracijo nikotina v serumu kot nekorrigirana koncentracija kotinina v urinu. Raziskovalce je zanimalo, ali je glede na različno ravnanje ledvic s kotininom in kreatininom upravičeno izračunavati koncentracijo kotinina glede na kreatinin. Kreatinin se namreč v veliki meri izloči skozi ledvica z glomerulno filtracijo, deloma pa je očistek kreatinina uravnan s tubulno sekrecijo. Ledvični očistek kotinina (12

ml/min) je manjši kot očistek kreatinina (80–120 ml/min). Kotinin se veže na plazemske beljakovine in tako ne more vstopiti skozi ledvične tubule, zato se večinoma reabsorbira (40). Menijo pa, da je lahko korekcija kotinina na kreatinin uporabna pri spremljanju koncentracije kotinina pri posamezniku in za ločevanje med nekadilci in pasivnimi kadilci (25, 40).

Koncentracije kotinina v serumu pod 2 µg/l oziroma v urinu pod 3 µg/l imajo nekadilci, neizpostavljeni TD. Koncentracije kotinina v urinu pod 30 µg/l kažejo na pasivne kadilce. Koncentracije kotinina v urinu nad 50 µg/l predstavljajo mejo med abstinenco in uporabo tobačnih izdelkov (30).

Kadar nas zanima daljše časovno obdobje uživanja nikotina oziroma izpostavljenosti TD, so kot biološki vzorec za določanje nikotina in kotinina priporočljivi lasje in nohti. Tako lahko sledimo večdnevno ali celo večmesečno izpostavljenost TDO. Pojavijo pa se določeni problemi, ki do danes še niso popolnoma pojasnjeni. Še vedno namreč ni popolnoma jasno, kako barva las, higiena, barvanje in rast las vplivajo na koncentracijo nikotina in kotinina v laseh (36).

#### **1.10.4 Izbor bioloških vzorcev za ugotavljanje izpostavljenosti otrok tobačnemu dimu**

Otroška populacija je žal zelo izpostavljena škodljivim snovem, ki se sproščajo pri rabi tobaka. Ob tem imajo vlogo pasivnih kadilcev. Tvrstna izpostavljenost je poglavitni vzrok različnih bolezni otrok (28). Biomonitoring merjenja nikotina in njegovih metabolitov ima velik pomen pri ugotavljanju izpostavljenosti TD v dobi razvoja v materinem telesu in nato pozneje med odraščanjem (22).

Kakšno vrsto biološkega vzorca za ugotavljanje izpostavljenosti TD otrok bomo izbrali, je odvisno od tega, ali nas zanima akutno stanje ali kronična izpostavitve TD. Za ugotavljanje prenatalne izpostavljenosti cigaretnemu dimu odvzamemo amnijsko tekočino, mekonij in lase fetusa, v primeru ugotavljanja akutne izpostavljenosti otrok kemičnim snovem tobaka pa odvzamemo kri, neonatalni urin in materino mleko. Za ugotavljanje daljše izpostavljenosti lahko odvzamemo kri, še pogosteje pa lase, nohte ali zobe. Lasje so »zlati standard«, kadar nas zanima dolgotrajna izpostavljenost (22).

Veliko študij je pokazalo značilno povezavo med povišano koncentracijo kotinina pri otrocih in količino pokajenih cigaret staršev (31). Merjenje nikotina v laseh je celo boljši



pokazatelj izpostavljenosti TD otrok kot kotinin v urinu in bolje korelira s številom cigaret, ki jih starši doma pokadijo (35).

Obstajajo pa tudi študije, ki so pokazale, da je koncentracija kotinina v krvi in slini nosečih kadilk nižja kot pri nosečih nekadilkah. Nekateri menijo, da kotinin ni najboljši označevalec za oceno stopnje kajenja med nosečnostjo (21).

### **1.10.5 Namen določanja kotinina**

Nespornost uporabe kotinina v serumu, plazmi ali urinu kot biooznačevalca kroničnega vnosa nikotina v telo je dokazana s številnimi študijami. Čeprav kotinin ni najboljši pokazatelj števila pokajenih cigaret, pa se vseeno zelo pogosto uporablja v namen ugotavljanja izpostavitve nikotinu iz tobaka. Koncentracijo kotinina pogosto merimo pri pregledih posameznikov pred zaposlitvijo. Pogosto ga določamo v različnih študijah kot biomonitoring nikotina v telesu ljudi oziroma pri ugotavljanju izpostavljenosti TDO ter z namenom razlikovanja med kadilci in nekadilci (40).

Kotinin pa ni najboljši označevalec za ugotavljanje izpostavljenosti tobaku v primeru odvajanja od kajenja. Pri opuščanju kajenja se namreč mnogi poslužujejo NNT. Pripravki NNT vsebujejo nikotin, ki se v telesu presnovi v kotinin. Posledično lahko dobimo lažno pozitivne rezultate (35). Kljub temu ga velikokrat določajo z namenom spremljanja opuščanja kajenja, lahko pa tudi za spremljanje odmerka NNT (40).

Raziskave so pokazale signifikantne povezave med kotininom in simptomi uživanja tobaka, kot so kašljanje, piskanje v pljučih, bronhitis in kardiovaskularne bolezni (35).

Z merjenjem koncentracije kotinina v serumu, slini in urinu lahko z veliko verjetnostjo razlikujemo med kadilci (KA), pasivnimi kadilci (PK) in nekadilci (NK), ni pa še testa, ki bi jih nedvoumno ločeval. Da bi jih lažje razlikovali, je smiselno narediti korekcijo kotinina na kreatinin (37).

## **1.11 METODE DOLOČANJA BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV IZPOSTAVLJENOSTI TOBAČNEMU DIMU**

Danes obstajajo različne metode za določanje različnih snovi v tobaku in TD, vse od hitrih testov brez uporabe analizatorjev do bolj specifičnih in občutljivejših metod.

Obstaja veliko različnih analitskih metod, »zlati standard« pa so kromatografske tehnike, ki niso vedno dostopne. Kromatografske tehnike so drage in zamudne, poleg tega pa

zahtevajo visoko usposobljen kader. Najpogosteje se uporabljata tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography – HPLC) in plinska kromatografija z masno spektrometrijo (angl.: Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC/MS), ki sodi med najbolj natančne. Uporabljata se tudi tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (angl.: Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – LC/MS) in plinska tekočinska kromatografija (angl.: Gas Liquid Chromatography – GLC).

Imunološke metode so za razliko od kromatografskih enostavnejše, dostopnejše, lažje izvedljive, cenejše in, kar je najpomembnejše, tudi dovolj specifične in občutljive. Imajo pa seveda tudi pomanjkljivosti. Pri določanju nikotina in njegovih presnovkov pogosto pride do navzkrižne reaktivnosti protiteles, kar lahko pripelje do napačne interpretacije rezultatov (35).

### **1.11.1 Metode določanja kotinina**

#### **1.11.1.1 Hitri testi**

Poznamo hitre teste z uporabo testnih ploščic oziroma trakov, kjer predpriprava vzorca ni potrebna. Potrebujemo le kapljico vzorca. Gre za imunske teste z uporabo »suhe kemije«. Testni trak je prevlečen z Ag kotinina. V primeru prisotnosti kotinina v vzorcu pride do nastanka imunskega kompleksa in pojava obarvane črtice na testnem traku (38).

Tako kvalitativno zaznamo kotinin v vzorcu. Občutljivost teh testov je približno 200 µg/l. Tovrstnih testov se poslužujemo z namenom ugotavljanja vnosa nikotina predvsem v forenzične namene in ne z namenom odkrivanja bolezni. Uporabljamo jih tudi za oceno uspešnosti odvajanja od nikotina, pogosto pa kadilske navade zaposlenih zanimajo tudi delodajalce (41).

Seveda pa ti testi niso visoko specifični in občutljivi, zato se v toksikologiji raje poslužujemo metod, ki nam omogočajo kvantitativno določanje nikotina in njegovih metabolitov v različnih bioloških vzorcih.

#### **1.11.1.2 Kromatografske metode**

Kromatografske metode so kljub določenim slabostim (so drage, zamudne, potreben je visoko izobražen kader z veliko izkušnjami) metode izbora. Mednje uvrščamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – **HPLC**, tankoplastno kromatografijo visoke ločljivosti

(angl. High Performance Thin-layer Chromatography) – **HPTLC** in plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo – **GC/MS**.

### **1.11.1.3 Encimskoimunski testi**

Danes pogosteje uporabljamo imunokemijske tehnike kamor uvrščamo encimskoimunski test – **EIA** (angl.: Enzyme ImmunoAssay), polarizacijsko imunofluorescenčno metodo – **FPIA** (angl.: Fluorescence Polarization ImmunoAssay), radioimunski test – **RIA** (angl.: Radio ImmunoAssay) in najpogosteje uporabljen encimskoimunski test **ELISA** (angl.: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (35, 42).

ELISA je praktična alternativa kromatografskim tehnikam. Z njo lahko v kratkem času analiziramo veliko število vzorcev. Za analizo potrebujemo le majhno količino vzorca (25).

## 2 NAMEN NALOGE

Poglavitni namen naše naloge je ugotoviti, kakšne so koncentracije kotinina v urinu nekadilcev, pasivnih kadilcev in kadilcev glede na njihove kadilske navade. Kajenje je namreč še vedno eden izmed največjih problemov današnje družbe. Kotinin je eden najpogostejših in najboljših bioloških označevalcev škodljive rabe tobaka in izpostavljenosti tobačnemu dimu iz okolja (TDO). Tobačnemu dimu so lahko zaradi kajenja izpostavljeni tudi tisti, ki ne kadijo. V nalogi nas zanima tudi kinetika izločanja nikotina, ki jo bomo spremljali z merjenjem koncentracije kotinina v vzorcih urina in seruma preiskovancev. Za določanje koncentracije kotinina v serumu in urinu bomo uporabili imunokemijsko tehniko ELISA, za določanje kreatinina v urinu pa rutinsko fotometrično Jaffejevo metodo. Rezultate kotinina bomo namreč zaradi različne koncentriranosti urina preiskovancev preračunali na koncentracijo kreatinina v urinu. Rezultate koncentracij kotinina v vzorcih nekadilcev (NK), pasivnih kadilcev (PK), kadilcev (KA) in kadilke abstinente (KAB) bomo statistično ovrednotili. Na podlagi statistične analize rezultatov bomo skušali ugotoviti, ali med njimi obstajajo statistično značilne povezave.

1. **V prvi del** naloge bomo vključili nekadilce. Naš namen je ugotoviti, kakšne so vrednosti kotinina v urinu NK, neizpostavljenih TDO. Z meritvami bi namreč radi pokazali, da se rezultati ujemajo s podatki iz literature, kjer navajajo, da so koncentracije kotinina v urinu nekadilcev manjše od 3–5 µg/l.
2. **Drugi namen** naloge je ugotoviti, kakšne so vrednosti kotinina, s katerimi lahko opredelimo NK kot PK. Navedbe v literaturi so, da so koncentracije v urinu PK pod 30 µg/l. Vrednosti kotinina v urinu PK bomo primerjali z vrednostmi kotinina v urinu NK in KA. V ta del naloge bomo vključili dve PK, ki sta TD v domačem okolju izpostavljeni že od rojstva (starši kadilci). V tem delu naloge želimo ugotoviti, ali kajenje matere lahko povzroči zvečane koncentracije kotinina pri otrocih, izpostavljenih TD preko matere, kakor navajajo v literaturi. Poleg omenjenih PK bomo v ta del naloge vključili še nekadilko in nekadilca, ki sicer v vsakdanjem življenju nista izpostavljena TD niti v domačem niti v delovnem okolju. Oba bosta tri ure izpostavljena tobačnemu dimu v zaprtem prostoru v družbi strastnih kadilcev. Po izpostavitvi bomo spremljali njuno izločanje kotinina z urinom in tako skušali potrditi navedbe, da že kratkotrajna izpostavljenost TD povzroči porast kotinina v urinu.

3. **Tretji namen** našega dela je ugotoviti, kakšne so vrednosti kotinina v urinu KA. V ta namen bodo preiskovanci oddali tri enkratne vzorce urina v istem dnevu (jutranji, opoldanski in večerni) in 24-urni urin. Koncentracije kotinina v urinu KA bomo primerjali s koncentracijami kotinina v urinu NK in PK. Hkrati nameravamo ugotoviti, kako na količino z urinom izločenega kotinina vplivata število dnevno pokajenih cigaret in dnevni vnos nikotina. Vemo namreč, da je koncentracija nikotina (kotinina) v telesu odvisna od številnih dejavnikov, kar je opisano že v uvodnem delu te naloge.
4. **Četrty namen** je ugotoviti povezavo med koncentracijami kotinina v serumu in urinu pri poskusu, kjer bo preiskovanka, kadilka, prižgala zadnjo cigareto v nedeljo, potem pa za pet dni opustila kajenje. Vseh pet dni bo KAB zjutraj, ob enakem času, oddala vzorec krvi in urina. Poleg samih vrednosti kotinina v serumu in urinu nas zanima tudi, kakšna je krivulja izločanja kotinina in kakšen je razpolovni čas kotinina preiskovanke v primerjavi z idealnim in teoretičnim razpolovnim časom, kot ga navajajo v literaturi. V strokovnih člankih smo zasledili, da je razpolovni čas kotinina med 16 in 24 ur, kar v povprečju znaša 20 ur.

## **3 EKSPERIMENTALNI DEL**

### **3.1 MATERIAL ZA ANALIZO**

V raziskavo smo vključili 24 preiskovancev obeh spolov in različnih starosti. Preiskovance smo razdelili v skupino nekadilcev (NK), pasivnih kadilcev (PK) in kadilcev (KA). Eno izmed kadilk smo obravnavali še posebej, kot kadilko abstinentsko (KAB), potem ko je za teden dni opustila kajenje. Ker smo se odločili, da bomo pri njej hkrati s spremljanjem kinetike izločanja kotinina v urinu spremljali še kinetiko izločanja kotinina v serumu, potem ko je prižgala zadnjo cigareto v nedeljo, nato pa ves teden nobene več, smo ji vsako jutro med 7:00 in 7:30 odvzeli vzorec krvi, ob enakem času pa je oddala še urin.

Vzorci seruma smo preiskovanki (KAB) odvzeli po priporočenih postopkih za venski odvzem (43) v vacutainersko epruveto Vacutube<sup>®</sup> z rdečim zamaškom (laboratorijska diagnostika Burnik). Kri smo centrifugirali 15 min pri 2000 x g v hladilni centrifugi (15 °C) proizvajalca Beckman Coulter. Serum smo ločili od koaguluma in ga do analize zamrznili pri -20 °C. V serumskih vzorcih smo izmerili koncentracijo kotinina.

Enkratni vzorci urina preiskovancev so bili odvzeti v sterilne urinske lončke, 24-urni urin pa v zbiralno posodo. V vzorcih urina smo takoj ob sprejemu vzorca izmerili koncentracijo kreatinina, nato pa smo jih zamrznili pri -20 °C do analize kotinina.

Pri tem je treba dodati, da so vsi preiskovanci izpolnili vnaprej pripravljene anketne liste, kamor so vpisali rojstne podatke, vrsto cigaret, ki jih kadijo, število dnevno pokajenih cigaret in vsebnost nikotina v cigareti.

### **3.2 METODE DOLOČANJA**

Koncentracijo kreatinina v vzorcih urina smo merili fotometrično, z Jaffejevo reakcijo, koncentracijo kotinina v urinu in serumu pa z encimsko imunokemijsko tehniko ELISA.

#### **3.2.1 Metoda določanja koncentracije kreatinina v urinu**

Kreatinin nastane v spontani reakciji v mišicah kot končni metabolit kreatina ali fosfokreatina. Dnevno se okoli 2 % kreatina pretvori v kreatinin, ki je odpadni produkt metabolizma mišic in se preko ledvic izloča iz organizma. Koncentracija kreatinina v urinu je merilo koncentriranosti urina, zato ostale analite urina preračunavamo nanj.

Kreatinin smo določali s kinetično Jaffejevo reakcijo (brez deproteinizacije) na analizatorju *Roche/Hitachi 917*.

### 3.2.1.1 Reagenti, kalibratorji, kontrole

**Reagent** (kat.št. 11.875.418.216) (Roche):

- R1 (NaOH: 0,20 mol/l)
- R2 (Pikrinska kislina: 25 mmol/l)

❖ **Kalibrator:**

- C.f.a.s. (kat.št. 10.759.350.190) (Roche)

❖ **Kontroli:**

- PreciNorm U (QCS) (kat.št. 10.651.257.922) (Roche)
- PreciPath U (QCS) (kat.št. 10.651.256.922) (Roche)

❖ **Fiziološka raztopina** (UKC Ljubljana – Lekarna)

0,9 % NaCl (1000 ml vsebuje 154 mmol Na<sup>+</sup> in 154 mmol Cl<sup>-</sup> ; pH = 4,5–7,0)

Reagente, kalibratorje ter kontrole hranimo in pripravimo po navodilih proizvajalca (44).

### 3.2.1.2 Aparature in pribor

- Analizator Roche/Hitachi 917 (Roche Diagnostics)
- Centrifuga Beckman Coulter Allegra<sup>®</sup> 6KR (Beckman Coulter)
- Plastične epruvete
- Pasteurjeve pipete

### 3.2.1.3 Princip metode

Kreatinin iz vzorca reagira z nasičeno pikrinsko kislino v alkalnem mediju. Absorbanca nastalega rumenooranžnega kompleksa, izmerjena pri 505 nm, je direktno sorazmerna koncentraciji kreatinina v vzorcu (44).

### 3.2.1.4 Stabilnost vzorca

Kreatinin v urinu je stabilen:

- 2 dni pri 15–25 °C,
- 6 dni pri 2–8 °C,
- 6 mesecev pri (-15)–(-25) °C (50).

### 3.2.1.5 Podajanje rezultatov

- Merilno območje: 0,36–57,50 mmol/l
- Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle:

v 24-urnem vzorcu urina:

ženske: 7,0–14,00 mmol/dan

moški: 9,0–21,00 mmol/dan

v 1. jutranjem vzorcu urina:

ženske: 2,47–19,20 mmol/l

moški: 3,45–22,90 mmol/l (44).

### 3.2.2 Metoda določanja koncentracije kotinina v serumu in urinu

Izpostavljenost tobačnemu dimu lahko ugotovljamo z merjenjem nikotina in njegovih metabolitov. Koncentracijo kotinina, ki nastaja med presnovo nikotina v telesu, smo merili z direktno kompetitivno encimsko imunsko tehniko ELISA na trdnem nosilcu na analizatorju Personal Lab<sup>TM</sup> (Adaltis/Italija). Metoda temelji na prepoznavi kotinina s specifičnimi protitelesi. Uporabili smo reagenčni set proizvajalca Calbiotech, ZDA. Ker je občutljivost tega testa 1 µg/l, smo koncentracijo kotinina v vzorcih z nižjimi rezultati izmerili z uporabo občutljivejšega ELISA reagenčnega seta proizvajalca Abraxis, ZDA.



**Slika 9:** Analizator Personal LAB<sup>TM</sup> (Adaltis/Italija)

Vir: [URL: <http://www.adaltis.net/content/product/instruments/personalLAB/default.aspx>] (45)



### 3.2.2.1 Cotinine Direct ELISA Kit (Calbiotech, ZDA)

#### 3.2.2.1.1 Reagenti, kalibratorji, kontrole

- ❖ Cotinine Direct ELISA Kit (Cat. No. CO096D) (96 testov) (Calbiotech, ZDA)

##### Reagenčni set vsebuje:

- Mikrotitrne ploščice prevlečene s poliklonskimi protitelesi proti kotininu
- Standard set (0; 5; 10; 25; 50; 100 µg/l)
- Kotinin-HRP (hrenova peroksidaza) encimski konjugat
- TMB barvni substrat (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Stop reagent (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- ❖ Kontrolni material: urin z dodanim kotininom (COPHES)
- ❖ Redestilirana voda za spiranje (pH = 5,0–7,0) (Klinični center Ljubljana – lekarna)
- ❖ Fiziološka raztopina za redčenje vzorcev (Klinični center Ljubljana – lekarna)  
0,9 % NaCl (1000 ml vsebuje 154 mmol Na<sup>+</sup> in 154 mmol Cl<sup>-</sup> ; pH = 4,5–7,0)

Reagenčni set hranimo pri 2–8 °C, po navodilih proizvajalca (46).

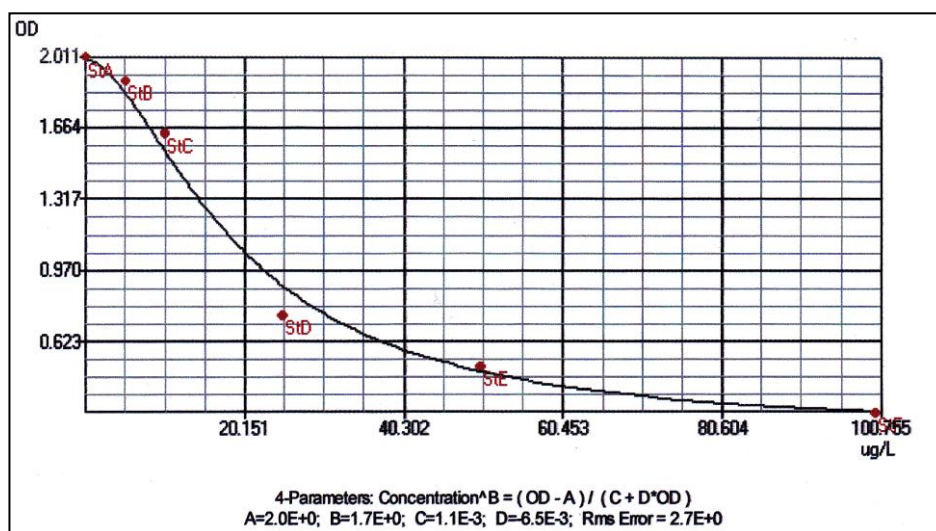
#### 3.2.2.1.2 Aparature in pribor

- Analizator Personal Lab<sup>TM</sup> (Adaltis, Italija)
- Centrifuga Beckman Coulter Allegra<sup>®</sup> 6KR (Beckman Coulter)
- Večkanalna nastavljiva pipeta z nastavki (30–300 µl) Eppendorf (Research)
- Nastavljiva pipeta z nastavki (10–100 µl) Eppendorf
- Nastavljiva pipeta z nastavki (100–1000 µl) Eppendorf
- Parafilm
- Stresalnik mikrotitrskih plošč IKA-VIBRAX -VXR
- Štoparica
- Rokavice lateks
- Staničevina

#### 3.2.2.1.3 Princip metode

Pri kotinin ELISA testu proizvajalca Calbiotech gre za direktno kompetitivno imunsko tehniko na trdnem nosilcu. Kotinin v vzorcu (serum, urin) in kotinin označen s hrenovo peroksidazo (kotinin-HRP) v reagentu tekmujeta za vezavo na protitelesa proti kotininu, vezana v vdolbinicah mikrotitrne ploščice. Po inkubaciji nevezan kotinin in kotinin encimski konjugat speremo. Po fazi spiranja in dodatka raztopine substrata nastane

obarvan kompleks, katerega intenziteto barve izmerimo. Manj kot je kotinina v vzorcu, več je razgrajenega substrata in večja je intenziteta barve. Intenziteta obarvanosti kompleksa je torej obratno sorazmerna s koncentracijo kotinina v vzorcu, ki jo odčitamo iz standardne krivulje. Krivuljo pripravimo za vsako serijo posebej. Pripravljena je v odnosu intenzitete barve in koncentracije kotinina v vzorcu. Optično gostoto (angl.: Optical density – OD) izmerimo pri valovni dolžini 450 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic na analizatorju Personal Lab™ (Adaltis, Italija).



**Slika 10:** Primer umeritvene krivulje za kotinin  
(Y os...izmerjena optična gostota – OD, X os...izmerjena koncentracija kotinina v µg/l)

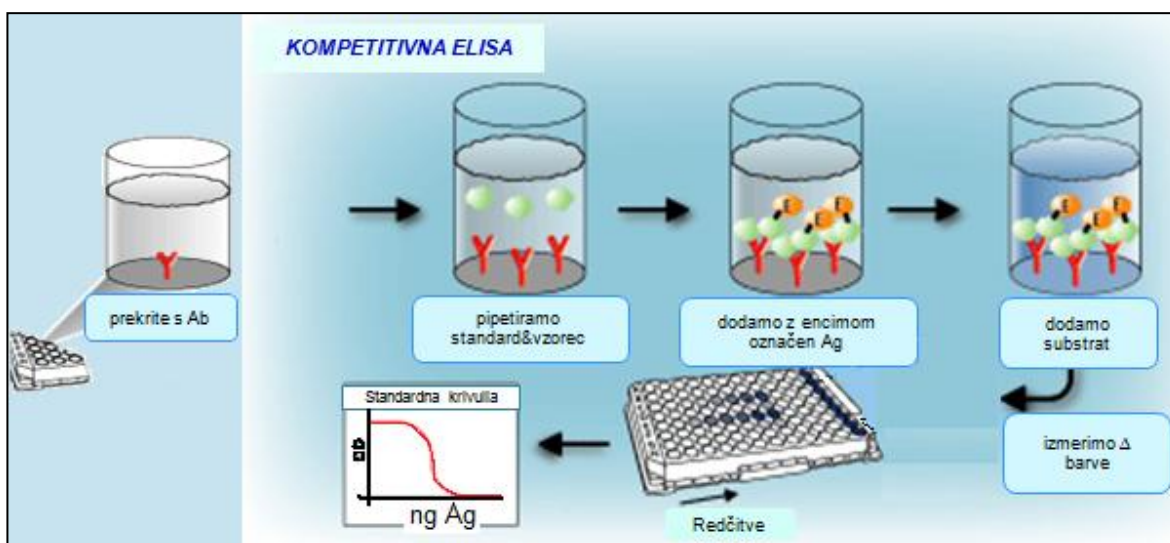
#### 3.2.2.1.4 Opis analitskega postopka

1. Pred pričetkom dela smo odmrznili vzorce, reagente iz Cotinine Direct ELISA reagenčnega seta, ki so že pripravljene za uporabo, pa ogreli na sobno temperaturo (18–26 °C).
2. V izbrane vdolbinice mikrotitrskih ploščic smo pipetirali po **10 µl** standarda (koncentracije: 0; 5; 10; 25; 50; 100 µg/l) kontrole in vzorca.
3. V vsako vdolbinico smo dodali **100 µl** encimskega konjugata (HRP). Nato smo mikrotitrsko ploščico pokrili s parafilmom in previdno stresali **10–30 sek** s pomočjo stresalnika mikrotitrskih plošč.
4. Sledila je **inkubacija** pri sobni temperaturi (18–26 °C), in sicer **60 min** v temi.
5. Nato smo vdolbinice **spirali s 300 µl** redestilirane vode. Postopek spiranja smo ponovili 6-krat. Med vsakim spiranjem smo mikrotitrsko ploščico obrnili na staničevino in jo dobro stresli, da smo odstranili tekočino. Ves čas smo pazili, da ne bi prišlo do kontaminacije vzorca med vdolbinicami. Ta faza je ključna, saj je

pomembno, da odstranimo nevezane molekule, ki bi v nadaljevanju lahko motile reakcijo.

6. V dobro sprane in odcejene vdolbinice smo nato pipetirali **100 µl** substrata (TMB).
7. Sledila je **30-minutna inkubacija** pri sobni temperaturi (18–26 °C) v temi.
8. V zadnji stopnji smo v vse vdolbinice pipetirali **100 µl** stop reagenta. Previdno smo stresali ploščico, da smo premešali reakcijsko zmes. Tako smo ustavili reakcijo, barva reakcijske zmesi pa je zaradi spremembe pH prešla iz modre v rumeno.
9. V **15 min** po dodatku stop reagenta smo mikrotitrsko ploščico vstavili v čitalec mikrotitrskih ploščic in odčitali absorbanco (OD) nastalega produkta pri **450 nm**.
10. Koncentracijo kotinina v vzorcih smo določili z interpolacijo z uporabo standardne krivulje, ki jo je potrebno narediti za vsako serijo posebej. Vzorce s koncentracijami kotinina nad linearnim območjem smo 10-krat in 100-krat razredčili s fiziološko raztopino.

Pri delu z analizatorjem in reagenti smo upoštevali varnostna navodila proizvajalca (46).



**Slika 11:** Shematski prikaz kompetitivne ELISE

(Primarna Ab so vezana na trdni nosilec. Za vezavo tekmujejo Ag iz vzorca in Ag označeni s HRP. Po dodatku substrata se spremeni intenziteta barve, katere A izmerimo. S pomočjo umeritvene krivulje odčitamo koncentracijo kotinina v vzorcu.)

### 3.2.2.1.5 Značilnosti metode

- Linearno območje: 0–100 µg/l
- Meja zaznavanja: 1 µg/l
- Specifičnost: Rezultati so pokazali visoko specifičnost testa. V manj kot 1 % navzkrižno reagirajo nikotin, nikotinamid in nikotinska kislina. Navzkrižno reaktivnost so ugotavljali še s številnimi kotininu sorodnimi substancami, ki so jih

dodali vzorcu urina. Tudi v teh primerih niso ugotovili večje ali enake navzkrižne reaktivnosti, kot je občutljivost testa.

- Orientacijske referenčne vrednosti niso podane (46).

### **3.2.2.2 Cotinine ELISA Kit (Abraxis, ZDA)**

#### **3.2.2.2.1 Reagenti, kalibratorji, kontrole**

- ❖ Cotinine ELISA (Microtiter Plate) (Cat. No. 515565) (Abraxis, ZDA)

Reagenčni set vsebuje:

- Mikrotitrne ploščice prevlečene s sekundarnimi protitelesi (kozja protikunčja)
  - Standard set (0; 0,05; 0,2; 0,5; 2,0; 5,0 µg/l)
  - Raztopina Ab (kunčja protikotinininska)
  - Kotinin HRP (hrenova peroksidaza) encimski konjugat
  - TMB barvni substrat (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)
  - Stop reagent (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
  - Kontrolni material: urin z dodanim kotininom (COPHES)
  - Diluent za redčenje vzorcev
  - Raztopina za spiranje, 5-kratni koncentrat
- ❖ Redestilirana voda za pripravo raztopine za spiranje (pH = 5,0–7,0) (Klinični center Ljubljana – lekarna)

Reagenčni set hranimo pri 4–8 °C, po navodilih proizvajalca (47).

#### **3.2.2.2.2 Aparature in pribor**

Glej točko 3.2.2.1.2

#### **3.2.2.2.3 Princip metode**

Pri ELISA testu za določanje kotinina proizvajalca Abraxis gre za direktno kompetitivno imunokemijsko tehniko, ki bazira na prepoznavi kotinina s specifičnimi protitelesi. Kotinin v vzorcu (serum, urin) in kotinin označen s hrenovo peroksidazo (kotinin-HRP) v reagentu tekmujeta za vezavo na kunčja antikotinininska protitelesa v raztopini. Protitelesa proti kotininu se potem vežejo na sekundarna kozja protikunčja protitelesa, vezana v vdolbinicah mikrotitrne ploščice. Po fazi spiranja in dodatka raztopine substrata nastane modro obarvan kompleks, katerega intenziteto barve izmerimo. Intenziteta obarvanosti kompleksa je obratno sorazmerna s koncentracijo kotinina v vzorcu, ki jo odčitamo iz standardne krivulje. Krivuljo pripravimo za vsako serijo posebej. Pripravljena je v odnosu

intenzitete barve in koncentracije kotinina v vzorcu. Optično gostoto izmerimo pri valovni dolžini 450 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic na analizatorju Personal Lab<sup>TM</sup> (Adaltis, Italija).

#### 3.2.2.2.4 Opis analitskega postopka

1. Pred pričetkom dela smo odmrznili vzorce. Mikrotitrsko ploščico in reagente iz ELISA reagenčnega seta proizvajalca Abraxis, ki so v večini pripravljeni za uporabo, smo ogreli na sobno temperaturo (20–25 °C). Pripraviti je treba le raztopino za spiranje, tako da 5-kratni koncentrat raztopine redčimo z destilirano vodo v razmerju 1:5 (100 ml vsebino stekleničke redčimo s 400 ml redestilirane vode) in dobro premešamo.
2. V izbrane vdolbinice mikrotitrskе ploščice smo pipetirali po **50 µl** standarda (koncentracije: 0,0; 0,05; 0,2; 0,5; 2,0; 5,0 µg/l), kontrole in vzorca.
3. V vsako vdolbinico smo z večkanalno nastavljivo pipeto dodali **50 µl** encimskega konjugata (HRP).
4. V naslednji fazi smo v vdolbinice pipetirali **50 µl** raztopine protiteles. Nato smo s parafilmom pokrili mikrotitrsko ploščico in jo previdno stresali **30 sek** s pomočjo stresalnika mikrotitrskih plošč.
5. Sledila je **inkubacija** pri sobni temperaturi, in sicer **60 min**.
6. Po inkubaciji smo vdolbinice **spirali** z **250 µl** raztopine za spiranje. Postopek spiranja smo ponovili 4-krat. Med vsakim spiranjem smo mikrotitrsko ploščico previdno obrnili na staničevino in jo dobro stresli, da smo odstranili tekočino.
7. V dobro sprane in odcejene vdolbinice smo nato pipetirali **100 µl** barvnega substrata (TMB).
8. Sledila je ponovna **inkubacija** pri sobni temperaturi (20–25 °C) v temi, tokrat **30 min**.
9. V zadnji stopnji smo v vse vdolbinice pipetirali **100 µl** stop reagenta v istem vrstem redu, kot smo v fazi 7 dodajali substrat. Previdno smo stresali ploščico, da smo premešali reakcijsko zmes. Tako smo ustavili reakcijo, reakcijska zmes pa se je zaradi spremembe pH obarvala rumeno.
10. V 15 min po dodatku stop reagenta smo mikrotitrsko ploščico vstavili v čitalec mikrotitrskih ploščic in odčitali absorbanco (OD) nastalega produkta pri **450 nm**.

11. Koncentracijo kotinina v vzorcih smo določili z interpolacijo z uporabo standardne krivulje, ki jo je potrebno narediti za vsako serijo posebej. Vzorce s koncentracijami pod 0,045 µg/l obravnavamo kot negativne rezultate, vzorce s koncentracijami nad 5,0 µg/l pa moramo po navodilih proizvajalca ustrezno redčiti. Pri delu z analizatorjem in reagenti smo upoštevali varnostna navodila proizvajalca (47).

#### **3.2.2.2.5 Značilnosti metode**

- Natančnost: Ponovljivost v seriji: 9,8–10,8 %  
Ponovljivost izven serije: 13,3–14,9 %  
Reproducibilnost: KV za standarde je < 15 %, za vzorce pa < 20 %.
- Linearno območje: 0–5,0 µg/l
- Meja zaznavanja: 0,045 µg/l
- Specifičnost: Test za določanje koncentracije kotinina je specifičen. Navzkrižna reaktivnost s kotininom, ki jo navaja proizvajalec je kar 100 %. Navzkrižno reaktivnost so preizkušali s številnimi kotininu sorodnimi substancami, ki so jih dodali vzorcu urina. Navzkrižne reaktivnosti niso zaznali. Opazili so, da v 1 % navzkrižno reagira nikotin, pod 0,1 % pa nornikotin.
- Orientacijske referenčne vrednosti niso podane (47).

### **3.3 STATISTIČNA ANALIZA**

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili računalniška programa Microsoft Excel (Microsoft, ZDA) in SPSS 20.0 (SPSS Inc., ZDA). Rezultate smo prikazali v preglednicah in grafikonih. Za primerjavo rezultatov oziroma ugotavljanja moči povezave med njimi smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije v primerih normalne porazdelitve ter Spearmanov koeficient korelacije v primeru nenormalne porazdelitve rezultatov. Dobljeni statistični rezultati so nas pripeljali do končnih ugotovitev in sklepov.

## **4 REZULTATI**

Preiskovance smo razvrstili v štiri skupine:

V **prvi skupini** je 10 nekadilcev, ki se niso gibali v okolju, kjer bi bili lahko izpostavljeni tobačnemu dimu, oddalo jutranji vzorec urina.

V **drugo skupino** smo uvrstili 4 pasivne kadilce. Prva in četrta PK sta oddali tri enkratne vzorce urina, zjutraj, opoldne in zvečer. Druga in tretji PK pa sta oddala štiri enkratne vzorce urina, potem ko sta bila 3 ure izpostavljena TD v zaprtem okolju.

V **tretjo skupino** smo vključili 10 kadilcev obeh spolov, ki so 3-krat v dnevu oddali enkratni urin. Prvi vzorec urina so oddali zjutraj, drugi opoldan, tretji vzorec pa zvečer. Sedem izmed njih je zbiralo tudi 24-urni urin.

V **četrto skupino** smo vključili kadilko, prostovoljko, ki je za teden dni opustila kajenje. Odločili smo se, da bomo pri njej hkrati s spremljanjem kinetike izločanja kotinina v urinu, spremljali še kinetiko izločanja kotinina v serumu. Potem ko je prižgala zadnjo cigareto v nedeljo in ves teden nobene več, smo ji vsako jutro med 7:00 in 7:30 odvzeli vzorec krvi, ob enakem času pa je oddala še enkratni vzorec jutranjega urina.

### **4.1 REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ KOTININA V URINU**

***Preglednica I:** Deskriptivni podatki izmerjenih vrednosti kotinina izraženih v  $\mu\text{g/l}$  v urinu NK, PK, KA in KAB ter vrednosti kotinina v serumu KAB*

|          | št. vz. | arimetrična sredina | standardni odkmik | mediana | najnižja vrednost | najvišja vrednost |
|----------|---------|---------------------|-------------------|---------|-------------------|-------------------|
|          | N       | $\bar{x}$           | SD                |         | min               | max               |
| NK       | 10      | 1,19                | 0,936             | 1,00    | 0,00              | 3,10              |
| PK       | 14      | 2,64                | 2,341             | 2,47    | 0,00              | 8,58              |
| KA-1,2,3 | 30      | 1202,26             | 1477,494          | 619,28  | 54,04             | 6321,20           |
| KA-1     | 10      | 1011,90             | 1616,160          | 438,86  | 105,38            | 5454,20           |
| KA-2     | 10      | 1073,06             | 787,800           | 933,85  | 54,04             | 2662,20           |
| KA-3     | 10      | 1521,83             | 1837,861          | 967,86  | 101,94            | 6321,26           |
| KA-24ur  | 7       | 533,33              | 426,974           | 539,48  | 64,24             | 1150,12           |
| KAB-S    | 5       | 4,60                | 3,971             | 2,42    | 1,88              | 11,20             |
| KAB-U    | 5       | 232,34              | 243,645           | 112,70  | 21,82             | 583,50            |

***Legenda:** KA-1 – vrednosti v jutranjih vzorcih urina, KA-2 – vrednosti v opoldanskih vzorcih urina, KA-3 – vrednosti v večernih vzorcih urina, KA-1,2,3 – vrednosti v vseh treh enkratnih vzorcih urina*

**Preglednica II:** Deskriptivni podatki izmerjenih vrednosti kotinina/kreatinin izraženih v  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  v urinu NK, PK, KA in KAB

|          | št. vz. | arimetrična sredina | standardni odmik | mediana | najnižja vrednost | najvišja vrednost |
|----------|---------|---------------------|------------------|---------|-------------------|-------------------|
|          | N       | $\bar{x}$           | SD               |         | min               | max               |
| NK       | 10      | 0,16                | 0,088            | 0,15    | 0,00              | 0,32              |
| PK       | 14      | 0,44                | 0,458            | 0,30    | 0,00              | 1,59              |
| KA-1,2,3 | 30      | 125,14              | 96,405           | 112,98  | 5,30              | 332,69            |
| KA-1     | 10      | 115,66              | 89,193           | 100,47  | 5,30              | 282,60            |
| KA-2     | 10      | 122,10              | 90,599           | 122,65  | 12,28             | 311,44            |
| KA-3     | 10      | 137,68              | 116,183          | 131,83  | 7,90              | 332,69            |
| KA-24ur  | 7       | 59,43               | 83,810           | 44,58   | 4,49              | 244,77            |
| KAB-U    | 5       | 14,87               | 17,524           | 6,99    | 1,54              | 44,20             |

*Legenda:* KA-1 – vrednosti v jutranjih vzorcih urina, KA-2 – vrednosti v opoldanskih vzorcih urina, KA-3 – vrednosti v večernih vzorcih urina, KA-1,2,3 – vrednosti v vseh treh enkratnih vzorcih urina

## 4.2 NORMALNOST PORAZDELITVE VZORCEV

**Preglednica III:** Test normalnosti porazdelitve podatkov v vzorcih seruma in urina kadilke abstinentke in v 24-urnih vzorcih urina kadilcev

|            | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |       |
|------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|-------|
|            | Statistic                       | df | Sig.  | Statistic    | df | Sig.  |
| KA-24 urni | 0,401                           | 7  | 0,001 | 0,653        | 7  | 0,001 |
| KAB-S      | 0,308                           | 5  | 0,135 | 0,782        | 5  | 0,058 |
| KAB-U      | 0,273                           | 5  | 0,200 | 0,817        | 5  | 0,111 |

Kolmogorov-Smirnov oziroma Shapiro-Wilkov test sta pri stopnji tveganja  $\alpha = 0,05$  pokazala normalno porazdelitev podatkov v serumu in urinu kadilke abstinentke ( $p > \alpha$ ), medtem ko so podatki v 24-urnih vzorcih urina kadilcev razporejeni neparametrično ( $p < \alpha$ ).

## 4.3 KORELACIJA

Statistično analizo korelacije smo izvedli s pomočjo statističnega programa SPSS in testiranja hipotez. Postavili smo ničelno ( $H_0$ ) in alternativno ( $H_a$ ) hipotezo ter določili stopnjo tveganja  $\alpha = 0,05$ :



- **H<sub>0</sub>**:  $\delta$  (grš. ro) je enak 0 (Ni povezave med spremenljivkama.)
- **H<sub>a</sub>**:  $\delta$  (grš. ro) ni enak 0 (Med spremenljivkama obstaja povezava.)

**Preglednica IV:** Korelacija koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA) izražene v  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  in števila dnevno pokajenih cigaret

|                |                 |                         | KA-24-urni urin | št. cigaret |
|----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------|
| Spearman's rho | KA-24-urni urin | Korelacijski koeficient | 1,000           | 0,449       |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         |                 | 0,312       |
|                |                 | N                       | 7               | 7           |
|                | št. cigaret     | Korelacijski koeficient | 0,449           | 1,000       |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | 0,312           |             |
|                |                 | N                       | 7               | 7           |

Iz rezultatov v *preglednici IV* je razvidno, da je Spearmanov korelacijski koeficient 0,449, signifikanca pa 0,312 ( $p > \alpha$ ), kar pomeni, da med spremenljivkama ni statistično značilne povezave. Zato privzamemo **H<sub>0</sub>**.

**Preglednica V:** Korelacija koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA) izražene v  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  in dnevnega vnosa nikotina

|                |                 |                         | KA-24-urni urin | nikotin |
|----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|---------|
| Spearman's rho | KA-24-urni urin | Korelacijski koeficient | 1,000           | 0,198   |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         |                 | 0,670   |
|                |                 | N                       | 7               | 7       |
|                | nikotin         | Korelacijski koeficient | 0,198           | 1,000   |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | 0,670           |         |
|                |                 | N                       | 7               | 7       |

Iz rezultatov v *preglednici V* je razvidno, da je Spearmanov korelacijski koeficient 0,198, signifikanca pa 0,670 ( $p > \alpha$ ), kar pomeni, da med spremenljivkama ni statistično značilne povezave, privzamemo **H<sub>0</sub>**.

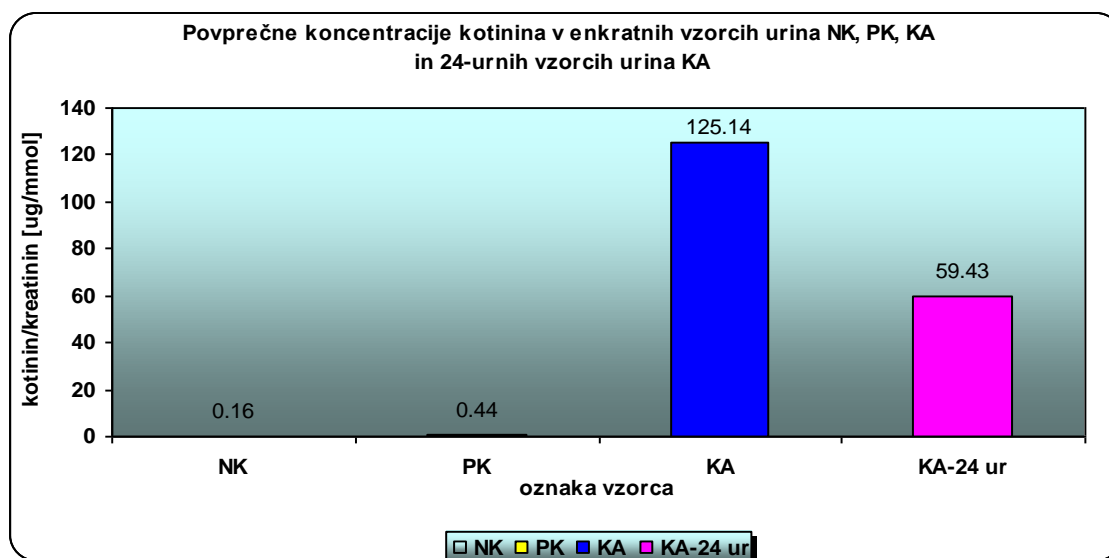
**Preglednica VI:** Korelacija koncentracije kotinina v urinu in koncentracije kotinina v serumu pri kadilki abinentki (KAB)

|       |                     | KAB-S | KAB-U |
|-------|---------------------|-------|-------|
| KAB-S | Pearson Correlation | 1     | 0,998 |
|       | Sig. (2-tailed)     |       | 0,000 |
|       | N                   | 5     | 5     |
| KAB-U | Pearson Correlation | 0,998 | 1     |
|       | Sig. (2-tailed)     | 0,000 |       |
|       | N                   | 5     | 5     |

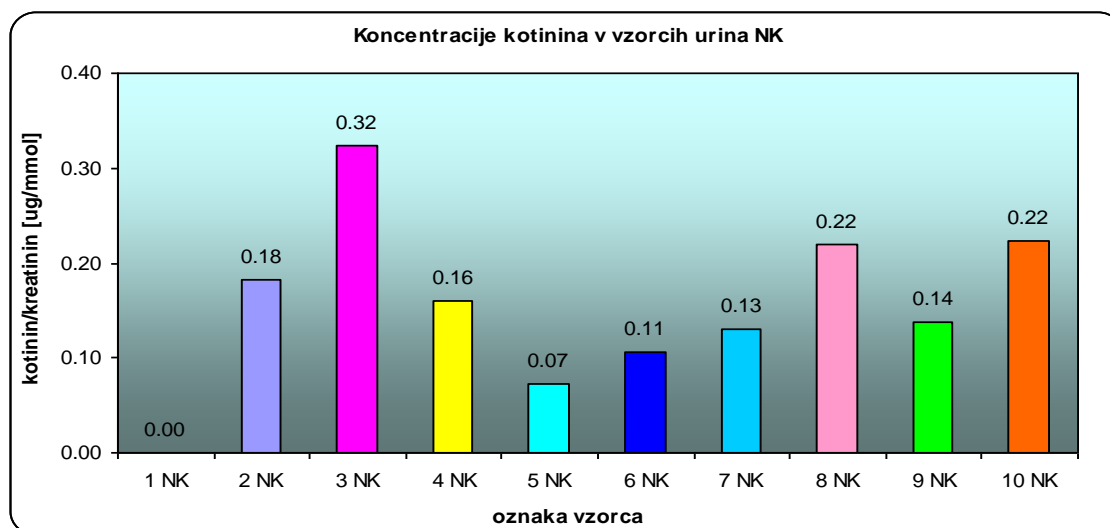
Iz rezultatov v preglednici VI je razvidno, da je Pearsonov korelacijski koeficient 0,998, signifikanca pa 0,0001 ( $p < \alpha$ ), kar pomeni, da gre za statistično značilne razlike. V tem primeru sprejmemo **H<sub>a</sub>**, ki pravi, da obstaja povezava med spremenljivkama.

#### 4.4 GRAFIČNI PRIKAZI REZULTATOV MERITEV KOTININA

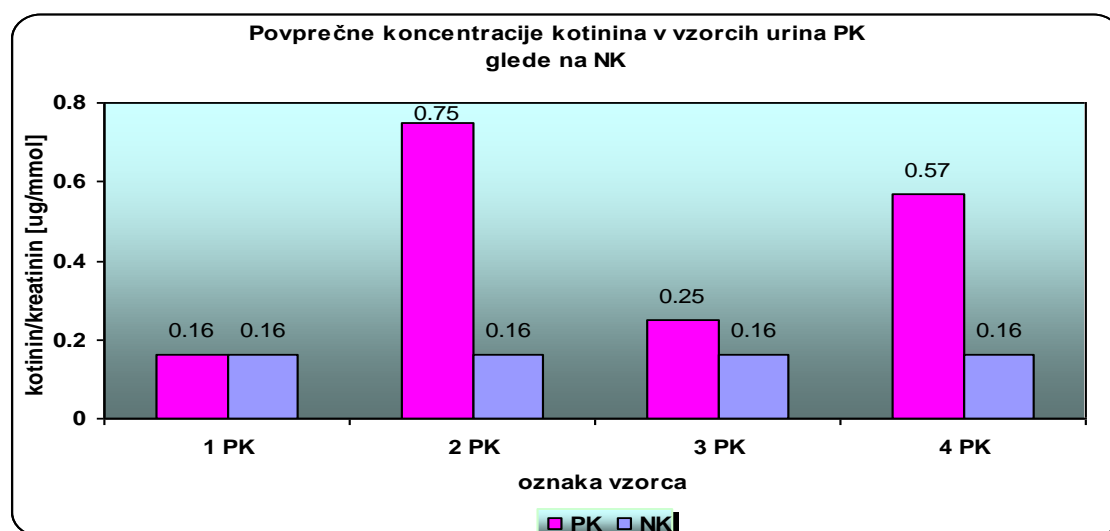
**Grafikon I:** Grafični prikaz izmerjenih povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina nekadilcev (NK), pasivnih kadilcev (PK) in kadilcev (KA) ter 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA)



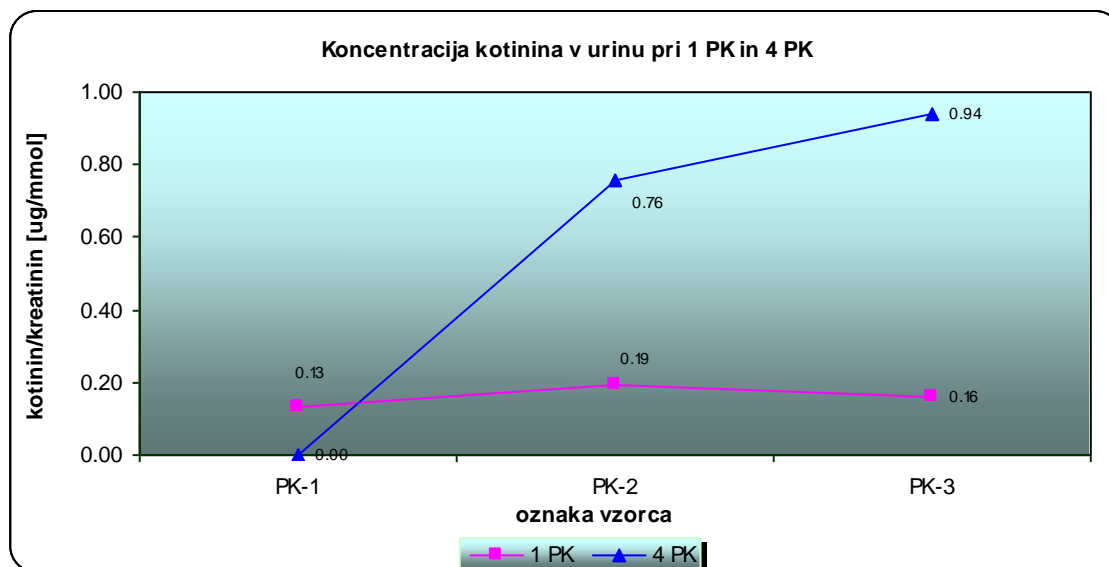
**Grafikon II:** Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v vzorcih urina nekadilcev (NK)



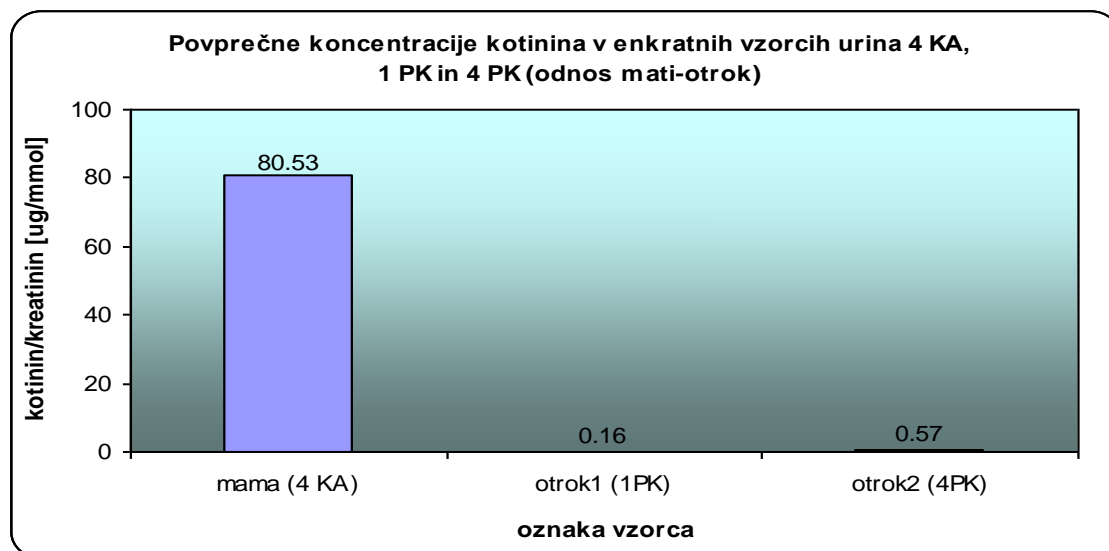
**Grafikon III:** Grafični prikaz povprečnih koncentracij kotinina v vzorcih urina pasivnih kadilcev (PK) glede na povprečno koncentracijo kotinina v vzorcih urina nekadilcev (NK)



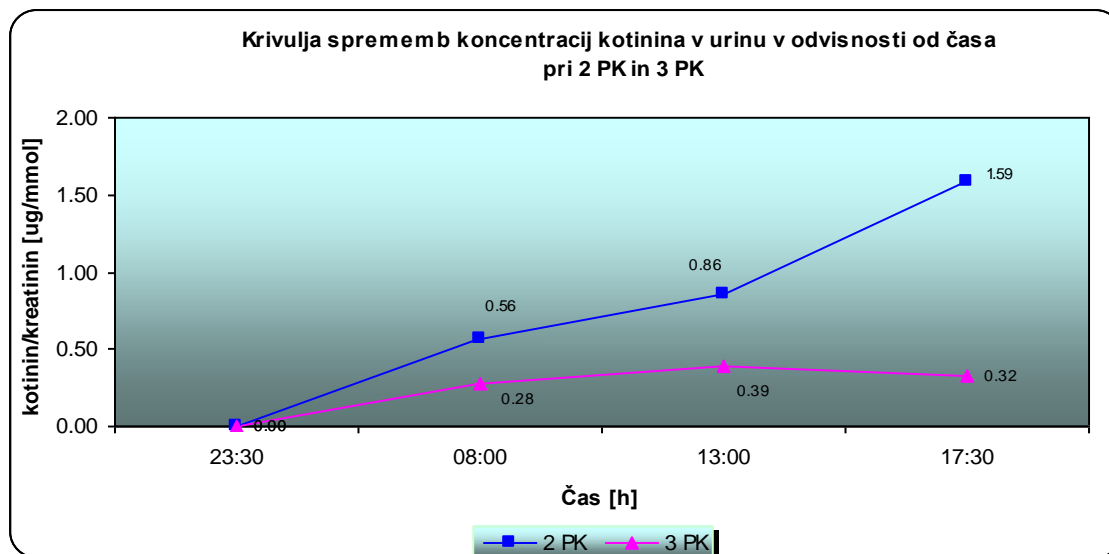
**Grafikon IV:** Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v jutranjem (PK-1), opoldanskem (PK-2) in večernem (PK-3) urinu pri prvi (1 PK) in četrti (4 PK) pasivni kadilki



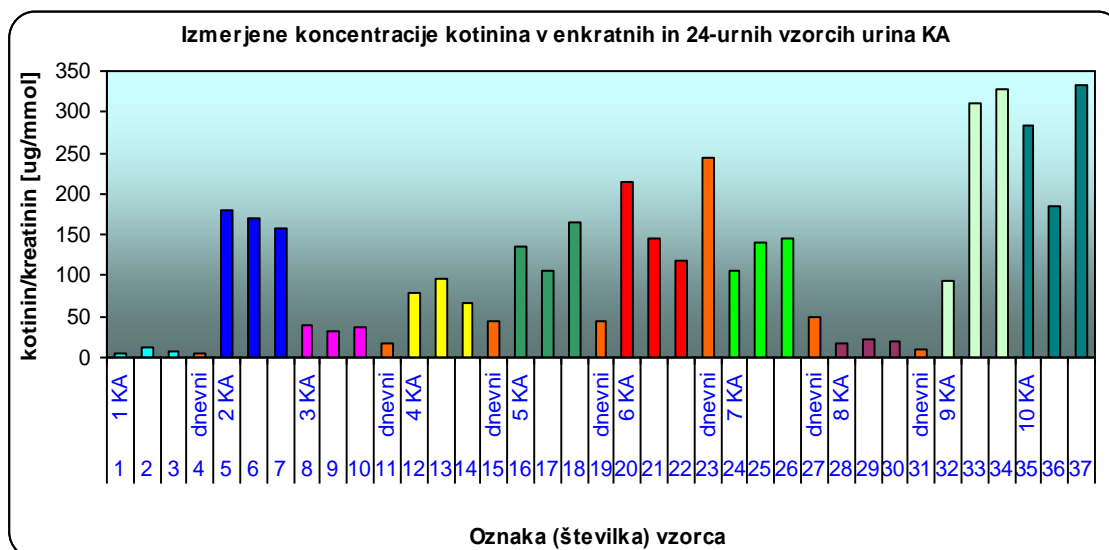
**Grafikon V:** Primerjava povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina matere kadilke (4 KA) in njenih hčera – pasivnih kadilk (1 PK in 4 PK)



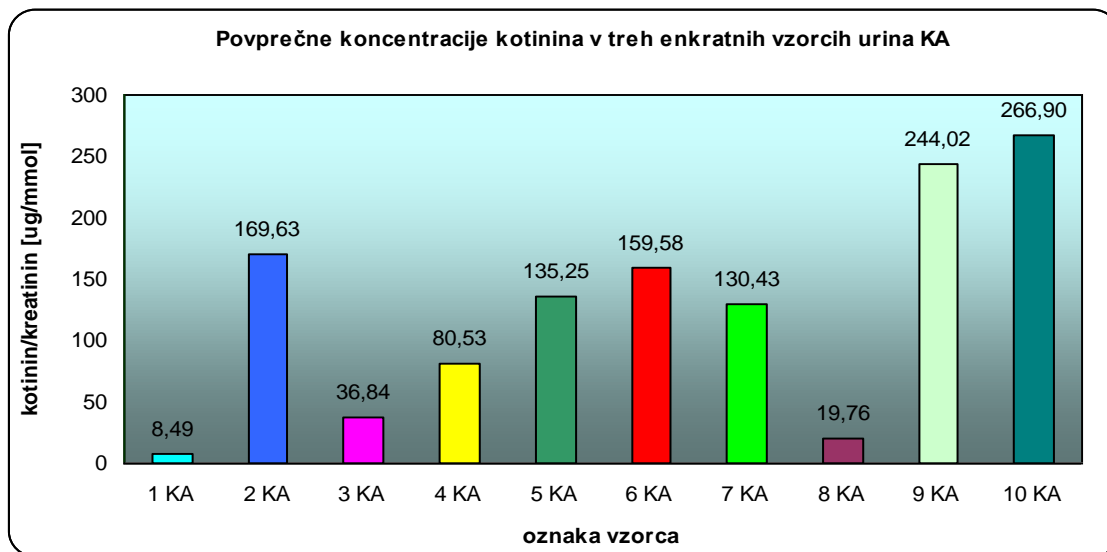
**Grafikon VI:** Grafični prikaz sprememb koncentracij kotinina v urinu v odvisnosti od časa dveh pasivnih kadilcev po triurni izpostavljenosti tobačnemu dimu (2 PK, 3 PK)



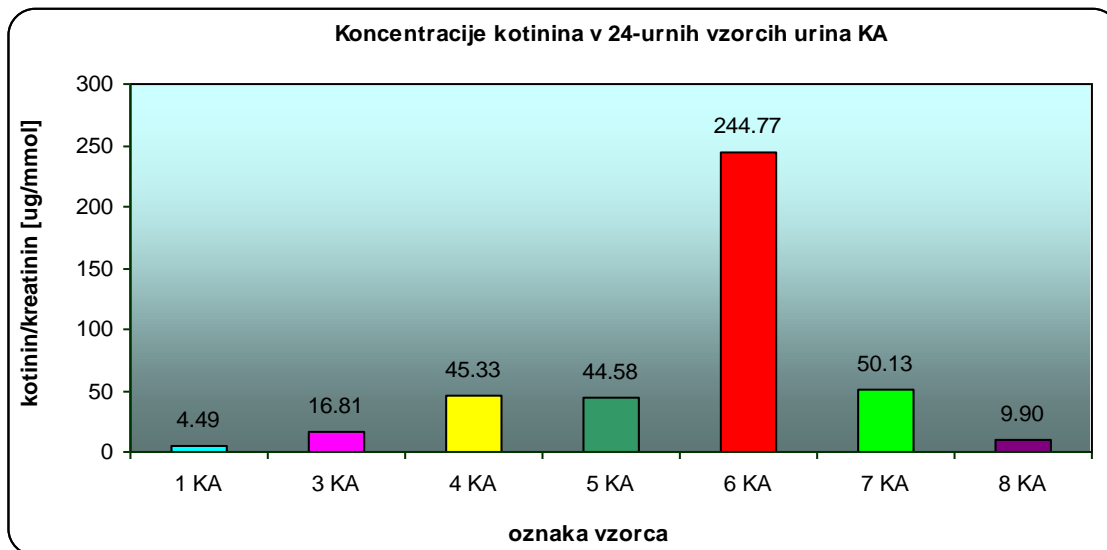
**Grafikon VII:** Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v jutranjih, opoldanskih, večernih in 24-urnih (dnevni) vzorcih urina kadilcev (KA)



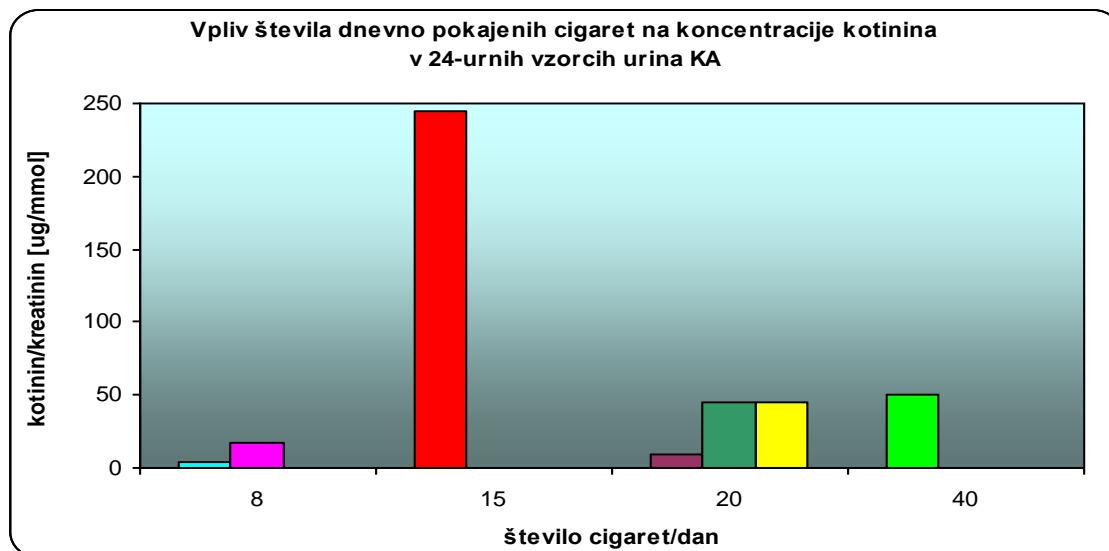
**Grafikon VIII:** Grafični prikaz izmerjenih povprečnih koncentracij kotinina v enkratnih vzorcih urina kadilcev (KA)



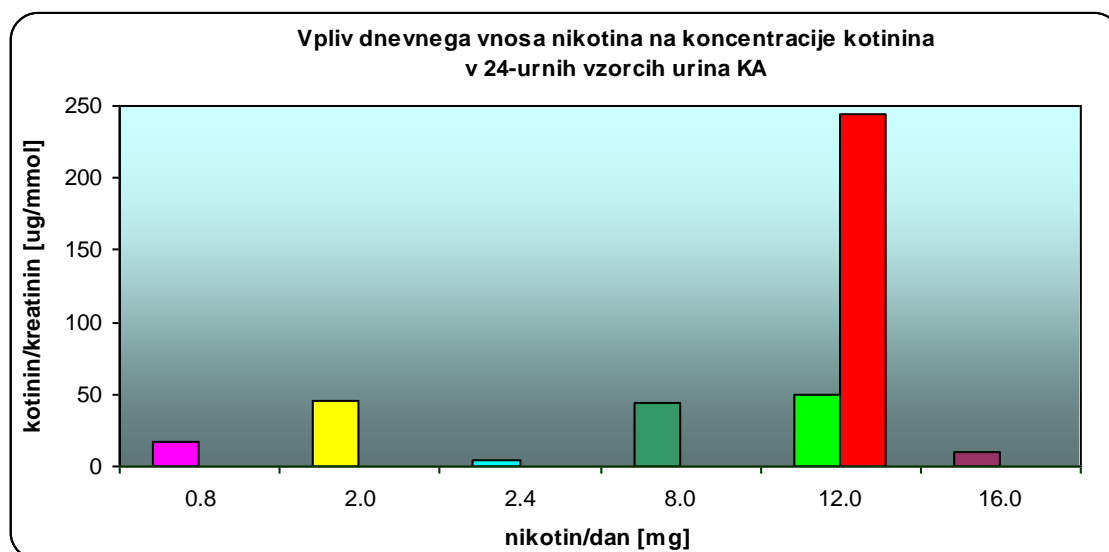
**Grafikon IX:** Grafični prikaz izmerjenih koncentracij kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA)



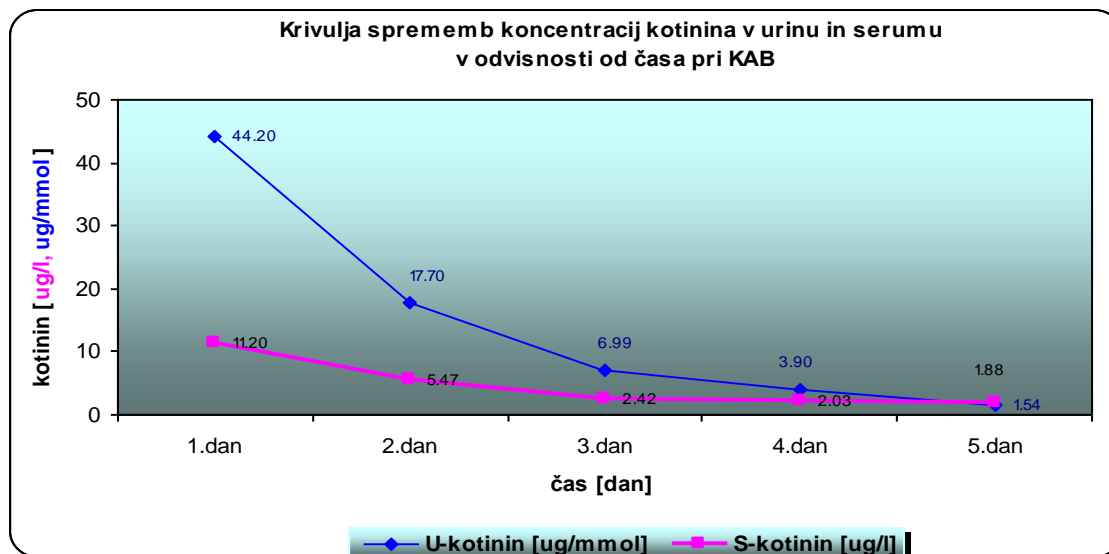
**Grafikon X:** Grafični prikaz vpliva števila dnevno pokajenih cigaret na koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA)



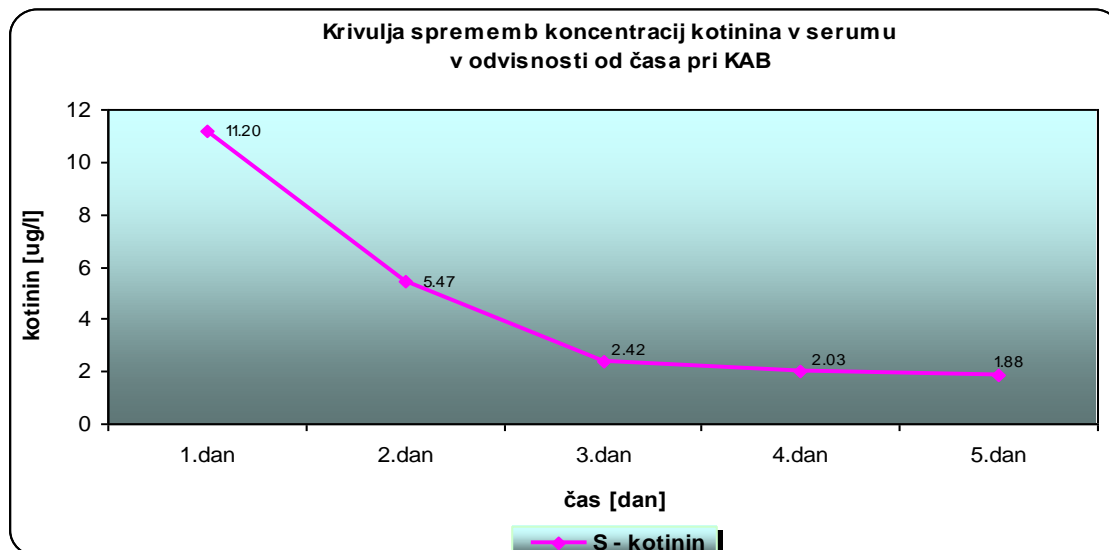
**Grafikon XI:** Grafični prikaz vpliva dnevnega vnosa nikotina na koncentracije kotinina v 24-urnih vzorcih urina kadilcev (KA)



**Grafikon XII:** Krivulja sprememb koncentracij kotinina v urinu in serumu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinentki (KAB)

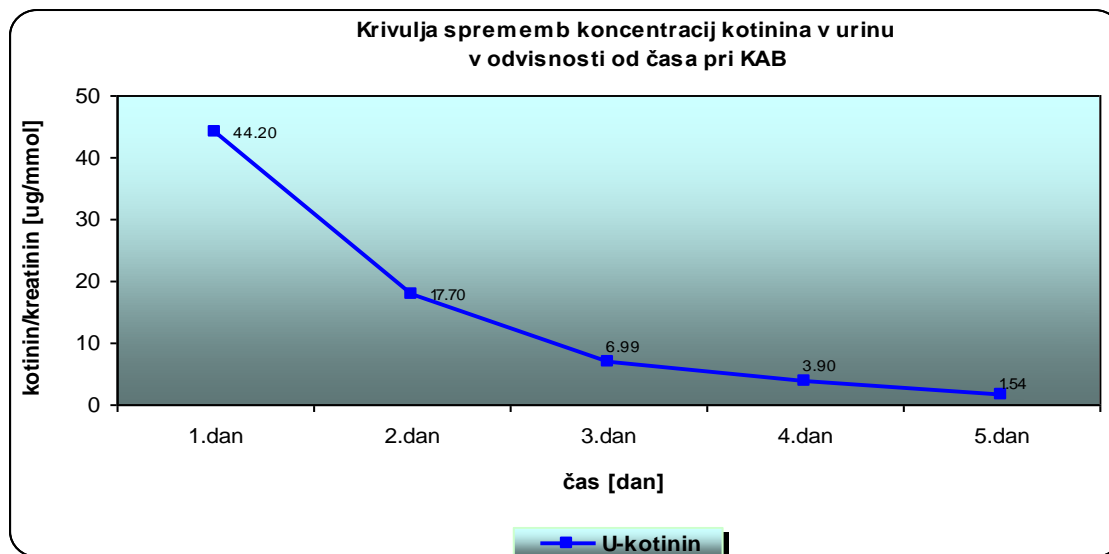


**Grafikon XIII:** Krivulja sprememb koncentracij kotinina v serumu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinentki (KAB)

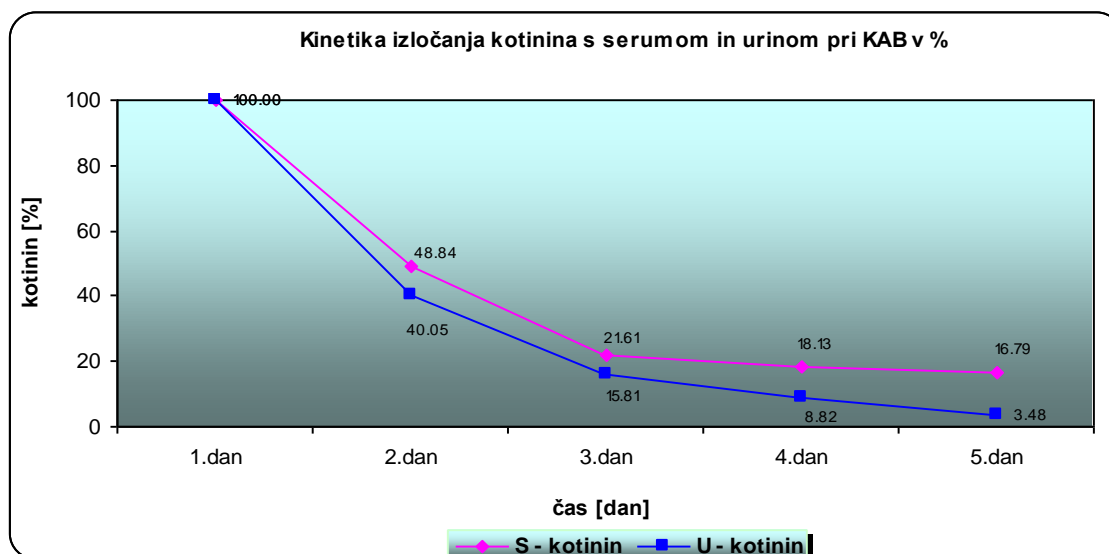




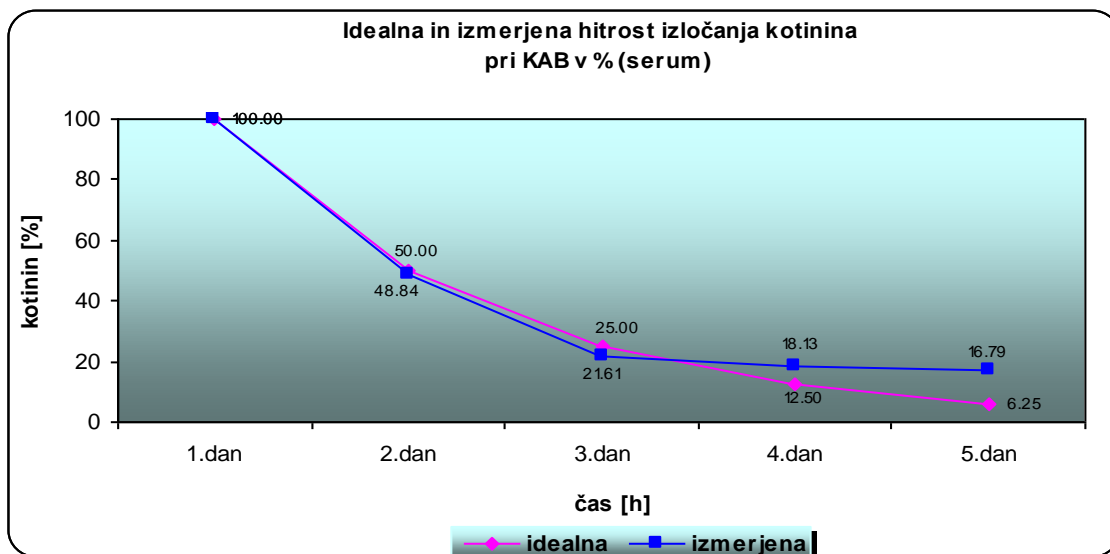
**Grafikon XIV:** Krivulja sprememb koncentracij kotinina v urinu v odvisnosti od časa pri kadilki abstinenci (KAB)



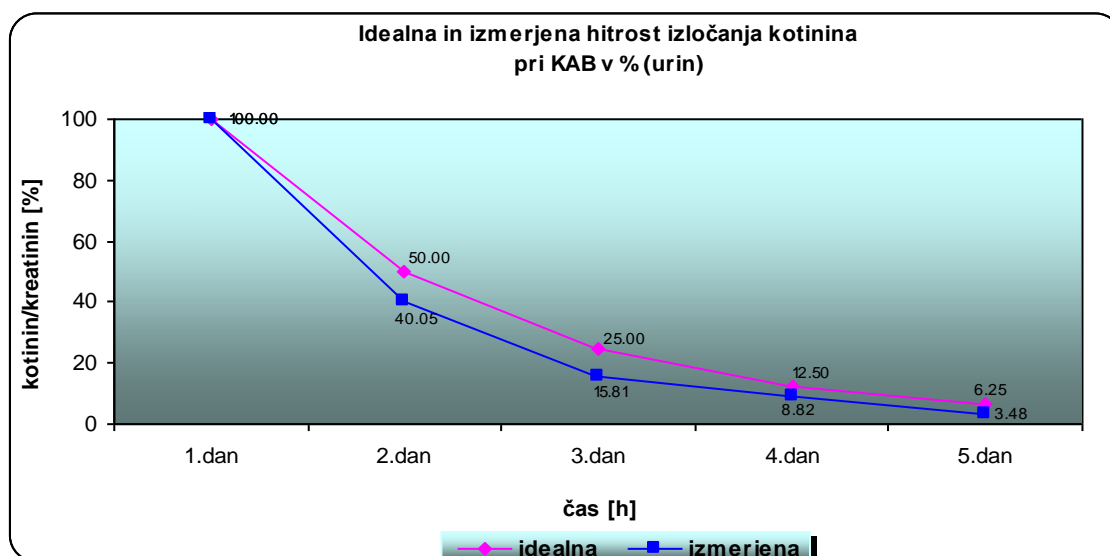
**Grafikon XV:** Grafični prikaz kinetike izločanja kotinina pri kadilki abstinenci (KAB) – koncentracije izmerjene v serumu in urinu so izražene v %



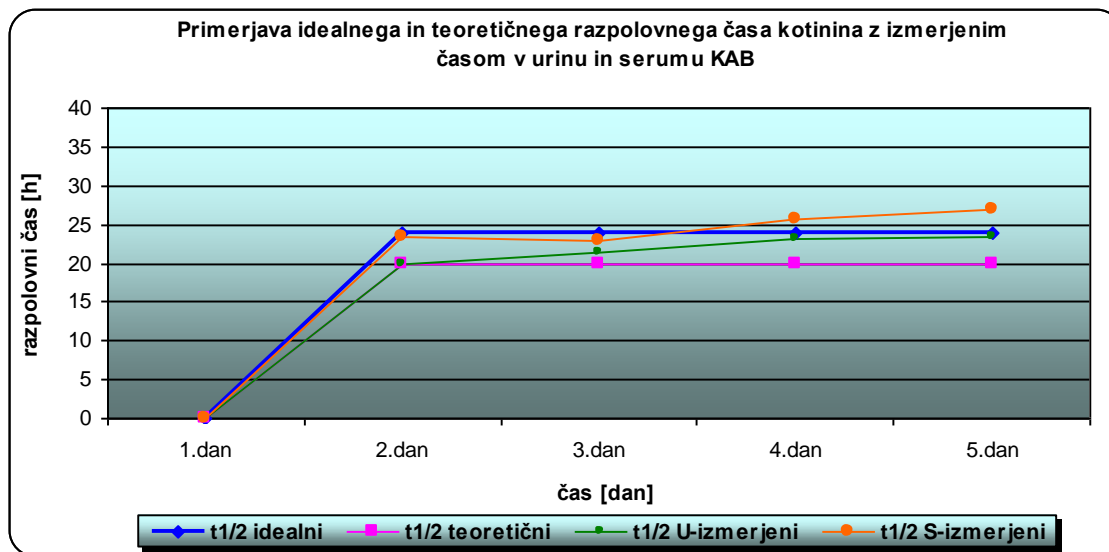
**Grafikon XVI:** Grafični prikaz idealne in izmerjene hitrosti izločanja kotinina pri kadilki abstinentki (KAB) v % (serum)



**Grafikon XVII:** Grafični prikaz idealne in izmerjene hitrosti izločanja kotinina pri kadilki abstinentki (KAB) v % (urin)



**Grafikon XVIII:** Grafični prikaz primerjave idealnega in teoretičnega razpolovnega časa ( $t_{1/2}$ ) z izmerjenim časom v urinu in serumu kadilke abstinente (spremljanje 5 dni)



## **5 RAZPRAVA**

Škodljiva raba tobaka je še vedno naraščajoči globalni problem današnje družbe. Kajenje in odvisnost od cigaret, ki so najpogosteje uporabljeni tobačni proizvod, sta najresnejši zdravstveni težavi, saj sta vzrok razvoja številnih bolezni in z zdravjem povezanih težav. Tobak namreč vsebuje več kot 4600 kemičnih snovi, od katerih so mnoge škodljive in celo rakotvorne (5). Nikotin je nedvomno najbolj škodljiva snov v cigaretah. Vodi namreč v hudo obliko odvisnosti, ki je vzrok ponavljajoče, kontinuirane rabe tobačnih izdelkov, kar vodi do povečane izpostavljenosti različnim bioaktivnim snovem (15). Hkrati ima tobačni alkaloid nikotin, ki je terciarni amin, sestavljen iz piridinskega in pirolidinskega obroča, tudi negativne učinke na delovanje drugih zdravil in zato lahko oteži zdravljenje različnih bolezni (49).

Kajenje pa ne povzroča bolezni samo pri kadilcih, temveč je zelo škodljivo tudi za nekadilce, ki so hote ali nehote izpostavljeni tobačnemu dimu (TD). Med zgorevanjem cigarete se, kot rečeno, sprošča nevarna mešanica kemičnih snovi, tudi kancerogenih (6).

Obstaja kar nekaj različnih bolj ali manj specifičnih biooznačevalcev, ki so lahko pokazatelji izpostavljenosti TD. Nikotin ni najboljši BO ugotavljanja izpostavljenosti TD. V telesu hitro razpada, saj ima razpolovno dobo le nekaj ur (36). Drugače je, ko govorimo o glavnem presnovku nikotina, kotininu, katerega koncentracijo smo v naši nalogi merili v urinu in serumu. Imamo zelo specifične in občutljive metode za določanje kotinina, zato je le-ta izmed vseh BO uporabe tobačnih izdelkov in izpostavljenosti TD najboljši, najbolj specifičen in občutljiv. V telesu ga lahko za razliko od nikotina izmerimo še nekaj dni po izpostavitvi. Tudi izbor bioloških vzorcev za določanje koncentracije kotinina je pester (31, 35).

V naši nalogi smo za določanje koncentracije kotinina v serumu in urinu uporabili imunokemijsko metodo ELISA. Koncentracijo kotinina v urinu smo zaradi različne dnevne sestave in koncentriranosti urina preračunali na koncentracijo kreatinina, ki smo jo izmerili spektrofotometrično. Sicer obstajajo izsledki raziskav, ki kažejo na to, da razmerje kotinin/kreatinin celo slabše korelira s koncentracijo nikotina v serumu kot nekorrigiran kotinin v urinu. Vseeno pa so v raziskavah rezultati kotinina mnogokrat korigirani na kreatinin, saj je za spremljanje koncentracije kotinina pri posamezniku in za razlikovanje med nekadilci, pasivnimi kadilci in kadilci tak način podajanja rezultatov najboljši (40).

V nalogo smo vključili 24 odraslih preiskovancev, starosti od 22–63 let, obeh spolov (14 žensk in 10 moških). Preiskovance smo razdelili v tri skupine, in sicer 10 preiskovancev

med NK, neizpostavljene TD, 4 med PK in 10 preiskovancev med KA. Eno izmed preiskovank kadilk pa smo dodatno spremljali še kot kadilko abstinentko, potem ko je v nedeljo prižgala zadnjo cigareto, potem pa ves teden nobene več. Pri tem je pet dni zapored vsako jutro oddala vzorec urina in seruma za določitev koncentracije kotinina. Primerjali smo koncentracije kotinina v serumu in urinu ter spremljali kinetiko izločanja kotinina iz telesa. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili.

### **Nekadilci (NK)**

Prvi namen naše naloge je bil ugotoviti, kakšne so vrednosti kotinina pri nekadilcih, ki niso izpostavljeni TD niti v domačem niti v delovnem okolju. V skupini 10 NK (5 moških in 5 žensk, starih od 26–62 let) je povprečna izmerjena koncentracija kotinina v urinu, preračunana na koncentracijo kreatinina,  $0,16 \mu\text{g}/\text{mmol} \pm 0,088 \text{ SD}$ , mediana pa je 0,15. Najnižja izmerjena koncentracija kotinina v enkratnem jutranjem vzorcu urina znaša 0,00  $\mu\text{g}/\text{mmol}$ , najvišja pa 0,32  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  (*preglednica II*).

Kotinin je metabolit nikotina, ki ga v telesu zaznamo le ob izpostavljenosti nikotinu. Na koncentracijo kotinina v telesu lahko vplivajo številni dejavniki. O teh bomo v nadaljevanju še govorili. V manjših koncentracijah se nikotin nahaja tudi v nekaterih rastlinah vrste razhudnikovk. Tako lahko tudi vnos tovrstne hrane vpliva na koncentracijo kotinina v telesu. Poročajo, da je pri zaužitju zmernih dnevnih količin krompirja, paradižnika, zelenega čaja in cvetače, povprečni dnevni vnos nikotina s hrano lahko 8,8  $\mu\text{g}$ , kar pomeni 10 % vsega nikotina, ki je vnesen v telo pri izpostavitvi TDO. Teh 8,8  $\mu\text{g}$  hkrati ustreza koncentracijam kotinina v urinu pod 0,7  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Kadar so zaužite večje količine tovrstne hrane, pa so lahko koncentracije precej večje, saj bi nekdo s hrano lahko zaužil tudi 99,9  $\mu\text{g}$  nikotina. Nekadilci so lahko izpostavljeni nikotinu še na druge načine. Nikotin se namreč absorbira tudi v samem prostoru (stene, preproge, pohištvo, oblačila). Nahaja se v hišnem prahu in zraku. Že kadilec ob nekadilcu ali okolje, kjer so kadili, pomeni vir nikotina, ki ga nekadilec lahko absorbira (48).

Ker so koncentracije kotinina v urinu NK v primerjavi s kadilci zelo nizke, potrebujemo za določevanje kotinina pri NK visoko specifične in občutljive metode. Vemo namreč, da je pri nizkih koncentracijah analitična občutljivost vprašljiva. Metodi, ki smo ju uporabili mi, sodita med dokaj občutljive in specifične, še vedno pa so »zlati standard« kromatografske metode. Če želimo z večjo gotovostjo ugotoviti, ali je nekdo izpostavljen TDO, moramo izbrati visoko občutljivo metodo, saj sicer lahko nekoga napačno opredelimo.

Naš prvi namen v nalogi je bil ugotoviti, ali so vrednosti kotinina v vzorcih urina NK res nižje od 3–5 µg/l, kot navajajo v strokovnih člankih (30, 48). Naši rezultati te navedbe potrjujejo, saj ima devet preiskovancev NK vključenih v našo nalogo vrednost kotinina v urinu nižjo od 3 µg/l, eden pa 3,10 µg/l (*grafikon II, priloga 1*). Vzrok za nekoliko višjo koncentracijo kotinina 8 NK v primerjavi z ostalimi bi bil lahko poleg različnih individualnih dejavnikov tudi v napačnem samoporočanju, saj posamezniki mnogokrat iz različnih razlogov ne podajo pravih podatkov o kadilskih navadah in izpostavljenosti TD (35).

### **Pasivni kadilci (PK)**

Pasivno kajenje je definirano kot izpostavljenost nekadilcev tobačnemu dimu v okolju (6). Kar 75 % nikotina v cigareti se sprosti v okolje v obliki stranskega dima, ki so mu izpostavljeni pasivni kadilci (39). Nekadilci so zaradi pasivnega kajenja ogroženi tako na javnih prostorih kot tudi v domačem okolju. Koncentracije snovi, ki onesnažujejo zrak, pa so v prostoru mnogo višje kot v zunanjem zraku (6).

V skupino PK smo vključili 4 preiskovance, stare od 22–62 let, ki so oddali 3 oziroma 4 enkratne vzorce urina. Povprečna izmerjena koncentracija kotinina v vseh 14 vzorcih je 0,44 µg/mmol ± 0,458 SD, mediana pa 0,30. Najnižja izmerjena vrednost je bila 0,00 µg/mmol, najvišja pa 1,59 µg/mmol (*preglednica II*).

Naš glavni namen preučevanja skupine PK je bil ponazoriti povprečne vrednosti kotinina v vzorcih urina PK s povprečno vrednostjo kotinina NK (*grafikon III*). V člankih navajajo, da so koncentracije pri PK, izražene v µg/l, pod 30 µg/l (30, 48, 50). Tem navedbam ustrezajo vsi naši rezultati v skupini PK (*priloga 2*), vendar pa na osnovi tako majhnega števila preiskovancev težko določimo razmejitveno vrednost med NK in PK. Naši rezultati so namreč v večini primerov pod 3 µg/l, kar po podatkih v literaturi ustreza koncentracijam kotinina pri NK. Na koncentracijo kotinina namreč močno vplivata tudi čas izpostavljenosti TD in vsebnost nikotina v okolju (27, 48).

Iz *grafikona III* je razvidno, da imajo trije izmed PK nekoliko višje povprečne vrednosti kotinina v urinu kot NK, kar smo seveda glede na izsledke v literaturi tudi pričakovali. Tako lahko kljub temu, da smo pri 1 PK izmerili enako povprečno vrednost kotinina kot pri NK (vzrok je verjetno neizpostavljanje TDO v tednu oddaje urina), potrdimo, da že kratkotrajna izpostavitve TD resnično povzročijo absorpcijo nikotina v telo nekadilcev in tako lahko vpliva na njihovo zdravje.

V drugem delu nas je zanimalo, kakšne so vrednosti kotinina v urinu 22-letne pasivne kadilke (1 PK) in 24-letne pasivne kadilke (4 PK), ki sta že od rojstva izpostavljeni TD v domačem okolju, ter njune *mame* kadilke (4 KA).

Pasivno kajenje ima škodljiv vpliv na zdravje otrok. Najpogosteje so otroci izpostavljeni TD v domačem okolju zaradi staršev kadilcev. Še posebej ogroženi so majhni otroci, ki večino časa preživijo s starši (6, 26). Koncentracije kotinina v urinu otrok dobro opišejo kadilske navade staršev (24).

V naši nalogi je prva pasivna kadilka (*otrok 1*) oddala vzorce urina v četrtek, torej med tednom, ko z mamo, ki hodi v službo, preživita skupaj le malo časa. Prav tako se v teh dneh ni gibala v družbi, kjer bi bila lahko izpostavljena TDO, saj se je intenzivno pripravljala na izpit, dopoldne doma, popoldne pa v knjižnici. To je verjetno vzrok nizkih koncentracij kotinina v vzorcih urina (min = 0,13 µg/mmol; max = 0,19 µg/mmol), ki se tekom dneva bistveno ne spreminjajo. Pri četrti pasivni kadilki (*otrok 2*) smo izmerili nekoliko višje koncentracije kotinina, kar smo seveda v nalogi tudi želeli pokazati. 4 PK je bila izpostavljena TD preko mame med tednom in ves vikend. Vzorce urina je oddala v nedeljo. V tem primeru koncentracije kotinina skozi dan naraščajo (min = 0,00 µg/mmol; max = 0,94 µg/mmol) (*grafikon IV*). Če primerjamo povprečni koncentraciji kotinina v vzorcih urina obeh PK s povprečno koncentracijo kotinina matere KA (*grafikon V*) lahko potrdimo navedbe v literaturi, da so koncentracije kotinina ob daljši izpostavljenosti višje. Tako je seveda verjeti številnim zapisom o škodljivem vplivu staršev kadilcev na zdravje otrok, še posebej v zgodnjem otroštvu, ko le-ti preživijo s starši veliko časa.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, kako se spreminja koncentracija kotinina v primeru, ko se nekadilec, ki v vsakdanjem življenju ni izpostavljen TD niti v domačem niti v družbenem okolju, za tri ure izpostavi TD, in tako ponovno potrditi navedbe o tem, da že kratkotrajna izpostavitve TD lahko škodljivo vpliva na naše telo. S tem namenom sta dva pasivna kadilca, 56-letni M in 62-letna Ž (2 PK, 3 PK), v večernih urah obiskala svoja prijatelja, strastna kadilca, v njenem domu. Takoj po triurni izpostavitvi sta oba PK ob 23:30 oddala prvi vzorec urina, v katerem nismo zaznali kotinina. Naslednji dan sta oba oddala še tri enkratne vzorce urina, in sicer ob 8:00, 13:00 in 17:30 uri. Iz *grafikona VI* lahko razberemo, da smo v teh vzorcih pri obeh preiskovancih z našo metodo kotinin zaznali. Po absorpciji nikotina je potreben določen čas za njegovo porazdelitev in presnovo v različne metabolite, ki se izločajo predvsem v urinu. Vidimo pa, da ima 2 PK, ženska, višje koncentracije kotinina kot 3 PK, moški. Prav tako lahko pri moškem v popoldanskem

vzorcu urina že opazimo padec koncentracije kotinina, medtem ko pri ženski le-ta še narašča. Vzroki različnih izmerjenih koncentracij kotinina, kljub istočasni izpostavitvi obeh preiskovancev TD v istem okolju, so lahko številni individualni dejavniki (absorbpcija, porazdelitev, kopičenje, presnova, izločanje). Poleg genetskih razlik imajo velik vpliv tudi fiziološki dejavniki (prehrana, starost, spol, hitrost in globina dihanja, hitrosti jetrnega pretoka in pretoka urina) in vpliv zdravil (3, 42). Možen vzrok za naraščanje koncentracije kotinina pri ženski PK v primerjavi z moškim PK je mogoče ta, da ima naša preiskovanka precej več maščobnega tkiva kot preiskovanec. Vemo namreč, da se nikotin v telesu porazdeli po različnih tkivih in se zaradi svoje lipofilnosti zelo dobro kopiči tudi v maščobah. To bi lahko bil vzrok počasnejše razgradnje in izločanja. Zaradi velikega števila dejavnikov, ki vplivajo na samo koncentracijo kotinina v telesu, je na osnovi dveh primerov v naši nalogi nemogoče priti do tehtnega zaključka. Zagotovo pa lahko potrdimo to, kar je bil namen naše naloge. PK tudi ob kratkotrajni izpostavljenosti TD absorbirajo določen odmerek nikotina.

### **Kadilci (KA)**

Naslednji namen naše naloge je bil ugotoviti, kakšne so vrednosti kotinina v urinu KA v primerjavi z NK in kako na količino z urinom izločenega kotinina vplivata število dnevno pokajenih cigaret in dnevni vnos nikotina v telo.

V skupino kadilcev smo vključili 10 preiskovancev, 5 žensk in 5 moških, starosti od 38 do 63 let. Vsi so pred pričetkom raziskave izpolnili anketni list, saj smo za primerjavo rezultatov potrebovali podatke o številu pokajenih cigaret in vsebnosti nikotina v njih. Vsi preiskovanci so v istem dnevu oddali tri vzorce urina (zjutraj, opoldne in zvečer), sedem izmed njih pa jih je zbiralo tudi 24-urni urin. Podatki, pridobljeni na osnovi ankete, in izmerjene koncentracije kotinina v posameznih vzorcih urina so razvidni v *prilogi 3*. Povprečna koncentracija kotinina v **enkratnih vzorcih urina** je  $125,14 \mu\text{g}/\text{mmol} \pm 96,405 \text{ SD}$ , mediana znaša 112,98. Najnižja izmerjena vrednost je  $5,30 \mu\text{g}/\text{mmol}$ , najvišja pa  $332,69 \mu\text{g}/\text{mmol}$  (*preglednica II*).

Koncentracije kotinina pri posameznikih tekom dneva variirajo. Glede na to, da so vpliv izpostavljenosti TD na spreminjanje koncentracije kotinina v urinu proučevali v številnih študijah, je dobro znano, da na to vplivajo številni dejavniki. Koncentracije so zelo odvisne od samih kadilskih navad. Tako imajo velik vpliv število dnevno pokajenih cigaret in njihova vsebnost nikotina, način kajenja (pogostost in globina vdihov), hitrost absorpcije



nikotina, porazdelitev nikotina v telesu ter hitrost jetrnega pretoka (39). Na koncentracijo kotinina v urinu prav tako vpliva pretok urina. Večji kot je volumen urina, manjša je koncentracija kotinina v njem. Več kot pijemo, hitreje se toksini izločajo iz telesa. To tudi pospeši sam metabolizem. Različni ljudje pa pretvarjajo različen % nikotina v kotinin (55–92 %) in imajo različen očistek kotinina (19–75 ml/min). Obstajajo tudi članki o tem, da je eliminacija nikotina in kotinina pri krajši izpostavljenosti TD počasnejša kot pri daljši, kar je verjetno posledica daljšega izplavljanja iz telesa (48). Seveda so koncentracije kotinina odvisne še od številnih dejavnikov, ki vplivajo na sam metabolizem in izločanje. To so različni genetski dejavniki (varianete CYP), fiziološki vplivi (spol, starost, biološki ritmi, prehrana, bolezni ledvic, jetrne bolezni) in nekatera zdravila. Nenazadnje je potrebno omeniti tudi vpliv vsebnosti nikotina v okoljskem zraku, ki so mu izpostavljeni tudi kadilci (3,27). O tem je več napisanega že v uvodnem delu naloge.

V nalogi smo želeli prikazati izločanje kotinina v urinu čez dan. Logično bi bilo, da bi imeli preiskovanci zjutraj najnižje koncentracije kotinina, saj je izpostavljenost tobaku ponoči v normalnih okoliščinah manjša. Čez dan pa naj bi te koncentracije zaradi kajenja naraščale. Iz naših rezultatov (*grafikon VII*) lahko vidimo, da interpretacija le ni tako preprosta. Nekateri imajo v jutranjih vzorcih urina celo višje koncentracije kot pozneje, čez dan. Vzrok bi lahko bil, poleg že omenjenega, tudi v neupoštevanju navodil, da naj oddajo jutranji urin, preden prižgejo prvo cigareto. Nikotin ima namreč kratek razpolovni čas (do 2 uri), kar pomeni, da je pretvorba v kotinin in ostale presnovke hitra. Poleg tega se iz telesa izloča na različne načine, tako z urinom kot tudi z blatom in potom (3,27). Razlike v koncentracijah kotinina v enkratnih vzorcih urina pri posameznikih so lahko posledica različnih kadilskih navad. Nekateri več kadijo v dopoldanskem času, drugi pa popoldne, ko pridejo iz službe. Zanimiva je primerjava 1 KA in 3 KA. Obe kadilki sta približno enako stari in pokadita enako število cigaret. Kljub temu, da 1 KA kadi cigarete z večjo vsebnostjo nikotina, ima nižje koncentracije kotinina v vseh treh vzorcih urina. Prav tako je zanimivo, da ima 8 KA kljub več kot enkrat večjemu številu pokajenih cigaret z mnogo večjo vsebnostjo nikotina, nižje koncentracije kotinina kot 3 KA (*priloga 3*). Menimo, da je to še ena potrditev o številnih vplivih na metabolizem ter izločanje nikotina in kotinina. Podobno je tudi v **24-urnih vzorcih urina KA**, kjer smo izmerili povprečno koncentracijo kotinina sedmih KA  $59,43 \mu\text{g}/\text{mmol} \pm 83,810 \text{ SD}$ . Mediana znaša 44,58, najnižja izmerjena koncentracija je 4,49  $\mu\text{g}/\text{mmol}$ , najvišja pa 244,77  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  (*preglednica II*).

Kadar nas zanimajo koncentracije kotinina v urinu, se namreč daje prednost merjenju v 24-urnemu urinu, ki bolje kaže na kronično izpostavljenost nikotinu kot kotinin v plazmi ali serumu (38).

Dobljene vrednosti v 24-urnih vzorcih urina ne moremo primerjati z izmerjenimi vrednostmi v enkratnih vzorcih urina, saj sta način in čas oddaje vzorcev različna. Vseeno pa smo pričakovali, da bodo imeli tisti, ki pokadijo več, višje koncentracije kotinina v 24-urnem urinu kot tisti, ki pokadijo manj. Izkazalo se je, da ni vedno tako (*grafikon IX*). Kot možen vzrok, naj poleg že omenjenih, navedem tudi možnost napake pri samem zbiranju dnevnega urina. Kakorkoli, koncentracije v vseh 24-urnih vzorcih urina so, razen v enem primeru, skoraj za polovico nižje kot v enkratnih vzorcih. Vzrok pripisujemo tudi dnevnim variacijam kotinina, ki so povezane s cirkadianimi ritmi. Zaradi majhnega števila preiskovancev tudi v tem primeru ne moremo podati trdnih zaključkov, kar tudi ni bil naš namen. V tem delu naloge smo želeli narediti le presek, kjer se nismo vprašali, kako in koliko so preiskovanci kadili dneve pred zbiranjem vzorca. Vemo pa, da je glede na  $t_{1/2}$  in kinetiko izločanja nikotina njegov vpliv v telesu prisoten še več dni. Kotinin v telesu lahko zaznamo še tri dni po izpostavitvi ali celo dlje, zato bi morali zaradi različnih kadilskih navad za natančnejšo določitev koncentracije kotinina po izpostavitvi nikotinu iz tobaka urin zbirati vsaj 72 ur. Pri zbiranju vzorcev je pomemben dejavnik tudi hranjenje vzorcev. Pri višjih temperaturah so namreč ugodnejši pogoji za razmnoževanje bakterij, ki lahko razgradijo kotinin v urinu (31,50).

V nalogi smo poleg prikaza posameznih vrednosti kotinina v vzorcih urina kadilcev želeli prikazati tudi korelacijo med številom dnevno pokajenih cigaret ter dnevnim vnosom nikotina in koncentracijo dnevno izločenega kotinina v urinu. Izkazalo se je, da so rezultati koncentracij kotinina v 24-urnih vzorcih urina preiskovancev, vključenih v naši nalogi, porazdeljeni neparametrično (Sig. 0,001;  $p < \alpha$ ) (*preglednica III*). Tako smo za oceno moči povezave med spremenljivkama uporabili Spearmanov koeficient korelacije ( $r$ ). Statistična analiza je pri stopnji tveganja  $\alpha = 0,05$  pokazala statistično neznačilno povezavo tako v primeru ugotavljanja korelacije med številom dnevno pokajenih cigaret ( $r = 0,449$ ; Sig. 0,312;  $p > \alpha$ ) kot tudi v primeru dnevnega vnosa nikotina in koncentracijo kotinina v 24-urnem urinu ( $r = 0,198$ , Sig. 0,670;  $p > \alpha$ ) (*preglednici IV, V*). V literaturi zasledimo, da oba parametra lahko signifikantno vplivata na koncentracijo kotinina v telesu. Tudi to je seveda odvisno od različnih dejavnikov. Tako lahko nekdo, ki kadi cigarete s filtrom, pokadi več cigaret kot tisti, ki kadi cigarete brez filtra, pa bo imel nižje izmerjene

koncentracije kotinina. Prav tako ne pomeni, da bo kadilec, ki se odloči za prehod na cigarete z manjšo vsebnostjo nikotina, imel nižje koncentracije kotinina, saj bo lahko za zadostitev potrebam po nikotinu pokadil temu primerno večje število cigaret (39, 48). V naši nalogi imamo žal premalo preiskovancev, zato nam morda tudi ni uspelo potrditi navedb drugih, obsežnejših študij.

Vseeno pa lahko na osnovi dobljenih rezultatov v skupini KA rečemo, da so povprečne koncentracije kotinina v urinu kadilcev bistveno višje v primerjavi z NK in PK (*grafikon I*), kar je bil tudi naš namen. Vsem KA smo namreč izmerili koncentracije kotinina nad 50  $\mu\text{g/l}$  (*priloga 3*), kar predstavlja mejo med abstinenco in uporabo tobačnih izdelkov (30). Maksimalna koncentracija kotinina, ki smo jo v naših vzorcih urina izmerili, znaša 6321,20  $\mu\text{g/l}$ . Izmerili smo jo pri 10 KA, ki pokadi kar 40 cigaret na dan. Tako visoke vrednosti smo glede na podatke v člankih (30) pri tako hudem kadilcu tudi pričakovali. Vrednosti kotinina v urinu pod 100  $\mu\text{g/l}$  namreč izmerimo pri lažjih kadilcih, koncentracije nad 500  $\mu\text{g/l}$  pa pomenijo hujšo obliko kajenja, 20 in več cigaret dnevno (50).

### **Kadilka abstinentka (KAB)**

V zadnjem delu naše naloge smo želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med koncentracijami kotinina v urinu in serumu pri poskusu, kjer je preiskovanka, sicer kadilka, za teden dni opustila kajenje, medtem pa vsak dan zjutraj oddala vzorec enkratnega urina in krvi. Spremembe koncentracij kotinina v urinu in serumu v odvisnosti od časa smo prikazali grafično (*grafikoni XII, XIII, XIV*).

Povprečna izmerjena koncentracija kotinina v serumu znaša 4,60  $\mu\text{g/l} \pm 3,971$  SD, mediana je 2,42, najnižja izmerjena koncentracija 1,88  $\mu\text{g/l}$ , najvišja pa 11,20  $\mu\text{g/l}$ . V urinu smo izmerili precej višje koncentracije v primerjavi s serumom, kar je glede na podatke drugih študij pričakovano. V vzorcih urina znaša povprečna koncentracija kotinina 14,87  $\mu\text{g/mmol} \pm 17,524$  SD, mediana pa 6,99. Najnižja izmerjena koncentracija je 1,54  $\mu\text{g/mmol}$ , najvišja pa 44,20  $\mu\text{g/mmol}$  (*preglednici I in II*).

Raziskovalci v različnih člankih navajajo, da so koncentracije kotinina v urinu v povprečju 6–10-krat višje kot v serumu (39, 49). Podobno se je izkazalo tudi v našem poskusu. Če pogledamo posamezne izmerjene vrednosti v serumu in urinu (*grafikona XIII, XIV*), vidimo, da je krivulja koncentracij kotinina v urinu padajoča, v serumu pa se ob koncu vzpostavlja ravnotežje. Menimo, da je to posledica tega, ker ima preiskovanka, sicer kadilka, kotinin v telesu razporejen po različnih tkivih še od preteklih dni izpostavljenosti

nikotinu. Iz tega razloga verjetno pride do prerazporejanja kotinina v telesu. Tako v serumu več dni zaznavamo približno enake koncentracije kotinina. Drugi možen vzrok pa je mogoče tudi v samem testu ELISA, ki smo ga uporabili za merjenje koncentracij kotinina, saj imamo pri nizkih koncentracijah lahko že problem z natančnostjo.

V nalogi nas je zanimalo, koliko časa po izpostavljenosti z našo metodo še zaznamo kotinin v vzorcih seruma in urina. Vsekakor lahko potrdimo navedbe, da kotinin v urinu oziroma serumu lahko zaznamo še več dni po izpostavljenosti. Ponekod navajajo, da ga zaznamo še 2–4 dni po izpostavljenosti (31, 39), drugod celo do 2 tedna (50).

Za ugotavljanje korelacije med koncentracijami kotinina v urinu in serumu smo, zaradi parametrične porazdelitve podatkov (*preglednica III*), upoštevali Pearsonov korelacijski koeficient  $r$ , ki znaša 0,998, kar je zelo blizu 1. Med spremenljivkama torej obstaja zelo močna povezava (Sig. 0,0001;  $p < 0,05$ ). Tako smo zadostili našim pričakovanjem, saj smo v literaturi zasledili navedbe, da obstaja statistično značilna povezava med koncentracijami kotinina v urinu in serumu (25, 39, 48).

Nazadnje smo v poskusu pri KAB želeli ugotoviti, kakšen je razpolovni čas kotinina oziroma kakšen % kotinina se izloči v določenem času. Vemo namreč, da je  $t_{1/2}$  kotinina v primerjavi z nikotinom ( $t_{1/2}$  do 2 uri) veliko daljši. Zaradi tega je kotinin tudi veliko primernejši BO ugotavljanja izpostavljenosti nikotinu iz tobaka. Razpolovni čas je po definiciji čas, ko se telo očisti 50 % nekega metabolita. V večini člankov navajajo, da je  $t_{1/2}$  kotinina med 16 in 24 ur (14, 31, 48, 50). To pomeni, da je potreben skoraj ves dan, da se ga polovica razgradi. Izmerjeni razpolovni čas pri naši preiskovanki, tako v urinu kot v serumu, smo primerjali z idealnim in teoretičnim (*grafikon XVIII*). Kotinin se izloča po kinetiki 1. reda. Torej bi bil v našem poskusu idealen razpolovni čas tisti, v katerem bi se izločilo 50 % kotinina. To je 24 ur. Povprečen  $t_{1/2}$  kotinina naše preiskovanke v urinu je 21,94 ur, v serumu pa 24,78 ur (*priloga 4*), kar pomeni, da odstopanja od idealnega obstajajo. Teoretični  $t_{1/2}$ , ki ga navajajo v literaturi, v povprečju znaša 20 ur. Pri naši preiskovanki je ta čas nekoliko daljši. To smo lahko tudi pričakovali, saj, kot smo v nalogi že večkrat poudarili, obstajajo številni individualni dejavniki, ki vplivajo tako na sam metabolizem kot tudi na izločanje nikotina (70–140 min) iz telesa (36). Povprečen  $t_{1/2}$  v našem poskusu je blizu vrednosti, ki jih navajajo v različni literaturi, kar smo v nalogi želeli pokazati. Iz poskusa lahko tudi razberemo, da se razpolovni časi v petih dneh spreminjajo (*priloga 4*), kar nam lepo prikazuje tudi % izločenega kotinina (*grafikon XV*).

Na začetku so razpolovni časi krajši, potem pa se med tednom podaljšujejo, kar je še bolj očitno v primeru seruma (*grafikon XVIII*).

Na samo hitrost izločanja nikotina in kotinina, vplivajo tudi kadilske navade. Eden izmed vzrokov podaljševanja razpolovnih časov bi bil lahko ta, da se zaradi počasnejšega prerazporejanja zalog kotinina iz različnih tkiv pri manjši izpostavljenosti hitrost izločanja upočasni. Vzrok ni v hitrosti samega metabolizma, ki je pri KA in NK podobna, ampak v manjši koncentraciji nikotina v telesu (48). Kadilka abstinentska je zaradi opustitve kajenja nikotinu vsak dan manj izpostavljena in temu primeren je tudi njen razpolovni čas.

V zaključku razprave želimo poudariti, da smo v nalogi želeli le v grobem prikazati, kakšne so koncentracije kotinina v urinu, saj imamo v vsaki skupini le majhno število preiskovancev, dejavnikov, ki vplivajo na koncentracije kotinina, pa je ogromno. Menimo, da je glede na obseg problematike kajenja današnje družbe in glede na posledice, ki jih povzroča, smiselno nadaljevati z raziskavami v tej smeri, rezultate pa objaviti na vidnem mestu, v vpogled širši populaciji, predvsem z namenom osveščanja in preprečevanja te vsem nam tako škodljive razvade.

## **6 SKLEPI**

Pri našem delu smo prišli do naslednjih zaključkov:

- 1) Izmerjene koncentracije kotinina v vzorcih urina nekadilcev se ujemajo s podatki iz literature, kjer navajajo, da so koncentracije kotinina v urinu nekadilcev manjše od 3–5 µg/l.
- 2) V vzorcih urina pasivnih kadilcev smo izmerili koncentracije kotinina nižje od 30 µg/l, kakor navajajo v številnih strokovnih člankih.
- 3) Kljub majhnemu številu preiskovancev znotraj skupine pasivnih kadilcev lahko rečemo, da pasivni kadilci že ob kratki izpostavljenosti tobačnemu dimu iz okolja absorbirajo določen delež nikotina, ki zdaj že po številnih dokazih lahko ogroža njihovo zdravje. Tudi starši kadilci škodljivo vplivajo na zdravje otrok, saj so otroci preko njih izpostavljeni tobačnemu dimu.
- 4) Povprečne koncentracije kotinina v urinu kadilcev so precej višje v primerjavi z nekadilci in pasivnimi kadilci. Kadilci imajo višje koncentracije kotinina od 50 µg/l, kar predstavlja mejo med abstinenco in uporabo tobačnih izdelkov.
- 5) Ni nujno, da ima nekdo, ki pokadi večje število cigaret z večjo vsebnostjo nikotina, višje koncentracije kotinina v urinu kot tisti, ki pokadi manj. Na koncentracijo kotinina vplivajo poleg kadilskih navad še številni individualni dejavniki. Interpretacija rezultatov pri posameznikih je težavna.
- 6) V nalogi nam ni uspelo potrditi navedbe v literaturi, da število dnevno pokajenih cigaret in dnevni vnos nikotina signifikantno vplivata na koncentracije kotinina v urinu. Primerjava izmerjenih koncentracij kotinina v 24-urnih vzorcih urina s številom dnevno pokajenih cigaret in dnevnim vnosom nikotina je pokazala statistično neznčilne razlike pri kadilcih, vključenih v našo nalogo. V nalogi imamo žal majhno število preiskovancev in nam morda iz tega razloga ni uspelo potrditi navedbe drugih, obsežnejših študij.
- 7) Primerjava izmerjenih koncentracij kotinina v serumu in urinu kadilke abtinentke je pokazala statistično značilne razlike.
- 8) Na osnovi našega poskusa pri kadilki abtinentki lahko potrdimo navedbe, da kotinin v vzorcih seruma in urina lahko detektiramo še več dni po izpostavljenosti nikotinu iz tobaka.

- 9) Povprečen razpolovni čas kotinina v urinu naše preiskovanke je 21,94 ur, v serumu pa 24,78 ur. Z rezultatom smo se približali navedbam v literaturi, da je razpolovni čas 16–24 ur.
- 10) Imunokemijska metoda ELISA je vsekakor praktična alternativa veliko bolj zamudnim in dragim kromatografskim tehnikam, potrebna pa je previdnost pri interpretaciji rezultatov, saj je velika možnost navzkrižne reaktivnosti, predvsem v nizkih koncentracijskih območjih pa imamo lahko že težave z natančnostjo. To je bil tudi vzrok, da smo v naši nalogi rezultate z vrednostmi pod 1 µg/l, dobljene z ELISA testom, proizvajalca Calbiotech, ZDA, analizirali z občutljivejšim ELISA testom, proizvajalca Abraxis, ZDA. Seveda pa so za natančnejšo opredelitev NK, PK ali KA še vedno »zlati standard« kromatografske tehnike.
- 11) Z nalogo smo želeli v grobem prikazati kakšne so koncentracije kotinina v urinu preiskovancev, saj imamo v vsaki skupini le majhno število preiskovancev, dejavnikov, ki na koncentracije kotinina vplivajo, pa je ogromno.
- 12) Glede na razsežnost problematike kajenja in posledice, ki jih kajenje v sodobni družbi povzroča, je smiselno nadaljevati z raziskavami v tej smeri, z rezultati pa seznaniti širšo javnost, predvsem z namenom osveščanja in tako preprečevanja te vsem nam tako škodljive razvade.

## **7 LITERATURA IN VIRI**

1. Čakš T. Opustite kajenje in zmagajte: Oris pomoči pri odvajanju od kajenja. Ljubljana: CINDI Slovenija, 2004; 60. str.
2. Inštitut za varovanje zdravja.  
[URL: <http://www.ivz.si/>], (dostop: 7.9.2011)
3. Hukkanen J, Jacob P 3 rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. Pharmacol Rev 2005; 57(1):79-115.
4. FDA U.S. Food and Drug Administration. Tobacco products.  
[URL: [http://www.fda.gov/TobaccoProducts/Labeling/ucm259214.htm#Selection\\_Process](http://www.fda.gov/TobaccoProducts/Labeling/ucm259214.htm#Selection_Process)]  
(dostop: 16.8. 2011)
5. Shabab L. The epidemiology of smoking: a growing concern. New advances in smoking cessation. Hot Topics in Respiratory Medicine. London: 2008; Issue 8; ISBN 1973-9664.
6. med.over.net  
[URL: <http://med.over.net/zasvojenost/kajenje.php>], (dostop: 7.8.2011)
7. Koprivnikar H. Zdravstveni delavci in nadzor nad tobakom: Informacije za zdravstvene delavce. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja RS, 2005; 18.str.
8. World health organisation: Warning about the dangers of tobacco. WHO report on the global tobacco epidemic; 2011. 158 str.  
[URL: [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2011/en/](http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/) ], (dostop: 17.9.2011)
9. Čakš T. Raba tobaka skozi čas. Pasivno kajenje. Vita, december 2005; št. 50.  
[URL: <http://www.revija-vita.com/index.php?page=4&leto=2005> ], (dostop: 7.8.2011)
10. Benowitz NL. Nicotine addiction. Mechanisms of disease. N Engl J Med 2010; 362; 24.
11. ENSP – European network for smoking and tobacco prevention. Slovenia network for smoking prevention.  
[URL: <http://www.ensp.org/slovenia> ], (dostop: 17.8.2011)
12. Mackay J, Ericksen P. M. The Tobacco Atlas. World Health Organization. Mayriad Editions Limited. Brighton, UK: 2002, ISBN 92 4156 209 9. 128 str.  
[URL: <http://books.google.com/books?id=BqNIwTkoYOoC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> ], (dostop: 30.8.2011)
13. Zakon o omejevanju uporabe tobačnih izdelkov (uradno prečiščeno besedilo) (ZOUTI-UPB3). Oktober 2007. Državni zbor RS, Uradni list RS, št. 93/2007, str. 12483.  
[URL: <http://www.uradni-list.si/1/content?id=82581> ], (dostop: 7.8.2011)
14. Wikipedia, the free encyclopedia.



[URL: <http://en.wikipedia.org> ]

15. Rotar Pavlič D. Življenski slog: brez cigarete. Ljubljana: Društvo za zdravje srca in ožilja Slovenije: 2007. ISBN 978 961 6639 01 9;16. str.

16. Tobacco.org. Tobacco news and information.

[URL:[http://www.tobacco.org/resources/history/Tobacco\\_History16.html](http://www.tobacco.org/resources/history/Tobacco_History16.html)],

(dostop:7.8.2011)

17. Slovenska zveza za tobačno kontrolo in javno zdravje.

[URL:<http://www.tobak-zveza.si/default.asp?lang=sl&tip=vsebina&str=119>]

(dostop: 26.9.2011)

18. Yeh CC, Graham Barr R, Powell CA, Mesia-Vela S, Wang Y, Hamade NK, Austin JH, Santella RM. No effect of cigarette smoking dose on oxidized plasma proteins. Environ Res. 2008 Feb;106(2):219-25. Epub 2007; 9. [PubMed]

19. Gehricke J-G, Potkin SG, Leslie FM, Loughlin SE, Whalen CK, Jamner LD, Mbogori J., Fallon JH. Nicotine - induced brain metabolism associated with anger. Behavioral and brain functions 2009; 5:19.

20. Parrington T. How Smoking changes metabolism. eHow...

[URL:<http://www.ehow.com/about5492491smokingchangesmetabolism.html#ixzz1JI03PboJ>], (dostop: 14.6.2011)

21. Dempsey D, Peyton J III, Benowitz NL. Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. JPET 2002; 301(2): 594-598.

22. Llaquet H, Pichini S, Joya X, Papaseit E, Vall O, Klein J, Garcia AO. Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood. Anal Bioanal Chem 2010; 396(1):379-399.

23. Tuomi T, Johnsson T, Reijula K. Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC – Tandem Mass Spectrometry. Clinical Chemistry 1999; 45: 2164-2172.

24. Matsumoto A, Ino T, Ohta M, Otani T, Hanada S, Sakuraoka A, Matsumoto A, Ichiba M, Hara M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of nicotine metabolites. Environ Health Prev Med 2010; 15(4): 211-216.

25. Nagano T, Shimizu M, Kiyotani K, Kamataki T, Takano R, Murayama N, Shono F, Yamazaki H. Biomonitoring of urinary cotinine concentrations associated with plasma levels of nicotine metabolites after daily cigarette smoking in a male Japanese population. Int J Environ Res Public Health 2010; 7(7):2953-2964.

26. Brčić KI. Nikotin i kotinin kod djece izložene pasivnom pušenju i poremećaji funkcije pluća. Doktorska disertacija. Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Sveučilište Zagrebu 2010; 126 str.
27. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3 rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 2009; (192):29-60.
28. IPCS (International programme on chemical safety), INCHEM.  
[URL: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm>], (dostop: 17.8.2011)
29. Polito RJ. Nicotine Adiction 101. WhyQuit.com.  
[URL: <http://whyquit.com/whyquit/LinksAAddiction.html> ], (dostop: 9.6. 2011)
30. Moyer TP, Charlson JR, Enger RJ, Dale LC, Ebbert JO, Schroeder DR, Hurt RD. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolite, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin Chem* 2002; 48(9): 1460-71.
31. Husgafvel PK. Biomarkers in the assessment of exposure and the biological effects of environmental tobacco smoke. *Scand J World Environ Health* 2002; 28(2):21 – 29 .
32. Nicotine. Item detail – flipper e nuvola <sup>beta</sup>  
[URL: <http://flipper.diff.org/app/items/info/1136> ], (dostop: 21 .9. 2011)
33. Nicotine & Metabolism. LIVESTRONG <sup>SM</sup>.com.  
[URL: <http://www.livestrong.com/article/394619-nicotine-metabolism/>], (dostop:19.9. 2011)
34. Bao Z, He XY, Ding X, Prabhu S, Hong JY. Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(2):258-61.
35. Wang XL, Scott DA. Molecular mechanisms of tobacco- induced diseases. Nova Science Publishers, Inc. 2005. ISBN 1-59454-514-6; str. 1-22.  
[URL: <http://books.google.com> ], (dostop: 7.9. 2011)
36. Al - Delaimy WK. Hair as a Biomarker for Exposure to Tobacco Smoke. *Tob Control* 2002; 11:176-182.
37. Wall MA, Johnson J, Jacob P, Benowitz NL. Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers. *Am J Public Health* 1988;78(6):699-701.
38. Cotinine test.com.  
[URL: <http://www.cotinetest.com/> ], (dostop: 11.9. 2011)

39. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. Environ Health Perspect 1999;107(2): 349-355.
40. Jatlow P, Mc – Kee S, O' Malley SS. Correction of urine cotinine concentrations for creatinine excretion: Is it useful? Clin Chem 2003;49:1932-34.
41. Cotinine. Urine cotinine test - cotinine urine test, preparation and procedure to conduct urine cotinine test. Medical Health Tests.  
[URL: <http://www.medicalhealthtests.com> ], (dostop: 20.8.2011)
42. Roche D, Callais F. Reungoat P. Momas I. Adaptation of an enzyme immunoassay to assess urinary cotinine in nonsmokers exposed to tobacco smoke. Clin Chem 2001;47:950-952.
43. Piskar M. Priporočeni postopek za odvzem venske krvi. Slovensko združenje za klinično kemijo. Ljubljana, 1999
44. Creatinine Jaffe method. Instruction manual (navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov). Roche/Hitachi 2007- 11, V 12.
45. Adaltis – Advanced laboratory diagnostic systems  
[URL: <http://www.adaltis.net/content/contact/default.htm> ], (dostop: 3.1.2012)
46. Calbiotech Cotinine ELISA Kit. Package Insert (navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov). Calbiotech Inc, 2008 - 12, V18.
47. Abraxis Cotinine ELISA (Microtiter Plate). Package Insert (navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov). Abraxis LLC, R081108.  
[URL: <http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN515565USER.pdf> ], (dostop: 3.1.2012)
48. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. Epidemiol Rev 1996; 18(2).
49. Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. Pharmacological Reports 2005; 57:143-153.
50. Foundation for blood research (FBR). Cotinine testing frequently asked questions.  
[URL: <http://www.fbr.org/publications/pamphlets/cotininefaq.html> ], (dostop: 17.12.2011)

## 8 PRILOGE

*Priloga 1: Rezultati meritev koncentracij kotinina v vzorcih urina nekadilcev (NK)*

| št.vz. | oznaka vz. | spol | starost | kotinin             | kreatinin | kot./kreat.                   |
|--------|------------|------|---------|---------------------|-----------|-------------------------------|
|        |            |      | [leta]  | [ $\mu\text{g/l}$ ] | [mmol/l]  | [ $\mu\text{g}/\text{mmol}$ ] |
| 1      | 1 NK-1     | M    | 56      | 0,00                | 7,4       | 0,00                          |
| 2      | 2 NK-1     | Ž    | 26      | 1,00                | 5,5       | 0,18                          |
| 3      | 3 NK-1     | Ž    | 62      | 1,20                | 3,7       | 0,32                          |
| 4      | 4 NK-1     | M    | 28      | 1,10                | 6,9       | 0,16                          |
| 5      | 5 NK-1     | Ž    | 35      | 0,82                | 11,3      | 0,07                          |
| 6      | 6 NK-1     | Ž    | 59      | 0,88                | 8,3       | 0,11                          |
| 7      | 7 NK-1     | Ž    | 56      | 0,30                | 2,3       | 0,13                          |
| 8      | 8 NK-1     | M    | 42      | 3,10                | 14,1      | 0,22                          |
| 9      | 9 NK-1     | Ž    | 46      | 1,00                | 7,3       | 0,13                          |
| 10     | 10 NK-1    | M    | 52      | 2,55                | 11,2      | 0,22                          |

*Legenda: NK-1 – jutranji urin*

*Priloga 2: Rezultati meritev koncentracij kotinina v vzorcih urina pasivnih kadilcev (PK)*

| št.vz. | oznaka vz. | spol | starost | čas       | kotinin             | kreatinin | kot./kreat.                   |
|--------|------------|------|---------|-----------|---------------------|-----------|-------------------------------|
|        |            |      | [leta]  | izpost.TD | [ $\mu\text{g/l}$ ] | [mmol/l]  | [ $\mu\text{g}/\text{mmol}$ ] |
| 1      | 1 PK-1     | Ž    | 22      | 22 let    | 4,83                | 36,2      | 0,13                          |
| 2      | 1 PK-2     | Ž    | 22      | 22 let    | 2,76                | 14,2      | 0,19                          |
| 3      | 1 PK-3     | Ž    | 22      | 22 let    | 3,04                | 19,1      | 0,16                          |
| 4      | 2 PK-1     | Ž    | 62      | (3ure)    | 0,00                | 3,8       | 0,00                          |
| 5      | 2 PK-2     | Ž    | 62      | (3ure)    | 4,32                | 7,7       | 0,56                          |
| 6      | 2 PK-3     | Ž    | 62      | (3ure)    | 3,18                | 3,7       | 0,86                          |
| 7      | 2 PK-4     | Ž    | 62      | (3ure)    | 8,58                | 5,4       | 1,59                          |
| 8      | 3 PK-1     | M    | 56      | (3ure)    | 0,00                | 10,9      | 0,00                          |
| 9      | 3 PK-2     | M    | 56      | (3ure)    | 3,89                | 13,9      | 0,28                          |
| 10     | 3 PK-3     | M    | 56      | (3ure)    | 2,07                | 5,3       | 0,39                          |
| 11     | 3 PK-4     | M    | 56      | (3ure)    | 2,17                | 6,7       | 0,32                          |
| 12     | 4 PK-1     | Ž    | 24      | 24 let    | 0,00                | 5,5       | 0,00                          |
| 13     | 4 PK-2     | Ž    | 24      | 24 let    | 1,21                | 1,6       | 0,76                          |
| 14     | 4 PK-3     | Ž    | 24      | 24 let    | 0,94                | 1,0       | 0,94                          |

*Legenda: 1 in 4 PK-1 – jutranji urin, PK-2 – opoldanski urin, PK-3 – večerni urin;  
2 in 3 PK-1 – prvi urin, PK-2 – drugi urin, PK-3 – tretji urin, PK-4 – četrti urin*

**Priloga 3: Rezultati meritev koncentracij kotinina v vzorcih urina kadilcev (KA)**

| št. vz. | oznaka vzorca | spol | starost<br>[leta] | kajenje<br>[leta] | št.cig./dan | nikotin/cig.<br>[mg] | nikotin/dan<br>dan [mg] | kotinin<br>[µg/l] | kreatinin<br>[mmol/l] | kotinin/kreatinin<br>[µg/mmol] |
|---------|---------------|------|-------------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1       | 1 KA-1        | Ž    | 38                | 18                | 8           | 0,3                  | 2,4                     | 105,38            | 19,9                  | 5,30                           |
| 2       | 1 KA-2        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 54,04             | 4,4                   | 12,28                          |
| 3       | 1 KA-3        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 101,94            | 12,9                  | 7,90                           |
| 4       | 1 KA-24ur     | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 64,24             | 14,3                  | 4,49                           |
| 5       | 2 KA-1        | Ž    | 63                | 40                | 25          | 0,1                  | 2,5                     | 866,12            | 4,8                   | 180,44                         |
| 6       | 2 KA-2        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 1003,68           | 5,9                   | 170,12                         |
| 7       | 2 KA-3        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 1741,56           | 11,0                  | 158,32                         |
| 8       | 3 KA-1        | Ž    | 39                | 13                | 8           | 0,1                  | 0,8                     | 385,28            | 9,6                   | 40,13                          |
| 9       | 3 KA-2        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 443,52            | 13,5                  | 32,85                          |
| 10      | 3 KA-3        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 555,44            | 14,8                  | 37,53                          |
| 11      | 3 KA-24ur     | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 154,66            | 9,2                   | 16,81                          |
| 12      | 4 KA-1        | Ž    | 49                | 30                | 20          | 0,1                  | 2,0                     | 117,84            | 1,5                   | 78,56                          |
| 13      | 4 KA-2        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 396,04            | 4,1                   | 96,60                          |
| 14      | 4 KA-3        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 710,92            | 10,7                  | 66,44                          |
| 15      | 4 KA-24ur     | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 539,48            | 11,9                  | 45,33                          |
| 16      | 5 KA-1        | M    | 42                | 18                | 20          | 0,4                  | 8,0                     | 1498,80           | 11,1                  | 135,03                         |
| 17      | 5 KA-2        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 1195,60           | 11,3                  | 105,81                         |
| 18      | 5 KA-3        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 1319,44           | 8,0                   | 164,93                         |
| 19      | 5 KA-24ur     | M    |                   |                   |             |                      |                         | 1150,12           | 25,8                  | 44,58                          |
| 20      | 6 KA-1        | Ž    | 54                | 33                | 15          | 0,8                  | 12,0                    | 279,69            | 1,3                   | 215,15                         |
| 21      | 6 KA-2        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 2662,20           | 18,4                  | 144,68                         |
| 22      | 6 KA-3        | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 1224,80           | 10,3                  | 118,91                         |
| 23      | 6 KA-24ur     | Ž    |                   |                   |             |                      |                         | 954,60            | 3,9                   | 244,77                         |
| 24      | 7 KA-1        | M    | 60                | 31                | 40          | 0,3                  | 12,0                    | 492,44            | 4,6                   | 107,05                         |
| 25      | 7 KA-2        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 571,92            | 4,1                   | 139,49                         |
| 26      | 7 KA-3        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 535,56            | 3,7                   | 144,75                         |
| 27      | 7 KA-24ur     | M    |                   |                   |             |                      |                         | 711,84            | 14,2                  | 50,13                          |
| 28      | 8 KA-1        | M    | 59                | 41                | 20          | 0,8                  | 16,0                    | 252,64            | 13,7                  | 18,44                          |
| 29      | 8 KA-2        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 294,46            | 13,2                  | 22,31                          |
| 30      | 8 KA-3        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 224,28            | 12,1                  | 18,54                          |
| 31      | 8 KA-24ur     | M    |                   |                   |             |                      |                         | 158,36            | 16,0                  | 9,90                           |
| 32      | 9 KA-1        | M    | 52                | 33                | 40          | 0,6                  | 24,0                    | 666,64            | 7,1                   | 93,89                          |
| 33      | 9 KA-2        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 1494,90           | 4,8                   | 311,44                         |
| 34      | 9 KA-3        | M    |                   |                   |             |                      |                         | 2483,20           | 7,6                   | 326,74                         |
| 35      | 10 KA-1       | M    | 52                | 30                | 40          | 0,1                  | 4,0                     | 5454,20           | 19,3                  | 282,60                         |
| 36      | 10 KA-2       | M    |                   |                   |             |                      |                         | 2614,20           | 14,1                  | 185,40                         |
| 37      | 10 KA-3       | M    |                   |                   |             |                      |                         | 6321,20           | 19,0                  | 332,69                         |

**Legenda:** K-1 – jutranji urin, KA-2 – opoldanski urin, KA-3 – večerni urin, KA-24ur – dnevni urin

**Priloga 4:** Rezultati meritev koncentracij kotinina v vzorcih urina in seruma kadilke abstinentke (KAB)

| št. vz. | oznaka vz.  | kotinin             | kreatinin           | kotin./kreat.                 | % izločanja | $t_{1/2}$  |
|---------|-------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|-------------|------------|
|         |             | [ $\mu\text{g/l}$ ] | [ $\text{mmol/l}$ ] | [ $\mu\text{g}/\text{mmol}$ ] | kotininina. | kotininina |
| 1       | KAB U-1.dan | 583,50              | 13,20               | 44,20                         | /           | /          |
| 2       | KAB U-2.dan | 388,10              | 21,93               | 17,70                         | 40,00       | 20,00      |
| 3       | KAB U-3.dan | 112,70              | 16,12               | 6,99                          | 15,80       | 21,37      |
| 4       | KAB U-4.dan | 55,58               | 14,26               | 3,90                          | 8,80        | 23,03      |
| 5       | KAB U-5.dan | 21,82               | 14,16               | 1,54                          | 3,50        | 23,32      |
| 6       | KAB S-1.dan | 11,20               | /                   | /                             | /           | /          |
| 7       | KAB S-2.dan | 5,47                | /                   | /                             | 48,84       | 23,45      |
| 8       | KAB S-3.dan | 2,42                | /                   | /                             | 21,61       | 22,96      |
| 9       | KAB S-4.dan | 2,03                | /                   | /                             | 18,13       | 25,65      |
| 10      | KAB S-5.dan | 1,88                | /                   | /                             | 16,79       | 27,04      |

**Legenda:** KAB U-1. dan – kadilec abstinent, urin, 1. dan; KAB S-1.dan – kadilec abstinent, serum, 1. dan