

## Laporan Hasil Penelitian

# GAMBARAN HISTOPATOLOGI VENTRIKEL KIRI TIKUS YANG DIBERI PAPARAN ROKOK ELEKTRIK (ENDS) DAN KONVENTSIONAL

Yanuarita Tursinawati<sup>1</sup>, Noor Yazid<sup>2</sup>, Findi Wira Purnawati<sup>3</sup>

1),2),3) Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang

*Submitted : March 2017 / Accepted : June 2017 / Published : July 2017*

### ABSTRACT

Electric cigarette (ENDS) and conventional contains carbon monoxide (CO) are major causes of cardiovascular disease. CO is a dangerous substance due to act as free radicals. In addition, the high affinity of hemoglobin by CO could lead to tissue hypoxia resulting in cell death (necrosis) started by the cell nucleus pyknosis. In order to further study about the effect, this experiment is conducted to identify the histopathological appearance of the left ventricle rat against exposure to electric cigarette (ENDS) and conventional. This study was conducted with a post-test only control group design method. Samples contained 18 *Rattus norvegicus* rat which was divided in 3 groups: control group (K) as a negative control, P1 group were exposed by conventional cigarettes, and P2 group were exposed by ENDS. The treatment had been maintained for 30 days, followed by termination to perform the heart organ dissection and HE staining in order to make preparat. Preparat was observed by 400x lens of microscope to identify the pyknosis of the nuclei in 5 field of view. Data were analyzed with One-way ANOVA test with  $p < 0.05$  and CI=95%. This study revealed that there was a significant difference of pycnotic nuclei amount among the group ( $p$ -value=0.008). There was significant difference between group K with P1 ( $p=0.004$ ), group K with group P2 ( $p=0.012$ ). However, there was no significant difference between group P1 and P2 ( $p=0.567$ ). We concluded that exposure to either electric cigarette (ENDS) or conventional cigarette gave significant effect to cell nucleus pycnosis. However, there was no significant difference of effect between exposure of electric cigarette smoke (ENDS) and conventional cigarette.

**Keywords** : histopathological appearance of left ventricle, electrical cigarette, ENDS, conventional cigarette

**Correspondence to** : yanuarita.tursinawati11@gmail.com

### ABSTRAK

Rokok elektrik (ENDS) dan konvensional mengandung karbon monoksida (CO) yang diduga berperan utama menyebabkan penyakit kardiovaskuler. CO merupakan zat yang berbahaya karena sebagai radikal bebas dan sifatnya yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap hemoglobin. Hal ini dapat menyebabkan hipoksia jaringan yang mengakibatkan kematian sel (nekrosis) ditandai dengan inti sel yang piknosis. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi gambaran histopatologi ventrikel kiri tikus terhadap paparan rokok elektrik (ENDS) dan konvensional. Penelitian ini merupakan penelitian

eksperimental dengan rancangan post-test only control group design. Sampel adalah tikus Rattus norvegicus dengan jumlah 18 ekor dibagi dalam 3 kelompok, yakni kelompok K sebagai kontrol negatif, kelompok P1 diberikan paparan rokok konvensional dan kelompok P2 diberikan paparan rokok elektrik (ENDS). Sampel diperlakukan selama 30 hari, kemudian diterminasi untuk pengambilan organ jantung dan dibuat preparat dengan pengecatan HE. Pembacaan preparat dengan mikroskop perbesaran 400x untuk melihat inti sel piknotik pada 5 lapang pandang. Data dianalisis menggunakan uji One-way ANOVA dengan  $p<0,05$  dan CI=95%. Dari hasil penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna jumlah inti sel piknotik pada ketiga kelompok ( $p\text{-value}=0,008$ ). Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K dan P1 ( $p=0,004$ ), kelompok K dan P2 ( $p=0,012$ ). Namun antar kelompok P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,567$ ). Paparan rokok elektrik dan konvensional memiliki efek yang signifikan dibanding kontrol terhadap jumlah inti piknotik. Namun, jumlah inti sel piknotik ventrikel kiri tikus tidak mengalami perbedaan bermakna antara paparan asap rokok elektrik (ENDS) dan konvensional.

**Kata kunci** : Histopatologi ventrikel kiri, rokok elektrik, ENDS, rokok konvensional.

**Korespondensi** : yanuarita.tursinawati11@gmail.com

## PENDAHULUAN

Merokok dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas penyakit kardiovaskuler. Perokok aktif memiliki resiko 80% kemungkinan terkena penyakit jantung koroner, sedangkan perokok pasif yang terpapar 1/100 asap dari perokok aktif memiliki resiko 30 % (Ambrose & Rajat, 2004; Law et.al, 1997). Asap rokok mengandung 4000 jenis bahan kimia berbahaya yang pada rokok konvensional terdapat pada dua fase dalam penggunaannya, yakni fase gas dan fase partikel. Pada fase gas mengandung  $>10^{15}$  radikal bebas/ hisapan yang terdiri dari karbon monoksida, nitrogen oksida, nitrosamin, nitrosopirolidin, formaldehid, piridin. Sedangkan pada fase partikel mengandung  $>10^{17}$  radikal bebas/g yang terdiri dari benzopirin, nikel, arsen, nikotin, fenol dan tar (Pryor & Stone, 1993; Putra, 2015). Karbon monoksida pada rokok konvensional diduga berperan utama menyebabkan

penyakit kardiovaskuler dan merupakan zat yang berbahaya karena sebagai radikal bebas dan sifatnya yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap hemoglobin (Hb) membentuk COHb (Zevin, 2001). Saat terjadi pertukaran oksigen di paru-paru, oksigen akan kalah berikatan dengan Hb. Jika jumlah COHb lebih banyak beredar pada pembuluh darah, yang dimana dari paru-paru, aliran darah akan berlanjut ke jantung melalui ruang atrium dan ventrikel kiri, CO dapat menyebabkan sel-sel pada organ jantung mengalami kekurangan oksigen yang dapat menyebabkan kematian sel. Kematian sel dapat berupa nekrosis ataupun apoptis yang salah satunya ditandai dengan perubahan inti sel yang mengalami piknosis yakni proses kerusakan pada inti sel menjadi padat atau kental dan ukurannya mengalami penyusutan. Inti yang mengalami piknosis disebut dengan piknotik (Kumar, 2007; Oktavianis, 2011; Anggraeni, 2009).

Rokok elektrik yakni Electronic Nicotine Delivery System (ENDS) atau e cigarette merupakan teknologi rokok yang mulai dipasarkan di Cina di tahun 2003 yang berupa alat dioperasikan dengan baterai yang berisi nikotin cair dengan bahan pelarut propilen glikol, dietil glikol ataupun gliserin yang bila dipanaskan akan menghasilkan nitrosamin dan menghasilkan CO pada asapnya (Tanuwihardja & Susanto, 2012; Vansickel et.al, 2010). Banyak masyarakat beranggapan bahwa ENDS lebih baik bila dibandingkan dengan rokok konvensional. Penelitian oleh Varlet et al, 2015 membuktikan bahwa aerosol rokok elektrik tetap mengandung zat berbahaya namun 450 lebih rendah daripada rokok konvensional.

Berdasarkan uraian tersebut dan oleh karena sepengetahuan kami belum adanya penelitian mengenai perbedaan gambaran histologi ventrikel kiri antara rokok konvensional dan rokok elektrik, penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai gambaran histologi otot jantung ventrikel kiri tikus Rattus norvegicus terhadap paparan rokok elektrik (ENDS) dan rokok konvensional.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian post test only control group design. Populasi dari penelitian adalah tikus Rattus norvegicus jantan yang berjumlah 18 ekor dan memenuhi kriteria inklusi yaitu sehat dan aktif sebelum perlakuan, umur 3-4 bulan, berat badan 150–250 gram yang dipilih secara simple random sampling. Rokok yang digunakan merk Tuton SPR, dan rokok ENDS merk Aspire, refil rasa lychee merk Tropican Liquid 55 mL 3 mg nikotin. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, meliputi kelompok

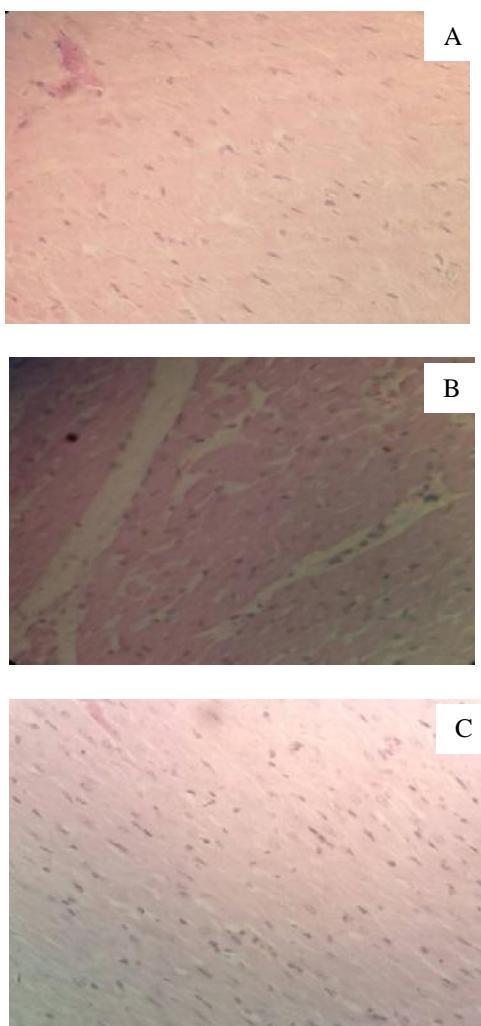
kontrol (K), Kelompok perlakuan I (P<sub>1</sub>) tikus Rattus norvegicus yang diberikan pakan standar, air minum, dan paparan asap rokok konvensional dengan dosis 5 batang dalam 2x pemaparan per hari. Kelompok perlakuan II (P<sub>2</sub>) tikus Rattus norvegicus yang diberikan pakan standar, air minum, paparan asap ENDS dengan dosis 3 ml dengan kandungan 3 mg nikotin dalam 2x pemaparan per hari. Pada hari ke-30, tikus diterminasi dengan cara dislokasi leher dan diambil organ jantungnya untuk dibuat preparat histologis dengan metode parafin dan pewarnaan HE. Setiap preparat diambil data dari 5 lapang pandang, kemudian data tersebut diakumulasikan dengan menghitung persentase kematian sel otot jantung. Berikut rumus penghitungan persentase kematian sel yang berupa inti sel piknotik (Dharmawan,2010).

$$\text{Kematian Sel (\%)} = \frac{\text{jumlah sel piknotik}}{\text{jumlah sel keseluruhan}} \times 100\%$$

Analisis data dengan menggunakan uji One-way Anova. Derajat kemaknaan yang digunakan adalah p ≤ 0.05 dengan interval kepercayaan 95%.

## HASIL PENELITIAN

Selama 30 hari perlakuan pada kelompok P2 terdapat 1 tikus yang mati karena kesalahan teknis. Pada kelompok lainnya tikus masih hidup sehingga jumlah total tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yaitu 17 ekor. Pada kelompok P2 tikus lebih aktif dibandingkan dengan kelompok P1. Gambaran histologi ventrikel kiri tikus Rattus norvegicus jantan sesuai kelompok terlihat pada Gambar 1 dimana didapatkan bahwa Kelompok P1 memiliki jumlah inti sel piknotik yang lebih banyak dari Kelompok K dan P



**Gambar 1.** Gambaran histologi inti sel otot jantung ventrikel kiri tikus *Rattus norvegicus* dengan perbesaran 400X a.kelompok kontrol. b.kelompok perlakuan1 (P1). c.kelompok perlakuan 2 (P2)

**Tabel 1.** Data Hasil Rata-Rata Kematian Sel Otot Jantung Ventrikel Kiri Analisis Univariat

Kelompok	Rata-rata	SD	Min.	Max.
K	9,93	1, 48	8,0 1	11, 87
P1	21,40	4, 00	15, 57	26, 31
P2	19,50	7, 72	14, 06	32, 90

Tabel 1, menunjukkan rata-rata dari jumlah inti sel piknotik yang terbentuk pada inti sel otot jantung ventrikel kiri

kelompok P<sub>1</sub> (21,40 ±4,00) merupakan yang tertinggi dibandingkan dengan K (9,93 ± 1,48) dan kelompok P<sub>2</sub> (19,50 ± 7,72).

**Tabel 2.** Hasil analisa nilai p-value One-way ANOVA dan Post hoc

Kelompok	p One-way ANOVA	Uji Post-hoc (p-value)		
		K	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
K	0,008		0,004	0,012
P <sub>1</sub>		0,004		0,567
P <sub>2</sub>		0,012	0,567	

Hasil uji dengan menggunakan uji One-way Anova didapatkan nilai p=0,008, sehingga dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari ketiga kelompok perlakuan dalam hubungannya dengan inti sel piknotik seperti yang tercantum pada tabel 2. Sedangkan kelompok yang memiliki beda signifikan yaitu antara kelompok K terhadap P<sub>1</sub> (p=0,004) dan K terhadap P<sub>2</sub> (p=0,012). Kelompok yang tidak berbeda signifikan yaitu kelompok P<sub>1</sub> terhadap P<sub>2</sub> (p=0,567).

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kelompok P<sub>1</sub> memiliki jumlah rata-rata lebih tinggi yaitu 21,40 dibandingkan dengan P<sub>2</sub> yaitu 19,50 sesuai dengan yang terdapat pada table 1. Pada kelompok P<sub>1</sub> yang dipapar rokok konvensional terbukti memiliki efek kematian sel yang lebih banyak dari kelompok P<sub>2</sub> yang dipapar ENDS meskipun secara statistik tidak bermakna. Hal ini dapat ditarik kesimpulan bahwa bahan yang dihasilkan oleh rokok konvensional lebih banyak dan lebih toksik.

Hal ini sejalan dengan penelitian Varlet et al, 2015 membuktikan bahwa aerosol rokok elektrik tetap mengandung zat berbahaya namun 450 lebih rendah daripada rokok konvensional. Bahkan penelitian terkini oleh Margham et al, 2016 menyebutkan bahwa tingkat emisi rokok elektrik 92-99% lebih rendah dibandingkan dari rokok konvensional.

Beberapa penelitian membuktikan bahwa kandungan rokok yang berbahaya bagi tubuh dan memiliki efek toksik langsung terhadap otot jantung adalah CO (Yoshida & Tuder, 2007; Leone et.al 2008; Farsalinos, 2013; Yamada et.al, 2009). Kerusakan otot jantung karena CO ini sebagai akibat dari hipoksia serta kerusakan pada tingkat sel (Satran et.al, 2005). Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa rokok konvensional dapat menyebabkan kematian sel yang berupa nekrosis dan apoptosis otot jantung melalui mekanisme stres oksidasi dan inflamasi (Bernhard & Wang, 2007; Zhang et.al,2002). CO merupakan radikal bebas eksogen yang akan menarik elektron dan dapat mengubah molekul menjadi suatu radikal karena bertambah atau hilangnya satu elektron pada molekul lain. Radikal bebas ini akan merusak molekul yang elektronnya ditarik oleh radikal bebas tersebut misalnya DNA, protein, dan lipid (Fitria, 2013). Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat sehingga terjadi kerusakan dan kematian sel tersebut (Armani et.al, 2009; Izzotti et.al, 2008). Afinitas hemoglobin terhadap CO sekitar 200 sampai 250 kali lebih kuat daripada afinitas terhadap oksigen membentuk COHb. Gas CO juga dapat mengganggu transport oksigen ke mitokondria otot pada lapisan miokardium dengan cara berikatan dengan mioglobin yang dapat menyebabkan stress oksidatif pada sel-sel otot organ jantung sehingga dapat menyebabkan kematian sel.

Kematian sel yang berupa nekrosis ataupun apoptosis tersebut ditandai dengan perubahan pada inti yang tipikal, yakni piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Inti yang mengalami piknosis akan menyusut, berwarna gelap, batas tidak teratur dan terjadi penggumpalan kromatin pada pengecutan Hematoksilin-Eosin (HE) menjadi basofilik. Pada tahap karioreksis, inti akan hancur menjadi fragmen-fragmen zat kromatin didalam sel dan akhirnya kromatin menjadi lisis dan disebut dengan kariolisis (Kumar, 2007). Dalam penelitian ini didapatkan hasil antara P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> tidak terdapat perbedaan secara signifikan. Terjadinya proses karioreksis dan kariolisis jika dilakukan pengecutan HE akan sulit dibedakan. Dari hasil pengamatan sekilas pada preparat seperti pada gambar 1, didapatkan bahwa lebih banyaknya inti sel yang mengalami karioreksis dan kariolisis pada kelompok P<sub>1</sub> dibanding P<sub>2</sub> meskipun dalam penelitian ini tidak dilakukan penghitungan.

Hal ini terjadi karena kelompok P<sub>1</sub> sudah lebih banyak inti sel yang mengalami kerusakan menjadi karioreksis dan kariolisis. Dari fakta tersebut, dapat disimpulkan kemungkinan bahwa inti sel piknotik pada kelompok P<sub>1</sub> sebenarnya lebih banyak dari kelompok P<sub>2</sub>, namun saat dilakukan pembacaan preparat sudah mengalami karioreksis dan kariolisis. Kemungkinan lainnya adalah karena masa pajanan yang singkat menjadi penyebab kuantitas kerusakan inti sel piknotik tidak berbeda antara kelompok yang dipapar asap rokok konvensional dan ENDS. Penelitian oleh Leone, 2008 menyebutkan bahwa nekrosis jaringan terjadi akibat pajanan kronik rokok. Perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> ini tidak sejalan dengan penelitian Farsalinos et al,

2013 yang membandingkan efek sitotoksik rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap kultur sel otot jantung. Dalam penelitian tersebut terbukti bahwa rokok elektrik secara signifikan kurang bersifat sitotoksik dibanding dengan rokok konvensional yang dilihat dari viabilitas kultur sel otot jantung.

Dalam penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar ketiga kelompok pada jumlah inti sel yang piknotik sesuai dengan tabel 1 yaitu nilai  $p=0,008$ . Perbedaan yang signifikan didapatkan antara kelompok K dengan perlakuan P<sub>1</sub> ( $p=0,004$ ) dan kelompok K dengan perlakuan P<sub>2</sub> ( $p=0,012$ ). Perbedaan ini terjadi disebabkan karena kelompok P<sub>1</sub> diberi paparan rokok konvensional dan kelompok P<sub>2</sub> diberi paparan ENDS yang mengandung zat kimia berbahaya, salah satunya yang paling berbahaya yaitu CO sehingga pembentukan jumlah inti sel yang piknotik lebih banyak dibandingkan kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian El Morsy, 2007 yang meneliti efek rokok konvensional pada tikus dimana didapatkan sitoplasma pada serat otot jantung yang terlihat samar atau ada yang bervakuola dan adapula yang terpulas asidofilik dengan inti yang piknotik. Penelitian tersebut juga membuktikan adanya kerusakan struktur serat cardiomiosit dan adanya daerah yang nekrosis. Dua gambaran utama sebagai hasil dari kerusakan sel jantung akibat merokok adalah nekrosis sel miokardia dan kardiomiopati akibat rokok (Leone, 2008).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Paparan rokok elektrik dan konvensional memiliki efek yang signifikan dibanding kontrol terhadap

jumlah inti piknotik. Namun, jumlah inti sel piknotik ventrikel kiri tikus tidak mengalami perbedaan bermakna antara paparan asap rokok elektrik (ENDS) dan konvensional. Sebagai saran, perlu diteliti dan dilakukan penghitungan terhadap inti yang karioreksis dan kariolisis.

## REFERENSI

- Ambrose, JA., Rajat, SB. (2014) The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 43(10), pp.1731-7.
- Anggraeni, N.I. S. (2009) *Pengaruh Lama Paparan Asap Knalpot Dengan Kadar CO 1800 PPM Terhadap Gambaran Histopatologi Jantung Pada Tikus Wistar*. [Tesis]. Semarang : Fakultas Kedokteran Univesitas Diponegoro.
- Armani C., Landini L., Jr, Leone A. (2009) Molecular and biochemical changes of the cardiovascular system due to smoking exposure. *Curr. Pharm. Des* vol.15, pp.1038–53. doi:10.2174/138161209787846973.
- Bernhard D., Wang X.L. (2007) Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases—Do anti-oxidative therapies fail?. *Curr. Med. Chem.* Vol.14, pp.1703–12. doi:10.2174/092986707781058959.
- Dharmawan, TP. (2010) *Uji Toksisitas Akut Monocrotaphos Dosis Bertingkat Per Oral Dilihat Dari Gambaran Histopatologis Otot Jantung Mencit BALB/C*. [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- El Morsy, A Amel, As Manal. (2007) Histological and Scanning Electron Microscopic Study of The Effect of Cigarette Smoke on The Heart of Male Albino Rats. *The Egypt J of Histo*. Vol.30(2), pp.409-18.
- Farsalinos , KE., Giorgio, R., Elena, A., Emiliano, R., Elena, B., Stefano, T et al. (2013) Comparison of the Cytotoxic Potential of Cigarette Smoke and Electronic Cigarette Vapour Extract on Cultured Myocardial Cells. *Int J Environ Res Public Health.* Vol.10(10), pp.5146–5162, doi:10.3390/ijerph1010516
- Fitria,Retno, T., Jubhar, CM., Ferry, FK.(2013) Merokok dan Oksidasi. *Sains Medika*. Vol.5(2), pp. 113-0.
- Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R., Degan P., Pennisi,T.M., Steele,V.E., De Flora S. (2008) Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA

- alterations in heart and aorta. *Mutat. Res.* Vol.644, pp.38–42. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.06.012.
- Kumar, V., Cotran, RS., Robbins, SL. (2007) Buku Ajar Patologi 7th ed, Vol. 2. Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Law, MR., Morris, JK., Wald, NJ. (1997) Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ*, vol.315, pp.973–80.
- Leone, A., Landini, L., Biagi, O., Balbarini, A. (2008) Smoking and cardiovascular system: cellular features of the damage. *Curr Pharm Des.* Vol.14(18), pp.1771-7.
- Margham, J., McAdam, K., Forster, M., et al. (2016) Chemical composition of an e-cigarette aerosol? a quantitative comparison with cigarette smoke. *Chem Res. Toxicol.* Vol.29(10), pp.1662-78, doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00188.
- Oktavianis. *Efek Pemberian Asap Rokok Terhadap Kehamilan Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. [Tesis]. (2011) Program Studi Ilmu Biomedik Pasca Sarjana Universitas Andalas, Padang.
- Pryor, WA., Stone, K., (1993) Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxy nitrate, and peroxy nitrite, *Ann NY Acad Sci*, Vol.686, pp.12–28
- Putra AS. (2015) *Perbandingan Efek Asap rokok konvensional dan rokok herbal terhadap kerusakan histologis paru mencit (Mus musculus)* [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Satran, D., Christopher, RH., Cheryl, A., Caren, IN., Yiscah, B., Timothy, DH. (2005) Cardiovascular Manifestations of Moderate to Severe Carbon Monoxide Poisoning. *J Am Coll Cardiol*, Vol.45(9), pp.1513-6.
- Tanuwihardja, RK., Susanto, AD. (2012) *Rokok Elektronik*. Jakarta: Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Vansickle, AR., Caroline, OC., Michael, FW., Thomas, EE. (2010) A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic “cigarettes”: nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol.19(8), pp.1945–53. Doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0288.
- Varlet, V., Farsalinos, K., Augsburger, M. et al. (2015) Toxicity assessment of refill liquids for electronic cigarettes. *Int J Environ Res Public Health*, vol.12, pp.479-685.
- Yamada, S., Zhang, X.Q., Kadono, T., Matsuoka, N., Rollins, D., Badger T., Rodesch, C.K., Barry, W.H. (2009) Direct toxic effects of aqueous extract of cigarette smoke on cardiac myocytes at clinically relevant concentrations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol.236. pp.71
- Yoshida, T., Tudor, RM. (2007) Pathophysiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev.* vol.87(3), pp.1047-82.
- Zevin S., Sandra, S., Steven, GG., Peyton, J., Neal, LB. (2001) Cardiovascular effect of carbon monoxide and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol.* Vol.38(6), pp.1633-8.
- Zhang J., Liu, Y., Shi, J., Larson, D.F., Watson, RR. (2002) Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress. *Exp Biol Med.* Vol.227, pp.823–9.