

Çinkodan Zengin Diyetin, Sigara Dumanı Maruziyetindeki Sıçan Mesane

Dokusu Sitokin Profiline Etkisi

The Effect of Zinc Rich Diet to the Cytokine Profile in the Rat Bladder on Cigarette Smoke Exposure

Elçin Hakan Terzi¹, Aysel Kükner¹, Hatip Aydın², Mehmet Emin Özyalvaçlı³, Tülin Fırat¹, Uğur Üyetürk³

¹İzmit Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Bolu

²Zeynep Kamil Kadın Doğum Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü İstanbul

³İzmit Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı Bolu

Özet

Amaç: Sigara içimi akciğer, larinks, özefagus, mide, mesane ve böbrek kanserleri ile kronik hastalıkların sebebidir. Sitokinler, inflamasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde önemlidirler. Sigara, çinko eksikliği sebebidir. Çinko, antioksidan olup serbest radikallerin zararlarından hücreleri korur. Çalışmamızda sigara dumanına maruz bırakılarak çinkodan zengin diyet ile beslenen sıçanların mesane dokusundaki TLR 2, TLR 4, Nükleer faktör kappa B, İnterlökin 1β ve İnterlökin 10 ekspresyonuna etkisi incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada 24 adet erişkin erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Birinci grup normal, 2. grup ise çinkodan zengin diyetle beslendi. Üçüncü ve 4. gruplar sigara inhalasyonu yapılan gruplar olup sırasıyla normal ve çinkodan zengin diyetle beslenen gruplardı. Deney sonunda alınan mesane dokuları histolojik olarak değerlendirildi. Kalan doku örnekleri ise Real time polymerase chain reaction yöntemi ile sitokin ekspresyonları gösterilerek değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmadaki hiçbir grup mesane epitelinde değişiklik izlenmemiştir. Sigara verilen grupta sadece düz kas yapılarında tabakalar arasında ödem ve bazı alanlarda yoğun inflamatuvar hücreler ile bu alanlarda hemoraji ve konjesyona rastlanılmıştır. Çinkodan zengin diyetle beslenen denekler de ise inflamatuvar hücrelere, konjesyona ve ödeme daha az rastlandı. Tüm sıçan gruplarının mesane dokularında sitokin ekspresyonları ikili olarak karşılaştırılarak sigaraya maruz kalmış sıçanlarda çinko almayan ve çinko alan sıçanlar için NF-κB2 geni için anlamlı farklılık bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak sigara maruz kalan sıçanlarda çinko kullanımının anlamı bir şekilde NF-κB2 ekspresyonunu artışına neden olması, çinkonun sigaraya bağlı gelişen mesane kanserlerinde kanserli hücre apoptozunu arttırarak tedaviye katkı yapabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sigara Dumanı Maruziyeti, RT-PCR, Çinko, NF-κB2.

Abstract

Objective: Cigarette smoking causes lung, larynx, esophagus, stomach, bladder and kidney cancers and chronic diseases. Cytokines are important in initiating and maintaining inflammation. Smoking is the cause of zinc deficiency. Zinc is an antioxidant and protects cells from free radical damage. In our study, it was aimed to investigate the effect of cigarette smoke exposure on expression of Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, nuclear factor kappa B, interleukin 1β and interleukin 10 in the bladder tissue of rats fed with zinc rich diet.

Method: In this study 24 adult male Wistar-Albino rats were used. The rats were divided into 4 groups. First group was fed with normal diet, the 2nd group was fed with zinc rich diet. Third and 4th groups were exposed to cigarette inhalation and fed with normal and zinc rich diet respectively. The bladder tissues were taken at the end of the experiment and evaluated histologically. The remaining tissue samples were evaluated by the method of Real time polymerase chain reaction to show cytokine expression.

Results: No changes in urinary bladder epithelium was observed in all study groups. Edema and inflammatory cells in the smooth muscle layers with intense hemorrhage and congestion were observed in cigarette smoke given group. Less inflammatory cells, congestion and edema have been found in the rats fed with zinc rich diet. Cytokine expression in bladder tissue of all groups of rats compared in pairs and significant difference was found for the NF-κB2 gene in zinc rich supplemented and normally supplemented rats exposed to cigarette smoke.

Conclusion: As a result, a significant increase in expression of NF-κB2 caused by the use of zinc in rats exposed to cigarette smoke suggests that zinc can contribute the treatment of bladder cancer due to smoking by increasing cancer cell.

Keywords: Cigarette smoke exposure, RT-PCR, Zinc, NF-κB2.

Giriş

Sigara, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan tütünün bir formudur. Buna bağlı olarak sigara kullanımı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en ciddi mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olarak dikkatleri çekmektedir (1,2). Ülkemizde de yılda ortalama olarak 100.000 kişi sigaraya bağlı hastalıklar nedeniyle

ölmektedir. Önlem alınmazsa 2025 yılında ölümlerin sayısı 250.000 e çıkacaktır (3). Sigara dumanı 7000 den fazla kimyasal içerir ve bunların en az 69 adedi arsenik, kadmiyum, benzen ve benzopirene içerir temel hastalıklar la olan ilişkisi bilinen kanserojenler ile çok sayıda toksik maddeleri barındırır (4-6). Sigara içi-



minin akciğer, ağız, larinks, özefagus, mide, mesane ve böbrek kanserleri ile koroner kalp hastalıkları, solunum yolu infeksiyonları gibi ciddi sağlık sorunlarının nedeni olduğu tespit edilmiştir (7,8). Bazı epidemiyolojik çalışmalarda sigara içiminin mesane kanseri gelişimi riskini 2-4 kat arttırdığı gösterilmiştir (9). Sigara dumanındaki mesane kanserlerine neden olan en önemli etken aromatik aminlerin N-Nitroso bileşikleri (NOCs) olduğu bilinmesine rağmen kanserojen mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (10,11). Bölgeler arasında farklılıklar olmakla beraber erkeklerde tüm kanser türlerinin %4,5'ünü ve kadınlarda %1,5'ünü oluşturan mesane kanseri üriner sistemin en sık görülen kanserlerinden biridir (12).

Sigara inflamasyon etkenlerinin artmasına ve aktifleşmesine neden olmaktadır, karsinogenezis dışında mesane ve testis dokularında da değişik toksik etkileri bilinmektedir. Sitokinler, inflamasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. Sitokin ve sitokin aktivitelerinin belirlenmesi hastalık evresi, rezolüsyon süreci ve hastalık evresine spesifik tedavi konusunda değerli bilgiler sağlamaktadır (13,14).

Sigara içenlerde ve kronik hastalığı olanlarda çinko eksikliğinin olduğu bilinmektedir. Çinko, bağışıklık sistemini güçlendirir ayrıca çinkonun antioksidan özelliği olup serbest radikallerin sebep olduğu zararlardan hücreleri korumaya yardım eder (15). Ancak sigaranın etkilerine karşı çinkodan zengin diyet ile yapılmış çalışmalar az sayıda olup bu konuda sınırlı bilgiler bulunmaktadır.

Bu çalışmada sigara dumanına maruz bırakılan ve çinkodan zengin diyet ile beslenen sıçanların mesane dokusundaki inflamasyona neden olan sitokinlerden Toll-like reseptör 2 ve 4 (TLR 2, TLR 4), Nükleer faktör kappa B (NF-κB), İnterlökin (IL) 1β ve IL-10 ifadesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışma için yerel deney hayvanları etik kurulunun onayı alınmıştır. Çalışmada toplam 24 adet 250-300 gr ağırlığında erişkin erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar normal laboratuvar koşullarında ad libitum beslendi. Her

grupta altı sıçan olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

Grup 1; Herhangi bir işlem uygulanmayan, normal koşullarda beslenen kontrol grubu,
Grup 2; Herhangi bir işlem uygulanmayan, normal koşullarda çinkodan zengin diyet ile beslenen grup,

Grup 3; 12 hafta süreyle günde 3 kez 2 adet sigara (Uzun Samsun marka) dumanına maruz bırakılıp normal diyet ile beslenen grup,

Grup 4; 12 hafta süreyle günde 3 kez 2 adet sigara (Uzun Samsun marka) dumanına maruz bırakılıp çinkodan zengin diyet ile beslenen grup olarak düzenlendi.

Çinkodan Zengin yemin hazırlanması

Çinko içeriği normal diyetinde 22 mg/kg, çinkodan zengin gruplarda 150 mg/kg olacak şekilde hazırlandı.

Sigara dumanına inhalasyon düzeneği

Sıçanlara sigara dumanına maruz bırakmak için ebatları 50x35x36 cm, kalınlığı 0.5 mm ve iç hacmi yaklaşık 0.060 m³ olan cam kabin hazırlanarak silikon ile izole edildi. Kabin içine bir ucu dışarıda akvaryum motoruna bağlı olan plastik boru yerleştirildi. Sigara dumanını soluyacak olan sıçanlar cam kabin içine alındı ve plastik borunun kabin içindeki ucuna her uygulamada iki adet yanan sigara takılıp motor ile püflandı. Bir sigaranın yanma süresi yaklaşık 7 dakika olup iki sigara arasında 5 dakikalık normal hava soluma süresi bırakıldı. Bu işlemler 12 hafta boyunca tekrarlandı. Bu süre sonunda sıçanlara 50 mg/kg ketamin hidroklorid ve 20 mg/kg ksilazin verilerek anestezi altında ötanazi uygulanarak mesane doku örnekleri alındı.

Histolojik değerlendirme ve Real-Time PCR yöntemi

Doku örneğinin bir kısmı % 10'luk formaldehid ile tespit edildi ve takip işlemlerinden sonra parafin bloklar elde edilerek Hematoksilin-Eozin boyaması ile genel doku inflamasyon, ödem, konjesyon, kanama açısından değerlendirildi. Mesane dokularının kalan kısmı -80 derecede, Real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile TLR2, TLR4, NF-κB, İnter-

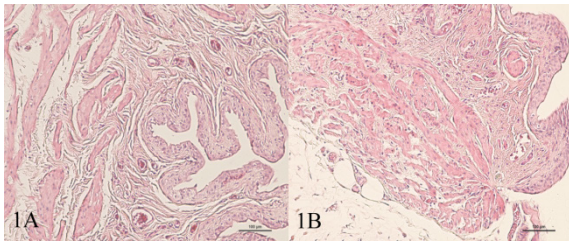


lökün (IL) 1 β ve IL-10 ekspresyonları gösterilmek üzere saklandı.

Mesane dokularından RNA izolasyon kiti (Pure-Link mRNA Mini Kit, Ambion, USA) ve High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystem, Amerika) kullanılarak cDNA'ları elde edildi. Çalışmaya alınan sıçanlarda TLR2, TLR4, TNF, IL1, IL10, NF- κ B 1 NF- κ B 2 genleri için tasarlanan özgül primer çiftleriyle genlerin ifade düzeyleri ölçüldü. Gen ifadelerinin karşılaştırılması amacıyla sıçanlarda sabit düzeyde ifade olduğunu bildiğimiz genlerden ACTB geni kontrol olarak seçilerek ekspresyon düzeyi bakıldı. Gen ekspresyonlarını değerlendirmek için Taqman Gene assay kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, Real Time PCR (7500 Real Time PCR Sistemi, Applied Biosystem, USA) Taqman Gene Expression Master Mix protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen gen ekspresyon düzeyleri Livak ve ark. belirttiği şekilde C_t Mean, ΔC_t Mean, $\Delta\Delta C_t$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri tek tek hesaplanarak değerlendirildi (16). İfade düzeylerinin istatistiksel analizleri SPSS 16 programı ile Mann-Whitney U yöntemi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

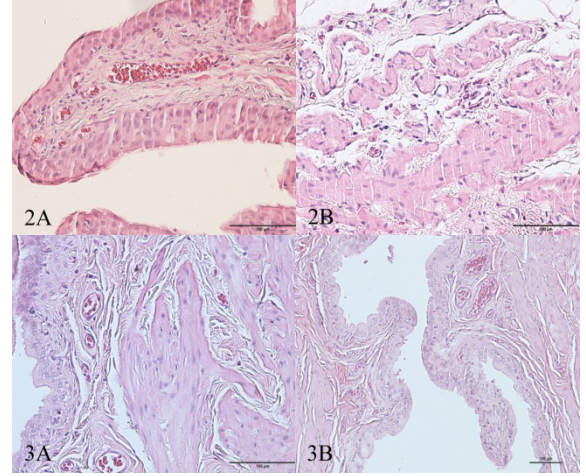
Bulgular

Doku kesitleri histolojik olarak değerlendirildiğinde; normal ve çinkodan zengin diyetle beslenen sıçan mesane dokularında herhangi bir değişiklik izlenmeyip normal histolojik yapı görüldü (Şekil 1).



Sigara verilen grupta ise mesane epitelinde metaplazik değişiklikler izlenmedi normal yapı tespit edildi. Düz kas grupları arasında ödem ve bazı alanlarda yoğun inflamatuvar hücreler izlenmiş olup bu alanlarda hemoraji ve konjesyona görüldü (Şekil 2). Çinkodan zengin diyetle beslenen denekler de ise inflamatuvar hücrelere ve konjesyona daha az rastlandı. Ayrıca kas

lifleri daha düzenli olup kas tabakaları arasındaki ödem daha az görüldü (Şekil 3).

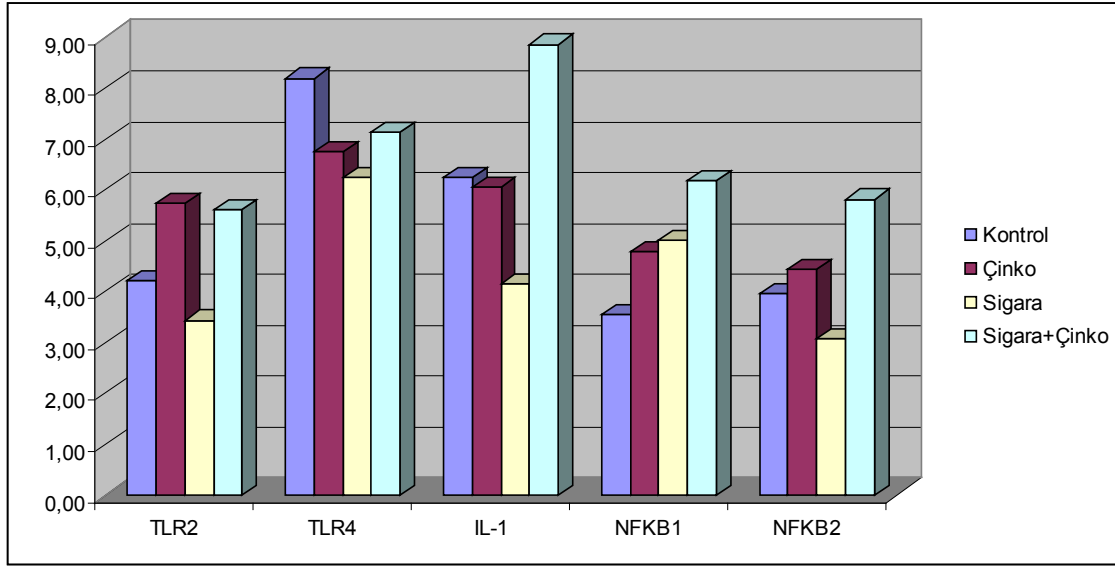


Tüm sıçan gruplarının mesane dokularında TLR2, TLR4, IL-1, NF- κ B1 ve NF- κ B2 ekspresyonları değerlendirildi. IL-10 için yeterli sayıda sıçanda ekspresyon elde edilemedi. Her gen için gruplar tek tek karşılaştırıldığında, değerlendirilen genlerin tüm gruplar arasında anlamlı olmadığı saptandı (sırasıyla, $p = 0.280, 0.426, 0.320, 0.627, 0.134$). Ancak, sigaraya maruz kalmış çinko alan ve çinko almayan sıçanlar karşılaştırıldığında, NF- κ B2 geni için anlamlı farklılık bulunurken ($p = 0.024$), IL-1 için istatistiksel anlamlılığa yakın olduğu ($p = 0,067$) saptandı. Çalışmadaki gen ekspresyonlarının ortalaması Grafik 1'de ve ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri Grafik 2'de gösterilmektedir.

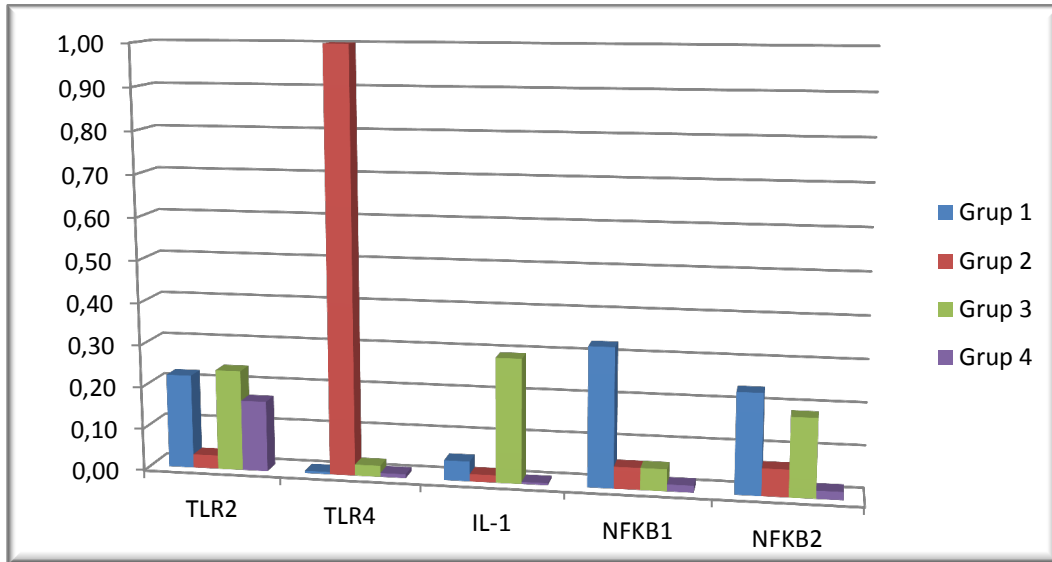
Tartışma

Sigara, erken ölümler ve önlenilebilir hastalıkların en önemli sebebidir (17). Sigara kullanmayan kişilerin sigara içilen ortamdaki havayı soluması pasif içiciliktir. Buna en çok eş, çocuklar ve arkadaşlar maruz kalmaktadır. İçen çekilen dumanın dışarıya üflenmesi ve sigara ucundan çıkan yan duman ortamdaki sigara dumanı kaynaklarıdır. Yan duman eksik yanmadan dolayı ana dumandan daha kirli ve toksiktir. Ülkemizdeki sigaraya bağlı ölümlerin en az %15 i pasif sigara içimine bağlıdır (3, 18).

Sigara kullanımına bağlı olarak artan oksidatif stres, normal dokuların fonksiyonlarını bozarak hasara sebep olmaktadır (19).



Grafik 1. Deneydeki farelerin gruplara göre TLR2, TLR4, IL-1, NFKB1 ve NFKB2 gen ifadelerinin birbirlerine göre değişim farklarının gösterimi



Grafik 2. Deneydeki farelerin gruplara göre TLR2, TLR4, IL-1, NFKB1 ve NFKB2 gen ifadelerinin $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerlerinin hesaplanması ile elde edilen ortalamaların birbirlerine göre değişim farklarının gösterimi

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki oksidatif strese bağlı hasarlanmalar kanserin gelişimindeki faktörlerden biri olabilir ve oksidasyonu azaltmak mesane kanserinin oluşumunu engelleyebilir (20). Bu durum antioksidant sistemi oluşturan enzimlerin yapısında bulunan elementlerin oksidatif hasarın azaltılmasına katkı sağlayabileceğini ve kansere karşı koruyucu bir etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir (21, 22). Çinko oksidan-antioksidan özellikleri olan bir elementtir. Yapılan bazı çalışmalarda çinkonun, akut ve kronik olarak allerjenlere maruz

kalan farelerde eozinofil ve lenfosit sayısını azalttığı saptanmıştır. Havayolu epitelinde çinko eksikliği oksidatif stresi ve sitokin uyarımlı hücre ölümünü tetikler ve respiratuvar silya titreşimini azaltır. Sigaranın ortaya çıkardığı etkilere karşı çeşitli antioksidan maddeler kullanılmıştır (15). Bizde yaptığımız çalışmada sigara ile beraber çinkodan zengin diyetin dokudaki inflamatuvar hücre sayısını azalttığını tespit ettik.

Nükleer faktör kappa B sigara dumanının etkilerini düzenleyen transkripsiyon faktörü olarak

bilinir. Daha önceki çalışmalar sigara içicilerinin bronşiyal biyopsilerinde Nükleer faktör kappa B artışı göstermiştir (23). Mesane kanserinde de apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (24).

Çalışmamızda gruplar arasında NF-kB1 ifadesi açısından herhangi bir farklılık bulunmazken, sigara maruziyeti olan sıçanlarda çinko tedavisine bağlı olarak NF-kB2 ifade düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmaktaydı. Sigaraya maruz kalmayan sıçanlarda çinko takviyesi NF-kB2 herhangi bir etkiye neden olmazken, sigara maruz kalan sıçanlarda çinko kullanımı anlamlı bir şekilde NF-kB2 ifade düzeyinin artışına neden olmaktadır. Bu veri bizlere sigaranın mesane üzerindeki zararlı etkilerini azaltmak için çinko kullanımının koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sigara kullanıcılarında çinko kullanımıyla NF-kB2 ifade düzeyinin artışı, bize mesane tümörlerinde çinko kullanımının apoptoz artışını desteklemesi nedeniyle tedavide bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

İnterlökin 1 (IL-1) , kuvvetli inflamatuvar aktivitesi olan çok fonksiyonlu bir sitokindir. IL 1β çok çeşitli biyolojik aktivitesi olan proinflamatuvar bir sitokindir (25). Yapılan bazı çalışmalarda sigaranın IL-1'i baskılaması nedeniyle inflamasyonu azalttığı bildirilmektedir (26). Çalışmamızda özellikle sigara içen grupta sigara kullanan ve çinko verilen gruba göre IL-1 seviyesinin azaldığını görmekteyiz. Bu çinkonun ile beraber sigaraya maruz bırakılan grupta ise IL-1 seviyesinin belirgin bir şekilde artmasının bize çinkonun koruyucu etkisini düşündürmektedir. Ancak histolojik olarak 3. grup mesane dokularında artan inflamatuvar hücrelerin tedavi grubunda görülmemesi inflamasyonun IL-1 kaynaklı olmadığını desteklemektedir.

Toll-like reseptörleri, katalitik olmayan reseptörler grubunun bir üyesidir (27). TLR-2 monositler/makrofajlar, myeloid dendritik hücreler, mast hücrelerin yüzeyinde yer alırken TLR-4 bu hücrelerin yanısıra, bağırsak epitel hücrelerinde de yer alır. İnvaziv patojenlerin belirlenmesinde ve inflamatuvar hastalıklarda kritik öneme sahiptirler. TLR aktivasyonu sitokin, kemokin ve interferon ya da proteaz, defensin, kollektin, lizozim, laktoferrin gibi doğal bağışıklık mole-

küllerinin harekete geçmesini sağlar (28). Sigara maruziyeti ve/veya çinko kullanımının TLR gen ifadeleri açısından istatistiksel bir anlamlı değişime neden olmadığını belirledik.

Çalışmamızda gruplar arasında TLR-2, TLR-4 ve NF-kB1 ekspresyonlarında herhangi bir anlamlı değişiklik saptamadık. Fazla sayıda denek kullanılarak, sigara dumanına maruziyet dozu ve süresi uzun tutularak yapılacak olan çalışmalar ile sigaranın epitel doku ve sitokin profili üzerine oluşturduğu değişiklikler konusunda daha fazla bilgi elde edilmesi sağlanacaktır.

Sonuç olarak sigaraya maruz kalan sıçanlarda, çinkodan zengin beslenmenin apoptozisin artmasına etki eden NF-kB2 ekspresyonu tespit edilmiştir. Sigaraya bağlı gelişebilecek mesane kanserlerinde hücre apoptozunu arttırarak tedaviye katkı için çinkonun kullanılabilirliği kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. World Health Organization. Tobacco: Deadly in Any Form or Disguise. Geneva: World Health Organization; 2006. [accessed: July 13, 2007]. <http://www.who.int/tobacco/communications/events/wntd/2006/Tfi_Rapport.pdf>.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Smoking attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses—United States, 2000–2004. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2008;57(45):1226–8
3. Uluslararası Katılımlı Üçüncü Sigara veya Sağlık Ulusal Kongresi Sonuç bildirgesi 1 Aralık 2006 ANKARA <http://www.tutunsuzyasam.org/dosya/SonucBildirgesi.doc>
4. International Agency for Research on Cancer [IARC] 2004
5. Rodgman A, Perfetti TA. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Boca Raton (FL): CRC Press Taylor & Francis Group; 2009
6. US Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta (GA). 2010.
7. US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of



- the Surgeon General. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2004.
8. Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol.* 2013 Dec;26(4):447-51. doi: 10.1293/tox.2013-0039.
9. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, and Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 306: 737–745. 2011.
10. Ward EM, Sabbioni G, DeBord DG, Teass AW, Brown KK, Talaska GG, Roberts DR, Ruder AM, and Streicher RP. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst.* 88: 1046–1052. 1996
11. Lesmes GR, Donofrio KH. Passive smoking: the medical and economic issues. *Am J Med.* 1992 Jul 15;93(1A):38S-42S.
12. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2010 Dec 15;127(12):2893-917. PubMed PMID: 21351269. Epub 2011/02/26.
13. Hebda PA, Piltcher OB, Swarts JD, Alper CM, Zeevi A, Doyle WJ. Cytokine profiles in a rat model of otitis media with effusion caused by eustachian tube obstruction with and without *Streptococcus pneumoniae* infection. *Laryngoscope.* 2002 Sep;112(9):1657-62.
14. Mortaz E, Lazar Z, Koenderman L. Cigarette smoke attenuates the production of cytokines by human plasmacytoid dendritic cells and enhances the release of IL-8 in response to TLR-9 stimulation *Respiratory Research* 2009 *Respir Res.* 2009 Jun 10;10:47.
15. Lang C, Hansen M, Roscioli E. Dietary zinc mediates inflammation and protects against wasting and metabolic derangement caused by sustained cigarette smoke exposure in mice. *Biometals.* 2011 Feb;24(1):23-39
16. Livak KJ, Schmittgen TD., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
17. Fielding JE. Smoking: health effects and control (1). *N Engl J Med.* 1985 Aug 22;313(8):491-8
18. Lesmes GR, Donofrio KH. Passive smoking: the medical and economic issues. *Am J Med.* 1992 Jul 15;93(1A):38S-42S.
19. Salganik RI, Solovyova NA, Dikalov SI, Grishaeva ON, Semenova LA, Popovsky AV. Inherited enhancement of hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in the S strain rats results in DNA rearrangements, degenerative diseases, and premature aging. *Biochemical and biophysical research communications.* 1994 Mar 15;199(2):726-33.
20. Akcay T, Saygili I, Andican G, Yalcin V. Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. *Urologia internationalis.* 2003;71(3):271-4.
21. Mao S, Huang S. Zinc and copper levels in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biological trace element research.* 2013 Jun;153(1-3):5-10.
22. Mazdak H, Yazdekhesti F, Movahedian A, Mirheshti N, Shafieian M. The comparative study of serum iron, copper, and zinc levels between bladder cancer patients and a control group. *International urology and nephrology.* 2010 Mar;42(1):89-93.
23. Preciado D, Lin J, Wuertz B. Cigarette Smoke Activates NFκB and Induces Muc5b Expression in Mouse Middle Ear Cells Laryngoscope. 2008 March; 118(3): 464–471.
24. Zhang GJ, Zhang Z. Effect of Bcl-2 on apoptosis and transcription factor NF-κB activation induced by adriamycin in bladder carcinoma BIU87 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(4):2387-91
25. Hamajima N, Katsuda N, Matsuo K, Saito T, Ito LS, Ando M, Inoue M, Takezaki T, Tajima K. Smoking habit and interleukin 1B C-31T polymorphism. *J Epidemiol.* 2001 May;11(3):120-5.
26. Ouyang Y, Virasch N, Hao P, et al. Suppression of human IL-1β, IL-2, IFN-γ, and TNF-α production by cigarette smoke extractions. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 280-287.
27. Hansson GK, Edfeldt K (2005). "Toll to be paid at the gateway to the vessel wall". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (6): 1085–7.
28. Unless else specified in boxes then ref is: Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Paperback: 384 pages. Publisher: Lippincott Williams & Wilkins; (July 1, 2007). Language: English. ISBN 0781795435. ISBN 978-0781795432. Page 17.

