

Ewa FLOREK¹
 Ewa IGNATOWICZ²
 Anna NOWAKOWSKA¹
 Wojciech PIEKOSZEWSKI³
 Maksymilian KULZA¹
 Antonella SAIJA⁴
 Marek CHUCHRACKI^{5,6}
 Monika SEŃCZUK-PRZYBYŁOWSKA¹
 Lucyna KRAMER⁷

¹Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik Laboratorium:
 Prof. dr hab. Ewa Florek

²Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik Katedry:
 Prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska

³Zakład Chemii Analitycznej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
 Kierownik Zakładu:
 Prof. dr hab. Paweł Kościelniak

⁴Dipartimento Farmaco-Biologico, Facoltà di Farmacia, Università di Messina, Italy
 Kierownik: Prof. Antonella Saija

⁵Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik: Prof. dr hab. med. Tomasz Opala

⁶Centralna Laboratorium GPSK, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik: Dr n. farm. Marek Chuchracki

⁷Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik Katedry:
 Prof. dr hab. n. med. Jerzy Moczko

Dodatkowe słowa kluczowe:

palenie tytoniu
 alkohol
 peroksydacja lipidów
 szczury

Additional key words:

tobacco smoking
 alcohol
 lipid peroxidation
 rats

Adres do korespondencji:
 Prof. dr hab. Ewa Florek
 Laboratorium Badań Środowiskowych
 Katedra i Zakład Toksykologii
 Uniwersytet Medyczny
 im. Karola Marcinkowskiego
 60-631 Poznań, ul. Dojazd 30
 Tel. (+61) 847 20 81
 Fax (+61) 847 20 81 w. 157
 e-mail: eflorek@ump.edu.pl

Wpływ łącznego narażenia na alkohol i dym tytoniowy na peroksydację lipidów u szczurów

Effect of combined exposure to ethanol and tobacco smoke on lipid peroxidation in rats

Najczęściej osoby uzależnione od alkoholu są również palaczami. W pracy oceniono wpływ łącznego narażenia na alkohol i dym tytoniowy u szczurów uzależnionych od alkoholu. Uzależnienie od alkoholu i jego obecność we krwi nie wpływa na poziom kotyniny, co wskazuje na brak wpływu tego czynnika na metabolizm nikotyny. Podobnie enzymy świadczące o uszkodzeniu wątroby (AspAT, AIAT, ALP) nie ulegają zmianie, co wskazuje, że zastosowany model uzależnienia i narażenia na dym tytoniowy nie wykazują działania hepatotoksycznego. Łączne narażenie na alkohol (uzależnienie od alkoholu) i dym tytoniowy zwiększa peroksydację lipidów w mózgu, wątrobie i płucach, natomiast obniża w surowicy. W przypadku nerek otrzymane wyniki nie są jednoznaczne.

Wstęp

Palenie tytoniu i spożywanie alkoholu to dwa nałogi, które od lat stanowią istotny problem zagrożenia ludzkiego zdrowia i życia. Najczęściej osoby uzależnione od alkoholu są również palaczami tytoniu. Z danych literaturowych wynika, że większy jest procent palących alkoholików (80-95%), w porównaniu z osobami niepijącymi lub pijącymi okazjonalnie (25-30%). Mechanizmy prowadzące do rozwinięcia uzależnienia mogą być podobne dla alkoholu i nikotyny. Niektóre czynniki, takie jak stres, rozwój tolerancji i wrażliwość na powyższe ksenobiotyki, mogą jeszcze uzależnienie wzmacniać [5,7].

Dym tytoniowy i alkohol etylowy posiadają zdolność indukcji syntezy reaktywnych form tlenu (RFT), które w znacznym stopniu wpływają na toksyczność tych ksenobiotyków. Niekontrolowany wzrost produkcji reaktywnych form tlenu prowadzi do stresu oksydacyjnego. Stan ten charakteryzuje się przewagą procesów prooksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi i objawia się tlenowymi uszkodzeniami białek, polisacharydów, lipidów i DNA. Skutkiem stresu oksydacyjnego może być obniżenie odporności, zmiany chorobowe i szybsze starzenie się organizmu [12]. Szczególnym uszkodzeniem tlenowym jest peroksydacja lipidów; zachodzi ona zarówno pod wpływem dymu tytoniowego, jak i w czasie metabolizmu alkoholu [10,13]. Proces ten polega na utlenianiu wienionenasycenych kwasów tłuszczowych,

Usually, alcohol addicted persons smokes cigarettes. In the study, the effect of combined exposure to alcohol and tobacco smoke in alcohol addicted rats on liver peroxidation was evaluated. Alcohol abuse and its presence in blood did not influence the cotinine level, what indicates the lack of the importance of this factor in nicotine metabolism. Similarly, enzymatic markers of liver damage (AspAT, AIAT, ALP) did not change, what showed lack of hepatotoxic effect studied compounds in applied model of alcohol addiction and tobacco smoke exposure. Combined exposure to alcohol and tobacco smoke increases the level of lipid peroxidation in brain, liver and lungs however decreases in serum. In kidneys the results are not unambiguous.

będących podstawowymi składnikami błon biologicznych [1]. Reakcje te zachodzą zarówno na drodze nieenzymatycznej, jak i w wyniku przemian enzymatycznych, z utworzeniem wielu reaktywnych produktów.

Głównymi produktami peroksydacji lipidów są aldehydy: dimalonowy (MDA) i 4-hydroksynonylowy (HNE) [16]. W ocenie działania peroksydacyjnego ksenobiotyków, mikroorganizmów i w przebiegu schorzeń najczęściej wykorzystywane jest badanie poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, thiobarbituric acid reactive species) ze względu na prostotę wykonania. Aldehydowe produkty peroksydacji lipidów tworzą barwny kompleks z kwasem tiobarbiturowym, oznaczany spektrofotometrycznie lub fluorometrycznie [4,8,9].

Celem badań była ocena wpływu łącznego działania alkoholu etylowego i dymu tytoniowego u szczurów uzależnionych od alkoholu na proces peroksydacji lipidów w różnych narządach.

Materiał i metodyka

Protokół eksperymentu na zwierzętach został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu, Uchwała nr 2/2008.

Zwierzęta i przebieg ekspozycji

Szczury samce szczepu Wistar o masie ciała 240 ± 20 g pochodziły z hodowli w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Zwierzęta przetrzymywano w klatkach polietylenowych zawierających wióry z drzew

liściastych i karmiono standardową paszą dla zwierząt laboratoryjnych z nieograniczonym dostępem do wody. Temperatura otoczenia wynosiła 20-22°C, wilgotność 50-60%, a oświetlenie było regulowane w cyklu 12 godzin światło/12 godzin ciemność.

Uzależnianie szczurów od alkoholu

W celu uzależnienia szczurów od alkoholu podawano im alkohol etylowy według schematu:

Tydzień I - zwierzęta otrzymywały do picia 10% roztwór etanolu.

Tydzień II - IV - zwierzęta otrzymywały do picia do wyboru wodę lub etanol.

Tydzień V - zwierzęta otrzymywały do picia do wyboru wodę lub etanol, prowadzono pomiar spożytego płynu.

Tydzień VI-VII - zwierzęta otrzymywały do picia wodę.

Tydzień VIII - zwierzęta otrzymywały do picia do wyboru wodę lub etanol, prowadzono pomiar spożytego płynu.

Tydzień IX - zwierzęta otrzymywały do picia do wyboru wodę lub etanol, prowadzono pomiar spożytego płynu. Na podstawie pomiaru ilości wypijanych płynów podzielono zwierzęta na uzależnione od etanolu, preferujące i nieuzależnione. Zwierzęta preferujące alkohol wyłączone z badań.

Podział szczurów na grupy

Szczury uzależnione od alkoholu podzielono na 3 grupy po 6 zwierząt w każdej grupie.

Grupa I - szczury uzależnione od alkoholu poddane ekspozycji na dym tytoniowy.

Grupa II - szczury uzależnione od alkoholu, którym podano jednorazowo sondą dożołądkowo roztwór 10% alkoholu etylowego w dawce 2 g/kg m.c.

Grupa III - szczury uzależnione od alkoholu, które zostały poddane ekspozycji na dym tytoniowy, a po zakończeniu ekspozycji zwierzętom podano jednorazowo sondą dożołądkowo roztwór 10% alkoholu etylowego w dawce 2g/kg m.c.

Ekspozycja szczurów na dym tytoniowy

Zwierzęta z grupy I i III umieszczone zostały w komorze toksykologicznej [3]. Ekspozycję prowadzono przez 5 dni, po 6 godzin dziennie. Papierosy marki "Poznańskie", bez filtra, po 20 sztuk w opakowaniu (Imperial Tobacco Polska S.A.) o deklarowanej przez producenta zawartości substancji smolistych - 10 mg, nikotyny - 0,9 mg i tlenu węgla - 8 mg w dymie z jednego papierosa, umieszczane były w urządzeniu do spalania. Zawartość tlenu węgla w powietrzu komory kontrolowano i utrzymywano na poziomie 1500 mg/m³.

Materiał do badań

Po upływie 3 godzin od zakończenia ekspozycji na dym tytoniowy (grupa I) i po upływie 3 godzin od podania alkoholu (grupa II i III) szczury uśmiercano przez podanie domięśniowo ksylazyny (40 mg/kg m.c.) z ketaminą (5 mg/kg m.c.). Pobrano krew z serca do próbek bez antykoagulantów oraz narządy: wątrobę, nerki, płuca i mózg.

Homogenizację tkanek przeprowadzono w homogenizatorze T25 basic, firmy Kika Labortechnik. Homogenaty wirowano przez 10 minut przy 6000 obrotów/min. Następnie zebrano nadsącz do badań. Krew wirowano w analogicznych warunkach. Oddzielone przez wirowanie surowicę i homogenaty zamrażano w temp. -80°C do czasu wykonania badań biochemicznych.

Oznaczenie kotyniny

Kotyninę oznaczano metodą enzymoimmunologiczną z zastosowaniem testu Cotinine Direct Elisa (Bio-Quant, USA), którą wcześniej zaadaptowano i zwalidowano w Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [17]. Zastosowana metoda cechowała się dużą specyficznością i czułością - limit wykrywalności wynosił 1 ng/ml, współczynnik zmienności w ciągu dnia i pomiędzy dniami był niższy od 10%. Białko w surowicy i homogenatach otrzymanych z narządów oznaczano metodą Lowry (piśmiennictwo). Poziom TBARS oceniono stosując metodę kolorymetryczną: do 100 ml badanego materiału (surowica, homogenat) dodano 0,9 ml buforu fosforanowego o pH=7,4 i inkubowano 60 minut w temperaturze 37°C. Następnie do każdej próbki do-

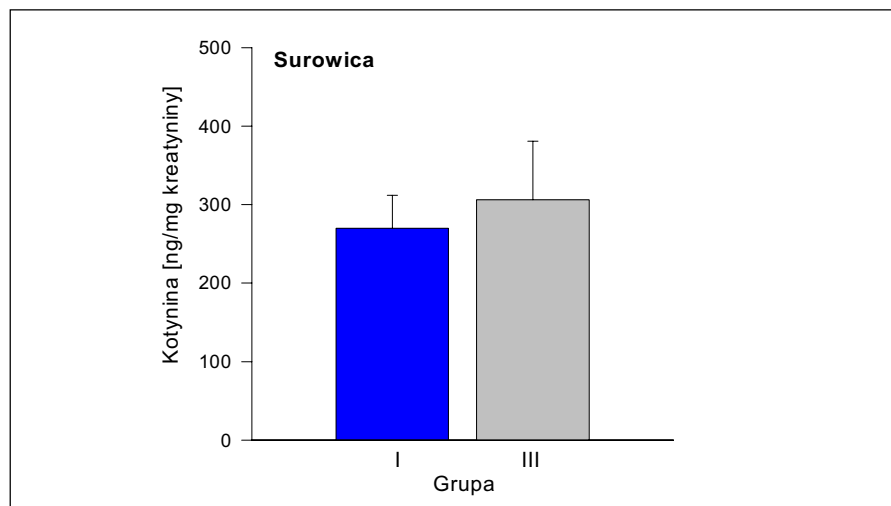
Tabela I

Stężenie białka w surowicy i narządach w badanych grupach zwierząt.

Concentration of protein in serum and organs in studied groups.

Grupa	Narząd	Białko [mg/g(ml)]			
		Średnia [#]	SD	Minimum	Maksimum
Grupa I	Surowica	49,96	3,63	44,76	54,84
	Wątroba	32,75	5,65	27,06	43,35
	Mózg	28,80	7,95	22,49	40,18
	Płuca	75,10	6,42	50,34	68,21
	Nerki	38,52	17,20	11,88	51,61
Grupa II	Surowica	54,81	4,42	51,62	57,73
	Wątroba	25,04*	4,77	18,36	30,82
	Mózg	23,39	6,79	12,84	32,67
	Płuca	26,46*	6,65	14,60	32,67
	Nerki	34,16	10,50	22,76	52,05
Grupa III	Surowica	55,93	3,63	52,50	60,32
	Wątroba	23,78*	4,61	17,88	29,94
	Mózg	15,17*	2,12	12,80	18,71
	Płuca	28,55*	4,18	23,93	34,82
	Nerki	30,26	6,08	23,10	39,17

Objaśnienia: * różnica statystycznie znamienna w stosunku do Grupy I; # średnia z 6 pomiarów



Rycina 1

Średnie stężenia kotyniny w surowicy zwierząt w Grupach I i III. Objasnienia grup w rozdziale Materiał i metody.

Mean concentration of cotinine in serum of rats from group I and III. Description of the groups is present in Materials and methods chapter.

dano po 1 ml przygotowanej bezpośrednio przed użyciem mieszaniny kwasu tiobarbiturowego, trichlorooctowego i solnego i ogrzewano w łaźni wodnej przez 15 minut, w temperaturze 95°C. Po oziębieniu wirowano przez 15 minut przy 3000 rpm, następnie zmierzono absorbancję nadsączu przy długości fali = 532 nm wobec próby odniesienia (bufor fosforanowy zamiast materiału badanego). Oznaczenie aminotransferazy asparaginowej (AspAT), alaninowej (AlAT) i fosfatazy alkalicznej wykonano w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, przy użyciu analizatora biochemicznego COBAS INTEGRA.

Analiza statystyczna wyników

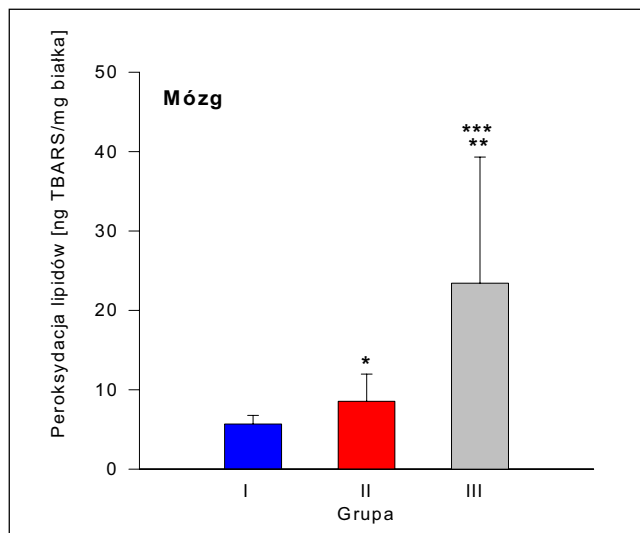
Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica PL v..0. Do analizy różnic pomiędzy grupami wykorzystano analizę wari-

cji (test *Shapiro-Wilka*) i homogeniczność wariancji (test *Levene'a*), a następnie zastosowano test *post-hoc Tukey'a*.

Wyniki i dyskusja

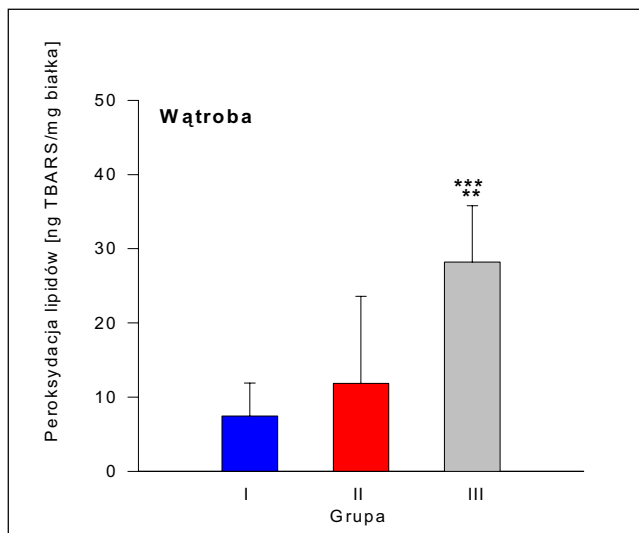
Kotynina jest podstawowym metabolitem nikotyny i jej poziom w organizmie odzwierciedla stopień narażenia na dym tytoniowy. W niniejszych badaniach, u szczurów eksponowanych na dym (grupa I i III) stężenie kotyniny w surowicy było wysokie i sięgało 300 ng/ml (rycina 1). U zwierząt tych nie wykazano wpływu uzależnienia alkoholowego i zawartości alkoholu we krwi na poziom kotyniny.

Oznaczenie białka w badanych próbach



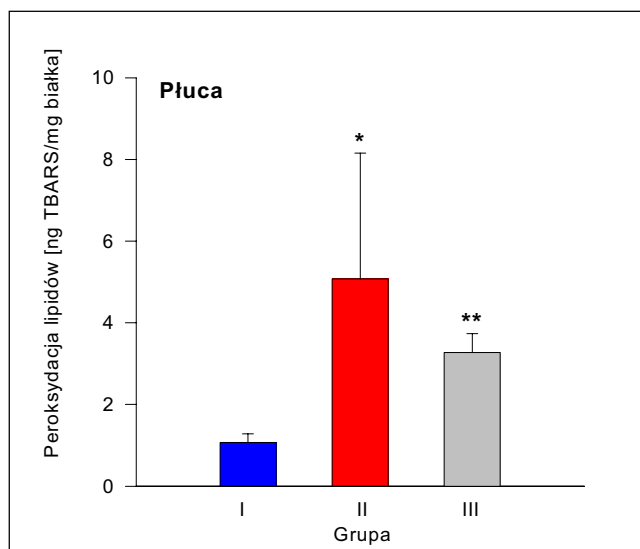
Rycina 2
Poziom peroksydacji lipidów w mózgu szczurów w grupach I, II, III. Objaśnienia grup w rozdziale Materiał i metodyka. * - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i II, $p < 0,05$; ** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i III, $p < 0,05$; *** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą II i III, $p < 0,05$.

Level of lipid peroxidation in rats' brain. Description of the groups is present in Materials and methods chapter. * - $p < 0.05$ group I vs. Group II; ** - $p < 0.05$ group I vs. Group III; *** - $p < 0.05$ group II vs. Group III.



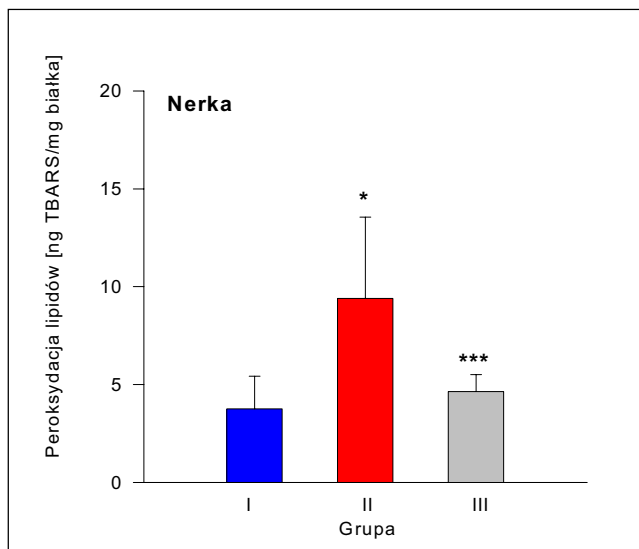
Rycina 3
Poziom peroksydacji lipidów w wątrobie szczurów w grupach I, II, III. Objaśnienia grup w rozdziale Materiał i metodyka. ** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i III; *** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą II i III.

Level of lipid peroxidation in rats' liver. Description of the groups is present in Materials and methods chapter. ** - $p < 0.05$ group I vs. Group III; *** - $p < 0.05$ group II vs. Group III.



Rycina 4
Poziom peroksydacji lipidów w płucach szczurów w grupach I, II, III. Objaśnienia grup w rozdziale Materiał i metodyka. * - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i II; ** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i III.

Level of lipid peroxidation in rats' lung. Description of the groups is present in Materials and methods chapter. * - $p < 0.05$ group I vs. group II; *** - $p < 0.05$ group II vs. group III.



Rycina 5
Poziom peroksydacji lipidów w nerkach szczurów w grupach I, II, III. Objaśnienia grup w rozdziale Materiał i metodyka. * - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą I i III; ** - różnica statystycznie znamiennej pomiędzy grupą II i III.

Level of lipid peroxidation in rats' kidney. Description of the groups is present in Materials and methods chapter. * - $p < 0.05$ group I vs. group II; *** - $p < 0.05$ group II vs. group III.

miało na celu przede wszystkim umożliwienie przeprowadzenia normalizacji oznaczeń aldehydu dimalonowego w homogenatach, jednak stwierdzono różnice statystycznie znamienne pomiędzy średnimi stężeniami białka w poszczególnych grupach (tabela I).

Poziom białka był niższy w wątrobie i płucach w grupie II (po podaniu alkoholu) i III (narażonych na dym tytoniowy i po podaniu alkoholu) w porównaniu z grupą I (narażona wyłącznie na dym tytoniowy), dodatkowo obniżeniu uległ również poziom białka w mózgu zwierząt z grupy III.

Tkankami najbardziej wrażliwymi na

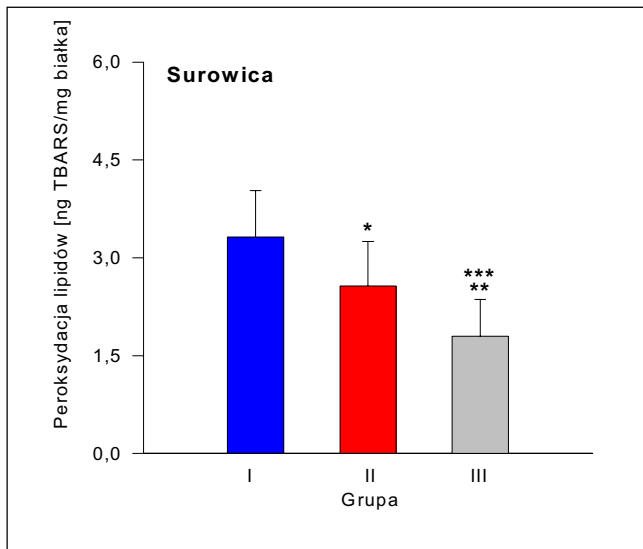
działanie dymu tytoniowego i alkoholu były mózg i wątroba (rycina 2 i 3), gdzie poziom TBARS w grupie III (łączna ekspozycja na dym i alkohol) znamienne przekraczała wartości uzyskane w grupach I (ekspozycja tylko na dym) i II (ekspozycja tylko na alkohol).

Wzrost poziomu peroksydacji lipidów w wątrobie pod wpływem etanolu (grupa II) może mieć związek ze spadkiem stężenia lipofilowych antyoksydantów w tej tkance, tokoferolu i koenzymu Q10 [14]. Również wysoka zawartość metali przejściowych (żelaza i miedzi) w wątrobie, uwalniających się

pod wpływem łącznego działania składników dymu i metabolitów alkoholu, może wpływać na poziom peroksydacji lipidów.

Wysokie stężenie TBARS w mózgu szczurów ekspozowanych łącznie na dym i alkohol potwierdzają wnioski płynące z pracy Qiao i wsp. [11], gdzie Autorzy stwierdzają, że połączenie ekspozycji na dym tytoniowy z innym czynnikiem prooksydacyjnym silnie uszkadza tkankę mózgową.

W płucach zwierząt ekspozowanych wyłącznie na dym tytoniowy (grupa I) poziom peroksydacji lipidów jest najniższy w porównaniu z pozostałymi grupami (rycina 4).

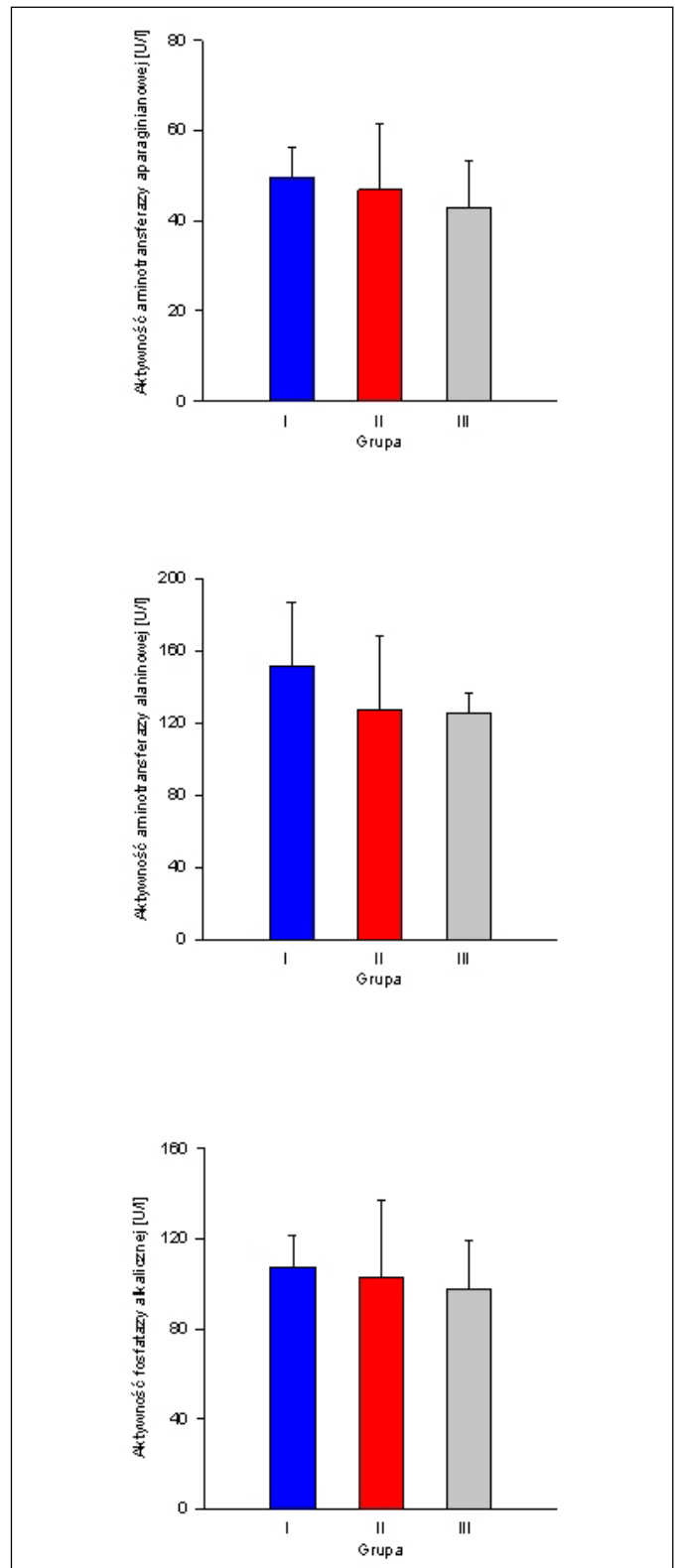


Rycina 6
Poziom peroksydacji lipidów w surowicy szczurów w grupach I, II, III. Objaśnienia grup w rozdziale Materiał i metodyka. * - różnica statystycznie znamienne pomiędzy grupą I i II; ** - różnica statystycznie znamienne pomiędzy grupą I i III; *** - różnica statystycznie znamienne pomiędzy grupą II i III.

Level of lipid peroxidation in rats' serum. Description of the groups is present in Materials and methods chapter. * - $p < 0.05$ group I vs. Group II; ** - $p < 0.05$ group I vs. Group III; *** - $p < 0.05$ group II vs. Group III.

Rycina 7
Aktywność transferazy asparaginianowej (A), alaninowej (B) i fosfatazy alkalicznej (C) w poszczególnych grupach zwierząt.

Activity of asparaginian aminotransferase (A), alanine aminotransferase (B), and alkaline phosphates (C) in studied groups.



Wynikać to może z faktu, że wdychanie dymu zwiększa aktywność endogennej obrony antyoksydacyjnej w tkance, która jest miejscem pierwszego kontaktu organizmu z substancjami toksycznymi i RFT zawartymi w dymie tytoniowym [2]. Przedstawione wyniki sugerują, że metabolizm alkoholu nie wpływa na mobilizację endogennych antyoksydantów w płucach (grupa II) lub wręcz ją znosi w przypadku równoczesnej ekspozycji z dymem tytoniowym (grupa III). Badania Jurczyk i wsp. [6] wykazały, że ekspozycja szczurów na alkohol etylowy zwiększa poziom TBARS w płucach, pomimo jednoczesnego wzrostu stężenia substancji zawierających grupy sulfhydrylowe, działających potencjalnie jako przeciwutleniacze.

W nerkach szczurów pod wpływem alkoholu etylowego wzrasta aktywność składników endogennej obrony antyoksydacyjnej, katalazy i peroksydazy glutationu [15], jednak wyniki badań własnych wykazują najwyższy poziom TBARS w grupie zwierząt ekspozowanych wyłącznie na alkohol (rycina 5).

Stężenie TBARS w surowicy osiąga najniższe wartości spośród wszystkich badanych tkanek.

U zwierząt ekspozowanych na dym tytoniowy poziom TBARS był najwyższy w porównaniu z grupą II i III. Poziom TBARS w surowicy odzwierciedla metabolizm oksy-

dacyjny w tkankach i narządach oraz ich wydalanie z moczem. Jak podają Tokarz i wsp. produkty peroksydacji lipidów pojawiają się w moczu po ekspozycji na dym tytoniowy [18].

Przeprowadzone oznaczenia enzymów wątrobowych: aminotransferazy asparaginowej, alaninowej i fosfatazy alkalicznej nie wykazały zmian na skutek łącznego narażenia na dym tytoniowy i podawanie alkoholu.

Wyniki tych oznaczeń przedstawiono w rycinie 7.

Podsumowując należy stwierdzić, że uzależnienie od alkoholu i jego obecność we krwi nie wpływa na poziom kotyniny, co wskazuje na brak wpływu tego czynnika na metabolizm nikotyny. Podobnie enzymy świadczące o uszkodzeniu wątroby (AspAT, AlAT, fosfataza alkaliczna) nie ulegają zmianie, co wskazuje, że zastosowany model uzależnienia i narażenia na dym tytoniowy nie wykazują działania hepatotoksycznego. Łączne narażenie na alkohol (uzależnienie od alkoholu) i dym tytoniowy zwiększa peroksydację lipidów w mózgu, wątrobie i płu-

cach, natomiast obniża w surowicy. W przypadku nerek otrzymane wyniki nie są jednoznaczne.

Piśmiennictwo

1. **Derejczyk J.**: Reakcje wolnorodnikowe i antyoksydanty. *Post. Nauk Med.* 1999, 12, 3.
2. **Florek E., Ignatowicz E., Wrzosek J., Piekoszewski W.**: Effect on rutin on total antioxidant status of rats exposed to cigarette smoke. *Pharmacol. Rep.*, 2005, 57, 84.
3. **Florek E., Marszałek A.**: An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999, 18, 272.
4. **Halliwell B., Chirico S.**: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 57, 715S.
5. **Howard L.A., Miksys S., Hoffmann E. et al.**: Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138, 1376.
6. **Jurczyk A.P., Barzdo M., Jankowska B. i wsp.**: Influence of selected alcohols on oxidative stress parameters in rat lungs. *Problems Forensic Sci.* 2003, 55, 50.
7. **Little H.J.**: Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Res. Health* 2000, 24, 215.
8. **Michel F., Bonnefont-Rousselot D., Mas E. et al.**: Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. *Ann. Biol. Clin.* 1998, 66, 605.
9. **Moore K., Roberts L.J. 2nd.**: Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 1998, 28, 659.
10. **Nagata K., Suzuki H., Sakaguchi S.**: Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J. Toxicol. Sci.* 2007, 32, 453.
11. **Qiao D., Seidler F.J., Slotkin T.A.**: Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 206, 17.
12. **Papas A.M.**: Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 1996, 31, 77.
13. **Pawlosky R.J., Salem N. Jr.**: Perspectives on alcohol consumption: liver polyunsaturated fatty acids and essential fatty acid metabolism. *Alcohol* 2004, 34, 27.
14. **Porta E.A.**: Dietary modulation of oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. *J. Nutr.* 1997, 127, 912S.
15. **Rodrigo R., Bosco C.**: Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006, 142, 17.
16. **Romero F.J., Bosch-Morell F., Romero J. et al.**: Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.* 1998, 106 Suppl 5, 1229.
17. **Stanek A., Piekoszewski W., Florek E. et al.**: Zastosowanie metody enzymoimmunologicznej do oznaczania kotyniny w moczu. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 734.
18. **Tokarz A., Jelińska M., Ozga A.**: Izoprostany - nowe biomarkery lipidowej peroksydacji in vivo. *Biul. Wydz. Farm. AMW*, 2004, 2.