

Astımlı Hastalarda Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanların Aktiviteleri

Aydanur Mihmanlı, Döndü Güneylioğlu, Ferhan Özşeker, Sulhattin Arslan, Mithat Özgel, Esen Akkaya

SSK Süreyyapaşa Göğüs, Kalp ve Damar Hastalıkları Eğitim Hastanesi, İstanbul

Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanların, astım patogeneziindeki rolü henüz belirlenmemiştir. Çalışmamızda, astımlı hastalarda ve kontrol grubunda serbest oksijen radikallerinin ve antioksidanların aktivitelerini araştırdık. Hiç astım tedavisi görmemiş, semptomatik, hafif astımlı 18 hasta (Grup I, yaş ortalaması, 34.6), halen tedavide olan asemptomatik hafif astımlı 20 hasta (Grup II, yaş ortalaması, 35.1) ve 20 sağlıklı birey kontrol grubu olarak (Grup III, yaş ortalaması, 33.2) çalışmaya alındı. Olguların hiçbiri sigara içmiyordu. Olguların, malondialdehid (MDA), katalaz (CAT), eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx), plazma seruloplazmin (SP), ve C vitamini (Vit C) düzeyleri ölçüldü. MDA ve CAT ve düzeyleri, Grup I (sırasıyla, 5.47 ± 2.73 mol/L, 110.45 ± 75.15 U/L) ve Grup II (sırasıyla, 4.73 ± 2.85 mol/L, 177.4 ± 124.8 U/L) olgularda, kontrol grubuna (sırasıyla, 2.14 ± 0.66 mol/L, 42.54 ± 21.97 U/L) göre anlamlı olarak yüksekti, Grup I ve Grup II arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). GPx düzeyleri bakımından her üç grup arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). SP düzeyi Grup I'de (133.48 ± 82.68 U/L) kontrol grubuna (61.84 ± 25.94 U/L) göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.01$), Grup II (104.42 ± 56.36 U/L) ile kontrol grubu arasında ise fark bulunmadı ($p > 0.05$). VitC düzeylerinin her üç grup arasındaki farkı, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Sonuç olarak, oksidan ve antioksidan maddelerin astımlı olgularda kontrol grubuna göre yüksek bulunması, serbest oksijen radikalleri ve antioksidanların astım patogeneziinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: astım, serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar

Toraks Dergisi, 2003;4(3):264-268

ABSTRACT

Role of Free Oxygen Radicals and Antioxidants in the Pathogenesis of Asthma

The role of free oxygen radicals and antioxidants in the pathogenesis of asthma, have not been well defined. In our study, we investigated plasma levels of free oxygen radicals and antioxidants in asthmatic patients. Symptomatic, mild asthmatic 18 patients who never used any antiasthma treatment (Group I, mean age, 34.6), asymptomatic, 20 mild asthmatic patients have been taking antiasthma treatment (Group II, mean age, 35.1) and 20 healthy adults for control group (Group III, mean age, 33.2) were selected for this study. All cases were nonsmokers. In all selected cases, malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), erythrocyte glutathione peroxidase (GPx), plasma seruloplasmin (SP) and vitamin C (Vit C) were measured. MDA and CAT levels of asthmatic patients in the Group I (respectively, 5.47 ± 2.73 mol/L and 110.45 ± 75.15 U/L) and in the Group II (respectively, 4.73 ± 2.85 mol/L and 177.4 ± 124.8 U/L) were significantly higher than control group (respectively, 2.14 ± 0.66 mol/L and 42.54 ± 21.97 U/L) ($p < 0.01$), there was no significant difference between Group I and Group II ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference in GPx levels between three groups ($p > 0.05$). SP levels of Group I (133.48 ± 82.68 U/L) were significantly higher than Group III (61.84 ± 25.94 U/L) ($p < 0.01$), there was no difference between Group II (104.42 ± 56.36 U/L) and Group III ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference in Vit C levels between three groups ($p > 0.05$). According to our study, oxidant and antioxidant substances were found higher in asthmatic patients than control group and it is concluded that, free oxygen radicals and antioxidants may play a role in pathogenesis of asthma.

Key words: asthma, free oxygen radicals, antioxidants

GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest oksijen radikallerinin (SOR), doku hasarı ve değişik hastalıkların etyopatogeneziindeki rolü, son yıllarda tıpta giderek artan ilgi alanı oluşturmaktadır. Oksidatif stres, artmış oksidana maruz kalma ya da azalmış antioksidan kapasite-

MDA	n	Ort±SS	p
Kontrol	20	2.14±0.66	p<0.001
Grup I	18	5.47±2.73	p<0.001
Grup II	20	4.73±2.85	p>0.05

te olarak tanımlanabilir [1]. Akciğerler, oksidana maruz kalmayı minimum düzeye indirmek için antioksidanlara sahiptir, ancak serbest oksijen radikallerinin aşırı üretiminde ya da varlığında, bu koruyucu sistem yetersiz kalmakta ve oksidan hasar meydana gelmektedir [2].

Eozinofiller, alveoler makrofajlar ve nötrofiller, astımlı hastalarda, sağlıklı bireylere göre, daha çok SOR üretmektedirler [3]. SOR, doğrudan solunum yolu düz kas kontraksiyonuna, doku harabiyetine, damar geçirgenliğinde artışa, bronş aşırı duyarlılığına ve medyatör salımına neden olmaktadır [4]. Ayrıca SOR, mast hücrelerinden histamin salımına ve hava yolu epitel hücrelerinden mukus salgılanmasına neden olmaktadır. [5].

Astım, kronik hava yolu inflamasyonu ile tanımlanan bir hastalıktır. SOR'un aktif inflamatuvar hücreler tarafından üretilmesi, astım patogeneğinde rolleri olabileceğini düşündürmektedir [6]. Çalışmamızda, astımlı hastalarda oksidan ve antioksidanların aktivitelerini belirlemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Merkezimiz astım polikliniğine başvuran hiç tedavi görmemiş, ilk defa tanı konulan, semptomatik, hafif astımlı 18 hasta (Grup I), halen düzenli tedavi alan, asemptomatik hafif astımlı 20 hasta (Grup II) ve 20 sağlıklı birey kontrol grubu olarak (Grup III) çalışmaya alındı. Astım tanısı öykü, fizik muayene bulguları, PA akciğer grafisi ve solunum fonksiyon testlerine göre konuldu. Grup II'deki hastaların tümü, en az 30 gündür inhaler steroid kullanmaktaydı. Olguların hiçbiri sigara içmiyordu. Her hastadan, malondialdehid (MDA), katalaz (CAT), eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx), plazma serüloplazmin (SP) ve vitamin C (Vit C) düzeyleri ölçülmek üzere, hastaneye başvurdukları gün venöz kan örneği alındı.

MDA düzeyi, kan alındıktan en geç iki saat içinde Yoshioka ve arkadaşlarının [7] önerdiği gibi, tiyobarbitirik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli MDA-TBA bileşiğinin spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi. CAT serum düzeyleri, Goth'un enzimatik kalorimetrik yöntemi ile ölçüldü [8]. Eritrosit GPx ölçümü için heparinli tüplere alınan 10 ml kan, -20° C'ta saklandı. Bir ay içinde Kone Delta otoanalizörde Ransel ticari kitleri kullanılarak Paglia ve Valentini'nin [9] enzimatik spektrofotometrik yöntemi ile GPx

Katalaz	n	Ort±SS	p
Kontrol	20	42.5±21.9	p<0.01
Grup I	18	110.4±75.1	p<0.01
Grup II	20	177.4±124.8	p>0.05

düzeği saptandı. SP plazma düzeyleri, substrat olarak o-dianisidin dihidroklorür kullanılarak, Lehmann ve arkadaşlarının [10] enzimatik kalorimetrik yöntemi ile ölçüldü. Vit C plazma düzeyleri dinitrofenilhidrazin (DNPH) yöntemiyle [11] plazmanın elde edilmesi sonrası hemen analiz edildi.

Bulguların değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin yanı sıra (ortalama, standart sapma), normal dağılım gösteren parametreler için Anova ve Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametreler ise Kruskal Wallis testi ve Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 düzeyinde kabul edildi.

BULGULAR

Tedavi uygulanmayan olgulardan oluşan Grup I'de yaş ortalaması 34.6 (21-54), kadın/erkek oranı 13/5, tedavi altındaki asemptomatik olgulardan oluşan Grup II'de yaş ortalaması 35.1 (19-57), kadın/erkek oranı 16/6, kontrol grubunu oluşturan Grup II'de ise yaş ortalaması 33.2 (22-57), kadın/erkek oranı 13/5 idi. Grup I'deki hastaların solunum fonksiyon testlerinde değişik derecelerde bozukluk görülürken, Grup II ve Grup III'teki olgularda solunum fonksiyon testleri normal sınırlarda bulundu.

MDA ve CAT düzeyleri, Grup I ve Grup II olgularda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Grup I ve Grup II arasında anlamlı fark yoktu (p>0.05). Ayrıntılar Tablo I ve Tablo II'de belirtilmiştir.

GPx düzeyi açısından astımlı olgular ile kontrol grubu arasında fark saptanmadı. Bulgular Tablo III'te görülmektedir.

SP düzeyi, hiç tedavi uygulanmamış semptomatik hastalarımızda (Grup I), kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yük-

Eritrosit GPx	n	Ort±SS	p
Kontrol	20	57.7±14.39	p>0.05
Grup I	18	65.1±22.21	p>0.05
Grup II	20	69.5±31.19	p>0.05

SP	n	Ort±SS	p
Kontrol	20	61.84±25.94	p<0.01
Grup I	18	133.4±82.68	p>0.05
Grup II	20	104.4±56.36	p>0.05

sek bulundu ($p<0.01$). Düzenli tedavi görmekte olan, asemptomatik hastalarımız (Grup II) ile kontrol grubu arasında ise fark yoktu. Gruplara göre SP sonuçları Tablo IV'te özetlenmiştir.

Vit C düzeyleri bakımından, her üç grup arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Bulgular Tablo V'te yer almaktadır.

TARTIŞMA

Oksidatif stres, ateroskleroz, karsinogenezis, astım, KO-AH, romatoid artrit ve psöriyazis gibi kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde yer almaktadır [12]. Normalde, solunum yolu epiteli, endojen ve eksojen SOR yüküne karşı antioksidan enzim ve moleküllerle korunur. Hücre içi enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), CAT, GPx, glutatyon (GSH) redoks halkası bulunur. Enzimatik olmayan başlıca antioksidanlar arasında SP, E vitamini ve Vit C mevcuttur. Alt solunum yolları yüzey epitel sıvısında antioksidan olarak SOD, CAT ve albümin, SP, transferrin gibi plazma proteinleriyle GSH ve vitaminler bulunur [13].

Serbest radikallere bağlı doku hasarı oluşumunda en önemli mekanizma, hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır [14]. Oksidanlar, çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Bunun sonucunda, hidroperoksizad ve uzun etkili aldehitler ortaya çıkar. Lipid peroksidasyonunun son ürünü, MDA, eten ve pantendir [15]. Bu reaksiyonlar, hücre membranındaki lipidlerin yapısını bozar, iyonlara karşı geçirkenlik artar ve hücre ölümü olur [16].

Wood ve arkadaşları [17], astımlı hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerini yüksek olarak saptamışlardır. Rahman ve arkadaşları [18], lipid peroksidasyon ürünlerinin plazma düzeyini, astımlı hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlar, Vural ve arkadaşları [2] çalışmalarında, astımlı hastalarda MDA'nın yüksek olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da MDA düzeyleri hiç tedavi görmemiş Grup I ve düzenli tedavi görmekte olan Grup II hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Astımlı hastalarda MDA'nın kontrol grubuna göre yüksek bulunması, astımda oksidan sistem aktivitesinin arttığını düşündürmektedir.

VİT C	n	Ort±SS	p
Kontrol	20	1.0±0.9	p>0.05
Grup I	18	1.0±7.7	p>0.05
Grup II	20	0.8±0.3	p>0.05

Steroidler, astımdaki hava yolu inflamasyonunu kontrol altına almaktadır [12]. Oksidan aktivitenin yüksek bulunduğu astımlı hastalarda, steroid tedavisinden sonra oksidan düzeylerinin düştüğünü gösteren çalışmalar vardır [19,20]. Ancak bizim tedavi uygulanmayan ve düzenli tedavi uygulanan iki grubumuzda da MDA düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş, astımlı hastalardan oluşan iki grup arasında ise fark bulunamamıştır. Bu da bize steroid tedavisine rağmen, oksidan aktivitenin devam edebileceğini düşündürmektedir.

Astımlı hastalarda SOR aktivitesi yüksek saptanırken, çeşitli çalışmalarda antioksidan aktivite artmış ya da azalmış bulunmaktadır. Joseph ve arkadaşları [21] astımlı hastalarda SOD aktivitesini düşük bulduklarını bildirmişlerdir. Tekin ve arkadaşları [6], astımlı hastalarda antioksidan maddelerin düzeyini araştırmışlar, SOD aktivitesini kontrol grubuna göre düşük bulurken, CAT ve GPx düzeylerinde anlamlı bir fark saptayamamışlardır. Bu sonuçları, astımlı hastalarda, azalmış antioksidan düzeylerinin astım patogeneğinde katkısı olabilir şeklinde yorumlamışlardır.

Bir başka çalışmada, eritrosit SOD aktivitesi normal saptanırken GPx aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur [22]. Kurosawa ve arkadaşları [23], astımlı hastalarda SOD düzeyinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğunu saptamışlardır. Stone ve arkadaşları [24] ise plazma GPx aktivitesinde astımlı hastalar ile kontrol grubu arasında fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda CAT, Grup I ve Grup II olgularında kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, GPx düzeyleri bakımından her üç grup arasında anlamlı bir fark saptanamadı.

Plazma SP, önemli bir ekstraselüler antioksidandır [25]. Vural ve arkadaşlarının [2] yaptığı çalışmada, astımlı hastalarda, SP düzeyi yüksek bulunmuştur. Biz, SP düzeyini Grup I'de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulurken, Grup II hastaları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamadık.

Vit C düzeyi düşük beslenmenin astım için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Vit C, hava yollarının yüzey epiteli sıvısında bulunan en önemli antioksidandır ve endojen ve eksojen oksidanlara karşı önemli bir koruyucu olduğu belirtilmektedir. [5]. Elli bir astımlı hasta ile yapılan kar-

şılaştırmalı bir çalışmada, plazma Vit C düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur [26]. Kalaycı ve arkadaşları [27], astımlı çocuklarda antioksidan vitamin düzeylerine bakmışlar, antioksidanların, remisyonadaki çocuklarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. Lipid peroksidasyon ürünleri ise, atak sırasında remisyona göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, lipid peroksidasyon ürünleri ile antioksidan vitaminler arasında bir korelasyon görülememiştir. Astımlı hastalarda Vit C verilerek yapılan çeşitli çalışmalarda bronş aşırı duyarlılığı ve çeşitli astım semptomlarında azalma olduğu gözlenmiştir [28,29]. Bizim çalışmamızda ise Vit C plazma düzeylerinde her üç grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sigara içen kişilerde yapılan çalışmalarda, oksidan madde artışıyla birlikte GSH, GPx, CAT düzeyleri de yüksek bulunmuştur [30,31]. Endojen antioksidan mekanizma, sigara içen kişilerde, antioksidan düzeyini artırabilmektedir. Sigara dumanına maruz bırakılan fare ve hamsterlerde koruyucu yanıt olarak antioksidan aktivitede artış, oksidatif tolerans modelini oluşturmaktadır. Oksidatif tolerans, tam açıklanamamış bir fenomendir. Ancak düşük düzeyde oksidatif strese karşı adaptasyon ve antioksidan savunmada artış olarak tanımlanmaktadır. Böylece, sigaranın oksidan etkisi KOAH gelişimine katkıda bulunurken, antioksidanların artışı koruyucu olabilmektedir. Sigara içenlerin bir kısmında belki de oksidatif tolerans nedeniyle KOAH gelişmemektedir [32].

Çalışmamızda, oksidan aktivitenin bir göstergesi olan MDA düzeyi, Grup I ve Grup II'deki hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, antioksidanlardan CAT, tüm astımlı hastalarımızda, SP ise Grup I'deki hastalarımızda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuçlar, astımlı hastalarda da (oksidatif tolerans modelinde olduğu gibi) oksidan hasarla birlikte, koruyucu olarak antioksidan aktivitenin de artabileceğini düşündürmektedir. Olgularımızın hafif astımlı olması da bu olguların oksidatif tolerans nedeniyle hafif astımlı grupta kaldıkları olasılığını akla getirmektedir.

Sonuç olarak, astımlı hastalarda oksidan ve antioksidan aktivitenin artmış bulunması, bu sistemin astım patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmekle birlikte, kesin rolünün gelecekte daha iyi aydınlanacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Horvath I, Donnelly LE, Kiss A et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1042-1046.
- Vural H, Uzun K, Erel Ü. Antioxidant status and lipid peroxidation in asthma. *Solunum Hastalıkları* 1999;10:77-83.
- Kelly CA, Ward C, Stenton SC et al. Numbers and activity of cells obtained at bronchoalveolar lavage in asthma, and their relationship to airway responsiveness. *Thorax* 1998;43:684-92.
- Jarjour NN, Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med.* 1994;123:131-7.
- Hatch GE. Asthma, inhaled oxidants, and dietary antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61 (suppl):625S-30S.
- Tekin D, Sin BA, Mungan D et al. The antioxidative defense in asthma. *J Asthma* 2000 Feb; 37(1):59-63.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obs Gynecol L.* 1979;372-376.
- Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chem Acta.* 1991;196:143-152
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and the qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158-168.
- Lehmann P, Schosinsky KH, Beeler MF. Standardization of serum seruloplasmin concentrations in International Enzyme Units With o-dianisidine dihydrochloride as Substrate. *Clin Chem.*1974;20 (12):1564-1567.
- Mc Cormick DB, Greene HL. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* Philadelphia. WB Saunders Co 1999;1025.
- Horvath I, Donnelly LE, Kiss A et al. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53:668-672.
- Ünlü M, Akkaya A. Reaktif oksijen metabolitleri ve akciğer hastalıkları. *Solunum Hastalıkları* 1999;10:207-211.
- Şahin Ü, Tahan V, Akkaya A ve arkadaşları. Primer akciğer kanserinde lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktivitesi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 1999;47 (1):31-35.
- Petruzzelli S, Hietanen E, Barstch H et al. Lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients. *Chest* 1990; 98: 930-5.
- Mertoğlu A. Oksidan ve antioksidan etkileşimleri. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi Ocak* 1993; Cilt VII. Sayı:1.
- Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG et al. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000 Sep; 35(9): 967-74.
- Rahman I, Marrison D, Donaldson K, Macnee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154:1055-60.
- Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, Nowak D. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir Med.* 2000 May; 94 (5):416-21.
- Saleh D, Ernest P, Lim S et al. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998 Aug; 12 (11):929-37.
- Joseph BZ, Routes JM, Borish L. Activities of superoxide dismutases and NADPH oxidase in neutrophils obtained from asthmatic and normal donors. *Inflammation* 1993;17: 361-70.
- Tho LL, Candlish JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease: a survey of one hundred cases. *Biochem Med Metabol Biol.*1987; 38: 74-80.
- Kurosawa M, Kobayashi H, Nakano M. Cu-Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in platelets from stable bronchial asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993; 101: 61-5.
- Stone J, Hinks LJ, Beasley R et al. Reduced selenium status of patients with asthma. *Clinical Science* 1989; 77: 495-500.
- Heffner JA, Repine JE. State of art: pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 531-54.
- Aderle WR, Ette SI, Oduwoule O, Ikpeme SJ. Plasma, vitamin C (ascorbic acid) levels in asthmatic children. (abstract) *Afr J Med Med Sci.* 1985;14:115-20.
- Kalaycı O, Beslar T, Kilinc K, et al. Serum levels of antioxidant vitamins (alpha tocopherol, beta carotene, and ascorbic acid) in children with bronchial asthma. *Turk J Pediatr.* 2000 Jan-Mar; 42 (1):17-21.

28. Schönemann HJ, Grant BJ, Freudenheim JL et al. The Relation of Serum Levels of Antioksidant Vitamins C and E, Retinol and Carotino-ids with Pulmonary Function in the General Population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;Vol 163. pp 1246-1255.
29. Forastiere F, Pistelli R, Sestini P et al. Consumption of fresh fruit rich in vitamin C and wheezing symptoms in children. *Thorax* 2000 Apr; 55 (4):283-8.
30. Mangione S, Kueppers F, Puglia C, Greenspon L W. Erythrocytes pre-vent inactivation of alpha-1-antitrypsin by cigarette smoke. *Eur Respir J.* 1991;4:26-30.
31. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal G. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 1989; 63:152-157.
32. Repine JE, Bast A, Lankhorst I and The Oxidative Stress Study Group. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156. 341-357.