

**MELATONİN VE C VİTAMİNİ'NİN KRONİK ALKOLİK SIÇANLARIN AKCIĞER DOKUSUNDAKİ HASAR VE eNOS İMMUNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ\***

**Effect of Melatonin and Vitamin C on Damage and Expression of Endothelial NOS in Lung of Chronic Alcoholic Rats**

**Mehmet Fatih SÖNMEZ<sup>1</sup>, Derya AKKUŞ<sup>2</sup>, Yasemin SAVRANLAR<sup>3</sup>, Arzu YAY<sup>4</sup>, Saim ÖZDAMAR<sup>5</sup>, Halime TOZAK YILDIZ<sup>6</sup>**

**Özet :** Bu çalışmada alkoliin akciğerde oluşturduğu hasar ve endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonu üzerine melatonin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmada 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol (n:6); ikinci grup deney süresince (28 gün) sadece alkol içeren sıvı diyet alan (n:6); üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 40mg/kg/gün intraperitoneal C vitamini alan (n:6); dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 4mg/kg/gün intraperitoneal melatonin alan sıçanlardan (n:6) oluşturuldu.

Deney süresince sadece alkol alan gruptaki sıçanların akciğer dokularında alveolar septumda kalınlaşma ve bazı bronşiol epitel hücrelerinde dökülme gözlemlendi. Bazı alanlarda alveolar ödem ve hemoraji tespit edildi. Endotelial nitrik oksit sentaz immunoreaktivitesini belirlemek için yapılan boyamada bronşiol epitel hücrelerinde (+++), alveolar septumda (++) ve bronşiol ve damarların düz kaslarında ise (+) boyanma tespit edildi. Alkol tüketen grupta bronşiol epitelindeki boyamada önemli miktarda azalma gözlemlendi. Melatonin ve C vitamini gruplarında ise endotelial nitrik oksit sentaz boyanması kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi ve oluşan morfolojik hasarlar düzelmisti.

Sonuç olarak kronik alkol tüketimi akciğer dokusunda hasara yol açmaktadır. Bu hasar melatonin ve C vitamini ile düzelmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kronik alkol tüketimi, akciğer, eNOS, melatonin, C vitamini

**Summary:** The aim of this study was to determine the expression of endothelial nitric oxide synthase and alterations in the lung caused by alcohol consumption and the effects of melatonin and vitamin C on these changes in rats.

Twenty-four adult male Wistar rats weighing 200-250g were used in this study. Rats were divided into four groups. The first group served as control (n:6). The second group was the ethanol treatment for 28 days (n:6). The third group was given ethanol and supplemented with 40 mg/kg/day vitamin C (intraperitoneally) (n:6). The fourth group was given ethanol and supplemented with 4 mg/kg/day melatonin (intraperitoneally) (n:6).

Light microscopic examinations revealed thickening in alveolar septum and desquamation of some bronchial epithelial cells in the ethanol-fed group. In some fields, alveolar edema and hemorrhage was observed. Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity was in (+++) bronchial epithelial cells, (++) in alveolar septum and (+) in smooth muscle of bronchioli and vessels. Expression of endothelial nitric oxide synthase in alcohol group was decreased compared to control group. In melatonin and vitamin C treated groups, endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity resembled that of control group, and morphological damage was partly improved.

Our finding have led us to conclude that chronic alcohol consumption results in damage to pulmonary tissue, which can only be resolved with especially melatonin and vitamin C.

**Key words:** Chronic alcohol consumption, lung, eNOS, melatonin, Vitamin C

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.His-Embr. AD, Kayseri

<sup>2</sup> Y.Lisans Öğr.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.His-Em. AD, Kayseri

<sup>3</sup> Arş.Gör.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.His-Embr. AD, Kayseri

<sup>4</sup> Doktora Öğ.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.His-Emb. AD, Kayseri

<sup>5</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.His-Embr. AD, Kayseri

<sup>6</sup> Öğr.Gör.Muğla Ün.Fethiye SYO, Muğla

Geliş Tarihi : 21.07.2009 Kabul Tarihi : 25.12.2009

\*Bu çalışma 22-25 Haziran 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından düzenlenen 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Değişik türdeki alkollü içecekler insanlar tarafından binlerce yıldır tüketilmektedir. Alkol dünya sağlık örgütü tarafından hem fizyolojik hem de psikolojik bağımlılık yapan maddeler arasında kabul edilmektedir. Kronik alkol tüketimi başta karaciğer olmak üzere gastrointestinal sistem, sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve solunum sisteminde çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Akut respiratuvar distress sendromu (ARDS), alveolar-kapiller bariyerin bozulması ve kalp kaynaklı olmayan pulmoner ödem ile karakterize olan akciğer hasarının ciddi bir formudur. Sepsis, travma ya da aspirasyon gibi sistemik proinflatuvar mediyatörlerin salınımı ile sonuçlanan çok değişik klinik durumlar ARDS'ye neden olabilmektedir (1). ARDS etkili tedavisi olmadığı için halen ölüm oranı yüksek olan bir hastalıktır (2). Kronik alkol tüketiminin ARDS gelişimi için bir risk faktörü olduğu iyi tanımlanmıştır (3). Çok sayıdaki çalışmada kronik alkol tüketiminin, alveolar epitel hücre aktivasyonunu bozarak deneysel akciğer hasarı oluşturduğu gösterilmiştir. Kronik alkol tüketimi 1) alveolar epitel hücrelerinde oksidan-aracılı nekrozu artırır ve sürfaktan sentezini bozar (4); 2) *in vivo* ve *in vitro* olarak alveolar epitelyal hücrelerde apoptozisi artırır (5-6); 3) metalloproteinaz aktivitesini artırır ve endotoksemi boyunca alveolar matriksi yıkar (7); 4) alveolar alanda transforming growth faktör  $\beta$ 1 aktivitesini ve ekspresyonunu artırır (8). Alkolün akciğerde oluşturduğu hasara birçok etken aracılık etmesine rağmen hücrel ve biyokimyasal kesin nedenler tanımlanmamıştır ve oksidatif stresin kritik rol oynadığı düşünülmektedir.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-argininden sentezlenen kısa ömürlü biyolojik bir mediyatördür. NOS enzim ailesinin bugüne kadar endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS) olmak üzere üç alt tipi tanımlanmıştır. NO'nin vasküler permeabilitenin düzenlenmesi, trombosit ve lökosit aktivasyonu, nöronal iletim, hücre çoğalmasının düzenlenmesi ve non-spesifik immun yanıt olmak üzere çok çeşitli görevleri vardır (9). NO'nin uygun olmayan salınımı, metabolize edilmesi ve aktivasyonu damarsal, iskemik, trombotik ve inflamatuvar patolo-

jilerle ilişkilidir. NO'nin hem prooksidan hemde antioksidan aktivitesi bulunmaktadır (10).

Vitamin C, fizyolojik görevini oksido-redüksiyon yoluyla gösteren, suda çözünen önemli vitaminlerden biridir. Vitamin C serbest oksijen radikallerini minimize edebilen diyet yoluyla alınabilen bir antioksidandır (11-13). Pineal bezin salgısı olan melatoninin sirkadyen ritmin, uyku, üreme, ruhsal durum ve davranışın düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Değişik serbest radikalleri detoksifiye etmede oldukça etkili olduğu bilinen antioksidan etkiye sahiptir. Kanbeyin ve kan-plasenta bariyerlerini geçebilir ve hücreler boyunca dağılır. Bu özellikleri melatoninin antioksidan etkisini artırmaktadır (14).

Bu çalışmada kronik alkol tüketimi ile akciğerde oluşturulan hasar üzerine melatonin ve C vitamini etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışmada 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 28 günlük deney süresince 21 °C oda ısısında ve 12 saat aydınlık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlık (19:00-7:00) döngüsünün uygulandığı ortamda çelik kafeslerde beslendi. Sıçanlar her bir grupta altı sıçan olacak şekilde rasgele olarak dört gruba ayrıldı. Birinci grup (kontrol) alkolsüz sıvı diyet ile beslenen sıçanlar; ikinci grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet alan; üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 40mg/kg intraperitoneal C vitamini (Redokson, Bayer) uygulanan; dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte günlük 4mg/kg intraperitoneal melatonin (Merck, kat. no:814537) uygulanan sıçanlardan oluşturuldu.

Kronik alkol tüketimi için deneklerin her biri ayrı kafeslere yerleştirildi. Modifiye sıvı diyet literatürde belirtildiği gibi hazırlandı (15). Çalışmanın baş-

langıcında bütün deneklere alışmaları için bir hafta boyunca alkol içermeyen sıvı diyet verildi. Bir hafta sonunda deney gruplarına üç gün %2.4 etanol içeren sıvı diyet verildi. Daha sonra izleyen günlerde etanol konsantrasyonu önce dört gün boyunca % 4.8, sonraki 21 gün boyunca ise %7.2 olacak şekilde ayarlandı. Kontrol grubu etanol içermeyen izokalorik sıvı diyet ile beslendi. Sıvı diyet günlük olarak taze hazırlandı ve her gün aynı saatte (10:00) deneklere verildi. Sıçanların vücut ağırlıkları her gün ölçüldü ve aldıkları alkol miktarı günlük olarak kaydedildi. Denekler alkolü veya alkol-süz sıvı diyet dışında başka bir madde ile beslenmedi.

Deneyin sonunda sıçanlar intraperitoneal ketamin (100mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyondan sonra akciğer dokuları hızlıca çıkarıldı. Klasik yöntemlere göre dokular %10'luk nötral formalin içinde 24 saat fikse edildi (16). Tespit edilen dokular musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5–6 µm kalınlığında kesitler Hematoksilin-Eozin ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı ve Olympus BX–51 fotomikroskopla incelenerek fotoğraflar elde edildi.

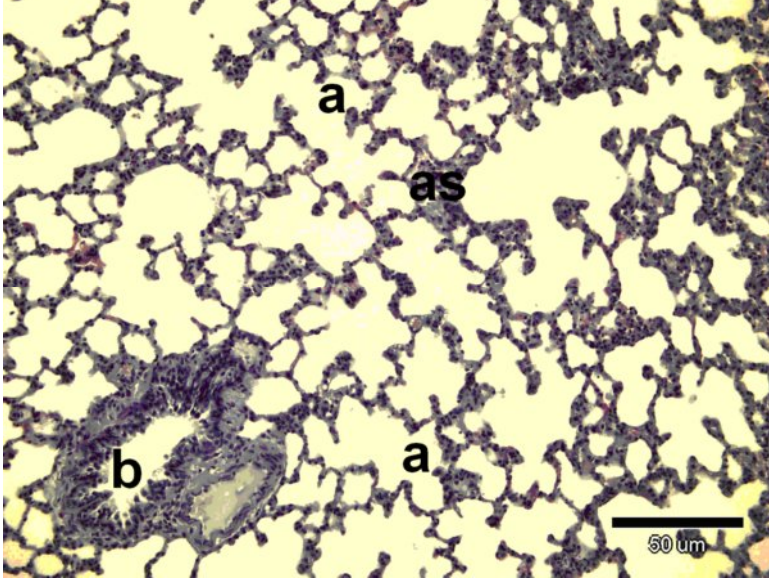
eNOS ekspresyonu streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle (17) tavşan poliklonal antikoru kullanılarak akciğer dokularında immunohistokimyasal olarak saptandı. Parafin kesitler öncelikle ksilol ile deparafinize edildi. Deparafinize edilen kesitler dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildikten sonra 20 dak. antijen geri kazanımı için 2N HCl ile muamele edildi. Metanol içinde %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 10 dak. boyunca endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra 3X5 dak. fosfat tamponuyla yıkanan dokular oda ısısında nemli ortamda 20 dak. fosfat tamponu içinde hazırlanmış %1.5'lik normal keçi serumu ile inkube edildi. Kesitler daha sonra 4 °C de bir gece boyunca eNOS (sc.654 Santa Cruz Biotechnology, USA) (fosfat tamponunda hazırlanmış %1,5 normal keçi serumunda sulandırılmış 2µg/ml eNOS) primer

antikoru ile muamele edildi. Negatif kontrol kesitlerine primer antikoru yerine fosfat tamponu uygulandı. Kesitler daha sonra fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra oda ısısında nemli ortamda 30 dak. boyunca biotinli tavşana karşı keçi IgG sekonder antikoru ile inkube edildi. Fosfat tamponu ile yıkanan dokular streptavidin-horseradish-peroksidaz ile 30 dak muamele edildikten sonra Aminoetil Karbazol (AEC) (kırmızı) substrat kit ile 5 dak. boyandı. Son olarak hematoksilin ile zıt boyama yapılan dokular dsitile su ile yıkandıktan sonra kapatma solüsyonuyla kapatıldı.

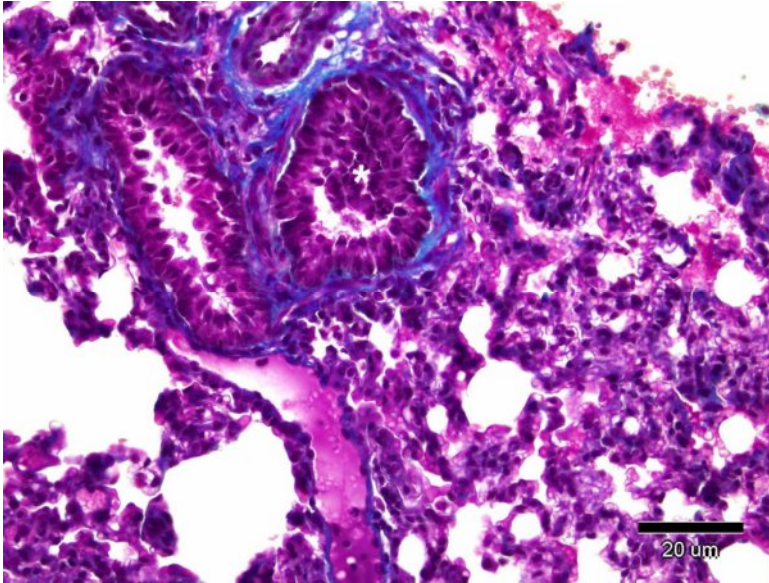
İmmunohistokimyasal boyama yoğunluğu iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. eNOS boyanma derecesi boyanma yoksa (-), az boyanma (+), orta boyanma (++) ve güçlü boyanma (+++) olacak şekilde skorlandı (17).

## BULGULAR

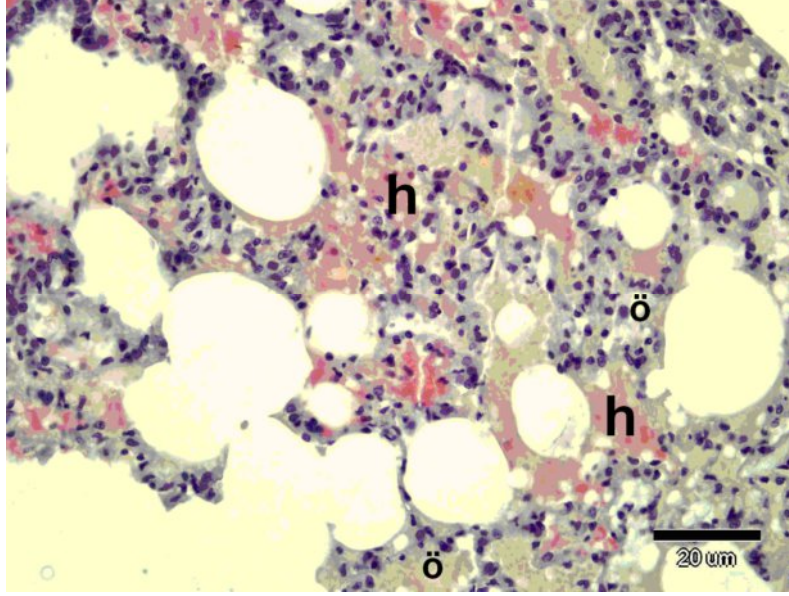
Günlük alkol tüketimi  $13.4 \pm 2.19$  g/kg olarak belirlendi. Çalışmamızda ışık mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait akciğer dokuları normal olarak gözlemlendi (Şekil 1). Deney süresince sadece alkol alan gruptaki sıçanların akciğer dokularında alveolar septumda kalınlaşma, bazı bronşiol epitel hücrelerinde dökülme gözlemlendi (Şekil 2). Bazı alanlarda alveolar ödem ve hemoraji tespit edildi (Şekil 3). Plevra altında bazı alanlarda hücre infiltrasyonu ayırt edildi (Şekil 4). Kontrol grubunda eNOS immunoreaktivitesini belirlemek için yapılan boyamada bronşiol epitel hücrelerinde (+++), alveolar septumda (++) ve bronşiol ve damarların düz kaslarında ise (+) boyanma tespit edildi (Şekil 5). Alkol tüketen grupta bronşiol epitelindeki boyamada (+) önemli miktarda azalma gözlemlendi (Şekil 6). Melatonin (Şekil 7) ve C vitamini gruplarında ise eNOS boyanması kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi ve oluşan morfolojik hasarlardan alveolar septumdaki kalınlaşma devam ederken hemoraji ve ödem bulgularında iyileşme gözlemlendi. Negatif kontrol kesitlerinde boyanma gözlenmedi (Şekil 8).



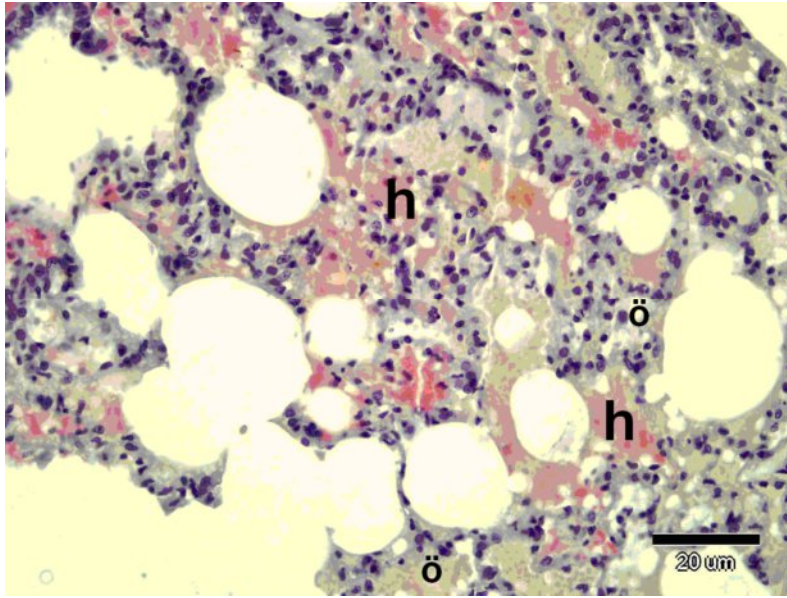
**Şekil 1.** Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanların akciğer dokusunda bronşiol (b), alveoller (a) ve alveolar septum (as) normal olarak izlenmekte. H&E. (Ölçek Çubuğu: 50 µm)



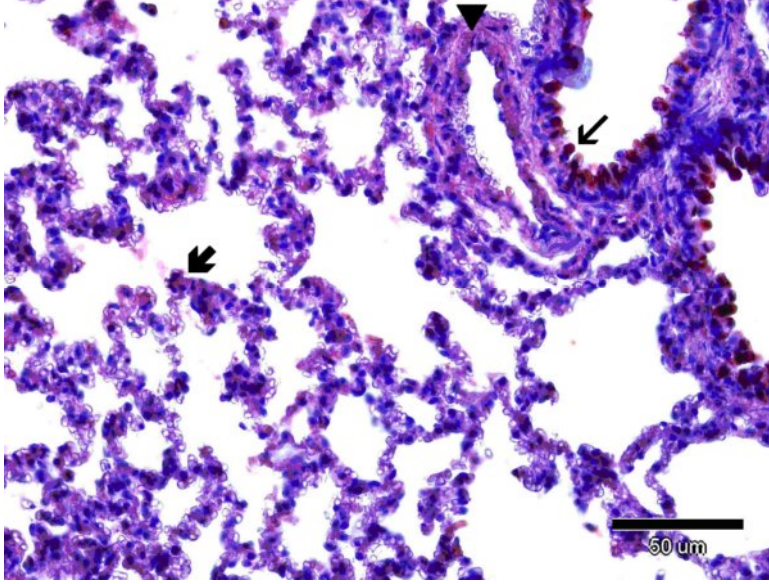
**Şekil 2.** Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların akciğer dokusunda bronşiol lümenine epitel dökülmesi (yıldız). Masson'un üçlü boyası. (Ölçek Çubuğu: 20 µm).



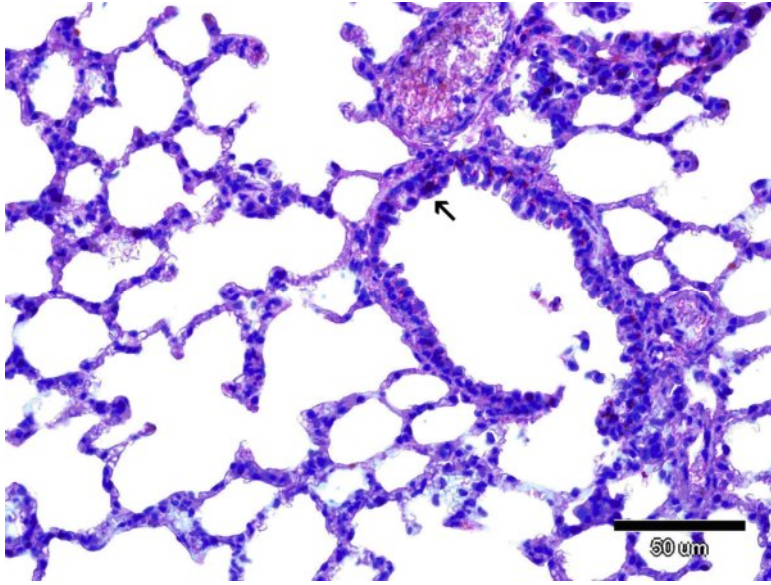
**Şekil 3.** Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların akciğer parankiminde ödem (ö) ve hemoraji (h) gözlenmektedir. H&E. (Ölçek Çubuğu: 20 µm)



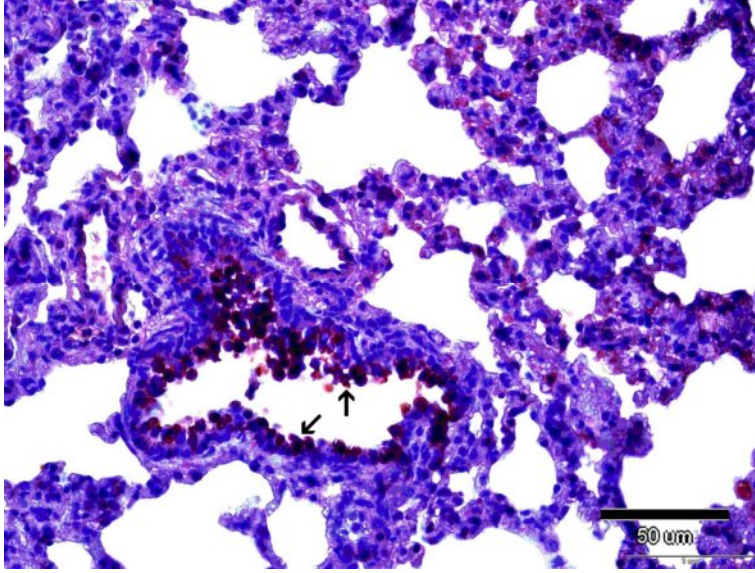
**Şekil 4.** Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların akciğer dokusunda plevra altında hücresel infiltrasyon (\*) alanı izlenmektedir. H&E. (Ölçek Çubuğu: 50 µm).



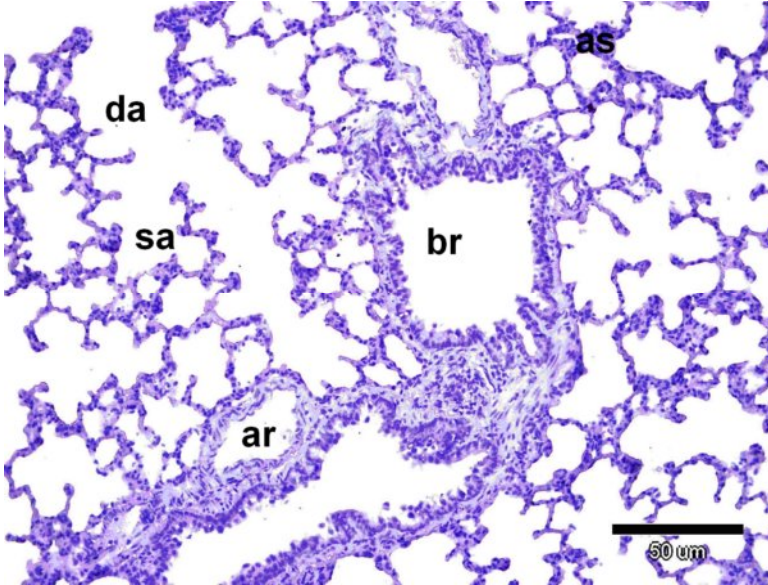
**Şekil 5.** Sıvı diyet ile beslenen kontrol grubu sıçanların akciğer dokusunda bronşiol epitel hücrelerinde (ok) (+++), alveolar septumda (kalmın ok) (++) ve bronşiol ve damarların düz kaslarında (ok başı) ise (+) eNOS boyanması. İmmunohistokimya. (Ölçek Çubuğu: 50 µm).



**Şekil 6.** Alkol içeren sıvı diyet alan ikinci grup sıçanların akciğer dokusunda özellikle bronşiyol epitel hücrelerinde (ok) eNOS boyanmasında azalma gözlenmektedir. İmmunohistokimya. (Ölçek Çubuğu: 50 µm).



Şekil 7. Alkol içeren sıvı diyet alan ve intraperitoneal olarak 4mg/kg/gün melatonin alan sıçanlarda bronşiol epitel hücrelerinde (ok) (+++) eNOS boyanması izlenmekte. İmmunohistokimya. (Ölçek Çubuğu: 50 µm)



Şekil 8. Negatif kontrol.(da:duktus alveolaris, sa:sakkus alveolaris, ar:arter, as: alveolar septum, br;bronşiyol). (Ölçek Çubuğu: 50 µm).

## TARTIŞMA

Alkol, karaciğer ve gastrik mukozada alkol dehidrogenaz ile metabolize edildiği gibi aynı zamanda sitokrom P450 ile de metabolize edilmektedir. Akciğer alkol dehidrogenaz içermemesine rağmen sitokrom P450 ile alkolü metabolize etmektedir ve bu alkolün akciğerde oluşturduğu patoloji için önemlidir. Alkol metabolizasyonu ister alkol dehidrogenaz, ister sitokrom P450 ile olsun sonuçta, serbest oksijen radikalleri üretimine ve lipid peroksidasyonuna neden olan asetaldehit oluşmaktadır. Böylece alkolün metabolize olması ile oluşan oksidatif stres antioksidanların kullanılmasına ve baskılanmasına yol açmaktadır (18). Alkol kullanımını akciğer ve bronkoalveolar sıvıdaki antioksidan glutatyon seviyesini önemli derecede azaltır ve süperoksid üretimini artırır (19-23). Alkol ARDS gelişimini de artıran önemli bir faktördür. Aynı zamanda kronik alkol tüketimi özellikle akciğerlerde enfeksiyon riskini artırmaktadır. Bunun altındaki mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen immun cevapta rol oynayan alveolar inflamatuvar hücrelerin özellikle alveolar makrofajların immun cevabında bir bozulma olmaktadır (24). Bizim yaptığımız çalışmada alkol alan sıçanların akciğer dokularında alveolar septumda kalınlaşma, alveolar ödem ve hemoraji tespit edildi. Plevra altında bazı alanlarda hücre infiltrasyonu ayırt edildi. Bu bulgular alkolik akciğer rahatsızlığında ortaya çıkan bulgulardır ve daha önceki çalışmalar ile uyumludur (24,25). Akciğerde hava yolundaki mukosilyer apparatus inhalasyon yolu ile alınan yabancı partiküllerden korunmada oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda alkolün mukosilyer klirensi azalttığı böylece özellikle akciğer enfeksiyonuna zemin hazırladığı bildirilmektedir (26,27).

NO, çeşitli fizyolojik ve patolojik rolleri olan güçlü bir biyolojik araçtır. NOS enzim ailesi tarafından üretilir. Bu ailenin nNOS, eNOS ve iNOS olmak üzere en az üç üyesi akciğer kültürü epitelinde ayırt edilmiştir (28,29). Xue ve arkadaşları (30) yaptıkları çalışmada bronşiyol silyalı epitelinde, tip II alveolar hücrelerde ve alveolar makrofajlarda eNOS immunoreaktivitesini belirlemişlerdir. Silyalı epitel hücrelerinde bulunan NO'nin silyanın vuruş frekansını ayarladığı bilinmektedir (31). Bu

çalışmada kontrol grubu akciğer dokusunda bronşiyol epitel hücrelerinde (+++), tip II alveolar epitel hücrelerde ise (++) eNOS immunoreaktivitesi ayırt edildi. Bu bulgular önceki çalışmalar ile uyumludur (28-30). Robert ve arkadaşları (32) koyun akciğerlerinde bronşiyol epitel hücrelerinde, alveolar tip I ve tip II hücrelerde ve makrofajlarda eNOS immunoreaktivitesini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada hasarlı akciğer dokusunda eNOS immunoreaktivitesi açısından bir fark saptanmamıştır. Bir başka çalışmada, kronik alkol tüketiminin akciğerde hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi hem de eNOS ekspresyonu ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Özellikle pulmoner damar endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini ve ekspresyonunu artırmaktadır (33). Bu çalışmada ise alkol verilen sıçanların akciğer dokusunda, özellikle bronşiyol epitel hücrelerinde eNOS immunoreaktivitesinde dramatik bir azalma tespit edildi. Alveolar epitel hücrelerinin eNOS immunoreaktivitesinde kontrol grubuna göre bir farklılık saptanmadı. Üst havayolu ile yapılan çalışmalarda azalmış olan NO seviyesinin mukosilyer fonksiyonda bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (34). Bizim çalışmamızda eNOS reaktivitesinin özellikle silyalı epitel hücrelerinde azalması mukosilyer sistemin bozulduğunun işaretidir.

Melatonin çok sayıda reaktif oksijen / nitrojen türevlerini direkt olarak nötralize edebilen ve birçok antioksidatif enzimi sitümüle edebilen bir hormondur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatoninin mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun etkinliğini artırdığı ve serbest radikal üretimini azalttığı vurgulanmaktadır (35). Melatonin, matriks metalloproteinaz-9 inhibisyonu yolu ile özellikle havayolunda kollajen birikmesini azaltmaktadır. Serin M ve ark. tarafından radyasyon ile oluşturulan akut akciğer yaralanmasına karşı melatoninin koruyucu olduğu belirlenmiştir (36). Pignone ve arkadaşları (37) melatoninin kronik sarkoidozda etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini önerilmektedirler. Vitamin C antioksidan özellikleri olan suda çözünen önemli vitaminlerden biridir. Bütün bu bilgiler ışığında bu çalışmada alkolün akciğerde oluşturduğu hasar üzerine koruyucu amaçlı olarak C vitamini ve melatonin uygulandı. Bizim çalışmamız alkolün sıçanlarda oluşturduğu oksidatif hasar



ve eNOS üzerine melatonin ve C vitamininin koruyucu etkisi üzerine yapılan ilk çalışmadır. Melatonin ve C vitamini uygulanan sıçanların akciğer dokularında alveolar septumdaki kalınlaşma devam etmekteydi. Akciğer dokusunda ödem ve hemorajiye rastlanmadı. Ancak alkol alan grupta özellikle bronşiyol epitelinde azalan eNOS immunreaktivitesinin melatonin ve C vitamini (+++) uygulamasıyla kontrole yakın bir boyanma gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak; alkolün özellikle bronşiyol silyalı epitelindeki eNOS immunoreaktivitesini azalttığı ve melatonin ve C vitamininin ise bunu düzelttiği tespit edildi. NO, silyaların hareketinde ve dolayısıyla akciğer dokusunun yabancı partiküllerden korunmasında önemlidir. Melatonin ve C vitamini özellikle silyalardaki NO üretimi üzerine etkili olarak ve antioksidan etkisiyle akciğer dokusunun korunmasında faydalı olabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2000; 18:1334–1349.
2. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1376–1383.
3. Moss M, Parsons PE, Steinberg KP, et al. Chronic alcohol abuse is associated with an increased incidence of acute respiratory distress syndrome and severity of multiple organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31:869–877.
4. Holguin F, Moss IM, Brown LS, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats. *J Clin Invest* 1998; 101: 761–768.
5. Brown LAS, Harris FL, Bechara R, Guidot DM. Effect of chronic ethanol ingestion on alveolar type II cell glutathione and inflammatory mediator-induced apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:1078–1085.
6. Brown LAS, Harris FL, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-mediated oxidative stress and apoptosis in rat alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:377–386.
7. Lois M, Brown LAS, Moss M, Roman J, Guidot DM. Ethanol ingestion increases activation of matrix metalloproteinases in rat lungs during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1354–1360.
8. Bechara RI, Brown LAS, Roman J, Joshi PC, Guidot DM. Transforming growth factor beta1 expression and activation is increased in the alcoholic rat lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:188–194.
9. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26):17161–6.
10. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 alpha. *FASEB J* 2006; 20(11):1889–91.
11. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003; 2:7.
12. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab* 2006; 50(2):85–94.
13. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11(8):1041–64.

14. Bhatia AL, Manda K. Study on pre-treatment of melatonin against radiation- induced oxidative stres in mice. *Env Tox and Phar* 2004; 18: 13-20.
15. Uzbay IT, Kayaalp SO. A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol Res* 1995; 31:37-42.
16. Louis ED, Yi H, Erickson-Davis C, Vonsattel JP, Faust PL. Structural study of Purkinje cell axonal torpedoes in essential tremor *Neurosci Lett*. 2009;450(3):287-91
17. Sonmez MF, Colakoglu N, Kukner A, Ozan E, Dabak DO. Immunolocalization of TGF-beta2 in the rat thymus during late stages of prenatal development. *Acta Histochem*. 2009;111(1):68-73.
18. Brown LA, Harris FL, Ping XD, Gauthier TW. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? *Alcohol* 2004; 33(3):191-7.
19. Brown LA, Harris FL, Bechara R, Guidot DM. Effect of chronic ethanol ingestion on alveolar type II cell: glutathione and inflammatory mediator-induced apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:1078-1085.
20. Brown LA, Harris FL, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *Am. J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:377-386.
21. Guidot DM, Brown LA. Mitochondrial glutathione replacement restores surfactant synthesis and secretion in alveolar epithelial cells of ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24:1070-1076.
22. Guidot DM, Hart CM. Alcohol abuse and acute lung injury: epidemiology and pathophysiology of a recently recognized association. *J Investig Med* 2005; 53:235-245.
23. Polikandriotis JA, Rupnow HL, Elms SC, et al. Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:314-319.
24. Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, et al. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30 (9):1624-31.
25. Moriya N, Nihira M, Sato S, Watanabe T. Ultrastructural changes of liver, heart, lung and kidney of mice in a large dose of ethanol injection. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison* 1992; 27(2):189-200.
26. Venizelos PC, Gerrity TR, Yeates DB. Response of human mucociliary clearance to acute alcohol administration. *Arch Environ Health* 1981; 36:194-201.
27. Heinemann HO. Alcohol and the lung. A brief review *Am J Med* 1977; 63:81-85.
28. Asano K, Chen BCE, Gaston B, et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 71:10089.
29. Shad PW, North AJ, Wu LC, et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 1994; 94:2231.
30. Xue C, Botkin SJ, Johns RA. Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(5):463-71.
31. Tamaoki J, Chiyotani A, Kondo M, Konno K. The role of NO generation in B-adrenoceptor in mediated stimulation of rabbit airway ciliary motility. *Am J Physiol* 1995; 268:1342.
32. Cox RA, Jacob S, Oliveras G, et al. Pulmonary expression of nitric oxide synthase isoforms in sheep with smoke inhalation and burn injury. *Exp Lung Res* 2009; 35(2):104-18.

33. Polikandriotis JA, Rupnow HL, Hart CM. Chronic ethanol exposure stimulates endothelial cell nitric oxide production through PI-3 kinase- and hsp90-dependent mechanisms. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29:1932–1938.
34. Lindberg S, Cervin A, Runer T. Low levels of nasal nitric oxide (NO) correlate to impaired mucociliary function in the upper airways. *Acta Otolaryngol* 1997; 117:728–734.
35. Şener G, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Uysal MK, Yeğen BÇ. Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 2002; 2977-2985.
36. Serin M, Gülbaş H, Gürses I, Erkal HS, Yücel N. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. *Int J Radiat Biol* 2007; 83(3):187-93.
37. Pignone AM, Rosso AD, Fiori G, et al. Melatonin is a safe and effective treatment for chronic pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis. *J Pineal Res* 2006; 41(2):95-100.