

بررسی سطح سرمی نیتريت، نیترات و مالون دی آلدئید در افراد سیگاری

چکیده

زمینه و هدف: افراد سیگاری در معرض مقادیر قابل توجهی از گونه های فعال اکسیژن (ROS) می باشند و سطح نیتريك اكسيد (NO)، که از سلول های اندوتلیال تولید می شود و دارای ویژگی گشاد کنندگی عروقی است نیز در این افراد تغییر می یابد. دود سیگار با اختلال در انقباض عروقی وابسته به اندوتلیوم و بیماری های قلبی - عروقی (CVD) در ارتباط می باشد. هدف از این مطالعه، تعیین سطح سرمی نیتريت، نیترات و مالون دی آلدئید (MDA) در افراد سیگاری است.

روش بررسی: در این مطالعه از نوع توصیفی - تحلیلی، ۶۰ نفر از افراد سیگاری و ۶۰ نفر از افراد غیر سیگاری (گروه کنترل) به روش نمونه گیری آسان انتخاب شده و سطح سرمی نیتريت، نیترات و مالون دی آلدئید آنها تعیین و با همدیگر مقایسه گردید.

یافته ها: سطح سرمی نیتريت و نیترات در گروه افراد سیگاری به ترتیب 10.4 ± 5.9 و 29.3 ± 6.7 ($p < 0.0001$) و در گروه افراد غیر سیگاری 14.6 ± 4.4 و 19.6 ± 4.4 ($p < 0.0001$) میکرومول در لیتر می باشد که به طور معنی داری در گروه افراد سیگاری پایینتر از افراد غیر سیگاری می باشد. همچنین سطح سرمی MDA در گروه افراد سیگاری 11.7 ± 2.6 و در گروه افراد غیر سیگاری 8.3 ± 1.9 میکرومول در لیتر می باشد که به طور معنی داری در گروه افراد سیگاری بالاتر از گروه افراد غیر سیگاری می باشد ($p < 0.0001$).

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه حاکی از پایینتر بودن سطح سرمی نیتريت و نیترات و بالاتر بودن سطح MDA در افراد سیگاری است و این تفاوت ها با بیماری های قلبی - عروقی در افراد سیگاری مرتبط می باشد.

واژه های کلیدی: افراد سیگاری، افراد غیر سیگاری، نیتريت، نیترات، مالون دی آلدئید (MDA)، بیماری های قلبی - عروقی (CVD)

مراد رستمی

کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

معصومه جرفی

کارشناس ارشد میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

نویسنده مسئول: مراد رستمی

تلفن: ۰۹۱۶۳۴۷۰۳۳۸

پست الکترونیک:

morad_r56@yahoo.com

آدرس: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

وصول مقاله: ۸۸/۷/۲

اصلاح نهایی: ۸۸/۱۲/۲

پذیرش مقاله: ۸۹/۲/۵

مقدمه

علی رغم آگاهی از اثرات نامطلوب مصرف سیگار بر سلامتی و قابل پیشگیری بودن آن به عنوان یک عامل شایع مرگ و میر، مصرف سیگار در جوامع انسانی، همچنان رو به گسترش است. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت تقریباً یک سوم افراد دارای سن ۱۵ سال و بالاتر در جهان سیگاری می باشند (۱). جمعیت مردان و زنان سیگاری در ایران نیز به ترتیب ۲۶٪ و ۳٪ گزارش گردیده است (۲). دود سیگار دارای بیش از ۴۰۰۰ نوع ماده با خواص آنتی ژنیک، سیتوتوکسیک، موتاژنیک و کارسینوژنیک می باشد (۳، ۴ و ۵).

رادیکال های آزاد، اتم ها و یا ملکول هایی با الکترون های منفرد و قدرت واکنشگری بسیار بالا بوده، با گردش مداوم در بدن، موجب آسیب به ماکروملکول های مختلف بدن جانداران از قبیل پروتئین ها، لیپیدها، کربوهیدرات ها و DNA می شود و ممکن است که موجب آسیب به سلول های اندوتلیال گردند (۶). افزایش فعالیت رادیکال های آزاد، ناشی از افزایش تولید رادیکال های آزاد و یا کاهش در سیستم های حفاظتی آنتی اکسیدانت می باشد (۷). یکی از جمله این عوامل تولید کننده اکسیدانت ها و رادیکال های آزاد، دود سیگار می باشد. همچنین افزودن برخی مواد معطر به سیگار در افزایش آسیب ها و ایجاد رادیکال های آزاد نقش به سزایی دارد (۸). رادیکال های آزاد در هر دو شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بافت های پستانداران قادر به تشکیل بوده، (۹) مستعد واکنش با اسیدهای چرب غیر اشباع و ایجاد پراکسیداسیون در لیپیدها می باشند (۱۰). آسیب ناشی از رادیکال های آزاد در ایجاد بسیاری از شرایط پاتولوژیکال شناخته شده است (۷).

ارتباط بین دود سیگار و بیماری های عروقی به خوبی روشن شده است. دود سیگار یکی از عوامل خطرزای اصلی بیماری های قلبی-عروقی بوده، با اختلال در انبساط وابسته به اندوتلیال وریدهای مختلف (EDV) همراه می باشد. به نظر می رسد که کاهش در EDV، یکی از نخستین اثرات

پاتوفیزیولوژیکال عوامل خطرزای مختلف آترواسکلوئوزیس باشد که همراه با تغییرات مرفولوژیکال در دیواره عروق می باشد (۱۱). اثبات شده است که افراد سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری، نیز در خطر ابتلا به بیماری های قلبی-عروقی از که احتمالاً ناشی از افزایش سطح ملکول های اکسیده شده در نتیجه افزایش تولید رادیکال های آزاد می باشد (۱۲).

تجمع اجزای حاصل از نیکوتین روی LDL پلاسما و سایر پروتئین های افراد سیگاری و آسیب به سلول های اندوتلیال نقش دارد. همچنین اثبات شده است که ضخامت عروق کرونر در افراد سیگاری بیشتر است (۸).

نیتریک اکسید (NO) یک رادیکال آزاد بوده و عملکردهای بیولوژیک متعددی در پروسه های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف، بویژه در پاتوفیزیولوژی عروق بازی می نماید. NO از تبدیل ال-آرژنین به ال-سیتروالین، به وسیله خانواده ای از آنزیم ها موسوم به نیتریک اکسید سنتاز (NOS) ایجاد می شود (۱۳).

NO بعنوان یک انتقال دهنده سیگنال، عمل نموده، گوانیل سیکلاز را فعال می کند و سبب تبدیل GTP به cAMP می شود و cAMP نیز متعاقباً سبب باز شدن عروق خونی می گردد (۱۴). NO مشتق شده از اندوتلیوم عروق، یک فاکتور شل کننده عضلات صاف بوده، یک واسطه مهم کشش عروقی و مسئول عملکردهای هموستاتیک سلول های اندوتلیال به شمار می آید. تعدادی از عملکردهای پلاکت شامل اتصالو تجمع آنها به وسیله تولید NO توسط پلاکت ها و سلول های اندوتلیال کنترل می شود (۱۱ و ۱۵).

میزان تولید NO تحت تاثیر مصرف سیگار قرار گرفته، احتمالاً این ماده یکی از عوامل موثر در تغییرات EDV می باشد. مطالعات مختلف بیانگر تغییر در میزان NO با دود سیگار می باشند (۱۱). مکانیسم دقیق عملکرد نامطلوب اندوتلیال وابسته به دود سیگار و تغییر در میزان تولید NO هنوز کاملاً روشن نبوده، نتایج متناقضی در این باره وجود دارد (۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

علی رغم اثرات مفید NO در کشش عروقی، تعدیل دفاع ایمنی و ... تولید بیش از حد NO به خاطر تولید گونه های نیتروژن فعال و نیتروزیلاسیون پروتئین ها، دارای اثرات سمی می باشد (۲۰). NO قادر است به سرعت از طریق انتشار از غشای سلولی عبور نماید و بسته به شرایط، مسافت های طولانی را طی نماید. از آنجائی که NO دارای قدرت واکنشگری و نفوذ بسیار بالایی می باشد، سنتز آن باید شدیداً کنترل گردد (۲۱).

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی بر روی افراد سیگاری مراجعه کننده به بیمارستان امام علی (ع) شهرستان اندیمشک انجام گردیده است. از بین افراد سیگاری که برای آزمایش های چک آپ به محل تحقیق مراجعه می نمودند، افراد سیگاری که به مدت حداقل یک سال و روزانه حداقل ۱۰ نخ سیگار مصرف می نمودند و این فعالیت را بدون وقفه انجام می دادند، انتخاب شدند و از بین آنها، افرادی که دارای بیماری های زمینه ای مختلف مانند بیماری های قلبی، کلیوی، دیابت، فشار خون و ... بودند، از مطالعه حذف گردیدند. از بین این افراد تعداد ۶۰ نفر انتخاب و نمونه خون وریدی به مقدار ۷-۸ سی سی در حالت ناشتا (بین ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا) گرفته شد. سپس تعداد ۶۰ نفر از بین افراد سالم غیر سیگاری که آنها نیز برای آزمایش های چک آپ به محل مذکور مراجعه می نمودند و آنها نیز از نظر بیماری های زمینه ای ذکر شده در بالا مشکلی نداشتند، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. متوسط سن افراد سیگاری 35.7 ± 6.2 و در گروه افراد غیر سیگاری نیز همسان سازی سنی و جنسی انجام شد. لازم به یادآوری است که همه افراد وارد شده در این طرح، مرد بودند. نمونه ها به روش غیر احتمالی آسان از میان جامعه مورد نظر انتخاب شدند.

نمونه خون وریدی در طی کمتر از دو ساعت سانتریفوژ شد و سرم آنها پس از جدا سازی، در فریز در دمای -20°C درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از جمع آوری نمونه ها، آزمایشهای اندازه گیری نیتريت، نیترات و مالون دی آلدئید بر روی نمونه ها انجام شد.

برای اندازه گیری نیتريت و نیترات، ابتدا با استفاده از غلظت های متفاوت نیتريت سدیم، منحنی استاندارد نیتريت سدیم رسم گردید. سپس نمونه ها با استفاده از سولفات روی و هیدروکسید سدیم، دپروتئینه شدند (۲۳). برای اندازه گیری نیتريت، به ۱ میلی لیتر از نمونه سرم دپروتئینه شده، ۱۰۵ میکرولیتر از معرف رنگزا (مخلوط سولفانیل آمید و نفتیل اتیلن دی آمین به نسبت ۱ به ۱) افزوده شد. نمونه ها به شدت مخلوط شدند و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری آن ها در طول موج ۵۴۳ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از منحنی استاندارد نیتريت، غلظت نیتريت نمونه ها محاسبه گردید (۲۴).

برای اندازه گیری نیترات، به ۱ میلی لیتر از سرم، ۸ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی لیتر سولفات روی ۱۰٪ و ۰/۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال، افزوده شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در $4000 \times g$ سانتریفوژ شدند (۲۵ و ۲۶). سپس از گرانول های کادمیوم پوشیده شده با مس، برای تبدیل نیترات به نیتريت استفاده شد. برای این منظور، گرانول های کادمیوم ذخیره شده در اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال را با استفاده از آب مقطر، شستشو داده و سپس از محلول سولفات مس (۱۵ میلی مول در لیتر در ۰/۲ مول در لیتر از بافر گلیسین، $\text{PH} = 9.7$) برای پوشاندن این گرانول ها با مس، استفاده شد؛ بدین صورت که این گرانول ها به مدت ۲ دقیقه در محلول فوق، غوطه ور شدند. سپس این گرانول ها با استفاده از دستمال کاغذی، خشک شده، در طی ۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفتند. به ۰/۵ میلی لیتر از نمونه سرم دپروتئینه شده، ۰/۵ میلی لیتر از بافر گلیسین (۰/۲ مول در لیتر، $\text{PH} = 9.7$) و ۲-۳ گرانول کادمیوم آغشته به مس، اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از ورتکس مخلوط شدند. پس از احیا نیترات به نیتريت، میزان ۰/۵ میلی لیتر از نمونه احیا شده را به لوله دیگری منتقل نموده، میزان ۰/۵ میلی لیتر از معرف رنگزا بدان افزوده شد. بقیه مراحل، همانند مراحل طی شده برای اندازه گیری نیتريت، انجام شد (۲۴ و ۲۶).

این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد (جدول شماره ۱).

همچنین سطح سرمی MDA در گروه افراد سیگاری $2/6 \pm 11/7$ و در گروه افراد غیر سیگاری $1/9 \pm 8/3$ میکرومول در لیتر می باشد. سطح سرمی MDA در گروه دارای افراد سیگاری، بالاتر از افراد غیر سیگاری می باشد که این اختلاف نیز از نظر آماری معنی دار می باشد ($p < 0/00001$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه سطح سرمی نیتريت، نیترات و MDA در افراد سیگاری و غیر سیگاری

پارامتر	سیگاری (n= ۶۰)	غیر سیگاری (n= ۶۰)	p-value
سن (سال)	$35/7 \pm 6/2$	-	-
MDA ($\mu\text{mole/L}$)	$11/7 \pm 2/6$	$8/3 \pm 1/9$	$p < 0/00001$
Nitrite ($\mu\text{mole/L}$)	$10/4 \pm 3/1$	$14/6 \pm 4/4$	$p < 0/00001$
Nitrate ($\mu\text{mole/L}$)	$19/6 \pm 5/9$	$29/3 \pm 6/7$	$p < 0/00001$

بحث

رادیکال های آزاد اکسیژن، ملکول هایی با قدرت واکنشگری بسیار بالا بوده و ممکن است که موجب آسیب سلول های اندوتلیال گردند (۲۹). رادیکال های آزاد در هر دو شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بافت های پستانداران قادر به تشکیل بوده (۹) و مستعد واکنش با اسیدهای چرب غیر اشباع و ایجاد پراکسیداسیون در لیپیدها می باشند (۱۰). آسیب ناشی از رادیکال های آزاد در ایجاد بسیاری از شرایط پاتولوژیکال شناخته شده است. افزایش فعالیت رادیکال های آزاد، ناشی از افزایش تولید رادیکال های آزاد و یا کاهش در سیستم های حفاظتی آنتی اکسیدانت می باشد (۷). محصولات ناشی از NO (نیتريت + نیترات) بسته به شرایط، دارای هر دو ویژگی پرواکسیدانی و آنتی اکسیدانی روی پراکسیداسیون لیپیدها می باشند (۳۰). از طرفی، استرس اکسیداتیو موجب عملکرد نامطلوب اندوتلیال شده که آن هم به نوبه خود با کاهش آزاد سازی عوامل گشاد کننده رگی از قبیل NO، موجب افزایش فشار خون می گردند (۳۱).

برای اندازه گیری MDA، از روش Rao و همکاران (۲۷) استفاده شد. در این روش، میزان MDA به روش تیوباریتوریک اسید (TBA) مورد بررسی قرار گرفت. برای آزمایش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم به ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از معرف TBA (در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر محتوی ۰/۵ گرم NaOH، ۰/۶۷ گرم از تیوباریتوریک اسید و ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد) به نمونه رقیق شده، افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه ها، به مدت ۱۰ دقیقه در $4000 \times g$ سانتریفوژ شدند. در نهایت مایع رویی جدا گردید و میزان جذب نوری نمونه ها، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۴ نانومتر، قرائت گردید (۲۷). با استفاده از ضریب خاموشی (Extinction Coefficient) $105 \times 1/56$ مول در لیتر (۲۸)، غلظت MDA نمونه ها را محاسبه نموده و نتایج بر حسب میکرومول در لیتر گزارش گردیدند.

هر آزمایش بر روی هر نمونه، سه مرتبه انجام شد و مقادیر آنها یادداشت گردید. سپس برای هر آزمایش میانگین سه مرتبه آزمایش محاسبه و سپس نتایج به صورت میانگین $\pm SD$ بیان شدند. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون t-Student مورد بررسی قرار گرفتند.

در این مطالعه تعداد ۶۰ نفر افراد سیگاری و ۶۰ نفر افراد غیر سیگاری به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط سن بیماران در افراد سیگاری $35/7 \pm 6/2$ بود و افراد غیر سیگاری نیز از نظر سن و جنس با افراد سیگاری، همسان سازی گردیدند. در هر دو گروه، افرادی که دارای بیماری های زمینه ای مختلف مانند بیماری های قلبی، کلیوی، دیابت، فشار خون و ... بودند از گروه مورد مطالعه حذف گردیدند. سطح سرمی نیتريت و نیترات در گروه افراد سیگاری به ترتیب $10/4 \pm 3/1$ و $19/6 \pm 5/9$ و در گروه افراد غیر سیگاری (گروه کنترل) $14/6 \pm 4/4$ و $29/3 \pm 6/7$ ($p < 0/00001$) میکرومول در لیتر می باشد. سطح سرمی نیتريت و نیترات در گروه افراد سیگاری، پایین تر از افراد غیر سیگاری می باشد که

در این مطالعه، سطح سرمی نیتريت و نیترات در گروه افراد سیگاری به ترتیب $4/4 \pm 14/6$ و $6/7 \pm 29/3$ و در گروه افراد غیر سیگاری (گروه کنترل) $3/1 \pm 10/4$ ($p < 0/001$) و $5/9 \pm 19/6$ ($p < 0/01$) میکرومول در لیتر بود که بطور معنی داری در گروه افراد سیگاری پایین تر از گروه افراد سیگاری می باشد.

همچنین سطح سرمی MDA در گروه افراد سیگاری $2/6 \pm 11/7$ و در گروه افراد غیر سیگاری $1/9 \pm 8/3$ میکرومول در لیتر می باشد. سطح سرمی MDA در گروه دارای افراد سیگاری، بالاتر از افراد غیر سیگاری می باشد که این اختلاف نیز از نظر آماری معنی دار می باشد ($p < 0/001$).

در مطالعه Barua و همکاران، بین میزان NO افراد سیگاری و غیر سیگاری، علی رغم پایین تر بودن میزان NO در افراد سیگاری، اختلاف معنی داری مشاهده نشده است. آنها با قرار دادن سلول های اندوتلیال عروق بند ناف انسان در معرض سرم افراد سیگاری و غیر سیگاری، مشاهده نمودند که تولید NO در سلول های تماس داده شده با سرم انسان افراد سیگاری، به طور معنی داری کمتر می باشد (۱۱).

در مطالعه Calikoglu و همکاران نیز سطوح نیتريت و نیترات در افراد سیگاری به طور معنی داری پایین تر از افراد غیر سیگاری بوده است (۳۲).

در مطالعه Schilling و همکاران، میزان تولید NO در هوای بازدم افراد سیگاری کمتر از افراد غیر سیگاری بوده است و بین میزان تولید NO در آنها اختلاف معنی داری وجود داشته است. آنها مشاهده نمودند که علی رغم افزایش NO در هوای استنشاقی افراد سیگاری، میزان NO در هوای بازدمی آنها پایین می باشد. آنها این یافته را با فرضیه های کاهش سنتز NO، افزایش کیفی و یا کمی بازدارنده های اندوژنوس NOS از قبیل NG-dimethylarginine یا NG-monomethyl-L-arginine و یا افزایش کلیرانس NO توجیه نموده اند (۳۳).

ارتباط بین مصرف سیگار و بیماری های عروقی علی رغم مشخص نبودن مکانیسم دقیق آنها به خوبی روشن شده است. NO مسئول عملکردهای گشادکنندگی و هموستاتیک عروق

بوده، این عملکردها با دود سیگار تحت تاثیر قرار می گیرند. با استفاده از آنتاگونیست های NO توانسته اند که این اثرات را کاهش دهند (۳۴ و ۳۵). از طرفی، میزان فشار خون در افراد سیگاری بالاتر از افراد غیر سیگاری می باشد کاهش. میزان NO و کاهش قدرت گشاد شدن عروق را می توان یکی از علل مسئول افزایش فشار خون در افراد سیگاری قلمداد نمود (۳۳).

در مطالعه رنجبر و همکاران، میزان پراکسیداسیون لیپیدی در افراد سیگاری، بالاتر از افراد غیر سیگاری بوده است. در مطالعه آنها ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و گروه های تیول پلاسما در افراد سیگاری، پایین تر از افراد سیگاری بوده است. با توجه به کاهش گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما چنین استنباط می شود که در افراد سیگاری، تولید رادیکال های آزاد افزایش یافته است (۶). در بررسی Antoniadis و همکاران، مصرف ویتامین های C و E، موجب بهبود عملکرد اندوتلیال عروق افراد سیگاری شده است (۳۶).

در مطالعه Block و همکاران نیز میزان پراکسیداسیون لیپیدی و F_2 -ایزوپروستان ها در افراد سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری، افزایش معنی داری داشته است (۳۷).

در مطالعه روزبهانی و همکاران، میزان MDA و CRP (C-Reactive Protein) در افراد سیگاری بالاتر از افراد سیگاری بوده است (۸). افزایش میزان CRP در افراد سیگاری، نشان دهنده افزایش روند التهاب به ویژه در آترواسکلروز می باشد (۸ و ۳۸).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه مذکور، دود سیگار برای افراد سیگاری یا افراد در معرض آن ممکن است موجب آسیب در سلول های اندوتلیال عروق و اختلال در عملکرد آنها شود. مصرف آنتی اکسیدان هایی از قبیل میوه ها و مواد غذایی با ویژگی آنتی اکسیدانی و مکمل های دارویی از قبیل ویتامین های C، E و ... و استفاده از دهنده های NO به منظور تولید میزان کافی از NO به افراد سیگاری می توان توصیه نمود.

علی (ع) شهرستان اندیشک و همچنین تمامی کسانی که ما را در اجرای این طرح تحقیقاتی یاری نمودند، صمیمانه قدردانی و تشکر می گردد.

لازم به ذکر است که استفاده از این بازدارنده ها منوط به بررسی های بیشتر و در سطح ملکولی می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران آزمایشگاه بیمارستان امام

References

- 1- Zenzes MT. *Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos*. Human Reproduction Update. 2000; 6: 122-131.
- 2- Ahmadi G, Khalili H, Jooibari R. *Prevalence of cigarette smoking in Iran*. Psjchol Rep. 2001; 89(2):339-41
- 3- Curits KM, Savitz DA, Arbuckle TE. *Effect of cigarette smoking, caffeine consumption and alcohol intake on fecundability*. Am J Epidemiol. 1997; 146: 32-41.
- 4- Evenson DP, Wixon R. *Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility*. Theriogenology. 2006; 65: 979-991.
- 5- Taghavi R, Ramezani A, Barzegar Nejad A. *Smoking and semen parameters in infertile men*. The Iranian Journal of Urology. 1999; 22: 45-50.
- 6- Ranjbar A, zhand Y, Mirzadeh E, Esmaeili A, Ghasemi Nejad S, Maleki Rad AA. *Comparison of oxidative stress in smokers and non smokers*. Journal of Arak Medical School. 2004; 7(3): 7-11.
- 7- Rao GM, Sumita P, Roshni M, Ashtagimatt MN. *Plasma antioxidant vitamins and lipid peroxidation products in pregnancy induced hypertension*. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2005; 20(1): 198-200.
- 8- Rouzbahani R, Asgary S, Naderi GA, Dehghan Nejad M, Rezaei F. *Comparison of plasma peroxidants, glycosilated hemoglobin, conjugated dienes and CRP level in smokers and non-smokers men*. Journal of Isfahan Medical School. 2009; 27(93): 115-121.
- 9- Plaa GL, Witschi H. *Chemicals, drugs and lipid peroxidation*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1976; 16: 125-141.
- 10- Chang YU, Lee WK, Kim HG. *Oxidative stress in rat model of preeclampsia and clinical correlates*. Korean J Physiol Pharmacol. 2007; 11: 129-133.
- 11- Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. *Dysfunctional Endothelial Nitric Oxide Biosynthesis in Healthy Smokers With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilatation*. Circulation. 2001; 104: 1905-1910.
- 12- Bloomer RJ. *Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake*. Nutrition Journal. 2007; 6: 39.
- 13- Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. *Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia*. Trends Mol Med. 2006; 12(5): 223-233.
- 14- Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. *Macrophage nitric oxide synthase subunits; purification, characterization and role of prosthetic groups and substrate in regulation their association into a dimeric enzymes*. The Journal of Biological Chemistry. 1993; 268: 21120-21129
- 15- Alonso D, Radomski MW. *Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies*. 2003; 8: 47-54
- 16- Sarker R, Gelabert HA, Mohiuddin KR, Thakor DK, Santibanez-Gallerani AS. *Effect of cigarette smoke on endothelial regeneration in vivo and nitric oxide levels*. J Surg Res. 1999; 82: 43-47.
- 17- Zhang S, Day I, Ye S. *Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells*. Atherosclerosis. 2001; 54: 277-283.
- 18- Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. *Genotype dependent and cigarette specific effect on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity*. FEBS Lett. 2000; 471: 45-50.
- 19- Wright JL, Dai J, Zay K, Price K, Gilks CB, Churg A. *Effects of cigarette smoke on nitric oxide synthase expression in the rat lung*. Lab Invest. 1999; 79: 975-983.
- 20- Sharma SP. *Nitric oxide and the kidney*. Indian J Nephrol. 2004; 14: 77-84.
- 21- Bredt D.S. *Nitric oxide signaling specificity- the heart of the problem*. 2003; 116: 9-15.
- 22- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation*. Physiology and Pharmacology. 2003; 54: 469-487.
- 23- Aksoy H, Aksoy Y, Ozbey I, Altuntas I, Akcay F. *The relationship between varicocele and semen nitric oxide concentration*. Urol Res. 2000; 28: 357-359.
- 24- Gaevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kicc A. *Determination of nitrite/nitrate in human biological by the simple Griess-reaction*. Clin Chim Acta. 1998; 274: 177-188.
- 25- Somogyi M. *A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar*. J Biol Chem. 1930; 86: 655-663.
- 26- Ghaffari MA, Kadkhodaei-Elyaderani M, Saffari MR, Pedram M. *Monitoring of serum nitric oxide in patients with acute leukemia*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2005; 4: 233-237

- 26- Ghaffari MA, Kadkhodaei-Elyaderani M, Saffari MR, Pedram M. *Monitoring of serum nitric oxide in patients with acute leukemia*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2005; 4: 233-237.
- 27- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. *Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility*. Gamete Res. 1989; 24(2): 127-134.
- 28- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. *Betteridge DJ, et al. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM*. Diabetes. 1995; 44: 1054-1058.
- 29- Maseki M, Nishigaki I, Hagihara M, Tomoda Y, Yagi K. *Lipid peroxide levels and lipid serum content of serum lipoprotein fractions of pregnant subjects with and without preeclampsia*. Clin Chim Acta. 1981; 155: 155-161.
- 30- Paternoster DM, Stella A, Mussap M, Plebani M, Gambaro G, Grella PV. *Predictive markers of preeclampsia in hypertensive disorders in pregnancy*. Int J Gynecol Obstet. 1999; 66: 232-243.
- 31- Mutlu TU, Aykac TG, Ibrahimoglu L, Ademoglu E, Uysal M. *Plasma nitric oxide metabolites and lipid peroxide levels in preeclamptic women before and after delivery*. Gynecol Obstet Invest. 1999; 48: 247-250.
- 32- Calikoglu M, Tamer L, Calikoglu L, Atis S, Ulubas B, Ercan B. *Oxidative Stress and Products of Nitric Oxide Metabolism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and in Healthy Smokers*. Turkish Respiratory Journal. 2002; 3: 24-27.
- 33- Schilling J, Holzer P, Guggenbach M, Gyurech D, Marathia K, Geroulanos S. *Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives*. Eur Respir J. 1994; 7: 467-471.
- 34- Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, Hirashima O, et al. *Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers*. Am Coll Cardiol. 1996; 28: 1161-1167.
- 35- Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, Ohgushi M, Matsumura T, Doi H, et al. *Impairment of endotheliumdependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract: role of free radicals and attenuation by captopril*. Atherosclerosis. 1997; 131: 195-202.
- 36- Antoniadis C, Tousoulis d, Tentouris C. *Effects of antioxidant vitamins C and E on endothelial function and thrombolysis fibrinolysis system in smokers*. Thromb Haemost. 2003; 89(6): 990-995.
- 37- Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. *Factors associated with oxidative stress in human populations*. Am J Epidemiol. 2002; 156 (3) : 274-285.
- 38- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. *Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein*. Arteriosclerosis. 1983; 3(2): 149-159.