

Fumo di tabacco e stress ossidativo respiratorio

Tobacco smoke and respiratory oxidative stress

Enrico M. Melillo, Gaetano Melillo

Riassunto

Il fumo di sigaretta è uno dei più potenti ossidanti. Esso rappresenta la causa più importante nello sviluppo della BPCO. L'azione è diretta, attraverso gli ossidanti in esso contenuti, ed indiretta, attraverso l'attivazione delle cellule epiteliali e dei macrofagi residenti nei bronchi, nonché delle cellule reclutate (neutrofili, monociti, linfociti ed eosinofili). Molteplici sono i danni provocati dal fumo: danno epiteliale, effetti sull'equilibrio proteasi-antiproteasi, danni a livello del DNA, riduzione della capacità antiossidante del plasma, riduzione della capacità di inibizione dell'elastasi nei soggetti con deficit di alfa1 antitripsina. La possibilità di misurare i markers biologici dello stress ossidativo (H_2O_2 , sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico-TBARs, F2-isoprostano) in maniera non invasiva nel condensato espiratorio ha permesso un progressivo ampliamento delle ricerche in campo di stress ossidativo. La sospensione del fumo, pur non eliminandola, riduce la componente infiammatoria e produce diminuzione o arresto del declino della funzione respiratoria.

Parole chiave: stress ossidativo, specie reattive dell' O_2 (ROS), markers biologici, BPCO, danno ossidativo, condensato espiratorio

Summary

Cigarette smoke is a very powerful oxidant. It has been shown to play a key role in the development of COPD. It acts directly through oxidant components of smoke or activation of epithelial resident cells and macrophages, as well of recruited cells (neutrophils, lymphocytes, eosinophils). Several damages may be due to smoke: epithelial damage, effects on the proteinase-anti-proteinase balance, DNA damage, plasma antioxidant depletion, decreased ability to inhibit elastase in patients with alfa1-antitrypsin deficit. Measurement of biological markers of oxidative stress (H_2O_2 , thiobarbituric acid reactive substances-TBARs, F2-isoprostane) in expiratory breath condensate by a non invasive method has recently allowed to increase studies in the field of oxidative stress. Smoking cessation, although not removing it, reduces the inflammatory component and decreases or even stops the progressive decline of pulmonary function.

Keywords: oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), biological markers, COPD, oxidative damage, expiratory breath condensate.

INTRODUZIONE

Per stress ossidativo si intende un'aumentata esposizione ad ossidanti e/o diminuita capacità antiossidante con esito in squilibrio tra ossidanti ed antiossidanti. Gli ossidanti generalmente indicati come "specie reattive dell'ossigeno" (ROS, reactive oxygen species) o metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) comprendono i radicali liberi quali il radicale superossido (O_2^-), che si forma dall' O_2 molecolare per perdita di un elettrone, ed il radicale idrossile (OH), più altri derivati non-radicali dell' O_2 quali il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'acido ipocloroso (HOCl). Le specie reattive dell' O_2 sono implicate nella patogenesi di svariate malattie (cardio- e vasculopatie, neu-

ropatie, diabete, epatopatie, virusi, artrite reumatoide, pneumopatie, etc.). Molti tessuti sono esposti al danno ossidativo, ma, per ragioni anatomico-funzionali, la superficie epiteliale del polmone risulta particolarmente a rischio (1).

Lo stress ossidativo è stato evidenziato nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), nella fibrosi cistica, nell'asma, nella fibrosi polmonare idiopatica, in alcune broncopneumopatie professionali, nella sindrome da distress respiratorio dell'adulto. Data la nota correlazione tra fumo di tabacco e BPCO, faremo riferimento nella presente rassegna a tale patologia, che risulta peraltro la più studiata per quanto riguarda il ruolo dello stress ossidativo.

FUMO DI TABACCO E BPCO

Il fumo di sigaretta è la causa di maggior rilievo nello sviluppo della BPCO (2). Altre possibili cause possono agire come fattori di rischio indipendente, ma la loro importanza è minima se paragonata a quella del fumo. Solo nell'1% dei casi di BPCO si rileva un fattore di rischio di importanza paragonabile, che è il deficit di alfa1-antitripsina (3). Il fumo di tabacco interviene in modo determinante anche nella storia naturale della BPCO. La diminuzione di funzione polmonare con l'età, in soggetti normali ed in fumatori, è riportata in Fig. 1.

I soggetti normali non fumatori perdono fisiologicamente tra i 25 ed i 35 ml di VEMS (o FEV1) all'anno. Tale percentuale di perdita è decisamente più elevata

Enrico M. Melillo, Gaetano Melillo

Unità Operativa di Pneumologia e Riabilitazione Respiratoria - Fondazione S. Maugeri, IRCCS - Clinica del Lavoro e della Riabilitazione - Istituto Scientifico di Telese (BN)

nei fumatori (4). I pazienti con BPCO mostrano una riduzione del FEV1 di circa 90 ml/anno. Questo processo può essere arrestato ed in parte fatto regredire mediante la cessazione del fumo. Lo studio "Lung Health Study" ha evidenziato come pazienti che avevano sospeso il fumo presentassero un aumento medio del FEV1 post-broncodilatazione di 57 ml alla prima visita annuale, laddove in coloro che avevano continuato a fumare si registrava una diminuzione di 38 ml del medesimo valore (5). Viene così confermato che la sospensione del fumo non solo arresta il progressivo declino della funzione polmonare ma può addirittura farla migliorare. Bambini esposti a fumo passivo manifestano in genere maggiore prevalenza di sintomi e malattie respiratorie rispetto ai non esposti, ed una diminuzione nel tempo della funzione polmonare come nell'adulto.

negli spazi aerei, nel respiro, nel sangue e nelle urine di fumatori.

Il fumo di sigaretta è una miscelanea complessa di oltre 4700 composti chimici, incluse alte concentrazioni di ossidanti (1014 ossidanti/puff) (7).

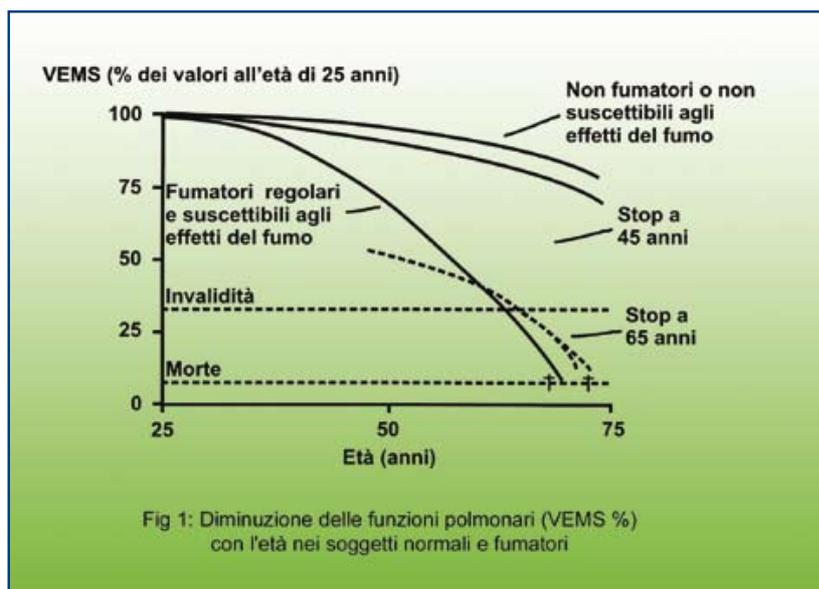
La fase gassosa del fumo di sigaretta contiene alte quantità di ossidanti a breve vita quali l' $\cdot\text{O}_2$ e l'ossido nitrico (NO). $\cdot\text{O}_2$ e NO reagiscono per formare molecole di perossinitrico altamente reattivo (ONOO-) (8). La fase corpuscolata del fumo contiene invece radicali a lunga vita come i radicali semichinone, che possono reagire con l' $\cdot\text{O}_2$ per formare radicale idrossile (O \cdot H) e H_2O_2 .

Il fumo di sigaretta ha la capacità di generare H_2O_2 anche se in soluzione acquosa (9, 10). Per quanto attiene agli ossidanti di origine endogena, un aspetto comune dell'infiammazione polmonare nelle broncopneumopatie in genere è lo sviluppo di una risposta infiammatorio-

sido di idrogeno (H_2O_2). La generazione di ossidanti a livello respiratorio può essere incrementata dalla reazione dell' O_2 in presenza di piccole quantità di ioni metallici, come il ferro libero. Questo, sotto forma ferrosa (Fe^{2+}), catalizza la reazione di Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^3 + \text{OH} + \text{OH}\cdot$), dando origine al radicale idrossile (O \cdot H). L' H_2O_2 , se catalizzato dalla mieloperossidasi neutrofila in presenza di cloruro, forma acido ipocloroso (11, 12).

MECCANISMI DI PRODUZIONE DEGLI OSSIDANTI

Accanto al meccanismo diretto espletato dagli ossidanti contenuti nel fumo, esiste un meccanismo indiretto manifestantesi attraverso stimolazione ed attivazione delle cellule residenti (cellule epiteliali e macrofagi) e di quelle reclutate (neutrofili, linfociti, eosinofili). Per quanto riguarda le cellule reclutate è di notevole rilevanza l'influsso dei neutrofili. Il loro sequestro nei capillari polmonari dà ad essi tempo per interagire ed aderire all'endotelio capillare polmonare e, quindi, per trasmigrare attraverso la membrana alveolare capillare nell'interstizio e negli spazi aerei del polmone. È stato dimostrato che nei fumatori vi è aumento transitorio del sequestro di neutrofili nel polmone (13) in conseguenza della loro deformabilità (14). Studi in vitro hanno dimostrato che tale aumentata deformabilità indotta dal fumo è abolita dagli antiossidanti, come il glutatione (GSH), suggerendo indirettamente una mediazione degli ossidanti nell'evento iniziale (14). L'inalazione forzata di fumo in criceti aumenta l'adesione dei neutrofili all'endotelio di arteriole e venule (15); tale evento si ritiene mediato dall'anione superossidodismutasi (SOD) derivato dal fumo di sigaretta, poiché esso è inibito dal pretrattamento con CuZn superossidodismutasi (SOD) (15). Neutrofili sequestrati nel circolo polmonare di conigli in seguito ad inalazione forzata di fumo, mostrano aumentata espressione di CD18 (16). Il sequestro di neutrofili nel microcircolo polmonare facilita l'insorgenza della chemiotassi; la nicotina è d'altronde per se stessa chemiotattica. L'esposizione al fumo, pertanto, dà luogo alla presenza di fattori chemiotattici negli spazi aerei



ORIGINE DEGLI OSSIDANTI

Gli ossidanti possono riconoscere origine esogena o endogena.

Tra i fattori esogeni abbiamo già annoverato come potente ossidante il fumo di sigaretta. Considerevoli evidenze sono state finora riportate in letteratura riguardo all'aumentato carico di stress ossidativo in fumatori, specie se sviluppati BPCO, basate sull'aumento dei markers biologici di stress ossidativo

immunitaria da attivazione delle cellule epiteliali e dei macrofagi residenti, nonché delle cellule reclutate (neutrofili, linfociti, eosinofili). Una volta reclutate, le cellule possono essere attivate e generare metaboliti reattivi dell' O_2 in risposta a vari stimoli, incluse le citochine. L'attivazione delle varie cellule genera anione superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Fig. 2).

Esso, sotto l'influenza della perossidodismutasi (SOD), viene convertito in peros-

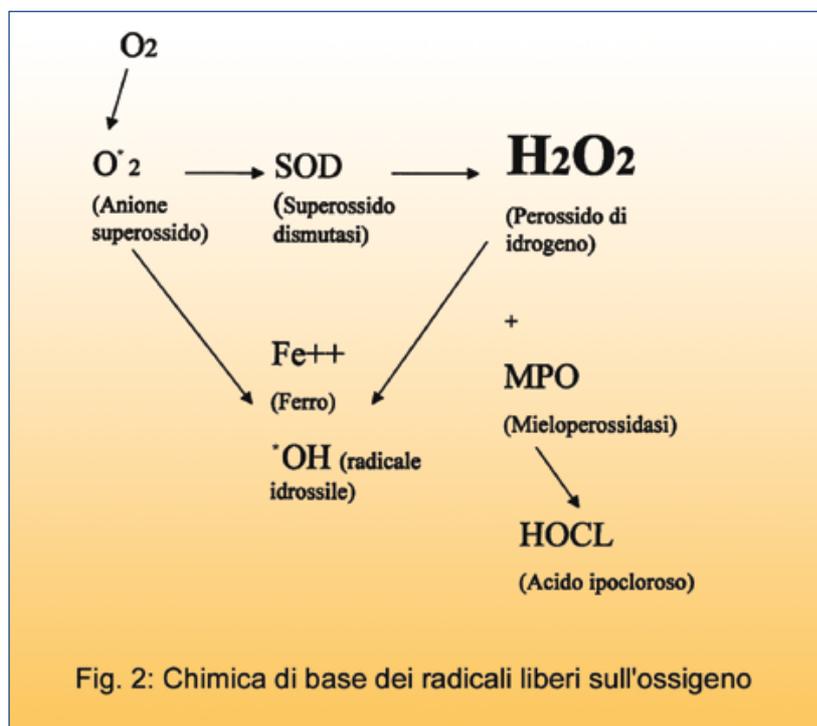


Fig. 2: Chimica di base dei radicali liberi sull'ossigeno

(17). È stata recentemente segnalata in letteratura infiltrazione neutrofila nelle vie aeree periferiche.

L'esame della microlocalizzazione di cellule infiammatorie nelle vie aeree periferiche ha mostrato significativo aumento della quantità di neutrofili, sia in fumatori con BPCO conclamata che in fumatori con normale funzionalità polmonare (18). Studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione tra il numero di neutrofili circolanti ed il FEV1 (19). Altrettanto correlati si sono dimostrati il rilascio di ossidanti dai neutrofili in circolo ed i valori di limitazione del flusso aereo in giovani fumatori (20). Con riferimento alle restanti cellule infiammatorie, è stato riportato aumento di macrofagi e T-linfociti nella mucosa bronchiale di fumatori con BPCO aventi livelli di ostruzione bronchiale paragonata a soggetti normali non fumatori (21). Segni di aumentata attivazione e produzione di specie reattive dell' O_2 da parte di tali cellule sono stati osservati in fumatori (22-24). Il liquido di lavaggio bronchioloalveolare di fumatori contiene un maggior numero di macrofagi alveolari, con maggiore densità e produttori maggiori quantità di anione superossido (22-24).

In aggiunta a ciò, i macrofagi alveolari di fumatori reduci da recente infezione delle basse vie aeree rilasciano un'aumentata quantità di H_2O_2 .

EFFETTI DANNOSI DEL FUMO

Il danno epiteliale delle vie aeree è una precoce ed importante conseguenza dell'esposizione al fumo, confermata dalla conseguente aumentata permeabilità dell'epitelio. Quest'ultima, susseguente alla deplezione glutationica, facilita i processi infiammatori per l'afflusso di neutrofili e macrofagi attivati, liberanti a loro volta altri ossidanti (O_2 , H_2O_2). Un secondo effetto è quello esplicito sul bilancio proteasi-antiproteasi nel polmone. Questo può manifestarsi attraverso un aumentato carico di proteinasi (particolarmente elastasi neutrofila) o attraverso la menomazione funzionale dello schermo antielastico, riguardante l'antielastasi delle vie di conduzione aerea (l'inibitore della proteina del muco bronchiale), e soprattutto l'antielastasi del tratto respiratorio inferiore (l'inibitore dell'alfa1proteinasasi che è il principale antiproteasico nelle vie aeree, alfa1PI). Componenti fondamentali della matrice polmonare (elastina, collagene) posso-

no essere direttamente danneggiate o frammentate dagli ossidanti del fumo (26). Il danno da fumo può manifestarsi inoltre a livello del DNA attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione quali il NF-KB e l'API, regolanti i mediatori proinfiammatori e per l'espressione del gene antiossidante protettivo.

METODICHE DI MISURA DELLE SPECIE REATTIVE DELL' O_2

Per la misurazione dello stress ossidativo in campo di malattie respiratorie, più che verso le rilevazioni su siero di sangue o urine come negli anni scorsi, le ricerche si sono recentemente orientate a livello locale, con particolare attenzione al condensato espiratorio. In esso sono infatti quantificabili i principali markers biologici di stress ossidativo quali l' H_2O_2 , le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARs) e l'8-isoprostano (27).

FUMO E ANTIOSSIDANTI

Abbiamo informazioni decisamente limitate sulle difese antiossidanti epiteliali in fumatori (28). La protezione naturale contro l'aumentata concentrazione di H_2O_2 è svolta dalla catalasi, e in ambito polmonare, dal glutatone.

L'analisi del liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di fumatori con BPCO ha mostrato aumentata concentrazione di glutatone in toto (libero e legato a bisolfuro) (29). Rahman e coll. (30, 31) hanno studiato gli effetti acuti dell'instillazione endotracheale di condensato di fumo sul metabolismo del glutatone in vitro in una linea di cellule epiteliali umane ed in vivo nei polmoni di ratto, riscontrando deplezione glutationica intracellulare tempo dipendente e concomitante con la formazione di coniugati del glutatone. Altri studi hanno mostrato modificazioni variabili degli ossidanti nel BAL (32). È stato inoltre riportato che il fumo aumenta il GSH nel liquido epiteliale superficiale di fumatori cronici, ma lo riduce nell'esposizione acuta al fumo.

Una marcata deplezione sulfidrilica nel polmone è stata osservata in vitro a seguito di esposizione al fumo, il che può aiutare a spiegare la caduta delle

capacità antiossidanti nel plasma dopo il fumo. Molti investigatori hanno misurato i principali antiossidanti plasmatici (acido ascorbico, alfatocoferolo, acido urico e solfidrici) in fumatori [32, 33], dimostrando deplezione di acido ascorbico, vit. E, betacarotene e selenio nel siero di fumatori cronici.

Il liquido di lavaggio broncoalveolare di fumatori si è mostrato meno ricco in vit. E rispetto ai non fumatori [34]. Il dato netto è che la capacità antiossidante del plasma è significativamente ridotta dal fumo (ed in pazienti con riacutizzazione di BPCO) a paragone con quella di soggetti normali.

SOSPENSIONE DEL FUMO

La sospensione del fumo produce effetti sui processi infiammatori mucosali e sulla funzione polmonare. È stata infatti osservata riduzione del numero di macrofagi alveolari e dei polimorfonucleati in liquido di broncolavaggio dopo 6 mesi dalla cessazione del fumo [35, 36]. Ulteriori studi

hanno evidenziato invece persistenza dei processi infiammatori nelle vie aeree periferiche pur in presenza di una migliorata funzionalità respiratoria [37].

Inflammation persistente era poi rilevata a livello delle vie aeree centrali e periferiche in pazienti con bronchite persistente dopo cessazione del fumo [38, 39]. È quindi evidente che il fumo cronico può manifestare i suoi effetti sull'attività metabolica e sui processi mediati da fagociti polmonari per lungo tempo in ex fumatori [40]. Del tutto caratteristico è il comportamento dello stress ossidativo in ex fumatori. Concentrazioni simili di H_2O_2 sono state riscontrate in fumatori in atto ed ex fumatori [41, 42].

Il fumo è il principale fattore ambientale causante accelerato declino della funzionalità respiratoria in adulti [4, 5]. Gli effetti della cessazione del fumo sono variabili e sembrano condizionati

dall'età dei pazienti. La frequenza del declino di funzionalità respiratoria in pazienti con BPCO moderata è ridotta dalla cessazione del fumo, che potenzialmente diminuisce molte sorgenti di stress ossidativo. Dimostrativa in tal senso è l'osservazione della riduzione del numero di macrofagi alveolari e neutrofili nel liquido di lavaggio bronchiale (e del conseguente squilibrio ossidanti-antiossidanti) di soggetti che avevano sospeso il fumo per sei mesi [37, 38].

Bosse e coll. hanno osservato un rapido effetto benefico della cessazione del fumo con ridotta percentuale di declino

del FEV1, anche in soggetti dai 50 ai 69 anni [43]. In un recente studio su pazienti che avevano sospeso il fumo, nei 6 mesi successivi si manifestava miglioramento del FEV1 e FEV1/FVC, ma tale effetto positivo non compariva nei più anziani del gruppo [44].

Un quadro sufficientemente indicativo degli effetti del fumo e relativa cessazione è a nostro parere reperibile

nello studio di Fletcher [4] e nel "Lung Health Study" [5].

CONCLUSIONI

Il fumo di sigaretta è uno dei più potenti ossidanti a cui un essere umano possa esporsi, e non sorprende che esso costituisca il principale responsabile di insorgenza e persistenza della BPCO, mediante la sua duplice azione: diretta, attraverso gli ossidanti in esso contenuti, ed indiretta, attraverso stimolazione delle cellule infiammatorie residenti e reclutate, che una volta attivate producono sostanze reattive dell' O_2 (ROS). Tra i molteplici danni da fumo annoveriamo in prima battuta quello sull'epitelio respiratorio, l'inattivazione dell'antiproteasi, l'ipersecrezione mucosa, l'aumentato sequestro di neutrofili nel microcircolo polmonare e l'espressione genica di mediatori proinfiammatori. La cessazione del fumo produce altresì di-

minuzione dell'infiammazione con riduzione del numero di macrofagi alveolari e neutrofili e diminuzione o arresto del declino della funzionalità respiratoria. La cessazione del fumo impoverisce pertanto molte delle principali sorgenti di stress ossidativo, modifica positivamente la storia naturale della BPCO e migliora qualità ed aspettativa di vita [45]. ■

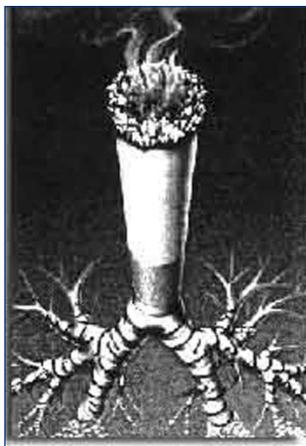
Corrispondenza: Enrico M. Melillo, c/o Fondazione S. Maugeri

Via Bagni Vecchi, 82037 Telesse (BN)

Tel. 0824909111/357

fax 0824909614/9

enrico.melillo@fastwebnet.it



Bibliografia

1. Crystal RG. Ossidanti e danno epiteliale delle vie respiratorie: patogenesi e strategie di intervento terapeutico. In: GSH system: glutathione in antioxidant defense. L Allegra, RG Crystal and C Grassi Eds., Excerpta Medica, Amsterdam 1992: 63-74
2. Sherril DL, Lobwitz MD, Burrows B. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest* 1990; 11: 375-388
3. Buist SA. Smoking and other risk factors. In: Murray JF, Nadel JA Eds. *Textbook of respiratory medicine - 2nd ed.*, Philadelphia, Saunders 1994: 1259-1287
4. Fletcher C, Peto K. The natural history of chronic airflow obstruction. *Brit Med J* 1977; 1: 1645-1648
5. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Althouse MD, Bailey WC, Buist S et al. The effect of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1: the Lung Health Study. *JAMA* 1994; 272: 1497-1505
6. MacNee W. Oxidants, antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to treatment. *Wiley, Chichester: Novartis Foundation Symposium* 232, 2001: 169-188
7. Nakayama T, Church DF, Prior WA. Quantitative analysis of hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radical Biol Med* 1989; 7: 9-15
8. Prior WA, Brier DG, Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and cigarette TAR. *Environ Health Perspective* 1985; 47: 345-355
9. Repine JE, Bast AA, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: 341-357
10. Alliwell B, Gatteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 86: 1-85
11. MacNee W, Selby C. New perspectives on basic mechanisms in lung diseases. 2 - Neutrophil traffic in the lungs: role of haemodynamics, cell adhesion and deformability. *Thorax* 1993; 48: 79-88
12. Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GD, MacNee W. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Resp Crit Care Med* 1992; 6: 287-295
13. Lehr HA, Kress E, Menger MD, Friedl HP, Hubner C, Arfors KE, Messmer K. Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters: inhibition by CuZn-SOD. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 573-581
14. Klut ME, Doerschulk CM, Van Eeden SF, Burns AR, Hogg JC. Activation of neutrophils in the pulmonary microvasculature of rabbits exposed to cigarette smoke. *Am J Resp Crit Care Med* 1993; 39: 82-90
15. Morrison D, Strieter RM, Donnelly SC, Burdick MD, Kunkel SL, MacNee W. Neutrophil chemokines in bronchoalveolar lavage fluid and leukocyte-conditioned medium from nonsmokers and smokers. *Eur Resp J* 1988; 12: 1067-1072
16. Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghè B, Zuin R et al. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax* 2004; 59(4): 308-312
17. Chan-Yeung M, Abboud R, Buncio AD, Vedal S. Peripheral leukocyte count and longitudinal decline in lung function. *Thorax* 1988; 43: 462-468
18. Richards GA, Theron AJ, Van Der Merwe CA, Anderson R. Spirometric abnormalities in young smokers correlate with increased chemiluminescence responses of activated blood phagocytes. *Am Rev Resp Dis* 1989; 139: 181-187
19. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Resp Dis* 1993; 47: 301-306
20. Hoidal JR, Fox RB, Le Marbe PA, Perri R, Repine JE. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am Rev Resp Dis* 1981; 123(1): 85-89
21. Greening AP, Lawric DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections. *Clin Science* 1983; 165: 661-664
22. Schaberg T, Klein U, Rau M, Eller J, Lode H. Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 151: 1551-1558
23. Morrison D, Lannan S, Langridge A, Rahman I, MacNee W. Effect of acute cigarette smoking on epithelial permeability, inflammation and oxidant status in the airspaces of chronic smokers. *Thorax* 1994; 49: P1077
24. Cantin A, Crystal RG. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur Resp J* 1985; 66(suppl. 139): 7-17
25. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7(1): 1-32
26. McCusker K, Hoidal JR. Selective increase of antioxidant enzyme activity in alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke exposed hamsters. *Am Rev Resp Dis* 1990; 41: 678-687
27. Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, Turnek A, Larson M, Tegner H et al. Airway inflammation in smokers with non obstructive bronchitis. *Am Rev Resp Dis* 1993; 148: 1226-1232
28. Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W. Glutathione omeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol* 1995; 269: L285-L292
29. Rahman I, Smith CA, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W. Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar cells. *FEBS Letter* 1996; 396: 21-25
30. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 154: 1055-1060
31. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277(6 pt.1): L1067-L1088. Review.
32. van Antwerpen L, Theron AJ, Myer MS, Richards GA, Wolmarans L, Booysen U et al. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vit. C, vit. E and tissue injury. *Ann NY Acad Sci* 1993 May 28; 686: 53-65
33. Chow CK, Thacker RR, Changchit C, Bridges RB, Rehm SR, Humble J, Turbek J. Lower levels of vit. C and carotene in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986; 5: 305-312
34. Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, Cornwell DG, Davis WB. Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. Influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *Clin Invest* 1988; 77: 789-796
35. Rennard SI, Daughton D, Fujita J, Cehlerking MB, Dobson JR, Stahl MG et al. Short-term smoking cessation is associated with reduction in measures of lower respiratory tract inflammation in heavy smokers. *Eur Resp J* 1990; 3: 752-759
36. Skold CM, Had J, Eklund A. Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid while alveolar macrophage fluorescence remains high. *Chest* 1992; 101: 989-991
37. Wright JL, Lawson LM, Pare PD, Wiggs BR, Kennedy S, Hogg JC. Morphology of peripheral airways in current smokers and ex smokers. *Am Rev Resp Dis* 1983; 127(4): 474-477
38. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Structure of central airways in current smokers and ex smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function. *Thorax* 1987; 42: 843-848
39. Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152: 1262-67
40. Skold CM, Forslid J, Eklund A, Hed J. Metabolic activity in human alveolar macrophages increases after cessation of smoking. *Inflammation* 1993; 17: 345-352
41. Nowak D, Antczak A, Kroll M, Pietras T, Shariati B, Bialasiewicz P et al. Increased content of hydrogen peroxide in expired breath of cigarette smokers. *Eur Resp J* 1996; 9: 652-657
42. Van Beurden WJ, Dekhuijzen PN, Smeenk FW. Exhaled biomarkers in COPD: their potential role in diagnosis, treatment and prognosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002; 57(5-6): 258-267
43. Bosse R, Sparrow D, Rose CL, Weiss ST. Longitudinal effect of age and smoking cessation on pulmonary function. *Am Rev Resp Dis* 1981; 123: 378-381
44. Sulubunic DM, Sulubunic TT, Lazovic NN, Kovanic DM. The effect of stop smoking on FEV1 and FEV1/FVC. *Eur Resp J* 2003; 22(suppl.45): P1962
45. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *NHLBI/WHO Workshop report. Publication N. 2701, April 2001: 58-62*