

喫煙障害における酸化ストレスの意義

—— 文献的考察に基づくエビデンス (Evidence-based Medicine) ——

竹田真由・船渡忠男

I はじめに

たばこのないクリーンな環境と健康な社会を実現していくためには、禁煙に関する様々なアプローチの施行とそれらの継続的な推進活動が重要である。まず、医療においては、2006年4月より、禁煙治療がニコチン依存症管理料として診療報酬の保険収載適応となった。今後、禁煙治療を受ける喫煙者を増加させ、治療の成績率を向上させていく必要がある。しかし、禁煙外来において、患者(喫煙者)の約3割が治療後3ヶ月たっても禁煙を実施できていないとの報告¹⁾がなされ、禁煙の難しさを示している。国の「健康日本21」や「健康増進法」により、各地で分煙や路上喫煙禁止条例など禁煙化を推進する環境を整備しつつあるが、地域により取り組みに対する格差が認められているのが現状である。そのため、ヒトにおいて喫煙はどのような影響を与え、どのような健康被害を来すのか、それらの根拠に基づいたデータを検証し、喫煙者にエビデンスを提示して、禁煙の意義を正しく伝えていく必要がある。さらに、禁煙社会を実現していくためには、人類の福祉、医療倫理、生命倫理の観点からも、次世代に向けた様々な科学的アプローチは欠かせない。とくに、若年者における早期からの喫煙習慣が将来の身体的障害を来すことから、十代への禁煙指導は緊急の課題である²⁾。

喫煙は、肺がんを始めとするがん、虚血性心疾患、脳梗塞などの循環器疾患、肺気腫などの慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、消化性潰瘍など、多くの疾患の発症リスク因子になりうると考えられている³⁾。最近では、喫煙がメタボリックシンドロームの発症リスク因子であることが明らかとなり、合併率も増加している⁴⁾が、喫煙が健康被害を及ぼすことを示すには、医学的に有用な直接的あるいは間接的な診断が確立されたものを用いて行うことが求められている。他方、エビデンスとして根拠に基づく医療 (evidence-based medicine: EBM) の観点から、喫煙は曝露としてのリスクと、禁煙としての介入の2つの場合が考えられる。喫煙曝露としてのリスク推定は、後ろ向き研究において種々の疾患のアウトカムとしての関連を表現する相対リスクとオッズ比の方法によって示される。例えば、喫煙と肺がんの関連性においては、1日のたばこの本数の増加が肺がんの死亡率のリスクとなりうるとされている⁵⁾。喫煙と死亡との関連を分析するには、コホート研究を行って相対危険率を出し、喫煙率があれば、死亡においてどれだけ喫煙が関与したか (人口寄与割合 population attributable proportion) を

推定しうる。他方、入院において禁煙を介入する前向き研究では、ニコチン補完療法などの禁煙介入が明らかに治癒率を向上させることが証明されている⁶⁾。すなわち、すでに発症している患者において喫煙が予後因子であるかどうかである。しかし、喫煙が肺がんなどの原因であるかどうかは未だ議論されており一定の結論は得られていないが、リスク因子としては多くのエビデンスがある。

一方、酸化ストレスとは、生体内において酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化に偏った状態をいう。酸化ストレス状態では、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の過程や、薬剤、紫外線などによって活性酸素 (active oxygen) が発生する。がんや生活習慣病など多くの疾患では、生体は酸化ストレス状態にあり、活性酸素がこれらの疾患に関わっている^{7,8)}。すなわち、酸化ストレスは過剰な活性酸素が引き起こす状態である。喫煙(たばこのニコチンなど種々の成分)における酸化ストレスおよび活性酸素との関連も明らかである⁹⁾。しかし、各種疾患との関連性については未だ十分なエビデンスが得られていない。

したがって、喫煙と活性酸素との関連に関して、早急に真に有用なエビデンスを選び出すことが、喫煙に関連する障害において良質の医療、すなわち、個別化医療を進めて行く上で極めて重要である。そのため、今回の研究は、喫煙障害と各種疾患との関連性として酸化ストレスに着目した妥当性と有用性について根拠に基づく医療 (EBM) の手法に則り、文献的考察からエビデンス (EBM) を得ることを目的とした。

II 研究方法—文献の検索方法

今回の EBM における喫煙障害の疑問としては、喫煙における種々の障害と酸化ストレスとの関連、またそれがどのような方法によって評価されているかということである。エビデンスの検索はコンピュータを使用し PubMed データベース (Medline)¹⁰⁾ を検索した。

文献の批判的吟味は、標準的な文献検索法 (STARD) に準じて行った¹¹⁾。まず、EBM 実践に必要な方法 (基本構造)¹²⁾ として、第 1 ステップは、たばこに関連する酸化ストレスにおいて活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) により引き起こされる障害に関し、「喫煙障害を評価しうる酸化ストレスマーカーは何か」という疑問 (research question) を定式化した。次に、データベースを用い、エビデンスについて系統的に PubMed より文献を検索し、エビデンスの決定を行い、評価し、推奨度を決定することとした。したがって、検索の基準としては、喫煙障害としての各種疾患および実験において、どのような酸化ストレスマーカーが用いられているか、有用性があるかという疑問を明確化した (表 1)。すなわち、疑問は種々の喫煙障害に対して、その原因としての ROS を評価するのに、どのような酸化ストレスマーカーを用いているかということである。そのため、たばこ (smoke)、酸化ストレス (oxidative stress)、活性酸素 (active oxygen) を検索用語として、PubMed データベース (1989 年 12 月から 2008 年 10 月) につい

表 1. エビデンスの検証

Research question
喫煙障害を評価しうる酸化ストレスマーカーは何か？
方法
PubMed データベースを使用
検索式
<pre> ("smoke" [MeSH Terms] OR "smoke" [All Fields]) AND ("oxidative stress" [MeSH Terms] OR ("oxidative" [All Fields] AND "stress" [All Fields]) OR "oxidative stress" [All Fields]) AND ("reactive oxygen species" [MeSH Terms] OR ("reactive" [All Fields] AND "oxygen" [All Fields] AND "species" [All Fields]) OR "reactive oxygen species" [All Fields]) OR ("active" [All Fields] AND "oxygen" [All Fields]) OR "active oxygen" [All Fields] </pre>

で検索した。さらに、検索した用語を含む文献を広く拾うようにした。

III 結 果

上記の検索条件により、PubMedにおいて検索した文献は132論文であった(図1)。うち入手し得た85論文(他は入手困難)においては、酸化ストレスマーカーを用いて測定しているかの有無について文献の吟味を行った。それらの中にはメタ分析(meta-analysis)とシステマティックレビュー(systematic review)は含まれていなかった。次に、タイトルと要旨(abstract)を吟味し、総説等review論文(16編)を除外すると、詳細を読むべき論文は69編となった。さらに本文の詳細を読んで、他の目的が中心で研究が施行されている論文(たばこに関連しない酸化ストレスの測定など)を除外すると、目的とする論文は最終的に28編となった。

使用されている酸化ストレスマーカーは、脂質系は4-hydroxy-2-nonenal (4HNE)^{15,19,25)}, Thiobarbiturate reactive substances (TBRRS)^{14,37)}, malondialdehyde (MDA)^{20,27,34)}, 脂質ペルオキシド lipid peroxide³⁵⁾, 酸化 LDL (low-density lipoprotein)³⁷⁾であった(表2)。DNAの損傷マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)も用いられている³³⁾。最近ではFpg-formamidopyrimidine (FLARE) DNA glycosylase (DNA修復酵素)を用いてDNAの断片(comet tail)の長さを測るFpg-FLARE comet assayが用いられている^{16,17,22,30)}。また、酸化ストレスの評価として、スーパーオキシド O²⁻ や H₂O₂ (hydrogen peroxide) などのROSを測定しているものが多く用いられている。ROSの多くは、酸化感受性蛍光プローブを用いたフローサイトメトリーにて dichlorofluorescein (DCF) 色素^{13,15,16,19,21,23-29)}, エチジウムブロマイド (ethidium bromide, EB) 色素を用いた蛍光アッセイ¹⁷⁾あるいは lucigenin/luminol などを用いた化学発光法^{18,21,32,39)}, チトクロームC還元法³⁸⁾にて測定されていた。

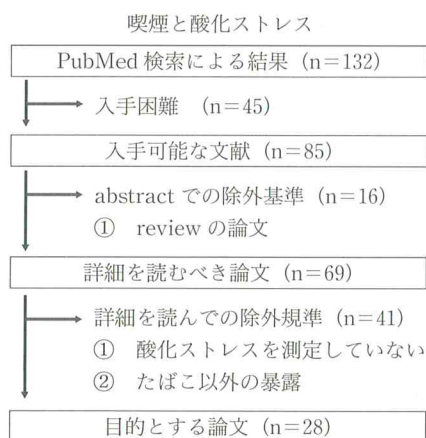


図1. エビデンス検証の流れ

表2. 酸化ストレスの測定項目

文献番号	測定項目	文献番号	測定項目
(13)	DCF, ETH	(27)	MDA, DCF
(14)	GSH, TBARS	(28)	SOD1, DCF
(15)	4-HNE/H2DCFDA	(29)	GSH, DCF
(16)	Comet assay, DCF	(30)	Comet assay
(17)	Comet assay, L-CL, EB	(31)	TAR, OSI
(18)	L-CL	(32)	化学発光法
(19)	DCF	(33)	8-OHdG
(20)	GSH, MDA, GPx	(34)	GSH, MDA
(21)	L-CL, DCF	(35)	POD
(22)	GSH, Comet assay	(36)	GSH
(23)	DCF	(37)	TBARS, 酸化 LDL
(24)	GSH, DCF	(38)	チトクローム C 還元法
(25)	DCF, 4-HNE, GSH	(39)	L-CL
(26)	DCF	(40)	GSH, MPO

また、酸化ストレスが引き起こされると ROS を解毒する抗酸化物質である glutathione (GSH) が関与するため、GSH を測定している論文も多く^{14,19,20,22,24,25,29,34,36,40}、酸化ストレスと密接に関連することが示唆された。抗酸化物質としては superoxide dismutase (SOD)²⁸ やカタラーゼ (catalase) のような酵素、あるいは hydroxy radical を用いた抗酸化状態測定³² もある。抗酸化反応 (total antioxidant response, TAR) 値に対するペルオキシド peroxide 値の比率を酸化ストレス指標とする論文もあった³¹。

喫煙障害の病態との関連からみると、ヒトを対象とし、患者、喫煙者^{22,30,39} 受動喫煙者^{22,31,32,37}

表3. 酸化ストレスを受ける対象

文献番号	対象	文献番号	対象
(13)	Cell (rat lung)	(27)	Mouse brain
(14)	Mouse lung	(28)	Cell
(15)	Mouse lung	(29)	Cell
(16)	Cell (human)	(30)	喫煙者
(17)	Rat	(31)	受動喫煙者
(18)	Rat	(32)	受動喫煙者
(19)	Cell	(33)	Mouse skin
(20)	COPD 患者	(34)	Rat kidney
(21)	Rat	(35)	Mouse
(22)	喫煙者	(36)	Cell
(23)	Cell	(37)	受動喫煙者
(24)	Cell	(38)	Cell
(25)	Cell	(39)	喫煙者
(26)	Cell	(40)	喫煙者

あるいは COPD 患者²⁰⁾ に対して、それぞれ酸化ストレスや ROS を測定していた(表3)。また、喫煙障害の実験対象は肺が多く、COPD⁴⁰⁾ あるいは肺がんと関連性においてたばこの抽出物あるいは煙が発症および憎悪因子として解析されている¹⁶⁾。血管内皮細胞^{15,17,23,29)}、単球³⁸⁾ や好中球など、特定の細胞についての解析もある。次いで、心血管系についての記述が多い^{21,23)}。腎臓³⁴⁾ や皮膚³³⁾ におけるたばこの影響の論文もあった。

また、喫煙障害と酸化ストレスや ROS との関連性に関与する因子としては、Nrf2 (nuclear erythroid-related factor 2)^{14,19)}、haem oxygenase-1(HO-1)^{13,36)}、YAP1²⁸⁾、asymmetrical dimethyl-arginine (ADMA)²³⁾、sirtuin 1(SIRT1)¹⁷⁾、interleukin(IL)-6/tumor necrosis factor (TNF)- α /IL-1 β /IL-8/cyclooxygenase(COX)-2/ICAM-1 などの炎症サイトカイン^{18,21,24,35)}、NF- κ B^{21,27)} などの転写因子、VEGF (vascular endothelial growth factor) や eNOS (endothelial nitric oxide synthase) などの血管内皮マーカー¹⁵⁾ が上げられ、それぞれの関与による喫煙障害の機序が推定されている。GST (glutathione-S-transferases) や mEPHX (microsomal epoxide hydrolase) などの解毒酵素の遺伝子多型との関連性に言及している論文もあった²⁰⁾。

IV 考 察

本研究は、たばこの生体に及ぼす影響を喫煙における酸化ストレスと活性酸素に着目し、研究デザインとして、酸化ストレスのマーカーの有効性を取り上げた。まず研究テーマとしての research question を設定した。EBM のステップである問題の同定としては、喫煙障害を評価するのに最適な酸化ストレスマーカーは何かということである。PubMed から検索し得た文献を解

析した結果、多くの論文において、たばこの成分あるいは煙が生体内で酸化ストレスを生じて、肺や血管に障害を及ぼし、アポトーシスを誘導するために、慢性の肺疾患や動脈硬化を促進する機序が証明されていた。

今回、メタ分析あるいはシステマティックを除いた総説論文は2つあったが、これらはこれまでの研究結果の記述的な図表から成り立っていた。総説論文において、情報収集の方法に関する記述がないが、二次資料として他の研究者がまとめた論文と著者らの研究をまとめたものがある。今回喫煙 (smoke) と酸化ストレス (oxidative stress) と活性酸素 (active oxygen) との関連性を PubMed (Medline) において検索した中には、統計的手法を用い、データを定量的に結合させた論文としてメタ分析 (meta-analysis) とシステマティックレビュー (systematic review) は含まれていなかった。すなわち、喫煙障害と酸化ストレスの関連性は現時点ではまだ大規模な調査研究を行ったエビデンスとして、診療ガイドラインに有用なデータとするには至っていないということである。しかし、喫煙障害におけるエビデンスを同定し収集するためには系統的なアプローチが必要である。今回の検索では、喫煙障害においてどの関連性の指標に最も注目すべきかを決める必要があった。喫煙障害に共通する問題として、酸化ストレスと活性酸素に着目した。検索の結果、酸化ストレスが喫煙障害における主な原因あるいは促進因子であると文献的に裏付けられる十分なエビデンスとなりうる指標であると考えた。

酸化ストレスマーカーは、喫煙、すなわちたばこにおける複数の成分が煙として体内に入り、気道や血液において脂質、タンパク質ならびに DNA を損傷して酸化させることによって血中あるいは尿中に増加する。LDL は血管壁におけるいろいろな刺激によって酸化 LDH となる。今回の検索で用いられていた酸化ストレスマーカーの測定法としての診断的有用性までも追求した論文はなかったが、種々のマーカーを測定することによって喫煙の障害を評価していた。これら酸化ストレスマーカーの意義を追求することには各種疾患の病態把握には必要となってくる。一方、酸化ストレスには相対的な抗酸化物質の減少も考えられる。これには、ROS を消去するスーパーオキシドディスターゼ (SOD) やカタラーゼなどがある。また、多くの論文において、解毒系として GSH の含量が測定され、喫煙により減少することが証明されており、喫煙に関連した抗酸化のマーカーを測定する意義は高い。また、喫煙障害の機序は肺における COPD の成因として積極的に研究されている。

また、喫煙としての問題として受動喫煙に関する論文も多く、喫煙する母親からの酸化ストレスが子供で増加することも指摘され、前述した若年者喫煙の問題に及んでいる。公衆衛生の観点からのエビデンスも追求する必要がある。

したがって、喫煙は、多くの論文において肺気腫など COPD の進展に深く関与する因子と考えられている。たばこの煙は多量のラジカルを含んでおり、主に H_2O_2 や O^{2-} のような ROS を形成する。COPD は、酸化と抗酸化のインバランスが起これ、酸化が増加してシグナル伝達系やサイトカインの異常を引き起こす結果、肺胞に閉塞性障害を来すと考えられている。さらに、喫煙は

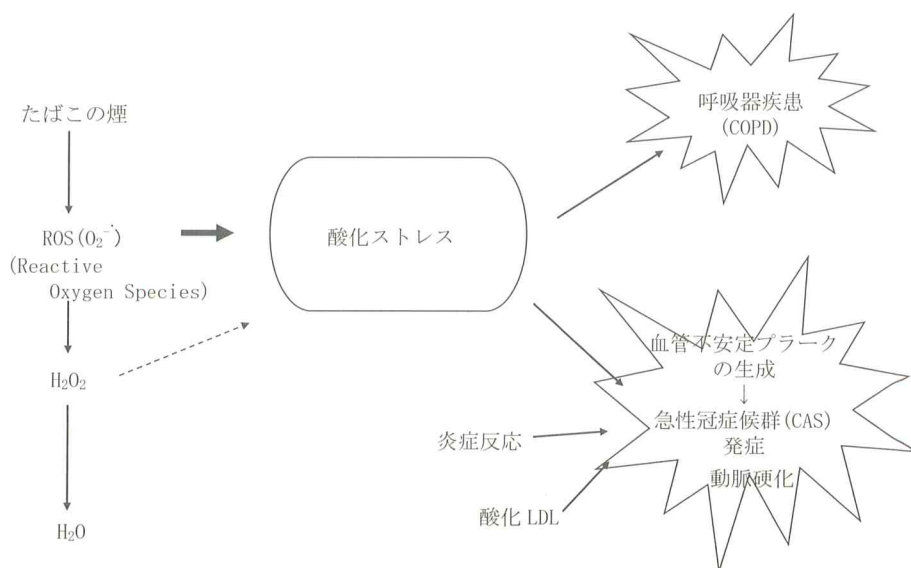


図2. 酸化ストレスと喫煙の関連性

心血管系との関連性の論文が多く、酸化ストレスが血管内皮細胞に障害を与え、動脈硬化を促進するという機序が考えられている。この機序は肺の血管でも同様であり、共通の病因が示唆されている。喫煙と酸化ストレスおよび活性酸素種との関連性は明らかとなったが、喫煙が原因あるいは関与する疾患において、診断および治療ガイドラインを作成する場合に、酸化ストレスおよび活性酸素種測定を含んだエビデンスを考慮していく必要がある。また、喫煙障害において酸化ストレスが強く関連するエビデンスを創出していくことも重要である (図2)。

V おわりに

本研究は、喫煙障害が酸化ストレスおよび活性酸素と関連することを明らかにすることを目的とした。根拠に基づくエビデンス (EBM) の文献的検索により、酸化ストレスは従来から実験的に多くの方法によって活性酸素種 (ROS) を含んで測定されてきたことが明らかとなった。とくに、喫煙による肺や心血管における障害に酸化ストレスや ROS が関与することを証明するため、酸化ストレスが測定され評価されていた。今後、肺疾患やメタボリックシンドロームなど喫煙に関連する疾患における診断および禁煙介入および抗酸化療法などの個別化治療を行うためには、酸化ストレスと ROS のエビデンスを統合した EBM システムを確立し推奨しうるガイドラインを作成することが必要である。

謝 辞

本研究の一部は、日本臨床検査医学会第1回学術推進プロジェクト研究の助成によるものである。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省中央社会保険医療協議会診療報酬改定結果検証部会：平成18年度診療報酬改定結果検証に係わる調査。ニコチン依存症管理料算定保険医療機関における禁煙成功率の実態調査報告書。平成19年5月16日
- 2) Grimshaw GM, Stanton A. Tobacco cessation interventions for young people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 18: CD003289.
- 3) 三原華子, 中山健夫: 能動喫煙による健康リスク-相対リスクと寄与リスク。禁煙指導・支援者のための禁煙科学。日本禁煙科学会編。p.14-7。文光堂, 東京, 2007年。
- 4) Berlin I. Smoking-induced metabolic disorders: a review. *Diabetes Metab.* 2008; 34: 307-14.
- 5) Doll R, Peto R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. *J Epidemiol Community Health.* 1978; 32: 303-13.
- 6) Silagy C, Lancaster T, Stead L, Mant D, Fowler G. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 3: CD000146.
- 7) Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008; 5: 38-49.
- 8) Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008; 4: 600-9.
- 9) Adamopoulos D, van de Borne P, Argacha JF. New insights into the sympathetic, endothelial and coronary effects of nicotine. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35: 458-63.
- 10) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 11) 石田 博. 医療情報 Evidence-Based Diagnosis 確立のための課題と展望. *Lab Clin Pract* 2001; 19: 31-4.
- 12) 中山健夫. EBMを用いた診療ガイドライン作成・活用ガイド. 東京: 金原出版; 2004, p. 23-53.
- 13) Lee T-S, Liu Y-J, Tang G-J, Yien H-W, Wu Y-L, Kou Y.R. Wood smoke extract promotes both apoptosis and proliferation in rat alveolar epithelial type II cells: the role of oxidative stress and heme oxygenase-1. *Crit Care Med.* 2008; 36: 2597-606.
- 14) Taylor R.C., Acquah-Mensah, G., Singhal M., Malhotra D., Biswal S. Network inference algorithms elucidate Nrf2 regulation of mouse lung oxidative stress. *PLoS Comput Biol.* 2008; 4: e1000166.
- 15) Edirisinghe I., Yang S-R., Yao H., Rajendrasozhan S., Caito S., Adenuga D., Wong C., Rahman A., Phipps R.P. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *FASEB J.* 2008; 22: 2297-310.
- 16) Coppe J-P., Boisen M., Sun C.H., Wong B.J.F., Kang M.K., Park N-H., Desprez P-Y., Campisi J., Krtolica A. A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced

- epithelial cell growth and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008 ; 6 : 1085-98.
- 17) Csiszar A., Labinskyy N., Podlutzky A., Kaminski P.M., Wolin M.S., Zhang C., Mukhopadhyay P., Pacher P., Hu F., de Cabo R., Ballabh., Ungvari Z. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1 : attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 ; 294 : H2721-35.
 - 18) Li P-C., Chen W-C., Chang L-C., Lin S-C. Substance P acts via the neurokinin receptor 1 to elicit bronchoconstriction, oxidative stress, and upregulated ICAM-1 expression after oil smoke exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 ; 294 : L912-20.
 - 19) Kode A., Rajendrasozhan S., Caito S., Yang S-R., Megson I.L., Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 ; 294 : L478-88.
 - 20) Vibhuti A., Arif E., Deepak D., Singh B., Pasha M.A.Q. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 ; 359 : 136-42.
 - 21) Orosz Z., Csiszar A., Labinskyy N., Smith K., Kaminski P.M., Ferdinandy P., Wolin M.S., Rivera A., Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype : role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 ; 292 : H130-9.
 - 22) Fracasso M.E., Doria D., Franceschetti P., Perbellini L., Romeo L. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicol Lett.* 2006 ; 167 : 131-41.
 - 23) Zhang W-Z, Venardos K., Chin-Dusting J., Kaye D.M. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability : role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension.* 2006 ; 48 : 278-85.
 - 24) Yang S-R., Chida A.S., Bouter M.R., Shafiq N., Seweryniak K., Maggirwar S.B., Kilty I., Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 ; 291 : L46-57.
 - 25) Baglolle C.J., Bushinsky S.M., Garcia T.M., Kode A., Rahman I., Sime P.J., Phipps R.P. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains : implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 ; 291 : L19-29.
 - 26) Zong-Xian J, Qi-Lin A., Mi X. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Sheng Li Xue Bao.* 2006 ; 58 : 244-54.
 - 27) Manna S.K., Rangasamy T., Wise K., Sarkar S., Shishodia S., Biswal S., Ramesh G.T. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochem Pharmacol.* 2006 ; 28 ; 71 : 1602-9.
 - 28) John L., Sharma G., Chaudhuri S.P., Pillai B. Cigarette smoke extract induces changes in growth and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ; 338 : 1578-86.
 - 29) Liu P-L., Chen Y-L., Chen Y-H., Lin S-J., Kou Y.R. Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells : role of AIF and EndoG. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 ; 289 : L739-49.
 - 30) Sinkó I, Mórocz M., Zádori J., Kokavszky K., Raskó I. Effect of cigarette smoking on

- DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. *Reprod Toxicol.* 2005; 20: 65-71.
- 31) Kosecik M., Erel O., Sevinc E., Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol.* 2005; 8; 100: 61-4.
 - 32) Doniec Z., Nowak D., Tomalak W., Pisiewicz K., Kurzawa R. Passive smoking does not increase hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in exhaled breath condensate in 9-year-old healthy children. *Pediatr Pulmonol.* 2005; 39: 41-5.
 - 33) Curtin G.M., Hanausek M., Walaszek Z., Mosberg A.T., Slaga T.J. Short-term in vitro and in vivo analyses for assessing the tumor-promoting potentials of cigarette smoke condensates. *Toxicol Sci.* 2004; 81:14-25.
 - 34) Cigremis Y., Turkoz., Akgoz M., Sozmen M. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urol Res.* 2004; 32: 213-8.
 - 35) Zhang J., Liu Y., Shi J., Larson D.F., Watson R.R. Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress. *Exp Biol Med.* 2002; 227: 823-9.
 - 36) Favatier F., Polla B.S. Tobacco-smoke-inducible human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates. *Biochem J.* 2001; 353: 475-82.
 - 37) Valkonen M.M., Kuusi T. Vitamin C prevents the acute atherogenic effects of passive smoking. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 428-36.
 - 38) Pinot F., Bachelet M., François D., Polla B.S., Walti H. Modified natural porcine surfactant modulates tobacco smoke-induced stress response in human monocytes. *Life Sci.* 1999; 64: 125-34.
 - 39) Von Antwerpen V.L., Theron A.J., Richards G.A., van der Merwe C.A., Viljoen E., van der Walt R., Anderson R. Plasma levels of beta-carotene are inversely correlated with circulating neutrophil counts in young male cigarette smokers. *Inflammation.* 1995; 19: 405-14.
 - 40) Linden M., Håkansson L., Ohlsson K., Sjödin K., Tegner H., Tunek A., Venge P. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation.* 1989; 13: 651-8.