

Ratlarda Sigara Dumanının Retinal Toksisitesi (Yaşa Bağlı Maküla Dejeneresansı İçin Elektron Mikroskopik Model Çalışma)

Yavuz BARDAK¹, Osman ÇEKİÇ², Cengiz GÜVEN³, Hakkı TAŞTAN⁴

ÖZET

Sigara içme alışkanlığının yaşa bağlı maküla dejeneresansı (YBMD) riskini belirgin olarak artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, sigara dumanının rat retinasında yapmış olduğu ultrastrüktürel değişikliklerin saptanması ve YBMD için hayvan modeli geliştirilmesidir. 7 rat, sigara dumanına maruz bırakıldı. Ratların sigara dumanını solumaları için, Walton'un modifiye edilmiş sigara içme makinası kullanıldı. Kontrol grubundaki ratlar (n:7) normal oda havası soludu. Her ratın bir gözüne ait retinadan kesitler alınarak elektron mikroskobu ile incelendi. Sigara grubundaki ratların kan tiyosiyonat düzeyi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Yapılan elektron mikroskobu incelemesinde sigara grubunda; ganglion tabakasındaki hücrelerin sitoplazma organellerinde dejenerasyon, aksanlarda dejenerasyon büzüşme ve bunun sonucunda da endonöryumu tam olarak dolduramaması, fotoreseptör hücrelerinin uzantılarının dış segmentlerindeki disklerin dejenerasyonu ve diskler arasındaki mesafelerin açılması saptandı. Retina pigment epiteli tabakasında pigment dağılımında düzensizlik, depigmente ve pigment artışının izlendiği alanlar görüldü. Sonuç olarak; bu çalışma ile sigara dumanının retina üzerindeki toksik etkisi ince yapı düzeyinde ortaya kondu. Bağlantılı olarak, çalışmada ortaya konan modelin YBMD için bir model olabileceği fakat geliştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELEER : elektron mikroskobu, rat, sigara dumanı, yaşa bağlı maküla dejeneresansı

SUMMARY

RETINAL TOXICITY OF CIGARETTE SMOKE IN BATS (AN ELECTRON MICROSCOPIC MODEL STUDY FOR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION)

Cigarette smoking increaases the risk of age related macular degeneration (AMD). The aim of this study was to investigate the toxicity of cigarette smoke to rat retina and to davelop an animal model for AMD. Seven rats were exposed to cigarette smoke by using Walton's modified cigarette smoking machine. In control group, rats (n:7) inhaled the room air. Sections were taken from 1 eye of each rat for electron microscopy. Blood tiocyonate levels of the cigarette group were higher than

1. Yard.Doç.Dr.Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı .
2. Uz. Dr. SSK Ankara Göz Hastanesi.
3. Doç.Dr.Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalı.
4. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

control ($p<0.05$). In electron microscopy, the cigarette group revealed degeneration of cytoplasmic organelles in cells of the ganglion cell layer, axonal degeneration and shrinkage leading to not full-filling of the endoneurium, degeneration of discs at outer segment of photoreceptor cells' outer processes, depigmented and pigmented areas of the retina pigment epithelium layer, ununiform pigment distribution. In conclusion; this study showed the retinal toxicity of cigarette smoke at ultra structural level. In conjunction with it, this study can be an animal model for AMD but it should be improved further. **Ret-vit 1999; 7: 188-195.**

KEY WORDS : *electron microscopy, rat, cigarette, smoke, age-related macular degeneration .*

Sigara içimine bağlı olarak gelişen artmış oksidatif stresin bir çok oküler hastalığın patogenizinde rol aldığı ortaya konmuştur.¹⁻⁵. Sigara içme alışkanlığının yaşa bağlı neovasküler maküla dejeneresansı (YBMD) riskini belirgin olarak arttırdığı bildirilmiştir.²⁻⁵.

Diabetli olgularda, sigara kullanımının diabetik retinopati ve makülopati riskini yükselttiği bulunmuştur⁶⁻⁸. Sigara içenlerde karanlık adaptasyon süresinin uzadığı ve karanlıkta ışığı algılama duyarlılığının azaldığı belirlenmiştir⁹. Sigara içenlerde HbCO'nun %20'nin üstüne çıkması ile uyarılmış görsel potansiyellerin latansında ve amplitütünde patolojik bulguların ortaya çıktığı saptanmıştır¹⁰. Sigara kullanımının katarakt ile yakın ilgisi de belirlenmiştir^{11,12}.

YBMD, ileri yaş döneminde en önemli körlük nedenlerinden biridir¹³. YBMD'nin patogenezi tam olarak bilinmemekte¹⁴⁻¹⁷ ve etkin bir tıbbi tedavisi de bulunmamaktadır^{14,15, 18-20}. Sigara kullanımının yaşa bağlı maküla dejeneresansı için önemli bir risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur^{2-5, 21,22}. Tekrarlayan subretinal neovaskülarizasyonlarda da sigaranın önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir²³.

Bu çalışmanın amacı sigara dumanının rat retinasında yapmış olduğu ultrastrüktürel değişikliklerin saptanması ve YBMD için hayvan modeli geliştirilmesidir.

GEREÇ-YÖNTEM

Yedi adet erkek, albino ratı (250-300 g) sigara grubu olarak alındı ve günde 2 saat, 60 gün süre ile sigara dumanına maruz bırakıldı. Ratların sigara dumanını solumaları için özel olarak üretilen, Chen tarafından tanımlanan Walton'un modifiye edilmiş sigara içme makinası kullanıldı²⁴. Bu makinada, iç içe geçmiş 3 ayrı cam bölme ve her bir bölmede havayı içeri doğru çeken pervaneler vardır. Birinci bölme sigara dumanının oluşturulduğu üretim bölümü, ikinci bölme sigara dumanının seyreltildiği seyreltme bölümü; üçüncü bölme ise ratların sigara dumanına maruz bırakıldığı inhalasyon bölümü olarak adlandırılır. Yanan sigaradan geçirilen hava ilk önce sigara dumanının oluşturulduğu birinci bölmede toplanır, buradan ikinci bölmeyi geçirilirken sigara dumanı 1/9 oranında oda havası ile seyreltilerek %10'luk sigara dumanı elde edilir. Ratlar, inhalasyon bölümünde %10'luk sigara dumanının tenefüs ederler. Inhalasyon bölümündeki %10'luk sigara dumanı 5.2 litre/dakika hızında oda dışına boru ile atılır.

Bu çalışmada yurdumuzda üretilen tütünlerden yapılan "Maltepe" sigarası kullanıldı. Her bir sigara yaklaşık 10-12 dakikada bitti.

Yedi adet erkek, albino rat (250-300 g) kontrol grubu olarak alındı. Kontrol grubundaki ratlar sigara dumanına maruz bırakılmadan aynı makine içerisinde günde 2 saat 60 gün süre ile normal oda havasına

maruz bırakıldı. Spektrofotometrik metod ile gaz analizleri yapıldı²⁵. Her iki grubun oluşturulan deney ortamından nasıl etkilendiğini bulmak için, deney öncesi ve sonrasında hematolojik değerlendirme yapıldı.

Her iki grup çelik kafesler içerisinde standart rat yemi ve şehir suyu ile beslenerek, standart koşullarda tutuldu.

Araştırma süresi olan 60 günün sonunda; ratların eter anestezisi altında kardiyak 'pankçır' ile kanları heparinize tüplere alındı ve ratlar servikal dislokasyon ile feda edildi. Ratların gözleri enüklüe edilerek, saat 9 hizasındaki perilimbal konjonktiva pensetle sıkıştırılıp oryantasyon için iz oluşturuldu. Morfolojik değerlendirme için göz küresi jilet ile ekvatoryal olarak kesildikten sonra her ratın bir gözüne ait retinadan, kesitler alındı. Kesitler papilla temporalinden retinanın tüm katmanlarını içerecek biçimde orta hatta paralel ve en az 2 papilla çapı uzunluğunda, yaklaşık 1 papilla çapı genişliğinde, alınmaya çalışıldı.

Kesitler pH'sı, 7.2 olan, fosfatla tamponlanmış, %2'lik gluteraldehit içerisinde 4 saat süre ile +4 derecede tespit edildi. Tespit edilen doku parçaları çalışılarak küçültüldükten sonra 0.1 M fosfat tamponunda yıkandı ve %1'lik osmium tetroksit içine 90 dakika oda ısısında 2. tespit yapıldı. Daha sonra alkol ile dehidrate edildi ve Araldite CY 212 içine gömülerek bloklandı²⁶. Ultratom (LKB) ile alınan ince kesitler, üranil-asetat ve kurşun-sitrat ile boyanarak elektron mikroskopu (Jeol 100) ile incelendi²⁶.

BULGULAR

Plazma tiosiyonat seviyesi, içilen sigara miktarının iyi bir göstergesi olduğu için epidemiyolojik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır^{27,28}. Bu çalışmada kontrol ve sigara grubu ratların uygulama öncesi plazma tiosiyonat

değerleri sırasıyla $3.0 \pm 0.4 \mu\text{mol/l}$ 'ye ve $3.7 \pm 0.5 \mu\text{mol/l}$ olarak hesaplandı ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Kontrol grubu ratların plazma tiosiyonat düzeyleri 60 günün sonunda $3.9 \pm 0.4 \mu\text{mol/l}$ 'ye yükseldi bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Tiosiyonat düzeyindeki değişiklikler, ratların sigara dumanından önemli derecede etkilendiklerini göstermektedir.

Sigara grubundan alınan ince kesitlerin yapılan elektron mikroskopu incelenmesinde; ganglion tabakasındaki hücrelerin sitoplazma organellerinde dejenerasyon (Şekil-1), aksonlarda dejenerasyon, büzüşme ve bunun sonucunda da endonöryumu tam olarak dolduramaması (Şekil-2), fotoreseptör hücrelerinin



Şekil-1

(X 1900)*: Sigara grubu, ganglion tabakasındaki hücrelerin sitoplazma organellerinde dejenerasyon.



Şekil-2

(X 7200)*: Sigara grubu, aksonlarda dejenerasyon, büzüşme ve bunun sonucunda da endonöryumu tam olarak dolduramaması.

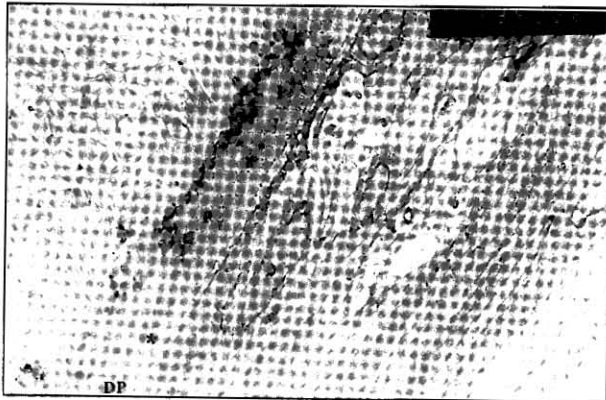
uzantılarının dış segmentlerindeki disklerin dejenerasyonu ve diskler arasındaki mesafelerin açılması saptandı (Şekil-3). Retina pigment epiteli (RPE) tabakasında pigment dağılımında düzensizlik, depigmente ve pigment artışının izlendiği alanlar görüldü (Şekil-4).

Kontrol grubunda alınan ince kesitlerin yapılan elektron mikroskobu incelenmesinde; Ganglion hücreleri ve sitoplazma elemanlarının belirgin ve düzenli biçimde normal görünümde olduğu, retina ve RPE'nin de normal yapıda olduğu görüldü (Şekil-5). Koriokapiller yapıların ve kapiller endotelinin normal görünümde olduğu belirlendi (Şekil-6).



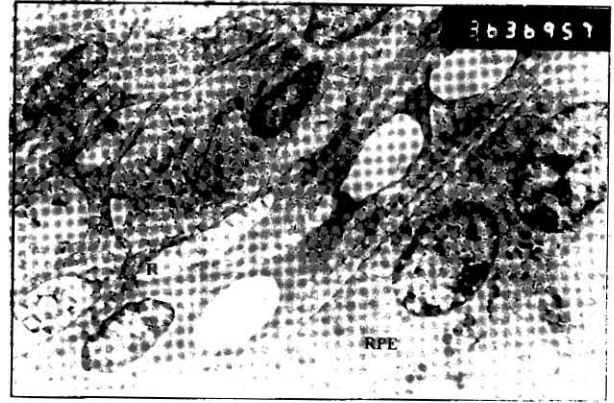
Şekil-3

(X 14000)*: Sigara grubu, fotoreseptör hücrelerinin uzantılarının dış segmentlerindeki disklerin dejenerasyonu ve diskler arasındaki mesafelerin açılması.



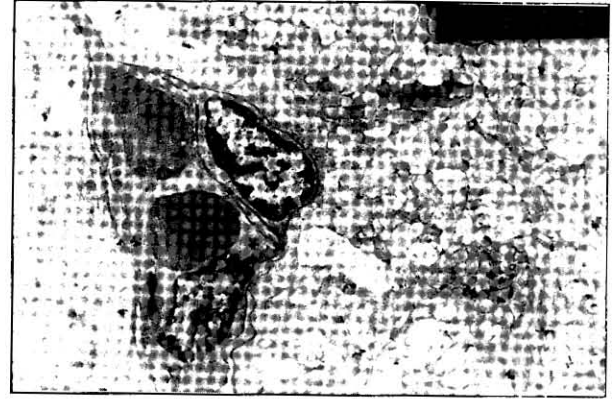
Şekil-4

(X 1900)*: Sigara grubu, retina pigment epiteli tabakasında pigment dağılımında düzensizlik, depigmente (DP) ve pigment (P) artışının izlendiği alanlar.



Şekil-5

(X 3600)*: Kontrol grubu, ganglion hücreleri ve sitoplazma elemanları belirgin, düzenli biçimde ve normal görünümde. Retina (R) ve retina pigment epiteli (RPE) normal görünümde.



Şekil-6

(X 3600)*: Kontrol grubu, koriokapiller yapılar ve kapiller endoteli normal görünümde.

TARTIŞMA

Sigara dumanında pro-oksidanların varlığı gösterilmiş olup^{29,30}, bu pro-oksidanlar hücre yapılara ve bilhassa lipid membranlara karşı toksikdir³¹. Pro-oksidanlar lipid oksidasyonunu in vivo^{32,33} ve in vitro³¹ olarak artırır. Bu etkileri; sigara dumanı içerisindeki maddelerin direkt etkisine bağlı olduğu gibi, dokulardaki antioksidan savunma mekanizmalarının yıpratılması ile ultra viole ışık gibi çevresel faktörlere karşı direncin azalması ve dolayısı ile hasarın oluşması sonucunda da olur¹. Sigara; kandaki, retinadaki ve bilhassa maküladaki lutein ve zeaksantin gibi karotenoidlerin azalmasına ve böylece neovasküler tipde YBMD gelişmesine neden olmaktadır³⁴.

Sigara kullanan kişilerde azalan antioksidan korumanın yol açtığı fonksiyon bozuklukları makrofajlarda³⁵ ve eritrositlerde³³ gösterilmiştir. Antioksidan savunma sisteminde rol alan vitamin E ve C'nin sigara içilmesi ile arteriyal kanda azaldığı belirlenmiştir.³⁶ Antioksidan sistemdeki bozukluk ve oksidatif hasarın subretinal neovaskülerizasyonun gelişmesinde ve anjiogenezde rol aldığı ortaya konmuştur^{8,37}. Karotenoidlerin veya antioksidan vitaminlerin diyet ile alınması YBMD da koruyucu etki oluşturabilir.

Sigara dumanındaki karbonmonoksit dokularda hipoksiye neden olur³⁸⁻⁴⁰. Karbonmonoksit; oksijen ayrışma (disassociation) eğrisini sola kaydırır, böylece kanın oksijen taşıma kapasitesini ve oksijenin dokulara geçişini azaltır^{40,41}. Karbonmonoksit hücre içindeki myogloblin ve sitokromlara bağlanarak oksidatif fosforilasyonu bozar, hücrenin oksijen kullanımını baskılar, hücrenel hipoksiye neden olur^{40, 42-45}. Hücrenel fonksiyonların yavaşlaması toksik maddelerin hücre içinde birikmesine ve hücrenel hasarın hızlanarak artmasına neden olur. HbCO'nun artması ile mitokondrium değişiklikleri, hücre içi oksijen taşımada bozukluk, damar endotelinde hasar ve vasküler geçirgenlikte artış olur; bunların sonucundada perivasküler ödem, lipid birikimi gibi patolojiler gelişir^{9,45}.

YBMD patogenezinde; ileri yaşın bulunması^{46,47} drusen oluşumu ve RPE değişiklikleri temel bulgulardandır. Bunun yanında, seröz RPE dekolmanı, RPE ve korikapillaris atrofi, subretinal neovaskülerizasyon gibi bulgulara da rastlanabilir.

YBMD'de santral görme alanı kaybı ile sonuçlanan hastalık, ilk önce RPE tabakası seviyesinde başlamakta, korioretinal patolojilerle devam etmekte, fotoreseptör hücrelerdeki de-

ğişikliklere ve hücre ölümüne kadar ilerlemektedir. RPE'nin fonksiyonel bozukluğu yanında fotoreseptör hücreleri dış segmentleri ile olan ilişkisinde bozulur. Normalde bu dış segmentteki değişikliğe uğramış diskler, RPE tarafından fagositize edilir ve RPE hücresi içinde biyokimyasal olarak 'degrade' edilerek yıkıma uğratılır.

Çalışmamızın sigara grubunda da, fotoreseptör hücreleri dış segmentlerindeki değişikliğe uğramış diskler saptandı (Şekil-3).

RPE hücrelerindeki bozukluk, biyokimyasal yıkımın durmasına ve artık madde birikimine yol açar. Bu biriken maddeler daha çok lipofusin yapısındadır. Bu maddeler genellikle Bruch membranının çeşitli seviyelerinde birikerek drusenleri oluşturur^{14,48,51-55}. RPE içinde biriken toksik maddeler bu hücrelerin lipoidal dejenerasyonuna ve apoptozisine neden olur. RPE tabakasında hücre ölümü ve hücre bütünlüğünün bozulması ile ortaya çıkan pigmenti, komşu hücreler fagosite etmeye çalışır, böylece hipopigmente ve hiperpigmente alanlar ortaya çıkar. Normalde kübik ve düzenli bir yapıda olan bu hücreler düzensiz bir hal alır.

Bizim çalışmamızın sigara grubunda, RPE tabakasında görüldüğü gibi pigment dağlımında düzensizlik saptandı (Şekil-4).

Komşu hücrelerin kompensasyon yeteneği sınırlı olduğu için belli bir noktadan sonra patolojiler belirgin hale gelir⁵⁶. Yaşlanmayla beraber Bruch membranı tabakasında debris birikmeye başlar^{57,58} ve bu birikintiler drusenleri oluşturur⁵⁵⁻⁶². Birikinti içerisindeki maddelerin özelliğine göre yumuşak, sert, yaygın, bazal, noduler, kalsifiye ve karışık tipde drusenler oluşur. Daha çok yumuşak drusenler seröz RPE dekolmanına neden olurlar. Yumuşak drusenler RPE'nin yaygın hasarını gös-

terir ki bu da neovaskularizasyona yatkınlık oluşturabilir^{63,64}. Sert drusenler ise daha çok lokalize RPE hasarını gösterir ve coğrafik atrofi ile ilişkisi gösterilmiştir⁶⁵. Koriokapillaris ve RPE coğrafik atrofisi; subretinal neovaskularizasyonun gelişmesi fotoreseptör hücrelerinde ölüme yol açarak görme kaybı ile sonuçlanır.

Bizim çalışmamızda, sigara grubunda, drusenlere rastanmadı. Bu sonuç, deney süremizin 60 gün gibi rölatif olarak kısa olmasına veya dokuların elektron mikroskopisi için hazırlanması esnasındaki işlemlerden dolayı drusenlerin tam olarak görülemediğine bağlandı. Çalışmamızın sigara grubunda yukarıda belirtilen patolojiler bulunurken, kontrol grubunda bu patolojilere rastlanmadı. Çalışmamızda saptanan bulgular ile yukarıda belirtilen YBMD bulguları arasındaki benzerlikler, çalışma modelimizin YBMD için bir model olabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile sigara dumanının retina üzerindeki toksik etkisi ultrastrüktür düzeyinde ortaya kondu. Bağlantılı olarak, çalışmada ortaya konan modelin YBMD için bir model olabileceği fakat geliştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- 1) Eldem B. serbest radikaller ve retina. T. Oft. Gaz. 1990; 20: 143-146.
- 2) Hyman LG, Grimson L, Oden N, Schachhat AP, Leske M. Risk factors for age related maculopathy. ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33 (s): 801.
- 3) Paetkau ME, Boyd TAS, Grace M, Bach-Mills J, Winship B. Senile disciform macular degeneration and smoking. Can J Ophthalmol 1978; 13: 67-71.
- 4) Klein R, Klein BEK, Linton KLP, De Mets DL. The Beaver Dam eye study. The relation of age related maculopathy to smoking. Am J Epidemiol 1993; 137: 190-200.
- 5) Vingerlig JR, Dielemans I, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PTVM. Age related macular degeneration and smoking. The Rotterdam study. ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 36(S): 9.
- 6) Sparrow JM, McLeod BK, Smith TDW, Birch MK, Rosenthal AR. The prevalence of diabetic maculopathy and their risk factors in the non insulin treated diabetic patients of an English town. Eye 1993; 7: 158-163.
- 7) Paetku ME, Boyd TAS, Winship B, Grace M. Cigarette smoking and diabetic retinopathy Diabetes 1977; 26:46-9.
- 8) Armstrong D, Abdella N, Salman A, Miller N, Rahman EA, Bojanczyk M. Relationship of lipid peroxidase to diabetic complications. Comparison with conventional laboratory test. J Diabet Complications 1992; 6: 116-22.
- 9) Restorff WV, Heisch S. Dark adaptation of the eye during carbon monoxide exposure in smokers and nonsmokers. Aviat Spance Environ Med 1988; 59:928-31.
- 10) Stewart RD, Newton PE, Hosko MJ, Peterson JE, Mellender JW. The effect of carbon monoxide on time perception manual coordination inspection and arithmetic. In: Weis B, Laties VG. Eds. Behavioral toxicology. Newyork: Plenum Press 1975.
- 11) West S, Munoz B, Emmett EA, Taylor HR. Cigarette smoking and risk of nuclear cataracts. Arch Ophthalmol 1989;107:166-9.
- 12) Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA. A prospective study of cigarette smoking and risk of cataract surgery in women. J Am Medical Association 1992. 268: 994-8.
- 13) National Society to Prevent Blindness. Vision problems in the US data analysis: definitions, data sources, detailed data tables, analysis, interpretation. New York. National Society to Prevent Blindness. 1980; pp: 1-46.
- 14) Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1987; 31:291-306.
- 15) Ferris FL. Senile macular degeneration: review of epidemiological features Am J Epidemiol 1983; 118: 132-51.
- 16) Şahin Ö, Akbatur H, Or M, Hasanreisioğlu B. Senil makula dejenerasyonunda doku tiplendirmesi. TOD 28. Ulusal Kongresi Bülteni 1994, s: 364-365.
- 17) Uğurlu ŞK, Bilgiç S. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda serum çinko, bakır, karoten ve bazı biyokimyasal değişken düzeylerin incelenmesi. TOD 28. Ulusal Kongresi Bülteni 1994, s: 366-370
- 18) Çukur MS, Eldem B. Yaşa bağlı diskiform makula

dejenerasyonlarında tedavi edilebilirlik. TOD 24. Ulusal Kongresi Bülteni 1990, cilt: 1 s: 155-158

19) Atmaca LS, Özmert E. Retina altı neovaskülerizasyonunda diye laser. TOD 25. Ulusal Kongresi Bülteni 1991, cilt 3 s:38-41

20) Şengün A, Akbatur H. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu. MN Oftalmoloji 1999, 6: 44-48.

21) Hammond BR, Wooten BR, Snodderly DM. Cigarette smoking and retinal carotenoid: Implications for age-related macular degeneration. Vision Res 1996; 36: 3003-9.

22) Paetkao ME, Boyd TAS, Grace M. Senile disciform macular degeneration and smoking Can J Ophthalmol. 1978; 13:67-71

23) Macular Photocoagulation Study Group. Recurrent choroidal neovascularization after argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Arch Ophthalmol 1986; 104: 503-12.

24) Chen BT, Weber RE, Yeh HC, Lundgren DL, Snipes MB, Mauderly II. Deposition of cigarette smoke particulates in the rat. Fundam Appl Toxicol 1989; 13: 429-38.

25) Borgerding MF, Hicks RD, Bodnar JE, Riggs DM, Nanni EJ, Fulp GW Jr, Hamlin WC Jr, Giles JA. Cigarette smoke composition. Part I. Limitations of FTC method when applied to cigarettes that heat instead of burn tobacco. J Assoc Off Anal Chem 1990; 73:605-9

26) Electron microscopy-Sampling. in: Ackerman's surgical pathology (8th ed) Ed: Juan Rosai. Mosby St. Louis, New-York 1996, p:32-34, 2646.

27) Densen PA, Davidow B, Bass HE, Jines EW. A chemical test of smoking exposure Arch Environ Health 1967; 14:865-74.

28) Haley NJ, Axelrad CM, Tilton KA. Validation of self-reported smoking behavior. Biochemical analysis of nicotine and thiocyanate. Am J Public Health 1983;73:1204-7.

29) Pryor WA, Stone K, Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyacetyl and peroxyacetyl nitrate Ann NY Acad Sci 1993, 686: 12-27.

30) Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environmental Health Perspective 1985;64:11-26.

31) Niki E, Minamisawa S, Oikawa M, Komuro E. Membrane damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke. Ann NY Acad Sci 1993; 686:29-37.

32) Allard JP, Royall D, Kurian R, Muggli R, Jejeebhoy KN. Effects of betacaroten supplementation on lipid peroxidation in humans. Am J Clin Nutrition 1994;59:884-90.

33) Duthie GG, Arthur JR, James WPT. Effects of smoking and vitamin E on blood oxidant status. Am J Clin Nutrition 1991; 53 (S): 1061-3.

34) Hammond Br, Wooten BR, Snodderly DM. Cigarette smoking and retinal carotenoids: Implications for age related macular degeneration. Vision Res 1996; 36:3003-9.

35) Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. Am J Resp Critical Care Med 1994; 149: 178-82.

36) Mezetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, et al. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non smokers. Atherosclerosis 1995; 112:91-9.

37) Armsstrong D, Hiramatsu T. Studies of experimentally induced retinal degeneration 2. Early morphological changes produced by lipid peroxidation in the albino rats. Japan J Ophthalmol 1990; 34:58-73.

38) Dhenin C. Aviation Medicine. Vol : 1. London : Tri-Med. 1978.

39) Haldane JBS. The dissociation of oxyhemoglobin in human blood during partial carbon monoxide poisoning. J Physiol. (London) 1912; 45:12.

40) Stewart RD. The effect of carbon monoxide on humans. J Occup Med 1976, 18:304-9.

41) Roughton FJ, Darling RC. The effect of carbon monoxide on the oxyhemoglobin dissociation curve. Am J Physiol. 1944; 141:17-31.

42) Chance B, Erecinska M, Wagner M. Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity Ann NY Acad Sci. 1970;174:193-204.

43) Coburn RF. The carbon monoxide body stores. Ann NY Acad Sci. 1970, 174:11-22, 429-30.

44) Goldbaum DR, Ramirez RO, Absalon KB. What is the mechanism of carbon monoxide toxicity. Aviat Space Environ Med 1975; 46:1289-91.

45) Somosi E, Balogh I, Ruhanyi G, Sotonyi P, Szegedi L. New findings concerning the pathogenesis of acute carbon monoxide (CO) poisoning. AM J Forens Med Fathol 1981; 2::31-9.

46) Feeney-Burns L, Burns RP, Gao CL. Age-related macular changes in humans over 90 years old. Am J Ophthalmol 1990;109:265.

- 47) Weale RA. Retinal senescence. In Osborne NN, Chader CJ(eds) : Progress in Retinal Research. Elm-sford. NY, Pergamon Press, 1985 pp 53-73.
- 48) Young RW. Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1988;32:252.
- 49) Boulton M, Marshall J. Retinal pigment epithelial detachments in the elderly. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105:674,1986
- 50) Hogan MJ. Role of the retinal pigment epithelium in macular discase. *Trans Am Acad Ophthalmol Oto-laryngol* 76:64. 1972.
- 51) Merry BJ. Biological mechanisms of ageing. *Eye* 1:163. 1987.
- 52) Franceschetti A, Francois J, Babel J. Decencre-sence maculaire senile In Les heredodegeneresences Chorioretiniennes Paris Masson. 1963, pp 518-538.
- 53) Gass JDM. Drusen and disciform macular de-tachment and degeneration *Arch Aphthalmol* 9(1:21)6. 1973.
- 54) Young RW: Visual cells and the Concept of re-nawal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:700 1976.
- 55) Gass JDM. Steropic atlas of macular disease, di-agnosis and treatment. 3rd ed. St. Lois CV Mosby, 1987; pp:2-18, 43-219, 552-577, 581-600, 684-693.
- 56) Sarks SH: Age-related macular degeneration. In Ryan SJ, Schachat AP, Murphy RP, Patz A (eds): Re-tina. Medical Retina. vol. 2. St. Louis, CV Mosby. 1989, pp 149-173.
- 57) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the Human Eye. Philadelphia, WB Saunders, 1971, p: 498.
- 58) Feeney-Burns L, Ellersieck MR. Age-related chan-ges in ultra structure of Bruch's membrane. *Am J Oph-thalmol* 1985;100:686.
- 59) Spencer WH. Syposium: Macular dieases. Pat-hogenesis: Light Microscopy. *Trans Am Acad Oph-thalmol Otolarngol* 1965;69:662.
- 60) Hagan MJ. Bruch's memhranc and disease of the macula: Role of elastic tissue and collagen. *Trans Oph-thalmol Soc UK* 1967; 77:410.
- 61) Hogan MJ, Alvarado JA. Studies on the human ma-cula. IV: Aging changes in Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 1967;77:410.
- 62) Sarks SH, Sarks JP: Age-related macular de-generation Atrophic form. In Ryan SJ (ed): *Retina*, vol:2. St. Louis, CV Mosby, 1989; p:149.
- 63) Green WR, Key SN: Senile macular degeneration: A histopathological study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1977;75:180.
- 64) Green WR, McDonnell PJ, Yeo HJ. Pathologic fe-atures of senile macular degeneration *Ophthalmology* 1985;92:615.
- 65) Sarks JP, Sarks SR, Kilingsworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium *Eye* 1988; 2:552.