

Received: 2012.05.25
Accepted: 2012.11.09
Published: 2012.12.14

Kotynina – metabolizm, zastosowanie jako biomarker i wpływ na organizm człowieka*

Cotinine – metabolism, application as a biomarker and the effects on the organism

Jakub Marcin Nowak, Agnieszka Żuryń, Alina Grzanka

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

W pracy omówiono stan wiedzy na temat kotyniny, głównego metabolitu nikotyny. Zwrócono szczególną uwagę na powstawanie tego związku w organizmie, metabolizm, zastosowanie w diagnostyce oraz ocenę działania w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Przez wiele lat kotynina wykorzystywana była jako biomarker ekspozycji na dym tytoniowy. Obecnie związek ten znajduje zastosowanie w wielu innych badaniach związanych z potencjalnym wykorzystaniem kotyniny w terapii różnych schorzeń. Kilka lat temu Scott i wsp. opatentowali terapeutyczne wykorzystanie kotyniny w przewlekłych i ostrych procesach zapalnych. Kotynina jest ciekawym związkiem o dość dobrze poznanym metabolizmie, dlatego istnieją sugestie co do jej zastosowania w diagnostyce oraz leczeniu niektórych chorób.

Słowa kluczowe:

kotynina • biomarker • palenie papierosów • cytochrom P450

Summary

This review presents the current state of knowledge on cotinine, the major metabolite of nicotine. Special attention is paid to the formation of this compound in the organism, its metabolism, application in diagnostic procedures and evaluation of its *in vitro* and *in vivo* activities. For many years, cotinine has been used as a biomarker of exposure to tobacco smoke. Currently, this compound is applied in many other studies including the use of cotinine in the treatment of various diseases. Several years ago, Scott et al. patented therapeutic applications of cotinine in chronic and acute inflammation. Cotinine is an interesting compound with a well-known metabolism; therefore there are suggestions for its application in the diagnosis and treatment of certain diseases.

Key words:

cotinine • biomarker • smoking • cytochrome P450

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1024156>

* Publikacja finansowana z funduszy zadania badawczego nr 586 w ramach działalności statutowej – utrzymanie potencjału badawczego w roku 2012 na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Word count: 3802
Tables: 2
Figures: 4
References: 73

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: agrzanka@cm.umk.pl

WSTĘP

Powszechnie wiadomo, że nikotyna powoduje uzależnienie, a jej głównym źródłem jest dym tytoniowy. Dostarczana jest do organizmu różnymi drogami, nie tylko podczas palenia papierosów, ale również może wnikać wraz z lekami oraz suplementami diety stosowanymi w nikotynowej terapii zastępczej (NTZ). Jest to organiczny związek chemiczny występujący w liściach tytoniu oraz w śladowych ilościach w pomidorach i innych roślinach z rzędu psiankowatych [6,36].

Nikotyna została po raz pierwszy wyekstrahowana w 1828 r. przez dwóch niemieckich studentów chemii, a jej wzór chemiczny został opracowany w 1843 r. Pierwszej sztucznej syntezy tego związku dokonano w 1904 r. Nazwa substancji pochodzi od nazwiska Jeana Nicota de Villemain, francuskiego dyplomaty z XVI w., który uważał, że tytoń ma właściwości lecznicze [29]. Historia badań nad nikotyną sięga XIX w. W 1862 r. Samuel Haughton opisał zastosowanie nikotyny w badaniach nad tężcem [32]. Od czasu odkrycia, nikotyna stała się przedmiotem badań wielu grup badawczych na całym świecie, a na temat tego związku powstało ponad 30 000 publikacji [49].

Kotynina to główny metabolit nikotyny. Około 70–80% nikotyny dostarczonej do organizmu ludzkiego zostaje przekształcona do kotyniny [36]. Związek ten ze względu na znacznie dłuższy od nikotyny okres półtrwania w organizmie (16–20 godzin) znalazł powszechne zastosowanie jako biomarker ekspozycji organizmu na dym tytoniowy, a pomiary koncentracji kotyniny w krwi, moczu, ślinie są pomocne w badaniach populacyjnych mających na celu określenie stopnia narażenia na nikotynę [4,61]. Kotynina powstaje w organizmie w wyniku metabolizowania dostarczonej do organizmu nikotyny, przede wszystkim w trakcie wdychania dymu papierosowego, ale również podczas stosowania nikotynowej terapii zastępczej (plastry, gumy do żucia) oraz w wyniku spożywania roślin i ich owoców, np. pomidor, zielony pieprz, ziemniaki (głównie z rzędu psiankowatych) [36,66,72].

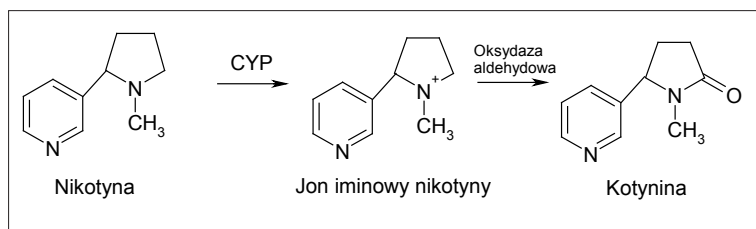
POWSTAWIANIE I GŁÓWNE DROGI METABOLIZOWANIA KOTYNYNY

Nikotyna jest trzeciorzędową aminą zbudowaną z dwóch pierścieni heterocyklicznych: pirydyny i pirolidyny. Alkaloid ten jest substancją psychoaktywną, pobudza receptory cholinergiczne typu N w zwojach autonomicznych i w zwoju nadnerczy. Wykazuje wysokie powinowactwo do tkanki nerwowej, co jest związane z obecnością dużej liczby nikotynowych receptorów cholinergicznych, czego dowodem jest obecność podwyższonej liczby receptorów cholinergicznych u osób palących papierosy [6].

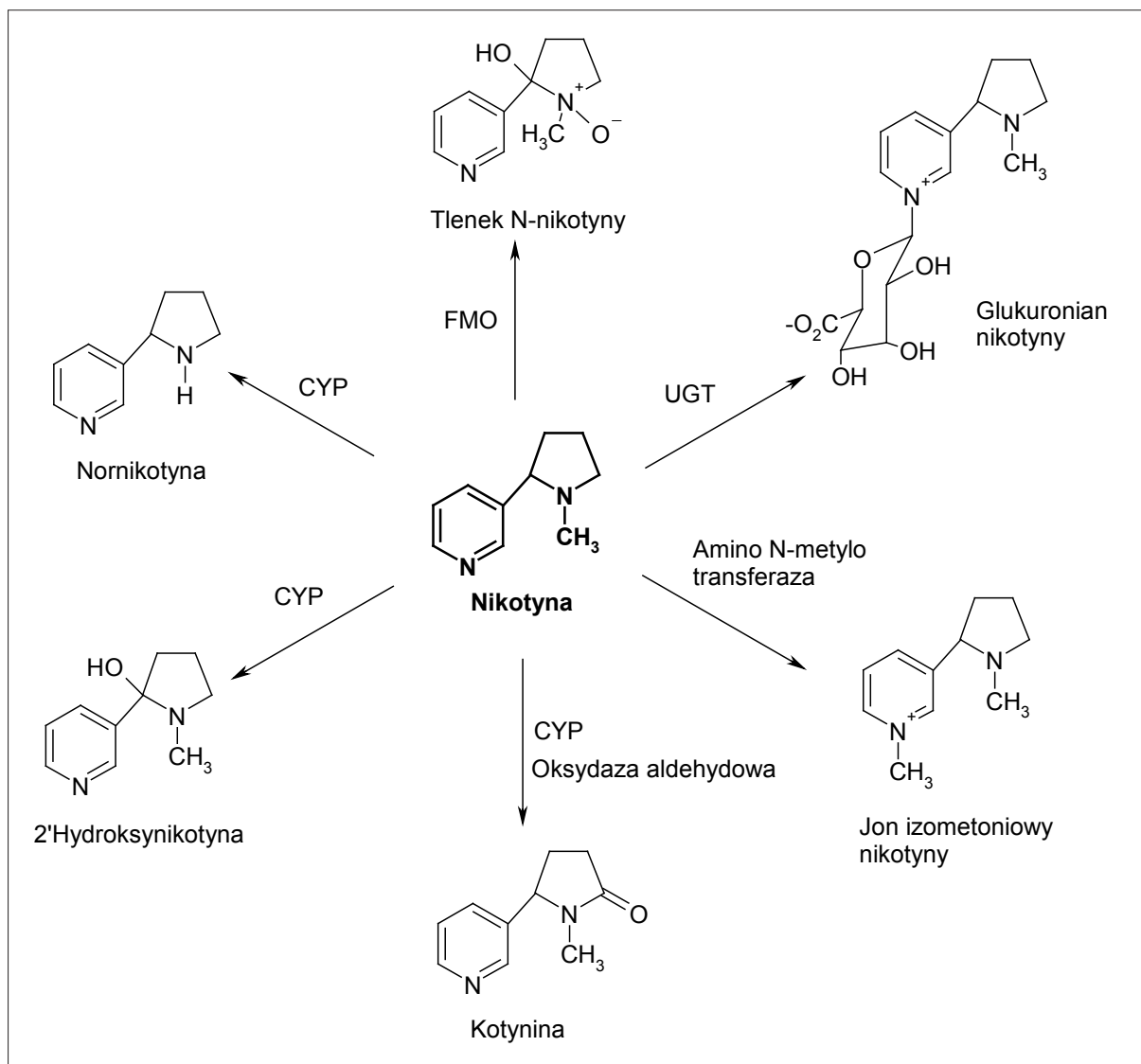
Nikotyna wnika do organizmu różnymi drogami poprzez jamę ustną, skórę, płuca, pęcherz moczowy oraz przewód pokarmowy (jelito cienkie). Proces absorpcji nikotyny zależy od wartości pH. Nikotyna należy do słabych zasad ($pK_a=8,0$ – co oznacza, że w $pH=8,0$ połowa tego związku występuje w postaci zjonizowanej, a pozostała część jest niezjonizowana). Zatem w kwaśnym środowisku występuje głównie w postaci zjonizowanej, co utrudnia wchłanianie przez błony, natomiast w środowisku zasadowym, jako postać niezjonizowana łatwiej ulega absorpcji. Doskonale wchłaniana jest z dymu papierosowego w pęcherzykach płucnych (duża powierzchnia absorpcji), przez skórę (plastry transdermalne stosowane w nikotynowej terapii zastępczej), a także przez nabłonek wyścielający jamę ustną (gumy do żucia, liście tytoniu), słabo natomiast przez żołądek ze względu na kwaśne pH soku żołądkowego. Ponadto, jako że nikotyna w niezmiennionej postaci wydalana jest drogami moczowymi, może również ulegać reabsorpcji z moczu (przy pH moczu powyżej 6,0) [5,6,36,72].

Po zaabsorbowaniu, nikotyna przedostaje się do krwiobiegu, gdzie w pH 7,4 występuje w postaci zjonizowanej (69%) i zdejonizowanej (31%). Tylko 5% całkowitej puli nikotyny obecnej we krwi ulega wiązaniu do białek osocza. Związek ten ulega dystrybucji do wszystkich narządów i powszechnie obecny jest w wielu tkankach. Szczególnie szybko przenika do ośrodkowego układu nerwowego (wystarczy około 8 s aby nikotyna dotarła do mózgu od chwili absorpcji). Jednak czas w jakim nikotyna osiąga organ docelowy oraz wywołuje efekt farmakologiczny zależy od dwóch podstawowych parametrów: drogi podania oraz dawki substancji [4,66]. Wysokie stężenie obserwuje się w krwi tętniczej, płucach i mózgu [36,66]. Badania pośmiertne osób palących papierosy wykazały ponadto, że nikotyna odkłada się również w nerkach i śledzionie. Natomiast niewielką koncentrację tego związku zaobserwowano w tkance tłuszczowej oraz mięśniach. Wykazano, że nikotyna może przekraczać barierę krew-mózg oraz przenikać przez łożysko, a także występuje w mleku matek karmiących piersią. Wysokie stężenie nikotyny obserwuje się ponadto w soku żołądkowym oraz ślinie [36,66].

Kotynina powstaje w wyniku procesów metabolicznych, zachodzących głównie w wątrobie (70–75%), które związane są z przekształcaniem nikotyny. Jednak w małych ilościach nikotyna podlega również biotransformacji przez płuca, nerki, błonę śluzową nosa oraz mózg [36]. Proces powstawania kotyniny obejmuje dwa etapy i jest zależny od NADPH (ryc. 1). W pierwszym etapie dochodzi do oksydacji pierścienia pirolidynowego nikotyny, w wyniku czego powstaje jon iminowy nikotyny, pozostający w równowadze z 5'hydroksynikotyną. Etap ten jest katalizowany



Ryc. 1. Biotransformacja nikotyny do kotyniny z udziałem cytochromu P450 (CYP) i oksydazy aldehydowej (wg [36,66] zmodyfikowano)



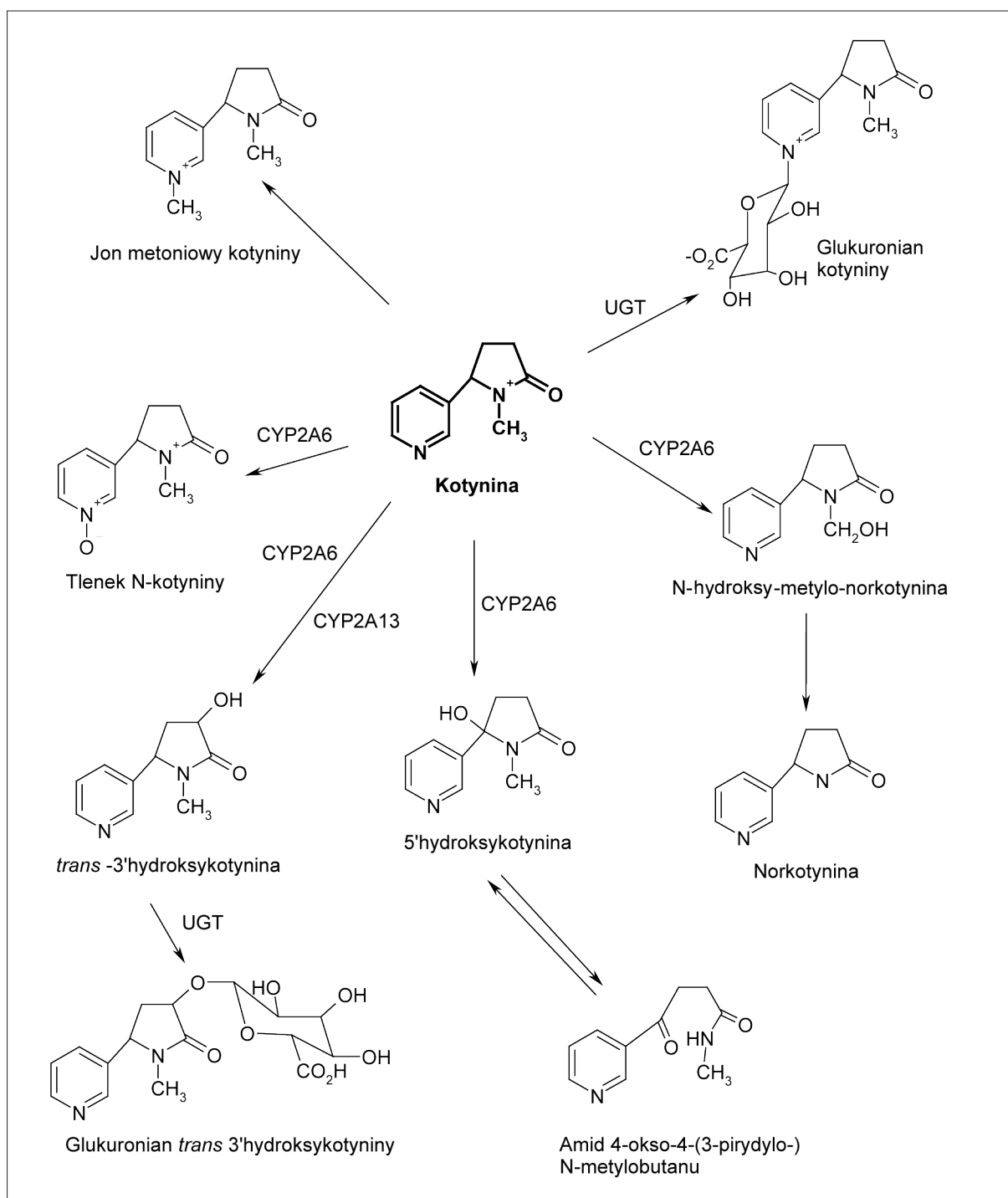
Ryc. 2. Główne metabolity nikotyny (wg [36,48] zmodyfikowano)

przez cytochrom P450 (głównie izoforma CYP2A6, rzadziej CYP2B6, CYP2E1, CYP2A13). Produkt przejściowy, którym jest jon iminowy nikotyny zostaje – z udziałem cytoplazmatycznej oksydazy aldehydowej – ostatecznie przekształcony do kotyniny [5,36,47,66]

Okolo 70–80% nikotyny ulega przekształceniu w organizmie do kotyniny za pośrednictwem C-oksydacji. Poza kotyniną, w wyniku biotransformacji nikotyny powstają również inne produkty (około 20 pochodnych), takie jak: tlenek N- nikotyny (4–7%), nornikotyna (0,4–0,8%), glukuronian nikotyny (3–5%), jon izometoniowy nikotyny (0,4–2,0%). Do wytworzenia tych produktów dochodzi w procesach

N-oksydacji, N-demetylacji, czy N-glukoronidacji. Procesy te katalizowane są przez cytochrom P450 (CYP), mono-oksygenazy flawinowe (FMO), amino N-metylotranferazę, czy UDP-glukuronozylotransferazy (UGT). Ponadto okolo 10% nikotyny w niezmienionej postaci jest wydalana razem z moczem. Główne produkty biotransformacji nikotyny przedstawiono na ryc. 2 [36,66,72].

Kotynina podlega dalszym przemianom metabolicznym. Badania nad procesami związanymi z metabolizmem i farmakokinetyką kotyniny prowadzone były u ludzi i na gryzoniach, jednak przemiany metaboliczne kotyniny nie zostały jeszcze tak dobrze poznane w porównaniu do przemian



Ryc. 3. Główne pochodne kotyniny (wg [14,36,46] zmodyfikowano)

nikotyny. Podobnie jak w przypadku nikotyny, istnieją znaczące różnice międzygatunkowe związane z procesami biotransformacji kotyniny (np. nie zaobserwowano przemian kotyniny w mikrosomach hepatocytów szczura) [66]. W organizmie ludzkim zidentyfikowano 6 podstawowych metabolitów kotyniny: 3'hydroksykotynina, 5'hydroksykotynina, tlenek N-kotyniny, jon metoniowy kotyniny, glukuronian kotyniny oraz norkotynina [36,46]. Kotynina głównie ulega biotransformacji do 3'hydroksykotyniny, związku wykrywanego w moczu osób palących tytoń. Transformacja kotyniny do 3'hydroksykotyniny jest procesem wysoce

stereoselektywnym, katalizowanym przez CYP2A6 oraz CYP2A13 [2,7,66]. Podstawowym produktem tych przemian jest izomer *trans* (ok. 95%). *Trans*-3'hydroksykotynina może być również wydalana w postaci glukuronianu (postać O-glukuronianu). Proces O-glukoronidacji katalizowany jest z udziałem UDP-glukonylotranferazy UGT2B7 i UGTB17. 40–60% zaabsorbowanej nikotyny jest ostatecznie wydalana w postaci 3'hydroksykotyniny i jej glukuronianu [6,7,14,48,71]. Kolejny metabolit kotyniny, tlenek N-kotyniny, w przeciwieństwie do tlenku N-nikotyny, powstaje w wyniku przemian z udziałem cytochromu P450

i stanowi około 2-5% metabolitów nikotyny wykrytych w moczu osoby palącej [36]. Glukuronian kotyniny powstaje w reakcji N-glukoronidacji katalizowanej przez UDP-glukoronozylotransferazę (UGT2B10, UGT1A4), enzym odpowiedzialny również za procesy prowadzące do powstania glukuronianu nikotyny [14,28,48]. Natomiast enzym cytochromu P450, izoforma CYP2A6, zaangażowany jest w katalizowanie przemian metabolicznych kotyniny zarówno do norkotyniny, jak i 5'hydroksykotyniny (związki te pozostają w równowadze) [36,46]. Norkotynina (około 1% metabolitów nikotyny wykrytych w moczu osoby palącej) powstaje w wyniku demetylacji kotyniny lub oksydacji nornikotyny. Badania z wykorzystaniem szczurzych hepatocytów wykazały, że nornikotyna ulega przekształceniu kolejno do następujących produktów: amidu 4-okso-(3-pirydylo)-butanu oraz kwasu 4-okso-4-(3-pirydylo)butanowego, który jest w równowadze z 5'hydroksynorkotyniną. Natomiast prawie 15% kotyniny w postaci niezmienionej jest wydalaną z moczem [36].

Kotynina jest laktamem, dlatego związek ten przyjmuje także formę otwartego pierścienia (open chain form) aminokwasu, zaobserwowaną w moczu. Jednak w oparciu o badania *in vitro* z użyciem homogenatów wątrobowych dowiedziono, że kotynina powstaje bezpośrednio z jonu iminowego nikotyny w procesie oksydacji, a nie z udziałem pochodnej w postaci aminokwasu [36].

Właściwości farmakokinetyczne kotyniny są bardzo przydatne w diagnostyce. Połowiczny czas eliminacji kotyniny z organizmu wynosi około 16 godzin i jest zdecydowanie dłuższy niż nikotyny (2 godziny). Stężenie kotyniny z powodu dłuższego czasu półtrwania w ciągu dnia utrzymuje się na stałym poziomie, natomiast w przypadku nikotyny może ulegać wahaniom w zależności od pory dnia i czasu od chwili dostarczenia nikotyny z zewnątrz [5,66]. Kotynina jest związkiem bardziej polarnym niż nikotyna, dodatkowo podlega wolniejszej biotransformacji. Najwyższe stężenie kotyniny obserwuje się w wątrobie. Natomiast w mięśniach jest ono zbliżone do stężenia w krwiobiegu [36]. Kotynina przekracza barierę krew-mózg. Zaobserwowano znaczące ilości głównej pochodnej nikotyny w ośrodkowym układzie nerwowym, nawet 18 godzin od podania nikotyny. Jednak nie wykazano obecności w mózgu bezpośrednich metabolitów kotyniny, ponieważ na terenie mózgu nie podlega ona biotransformacji, w przeciwieństwie do nikotyny [19].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PROCESY POWSTAWANIA ORAZ BIOTRANSFORMACJI KOTYNYNY

W wyniku przemian metabolicznych nikotyny i kotyniny, powstaje wiele pochodnych tych związków, które ostatecznie są wydane przede wszystkim z moczem. Prace badawcze z użyciem izotopowo znakowanej nikotyny wykazały, że pomiary wydalaną z moczem nikotyny, kotyniny czy 3'hydroksynikotyny (dobowa zbiórka moczu) były bardzo różne u osób palących. Badania wielu zespołów badawczych wskazują nie tylko na znaczącą zmienność osobniczą, choćby w szybkości eliminacji z organizmu zarówno nikotyny jak i kotyniny, ale również na rozbieżności międzygatunkowe czy międzyrasowe w procesach związanych z metabolizowaniem nikotyny i kotyniny. Różnice międzyrasowe najwyraźniej widoczne są między osobami palącymi rasy czarnej i białej, co zaobserwowano porównując

Tabela 1. Nikotyna i kotynina – różnice wybranych parametrów farmakokinetycznych u osób rasy białej i Afroamerykanów wg [54]. Dane wyrażone są jako wartości średnie

Parametr	Rasa biała	Afroamerykanie
$T_{1/2}$ kotyniny	950	1064
$T_{1/2}$ nikotyny	129	134
V_d kotyniny	0,80	0,75
V_d nikotyny	3,09	2,92

V_d – pomiar objętości dystrybucji (l/kg); $T_{1/2}$ – biologiczny okres półtrwania (min).

stężenie kotyniny w osoczu [9,62]. Wykazano również różnice na podstawie porównania wartości parametrów farmakokinetycznych nikotyny i kotyniny, takich jak: biologiczny okres półtrwania (min), czy pomiaru objętości dystrybucji (l/kg). Dane przedstawiono w tabeli 1 [54]. Przemiany metaboliczne kotyniny przebiegają wolniej u osób rasy czarnej, ze względu na obniżony metabolizm oparty na oksydacji nikotyny (z udziałem CYP2A6) oraz wolniejszą N-glukoronidację [9].

Przedstawiciele rasy czarnej palący tytoń, wolniej metabolizują nikotynę (szlak obejmujący konwersję do kotyniny). Podobnie Azjaci oraz Afroamerykanie średnio wolniej transformują nikotynę, niż osoby rasy białej czy Latynosi [5,66].

Zarówno międzyosobnicze, jak i międzyrasowe różnice w procesach biotransformacji kotyniny są najprawdopodobniej wynikiem uwarunkowań genetycznych oraz środowiskowych. Biorąc pod uwagę czynniki genetyczne uważa badacze skupiła się głównie na badaniu polimorfizmów genów odpowiedzialnych za kodowanie enzymów, takich jak: CYP2A6 oraz UGP, zaangażowanych w procesy związane z metabolizowaniem nikotyny i kotyniny [5,36,66].

Ponadto zaobserwowano istotne różnice związane z procesami biotransformacji kotyniny i nikotyny w zależności od płci. U kobiet wykazano, że zarówno pomiar objętości dystrybucji, jak i biologiczny czas półtrwania kotyniny był niższy niż u mężczyzn [9]. Uzyskane dane potwierdzone zostały w kolejnym badaniu tej grupy naukowców i świadczą o tym, że u kobiet obserwuje się szybszy metabolizm kotyniny, co związane jest ze stężeniami hormonów płciowych – głównie estrogenu. Ponadto Benowitz i wsp. zaobserwowali, że kobiety, które stosowały doustną antykoncepcję, miały zwiększony metabolizm kotyniny w porównaniu z kobietami, które z niej nie korzystały [6,8]. Z kolei w badaniach Higashi i wsp. wykazano, że estrogen (swoiście tkankowo) indukuje działania CYP2A6, głównego enzymu zaangażowanego w tworzenie kotyniny [35].

Wiek również może mieć istotne znaczenie w procesach związanych z powstawaniem kotyniny. W przypadku badań u osób starszych (65–76 lat) wykazano istotne statystycznie zmniejszenie wartości parametrów farmakokinetycznych (całkowity klirens nikotyny, pomiar objętości dystrybucji w stanie równowagi, czy klirens nerkowy kotyniny) w stosunku do uzyskanych wartości u osób dorosłych (22–43). Jednak Molander i wsp. podsumowując



Ryc. 4. Wybrane biomarkery narażenia na dym tytoniowy (wg [24,55])

swoje badania, zasugerowali, że mimo zaobserwowanych istotnych statystycznie różnic, dystrybucja nikotyny u osób starszych nie ulega zmianom istotnym z punktu klinicznego, w stosunku do osób młodszych [44]. Z kolei porównując stężenia kotyniny u nastolatków (średnia wieku ok. 15 lat) i osób dorosłych palących papierosy nie zaobserwowano istotnych zmian dotyczących biotransformacji nikotyny [7,45]. W przypadku noworodków wykazano, że biologiczny czas półtrwania kotyniny był podobny do danych uzyskanych u osób dorosłych. Natomiast czas półtrwania nikotyny różnił się znacząco podczas badań tych grup wiekowych – niemowlęta wykazywały zdecydowanie wyższe wartości tego parametru. Dempsey zasugerował, że u niemowląt może dochodzić do niedoboru CYP2A6. W późniejszych badaniach wykazano, że u noworodków obserwuje się obniżoną ekspresję innego enzymu należącego do kompleksu cytochromu P450 – CYP2B6, co może sugerować, że to ta izoforma wpływa bezpośrednio na poziom nikotyny, a nie kotyniny u noworodków [6,23,66].

Do innych czynników wpływających na farmakokinetykę kotyniny należy z pewnością stosowana dieta. Wynika to z tego, że procesy powstawania, jak również metabolizowania kotyniny, zachodzą głównie w wątrobie i stamtąd podlega ona dystrybucji. Zatem substancje dostarczane z poślankami i wpływające na przepływ krwi w wątrobie mają istotny wpływ na wiele parametrów farmakokinetycznych kotyniny [6,36]. Zaobserwowano hamowanie metabolizmu nikotyny przez związki zawarte w soku grejpfrutowym, a także przez mentol, który dodawany jest jako substancja aromatyczna do papierosów, pasty do zębów czy też

produktów spożywczych i kosmetycznych. Wykazano, że zarówno sok grejpfrutowy, jak i mentol, oddziałują bezpośrednio na CYP2A6, powodując hamowanie działania tego enzymu w mikrosomach hepatocytów. Istotny wpływ na procesy biotransformacji nikotyny i kotyniny ma również spożywanie rośliny należącej do rodziny kapustowatych, potocznie zwanej rzeżuchą (rukiew wodna). Wykazano, że po spożyciu rzeżuchy obserwuje się zwiększenie formowania glukuronianu nikotyny, glukuronianu kotyniny i glukuronianu 3'hydroksykotyniny, natomiast brak wpływu na poziom innych metabolitów. Zatem zasadne wydaje się stwierdzenie, że w tym przypadku spożycie rzeżuchy wpływa bezpośrednio na poziom enzymów z grupy UGT, zaangażowanych w procesy glukoronidacji pochodnych nikotyny i kotyniny [6,36].

Procesy związane z biotransformacją nikotyny i jej pochodnych również mogą podlegać zaburzeniom w warunkach patologicznych. Dotyczy to głównie chorób nerek oraz wątroby. Ponadto stosowana farmakoterapia może mieć istotny wpływ na przemiany metaboliczne nikotyny i jej pochodnych [36]. Ryfampicyna oraz fenobarbital stymulują procesy katalizowane przez CYP2A6, prowadząc do zwiększenia tempa biotransformacji nikotyny. Podobny efekt obserwowano u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne. Również kofeina może przyspieszać procesy biotransformacji nikotyny. Natomiast do inhibitorów wspomnianych procesów należą: metoksalen (inhibitor CYP2A6 i CYP1A2), tranilcypromina (CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1), tryptamina (CYP2A6) i kumaryna (CYP2A6), raloksyfen (inhibitor oksydazy aldehydowej) [21,42,51,56,73].

Podsumowując, procesy biotransformacji oraz powstania kotyniny w ludzkim organizmie zależą od wielu czynników, począwszy od różnic gatunkowych, populacyjnych międzyrasowych i międzyosobniczych związanych m.in. z polimorfizmem oraz obecnością genów wytwarzających enzymy zaangażowane w te procesy, poprzez płeć czy wiek, aż do składników diety, czy spożywanych leków.

KOTYNINA JAKO BIOMARKER

Biomarkery stosowane w celu oceny narażenia na palenie tytoniu

Idealny biomarker pozwalający ocenić stopień narażenia na dym papierosowy powinien charakteryzować się następującymi cechami: umiarkowany czas półtrwania w organizmie, wykazywać swoistość, podlegać ocenie w płynach ustrojowych z wykorzystaniem dostępnych metod analitycznych. Ponadto obecność innych związków nie powinna oddziaływać na ocenę biomarkera i jednocześnie biomarker nie może podlegać wpływom czynników zewnętrznych innych niż dym papierosowy. Do biomarkerów stosowanych w ocenie narażenia organizmu na palenie papierosów należą m.in. nikotyna, tlenek węgla, karboksyhemoglobina, tiocyjaniany i pochodne nikotyny (kotynina, *trans* 3'-hydroksykotynina) [6,24]. Wybrane biomarkery narażenia na dym tytoniowy wraz z rodzajem badanego materiału przedstawiono na ryc. 4.

Kotynina biomarkerem z wyboru

Określenie stężenia kotyniny jest przydatnym biomarkerem ekspozycji organizmu na dym tytoniowy. Wykazano to w wielu badaniach, gdzie określano poziom narażenia na dym tytoniowy zarówno u osób palących, jak i narażonych na bierne palenie [20,39,41,50,69].

Stężenie kotyniny jest określane z wykorzystaniem różnego materiału biologicznego - moczu, krwi, śliny, spermy, a nawet włosów [22,40,69,70]. Wykonywanie badań mających na celu określanie stężenia nikotyny we krwi używane jest jedynie wówczas, jeżeli przeprowadzane są również inne badania krwi. Najczęściej do określenia stężenia kotyniny wykorzystuje się moczu. Wynika to z tego, że badanie to jest proste, związane z mniejszymi kosztami i zapewnia nieinwazyjność w porównaniu z pobraniem krwi [10,63].

Równie łatwym i dostępnym materiałem do badań stężenia kotyniny jest ślina. Według Bramera i Kallungall stężenie graniczne kotyniny w moczu pozwalające odróżnić osobę palącą od niepalącej wynosi 200 ng/ml, w osoczu i ślinie wynosi 10 ng/ml, natomiast we włosach 0,3 ng na mg włosa (tab. 2) [10].

Podobne stężenia kotyniny w ślinie i we krwi, skłaniają do uznania śliny za materiał z wyboru, ponieważ w przypadku śliny możliwe są nieinwazyjne pomiary kotyniny. Porównując różnego rodzaju materiały biologiczne, badane na obecność kotyniny wskazuje się, że to ślina powinna być materiałem z wyboru w przypadku badań mierzących narażenie na dym tytoniowy [10,24].

Pomiary z wykorzystaniem śliny jako materiału do analiz są bardzo czułe. Metoda ta stosowana jest m.in. do określania

Tabela 2. Stężenia graniczne kotyniny pozwalające na rozróżnienie osób palących i niepalących (wg [10])

Materiał	Osoba paląca	Osoba niepaląca
Mocz	>200 ng/ml	<200 ng/ml
Ślina	>10 ng/ml	<10 ng/ml
Krew	>10 ng/ml	<10 ng/ml
Włosy	>0,3 ng/mg włosa	<0,3 ng/mg włosa

biernej ekspozycji na dym papierosowy. Wykorzystując ślinę jako materiał do badań na obecność kotyniny można wykazać nie tylko sam fakt ekspozycji na dym tytoniowy, ale również określić nasilenie ekspozycji (liczbę osób palących w otoczeniu badanej osoby) oraz uwzględnić nawet intensywność palenia osób palących. Umożliwiają to stosowane obecnie techniki pomiaru stężenia kotyniny, które wykazują czułość na poziomie nawet do kilkudziesięciu pikogramów analizowanej substancji [10,37].

Istnieją jednak pewne ograniczenia w stosowaniu kotyniny jako biomarkera. Trzeba uwzględnić, że niektóre parametry farmakokinetyczne (czas eliminacji i okres półtrwania tego związku w organizmie ludzkim) są zależne od rasy człowieka. Zatem istotne jest, aby podczas wykorzystywania kotyniny jako biomarkera uwzględniać możliwe genetyczne predyspozycje do biotransformacji nikotyny związane z polimorfizmem genów odpowiedzialnych za wytwarzanie enzymów z grupy CYP, zwłaszcza CYP2A6 [47,62,64]. Ze względu na prawie 16-godzinny okres półtrwania, kotynina może służyć jedynie jako biomarker krótkotrwałej ekspozycji na dym tytoniowy (3–4 dni) [6]. Ponadto w badaniu populacyjnym (NHANES 1999–2008) wykazano, że wskaźnik BMI lub wartość całkowitej objętości krwi (TBV) u osób palących, mogą być istotnymi czynnikami prognostycznymi w ocenie stężenia kotyniny w surowicy [38].

Uważa się, że nikotyna dostarczana z pożywieniem nie wpływa na wrażliwość testu opartego na pomiarze kotyniny. Zatem nie są konieczne dietetyczne restrykcje podczas określania stopnia ekspozycji organizmu na dym tytoniowy lub określania statusu osoby palącej [4].

Warto również podkreślić, że pomiar stężenia kotyniny w surowicy lub moczu uważany jest przez komisję ekspertów powołaną przez Society for Research on Nicotine and Tobacco, za najlepszą metodę w ocenie narażenia organizmu na środowiskowy dym tytoniowy [63]. Podsumowując, dzięki znacznej czułości testów określających stężenie kotyniny, a także łatwości pozyskiwania materiału do badań (ślina, moczu, włosy), substancja ta stała się bardzo dobrym biomarkerem ekspozycji organizmu na dym papierosowy, uważanym za biomarker z wyboru w przypadku narażenia na dym tytoniowy [24].

Sposoby pomiaru kotyniny

Zmieniające się stężenie kotyniny, zwłaszcza w powiązaniu z procesem biotransformacji nikotyny, nadal budzi duże zainteresowanie. Pomiarów obecności głównej pochodnej nikotyny, dokonywano wykorzystując różne dostępne metody

doświadczalne. W pierwszych badaniach stosowano kotyninę znakowaną izotopowo. W latach 80 ub.w. stosowano testy oparte na wykorzystaniu RIA (test radioimmunologiczny) czy technik chromatografii cieczowej i gazowej [4]. Określano poziom kotyniny w moczu, osoczu, a nawet włosach [30,43,70]. Obecnie techniki chromatograficzne łączone są z metodami opartymi na analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas. W badaniu populacyjnym określającym poziom kotyniny w osoczu noworodków i kobiet w ciąży wykorzystano chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią mas (GC-MS) [13]. Jedną z najnowszych metod pozwalających na dokładne określenie kotyniny w surowicy na poziomie do 2 ng/ml jest preparatyka opracowana przez Baumann i wsp. opierająca się na pomiarze kotyniny z fazy stałej próbki w oparciu o HPLC i spektrometrię mas z jonizacją przez elektrozpylanie [3]. Z kolei Jacob i wsp. w celu określenia poziomu metabolitów nikotyny (kotynina i *trans*-3'-hydroksykotynina) w osoczu, moczu oraz ślinie wykorzystali bardzo czułą metodę, opartą na chromatografii cieczowej, połączonej z tandemową spektrometrią mas, co pozwoliło im na uzyskanie czułości pomiaru na poziomie 0,02 do 0,1 ng/ml [37].

Na podstawie pomiarów kotyniny można ustalić, czy osoba jest palącą oraz określić liczbę wypalonych w ciągu doby papierosów. Można również dokonać pomiarów biernego palenia. Wszystko zależy od czułości i wrażliwości zastosowanego testu. Kotynina jest najczęściej używanym i najbardziej wiarygodnym biomarkerem ekspozycji organizmu na dym papierosowy.

WPŁYW KOTYNYNY NA ORGANIZM

Kotynina jest głównym metabolitem nikotyny, wobec czego podejrzewano, że może ona mieć podobne działanie biologiczne jak jej prekursor. Badania nad nikotyną wykazały, że wpływa ona m.in. na procesy związane z chorobami układu krążenia oraz chorobami nowotworowymi, przede wszystkim rakiem płuc. W przypadku nikotyny obserwowano jej bezpośredni wpływ na cały organizm, a także na poszczególne komórki [24]. Asgary i wsp. wykazali, że zarówno nikotyna jak i kotynina, choć w mniejszym stopniu, hamują procesy oksydacji LDL oraz zwiększają stopień glikozylacji hemoglobiny, co może odgrywać istotną rolę w rozwoju chorób układu krążenia oraz nowotworów płuc u osób palących [1]. Z kolei Conclin w badaniach nad komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych, wykazał, że kotynina zaburza funkcjonowanie tych komórek, co istotnie wpływa na zależną od endotelium relaksację tętnic szyjnych wspólnych [17]. W dalszych badaniach wykazano ponadto, że kotynina powoduje znaczący wzrost ekspresji VEGF w komórkach endotelialnych, co może sugerować wpływ kotyniny na progresję chorób sercowo-naczyniowych oraz wzrost nowotworu lub tworzenie przerzutów [18]. Z kolei Heiss i wsp., badając wpływ biernego palenia na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych wykazali, że kotynina służy nie tylko jako biomarker narażenia na dym tytoniowy, ale również może mieć wpływ na zachowanie badanych komórek w stężeniu obserwowanym *in vivo* u biernych palaczy. Kotynina dawko- zależnie miała wpływ na zwiększenie wytwarzania tlenu azotu, chemotaksję oraz podwyższenie szybkości procesów proliferacji i chemokinezy progenitorowych komórek endotelialnych [33].

Doniesienia wielu grup badaczy wskazują, że kotynina może działać nikotynopodobnie, w związku z oddziaływaniem na nikotynowe receptory cholinergiczne w mózgu (nAChR). Potwierdzeniem tego są następujące przesłanki:

- kotynina podobnie do nikotyny wpływa na uwalnianie noradrenaliny, aktywność białka C oraz wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w bydlęcych chromochłonnych komórkach nadnerczy [67,68];
- stymuluje uwalnianie dopaminy w prążkowiu mózgowia szczura [25].

Badania Vainio i wsp. wykazały, że kotynina najprawdopodobniej łączy się do nikotynowych receptorów cholinergicznych w mózgu, co może wyjaśniać opisane wcześniej efekty farmakologiczne [70].

Jednak niektóre badania sugerują, że kotynina może wywierać niezależny od nikotyny efekt, zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu, wpływając na procesy fizjologiczne i behawioralne. Na przykład w badaniach Hatsumaki i wsp. wykazano, że w przypadku osób, które rzuciły palenie i zostały poddane nikotynowej terapii zastępczej (plastry nikotynowe) – obserwowano, że kotynina jedynie podawana wraz z nikotyną zmniejszała tzw. „efekt odstawienia”. Nie wykazano takiego działania przy podaniu samej kotyniny [31]. Nie zaobserwowano natomiast, aby kotynina podawana doustnie wpływała na ciśnienie krwi oraz rytm serca, choć wykazano jej oddziaływanie na przetwarzanie informacji u osób niepalących [34]. Badania Riaha i wsp. wykazały, że nAChR nie są głównym miejscem działania kotyniny w mózgu, ale również uczestniczy w nich nowy receptor dla kotyniny, który jest białko p40 [58,59].

Kotynina może znaleźć potencjalne zastosowania w leczeniu zaburzeń funkcji poznawczych [12]. Terry i wsp. wykazali, że kotynina jest farmakologicznie aktywnym związkiem, który nie tylko wykazuje pożądane nikotynopodobne działanie, ale również ma własne unikalne właściwości [65]. Możliwy mechanizm działania zakłada, że zarówno kotynina, jak i nikotyna poprzez desetyzację nAChR, a nie przez aktywację tych receptorów wpływa na działanie behawioralne [11]. O'Leary i wsp. sugerują, że kotynina może również wykazywać aktywność neuroprotektyną obserwowaną u osób palących z chorobą Parkinsona [52].

Ocenie poddano także oddziaływanie kotyniny (0,4–400 µg/ml) na florę bakteryjną jamy ustnej. Nie wykazano jednak, aby kotynina, podobnie jak nikotyna lub kofeina, w istotny sposób wpływała na wzrost przebadanych szczepów bakteryjnych [16]. Natomiast w przypadku badań nad ruchliwością nasienia zaobserwowano, że w warunkach *in vivo* kotynina może być jednym z czynników odpowiedzialnych za obniżenie zdolności motorycznych plemników osób palących papierosy. Nie udało się jednak potwierdzić w badaniach *in vitro*, aby kotynina bezpośrednio wpływała na ruchliwość plemników [26,53]. Chen i wsp. oraz Ghaffari i wsp. badając wpływ kotyniny na inne parametry określające jakość nasienia wskazują, że kotynina może być jednym z czynników powodujących bezpłodność u osób palących papierosy [15,27].

Kotynina znalazła zastosowanie w leczeniu przewlekłego i ostrego zapalenia. Rehani i wsp. w badaniach z użyciem

pierwotnych monocytów ludzkich wykazali, że ta główna pochodna nikotyny jest silnym czynnikiem antyzapalnym, który działa głównie poprzez nikotynowy receptor cholinergiczny $\alpha 7$ obecny na monocytach, co prowadzi do konwergencji dwóch szlaków przeciwwzapalnych: cholinergicznego oraz endogennego P13K-zależnego. Proces przeciwwzapalny z udziałem kotyniny jest z kolei niezależny od NF- κ B. [57]. Uzyskane wyniki badań sugerowały, że kotynina może zostać zastosowana w leczeniu procesów zapalnych. Scott i wsp. zgłosili patent, w którym opisali wykorzystanie kotyniny w terapii ostrego i przewlekłego zapalenia. Wynikało to z badań dowodzących, że kotynina znosi odpowiedź prozapalną zależną od TLR (Toll-like receptor) na patogeny w ludzkich

monocytach oraz zwiększa wytwarzanie cząsteczek przeciwzapalnych (IL-10) w sposób swoisty, z wykorzystaniem nikotynowych receptorów cholinergiczných typu $\alpha 7$ [60].

PODSUMOWANIE

Kotynina, główny metabolit nikotyny, znalazła zastosowanie jako biomarker narażenia na dym tytoniowy. Ostatnie badania wskazują na kotyninę, jako potencjalny terapeutyk, który może mieć zastosowanie w leczeniu procesów zapalnych oraz chorób neurodegeneracyjnych. Zatem zasadne wydaje się kontynuowanie badań nad kotyniną, szczególnie w aspekcie terapii chorób cywilizacyjnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Asgary S., Naderi G.H., Sarrafzadegan N., Gharypur M.: *In vitro* effect of nicotine and cotinine on the susceptibility of LDL oxidation and hemoglobin glycosylation. *Mol. Cell. Biochem.*, 2003; 246: 117–120
- [2] Bao Z., He X.Y., Ding X., Prabhu S., Hong J.Y.: Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab. Dispos.*, 2005; 33: 258–261
- [3] Baumann F., Regenthal R., Burgos-Guerrero I.L., Hegerl U., Preiss R.: Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010; 878: 107–111
- [4] Benowitz N.L., Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.*, 1996; 18: 188–204
- [5] Benowitz N.L.: Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009; 49: 57–71
- [6] Benowitz N.L., Hukkanen J., Jacob P. III: Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009; 192: 29–60
- [7] Benowitz N.L., Jacob P. III: Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 51: 53–59
- [8] Benowitz N.L., Lessov-Schlaggar C.N., Swan G.E., Jacob P. III: Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2006; 79: 480–488
- [9] Benowitz N.L., Perez-Stable E.J., Fong I., Modin G., Herrera B., Jacob P. III: Ethnic differences in N-glucuronidation of nicotine and cotinine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 291: 1196–1203
- [10] Bramer S.L., Kallungal B.A.: Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers*, 2003; 8: 187–203
- [11] Buccafusco J.J., Beach J.W., Terry A.V.Jr.: Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2009; 328: 364–370
- [12] Buccafusco J.J., Terry A.V.Jr.: A reversible model of the cognitive impairment associated with schizophrenia in monkeys: potential therapeutic effects of two nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 78: 852–862
- [13] Chazeron I., Daval S., Ughetto S., Richard D., Nicolay A., Lemery D., Llorca P.M., Coudoré F.: GC-MS determined cotinine in an epidemiological study on smoking status at delivery. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2008; 21: 485–488
- [14] Chen G., Giambrone N.E.Jr., Dluzen D.F., Muscat J.E., Berg A., Gallagher C.J., Lazarus P.: Glucuronidation genotypes and nicotine metabolic phenotypes: importance of functional UGT2B10 and UGT2B17 polymorphisms. *Cancer Res.*, 2010; 70: 7543–7552
- [15] Chen H.W., Kuo C.T.: Cotinine characterization and quality effect of sperm for smoking and nonsmoking students. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007; 79: 11–14
- [16] Cogo K., Montan M.F., Bergamaschi Cde C., D Andrade E., Rosalen P.L., Groppo F.C.: *In vitro* evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. *Can. J. Microbiol.*, 2008; 54: 501–508
- [17] Conklin B.S., Surowiec S.M., Ren Z., Li J.S., Zhong D.S., Lumsden A.B., Chen C.: Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function. *J. Surg. Res.*, 2001; 95: 23–31
- [18] Conklin B.S., Zhao W., Zhong D.S., Chen C.: Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 413–418
- [19] Crooks P.A., Li M., Dwoskin L.P.: Metabolites of nicotine in rat brain after peripheral nicotine administration. Cotinine, norcotinine, and norcotinine. *Drug Metab. Dispos.*, 1997; 25: 47–54
- [20] Czarnywojtek A., Zgorzalewicz-Stachowiak M., Florek E., Piekoszewski W., Warmuz-Stangierska I., Kulińska-Niedziela I., Komar-Rychlicka K., Sowiński J.: Stężenie kotyniny – markera nikotynizmu – u pacjentów z nadczynnością tarczycy. *Endokrynol. Pol.*, 2006; 57: 612–618
- [21] Damaj M.I., Siu E.C., Sellers E.M., Tyndale R.F., Martin B.R.: Inhibition of nicotine metabolism by methoxysalen: Pharmacokinetic and pharmacological studies in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2007; 320: 250–257
- [22] de Leon J., Diaz F.J., Rogers T., Browne D., Dinsmore L., Ghosheh O.H., Dwoskin L.P., Crooks P.A.: Total cotinine in plasma: a stable biomarker for exposure to tobacco smoke. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 2002; 22: 496–501
- [23] Dempsey D., Jacob P. III, Benowitz N.L.: Nicotine metabolism and elimination kinetics in newborns. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000; 67: 458–465
- [24] Dhar P.: Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004; 35: 155–168
- [25] Dwoskin L.P., Teng L., Buxton S.T., Crooks P.A.: (S)-(-)-Cotinine, the major brain metabolite of nicotine, stimulates nicotinic receptors to evoke [3H]dopamine release from rat striatal slices in a calcium-dependent manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 288: 905–911
- [26] Gandini L., Lombardo F., Lenzi A., Culasso F., Pacifici R., Zuccaro P., Dondero F.: The *in-vitro* effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 727–733
- [27] Ghaffari M.A., Abromand M., Motlagh B.: *In vitro* inhibition of human sperm creatine kinase by nicotine, cotinine and cadmium, as a mechanism in smoker men infertility. *Int. J. Fertility Sterility*, 2008; 3: 125–130
- [28] Ghosheh O., Hawes E.M.: N-glucuronidation of nicotine and cotinine in human: formation of cotinine glucuronide in liver microsomes and lack of catalysis by 10 examined UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.*, 2002; 30: 991–996
- [29] Grzybowski A.: Historia tytoniu w Europie. *Herba Polonica*, 2006; 52: 146–152
- [30] Haley N.J., Hoffmann D.: Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. *Clin. Chem.*, 1985; 31: 1598–1600
- [31] Hatsukami D., Pentel P.R., Jensen J., Nelson D., Allen S.S., Goldman A., Rafael D.: Cotinine: effects with and without nicotine. *Psychopharmacology*, 1998; 135: 141–150
- [32] Haughton S.: On the use of nicotine in tetanus and cases of poisoning by strychnia. *Dublin Quarterly J. Med. Sci.*, 1862; 6: 1–16
- [33] Heiss C., Amabile N., Lee A.C., Real W.M., Schick S.F., Lao D., Wong M.L., Jahn S., Angeli F.S., Minasi P., Springer M.L., Hammond S.K., Glantz S.A., Grossman W., Balmes J.R., Yeghiazarians Y.: Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008; 51: 1760–1771

- [34] Herzig K.E., Callaway E., Halliday R., Naylor H., Benowitz N.L.: Effects of cotinine on information processing in nonsmokers. *Psychopharmacology*, 1998; 135: 127–132
- [35] Higashi E., Fukami T., Itoh M., Kyo S., Inoue M., Yokoi T., Nakajima M.: Human CYP2A6 is induced by estrogen via estrogen receptor. *Drug Metab. Dispos.*, 2007; 35: 1935–1941
- [36] Hukkanen J., Jacob P.3rd, Benowitz N.L.: Metabolism and disposition kinetics of nicotine *Pharmacol. Rev.*, 2005; 57: 79–115
- [37] Jacob P. III, Yu L., Duan M., Ramos L., Yturalde O., Benowitz N.L.: Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011; 879: 267–276
- [38] Jain R.B., Bernert J.T.: Effect of body mass index and total blood volume on serum cotinine levels among cigarette smokers: NHANES 1999–2008. *Clin. Chim. Acta*, 2010; 411: 1063–1068
- [39] Jarvis M.J., Tunstall-Pedoe H., Feyereabend C., Vesey C., Saloojee Y.: Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. *Am. J. Public Health*, 1987; 77: 1435–1438
- [40] Kalkbrenner A.E., Hornung R.W., Bernert J.T., Hammond S.K., Braun J.M., Lanphear B.P.: Determinants of serum cotinine and hair cotinine as biomarkers of childhood secondhand smoke exposure. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2010; 20: 615–624
- [41] Kołodziejczyk J.: Wpływ biernego palenia na stan zdrowia osób niepalących. *Kosmos*, 2002; 51: 47–55
- [42] Lotfipour S., Arnold M.M., Hogenkamp D.J., Gee K.W., Belluzzi J.D., Leslie F.M.: The monoamine oxidase (MAO) inhibitor tranylcypromine enhances nicotine self-administration in rats through a mechanism independent of MAO inhibition. *Neuropharmacology*, 2011; 61: 95–104
- [43] Machacek D.A., Jiang N.S.: Quantification of cotinine in plasma and saliva by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 1986; 32: 979–982
- [44] Molander L., Hansson A., Lunell E.: Pharmacokinetics of nicotine in healthy elderly people. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2001; 69: 57–65
- [45] Moolchan E.T., Franken F.H., Jaszyna-Gasior M.: Adolescent nicotine metabolism: ethnorracial differences among dependent smokers. *Ethn. Dis.*, 2006; 16: 239–243
- [46] Murphy S.E., Johnson L.M., Pullo D.A.: Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 1999; 12: 639–645
- [47] Nakajima M., Yamagishi S., Yamamoto H., Yamamoto T., Kuroiwa Y., Yokoi T.: Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000; 67: 57–69
- [48] Nakajima M., Yokoi T.: Interindividual variability in nicotine metabolism: C-oxidation and glucuronidation. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2005; 20: 227–235
- [49] Nicotine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=nicotine> (25.04.2012)
- [50] Nowak A., Pufal E., Mierzwia G., Kuczyńska R., Landowski P., Kamińska B., Śliwka K., Korzon M., Czerwionka-Szaflarska M.: Kotynina w moczu jako wskaźnik ekspozycji na dym tytoniowy w ocenie przebiegu klinicznego choroby Leśniowskiego-Crohna u dzieci i młodzieży – obserwacje własne. *Przegl. Gastroenterol.*, 2008; 3: 154–160
- [51] Obach R.S.: Potent inhibition of human liver aldehyde oxidase by raloxifene. *Drug Metab. Dispos.*, 2004; 32: 89–97
- [52] O'Leary K., Parameswaran N., McIntosh J.M., Quik M.: Cotinine selectively activates a subpopulation of $\alpha 3/\alpha 6\beta 2$ nicotinic receptors in monkey striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008; 325: 646–654
- [53] Pacifici R., Altieri I., Gandini L., Lenzi A., Pichini S., Rosa M., Zuccaro P., Dondero F.: Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther. Drug Monit.*, 1993; 15: 358–363
- [54] Pérez-Stable E.J., Herrera B., Jacob P. III, Benowitz N.L.: Nicotine metabolism and intake in black and white smokers. *JAMA*, 1998; 280: 152–156
- [55] Piekoszewski W., Florek E.: Markery narażenia na dym tytoniowy. Wydaw.-Druk. Prodrug, Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2001
- [56] Poland R.E., Pechnick R.N., Cloak C.C., Wan Y.J., Nuccio I., Lin K.M.: Effect of cigarette smoking on coumarin metabolism in humans. *Nicotine Tob. Res.*, 2000; 2: 351–354
- [57] Rehani K., Scott D.A., Renaud D., Hamza H., Williams L.R., Wang H., Martin M.: Cotinine-induced convergence of the cholinergic and PI3 kinase-dependent anti-inflammatory pathways in innate immune cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1783: 375–382
- [58] Riah O., Dousset J.C., Bofill-Cardona E., Courrière P.: Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2000; 20: 653–664
- [59] Riah O., Dousset J.C., Courrière P., Stigliani J.L., Baziard-Mouysset G., Belahsen Y.: Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity. *Toxicol. Lett.*, 1999; 109: 21–29
- [60] Scott D.A. Martin M.: Therapeutic cotinine compositions. United States Patent Application Publication, US 2010/0143270 A1, 2010
- [61] Seccareccia F., Zuccaro P., Pacifici R., Meli P., Pannozzo F., Freeman K.M., Santaquilani A., Giampaoli S.: Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: the experience of the MATISS project. *Eur. J. Epidemiol.*, 2003; 18: 487–492
- [62] Signorello L.B., Cai Q., Tarone R.E., McLaughlin J.K., Blot W.J.: Racial differences in serum cotinine levels of smokers. *Dis. Markers*, 2009; 27: 187–192
- [63] SRNT Subcommittee on Biochemical Verification: Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob. Res.*, 2002; 4: 149–159
- [64] Swan G.E., Lessov-Schlaggar C.N., Bergen A.W., He Y., Tyndale R.F., Benowitz N.L.: Genetic and environmental influences on the ratio of 3'-hydroxycotinine to cotinine in plasma and urine. *Pharmacogenet. Genomics*, 2009; 19: 388–398
- [65] Terry A.V. Jr., Hernandez C.M., Hohnadel E.J., Bouchard K.P., Buccafusco J.J.: Cotinine, a neuroactive metabolite of nicotine: potential for treating disorders of impaired cognition. *CNS Drug Rev.*, 2005; 11: 229–252
- [66] Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M.: Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol. Rep.*, 2005; 57: 143–153
- [67] Vainio P.J., Törnquist K., Tuominen R.K.: Cotinine and nicotine inhibit each other's calcium responses in bovine chromaffin cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000; 163: 183–187
- [68] Vainio P.J., Tuominen R.K.: Cotinine binding to nicotinic acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes. *Nicotine Tob. Res.*, 2001; 3: 177–182
- [69] Vine M.F., Hulka B.S., Margolin B.H., Truong Y.K., Hu P.C., Schramm M.M., Griffith J.D., McCann M., Everson R.B.: Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am. J. Public Health*, 1993; 83: 1335–1338
- [70] Wall M.A., Johnson J., Jacob P., Benowitz N.L.: Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers. *Am. J. Public Health*, 1988; 78: 699–701
- [71] Yamanaka H., Nakajima M., Nishimura K., Yoshida R., Fukami T., Katoh M., Yokoi T.: Metabolic profile of nicotine in subjects whose CYP2A6 gene is deleted. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004; 22: 419–425
- [72] Yildiz D.: Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon*, 2004; 43: 619–632
- [73] Zhang W., Kilcarslan T., Tyndale R.F., Sellers E.M.: Evaluation of methoxsalen, tranylcypromine, and tryptamine as specific and selective CYP2A6 inhibitors *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; 29: 897–902

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.