

Sigara İnhalasyonunun Trakea'da Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler Üzerine Melatonin ve C Vitamininin Etkileri

Enver OZAN^{a,1}, Neriman ÇOLAKOĞLU¹, Mehmet Fatih SÖNMEZ¹, Sema OZAN², Seval YILMAZ²,
Bülent TAŞDEMİR², Gonca OZAN³

¹ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı,

² Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,

³ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Amaç: Sigara toksikasyonunun trakea dokusunda oluşturduğu yapısal ve biyokimyasal değişiklikler üzerine C vitamini ve melatoninin koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 24 adet Wistar cinsi ergin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanlar kontrol olarak kullanıldı, ikinci grup sıçanlara sigara inhale ettirildi. Sigara soluyan üçüncü ve dördüncü grup sıçanlara ise hergün sırasıyla melatonin ve C vitamini enjekte edildi. Deney sonunda sıçanlardan eter anestezisi altında trakea dokuları ve kan örnekleri alındı. Dokuların bir kısmı rutin histolojik prosedürlerden geçirilerek ışık mikroskopunda incelendi. Biyokimyasal olarak, malondialdehit (MDA) ve glutatyon düzeyleri ile katalaz aktiviteleri belirlendi.

Bulgular: Işık mikroskopik incelemelerde ikinci gruptaki sıçanların trakea lümeninde kan ve epitelyal hücre döküntüleri, epitel tabakasında apoptozise giden hücrelere ve aktive olmuş granüllü hücrelere rastlandı. Submukozadaki seröz bezlerde aktivasyon tespit edildi. Üçüncü ve dördüncü gruplarda melatonin ve C vitamininin trakea dokusunu sigara toksikasyonuna karşı kısmen koruduğu gözlemlendi. Yapılan biyokimyasal incelemelerde, sigara inhale eden grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı, C vitamini ve melatonin enjeksiyonunun ise artan MDA düzeyini azalttığı saptandı. Katalaz aktivitesi ve glutatyon düzeyi ise sigara inhale eden grupta kontrol grubuna göre düşüş gösterirken, C vitamini ve melatoninin bu düşüşü önemli derecede etkilemediği gözlemlendi.

Sonuç: Sigara inhalasyonunun, lipid peroksidasyonunu ve antioksidan sistemi artırdığı, trakea dokusunda yer yer yapısal değişiklikler oluşturduğu tespit edildi. C vitamini ve melatoninin ise sigara toksikasyonuna karşı kısmen koruma sağladığı gözlemlendi. ©2005, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Trakea, sigara, melatonin, C vitamini, ışık mikroskop

ABSTRACT

Effects of Melatonin and Vitamin C on Cigarette-Induced Structural Changes in the Trachea

Objectives: This study was undertaken to investigate smoke-induced structural and biochemical changes and protective effects of co-administered of melatonin and vitamin C in rat trachea.

Materials and Methods: Twenty-four Wistar female rats were used. Animals were divided into four groups. The first group of rats used as control. The second group of rats were inhaled cigarette. Cigarette inhaled third and fourth group of rats recieved melatonin and vitamin C respectively. At the end of the study trachea tissues and blood samples were taken under the anesthesia. Tissues were prepared and examined by light microscopy. And biochemically, malondialdehyde and glutathione levels and catalase activities were determined.

Results: Microscopically, blood and desquamation of epithelial cells in the tracheal lumen, activated granular cells and apoptotic cells in the epithelial layer and activated serous gland in the submucosal layer were detected in the group II. In the group III and IV melatonin and vitamin C relatively protected the trachea tissue against smoke intoxication. Biochemical examination showed malondialdehyde levels in the group II higher than group I, melatonin and vitamin C injection to group III and IV caused to decrease of malondialdehyde. Glutathione levels and catalase activity in the group II were less than group I. Melatonin and vitamin C injection did not change the decrease of the glutathione levels and catalase activities in group III and IV.

Conclusion: As a result, cigarette inhalation increased lipid peroxidation and antioxidant system and caused structural changes. However, melatonin and vitamin C administration obtained relative protection against smoke. ©2005, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Key words: Trachea, cigarette, melatonin, vitamin C, light microscope

Çevremizde maruz kaldığımız en yaygın toksik maddelerden biri olan sigaranın akciğer, özafagus, mesane, renal pelvis, pankreas, kemik ve serviks kanserlerine neden olduğu rapor edilmektedir (1-2). Sigara organizmada birçok sistemi etkile-

mesine rağmen, özellikle solunum sisteminde toksikasyona yol açmaktadır. Sigara içimi insan fibroblastlarında apoptozis, DNA fragmantasyonu ve oksidatif stresin tetikleyicisidir. Meydana gelen bu değişikliklerin pulmoner amfizeme yol açabileceği rapor edilmektedir (3). Sigara içimi ile artan

^a Yazışma Adresi: Dr. Enver Ozan, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 23119 ELAZIĞ

* II. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi 9-11 Eylül 2004 ELAZIĞ

Tel: 0424 2370000 / 3226

e-mail: eozan@firat.edu.tr

oksidatif stres sonucunda makrofajlarda apoptozisin arttığı ve bu apoptozisin glutatyon, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi anti-oksidanlar tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (4). Sigara dumanı direkt olarak hava yolu epiteline toksik etkilidir. Sigara maruziyeti sonucu hava yolu ödemi, alveolar atelektazi, alveolar ödem, PaO₂'de azalma, malondialdehit (MDA) düzeyinde artma ve katalaz aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (5). Sigara invitro olarak trakeada hızlı bir şekilde lipid peroksidasyonuna neden olur ve bu durum sigara miktarıyla direkt olarak ilişkilidir (6). Sigara 4700 tanımlanmış bileşeniyle kompleks bir karışımdır. Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen örnekleri üretilir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipitleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olmaktadır (7).

Pineal bezin salgısı olan melatoninin sirkadiyen ritmin, uyku, üreme, ruhsal durum ve davranışın düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Değişik serbest radikalleri detoksifiye etmede oldukça etkili olduğu bilinen antioksidan etkiye sahiptir. Kan-beyin ve kan-plasenta bariyerlerini geçebilir ve hücreler boyunca dağılır. Bu özellikleri melatoninin antioksidan etkisini artırmaktadır (8).

Askorbik asit kollajen, karnitin ve nörotransmitter biyosentezi için gerekli olan suda çözünen önemli vitaminlerden biridir. Askorbik asidin antioksidan, anti-aterojenik, anti-karsinojenik ve immunmodulator etkileri vardır. Sigaranın, C vitamini döngüsünü serbest radikaller ve reaktif oksijen ürünleri yoluyla artırdığı bildirilmiştir (9).

Bu çalışmada, sigara toksikasyonu sonucu trakea dokusunda oluşan yapısal ve biyokimyasal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine melatonin ve C vitamininin etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmayla ilgili olarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı ve "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensiplerine uyularak hayvan haklarının korunmasıyla ilgili gereken titizlik gösterildi. Bu çalışmada 24 adet Wistar cinsi ergin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol; ikinci grup 3 ay boyunca günde iki kez 1'er saat ikişer adet sigara (Birinci-Tekel) soluyan; üçüncü grup 3 ay boyunca günde iki kez 1'er saat ikişer adet sigara soluyan ve 4mg/kg intraperitoneal melatonin enjekte edilen; dördüncü grup ise 3 ay boyunca günde iki kez 1'er saat ikişer adet sigara soluyan ve 40mg/kg intraperitoneal C vitamini enjekte edilen sıçanlardan oluşturuldu. Sıçanlara sigara solutmak için ebatları 50x35x36 cm, kalınlığı 0.5 mm ve iç hacmi yaklaşık 0.060m³ olan cam kabin hazırlanarak silikon ile izole edildi. Kabin içine bir ucu dışarıda akvaryum motoruna bağlı olan plastik boru yerleştirildi. Sigara soluyacak olan sıçanlar cam kabin içine alındı. Plastik borunun kabin içindeki ucuna her uygulamada iki adet yanar sigara takılıp motor ile puflandı. Deney sonunda, sıçanlardan eter anestezisi altında trakea dokuları alındı. Trakea dokularının bir kısmı serum fizyolojik (% 0,9'luk NaCl) ile yıkandıktan sonra % 1,15 KCl ile 1:10 oranda sulandırılarak homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 1.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı. MDA düzeyi Ohkawa ve ark. (10)'nın modifiye ettiği yöntemle göre saptandı. Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan bu pembe renk 532 nm'de okunmaktadır.

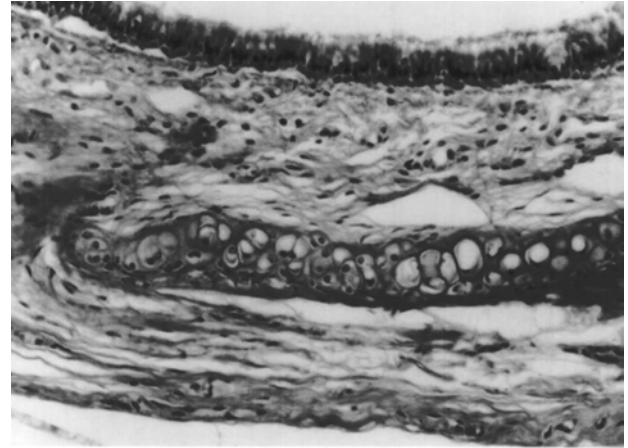
H₂O₂'in katalaz tarafından yıkım hızı, H₂O₂'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak Aebi (11) yöntemi ile ölçüldü. Glutatyon (GSH) düzeyi Elman yöntemine göre tayin edildi (12).

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar için p<0,05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Dokuların bir kısmı ise %10'luk formaldehit ile 24 saat süreyle tespit edildi. Takiben 24 saat boyunca musluk suyunda yıkanan dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon sağlandı. Dokular ksilolde şeffaflaştırıldı ve parafin infiltrasyonu yapıldıktan sonra bloklandı. Parafin bloklardan alınan 5µm kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı ve Olympus BH2 fotomikroskopla incelenerek fotoğraflar elde edildi.

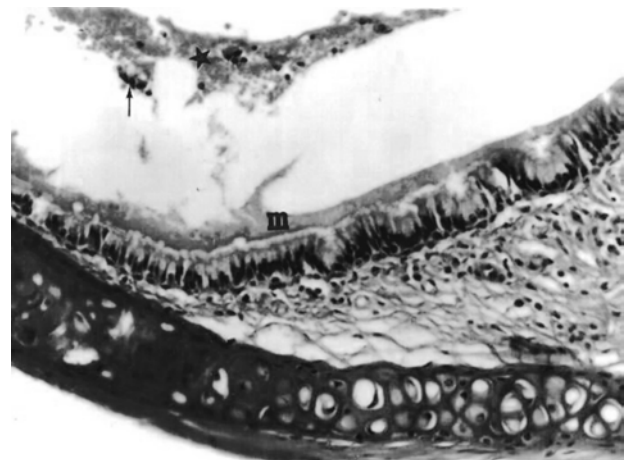
BULGULAR

Kontrol grubuna ait kesitlerde trakea normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1).



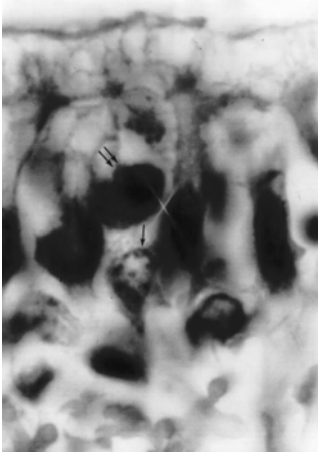
Şekil 1. Kontrol grubu. Trakea normal yapıda izlenmekte. H&E X 10.

Deney süresince sadece sigara soluyan grupta trakea lümeninde kan ve epitelyal hücre dökülmeleri saptandı (Şekil 2).

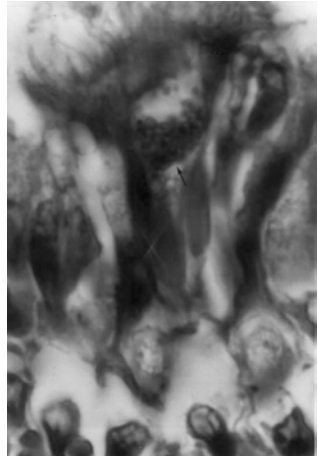


Şekil 2. Grup II. Sigara intoksikasyonu sonucu intratrakeal kanama (*), epitelyal hücre dökülmesi (ok) ve solunum epitelinin apikalinde mukus (m) ayırt edilmekte. H&E X 10.

Trakea epitelinde apoptozise giden hücelere ve granüllü hücelere sıklıkla rastlandı (Şekil 3,4).

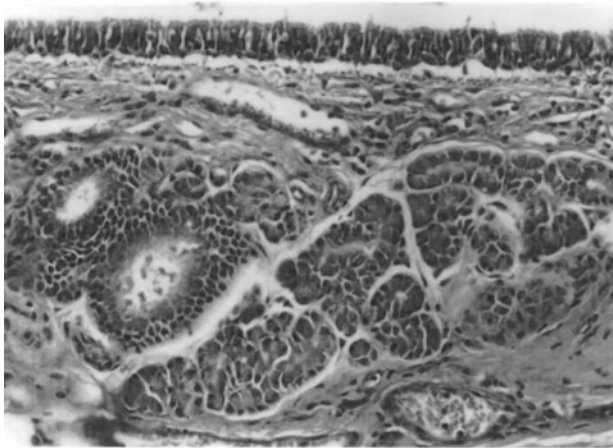


Şekil 3. Grup II. Solunum epitelinde apoptozise giden hücre (tek ok) ve granüllü hücre (çift ok) gözlenmekte. H&E X 100.



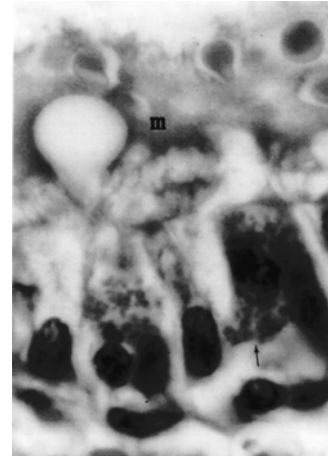
Şekil 4. Grup II. Solunum epitelinde degranüle olan granüllü hücre (ok) izlenmekte. Masson'un üçlü boyası X 100.

Bu grupta ayrıca submukozadaki seröz bezlerin aktive olduğu ayırt edildi (Şekil 5).

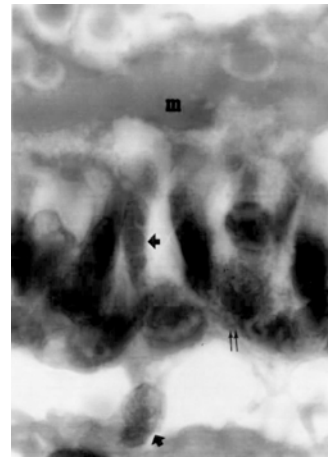


Şekil 5. Grup II. Submukozal bezlerin aktive olduğu ayırt edilmekte. H&E X 20.

Epitelyal hücre dökülmelerine ve granüllü hücre aktivasyonuna sigara ile birlikte melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda da rastlandı (Şekil 6,7).



Şekil 6. Grup III. Solunum epitelindeki granüllü hücrelerin aktive olduğu (ok) ve epitel tabakasının apikalinde mukus (m) biriktiği gözlenmekte. H&E X 100.



Şekil 7. Grup IV. Solunum epitelinde apoptotik görümlü hücreler (tek ok), granüllü hücre (çift ok) ve epitel tabakasının apikalinde mukus (m) ayırt edilmekte. H&E X 100.

Tablo 1. Trakea dokusunda malondialdehit ve glutatyon düzeyleri ile katalaz aktiviteleri (^{a,b,c}: aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05))

	MDA (nmol/ml)	Glutatyon (nmol/ml)	Katalaz (k/ml)
Kontrol	1,05 ± 0,064 ^a	174,0 ± 2,94 ^a	0,065 ± 0,006 ^a
Sigara	4,31 ± 0,10 ^b	141,66 ± 0,88 ^b	0,032 ± 0,019 ^b
Vitamin C	3,31 ± 0,20 ^c	153,0 ± 4,70 ^b	0,038 ± 0,004 ^b
Melatonin	3,57 ± 0,18 ^c	150,67 ± 3,7 ^b	0,029 ± 0,006 ^b

C vitamini uygulanan grupta ayrıca sigara soluyan grupta olduğu gibi trakea lümeninde kan da saptandı. Yapılan biyokimyasal incelemelerde, sigara inhale eden grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı, C vitamini ve melatonin enjeksiyonunun ise artan MDA düzeyini azalttığı saptandı (p<0,05). Katalaz aktivitesi ve glutatyon düzeyi ise sigara inhale eden grupta kontrol grubuna göre düşüş gösterirken, C vitamini ve melatoninin bu düşüşü önemli derecede etkilemediği gözlemlendi (p>0,05) (Tablo I).

TARTIŞMA

Sigaranın özellikle solunum sistemi üzerine toksik etkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Üç hafta boyunca günde 6 saat sigaraya maruz kalan gebe ratların akciğerlerinde amfizem, inflamasyon, metaplastik değişiklikler ve respiratuar bronşial epitel boyunda kısalma gözlenmiştir (13). Yine uzun süre sigara soluyan ratların pulmoner dokusunda peribronşioler ve perivasküler lenfosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu, alveolar alanda azalma, alveolar septada kalınlaşma, alveol içinde sürfaktan benzeri materyal birikmesi ve bu değişikliklere bağlı olarak pulmoner fonksiyon bozukluğu saptanmıştır (14). Hubbard ve ark. (15) sigara maruziyetinin trakea ve bronşlarda ödem, progresif nekrotik trakeobronşit, yalancı membran teşekkülü ve hava yolu obstruksiyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Bu inflamatuvar ve tıkaçıcı değişiklikleri; konjesyon, alveolar alanda ödem, ateletazi ve bronkopnömoninin izlediğini ve tip I hücrelerde intrasellüler ödem ve tip II hücrelerin membrana bağlı vakuollerinde değişiklikler meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Yapılan elektron mikroskopik bir çalışmada sigara inhalasyonu sonucunda, trakea epitel yüzeyinde belirgin mukus artışı olduğu ve epitel yüzeyinden çok sayıda silya dökülmesi tespit edilmiştir (16). Yine başka bir çalışmada sigara uygulanması sonucu trakea epitelinde ödem ve dağınık katmanlaşma, silyalarda dağınıklık ve çomaklaşma, aktif bazal hücreler ve lamina propriada amorf cisimcikler ve çok sayıda vakuole rastlanmıştır (17). Sigara maruziyeti sonucu goblet hücrelerinde, trakeal bezlerde ve salgılarında artış olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (18-21). Lewis ve ark. (22) sigara içimi sonucu trakea submukozal bez hücrelerinde içi amorf materyalle dolu olan çok sayıda genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum sisternası, yoğun salgı granülleri ile dolu golgi kompleksi ve artmış mukus sekresyonu tespit etmişlerdir. Sigara normalde steril olan alt hava yollarına floranın penetrasyonunu sağlar (23). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, deney süresince sadece sigara soluyan grupta, trakea lümeninde kan ve epitelyal hücre dökülmeleri, trakea epitelinde apoptozise giden hücrelere, aktive olmuş granüllü hücrelere ve submukozal bezlere rastlandı. Bu granüllü hücrelere normal şartlarda az rastlandığı ve hipoksi durumunda aktive olarak sekretuar içeriklerini boşalttıkları bildirilmektedir (24). Apoptozis daha önceden programlanmış bir şekilde zamanı gelince hücrelerin ölmesidir. Apoptozis hem fizyolojik, hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Yapılan çalışmalarda sigaranın bronşiyal epitel hücrelerinde, fibroblast-

larda, alveolar makrofajlarda, plasentada ve endotel hücrelerinde apoptozisi artırdığı tespit edilmiştir (25-28).

Sigara kullanılmasının karaciğer, akciğer ve böbrek dokusunda lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bu organlarda oluşan serbest oksijen radikallerinin zararlı etkisine karşı antioksidan enzimlerin seviyesinin yükseldiği saptanmıştır (29). Yıldız ve ark. (30) pasif ve aktif sigara içenlerde eritrosit oksidan sistemi üzerine yaptıkları çalışmada; superoksit dismutaz ve katalazın sigara içenlerde azaldığını ve glutatyon peroksidazın arttığını tespit etmişlerdir. Pasif sigara içenlerin, aktif sigara içenler kadar sigaradan etkilendiği sonucuna varmışlardır. Sigara içenlerde oksidatif stres artmış olarak bulunur. Bu çalışmanın biyokimyasal incelemelerinde, sigara inhale eden grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı, katalaz aktivitesi ve glutatyon düzeyinin ise sigara inhale eden grupta kontrol grubuna göre azaldığı saptandı.

Melatonin endokrin ritmin düzenlenmesi, antigonadal etki, değişik immun fonksiyonların nöroendokrin düzenlenmesi gibi aktivitelerinin yanında, antioksidan özelliğe de sahip olan pineal bezden salgılanan bir hormondur (31-33). Yapılan çalışmalar sonunda melatoninin yüksek şekilde reaktif olan OH radikalini detoksifiye etmede çok etkili olduğu kanıtlanmıştır (34-35). C vitamini (askorbik asit) suda çözünen önemli vitaminlerdendir. Fizyolojik fonksiyonunu büyük ölçüde oksido-redüksiyon yoluyla gösterir. C vitamini serbest oksijen radikallerinin etkisini önemli derecede azaltan ve diet yoluyla alınan bir antioksidandır (36-38). Çalışmamızda sigara toksikasyonuna karşı koruyucu amaçla melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda epitelyal hücre dökülmelerine ve granüllü hücre aktivasyonuna rastlandı, ama submukozal bez aktivasyonuna rastlanmadı. Biyokimyasal tetkiklerde sigara ile birlikte C vitamini ve melatonin enjeksiyonunun sigara toksikasyonu sonucu artan MDA düzeyini azalttığı saptandı, ancak katalaz aktivitesi ve glutatyon düzeyindeki azalmaya fazla bir etkisinin olmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada sigara intoksikasyonuna bağlı olarak epitelyal hücrelerde dökülme, belirgin mukus artışı olduğu saptandı. Sigaranın yol açtığı hipoksiye bağlı olarak epitel tabakasındaki granüllü hücrelerin aktivasyonunun ve epitelyal hücrelerdeki apoptozisin indüklendiğini düşünmekteyiz. Antioksidan özellikleriyle bilinen ve sigaranın toksik etkilerine karşı koruyucu amaçla uygulanan melatonin ve C vitamininin ise trakeadaki yapısal değişiklikler üzerine kısmen etkili olduğu saptandı.

KAYNAKLAR

1. Doll R. Cancers weakly related to smoking. Br Med Bull 1996; 52: 35-49
2. Hoffman D, Hoffman I. The changing cigarette, 1950-1995. J. Toxicol Environ Health 1997; 50: 307-64.
3. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: 955-63.
4. Aoshiba K, Tamaoki J, Nagai A. Akut cigarette smoke exposure induce apoptosis alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L 1392-1401.
5. Lalonde C, Picard L, Campbell C, Demling R. Lung and systemic oxidant and antioxidant activity after graded smoke exposure in the rat. Circ Shock 1994; 42: 7-13.
6. Cigarette smoke causes rapid lipid peroxidation of rat tracheal epithelium. Churg A, Cherukupalli K. Int J Exp Pathol 1993; 74: 127-32.
7. Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. Free Radic Biol Med 1998; 25: 79-86.
8. Bhatia A.L, Manda K. Study on pre-treatment of melatonin against radiation- induced oxidative stress in mice. Env Tox and Phar 2004; 18: 13-20.

9. Bendich A, Cohen M. Ascorbic acid safety: analysis factors affecting iron absorption. *Toxicol Lett* 1990;51:189-90.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
11. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editors. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie 2nd 1974. p. 673-678.
12. Ellman GL. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch Biochem* 1959; 70-77
13. Czekaj P, Plaszczyk A, Lebeda-Whborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, Kaminski M. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75: 27-35.
14. Matulionis DH. Chronic cigarette smoke inhalation and aging in mice: 1. morphologic and functional lung abnormalities. *Exp Lung Res* 1984; 7: 237-56.
15. Hubbard GB, Langlinais PC, Shimazu T, Okerberg CV, Mason AD. The morphology of smoke inhalation injury in sheep. Jr, Pruitt BA Jr. *J Trauma* 1991; 31:1477-86.
16. Abdi S, Evans MJ, Cox RA, Lubbesmeyer H, Herndon DN, Traber DL. Inhalation injury to tracheal epithelium in an ovine model of cotton smoke exposure. Early phase (30 minutes). *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1436-9.
17. Gaafar HA, Al-Mansour AH. The effect of cigarette smoke on the tracheal mucosa of the rabbit. An electron microscopic study. *J Laryngol Otol* 1982; 96: 943-50.
18. Martonen TB. Deposition patterns of cigarette smoke in human airways. *Am Ind Hyg Assoc J* 1992; 53: 6-18.
19. Whimster WF. Tracheobronchial submucous gland profiles in smokers and non-smokers. *Appl Pathol* 1988; 6: 241-6.
20. Hayashi M, Sornberger GC, Huber GL. Differential response in the male and female tracheal epithelium following exposure to tobacco smoke. *Chest* 1978; 73: 515-8.
21. Rogers DF, Turner NC, Marriott C, Jeffery PK. Cigarette smoke-induced chronic bronchitis: a study in situ of laryngo-tracheal hypersecretion in the rat. *Clin Sci* 1987; 72: 629-37.
22. Lewis DJ, Jakins PR. Effect of tobacco smoke exposure on rat tracheal submucosal glands: an ultrastructural study. *Thorax* 1981; 36: 622-4.
23. Pesti L, Wiseman RF, Bruckner G, Gordon HA. Effects of tobacco smoke inhalation on the tracheo-bronchial microflora of rats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1984; 7: 75-80.
24. Fawcett DW, Jensch RP. *Bloom & Fawcett: Concise Histology*. 1st edition, Florence: Chapman & Hall 1997: 229-241.
25. Raveendran M, Wang J, Senthil D, et al. Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 733-40.
26. Kim H, Liu X, Kobayashi T, et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 483-90.
27. Liu L, Yuan Y, Li F, Liu H. Relationship between apoptosis and E-cadherin expression in bronchial epithelium of smoking mouse. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23: 216-8.
28. Vogt Isaksen C. Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 433-42
29. Baskaran S, Lakshmi S, Prasad PR. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Indian J Exp Biol* 1999; 37: 1196-200.
30. Yildiz L, Kayaoglu N, Aksoy H. The changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes of active and passive smokers. *Clin Chem Lab Med* 2002 Jun;40:612-5
31. Forsling ML, Stoughton RP, Zhou Y, Kelestimir H, Demaine C. The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *J Pineal Res* 1993; 14: 45-51.
32. Guerrero JM, Reiter RJ. A birefracture survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
33. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 359-84.
34. Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Tan DX, Pablos MI, Acuna-Castroviejo D. The role of melatonin in the pathophysiology of oxygen radical damage. *Pathophysiology of Oxygen Radical Damage* 1994; 8: 403-12.
35. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, Chen L, Manchester LC, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol* 1993; 15: 103-16.
36. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003 Aug 21; 2: 7.
37. Levin M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New Engl J Med* 1986; 3: 892-02.
38. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Oxford 1999.

Kabul Tarihi: 28.04.2005