
REZUMAT TEZĂ DOCTORAT

Efectele fumatului asupra sarcinii

Doctorand **Daniela Bodnar (Pintican)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Dan Mihu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Pintican Daniela**, Mișu Dan. Influence of smoking on exercise capacity. *Palestrica Mileniului III*. 2015; 16(2): 164-171. *CNCSIS B+ (review cuprins în capitolul 1 – Stadiul actual al cunoașterii)*
2. **Pintican Daniela**, Strilciuc Ștefan, Mișu Dan. Prenatal exposure to nicotine: the effect of dietary supplements on the levels of IL-1 α , IL-6 and TNF α expression in the brain, lung and placenta of rats. *Obșterica și Ginecologia*. 2017; 4: 211- 218. *CNCSIS B+(studiu cuprins în capitolul 4 – Contribuția personală)*
3. **Pintican Daniela**, Strilciuc Ștefan, Mișu Dan. The effect of alcohol exposure on the liver and foetal myocardium. *Perinatologia*. 2017; DOI: 10.26416/Peri.1.2.2017.833. *CNCSIS B+ (studiu cuprins în capitolul 3 – Contribuția personală)*
4. **Pintican Daniela**, C.Iușas, Alexandra-Andreea Poienar, R.Mocan-Hognogi, Dan Mișu. Effects of caffeine exposure on fetal liver and myocardium. *Obșterica și Ginecologia*. 2018; 4: 171-175. *CNCSIS B+(studiu cuprins în capitolul 3 – Contribuția personală)*
5. **Pintican Daniela**, Alexandra-Andreea Poienar, Dan Mișu. Impact of smoking during pregnancy over the clinical parameters of the new-born: the importance of counselling. *Proceedings of SOGR*. 2018; 662-667. *ISI proceedings (studiu cuprins în capitolul 6 - Contribuția personală)*
6. **Pintican Daniela**, Alexandra-Andreea Poienar, Ștefan Strilciuc, Dan Mișu. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019; 58(4): 454-459. DOI: 10.1016/j.tjog.2019.05.004. *ISI Factor de impact - 1,2 (studiu cuprins în capitolul 2 – Stadiul actual al cunoașterii)*
7. **Pintican Daniela**, Ștefan Mișu Armean, Ștefan Strilciuc, Dan Mișu, Effects of ethanol, nicotine and caffeine gestational exposure of female rats on lung and brain tissues in fetuses: morphological and biological study. *Romanian journal of morphology and embryology*. 2019; 60(2): 643-651. *ISI Factor de impact - 1,5 (studiu cuprins în capitolul 2 – Stadiul actual al cunoașterii)*

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1. Fumatul	21
1.1. Compoziția fumului de țigară	21
1.1.1. Nicotina	21
1.1.2. Acidul cianhidric	21
1.1.3. Monoxidul de carbon	22
1.2. Prevalența fumatului	22
1.2.1. Prevalența fumatului la nivel global	22
1.2.2. Prevalența fumatului în România	23
1.2.3. Prevalența fumatului la femeile însărcinate	24
2. Efectele fumatului asupra sarcinii	25
2.1. Morfofiziopatologia complicațiilor materno-fetale induse de fumat	25
2.1.1. Morfologie fetoplacentară	25
2.1.1.1. Vilozițiile placentare	25
2.1.1.2. Histomorfometrie	25
2.1.1.3. Morfologie fetală	25
2.1.2. Fiziopatologie	26
2.1.2.1. Volumul sangvin	26
2.1.2.2. Factori genetici	26
2.1.2.3. Bariera fetoplacentară	26
2.2. Efecte asupra organismului matern	27
2.2.1. Reducerea fertilității	27
2.2.2. Avortul spontan	27
2.2.3. Preeclampsia	28
2.3. Efecte asupra organismului fetal	28
2.3.1. Nașterea prematură	28
2.3.2. Restricția de creștere intrauterină	29
2.3.3. Ruperea prematură a membranelor	30
2.3.4. Moarte fetală intrauterină	30
3. Implicații ale citokinelor și stresului oxidativ în complicațiile induse de fumat	33
3.1. Citokinele	33
3.1.1. Interleukina -6	33
3.1.2. Interleukina 1-alpha	34

3.1.3. Interleukina-23	35
3.1.4. TNF-alfa	35
3.1.5. Citokinele și fumatul	36
3.2. Stresul oxidativ	36
3.2.1. Indicatorii pentru stresul oxidativ	36
3.2.1.1. Malondialdehida	36
3.2.1.2. Proteinele Carbonilate	37
3.2.2. Indicatorii apărării antioxidante	37
3.2.2.1. Glutationul redus	37
3.2.2.2. Grupările tiol totale	37
Contribuția personală	39
1. Ipoteza de lucru/obiective	41
2. Metodologie generală	43
3. Studiul 1 - Evaluarea markerilor stresului oxidativ din creier și plămâni la feții proveniți de la femele de șobolani expuse la nicotină	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	47
3.3. Material și metodă	48
3.4. Rezultate	49
3.5. Discuții	57
3.6. Concluzii	59
4. Studiul 2 - Expunerea perigestațională la nicotină: Rolul suplimentelor nutritive în expresia IL-1α, IL-6 și TNFα în creier, plămân și placenta la șobolani	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	61
4.3. Material și metodă	62
4.4. Rezultate	63
4.5. Discuții	70
4.6. Concluzii	71
5. Studiul 3 - Nivelul IL1-α, IL 6 și IL 23 în sângele din cordonul ombilical la gravidele fumătoare în relație cu nivelul plasmatic al cotininei	73
5.1. Introducere	73
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	73

5.3. Material și metodă	74
5.4. Rezultate	75
5.5. Discuții	77
5.6. Concluzii	79
6. Studiul 4 - Impactul fumatului în sarcină asupra parametrilor clinici ai nou născutului:importanța consilierii	81
5.1. Introducere	81
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
5.3. Material și metodă	81
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	88
5.6. Concluzii	89
7. Concluzii generale	91
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	93
REFERINȚE	95

Cuvinte cheie: sarcină, fumat, stres oxidativ, consiliere sarcină, gravide la termen, pregestație, cordon ombilical, țesut cerebral, țesut pulmonar, placentă, citokine, nicotină, cotinină,

INTRODUCERE

Fumatul în timpul sarcinii reprezintă una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică la nivel global. Având în vedere că aproximativ 20% din femei fumează în timpul sarcinii, sunt necesare studii aprofundate care să demonstreze efectele negative ale fumatului în sarcină asupra produsului de concepție. Se impune cunoașterea mecanismelor de producere ale acestor efecte precum și căutarea unor soluții de diminuare, renunțare la toxice și nu în ultimul rând implementarea unei terapii profilactice în timpul sarcinii la femeile care continuă să fumeze.

Studiile realizate până în prezent sugerează că stresul oxidativ și răspunsul inflamator sunt implicați în apariția complicațiilor decelate în timpul sarcinii. Pe lângă implicarea în procesele fiziopatologice de apariție a acestor complicații, stresul oxidativ se manifestă și la nivelul interfeței materno-fetale încă de la debutul sarcinii, influențând dezvoltarea normală a placentei.

Datorită mecanismelor multiple prin care pot să apară complicațiile date de fumat în sarcină, există un interes deosebit pentru utilizarea unor teste predictive care pot să determine markerii, încă de la naștere în sangele din cordonul ombilical, pentru a avea o urmărire cât mai riguroasă a copiilor proveniți din mame fumătoare.

Având în vedere considerentele amintite, studiul nostru a încercat să aprecieze existența unor markeri biochimici care pot fi detectați precoce, de la naștere, cu urmărirea în dinamică a acestora și monitorizarea mai atentă a copiilor cu predispoziție de a dezvolta complicații pe termen lung.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Compușii rezultați din fumat, cu efecte nocive asupra sarcinii

Nicotina reprezintă cel mai patogen compus din fumul de țigară, fiind substanța adictivă cu efecte asupra creierului și funcțiilor neurologice, în special asupra sistemului nervos simpatic, prin stimularea receptorilor specifici ai acetilcolinei¹. Acești receptori sunt localizați și în placenta umană normală, iar stimularea lor de către nicotină influențează dezvoltarea celulelor și sinteza proteinelor. Influența asupra acestor receptori contribuie la apariția efectelor negative ale fumatului, precum vasoconstricția, calcificarea, restricția țesutului de creștere și apariția necrozei².

Cantități mici de cianura care se combina cu vitamina B12, blochează activitatea enzimelor implicate în respirația celulară, astfel cantitatea de vitamina B12 este mai scăzută la femeile care fumează^{3,4}.

Monoxidul de carbon, prezintă afinitate crescută pentru hemoglobină, rezultând carboxihemoglobina⁵.

2. Efectele fumatului asupra evoluției sarcinii

Fumatul afectează formarea vilozităților placentare încă din primul trimestru de sarcină. Astfel, greutatea placentei la femeile fumătoare este mai scăzută. Morbiditatea perinatală asociată cu fumatul este determinată de ischemie și/sau efectele directe ale compușilor din fumul de țigară. Principalul efect asupra morfologiei fătului este restricția de creștere^{6,7}.

Scăderea funcțiilor biologice ale placentei determină dezvoltare insuficientă a masei placentare. Substanțele chimice din fumul de țigară au impact direct asupra placentei, alterând proliferarea și diferențierea trofoblastului, indirect prin alterarea proprietăților mecanice ale vascularizației vilozitare cu reducerea fluxului sanguin în circulația ombilico-placentară^{8,9}.

Cele mai multe toxine rezultate în fumul de țigară au greutate moleculară mică și solubilitate crescută în apă, traversând cu ușurință placenta. Nicotina și cotinina traversează libere la făt, care va fi expus la o concentrație mai mare de nicotină decât mama¹⁰.

Cadmiul, constituent major al fumului de țigară, este transferat ușor de la mamă la făt prin placentă. Acumularea lui în placentă este asociată cu reducerea nivelului de progesteron la fumătoare comparativ cu mamele nefumătoare⁶.

3.Efectele fumatului asupra organismului matern

Fumatul crește riscul de infertilitate începând de la consumul a 15 țig/zi, afectând foliculogeneza, steroidogeneza, transportul embrionar, receptivitatea endometrului, angiogeneza endometrială, fluxul sanguin uterin și miometrul¹¹.

Fumatul crește riscul de avort spontan datorită inhibării de către nicotină a invaziei citotrofoblastului¹².

Nicotina poate reduce volumul plasmatic prin influențarea producerii de prostaglandine, care sunt cunoscute a fi vasoconstrictoare, dar poate și să reducă nivelul stresului oxidativ prin dereglarea sistemelor antioxidante în placentă, care pot avea ca rezultat reducerea preeclampsiei^{13,14}.

4.Implicații ale citokinelor și stresului oxidativ în complicațiile induse de fumat

Răspunsul cronic inflamator și răspunsul imunitar joacă un rol cheie în dezvoltarea și progresia bolilor legate de fumat. Mecanismele acestor boli includ producția necorespunzătoare de citokine inflamatorii și generarea de diferite specii reactive de oxigen (ROS) precum și specii reactive de azot (RNS), care pot inactiva mecanismele antioxidante endogene. Studiile au demonstrat că și la persoanele sănătoase fumătoare, în urma proceselor oxidative excesive, se înregistrează creșterea unor citokine proinflamatorii precum IL-6 și TNF-alpha^{15,16}.

Mai mult decât atât, nivelul de citokine proinflamatorii IL-6, IL-1 și TNFalfa sunt crescute în aproape toate procesele inflamatorii, fiind recunoscute ca și ținte valoroase în intervențiile terapeutice¹⁶.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Studiul 1. Evaluarea markerilor stresului oxidativ din creier și plămâni la feți proveniți de la femele de șobolani expuse la nicotină

Obiective

- evaluarea efectelor nicotinei asupra produsului de concepție, atât în cazul unei expuneri cronice la nicotină, cât și în cazul expunerii pe perioada sarcinii.
- evaluarea markerilor prooxidanți și antioxidanți în țesutul pulmonar și cerebral fetal după expunerea femelelor gestante la fum de țigară.

Material si metodă

Designul studiului a fost de tip prospectiv longitudinal, fiind incluși 30 de șobolani femele și feteșii acestora, care au fost împărțiți în 3 loturi, după cum urmează:

- **Lotul I (lot control)** - fete rezultate de la femele la care nu li s-a administrat nici o substanță.
- **Lotul II** – fete rezultate de la femele la care s-a administrat nicotină timp de 20 zile pe perioada gestației.
- **Lotul III** - fete rezultate de la femele la care s-a administrat nicotină timp de 50 zile (30 zile pregestație și 20 zile pe durata gestației).

Administrarea nicotinei s-a făcut prin gavaj oro-faringian, soluție cu nicotină. Pregătirea animalelor pentru gestație s-a făcut după metoda Ladoși, adaptată pentru rozătoare.

Extragerea feților s-a realizat în ziua 20 de gestație ,prin operație cezariană de la șobolani femele anesteziate cu Ketamină – Silazină (2:1).Recoltarea țesuturilor de la feți , creier,plămân și placentă, s-a făcut în vederea determinărilor biochimice .La terminarea experimentului, animalele au fost eutanasiate cu supradoză de Ketamină 10%.

Rezultate

La analiza statistică a valorilor MDA,PC (markerii prooxidanți) și SH,GSH(markeri entioxidanți) la nivelul tesutului pulmonar fetal nu au fost observate diferențe statistic semnificative între loturi($p > 0,05$).

La nivelul tesutului cerebral au fost observate diferențe intens semnificative între loturi ($p < 0,001$) atât pentru markerii prooxidanți(MDA,PC) fiind corelație pozitivă cu administrarea de nicotină cât și pentru markerii antioxidanți(GSH,SH) fiind corelație negativă.

Concluzie

Nicotina administrată pe perioada gestației cât și pregetați-gestație determină stres oxidativ la nivelul țesutului cerebral al feților prin creșterea markerilor prooxidanți și scăderea activității markerilor antioxidanți.

Studiu 2. Expunerea perigestațională la nicotină: Rolul suplimentelor nutritive în expresia IL-1 α , IL-6 și TNF α în creier, plămân și placentă la șobolani

Obiective

- rolul suplimentelor nutritive (Seleniu, VitaminaE) asupra nivelurilor expresiei IL-1 α , IL-6 și TNF α , la feți, după expunerea perigestațională la nicotină a femelelor de șobolani.

Material și metodă

Designul studiului a fost de tip prospectiv longitudinal, fiind incluși 30 de șobolani femele și feteșii fetușii acestora care au fost împărțiți astfel:

- Lot I – martor
- Lot II - administrare nicotină timp de 50 de zile (30 zile anterior perioadei de gestație + 20 zile în perioada de gestație)
- Lotul III - administrare nicotină timp de 50 de zile și Selevit.

S-a realizat pregătirea animalelor pentru gestație, administrarea de nicotină și extragerea feților conform tehnicii descrise în metodologia de la studiul 1.

Rezultate

La analiza statistică a valorilor **IL-1**, **IL-6**, **TNF α** au fost observate diferențe statistic intens semnificative între loturi ($p < 0,001$), la nivelul țesutului cerebral fetal. La nivelul țesutului placentar au fost observate diferențe intens semnificative între loturi($p < 0,001$),

Un important rezultat al acestui studiu a fost observat pentru IL-6: în aproape toate cazurile (n=9), suplimentarea cu Se și VE a înregistrat valori scăzute în comparație cu lotul II de expunere.

Concluzii

Toate grupurile de studiu au înregistrat creșteri ale nivelurilor citokinelor în cazul expunerii la nicotină.

Administrarea perinatală a suplimentelor a fost asociată cu un nivel scăzut de IL-6 în comparație cu grupul de control și cel de expunere pentru toate tipurile de eșantioane analizate: omogenat de creier, plămân și placentă.

Studiu 3. Nivelul IL1- α , IL 6 și IL 23 în sângele din cordonul ombilical la gravidele fumătoare în relație cu nivelul plasmatic al cotininei

Obiective

- evaluarea valorilor markerilor inflamatori în relație cu valorile cotininei în sângele din cordonul ombilical.
- determinarea cotininei care este un biomarker specific al consumului real de țigări, în special la femeile gravide, datorită reticienței gravidei de a declara numărul real de țigări.

Material și metodă

Studiul reprezintă o analiză prospectivă de tip caz-control care include 88 paciente aflate în trimestrul III de sarcină fără patologii asociate, împărțite în două loturi după cum urmează:

- **Lotul I (lot control)** - 40 gravide nefumătoare cu vârsta cuprinsă între 18 și 43 ani,
- **Lotul II** - 48 gravide fumătoare cu vârsta cuprinsă între 15 și 39 ani

Sublotul IIa - gravide fumătoare a căror sarcină a fost corect dispensarizată;

Sublotul IIb - gravide fumătoare a căror sarcină nu a fost dispensarizată.

Pentru fiecare pacientă inclusă în studiu s-a obținut consimțământul informat, după care s-a realizat o fișă de lucru (buletin standardizat) care a cuprins următorii parametri: vârsta de la care fumează, vârsta înrolării în studiu, mediu, nivel de educație, alergii, paritate, indice de masă corporală (IMC), câștig ponderal pe perioada sarcinii, numărul de țigări/trimestru, dispensarizarea corectă a sarcinii, durata travaliului, vârsta gestațională la naștere, greutate nou-născut, perimetrul cranian (PC), perimetrul toracic (PT), scor Apgar la 1 minut, scor Apgar la 5 minute. Imediat după naștere, s-a recoltat sânge din cordonul ombilical pentru determinarea parametrilor biochimici studiați. S-a realizat o bază de date care cuprinde:

-caracteristicile pacientelor și nou născuților, valorile markerilor inflamatori și ai cotininei.

În cadrul studiului au fost determinați următorii parametri:

- Concentrațiile serice ale IL-1 α , IL-6 și IL-23 din ser, cu ajutorul kit-ului ELISA.
- Nivelul cotininei serice cu ajutorul kit-ului ELISA

Rezultate

La analiza statistică a **cotininei**, au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$) și diferențe statistic foarte semnificative între cele două subloturi de paciente fumătoare ($p < 0,01$).

La analiza statistică *pentru probe neperechi* a **interleukinei 6 (IL-6)**, au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$) dar nu au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două subloturi de paciente fumătoare ($p > 0,05$).

La analiza statistică a **interleukinei 1 α (IL-1 α)**, nu au fost observate diferențe statistic semnificative nici între cele două loturi și nici între cele două subloturi de paciente fumătoare ($p > 0,05$).

La analiza statistică a **interleukinei 23 (IL-23)**, au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două loturi ($p < 0,05$) dar nu au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două subloturi de paciente fumătoare ($p > 0,05$).

Concluzie

Autoraportarea numărului de țigări consumate în sarcină este suficientă pentru încadrarea gravidelor în fumătoare active și nefumătoare.

Gravidele fumătoare au declarat un număr mai redus de țigări decât cel real ceea ce a confirmat că este necesară dozarea cotininei serice pentru o apreciere corectă. Valorile IL-1 α nu au fost modificate la feții proveniți de la mame fumătoare comparativ cu nefumătoare.

Valorile IL-6 și IL-23 au fost semnificativ crescute la feții proveniți de la mame fumătoare comparativ cu nefumătoare

Studiul 4. Impactul fumatului în sarcină asupra parametrilor clinici ai nou născutului: importanța consilierii

Obiective

- evaluarea caracteristicile socio-demografice ale femeilor gravide fumătoare;
- influența fumatului asupra parametrilor clinici ai nou-născutului;
- modul în care consilierea gravidei, în scopul renunțării la fumat, are efect asupra reducerii sau renunțării la fumat.

Material și metodă

Au fost incluse 88 paciente care au fost împărțite în 3 loturi, conform descrierii din metodologia de la studiul 3.

Rezultate

La analiza statistică a nivelului de educație al pacientelor, au fost observate diferențe statistic intens semnificative între lotul de nefumătoare și fumătoare și între gravidele fumătoare dispensarizate și nedispensarizate ($p < 0,001$).

Repartizarea pacientelor în funcție de absolvirea sau nu a studiilor liceale a arătat o asociere statistic semnificativă a pacientelor din lotul II cu lipsa studiilor sau cu absolvirea de studii primare, gimnaziale sau postliceale ($p < 0,05$). Nici o pacientă nedispensarizată nu a absolvit studii liceale și, prin comparație cu pacientele dispensarizate, a fost observată o asociere statistic semnificativă a pacientelor din subplotul IIb cu lipsa studiilor sau cu absolvirea de studii primare, gimnaziale sau postliceale ($p < 0,05$).

Repartizarea pacientelor în funcție de **mediul de proveniență** a arătat o asociere statistic semnificativă a pacientelor fuătoare cu mediul rural ($p < 0,05$). De asemenea, a fost observată o asociere statistic semnificativă a pacientelor fumătoare, gravide nedispensarizate cu mediul rural ($p < 0,05$).

La analiza statistică a valorilor **masei corporale a nou-născuților** proveniți din pacientele studiate, au fost observate diferențe statistic foarte semnificative între loturile I-II și, de asemenea, între subploturile IIa-IIb ($p < 0,01$).

La analiza statistică a valorilor PC,PT și scorul Apgar la 5 minute a nou-născuților proveniți din pacientele studiate, au fost observate diferențe statistic intens semnificative între loturile I-II ($p < 0,001$) și diferențe statistic semnificative între subploturile IIa-IIb ($p < 0,05$).

La analiza statistică a numărului total de țigări fumate în cele trei trimestre de sarcină, au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două subploturi în trimestrul I de sarcină ($p < 0,05$) dar nu au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două subploturi în trimestrele II și III de sarcină și nici pentru întreaga perioadă de sarcină ($p > 0,05$).

Concluzii

- Consilierea nu a avut efect, pacientele nu au renunțat și nu au redus numărul de țigări.
- Greutatea la naștere, perimetrului cranian, perimetrul toracic și scorul Apgar la 5 minute au fost influențate de fumat.
- Gravidele fumătoare au statut socio-economic redus, proveniență mediu rural, nivel de educație redus.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea studiului constă în analiza unor markeri biochimici, atât experimental cât și clinic, care pot fi detectați precoce, de la naștere, cu urmărirea în dinamică a acestora și monitorizarea mai atentă a copiilor cu predispoziție de a dezvolta complicații pe termen lung.

Prin lucrarea de față, s-a încercat determinarea markerilor stresului oxidativ (MDA, PC, GSH,SH) la nivelul organelor fetale (creier, plămân). Acest studiu este printre primele studii care au realizat determinarea markerilor stresului oxidativ din omogenatul tisular de creier și plămân fetal.

Originalitate cercetării este susținută și prin evaluarea nivelurilor serice de IL-23 în sângele din cordonul ombilical la naștere în raport cu fumatul matern.

Studiul de față deschide noi oportunități de cercetare în ceea ce privește efectele terapiei antioxidante în scopul prevenirii efectelor negative ale fumatului .

Rezultatele obținute nu confirmă în totalitate studiile efectuate până la ora actuală, astfel că studii viitoare sunt necesare pentru clarificarea implicațiilor citokinelor și markerilor stresului oxidativ în patogeneza complicațiilor induse de fumat.

REFERINȚE

1. Machaalani R, Ghazavi E, Hinton T et al. Cigarette smoking during pregnancy regulates the expression of specific nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in the human placenta. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;276(3):204-212.
2. M. R. Picciotto, Y. S. Mineur. Molecules and circuits involved in nicotine addiction: the many faces of smoking. *Neuropharmacology*. 2014;76:545-553.
3. Blackledge WC, Griesel A, Mahon SB et al. A New Facile Method to Measure Cyanide in Blood. *Anal Chem*. 2010; 82(10): 4216-4221.
4. McGarry JM, Joan Andrews. Smoking in pregnancy and vitamin B12 metabolism. *Br Med J*. 1972; 2(5805): 74-77.
5. Christova T, Diankova Z, Setchenska M. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway as a physiological regulator of vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 2000;25(1):9-17.
6. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the fetoplacental unit. *Early Hum Dev*. 2007;83(11):699-706.
7. Pintican Daniela, Alexandra-Andreea Poienar, Stefan Strilciuc, Dan Miha. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019;58(4):454-459.
8. Ortigosa S, Friguls B, Joya X, Martinez S, Marinoso ML et al. Fetoplacental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. *Reproductive Toxicology*. 2012;34(1):73-79.
9. Man J, Hutchinson JC, Heazell AE et al. Stillbirth and intrauterine fetal death: role of routine histopathological placental findings to determine cause of death. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;48(5):579-584.
10. Andriani H, Kuo HW. Adverse effects of prenatal smoking during pregnancy in urban and rural areas. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2014;14:414-429.
11. Stilmann RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986; 46:545-566.
12. Beth L. Pineles, Edward Park, Jonathan M. Samet. Systematic Review and Meta-Analysis of Miscarriage and Maternal Exposure to Tobacco Smoke During Pregnancy. *Am J Epidemiol*. 2014;179(7): 807-823.
13. Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*. 2000;14:208-219.

14. England L, Zhang J. Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. *Front Biosci.* 2007;12:2471–2483.
15. Rincon M, Irvin CG Role of IL6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1281-1290.
16. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest.* 2011;121:3375–3383.

PHD THESIS SUMMARY

The effects of smoking on pregnancy

Doctorand **Daniela Bodnar (Pintican)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Dan Mișu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published *in extenso* as a result of the doctoral research

8. Pintican Daniela, Mihi Dan. Influence of smoking on exercise capacity. *Palestrica Mileniului III*. 2015; 16(2): 164-171. *CNCSIS B+(review comprised in chapter 1)*.
9. Pintican Daniela, Strilciuc Stefan, Mihi Dan. Prenatal exposure to nicotine: the effect of dietary supplements on the levels of IL-1 α , IL-6 and TNF α expression in the brain, lung and placenta of rats. *Obstetrica si Ginecologia*.2017; 4: 211-218. *CNCSIS B+(study comprised in chapter 4)*.
10. Pintican Daniela, Strilciuc Stefan, Mihi Dan. The effect of alcohol exposure on the liver and foetal myocardium. *Perinatologia*. 2017;**DOI**: 10.26416/Peri.1.2.2017.833(*study comprised in chapter 3*).
11. Pintican Daniela, C.Iuhas, Alexandra-Andreea Poienar, R.Mocan-Hognogi, Dan Mihi.Effects of caffeine exposure on fetal liver and myocardium.*Obstetrica si Ginecologia*.2018;4:171-175 .*CNCSIS B+(study comprised in chapter 3)*.
12. Pintican Daniela, Alexandra-Andreea Poienar, Dan Mihi. Impact of smoking during pregnancy over the clinical parameters of the new-born: the importance of counselling.*Proceedings of SOGR*.2018;662-667. *ISI proceedings(study comprised in chapter 6)*.
13. Pintican Daniela, Alexandra-Andreea Poienar, Stefan Strilciuc, Dan Mihi.Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review.*Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*.2019;58(4):454-459.DOI:10.1016/j.tjog.2019.05.004.*ISI Impact factor - 1,2(study comprised in chapter 2)*.
14. Pintican Daniela, Sebastian Mihai Armean, Stefan Strilciuc, Dan Mihi, Effects of ethanol, nicotine and caffeine gestational exposure of female rats on lung and brain tissues in fetuses: morphological and biological study. *Romanian journal of morphology and embryology*. 2019; 60(2):643-651.*ISI Impact factor - 1,5 (study comprised in chapter 3)*.

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. Smoking	19
1.1. Compounds of cigarette smoke	21
1.1.1. Nicotine	21
1.1.2. Hydrogen cyanide	21
1.1.3. Carbon monoxide	22
1.2. Prevalence of smoking	22
1.2.1. Prevalence of smoking at global level	22
1.2.2. Prevalence of smoking in Romania	23
1.2.3. Prevalence of smoking in pregnant women	24
2. Effects of smoking on pregnancy	25
2.1. Morpho-physiopathology of smoking-induced maternal-foetal complications	25
2.1.1. Foetal-placental morphology	25
2.1.1.1. Placental villi	25
2.1.1.2. Histomorphometry	25
2.1.1.3. Foetal morphology	25
2.1.2. Physiopathology	26
2.1.2.1. Blood volume	26
2.1.2.2. Genetic factors	26
2.1.2.3. Foetal-placental barrier	26
2.2. Effects on the mother's body	27
2.2.1. Decrease in fertility	27
2.2.2. Spontaneous abortion	27
2.2.3. Preeclampsia	28
2.3. Effects on the foetal body	28
2.3.1. Premature birth	28
2.3.2. Intrauterine growth restriction	29
2.3.3. Premature rupture of membranes	30
2.3.4. Intrauterine foetal death	30
3. The role of cytokines and oxidative stress in smoking-induced complications	33

3.1. Cytokines	33
3.1.1. Interleukin-6	33
3.1.2. Interleukin 1-alpha	34
3.1.3. Interleukin-23	35
3.1.4. TNF-alpha	35
3.1.5. Cytokines and smoking	36
3.2. Oxidative stress	36
3.2.1. Indicators for oxidative stress	36
3.2.1.1. Malondialdehyde	36
3.2.2. Carbonylated proteins	37
3.2.2. Indicators of antioxidant defence	37
3.2.2.1. Low glutathione	37
3.2.2.2. Total thiol groups	37

Own contribution

1. Working hypothesis/objectives	41
2. General methodology	42
3. Study 1 – Evaluation of oxidative stress markers in the brain and lungs of fetuses from nicotine-exposed female rats	47
3.1. Introduction	47
3.2. Working hypothesis/objectives	47
3.3. Material and method	48
3.4. Results	50
3.5. Discussions	57
3.6. Conclusions	59
4. Study 2 – Perigestational exposure to nicotine: the role of dietary supplements in the expression of IL-1α, IL-6 and TNFα in the brain, lung and placenta, in rats	61
4.1. Introduction	61
4.2. Working hypothesis/objectives	61
4.3. Material and method	62
4.4. Results	63
4.5. Discussions	70
4.6. Conclusions	71

5. Study 3 - IL1-α, IL 6 and IL 23 levels in the umbilical cord blood of smoking pregnant women in relation to the plasmatic levels of cotinine	
5.1. Introduction	73
5.2. Working hypothesis/objectives	73
5.3. Material and method	74
5.4. Results	75
5.5. Discussions	77
5.6. Conclusions	79
6. Study 4 - The impact of smoking during pregnancy on the clinical parameters of the newborn: the importance of counselling	81
5.1. Introduction	81
5.2. Working hypothesis/objectives	81
5.3. Material and method	81
5.4. Results	82
5.5. Discussions	88
5.6. Conclusions	89
7. General conclusions	91
8. Originality and innovative contributions of the thesis	93
REFERENCES	95

Keywords: pregnancy, smoking, oxidative stress, counselling pregnancy, pregnant term, umbilical cord, brain tissue, placenta, cytokine, nicotine, cotinine

INTRODUCTION

Smoking during pregnancy is one of the most severe public health problems at global level. Given that approximately 20% of women smoke during pregnancy, it is necessary to conduct in-depth studies that demonstrate the negative effects of smoking during pregnancy on the products of conception. It is important to become aware of the mechanisms that engender such effects, as well as to seek a solution in order to reduce or renounce toxic substances and, not least, to implement prophylactic therapies during pregnancy in women who continue to smoke.

The studies conducted to date suggest that oxidative stress and inflammatory response are involved in the occurrence of complications revealed during pregnancy. Apart from its involvement in the physio-pathological processes leading to these complications, oxidative stress also manifests itself at the level of the maternal-foetal interface from the onset of pregnancy, thus influencing the normal development of the placenta.

Due to the multiple mechanisms through which smoking-induced complications can appear during pregnancy, there is particular interest in using predictive tests that can determine their markers, since birth, in the blood from the umbilical cord, in order to exert a rigorous follow-up on the children born by smoking mothers.

In the light of the aforementioned considerations, our study has attempted to assess the existence of biochemical markers which can be detected early, since birth, through the dynamic follow-up thereof and a closer monitoring of the children exhibiting a predisposition to develop complications in the long term.

STATE OF THE ART

3. Compounds resulting from smoking, with damaging effects on pregnancy

Nicotine is the most pathogenic compound in cigarette smoke, as it is an addictive substance with effects on the brain and neurological functions, especially on the sympathetic nervous system, through the stimulation of specific receptors of acetyl-nicotine¹. These receptors are also located in the normal human placenta, and their stimulation by nicotine influences the development of cells and the synthesis of proteins. Its influence on these receptors contributes to the occurrence of negative effects of smoking, such as vasoconstriction, calcification, growth tissue restriction and necrosis².

Small amounts of cyanide combining with vitamin B12 block the activity of the enzymes involved in cellular respiration, so that the amount of vitamin B12 is lower in smoking females^{3,4}.

Carbon monoxide exhibits a high propensity for haemoglobin, resulting in carboxyhaemoglobin⁵.

4. Effects of smoking on the evolution of pregnancy

Smoking affects the formation of placental villi from the first trimester of pregnancy. Thus, the weight of the placenta in smoking women is lower. Perinatal morbidity associated with smoking is determined by ischemia and/or by the direct effects of the compounds of cigarette smoke. The main effect on the morphology of the foetus is growth restriction^{6,7}.

The decrease in biological functions of the placenta triggers the insufficient development of the placental mass. Chemicals in cigarette smoke have a direct impact on the placenta, by damaging the proliferation and differentiation of trophoblast, and an indirect one, through the altering of the mechanical properties of villous vascularity and the reduction of the blood flow in umbilical-placental circulation^{8,9}.

Most toxins resulting from cigarette smoke have a small molecular weight and a high solubility in water, thus easily breaching the placenta. Nicotine and cotinine are

free to reach the foetus, who will be exposed to a higher concentration of nicotine than the mother¹⁰.

Cadmium, a major compound of cigarette smoke, is easily transferred from the mother to the foetus, through the placenta. Its accumulation within the placenta is associated with a decrease in the levels of progesterone in smoking mothers, compared to non-smoking ones⁶.

3. Effects of smoking on the mother's body

Smoking increases the risk of infertility starting with the consumption of 15 cigarettes/day, which affects folliculogenesis, steroidogenesis, embryo transport, endometrial receptivity, endometrial angiogenesis, uterine blood flow and the myometrium¹¹.

Smoking increases the risk of spontaneous abortion due to the inhibition by nicotine of the invasion of the cytotrophoblast¹².

Nicotine can reduce plasma levels by influencing the production of prostaglandins, which are known to be vasoconstrictors, but it can also decrease the levels of oxidative stress by unbalancing the antioxidant systems within the placenta, which can result in the reduction of preeclampsia^{13,14}.

4. The role of cytokines and oxidative stress in smoking-induced complications

Chronic inflammation response and immune response play a key role in the development and progression of smoking-related illnesses. The mechanisms of such illnesses include the inappropriate production of inflammatory cytokines and the generation of various reactive oxygen species (ROS), as well as reactive nitrogen species (RNS), which can deactivate the endogenous antioxidant mechanisms. Studies have demonstrated that even in healthy smokers, following excessive oxidative processes, an increase in proinflammatory cytokines is registered, such as IL-6 and TNF-alpha^{15,16}.

Furthermore, the levels of IL-6, IL-1 and TNF-alpha proinflammatory cytokines are raised in almost all inflammatory processes, which is recognised as a valuable target in therapeutic interventions¹⁶.

OWN CONTRIBUTION

2. Study 1. Evaluation of oxidative stress markers in the brain and lungs of foetuses from nicotine-exposed female rats

Objectives

- to evaluate the effects of nicotine on the products of conception, both in the case of chronic exposure to nicotine, and in that of exposure during pregnancy.
- to evaluate prooxidant and antioxidant markers in pulmonary and cerebral tissue after the exposure of pregnant females to cigarette smoke.

Material and method

The design of the study was longitudinal prospective, with 30 female rats and their foetuses included therein, which were divided into 3 groups, as follows:

- **Group I (control group)** – foetuses resulting from females that were not administered any substances.
- **Group II** – foetuses resulting from females that were administered nicotine for 20 days during gestation.
- **Group III** – foetuses resulting from females that were administered nicotine for 50 days (30 days prior to gestation and 20 days during gestation).

The administration of nicotine was conducted through oropharyngeal gavage, in the form of nicotine solution. The preparation of the animals for gestation was performed in accordance with the Ladoși method, adapted to rodents.

The extraction of the foetuses was conducted on the 20th day of gestation, through a caesarean performed on females anesthetised with Ketamine-Xylazine (2:1). The harvesting of the tissues from the foetuses – brain, lung and placenta – was conducted in order to achieve biochemical determinations. Upon completing the experiment, the animals were euthanized with a 10% Ketamine overdose.

Results

Upon a statistical analysis of the MDA, PC (prooxidant markers) and SH, GSH (antioxidant markers) at the level of the foetal pulmonary tissue, no statistically significant differences were found among the groups ($p > 0,05$).

At the level of the cerebral tissue, intensely significant differences were noticed among the groups ($p < 0,001$), both for prooxidant markers (MDA, PC), in positive correlation with the administration of nicotine, and for antioxidant markers (GSH, SH), in negative correlation.

Conclusion

Nicotine administered during the gestation period and prior to gestation triggers oxidative stress at the level of the cerebral tissue of the foetuses, through an increase in prooxidant markers and a decrease in the activity of antioxidant markers.

Study 2. Perigestational exposure to nicotine: the role of dietary supplements in the expression of IL-1 α , IL-6 and TNF α in the brain, lung and placenta, in rats

Objective

- to assess the role of dietary supplements (Selenium, Vitamin E) on the levels of expression of IL-1 α , IL-6 and TNF α , in foetuses, following perigestational exposure to nicotine in female rats.

Material and method

The design of the study was longitudinal prospective, with 30 female rats and their foetuses included therein, which were divided as follows:

- Group I – control group.
- Group II – administration of nicotine for 50 days (30 days prior to gestation + 20 days during gestation).
- Group III - administration of nicotine for 50 days and of Selevite.

The preparation of the animals for gestation, the administration of nicotine and the extraction of the foetuses were performed according to the technique described in the methodology of study no. 1.

Results

The statistical analysis of the values of IL-1, IL-6 and TNF α revealed intense statistically significant differences among the groups ($p < 0,001$), at the level of the foetal cerebral tissue. At the level of the placental tissue, intense statistically significant differences were noted among the groups ($p < 0,001$).

An important result of this study was noticed for IL-6: in almost all cases ($n=9$), Se and VE supplementing led to decreased values compared to exposure Group II.

Conclusions

All study groups registered increases in the levels of cytokines, when exposed to nicotine.

Perinatal administration of supplements was associated with decreased levels of IL-6, compared to the control group and the exposure group, for all types of samples analysed: brain, lung and placental homogenate.

Study 3. IL1- α , IL 6 and IL 23 levels in the umbilical cord blood of smoking pregnant women in relation to the plasmatic levels of cotinine

Objectives

- to evaluate the values of inflammation markers in relation to the values of cotinine in umbilical cord blood.
- to determine cotinine, which is a specific biomarker of real cigarette consumption, notably in pregnant women, due to their reluctance to declare the actual number of cigarettes smoked.

Material and method

The study is a control-case prospective analysis which includes 88 patients in the third trimester of pregnancy, with no associated pathologies, divided into two groups, as follows:

- **Group I (control group)** - 40 non-smoking pregnant women aged 18 to 43.
- **Group II** – 48 smoking pregnant women aged 15 to 39.
 - Subgroup IIa** – smoking pregnant women whose pregnancy was properly tracked.
 - Subgroup IIb** - smoking pregnant women whose pregnancy was not tracked.

Informed consent was sought from each patient included in the study, after which a worksheet was drafted (standardised form), comprising the following parameters: age when smoking started, age upon inclusion in the study, origin, level of education, allergies, parity, body mass index (BMI), weight gain during pregnancy, number of cigarettes/trimester, correct tracking of pregnancy, length of labour, gestational age at birth, weight of newborn, head circumference (HC), thoracic circumference (TC), Apgar score at 1 minute, Apgar score at 5 minutes. Immediately after delivery, blood was harvested from the umbilical cord to determine the biochemical parameters studied. A database was compiled, which includes:

-the characteristics of the patients and newborns, the values of inflammation markers and of cotinine.

The following parameters were assessed during the study:

- Serum levels of IL-1 α , IL-6 and IL-23, with the help of the ELISA kit.
- The levels of serum cotinine, with the help of the ELISA kit.

Results

Upon a statistical analysis of **cotinine**, intense statistically significant differences were noticed between the two groups ($p < 0,001$) and very significant statistical differences between the two subgroups of smoking patients ($p < 0,01$).

Upon a statistical analysis *for unpaired samples* of **interleukin 6 (IL-6)**, intense statistically significant differences were noticed between the two groups ($p < 0,001$), but no statistically significant differences were noticed between the two subgroups of smoking patients ($p > 0,05$).

Upon a statistical analysis of **interleukin 1 α (IL-1 α)**, no statistically significant differences were noticed between the two groups, or between the two subgroups of smoking patients ($p > 0,05$).

Upon a statistical analysis of **interleukin 23 (IL-23)**, statistically significant differences were noticed between the two groups ($p < 0,05$), but no statistically significant differences were noticed between the two subgroups of smoking patients ($p > 0,05$).

Conclusions

Self-reporting on the number of cigarettes consumed during pregnancy is sufficient to consider pregnant women as active smokers or non-smokers.

Smoking pregnant women reported a lower number of cigarettes than real, which confirmed that it is necessary to dose serum cotinine for accurate assessment. The values of IL-1 α were unaltered in the case of foetuses coming from smoking mothers, compared to those from non-smokers. The values of IL-6 and IL-23 were significantly higher in the case of foetuses coming from smoking mothers, compared to those from non-smokers.

Study 4. The impact of smoking during pregnancy on the clinical parameters of the newborn: the importance of counselling

Objectives

- to evaluate socio-demographic characteristics of smoking pregnant women.
- to evaluate the influence of smoking on the clinical parameters of the newborn.

- to evaluate the extent to which counselling provided to pregnant women, with a view to stopping smoking, has an effect on reducing or renouncing smoking.

Material and method

A number of 88 patients were included in the study, who were divided into 3 groups, according to the description provided in the methodology of study no. 3

Results

A statistical analysis of the level of education of the patients revealed intense statistically significant differences between the non-smoking and smoking groups, and between tracked and non-tracked smoking pregnant women ($p < 0,001$).

Dividing patients depending on whether they had graduated or not from high school showed a statistically significant association of patients in group II with a lack of studies or with the graduation from elementary, secondary or post-high school studies ($p < 0,05$). None of the non-tracked patients had graduated from high school and, when compared to tracked patients, a statistically significant association was noticed in the case of patients from subgroup IIb with a lack of studies or the graduation from elementary, secondary or post-high school studies ($p < 0,05$).

Dividing patients depending on their **origin** revealed a significant statistical association of smoking patients with the rural environment ($p < 0,05$). Moreover, a statistically significant association was found between non-tracked smoking pregnant patients with the rural environment ($p < 0,05$).

Upon a statistical analysis of the values of **body mass index of the newborns** coming from the patients studied, very significant statistical differences were noted between groups I and II, as well as between subgroups IIa and IIb ($p < 0,01$).

Upon a statistical analysis of the values of PC, PT and the Apgar score at 5 minutes of the newborns coming from the patients studied, intense statistically significant differences occurred between groups I and II ($p < 0,001$), and significant statistical differences between subgroups IIa and IIb ($p < 0,05$).

Upon a statistical analysis of the total number of cigarettes smoked in the three trimesters of pregnancy, statistically significant differences were noticed between the two subgroups in the first trimester of pregnancy ($p < 0,05$), but no statistically significant differences appeared between the two subgroups in the second and third trimesters of pregnancy, or for the entire period of pregnancy ($p > 0,05$).

Conclusions

- Counselling was ineffective, as the patients neither renounced nor reduced the number of cigarettes they smoked.
- Weight at birth, cranial circumference, thoracic circumference and the Apgar score at 5 minutes were influenced by smoking.

- Smoking pregnant women have a poor socio-economic status, a rural background and a low level of education.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of the study lies in the analysis of several biochemical markers, both experimental and clinical, which can be detected early, since birth, with a dynamic follow-up thereof and careful monitoring of the children that are prone to develop long-term complications.

Through this thesis, it was attempted to determine the markers of oxidative stress (MDA, PC, GSH, SH) at the level of foetal organs (brain, lungs). This study is among the first to perform a determination of oxidative stress markers in the foetal brain and lung tissue homogenate.

The originality of the research is also upheld by the evaluation of serum levels of IL-23 in umbilical cord blood at birth, in relation to maternal smoking.

The current study opens up new opportunities for researching the effects of antioxidant therapy with a view to preventing the negative effects of smoking.

The results obtained do not fully confirm the studies conducted to date, which is why future studies are needed in order to clarify the implications of cytokines and oxidative stress markers on the pathogenesis of smoking-induced complications.

REFERENCES

1. Machaalani R, Ghazavi E, Hinton T et al. Cigarette smoking during pregnancy regulates the expression of specific nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in the human placenta. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;276(3):204-212.
2. M. R. Picciotto, Y. S. Mineur. Molecules and circuits involved in nicotine addiction: the many faces of smoking. *Neuropharmacology*. 2014;76:545-553.
3. Blackledge WC, Griesel A, Mahon SB et al. A New Facile Method to Measure Cyanide in Blood. *Anal Chem*. 2010; 82(10): 4216-4221.
4. McGarry JM, Joan Andrews. Smoking in pregnancy and vitamin B12 methabolism. *Br Med J*. 1972; 2(5805): 74-77.
5. Christova T, Diankova Z, Setchenska M. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway as a physiological regulator of vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 2000;25(1):9-17.
6. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the fetoplacental unit. *Early Hum Dev*. 2007;83(11):699-706.
7. Pintican Daniela, Alexandra-Andreea Poienar, Stefan Strilciuc, Dan Miha. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019;58(4):454-459.
8. Ortigosa S, Friguls B, Joya X, Martinez S, Marinoso ML et al. Fetoplacental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. *Reproductive Toxicology*. 2012;34(1):73-79.
9. Man J, Hutchinson JC, Heazell AE et al. Stillbirth and intrauterine fetal death: role of routine histopathological placental findings to determine cause of death. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;48(5):579-584.
10. Andriani H, Kuo HW. Adverse effects of prenatal smoking during pregnancy in urban and rural areas. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2014;14:414-429.
11. Stilmann RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986; 46:545-566.
12. Beth L. Pineles, Edward Park, Jonathan M. Samet. Systematic Review and Meta-Analysis of Miscarriage and Maternal Exposure to Tobacco Smoke During Pregnancy *Am J Epidemiol*. 2014;179(7): 807-823.
13. Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*. 2000;14:208-219.

14. England L, Zhang J. Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. *Front Biosci.* 2007;12:2471-2483.
15. Rincon M, Irvin CG Role of IL6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1281-1290.
16. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest.* 2011;121:3375-3383.