



## Effect of vitamin C on tracheal responsiveness and pulmonary inflammation in chronic obstructive pulmonary disease model of guinea pig

Rana Keyhanmanesh<sup>1</sup>, Mahdi Ahmadi<sup>2</sup>, Sajjad Jeddy<sup>2</sup>, Horyeh Bagban<sup>2</sup>, Fariba Mirzaei Bavi<sup>2</sup>, Mohammad Reza Alipour<sup>3\*</sup>, Mohammad Hossein Boskabady<sup>4</sup>, Javad Ashrafi Helan<sup>5</sup>, Mohammad Ali Ebrahimi Saadatlou<sup>6</sup>

1. Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Physiology Dept., Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Tuberculosis and Lung Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Physiology Dept., Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Pathology Dept., Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran
6. Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Received: 2 Sept 2012

Accepted: 25 Jan 2013

### Abstract

**Introduction:** In the present study, the prophylactic effect of vitamin C, as a potent anti-oxidant, on tracheal responsiveness to methacholine and ovalbumin, bronchoalveolar lavage fluid white blood cell (WBC) count and differential count, and also lung pathology in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) -guinea pigs (cigarette exposed guinea pigs) were examined. In addition, the relaxant effects of theophylline on tracheal chains of guinea pigs were studied.

**Methods:** Twenty four male guinea pigs were randomly divided to three groups; control (C group), COPD model of guinea pigs (COPD group) and pretreated group (COPD+ Vit C group). The two first groups were given drinking water alone, and the third group used water containing vitamin C. The relaxant effects of four cumulative concentrations of theophylline were examined by their relaxant effects on precontracted tracheal chains of guinea pig by 60 mM KCl (group 1) and 10  $\mu$ M methacholine (group 2).

**Results:** The tracheal responsiveness to methacholine and ovalbumine, and WBC count of COPD guinea pigs were significantly higher than those of controls ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). The lung in COPD group showed significant pathological changes. The tracheal responsiveness to methacholine and ovalbumine and WBC count were significantly decreased in pretreated group compared with the COPD guinea pigs (COPD group) ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). In both groups, the relaxant effect of theophylline in the COPD group was lower than the control group (group C) ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** These results showed prophylactic effect of vitamin C on tracheal responsiveness and pulmonary inflammation of COPD-guinea pigs.

**Key words:** COPD, Vitamin C, Tracheal responsiveness

\* Corresponding author e-mail: alipourmr52@gmail.com  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## اثر ویتامین C بر پاسخ دهی تراشه و التهاب ریه در مدل بیماری مزمن انسدادی ریوی (COPD) در خوچه های هندی

رعنا کیهان منش<sup>۱</sup>، مهدی احمدی<sup>۲</sup>، سجاد جدی<sup>۲</sup>، حوریه باغبان<sup>۲</sup>، فریبا میرزایی باویل<sup>۲</sup>، محمدرضا علیپور<sup>۳\*</sup>، محمد حسین بسکابادی<sup>۴</sup>، جواد اشرفی هلان<sup>۵</sup>، محمدعلی ابراهیمی سعادتلو<sup>۶</sup>

۱. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
  ۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
  ۳. مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
  ۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد
  ۵. گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
  ۶. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ایران، شعبه تبریز، تبریز
- دریافت: ۱۲ شهریور ۹۱ پذیرش: ۶ بهمن ۹۱

### چکیده

**مقدمه:** در مطالعه حاضر، اثر پروفیلاکتیک ویتامین C که یک آنتی اکسیدان قوی می باشد، بر پاسخ دهی تراشه به متاکولین و اوالبومین، تعداد و انواع گلبولهای سفید در مایع لاواژ برونشی آلتولی و پاتولوژی ریه در حیوانات در معرض دود سیگار (مدل حیوانی بیماری های انسدادی مزمن ریه) بررسی شد. علاوه بر آن، اثر اتساعی تنوفیلین بر روی زنجیره تراشه خوچه هندی مطالعه گردید؟

**روش ها:** ۲۴ خوچه هندی نر به طور تصادفی در سه گروه کنترل (گروه C)، مدل حیوانی بیماری انسدادی مزمن ریه (گروه COPD) و گروه تیمار شده (COPD+Vit C) تقسیم شدند که دو گروه اول در طول مطالعه، آب و گروه سوم آب حاوی ویتامین C دریافت کردند. پاسخ دهی تراشه به متاکولین و اوالبومین، تعداد کل گلبولهای سفید و انواع آن در مایع لاواژ برونشی آلتولی و پاتولوژی ریه در سه گروه مطالعه شد. بعلاوه اثرات اتساعی چهار غلظت تجمعی از تنوفیلین در دو گروه مختلف، گروه ۱؛ که توسط ۶۰ میلی مول KCl منقبض شده و گروه ۲؛ که توسط ۱۰ میکرو مول متاکولین منقبض شده، مطالعه گردید.

**یافته ها:** پاسخ تراشه به متاکولین و اوالبومین و تعداد کل گلبولهای سفید در گروه COPD بطور چشمگیری بیشتر از گروه کنترل بود ( $p < 0.05$ ). بافت ریه در گروه COPD تغییرات پاتولوژیک واضح را نشان داد. پاسخ تراشه به متاکولین و اوالبومین و تعداد کل گلبولهای سفید در گروه تیمار شده کمتر از گروه COPD بود ( $p < 0.05$ ). در هر دو گروه، اثر اتساعی در گروه COPD کمتر از گروه کنترل بود ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** این نتایج اثر پیشگیری کننده ویتامین C را بر پاسخ تراشه و التهاب ریه در حیوانات تیمار شده نشان داد.

**واژه های کلیدی:** بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD)، ویتامین C، پاسخ دهی تراشه

### مقدمه

امروزه به دلیل رشد روزافزون شان در سرتاسر جهان مورد توجه مسئولین ارتقا بهداشت و سلامت جامعه قرار گرفتند. یک گروه از این بیماری ها، بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD) می باشد که یک بیماری غیرقابل علاج و پیش رونده ای است که با انسداد دائمی در جریان خروجی هوا از ریه ها مشخص می شود [۷]. این بیماری در برگیرنده دو بیماری مشخص

بیماری های غیر واگیر دسته ای از بیماری ها هستند که

alipourmr52@gmail.com

www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

آرتزیت روماتوئید [۴]، بیماریهای کلیوی [۱۷]، بیماریهای قلبی عروقی [۲۱] و انواع سرطانها [۳۷] مشخص شده است. در این مطالعه اثر این ویتامین را بر پاسخ دهی تراشه به متاکولین، اوالبومین و تئوفیلین، تعداد کل گلبولهای سفید و انواع آن در مایع لاواژ برونشی آلئولی و تغییرات التهابی در بافت ریه در مدل حیوانی COPD در خوکچه های هندی قرار گرفته در معرض دود سیگار بررسی شده است.

## مواد و روش ها

نمونه مورد مطالعه و گروه های مورد مطالعه:

خوکچه های هندی نر به وزن تقریبی ۶۵۰-۵۰۰ گرم از انستیتو رازی تهران تهیه شدند و به حیوان خانه مرکز تحقیقات دارویی تبریز منتقل شدند. به منظور رفع استرس حمل و نقل و عادت کردن به محیط جدید، ۱۰ روز به حیوانات استراحت داده شد. لازم به توضیح است در این مدت و در طول مطالعه، حیوانات در قفس هایی نگهداری شدند که غذا و آب کافی در اختیار آنها قرار داشت. دمای حیوانخانه ثابت و چرخه شبانه روزی به طور مرتب ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب رعایت می شد.

این مطالعه بر روی ۲۴ عدد خوکچه هندی انجام گرفت که به سه گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (گروه C)

۲- گروه مدل حیوانی بیماری انسدادی مزمن ریه (گروه

COPD)

۳- گروه تیمار شده (مدل حیوانی بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD) با دریافت ویتامین C) به میزان 0.25 g/lit ویتامین C در آب خوراکی این حیوانات در طول مطالعه حل می شد. (گروه COPD + Vit C)

القای مدل حیوانی بیماری انسدادی مزمن ریه COPD: بر اساس تجربیات قبلی [۹] محفظه ای متشکل از دو محفظه قرارگیری سر حیوان به ابعاد ۳۱×۹×۱۳ سانتی متر و محفظه قرارگیری بدن حیوان به ابعاد ۳۱×۲۸×۱۳ سانتی متر طراحی شد. تا حد امکان در ساخت این محفظه سعی گردید که کمترین امکان تماس گاز با بدن حیوان وجود داشته باشد. برای القای COPD، حیوانات در داخل محفظه گذاشته

برونشیت مزمن و آمفیزم می باشد، اگرچه این دو فرآیند مجزا هستند ولی در اغلب موارد همراه با هم وجود دارند [۵، ۴۰، ۳۴] آمفیزم یک تشخیص آناتومیک است که با بزرگ شدگی دائمی مجاری هوایی انتهایی ناشی از تخریب نسل های مجاری هوایی بعد از برونشلولهای انتهایی مشخص می شود [۱۶]. این بیماری معمولاً در بزرگسالان و بین سنین ۷۵-۵۵ سال رخ می دهد و در مردان شایع تر از زنان است [۲۳]. به آماس و التهاب راه های هوایی بین بینی و ریه ها برونشیت گفته می شود که می تواند حاد یا مزمن باشد. اولین نشانه برونشیت مزمن، سرفه خفیف است که سرفه سیگاری ها نامیده می شود [۲].

مهم ترین عامل خطر این بیماری را می توان مصرف تنباکو و به طور کلی دخانیات دانست [۲، ۴۸]. مصرف سیگار ۹۰-۸۰ درصد موارد ابتلا به بیماری COPD را شامل می شود. به طور کلی ۱۵ درصد از سیگاری ها دچار این بیماری می شوند [۵، ۳۳].

درمان این بیماری پیچیده است و به مرحله بیماری و وجود سایر مشکلات سلامتی بستگی دارد. هدف از درمان، تسکین علائم و جلوگیری از پیشرفت بیماری و به حداقل رساندن اثرات جانبی می باشد. علاوه بر ترک سیگار که اصلی ترین و مهم ترین عامل برای حفظ سلامت ریه ها می باشد، امروزه داروهای مختلفی از جمله گشاد کننده های مجاری هوایی [۲۵]، آنتی بوتیک ها، خلط آورها [۲۴]، ضد التهاب ها، مهار کننده آلفا-۱ پروتئیناز و ... در درمان این بیماری تجویز می گردد. البته در کسانی که درمان می شوند، بهبودی کامل صورت نمی گیرد و فقط علائم بیماری کاهش می یابد.

از آنجایی که درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و هزینه درمان بسیار بالا می باشد و مصرف اکثر داروها با عوارض جانبی همراه است، استفاده از داروهای با عوارض کمتر به منظور پیشگیری از بروز علائم بیماری توصیه می شود. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ مشخص گردید که سطح آنتی اکسیدانها بویژه ویتامین C در مبتلایان به COPD نسبت به گروه کنترل بطور چشمگیری کاهش یافته است [۱۸]. لذا یکی از داروهای پیشنهادی ویتامین C می باشد. ویتامین C جزء ویتامین های آنتی اکسیدانی می باشد که نقش های زیادی در بدن ایفا می کند [۴۸]. اثر ویتامین C بر التهاب های مزمن نظیر

Elektronik با محدوده حساسیت ۲۰-۰ گرم و  $0.2 \text{ mm/turn}$  ثبت شد و توسط تقویت کننده CC/118 quadribridge amp ساخت شرکت آلمانی March-Hugstetten تقویت گردید.

پس از یک ساعت استراحت، یازده غلظت تجمعی از متاکولین به محفظه ۲۰ میلی لیتری حمام بافتی در فواصل ۳-۵ دقیقه اضافه شد و پاسخ بافت به غلظتهای افزایشده متاکولین بصورت نمودار پلکانی ثبت گردید. سپس درصد پاسخ انقباضی هر یک از غلظتهای متاکولین با مقایسه با حداکثر انقباض حاصله در نتیجه آخرین غلظت متاکولین بدست آمد.

در پایان برای هر آزمایش منحنی لگاریتم غلظت-پاسخ روی صفحه نیمه لگاریتمی رسم شده و به کمک منحنی حاصل، غلظتی از متاکولین که موجب ۵۰ درصد انقباض حداکثر در هر آزمایش می گردید (EC<sub>50</sub>)، تعیین می گشت.

#### بررسی پاسخ عضله صاف تراشه به اوالبومین:

پاسخ عضله صاف تراشه حیوانات به محلول ۰/۱ درصد اوالبومین به ترتیب زیر اندازه گیری شد: به این منظور ۰/۵ ml از محلول ۴ درصد اوالبومین به محفظه ۲۰ میلی لیتری حمام بافتی اضافه شد و میزان انقباض ایجاد شده بعد از ۱۰ دقیقه محاسبه گردید. سپس پاسخ به صورت درصدی از انقباض بدست آمده با  $10 \mu\text{mol/lit}$  متاکولین بیان شد.

#### بررسی پاسخ اتساعی تتوفیلین:

در ابتدا ۱۰ میلی مول متاکولین به محفظه ۲۰ میلی لیتری حمام بافتی اضافه شد و بعد از ۷ دقیقه ۰/۱ میلی لیتر از محلول  $4 \times 10^{-2} \text{ mol}$  تتوفیلین به حمام بافتی اضافه شد. این کار ۴ بار و به فاصله ۳-۵ دقیقه تکرار شد. سپس میزان اتساع تراشه در پاسخ به هر یک از غلظتهای تتوفیلین به عنوان کسری از اتساع حداکثر به درصد محاسبه شد.

#### بررسی مایع لاواژ برونشی آلوتولی (BAL):

همزمان با آماده سازی زنجیره تراشه، کانولی از طریق سوراخ تراشه وارد شد و از طریق آن ریه ها با ۵ میلی لیتر نرمال سالین لاواژ شدند. این عمل ۴ بار تکرار شد (جمعاً ۲۰ سی سی).

یک میلی لیتر از مایع لاواژ با حجم برابر از محلول تورک (شامل یک میلی لیتر اسید استیک گلاسیال، یک میلی لیتر محلول کریستال ویوله ۱٪ و صد میلی لیتر آب مقطر) رنگ

می شدند و از طریق دو روزنه در دو سوی سر حیوانات و توسط سرنگ ۲۰ سی سی دود سیگار وارد محفظه می شد. هر بار استنشاق برای ۳ دقیقه به طور همزمان صورت می گرفت و حیوانات در هر دقیقه در معرض ۲ سرنگ دود سیگار قرار می گرفتند. از آنجایی که هر سیگار حدود ۱۶-۱۸ پاف دود تولید می کرد، مدت در معرض قرار گرفتن حیوان با هر سیگار حدود ۸-۹ دقیقه بود. بین تجویز هر دو سیگار به حیوان ۱۰ دقیقه استراحت داده می شد. هر حیوان در مدت ۳ ماه، هر هفته ۶ روز و هر روز ۵ نخ سیگار دریافت می کرد [۹].

#### بررسی پاسخ تراشه به متاکولین در حمام بافت:

خوکچه های هندی یک روز پس از اتمام دوره مطالعه، با وارد شدن ضربه به پشت گردن، نخاعی شدند. بلافاصله به کمک قیچی سینه حیوان گشوده و تراشه از بافت های اطراف جدا می شد. سپس در داخل ظرف حاوی محلول کربس (با ترکیبات NaCl; 120 mM, NaHCO<sub>3</sub>; 25 mM, MgSO<sub>4</sub>; 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 mM, dextrose; 11 mM, CaCl<sub>2</sub>; 2.5 mM, KCl; 4.72 mM قرار داده شد. بافت در این محلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حفظ شده و توسط کربوژن (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) اکسیژنه شد. سپس تراشه به تعداد ۱۰ حلقه که هر کدام حاوی ۲-۳ حلقه غضروفی بود برش داده شد. حلقه ها به هم متصل گردید تا زنجیره تراشه تشکیل شود. در انتها به منظور ثبت دقیق میزان انقباض عضله تراکتال، هر حلقه در قسمت غضروف، مقابل عضله، بریده شد و زنجیره از نیم حلقه ها تشکیل شد.

نهایتاً بافت داخل محفظه ۲۰ میلی لیتری حمام بافتی (Schuler organ bath type 809) ساخت شرکت آلمانی (March-Hugstetten) که حاوی محلول کربس بود به حالت معلق قرار داده شد و تحت ۱ گرم کشش ایزوتونیک قرار گرفت. در زمان استراحت و طول مطالعه دمای این محلول ۳۷ درجه سانتی گراد حفظ شده و توسط کربوژن (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) اکسیژنه می شد و محفظه حمام بافتی هر ۱۵ دقیقه یک بار با محلول کربس تازه شستشو می شد. سپس تأثیر مواد مختلف به فاصله یک ساعت از هم بررسی شد [۳۲].

پاسخها با استفاده از ترانسدیوسر vernier control نوع Hugo-Sachs 850 N ساخت شرکت آلمانی

## مطالعات آماری:

داده‌ها بصورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین (mean $\pm$ SEM) ارائه شد. مقایسه بین پاسخ دهی زنجیره تراشه کوچک‌های سالم و تجربی نسبت به متاکولین ( $EC_{50}$ ) و اوالبومین با استفاده از تست Unpaired t test انجام شد. نتایج حاصل از حیوانات شاهد و حیوانات مبتلا به COPD مصرف کننده آب آشامیدنی ساده و مبتلا به COPD مصرف کننده آب آشامیدنی حاوی ویتامین C، با استفاده از تست آماری ANOVA مقایسه شد و گروه متفاوت با آزمون Tukey مشخص گردید. منحنی‌های مربوطه با استفاده از نرم افزار Sigma plot رسم شد.  $p < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن آماری در نظر گرفته شده است.

## یافته‌ها

## پاسخ دهی تراشه به متاکولین:

با بررسی منحنی پاسخ بافت‌های تراشه به غلظت‌های مختلف متاکولین در حمام بافتی مشخص گردید که منحنی مربوط به گروه COPD نسبت به گروه C دارای شیب به سمت چپ می‌باشد. اگرچه منحنی مربوط به گروه COPD+Vit C نسبت به گروه COPD به سمت راست

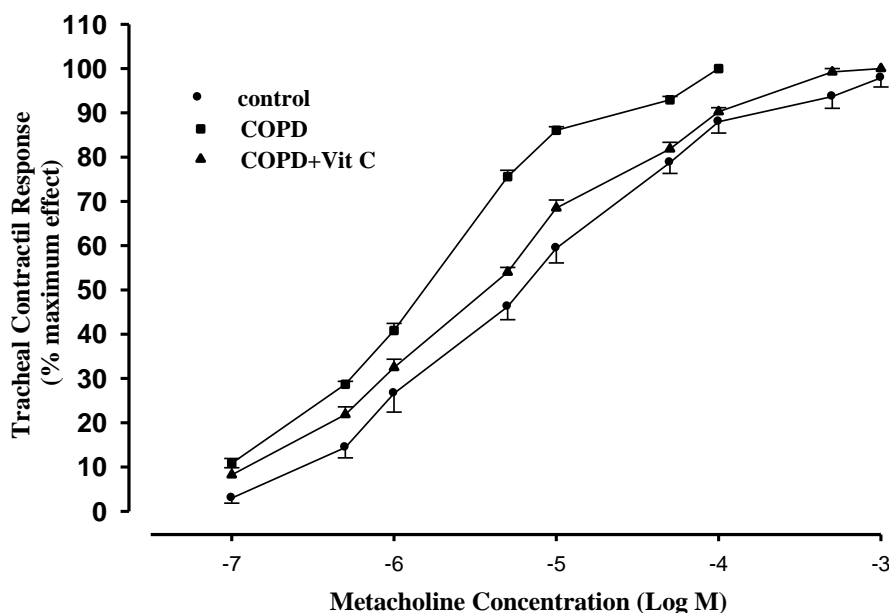
آمیزی شد. سپس کل سلول‌ها به صورت ۲ بار بر روی لام هموسیستمتر شمارش شدند [۱۰].

شمارش افتراقی سلولهای التهابی مایع لاواژ برونشی آلوتولی (Cellular diff):

باقیمانده مایع لاواژ در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۵۰۰ دور سانتیفریوژ شد. مایع روئی برداشته شد و از سلولهای رسوب کرده در قسمت ته لوله، اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن لامها رنگ آمیزی با رایت-گیمسا صورت گرفت. سپس در زیر میکروسکوپ نوری، براساس معیارهای رنگ آمیزی و مورفولوژی، آنالیز تفکیک سلول‌ها با شمردن ۴۰۰ سلول به صورت ۲ بار انجام شد و عدد بدست آمده به درصد بیان شد [۱۰].

## مطالعه پاتولوژیک ریه:

بعد از اتمام لاواژ، ریه‌ها با باقیمانده تراشه جدا شدند و داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. یک هفته بعد بافت‌ها به روش پاساژ با استفاده از اتانول ۷۰ تا ۱۰۰ درصد آگیری شدند. بعد از شفاف سازی بافت‌ها بوسیله گزیلول، نمونه‌ها با پاراتین اشباع شده و بلوک بافتی انجام شد. سپس نمونه‌ها با میکروتوم به ضخامت ۴ میکرون برش داده شدند و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و سپس زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.



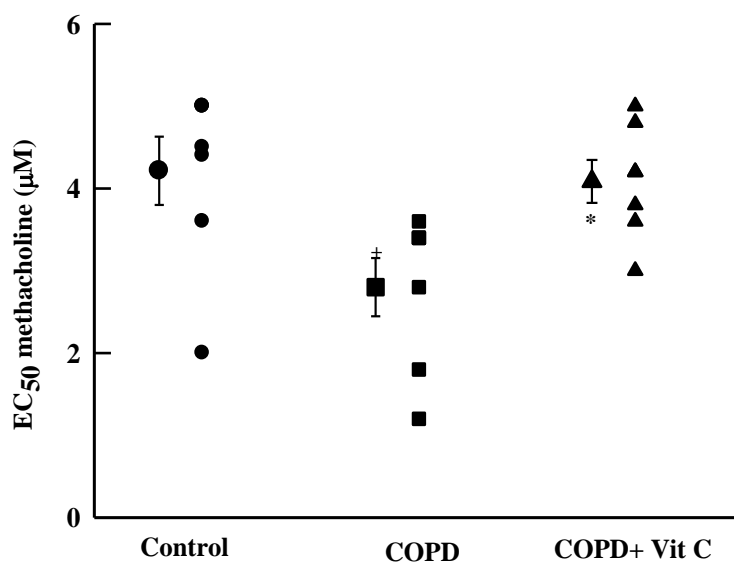
شکل ۱- منحنی‌های پاسخ انقباضی زنجیره تراشه به غلظت‌های مختلف متاکولین در سه گروه مورد مطالعه

گروه COPD بهبودی داشت ( $p < 0.05$ ) و به حد گروه کنترل رسیده بود (شکل ۲).

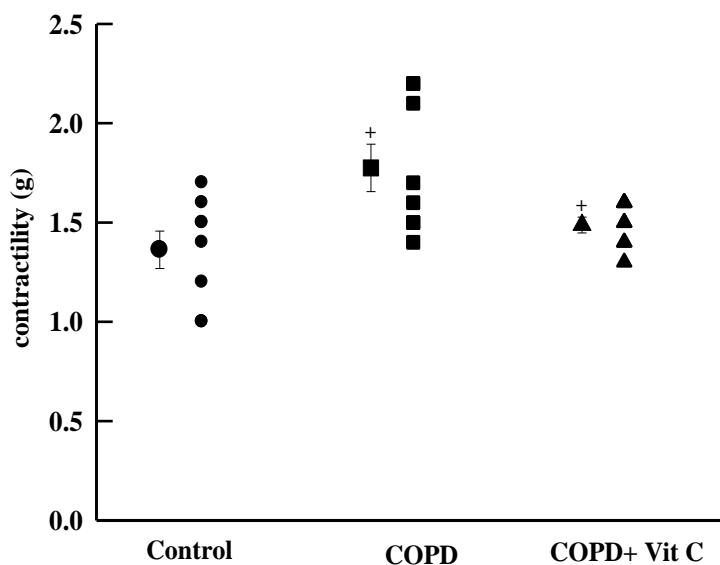
پاسخ انقباضی زنجیره تراشه به غلظت  $10^{-5}$  M متاکولین (Contractility) در گروه COPD ( $1.12 \pm 0.17$  g) به طور معنی داری نسبت به گروه ( $1.36 \pm 0.09$  g) بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). پاسخ تراشه در گروه COPD+Vit C ( $1.48 \pm 0.04$  g) موجب کاهش معنی دار پاسخ انقباضی زنجیره

شیفت پیدا کرده بود ولی هنوز این منحنی نسبت به گروه C شیفت به سمت چپ داشت (شکل ۱). شیفت به سمت چپ نشان دهنده افزایش پاسخ دهی تراشه به دوزهای مختلف متاکولین می باشد.

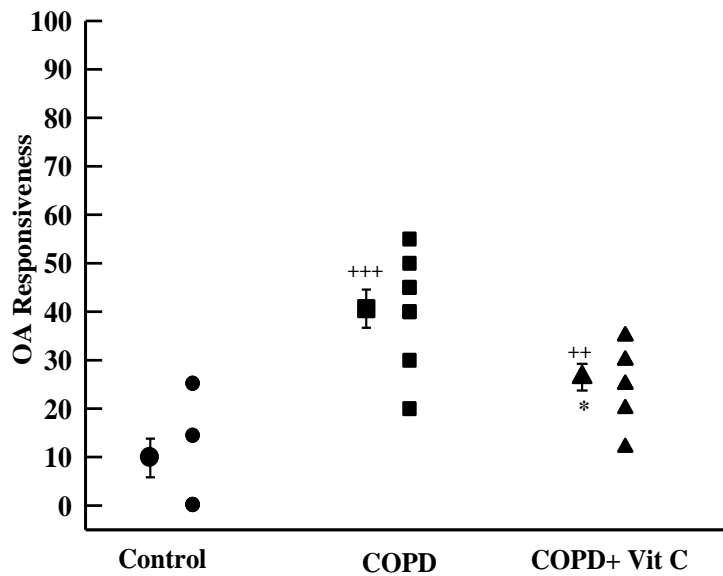
میانگین  $EC_{50}$  در زنجیره های تراشه گروه COPD ( $2.8 \pm 0.35 \mu M$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه C ( $4.21 \pm 0.41 \mu M$ ) کمتر بود ( $p < 0.05$ ). میانگین  $EC_{50}$  زنجیره های تراشه مربوط به گروه COPD+Vit C



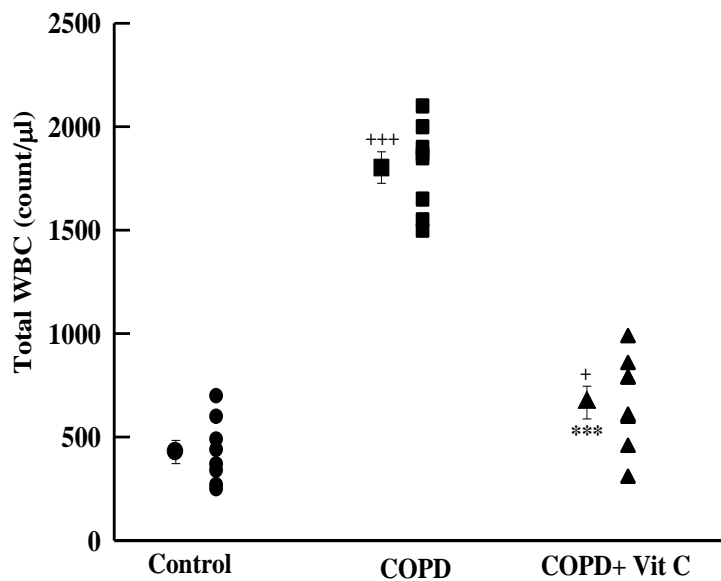
شکل ۲- مقدار میانگین  $\pm$  SEM پاسخ تراشه به متاکولین ( $EC_{50}$ ) در ۳ گروه مورد مطالعه، اختلاف آماری بین گروه C و گروه های دیگر: +,  $p < 0.05$ . اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*,  $p < 0.05$ .



شکل ۳- پاسخ انقباضی زنجیره تراشه به غلظت  $10^{-5}$  M متاکولین (contractility) در گروه های مورد مطالعه، اختلاف آماری بین گروه C و گروه های دیگر: +,  $p < 0.05$ .



شکل ۴- پاسخ انقباضی زنجیره تراشه به اوبومین در گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف آماری بین گروه C و گروه‌های دیگر: ++،  $p < 0.01$  و +++،  $p < 0.001$ ، اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*،  $p < 0.05$ .



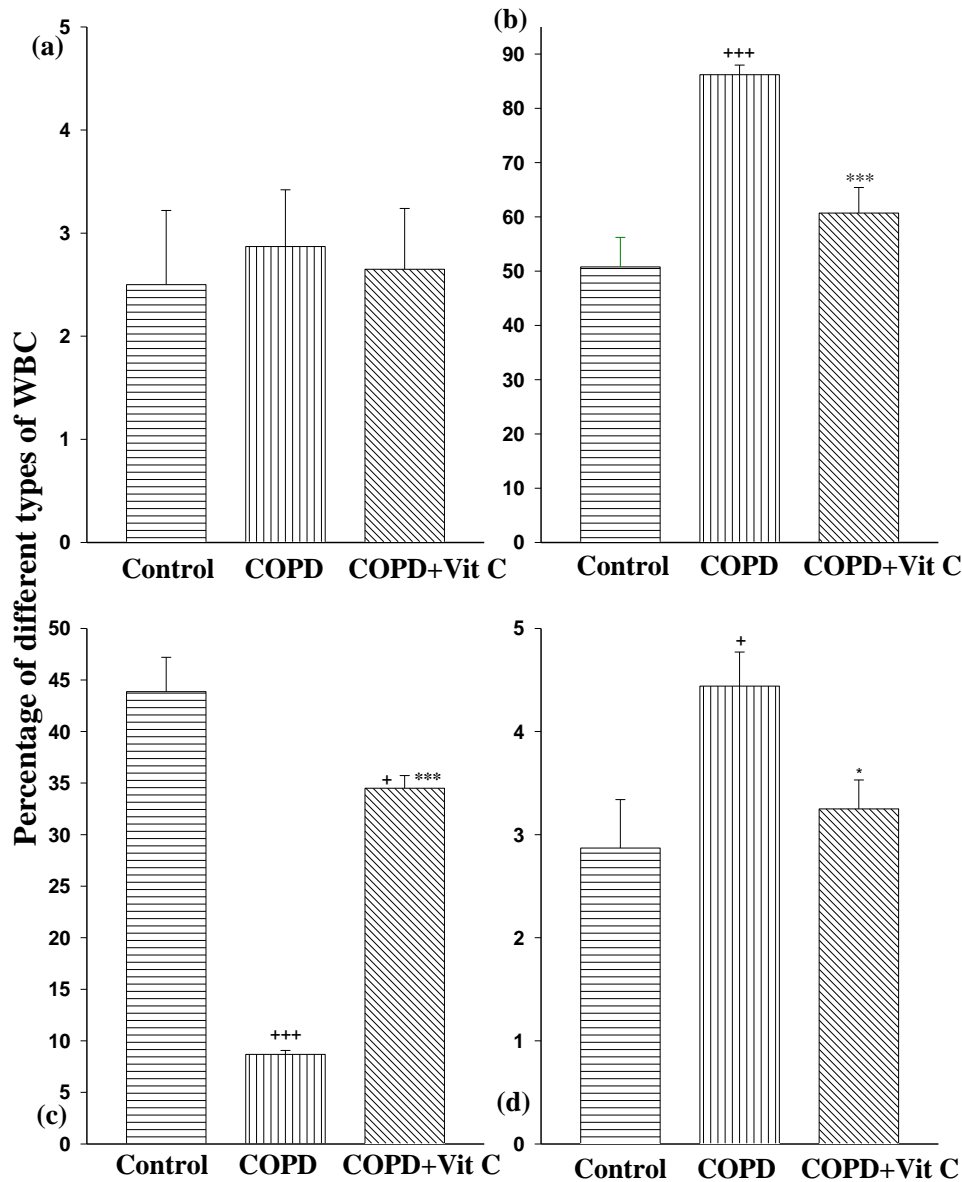
شکل ۵- تعداد سلولهای سفید در مایع BAL (مایع برونشی آلوئولی) در گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف آماری بین گروه C و گروه‌های دیگر: +،  $p < 0.05$ ، ++،  $p < 0.01$  و +++،  $p < 0.001$ ، اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*\*،  $p < 0.001$ ، \*.

معنی داری نسبت به گروه COPD کاهش داشت ( $p < 0.05$ )، اگر چه پاسخ تراشه به اوبومین در گروه COPD+Vit C هنوز به طور معنی داری نسبت به گروه C بیشتر بود ( $p < 0.01$ ). (شکل ۴).

تعداد سلولهای سفید در مایع لاواژ برونشی آلوئولی: میانگین تعداد سلولهای سفید در مایع BAL در گروه COPD ( $1802/5 \pm 75/87$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه C ( $427/5 \pm 55/92$ ) بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). میانگین

تراشه به متاکولین نسبت به گروه COPD شد ( $p < 0.05$ ). پاسخ انقباضی زنجیره تراشه در گروه COPD+Vit C در حد گروه کنترل بود (شکل ۳). پاسخ تراشه به اوبومین:

پاسخ انقباضی زنجیره تراشه به اوبومین در گروه COPD ( $40/62 \pm 3/94\%$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه C ( $9/82 \pm 3/98\%$ ) بیشتر بود ( $p < 0.001$ ). پاسخ تراشه به اوبومین در گروه COPD+Vit C ( $26/5 \pm 2/67\%$ ) به طور



شکل ۶- میانگین درصد ائوزینوفیل (a)، نوتروفیل (b)، لنفوسیت (c) و مونوسیت (d) در مایع BAL (مایع لاواژ برونشی آلوئولی) در گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف آماری بین گروه C و گروه‌های دیگر: +، p<0.05، ++، p<0.01، +++، p<0.001. اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*، p<0.05، \*\*، p<0.01 و \*\*\*، p<0.001.

میانگین درصد ائوزینوفیلها در گروه COPD+Vit C ( $2/5 \pm 0/72\%$ ) بیشتر بود. میانگین درصد ائوزینوفیلها در گروه COPD+Vit C ( $0/59\% \pm 2/65$ ) به طور غیر معنی داری نسبت به گروه COPD کاهش داشت. میانگین درصد ائوزینوفیلها در گروه COPD+Vit C به طور غیر معنی داری نسبت به گروه C افزایش داشت (شکل ۶a).

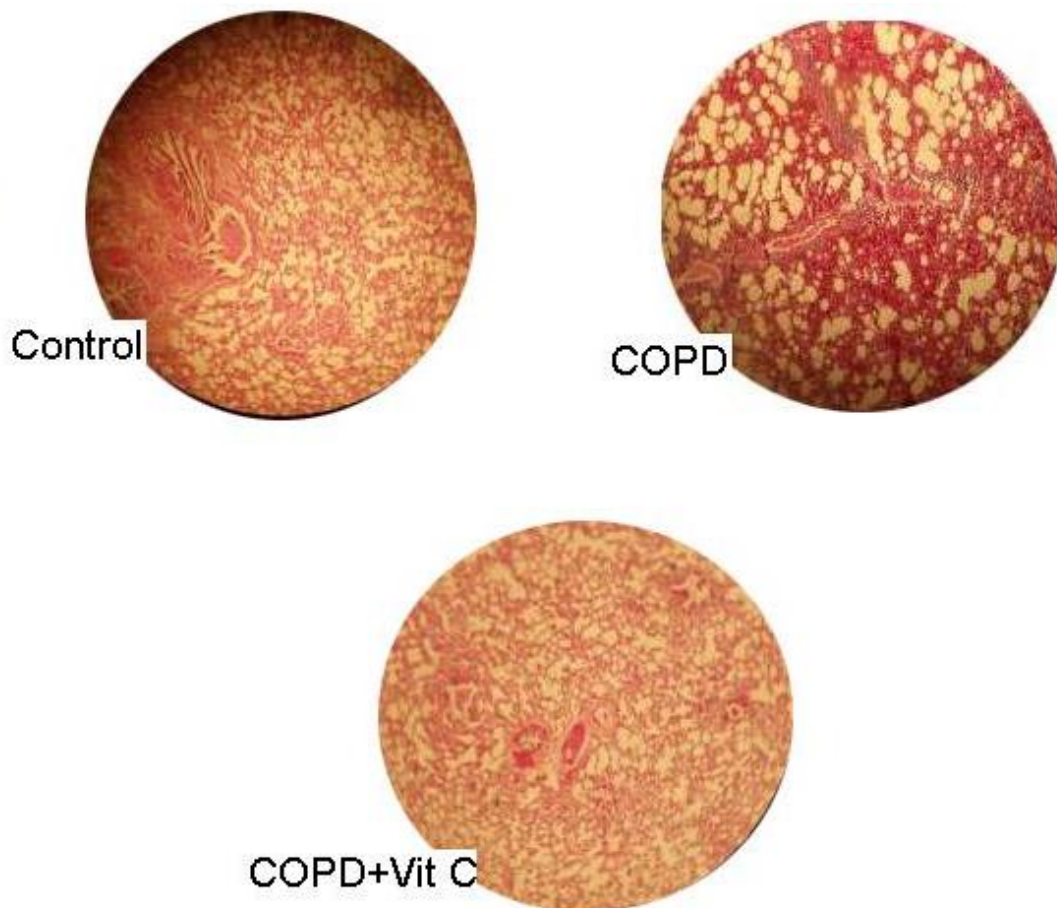
میانگین درصد نوتروفیلها در مایع BAL در گروه COPD ( $86/18 \pm 1/77\%$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه C ( $50/78 \pm 5/44\%$ ) بیشتر بود ( $p < 0/001$ ). میانگین درصد نوتروفیلها در گروه COPD+Vit C ( $60/68 \pm 4/72\%$ ) به طور

تعداد سلولهای سفید در مایع BAL در گروه COPD+Vit C ( $666/25 \pm 78/96$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه COPD کاهش داشت ( $p < 0/001$ ). اگر چه تعداد سلولهای سفید در گروه COPD+Vit C به طور معنی داری نسبت به گروه C افزایش داشت ( $p < 0/05$ ) (شکل ۶b).

درصد انواع سلولهای سفید در مایع BAL (مایع لاواژ برونشی آلوئولی):

میانگین درصد ائوزینوفیلها در مایع BAL در گروه COPD ( $2/87 \pm 0/55\%$ ) به طور غیر معنی داری نسبت به گروه C





شکل ۷- تغییرات پاتولوژیک در بافت ریه در گروه‌های مورد مطالعه (با بزرگنمایی ۱۰)

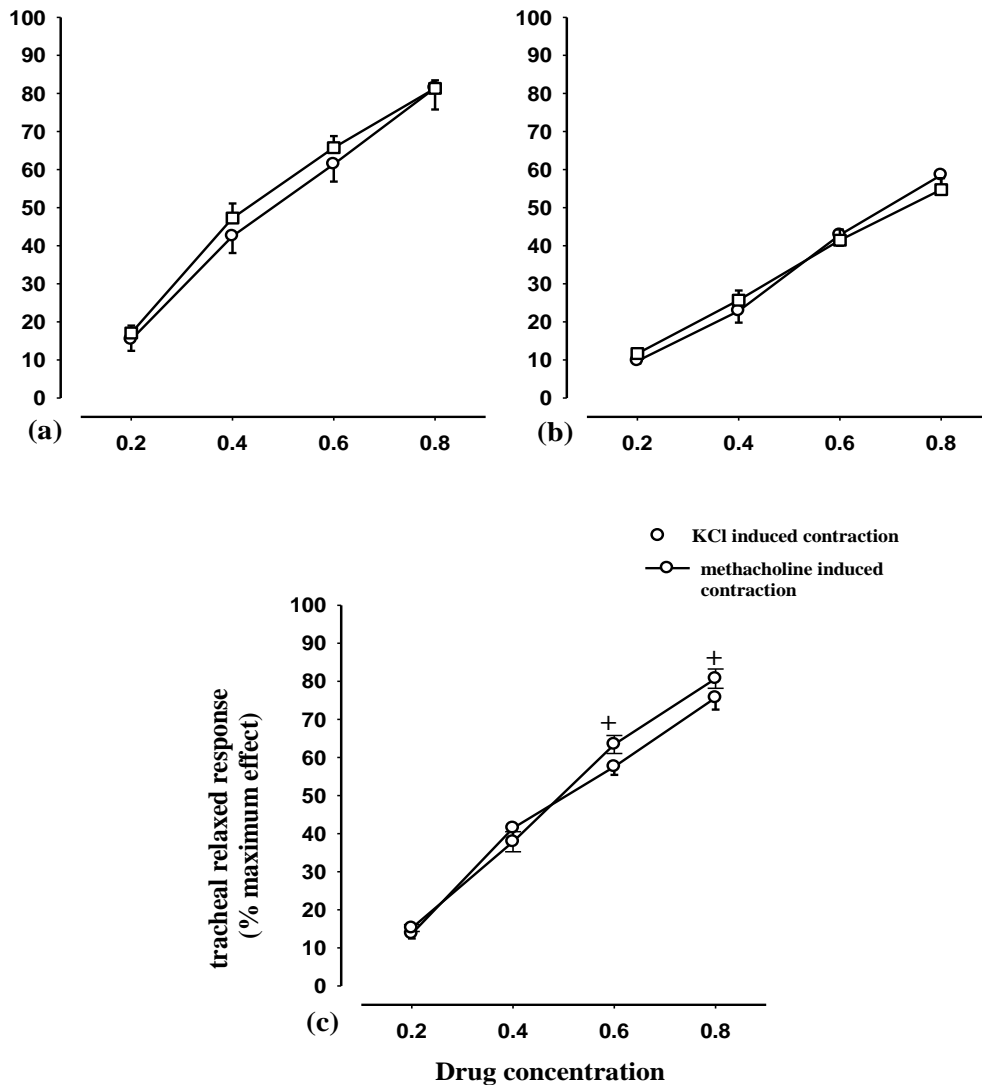
میانگین درصد مونوسیتها در گروه COPD+Vit C به طور غیرمعنی داری نسبت به گروه C افزایش داشت. (شکل ۶d). یافته های پاتولوژیک بافت ریه: در گروه COPD بررسی بافت‌های ریوی تغییرات واضح و مشخصی نشان داد که عبارتند از:

- ۱- افزایش ضخامت عضله صاف برونش
  - ۲- هیپرپلازی بافت پوششی عضله صاف برونش
  - ۳- متاپلازی سلولهای استوانه ای شبه مطبق مژده دار به سلولهای سنگفرشی (در برخی از نواحی)
  - ۴- هیپرپلازی بافت لنفوی وابسته به برونش (Bolt)
  - ۵- تجمع سلولهای التهابی (لنفوسیت، ماکروفاژ) در دیواره عروق.
- در گروه COPD+Vit C تغییرات فوق دیده نمی‌شود (شکل ۷).

اثر اتساعی تتوفیلین: در گروه ۱ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 60 mM KCl)، اثر اتساعی تتوفیلین در گروه

معنی داری نسبت به گروه COPD کاهش داشت ( $p < 0.001$ ). میانگین درصد نوتروفیلها در گروه COPD+Vit C به طور غیرمعنی داری نسبت به گروه C افزایش داشت (شکل ۶b). میانگین درصد لنفوسیتها در مایع BAL در گروه COPD به طور چشمگیری نسبت به گروه C ( $8/68 \pm 0/39\%$ ) کاهش داشت ( $43/87 \pm 3/33\%$ ) ( $p < 0.001$ ). میانگین درصد لنفوسیتها در گروه COPD+Vit C ( $34/5 \pm 1/22\%$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه COPD افزایش داشت ( $p < 0.001$ ). میانگین درصد لنفوسیتها در گروه COPD+Vit C به طور معنی داری کمتر از گروه C بود. (شکل ۶c). ( $p < 0.05$ ).

میانگین درصد مونوسیتها در مایع BAL در گروه COPD به طور معنی داری نسبت به گروه C ( $4/44 \pm 0/33\%$ ) بیشتر بود ( $2/87 \pm 0/47\%$ ) ( $p < 0.05$ ). میانگین درصد مونوسیتها در گروه COPD+Vit C ( $3/25 \pm 0/28\%$ ) به طور معنی داری نسبت به گروه COPD کاهش داشت ( $p < 0.05$ ).



شکل ۸- منحنی پاسخ- غلظت اثر اتساعی تئوفیلین در دو گروه ۱ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 60 mM KCl) و گروه ۲ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 10 μM متاکولین) در گروه C (a)، گروه COPD (b) و گروه COPD + Vit C (c). اختلاف آماری بین دو گروه: +, p<0.05.

منقبض شده با متاکولین یا KCl (گروه ۱ و ۲) در گروه های C و COPD و در دو غلظت پایین تئوفیلین در گروه C و COPD+Vit از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارند. اثر اتساعی غلظتهای بالای تئوفیلین در گروه ۲ (زنجیره های تراشه منقبض شده با متاکولین) در گروه COPD+Vit C بیشتر از گروه ۱ بود (p<0.05). (شکل ۸).

### بحث

در این مطالعه اثر ویتامین C بر میزان پاسخ دهی تراشه به متاکولین، اوالبومین و تئوفیلین، تعداد کل گلبولهای سفید موجود در مایع BAL و درصد افتراقی انواع سلولهای سفید در

COPD نسبت به گروه C بطور چشمگیری کاهش نشان داد (p<0.05) تئوفیلین در گروه COPD+Vit C اثر اتساعی بیشتری نسبت به گروه COPD داشت (p<0.05). اثر اتساعی تئوفیلین در گروه COPD+Vit C بطور غیرمعنی داری کمتر از گروه C است (جدول ۱).

در گروه ۲ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 10 μM متاکولین)، اثر اتساعی تئوفیلین در گروه COPD نسبت به گروه C بطور چشمگیری کاهش نشان داد (p<0.05). تئوفیلین در گروه COPD+Vit C اثر اتساعی بیشتری نسبت به گروه COPD داشت (p<0.05). اثر اتساعی تئوفیلین در گروه COPD+Vit C بطور غیرمعنی داری کمتر از گروه C است (جدول ۲). اثر اتساعی تئوفیلین در زنجیره های تراشه

جدول ۱- اثر اتساعی غلظتهای مختلف تتوفیلین در گروه ۱ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 60 mM KCl)

	0.2M Theophilin	0.4 M Theophilin	0.6 M Theophilin	0.8 M Theophilin
Control	15.37 ± 3.00	42.5 ± 4.40	61.43 ± 4.59	81.43 ± 5.64
COPD	9.71 ± 0.68 +	22.85 ± 3.06 ++	42.85 ± 2.85 ++	58.57 ± 2.83 ++
COPD+ Vit C	13.71 ± 1.25 *	41.43 ± 2.37 ***	52.14 ± 2.85 *	69.28 ± 3.69 *

اختلاف آماری بین گروه C و گروه های دیگر: +, p<0.05, ++, p<0.01. اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001.

جدول ۲- اثر اتساعی غلظتهای مختلف تتوفیلین در گروه ۲ (زنجیره های تراشه منقبض شده با 10 μM متاکولین)

	0.2M Theophilin	0.4 M Theophilin	0.6 M Theophilin	0.8 M Theophilin
Control	17.04 ± 1.98	47.28 ± 3.83	65.73 ± 3.05	81.13 ± 2.13
COPD	11.65 ± 1.14 +	25.71 ± 2.54 +++	41.43 ± 2.82 +++	54.71 ± 3.02 +++
COPD+ Vit C	15.18 ± 0.90 *	37.85 ± 2.64 **	63.43 ± 2.37 ***	80.71 ± 2.54 ***

اختلاف آماری بین گروه C و گروه های دیگر: +, p<0.05, ++, p<0.01, +++، p<0.001. اختلاف آماری بین گروه COPD+Vit C با گروه COPD: \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001.

دارد که عمدتاً الکلیل و پروکسیل می باشد. نیتریک اکسید (NO) ماده اکسیدان دیگری است که در دود سیگار در غلظت ۵۰۰-۱۰۰۰ PPM وجود دارد. نیتریک اکسید به سرعت با آنیون سوپر اکسید تشکیل پروکسی نیتريت و رادیکالهای پروکسیل و الکیل پروکسی نیتريت را می دهد [۴۲].

مایع پوشاننده اپی تلیوم و موکوس، اولین خط دفاعی در ریه ها علیه اکسیدانهای استنشاقی می باشند که رادیکالهای کوتاه اثر موجود در فاز گازی دود سیگار را خنثی می کند. اگر چه تغلیظ دود سیگار در مایع پوشاننده اپی تلیوم گاهی منجر به تولید انواع اکسیژن فعال (reactive oxygen species) (ROS) می شود که در پاتوژنز COPD نقش دارند [۱۵]، استرس اکسیداتیو در مبتلایان به COPD بویژه در دوره حملات افزایش می یابد [۲۲، ۳۵].

افزایش مستقیم مواد اکسیدان حاصل از دود سیگار استنشاقی موجب رهائش رادیکالهای اکسیژن از لکوسیتها، نوتروفیل ها و ماکروفاژهای مهاجرت کرده می شود [۲۸].

مایع BAL و تغییرات پاتولوژیک بافت ریه در خوکچه های هندی مبتلا به COPD بررسی شده است.

نتایج این مطالعه مشخص کرد که پاسخ تراشه به متاکولین و اوالبومین، Contractility، تعداد کل گلبولهای سفید موجود در مایع BAL و تعداد نوتروفیل ها، ائوزینوفیلها و مونوسیتهای مایع BAL در گروه COPD نسبت به گروه کنترل افزایش داشت در حالی که میزان EC50 و تعداد لنفوسیتهای مایع BAL نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. همچنین القای COPD موجب تغییرات پاتولوژیک در بافت ریه در گروه COPD شد. تجویز ویتامین C در تمام طول القای COPD در گروه COPD+Vit C موجب جلوگیری از بروز تغییرات فوق طبیعی شده است.

دود سیگار مخلوطی از ترکیبات شیمیایی متشکل از رادیکالهای آزاد و دیگر ترکیبات اکسیدان است که در غلظت بالا وجود دارند. رادیکالهای آزاد در فاز گازی دود سیگار وجود دارند. در هر پاف فاز گازی دود سیگار تقریباً ۱۰<sup>۱۵</sup> رادیکال وجود

می‌باشند [۸]. خانم احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند شدت بیماری در بیماران مبتلا به COPD با مواد غذایی دریافت کرده نظیر ویتامین C ارتباط معنی داری دارد [۳]. از طرفی در مطالعه‌ای نشان داده شده که ظرفیت اکسیدانی پلاسما یک ساعت بعد از سیگار کشیدن بطور چشمگیری کاهش می‌یابد [۲۲]. کاهش ظرفیت اکسیدانی پلاسما در افراد سیگاری ممکن است ناشی از کمبود شدید پروتئین سولفیدریل‌های پلاسما در زمان مواجهه با سیگار باشد [۱۹، ۳۸، ۴۱، ۴۳]. لذا اکسیدان‌های دود سیگار بطور چشمگیری آنتی اکسیدان‌های با وزن مولکولی پایین را کاهش می‌دهد. کمبود آنتی اکسیدان‌های پلاسمایی حفاظت در برابر پراکسیداسیون غشای پلاسمایی القا شده با دود سیگار را کاهش می‌دهد. دفاع آنتی اکسیدانی در ریه توسط سیستم‌های آنزیمی داخلی و آنتی اکسیدان‌های رژیم غذایی بویژه ویتامین C تأمین می‌شود. در نتیجه این ویتامین نقش مهمی در دفاع میزبان ضد آسیب اکسیداتیو ریه ایفا می‌کند [۴۶]. مطالعات مختلف نشان داده است اسید اسکوربیک، ویتامین E، بتا کاروتن و سلنیوم در سرم افراد سیگاری مزمن کاهش می‌یابد [۱، ۴۷]. ویتامین C با دوز تجویز شده در این مطالعه، احتمالاً با اثر آنتی اکسیدانی خود با کند کردن پراکسیداسیون چربی و کاهش تولید ROS از بروز علائم و تغییرات ناشی از القا COPD جلوگیری کرده است.

التهاب مزمن COPD با تجمع نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و بتا سلها بویژه در مجاری هوایی کوچک مشخص می‌شود [۲۷]. نوتروفیل‌ها مخصوصاً در اپی تلیوم برونشیا و غدد برونشی و همچنین در نزدیکی رشته‌های عضله صاف تجمع می‌یابد [۶، ۴۴]. مجاری هوایی کوچک و پارانشیم اطرافش محل مهمی برای پاسخ التهابی می‌باشد و از آنجائی که مستعد remodeling چشمگیر هستند، منجر به انسداد جریان هوا می‌شود [۴۴]. در این مطالعه دیواره مجاری هوایی کوچک در مبتلایان به COPD ضخیم‌تر از گروه کنترل بود که منطبق بر نتایج مطالعات قبلی و در تمام اجزای بافتی دیواره مجاری هوایی صورت می‌گیرد [۱۹، ۲۶، ۴۶]. اگرچه سلول‌های التهابی در حجم دیواره مجاری هوایی شرکت دارند، تغییرات ساختمانی نظیر متاپلازی اپیتلیال، افزایش عضله صاف، هیپر پلازی سلولهای گابلت و هیپرتروفی غدد زیر مخاطی از دلایل دیگر

افراد سیگاری ترکیبات اکسیدانی که از لوکوسیتها آزاد می‌شود نسبت به افراد غیرسیگاری افزایش یافته است [۳۷]. آسیب اکسیداتیو مستقیم ماتریکس ریه (کلاژن و الاستین) می‌تواند توسط اکسیدان‌های دود سیگار القا شود [۱۳] از جمله اثرات آسیب رسان دود سیگار بر تک لایه سلولهای پوششی حبابچه‌ای می‌توان به تفکیک سلولهای اپیتلیال، کاهش چسبندگی سلولی و افزایش تخریب و لیز سلولی [۳۴] اشاره نمود. بعلاوه اپی تلیوم حبابچه‌ای و مجاری هوایی در افراد سیگاری نسبت به افراد غیرسیگاری نفوذ پذیر تر است که پیشنهاد می‌شود مواد محرک در دود سیگار در پاسخ التهابی نقش واسطه‌ای دارند [۳۰].

سطوح ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما ارتباط منفی با افزایش آزاد سازی رادیکال‌های آزاد از نوتروفیل‌های بیماران مبتلا به حملات حاد COPD دارند. عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی داخل و خارج سلولی اهمیت زیادی در تغییرات مرتبط با COPD در بافت ریه دارد. سرکوب پاسخ التهابی همراه با درمان‌های ضد التهابی یک راه منطقی درمان COPD است [۱۲، ۲۰].

از آنجائی که متابولیت‌های اکسیژن فعال در پاتوفیزیولوژی COPD دخالت دارند، لذا آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند یک درمان مفید باشند. اصلی‌ترین آنتی اکسیدان موجود در مایع BAL شامل موسین، گلوکاتینون احیا، اسید اوریک، اسید اسکوربیک و پروتئین (عمدتاً آلبومین) می‌باشند. موسین یک گلیکو پروتئین غنی از سیستئین است و رادیکال‌های هیدروکسیل را جذب می‌کند [۱۲، ۲۰]. مطالعات مختلف نشان داده است که گلوکاتینون احیا در مایع BAL افراد سیگاری مزمن افزایش می‌یابد [۱۲، ۳۷، ۴۵]. به منظور افزایش سطح آنتی اکسیدانی ریه به راحتی تجویز درمان‌های ضد اکسیدانی مثل تجویز ویتامین C و E در افراد سیگاری صورت می‌گیرد [۱۴، ۲۶].

مطالعات مختلف نشان داده‌اند مصرف ویتامین می‌تواند از کاهش عملکرد ریوی در بیماران مبتلا به COPD جلوگیری کند [۲۹]. همچنین محققان پیشنهاد می‌کنند آنتی اکسیدان‌ها در رژیم غذایی علیه اثرات مضر سیگار اثر محافظتی دارند و مصرف کم این ویتامین‌های آنتی اکسیدانت مانند ویتامین C با کاهش عملکرد ریوی و افزایش شیوع COPD همراه

التهاب ریه (تغییرات پاتولوژیک ریه و افزایش تعداد و انواع سلولهای خونی در مایع لاواژ برونشی) در مدل حیوانی COPD در خوکچه های هندی در معرض دود سیگار نشان داده است.

### سپاسگزاری

این پژوهش با اعتبار وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در زمینه دخانیات و به عنوان پایان نامه آقای مهدی احمدی در مقطع کارشناسی ارشد فیزیولوژی انجام گرفته است.

افزایش ضخامت است که با شدت بیماری نسبت مستقیم دارد [۴۴].

اثرات اتساعی تتوفیلین در گروه COPD کمتر از گروه کنترل بود و با تجویز ویتامین C اثرات اتساعی افزایش یافته و به حد گروه کنترل رسیده است. دلیل این کاهش در گروه COPD تغییرات غیر قابل برگشت بافت ریه بویژه مجاری هوایی می باشد که پاسخ دهی عضله صاف به منقبض کننده ها را افزایش داده و اثرات اتساعی تتوفیلین را کاهش داده است.

این مطالعه اثر ویتامین C را در جلوگیری از بروز افزایش پاسخ دهی تراشه به اوالبومین، متاکولین و تتوفیلین، و بروز

2011.

## References

- [1] Abboud RT, Fera T, Richter A, Acute effect of smoking on the functional activity of alpha-1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 131 (1985) 79-85.
- [2] Agustí A, Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (1995) S77-121.
- [3] Ahmadi A, Haghghat N, Hakimrabet M, Tolide-ie HR, Nutritional Evaluation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Pak J Biol Sci* 15 (2012) 501-518.
- [4] Al-Okbi SY, Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. *Toxicol Ind Health* (2012) In press.
- [5] Makris D, Bouros D, COPD exacerbation: Lost in translation. *BMC Pulm Med* 9 (2009). Available from: URL: <http://link.springer.com/article/10.1186%2F1471-2466-9-6#page-1>.
- [6] Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M, Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax* 59 (2004) 308-312.
- [7] Barnes PJ, Hansel TT, Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364 (2004) 985-96.
- [8] Bellamy D, Booker R, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Primary Care*. UK: Class publishing Ltd., 2011.
- [9] Boskabady MH, Jandaghi P, Tracheal responsiveness to methacholine and muscarinic receptor blockade by atropine in animal model of COPD. *Pharmacology online* 2 (2006) 307-323.
- [10] Boskabady MH, Keyhanmanesh R, Khamneh S, Ebrahimi MA, The effect of Nigella sativa extract on tracheal responsiveness and lung inflammation in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Clinics* 66 (2011) 879-887.
- [11] Bridges AB, Scott NA, Parry GJ, Belch JJ, Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur J Med* 2 (1993) 205-208.
- [12] Brown DM, Drost E, Donaldson K, MacNee W, Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 (1995) 531-539.
- [13] Cantin A, Crystal RG, Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur J Respir Dis* 66 (1985) 7-17.
- [14] Clausen J, The influence of antioxidants on the enhanced respiratory burst reaction in smokers. *Ann NY Acad Sci* 669 (1992) 337-341.
- [15] Chow CK, Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann NY Acad Sci* 686 (1993) 289-298.
- [16] Chung KF, *Airway smooth muscle in asthma and COPD*. England: John Wiley & Sons Ltd, 2008.
- [17] Conner TA, McQuade C, Olp J, Pai AB, Effect of intravenous vitamin C on cytokine activation and oxidative stress in end-stage renal disease patients

- receiving intravenous iron sucrose. *BioMetals* 25 (2012) 961-969.
- [18] Cristóvão C, Cristóvão L, Nogueira F, Bicho M, Evaluation of the oxidant and antioxidant balance in the pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Rev Port Pneumol* 19 (2013) 70-75.
- [19] Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, Hu ML, Marcocci L, Packer L, Frei B, Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann NY Acad Sci* 686 (1993) 72-89.
- [20] Cross CE, van der Vliet A, O'Neill CA, Louie S, Halliwell B, Oxidants antioxidants and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 102 (1994) 185-191.
- [21] Das A, Dey N, Ghosh A, Das S, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB, Molecular and cellular mechanisms of cigarette smoke-induced myocardial injury: prevention by vitamin C. *PLoS One* 7 (2012) e44151.
- [22] Davis WB, Pacht ER, Spatafora M, Martin WJ 2nd, Enhanced cytotoxic potential of alveolar macrophages from cigarette smokers. *J Lab Clin Med* 111 (1988) 293-298.
- [23] Devereux G, ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ* 332 (2006) 1142-1144.
- [24] Kuo HP, Lu LC, Sensory neuropeptides modulate cigarette smoke-induced decrease in neutral endopeptidase activity in guinea pig airways. *Life Sci* 57 (1995) 2187-96.
- [25] Heikkinen T, Järvinen A, The common cold. *Lancet* 361 (2003) 51-9.
- [26] Huang Su, Chang S, Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 156 (1997) 1436-1439.
- [27] Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD, The nature of small airway obstruction in COPD. *N Engl J Med* 350 (2004) 2645-53.
- [28] Hunninghake GW, Crystal RG, Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 128 (1983) 833-838.
- [29] Hu G, Zhang X, Chen J, Peto R, Campbell TC, Cassano PA, Dietary Vitamin C Intake and Lung Function in Rural China. *Am J Epidemiol* 148 (1998) 594-9.
- [30] Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley JC, Veall N, Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 1 (1980) 66-68.
- [31] Johnston CS, Martin LJ, Cai X, Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis. *J Am Coll Nutr* 11 (1992) 172-176.
- [32] Keyhanmanesh R, Boskabady MH, Ebrahimi Saadatloo MA, Saeed khamnei, The contribution of water and lipid soluble substances in the relaxant effects of *Nigella sativa* extract on guinea pig tracheal smooth muscle (in vitro). *IJBMS* 10 (2007) 154-161.
- [33] Laitinen LA, Koskela K, Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease: Finnish National Guidelines for Prevention and Treatment 1998-2007. *Respir med* 93 (1999) 297-332.
- [34] Lannan S, Donaldson K, Brown D, MacNee W, Effects of cigarette smoke and its condensates on alveolar cell injury in vitro. *Am J Physiol* 266 (1994) L92-L100.
- [35] Ludwig PW, Hoidal JR, Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 126 (1982) 977-980.
- [36] Mikirova N, Casciari J, Rogers A, Taylor P, Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *J Transl Med* 10 (2012) 189.
- [37] Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W, Epithelial permeability inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159 (1999) 473-479.
- [38] O'Neill CA, Halliwell B, van der Vliet A, Davis PA, Packer L, Tritschler H, Strohmman WJ, Rieland T, Cross CE, Reznick AZ, Aldehyde-induced protein modifications in human plasma: protection by glutathione and dihydrolipoic acid. *J Lab Clin Med* 124 (1994) 359-370.
- [39] Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22 (2003) 18-35.
- [40] Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.

- Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) 1256-76.
- [41] Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, Camus AM, Mussi A, Angeletti CA, Saracci R, Giuntini C, Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung patients. *Chest* 98 (1990) 930-935.
- [42] Pryor WA, Stone K, Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxides, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 686 (1993) 12-27.
- [43] Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, Motchnik PA, Packer L, Halliwell B, Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyls formation. *Biochem J* 286 (1992) 607-611.
- [44] Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM, CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (1999) 711-7.
- [45] Selby C, Drost E, Brown, D, Howie S, MacNee W, Inhibition of neutrophil adherence and movement by acute cigarette smoke exposure. *Exp Lung Res* 18 (1992) 813-827.
- [46] Sutherland ER, Cherniack RM, Management of Chronic Obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med* 350 (2004) 2689-97.
- [47] Stockley RA, Burnett D, Alpha 1-antichymotrypsin in infected and non-infected sputum. *Am Rev Respir Dis* 122 (1980) 81-88.
- [48] Wright J, Churg A, Cigarette smoke cause physiological and morphological changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 142 (1990) 1422-1426.