

Sigara İçenlerde ve İçmeyenlerde Nitrik Oksit Seviyeleri

Y. Doç. Dr. Engin BOZKURT, Uz. Dr. Abdusselam EMEK, Y. Doç. Dr. M. Kemal EROL, Y. Doç. Dr. Mahmut AÇIKEL, Uz. Dr. İrfan ALTUNTAŞ*, Prof. Dr. Sebahattin ATEŞAL, Doç. Dr. Salim Başol TEKİN**

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji, Biyokimya* ve İç Hastalıkları** Anabilim Dalları, Erzurum

ÖZET

Kardiyovasküler sistem kesintisiz tek katlı endotel hücreleri ile döşelidir. Endotel hücreleri devamlı olarak nitrik oksit (NO) salgılayarak hem vasküler tonusu ve kan basıncını düzenler hem de trombosit adezyonunu ve agregasyonunu baskılar. Ayrıca NO'in damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü de baskıladığı saptanmıştır. Sigara içilmesi endotel hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olarak NO aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır. Bu çalışma kronik sigara içiminin plazma NO düzeyi ve trombosit adezyonu ve agregasyonuna etkisini araştırmak amacı ile yapıldı.

Çalışmaya herhangi bir sağlık problemi olmayan, son bir hafta içinde hiçbir ilaç almayan ve 24-47 yaşlarında 101 gönüllü erkek olgu alındı. Olgular üç gruba ayrıldı. Grup I: Ağır (>20 adet/gün) sigara içenler (n: 40). Grup II: Hafif (<20 adet/gün) sigara içenler (n: 38). Grup III: Sigara içmeyen ve sigara dumanına maruz kalmayanlar (n: 23).

Olgulardan 24 saatlik sigarasız dönemi ve 12 saatlik açlık periyodunu takiben alınan venöz kanda NO düzeyi, trombosit agregasyonu ve trombosit adezyonları ölçüldü.

Serum NO konsantrasyonu grup I'de: $12.05 \pm 2.83 \mu\text{M}$, grup II'de: $13.98 \pm 2.52 \mu\text{M}$ ve grup III'de: $18.69 \pm 9.91 \mu\text{M}$ olarak saptandı. Grup I ve II'de NO konsantrasyonu grup III'e göre anlamlı derecede azalmıştı (strastıyla $p < 0.001$, $p < 0.01$). Ayrıca grup I'deki NO konsantrasyonu grup II'dekine göre de anlamlı derecede azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$). Trombosit adezyonları ve trombosit agregasyonu açısından gruplar arasında hafif farklar olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Sonuç olarak sigara içen sağlıklı bireylerde NO düzeyinin azaldığı ve bu azalmanın içilen günlük sigara sayısı ile artış gösterdiği; fakat trombosit agregasyonu ve adezyonlarında ise in vitro şartlarda anlamlı değişiklik olmadığı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sigara, nitrik oksit

Kardiyovasküler sistemin iç yüzü vücuttaki en büyük ve en yaygın doku olarak kabul edilen kesintisiz tek katlı endotel hücreleri ile döşelidir (1). Vasküler

Alındığı tarih: 11 Temmuz, revizyon 31 Ekim 2000
Yazışma adresi: Dr. Engin Bozkurt, Osman Gazi Mahallesi, Çakır Evler D-Blok No: 10, Yıldızkent - Erzurum
Tlf: (0 442) 342 1644 (ev) - (0 533) 365 8539 (cep)
Bu çalışma İzmir'de XV. Ulusal Kardiyoloji Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

endotel hücreleri tarafından az miktarda ancak devamlı olarak salgıladığı nitrik oksit (NO) aracılığı ile vasküler tonusu ve kan basıncını düzenlediği belirlenmiştir (2,3). Ayrıca NO'in hem trombosit adezyonunu ve agregasyonunu (4,5) hem de damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu baskıladığı saptanmıştır (5).

NO biyoaktivitesinde azalma olduğu zaman vazodilatasyonun baskılandığı, trombosit adezyonu ve agregasyonunun arttığı, damar düz kas hücrelerinde lokal proliferasyon ve migrasyonda artış meydana geldiği saptanmış; miyokard iskemisi patogenezinde anahtar rolü olan aterosklerozla birlikte, vazospazm ve trombus oluşumu gibi olayların meydana gelişinin kolaylaştığı gözlemlenmiştir (3-11).

Bu çalışma kronik sigara içilmesinin plazma NO düzeyine ve trombosit adezyonu ve agregasyonuna etkisini araştırmak amacı ile yapıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya polikliniğimize müracaat eden, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve 10 yıldan daha uzun süre sigara içen ardışık 78 gönüllü ile kontrol grubu olarak hiç sigara içmemiş sağlıklı 23 olgu alındı. Kalp yetersizliği, koroner arter hastalığı ya da aterosklerotik başka damar hastalığı, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), pulmoner hipertansiyon, sistemik hipertansiyon, malign hastalıklar, karaciğer parankim yetersizliği, böbrek yetersizliği, diabetes mellitus, hiperlipidemi, anormal tiroid fonksiyon bozukluğu ve son bir hafta içinde ilaç alma hikayesi dışlama kriterleriydi.

Çalışmadaki olgular içilen günlük sigara sayısına göre üç gruba ayrıldı.

Grup I: Günde 20 adetin üzerinde sigara içenlerin oluşturduğu 'ağır sigara içenler' (n: 40; yaş ortalaması: 31.40 ± 3.98 yıl). **Grup II:** Günde 10-20 adet sigara içenlerin oluşturduğu 'hafif sigara içenler' (n: 38; yaş ortalaması: 33.63 ± 6.57 yıl). **Grup III:** Sigara içmeyen ve sigara dumanına maruz kalmayanların oluşturduğu 'kontrol grubu' (n:23; yaş ortalaması: 33.35 ± 5.69 yıl).

24 saatlik sigarasız ve 12 saatlik açlık dönemini takiben 15 dakikalık istirahat sonrasında oturur pozisyonda önkol ve

ninden 20 ml kan alındı. Alınan kanın 5 mililitresi NO düzeyi ölçümü için steril tüplere alındıktan sonra 4000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve -80 °C'de çalışma tarihine kadar derin dondurucuda bekletildi. Kalan kan trombosit adezivitesi ve trombosit agregasyonunun çalışılması için özel tüplere konuldu.

NO ölçümü kolorimetrik yöntemle Nitric Oxide Colorimetric Assay (Boehringer Mannheim) hazır ticari kiti kullanılarak yapıldı. Trombosit agregasyonu için alınan kan %3,8 trisodyum sitrat içeren plastik tüplere 10:1 oranında konularak agrometer cihazında (Cronolog Corporation, model 560) ölçüldü. Trombosit adezivitesi için heparinle yıkanmış enjektöre alınan kan iki ayrı tüpe aktarıldı. Birinci tüpteki kanda trombosit sayımı yapıldı. İkinci tüpteki kan içerisinde cam boncuklar bulunan özel polivinil tüpten geçirildikten sonra trombosit sayısı belirlendi. Aradaki farkın ilk tüpteki trombosit sayısına bölünmesi ile trombosit adezivitesi '%' olarak belirlendi.

İstatistiksel Değerlendirme: Çalışmada elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Farklı grupların veri ortalamalarının karşılaştırılmasında Student's t testi kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Gruplar arasında yaş (sırasıyla 31.40 ± 3.98 yıl, 33.63 ± 6.57 yıl, 33.35 ± 5.69 yıl; $p > 0.05$) bakımından anlamlı fark yoktu.

Serum NO konsantrasyonu ağır sigara içenlerde (Grup I) 12.05 ± 2.83 (M, hafif sigara içenlerde (Grup II) 13.98 ± 2.52 (M ve kontrol grubunda (Grup III) 18.69 ± 9.91 (M olarak saptandı. Sonuçlar karşılaştırıldığında hem ağır sigara içenlerde hem de hafif sigara içenlerde NO konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulundu (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.01$). Ayrıca ağır sigara içenlerde hafif sigara içenlere göre de NO konsantrasyonun anlamlı derecede azalmış olduğu bulundu ($p < 0.05$). Çalışmaya alınan tüm grupların NO düzeyleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya alınan grupların NO düzeyleri

	Grup I (n= 40)	Grup II (n= 38)	Grup III (n= 23)
NO (μ M)	12.05 ± 2.83	13.98 ± 2.52	18.69 ± 9.91
p	$p < 0.05$ (Grup I- Grup II)		
p	$p < 0.01$ (Grup II- Grup III)		
p	$P < 0.001$ (Grup I- Grup III)		

Trombosit agregasyonu adenozin difosfat, kollajen ve epinefrin için sırasıyla Grup I: 12.20 ± 8.95 ohm,

28.78 ± 9.97 ohm, 13.73 ± 9.15 ohm; Grup II: 10.65 ± 8.34 ohm, 25.53 ± 14.65 ohm, 12.89 ± 9.15 ohm; Grup III: 9.97 ± 8.18 ohm, 24.08 ± 11.70 ohm, 10.56 ± 8.69 ohm olarak bulundu. Trombosit agregasyonu açısından gruplar arasında küçük farklar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Gruplara göre tespit edilen trombosit agregasyonu değerleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmaya alınan grupların trombosit agregasyon değerleri

	TROMBOSİT AĞREGASYONU (ohm)		
	ADP	Kollajen	Epinefrin
Grup I (n= 40)	12.20 ± 8.95	28.78 ± 9.97	13.73 ± 9.15
Grup II (n= 38)	10.65 ± 8.34	25.53 ± 14.65	12.89 ± 9.15
Grup III (n= 23)	9.97 ± 8.18	24.08 ± 11.70	10.56 ± 8.69
p	$p > 0.05$ (Grup I- II; Grup I- III; Grup II- III)		

Trombosit adezivitesi "%" olarak Grup I, Grup II ve Grup III için sırasıyla; 23.89 ± 13.40 , 23.65 ± 13.81 , 18.04 ± 14.41 olarak bulundu. Trombosit adezivitesi değerleri karşılaştırıldığında da gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). Gruplara göre tespit edilen trombosit adezivitesinin '%' olarak değerleri tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya alınan grupların trombosit adezivitesi değerleri

	TROMBOSİT ADEZİVİTESİ (%)
Grup I	23.89 ± 13.40
Grup II	23.65 ± 13.81
Grup III	18.04 ± 14.41
P	$p > 0.05$ (tüm gruplar arasında)

TARTIŞMA

Günümüz toplumlarında yaygın olarak kullanılan sigara dumanında başta nikotin olmak üzere çoğu toksik 4000'den fazla bileşik bulunur (12). Çeşitli klinik ve patolojik çalışmalarla sigara içmenin başta kardiyovasküler sistem (13-18) olmak üzere solunum sistemi, endokrin, ürogenital ve immün sistemi etkilediği ve oluşturduğu patolojik değişikliklerle bu sistemlere bağlı morbiditeyi ve mortaliteyi artırdığı gösterilmiştir (14,19-22). Fakat şüphesiz en önemli özelliklerinden birisi endotel yapı ve fonksiyonlarını bozucu

etkisidir (15,18,23-25). Nikotinin direk toksik etkisi ile endotel hasarı yaparak ateroskleroz ve diğer vasküler komplikasyonların oluşmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (26,27).

Sigaranın neden olduğu endotel fonksiyon bozukluğunu incelemek için yapılan birtakım çalışmalarda NO aktivitesinde belirgin azalma olduğu, NO aktivitesinin azalması hem vasküler tonusta artışa hem de ateroskleroz ve tromboz gelişimine yol açarak kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir (5-7,28-32). Başlıca kaynağı endotel olan NO, yarı ömrü birkaç saniye olan kararsız bir molekül olup, hızla nitrit ve nitrat okside olur (33). Bu nedenle NO düzeyini belirlemek için NO'in kararlı son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin ölçümlerinden yararlanılır (33,34). Bizim çalışmamızda üstteki çalışmalarla uyumlu olarak sigara içen sağlıklı bireylerde serum NO₂ ve NO₃ düzeylerinin, dolayısıyla serum NO düzeyinin anlamlı bir şekilde azalmış olduğunu ortaya koyduk.

Node ve arkadaşları (35) yaptığı çalışmada; sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde serum NO seviyesinin daha düşük olduğunu ve günlük sigara içme miktarı arttıkça bu düşüşün daha da belirginleştiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızın sonuçları da bu çalışma ile uyumludur.

Higman ve arkadaşları (36) sigara içen hastalarda endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO₂ düzeyinin azalmış olduğunu saptamışlardır. Ayrıca Kiowski ve arkadaşları (37) da kronik sigara içenlerde vasküler tonusdaki artışın NO sentezindeki yetersizlikten kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Mc Veugh ve arkadaşları (38) kronik sigara içenlerde NO aktivitesinin azalmış olduğu ve bu nedenle NO'in aracılık ettiği bazal vazodilatasyonun da baskılanmış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yapılan birçok çalışmada (36-40) da gösterildiği gibi kronik sigara içiminin NO seviyesini azaltarak vasküler tonusta artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Yine bazı çalışmalarda sigara içen hastalarda PTCA sonrasında NO eksikliğine bağlı olarak koroner spazm riskinin de arttığı bulunmuştur (4,20,41).

Endotelden salınan NO'in trombosit adezyonunu ve agregasyonunu baskıladığı birtakım çalışmalarda gösterilmiştir (4,5,7,30). Ayrıca son zamanlarda trombositlerin içinde de L-arjinin NO yolunun var olduğu

saptanmıştır (7,10,42). Uzun süreli sigara içilmesinden trombosit içindeki L-arjinin yolunun da etkilenecek trombositlerden salınan NO'in de azaldığı bulunmuştur (10). Yani sigara içimi hem endotel kaynaklı hem de trombositlerce sentezlenen NO düzeyini azaltarak in vivo trombosit adezyonunu ve agregasyonunu artırabilmektedir. Sigara içilmesinin bu yolla hem aterosklerozisin gelişimine katkıda bulunabileceği hem de akut vasküler olayların gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda trombositlerin in vitro ADP, epinefrin ve kollajene verdikleri agregasyon cevabı değerlendirildi. Ancak sigara içenler ve içmeyenler arasında agregasyon cevabı açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

Berglund ve arkadaşları (43) ile Chao ve arkadaşlarının (44) yaptığı iki ayrı çalışmada da kronik sigara içicilerde in vitro trombosit agregasyonunda değişiklik olup olmaması araştırılmış ve kronik sigara içiminin in vitro trombosit agregasyonunda değişiklik yapmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Fakat sigaranın in vitro trombosit agregasyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar da vardır (44-46). Ancak bu çalışmalarda sigara içilmesini takiben alınan kanda in vitro trombosit agregasyonu değerlendirilmiştir. Oysa bizim çalışmamızda 24 saat sigarasız dönemi takiben değerlendirme yapıldığı için anlamlı fark bulunmadığı kanaatindeyiz. Bu görüşü destekler nitelikte Belch ve arkadaşlarının (47) yaptığı bir çalışmada kronik sigara içicilerde sigara içilmesinin hemen ardından ve 10 saatlik sigarasız dönemden sonra alınan kanlarda trombosit agregasyonuna bakılmış, sigara içilmesini takiben trombosit agregasyonunun anlamlı derecede arttığı fakat 10 saatlik sigarasız dönemden sonra ise trombosit agregasyonunda anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda sigaranın trombosit adezivitesi üzerine etkisi de incelendi. Sigara içmeyenlerle ağır ve hafif sigara içen gruplar arasında in vitro trombosit adezivitesi açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Benzer şekilde Rival ve arkadaşlarının (48) yapmış olduğu bir çalışmada kronik sigara içenlerde trombosit adezivitesinin sigara içmeyen kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır. Ancak hem kronik sigara içicilerde (49) hem de sigara

içilmesini takiben (50) trombosit adezivitesinde artış saptanan çalışmalar da mevcuttur. Yapılan çalışmalarda trombosit adezivitesinin in vitro değerlendirilmiş olması, in vivo trombosit adezivitesini yansıtabilir. Çünkü in vitro çalışmalarda hasarlı disfonksiyonel endotel yerine ya sağlam endoteli olan damar ya da cam boncuklar kullanılmıştır.

Sonuç olarak uzun süre sigara içilmesi içilen günlük sigara sayısına paralel olarak serum NO seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Fakat trombosit agregasyonu ve adezyonunda anlamlı derecede değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Sigaranın kardiyovasküler olumsuz etkilerinden kısmen de olsa NO düzeyi düşüklüğünün sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. **Ross R**: The pathogenesis of atherosclerosis In: Braunwald E (ed). Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. WB Saunders Co. Philadelphia,1997: 1105-12
2. **Busse R, Mülsch A, Fleming I**: Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. Circulation 1993; 87(suppl V): 15-18
3. **Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S**: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 3375-8
4. **Lowenstein CJ, Dinerman JL, Synder SH**: Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med. 1994; 120: 227-37
5. **Moncada S, Higgs A**: The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329: 2002-12
6. **Flavahan NA, Vanhoutte PM**: Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. Am J Hypertens. 1995; 8: 285-415
7. **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA**: Nitric oxide. physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-42
8. **Lerman A, Evan K, Fredric L**: Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin mediated vasoconstriction. Proc Natl Acad Sci 1992;85:1894-8
9. **Sarkar 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: 43-7
10. **Ikeda H, Takajo Y, Murohara T et all**: Platelet-derived nitric oxide and coronary risk factors. Hypertension 2000; 35: 904-7
11. **Riddell DR, Owen JS**: Nitric oxide and platelet aggregation. Vitam Horm 1999; 57: 25-48
12. **Terry ML, Berkowitz HD, Kerstein MD**: Tobacco. Its impact on vascular disease. Surg Clin North Am 1998; 78: 409-29
13. **Smoking cessation and cardiovascular disease**. US Department of Health, Education and Welfare: The Health Benefits of Smoking Cessation: A report of surgeon general. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers of Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office of smoking and Health. DHHS Publication No (CDC)90-8416; 1990: 189-261
14. **Felding JE**: Smoking: Health effects and control. N Engl J Med 1985; 313: 491-8.
15. **Traber MG, van der Vliet A, Reznick AZ, Cross CE**: Smoking and pulmonary and cardiovascular diseases. Clin Chest Med 2000; 2: 173-87
16. **Farmer JA, Gotto AM**: Dyslipidemia and other risk factors for coronary artery disease. In: Braunwald E (ed). Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. WB Saunders Co. Philadelphia,1997:1126-61
17. **Coronary heart disease** US Department of Education and Welfare: The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Cardiovascular Disease. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service Office of Smoking and Health. DHHS Publication No (PHS 84-50204) 1983: 63-157
18. **Auerback O, Carter HW, Carfinkel L et all**: Cigarette smoking and coronary artery. Chest 1976; 70: 697-705
19. **Robertson D, Tseng JC, Appolsamy M**: Smoking and mechanisms of cardiovascular control. Am Heart J 1988; 115: 258-66
20. **Benowitz N**: Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. N Engl J Med 1988;319: 1318-28
21. **Christen AG**: The impact of tobacco use and cessation on oral and dental disease and condition. Am J Med. 93 (1A) : 23-31
22. **Poll R, Hill AB**: Mortality in relation to smoking ten years observations of British doctors. Br Med J 1964;1:1399-1410
23. **Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P**: Atherosclerosis: Risk factors and the vascular endothelium. Am Heart J 1996; 131: 379-84
24. **Wopel RA**: Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: A review Clin Cardiol 1997; 20: 426-32
25. **Freischlag JA, Johnson D, Farooq MM et all**: Cigarette smoke impairs endothelium- dependent relaxation in rabbit superficial femoral veins. J Surg Res 1999; 8:77-8
26. **Chalon SVH, Moreno H Jr, Benowitz NL, Hoffman BB, Blaschke TF**: Nicotine impairs endothelium- dependent dilatation in human veins in vivo. Clin Pharmacol Ther 2000; 67: 391-7
27. **Miller VM, Lewis DA, Rud KS, Offord KP, Croghan IT, Hurt RD**: Plasma nitric oxide before and after smoking cessation with nicotine nasal spray. J Clin Pharmacol 1998; 38: 22-7

28. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M: Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by super oxide anion-mediated degradation of EDRF. *Am J Physiol* 1994; 266: 874-80
29. Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M: Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1161-7
30. Moncada S: The L-arginin: Nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 201-27
31. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J: Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 2000; 471: 45-50
32. Soejima K, McGuire R, Snyder N 4th et al: The effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition on smoke inhalation injury in sheep. *Shock* 2000; 13: 261-6
33. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM: Nitrite and nitrate determinations in plasma. A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 904-7
34. Jungersten L, Edlund A, Petersson AS et al: Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man. Analysis of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol* 1996; 16: 366-79
35. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H: Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1538-41
36. Higman DJ, Strachan AMJ, Buttery L et al: Smoking impaires the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous vein. *Arteriosclerosis Trombosis and Vascular Biology* 1996; 16: 546-52
37. Kiowski W, Linder L, Stoschitzky K et al: Diminished vascular response to inhibition of endothelium derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers. *Circulation* 1994; 90: 27-34
38. McWeugh GE, Lemay L, Morgon D, Cohn JN: Effects of long term smoking on endothelium dependent responses in humans. *Am J Cardiol* 1996; 78: 668-72
39. Hutchison SJ, Reitz MS, Sudhir K et al: Chronic dietary L-arginine prevents endothelial dysfunction secondary to environmental tobacco smoke in normocholesterolemic rabbits. *Hypertension* 1997; 29: 1186-91
40. Zhu B, Sun Y, Sievers RE et al: L-arginine decreases infarct size in rats exposed to environmental tobacco smoke. *Am Heart J* 1996; 132: 91-100
41. Weintraub WS: Cigarette smoking as a risk factor for coronary artery disease. In: Diana JN (ed). *Tobacco smoking and atherosclerosis*. Plenum Press, New York, 1990; 27-35
42. Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR et al: Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 1993;44:395-418
43. Berglund U, Wallentin L, Schenck H: Platelet function and plasma fibrinogen and their relations to gender, smoking habits, obesity and beta blocker treatment in young survivors of myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis* 1988; 60: 21-4
44. Chao FC, Tullis JL, Alper CA et al: Alterations in plasma proteins and platelet functions with aging and cigarette smoking in healthy men. *Thrombosis and Haemostasis* 1982; 47: 259-65
45. Davis JW, Shelton L, Eigenberg DA: Effect of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. *Clin Pharmacol Ther* 1985;37:529-33
46. Dawis JW, Sheltan L: Passive smoking affects endothelium and platelets. *Arch Intern Med* 1989; 149: 386-9
47. Belch JJJ, Mc Ardle BM, Burns P: The effects of acute smoking on platelet behavior, fibrinolysis and hemorrheology in habitual smokers. *Thrombosis and Haemostasis* 1984; 51: 6-8
48. Rival J, Riddle JM, Stein PD: Effects of chronic smoking on platelet function. *Thromb Res* 1987; 45: 75-9
49. Erikssen J, Hellem A, Stormorken H: Chronic effect of smoking on platelet count and platelet adhesiveness in presumably healthy middle aged men. *Thrombosis and Haemostasis* 1977; 38: 606-11
50. Pittilo RM, Clarke JM, Harris D et al: Cigarette smoking and platelet adhesion. *Br J Haematol* 1984; 58: 627-32