

## URINARNI KOTININ KAO MARKER PASIVNOG PUŠENJA DUVANA

Ž. Saničanin, J. Hanjalić i R. Lončar

*Medicinski fakultet Univerziteta u Banjaluci, Banjaluka*

*Primljeno 19. X. 1990.*

Radi objektivizacije opasnosti pušenja roditelja po zdravlje njihove djece u 205 učenika oba spola, dobi 10–12 godina određena je, kolorimetrijskom metodom sa barbiturnom kiselinom (DBA), koncentracija kotinina u urinu. Dobiveni rezultati su korelirani sa podacima dobivenim iz ankete. Utvrđena je signifikantna razlika između srednje vrijednosti koncentracije kotinina za djecu roditelja nepušača (3,2  $\mu\text{mol/L}$ ) i djece u kojih puši jedan roditelj (5,8  $\mu\text{mol/L}$ ). Koncentracija kotinina je još veća ako puše oba roditelja (7,8  $\mu\text{mol/L}$ ) i najveća u djece, pasivnih pušača, koji nemaju posebnu sobu za učenje i spavanje, a oba su im roditelja pušači (9,2  $\mu\text{mol/L}$ ). Nije dobivena statistički značajna razlika u koncentracijama kotinina u djevojčica i dječaka.

*Cljučne riječi:* djeca, metabolit nikotina, nepušači, pušači.

Pušenje duvana jedan je od najznačajnijih štetnih činilaca u nastanku mnogih bolesti čovjeka. Međutim, pušenjem nisu ugroženi samo aktivni pušači. Pasivni pušači, naročito djeca, podložni su kroničnim i akutnim bolestima respiratornih organa (1–6) i kroničnim upalama srednjeg uha (7). Pasivno pušenje predstavlja i faktor rizika od pojave karcinoma različitih organa (8–11), najčešće pluća (12–14). Kao biokemijska mjera izloženosti pušača duvanskom dimu određuju se u biološkom materijalu koncentracije nikotina, kotinina, tiocijanata i karboksihemoglobina. Mjerenje koncentracije kotinina je najpouzdanije, jer je on najvažniji metabolit nikotina. Stabilniji je od nikotina, sporije se izlučuje, može da se određuje u malim koncentracijama (0,6 nmol/L) i nije uslovljen načinom ishrane, kao tiocijanati, niti sastojcima zraka kao ugljični monoksid. Za obimnije epidemiološke studije koncentracija kotinina određuje se plinskom kromatografijom (GC) (15) ili visokotlačnom kromatografijom (HPLC) (16). Za opštu upotrebu mnogo je jednostavnija tehnika radioimunološkog testa (RIA) (17), mada su potrebni reagensi koji nisu lako dostupni. Najjednostavnija, najbrža i najjeftinija metoda određivanja koncentracije kotinina u urinu je kolorimetrijska metoda sa barbiturnom kiselinom (DBA) (18). *Barlow i suradnici* (18) su ovu metodu prvi put primijenili za određivanje

statusa aktivnih pušača mjerenjem koncentracije metabolita nikotina u urinu. Cilj ovog rada je bio da se tom metodom utvrdi da li su, i u kojoj mjeri, djeca kao pasivni pušači izložena dimom cigareta roditelja aktivnih pušača.

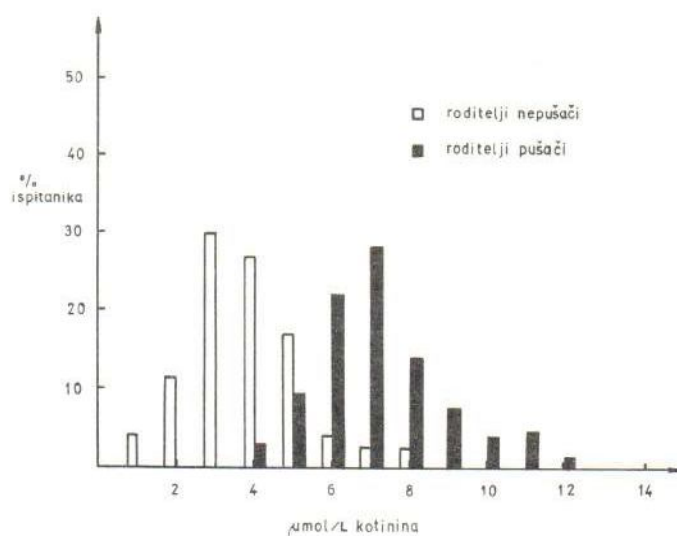
#### ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno kod 205 učenika petih razreda Osnovne škole »Niko Jurinčić« u Banjaluci među kojima je bilo 114 djevojčica i 91 dječak. Podaci o uvjetima u kojima djeca žive kao pasivni pušači (da li puše oba roditelja, koliko dnevno cigareta puše i da li dijete ima posebnu prostoriju gdje uči i spava) dobiveni su anketom. Od ispitanika je prikupljen prvi jutarnji urin i svjež zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

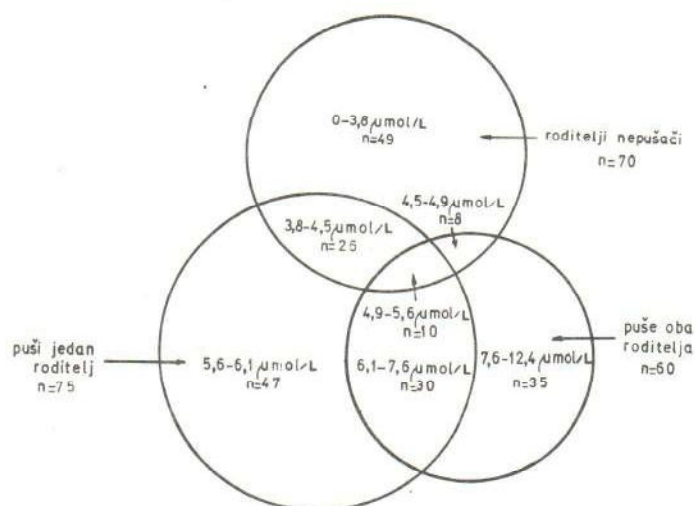
Za određivanje koncentracije metabolita nikotina u urinu prilagođena je, postojećim eksperimentalnim uvjetima, kolorimetrijska metoda sa barbiturnom kiselinom (DBA), *Barlowa i suradnika* (18). Jednokratno je odmrzavano po 10 uzoraka urina. U epruvete, veličine 5 ml, uzet je po 1 ml urina, odnosno vodene otopine standarda kotinina (Sigma, No. C-9399), a potom su redom dodavane vodene otopine od 0,5 ml 4 mmol/L acetatnog pufera ( $\text{pH}=4,7$ ), 0,2 ml 1,5 mol/L kalijum-cijanida, 0,2 ml 0,2 mol/L kloramina-T i 1 ml 70 mmol/L otopine barbiturne kiseline u smjesi voda–acetona 1:1 (volumski). Nakon miješanja otopina, po 10 sekundi, izvedena je inkubacija po 15 minuta na sobnoj temperaturi i potom su reakcije prekinute dodatkom po 0,2 ml 1 mol/L vodene otopine natrijum-hidrogen-sulfita. Za mjerenje apsorpcije uzet je po 1 ml svakog uzorka. Mjerenje apsorpcije je izvedeno spektrofotometrom (Spekol-11) na 505 nm u odnosu na destilovanu vodu. Upotrebljeni uzorci, prije bacanja, miješani su sa cijanidnim antidotom /ferum(III)-sulfat, limunska kiselina i natrijum-karbonat/. Dobiveni narančasti produkt, koji omogućuje kolorimetrijsko određivanje, rezultat je reakcija i kotinina i nikotin-N-oksida. Pošto je kotinin mnogo više zastupljen u smjesi i duže se zadržava u organizmu (17), za određivanje je korištena njegova 50  $\mu\text{mol/L}$  vodena otopina kao standard, a koncentracije metabolita nikotina su izražavane kao  $\mu\text{mol/L}$  kotinina.

#### REZULTATI

Dobiveni rezultati koncentracija metabolita nikotina, izraženih kao ekvivalentne količine kotinina u  $\mu\text{mol/L}$ , predstavljeni su na slici 1. Očigledno je da su djeca roditelja pušača, prema dobivenim koncentracijama kotinina, mnogo više izložena pasivnom pušenju mada je očito da su i djeca roditelja nepušača pasivni pušači, ali u blažoj formi i po nekom drugom osnovu. Da roditelji, aktivni pušači, nisu jedini uzrok pasivnog pušenja svoje djece, pokazuje slika 2. gdje se pored tri izdvojene oblasti prema koncentracijama kotinina uslovljenih statusom roditelja kao pušača pojavljuju i četiri granične oblasti, što upućuje na uticaj i drugih faktora. U tabeli 1. su, za ispitanike, predstavljene srednje vrijednosti koncentracija kotinina i standardne devijacije. Dobivene su signifikantne razlike vrijednosti za djecu roditelja pušača u odnosu na djecu roditelja nepušača. Statistički je značajna razlika i ako se poredi vrijednosti za djecu,



Slika 1. Distribucija vrijednosti koncentracija kotinina u urinu za djecu roditelja nepušača i djecu roditelja pušača



Slika 2. Grupe ispitanika i njihova distribucija u zajedničke oblasti prema statusu roditelja kao pušača i dobivenim vrijednostima koncentracija kotinina u urinu

Tablica 1.

Srednje vrijednosti koncentracija kotinina u urinu ( $\bar{X}$ ) i značajnost razlike (P) za djecu roditelja nepušača i djecu roditelja pušača

Roditelji	Djeca		Koncentracija kotinina $\bar{X} \pm SD$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	P
	n	%		
nepušači	70	34,1	$3,2 \pm 1,4$	P < 0,001
pušači	135	65,9	$6,6 \pm 1,9$	

pasivne pušače, u kojih puši jedan roditelj i ako puše oba roditelja (tabela 2). Ovisnost statusa djeteta kao pasivnog pušača o stambenim uvjetima, odnosno o tome da li dijete ima posebnu prostoriju za učenje i spavanje, vidi se iz tabele 3. Postojanje vlastite prostorije gdje dijete provodi najveći dio vremena, gdje spava i gdje se ne puši, uvjetuje manju izloženost duvanskom dimu u toku boravka u stanu pa je i koncentracija

Tablica 2.

Srednje vrijednosti koncentracija kotinina u urinu ( $\bar{X}$ ) i značajnost razlike (P) za djecu u kojih puši jedan i u kojih puše oba roditelja

Pušači	Djeca		Koncentracija kotinina $\bar{X} \pm SD$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	P
	n	%		
jedan roditelj	75	55,6	$5,8 \pm 1,7$	P < 0,001
oba roditelja	60	44,4	$7,8 \pm 2,2$	

Tablica 3.

Srednje vrijednosti koncentracija kotinina u urinu ( $\bar{X}$ ) i značajnost razlike (P) za djecu roditelja pušača i stambeni uslovi

Pušači	Dijete ima sobu			Dijete nema sobu			P
	n	%	$\bar{X} \pm SD$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	%	$\bar{X} \pm SD$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	
jedan roditelj	52	69,3	$5,1 \pm 1,9$	23	30,7	$6,8 \pm 1,3$	P < 0,01
oba roditelja	39	65,0	$6,9 \pm 1,1$	21	35,0	$9,2 \pm 3,4$	P < 0,01

metabolita u urinu, izražena preko kotinina, u obje kategorije djece, pasivnih pušača, znatno manja. Procjena statističke značajnosti je vršena pomoću Studentovog t-testa.

#### DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati određivanja koncentracija metabolita nikotina u urinu, za 205 učenika u dobroj su korelaciji sa podacima dobivenim anketom. Na osnovu podataka iz ankete, ispitanici su bili podijeljeni u tri grupe. Prvu grupu od 70-ero djece (34,1%) činila su djeca roditelja nepušača, drugu od 75-ero djece (36,6%) u kojih puši samo jedan roditelj i treću od 60-ero djece (29,3%) u kojih su oba roditelji pušači.

Eksperimentalno dobivene vrijednosti koncentracija kotinina potvrđuju postojanje ovih grupa i slaganje rezultata je potvrđeno (slika 2) u prvoj grupi sa 70%, u drugoj sa 63% i u trećoj sa 58%. Za postojanje relativno velike zajedničke oblasti rezultata sa 30 ispitanika gdje puši jedan roditelj i gdje puše oba roditelja može da se nađe realno objašnjenje. U obzir nije uzet, zbog nesigurnosti u izjašnjavanju u anketi, broj cigareta koji roditelji puše, pa se tako može da desi da jedan roditelj puši dnevno isto toliko, ili više, nego druga dva roditelja zajedno. Zajednička oblast dobivenih rezultata, od 26 ispitanika, u kojoj su roditelji nepušači, ili puši samo jedan roditelj, vjerovatno je uslovljena postojanjem i drugih izvora zbog kojih su djeca roditelja nepušača pasivni pušači. Male granične oblasti od 8 (3,9%) odnosno 10 (4,9%) ispitanika nisu očekivane i rezultat su ili lažnog izjašnjavanja djece u anketi ili činjenice da su djeca, mimo roditelja, izložena nekom drugom jačem izvoru pasivnog pušenja.

Zabrinjava činjenica da su kod 198 ispitanika (96,6%) registrovani metaboliti nikotina. To znači, zapravo, da je svaki čovjek koji ne puši pasivni pušač i dovoljno je da jednom nedjeljno dođe u kontakt sa izvorom pasivnog pušenja pa da mu se u urinu pronađe kotinin, jer izlučivanje ovog metabolita iz organizma traje oko sedam dana (17). Potvrđena je pretpostavka da su najizloženija pasivnom pušenju djeca u kojih puše oba roditelja. Ona imaju prosječno više nego dvostruko veću koncentraciju kotinina u urinu u odnosu na djecu roditelja nepušača (3,2 prema 7,8  $\mu\text{mol/L}$ ). Ako dijete nema svoju sobu za učenje i spavanje, onda je ta razlika još više izražena (3,2 prema 9,2  $\mu\text{mol/L}$ ). Ove vrijednosti su u korelaciji sa rezultatima ranijih istraživanja (8) prema kojima su djeca roditelja pušača hospitalizirana 50 – 100% više od djece roditelja nepušača zbog bolesti respiratornih organa.

Ispitivanje nije potvrdilo rezultate *Strachana i suradnika* (7) da djevojčice, kao pasivni pušači, imaju viši nivo kotinina nego dječaci, već je u saglasnosti sa rezultatima studije *Greenberga i suradnika* (19). U odnosu na rezultate *Barlowa i suradnika* (18) vrijednosti koncentracija kotinina u urinu su znatno niže (za nepušače 3,2 u odnosu prema 7,9  $\mu\text{mol/L}$ ). To je zbog toga što su oni ispitivanje izvodili na odraslim ljudima i što su mjerili apsorpciju na 490 nm. Valna duljina od 505 nm, gdje kotinin ima drugi maksimum apsorpcije, pokazala se znatno selektivnijom, jer je pokazivala apsorpciju koja je zavisila samo od koncentracije kotinina.

Dobiveni rezultati koncentracija kotinina u urinu pokazuju da se kolorimetrijska metoda sa barbiturnom kiselinom (DBA) može uspješno da koristi za utvrđivanje stepena izloženosti djece dimu cigarete roditelja, aktivnih pušača. Međutim, kotinin ne

predstavlja jedinu opasnost po zdravlje djece. Veća izloženost dimu cigarete znači i unošenje u organizam pasivnog pušača veće količine, po genotoksičnosti i karcinogenosti, poznatih spojeva: alkena, amina, nitrozamina te aromatskih i heterocikličnih ugljikovodika.

#### LITERATURA

1. *Kauffman F, Dockery DW, Speizer FE, Ferris BG.* Respiratory symptoms and lung function in relation to passive smoking: A comparative study of American and French women. *Int J Epidemiol* 1989;18:334–44.
2. *Kojima N, Kasuga H, Osaka F, Matsuki H.* Passive smoking effects to non-smoking adults. *Jpn J Hyg* 1981;36:200–4.
3. *Schenker MB, Samet JM, Speizer FE.* Effect of cigarette tar content and smoking habits on respiratory symptoms in women. *Am Rev Respir Dis* 1982;125:684–90.
4. *Simecek C.* Reflection of passive exposure to smoking in the home on the prevalence of chronic bronchitis in non-smokers. *Czech Med* 1980;3:308–10.
5. *Corbo GM, Fuciarelli F, Foresi A, De Benedetto F.* Snoring in children: association with respiratory symptoms and passive smoking. *Br Med J* 1989;299:1491–4.
6. *Tager IB.* Health effects of passive smoking in children. *Chest* 1989;96:1161–4.
7. *Strachan DP, Jarvis MJ, Feyerabend C.* Passive smoking, salivary cotinine concentrations, and middle ear effusion in 7 year old children. *Br Med J* 1989;298:1549–52.
8. *Spitzer WO, Lawrence V, Dales R. et al.* Links between passive smoking and disease. *Clin Invest Med* 1990;13:17–42.
9. *Sandler DP, Everson RB, Wilcox AJ, Browder JP.* Cancer risk in adulthood from early life exposure to parents' smoking. *Am J Public Health* 1985;75:487–92.
10. *Sandler DP, Everson RB, Wilcox AJ.* Passive smoking in adulthood and cancer risk. *Am J Epidemiol* 1985;121:37–48.
11. *Persbagen G.* Childhood cancer and malignancies other than lung cancer related to passive smoking. *Mutat Res* 1989;222:129–35.
12. *Correa P, Pickle LW, Fontham E, Lin Y, Haenszel W.* Passive smoking and lung cancer. *Lancet* 1983;10:595–7.
13. *Saracci R, Riboli E.* Passive smoking and lung cancer: current evidence and ongoing studies at the International Agency for Research on Cancer. *Mutat Res* 1989;222:117–27.
14. *Vainino H, Partanen R.* Population burden of lung cancer due to environmental tobacco smoke. *Mutat Res* 1989;222:137–40.
15. *Jacob P, Wilson M, Benowitz NL.* Improved gas chromatographic method for the determination of nicotine and cotinine in biological fluids. *J Chromatogr* 1981;222:61–70.
16. *Watson ID.* Rapid analysis of nicotine and cotinine in the urine of smokers and non-smokers by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1977;143:203–6.
17. *Langone JJ, Gjika HB, Van Vunakis H.* Nicotine and its metabolites: radio-immunoassays for nicotine and cotinine. *Biochemistry-USA* 1973;12:5025–30.
18. *Barlow RD, Stone RB, Wald NJ, Puhakainen VJ.* The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: a simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarette smoke intake. *Clin Chim Acta* 1987;165:45–52.
19. *Greenberg RA, Bauman KE.* Ecology of passive smoking by young infants. *J Pediatr* 1989;114:774–80.

*Summary*

URINARY COTININE AS MARKER OF PASSIVE TOBACCO SMOKING

To provide an objective measure of the hazard smoking parents represent to their children's health, cotinine concentration in urine was measured by the colorimetric method using barbituric acid (DBA). A total of 205 children, aged 10 – 12, were examined. The results of laboratory tests were correlated with the data collected by interview. A significant difference in the average value of cotinine concentration was demonstrated between the children whose parents did not smoke (3.2  $\mu\text{mol/L}$ ) and those whose one parent smoked (5.8  $\mu\text{mol/L}$ ). An even larger concentration was recorded when both parents smoked (7.8  $\mu\text{mol/L}$ ). The largest cotinine concentration was determined in the urine of children – passive smokers whose both parents smoked and who did not have a room of their own (9.2  $\mu\text{mol/L}$ ). The difference in cotinine concentration between girls and boys was not statistically significant.

*Medical Faculty, University of Banjaluka, Banjaluka*

*Key terms:* children, nicotine metabolite, non-smokers, smokers.