



Pengaruh Asap Rokok Terhadap Histopatologi Koklea: Studi pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Bambang Udji Djoko Rianto *

ABSTRACT

The effect of cigarette smoke on histopathology of cochlea

Background: Clinical studies have suggested that cigarette smoking associate with hearing loss. Smoke exposure is a risk factor to endothelial dysfunction and developing atherosclerosis. Cochlea is a auditory organ that is sensitive to hipoxia condition. Objective this study was to determine the effect of cigarette smoke exposure to histological cochlear integrity.

Methods: This was post test only design experimental study, using twenty male rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 2 groups. The control group (10 rats) was kept in room free from cigarette smoke, while the experimental group (10 rats) was exposed to tobacco smoke, two cigarette per 1 hour exposure, twice a day, every work day, for 6 months from July 2004-February 2005. The cochlea rats were examined in Patologi Anatomi Laboratory Gadjah Mada University for histopathological examination.

Results: There was 1 rat died in each group, and 18 rats (9 control group and 9 experimental group) were still alive. Based on histopathological result, there were abnormality in 7 rats (77.7%) of experimental group while all of control group were normal. This difference is significant statistically with Relatif Risk (RR) was 3.5 (95% CI: 0.66-34.53). The histopathological abnormality were of congestion of capilare, vacuolar degeneration, foam cell and necrosis of hair cells.

Conclusion: Tobacco smoke causes histopatological abnormality in cochlear integrity. The relatif risk (RR) of histopathological abnormality on experimental group was 3.5.

Keywords: Tobacco smoke, cochlea, stria vascularis, hair cells

ABSTRAK

Latar belakang: Beberapa studi klinik membuktikan bahwa kebiasaan merokok berhubungan dengan penurunan pendengaran. Paparan asap rokok merupakan faktor risiko terhadap disfungsi endotel yang dapat berkembang menjadi aterosklerosis. Koklea merupakan organ pendengaran yang sensitif terhadap keadaan hipoksia. Penelitian ini membuktikan pengaruh paparan asap rokok terhadap integritas histologis koklea.

Metode: Rancang penelitian eksperimental yang digunakan adalah post test only design, dengan sampel sebanyak 20 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok kontrol (10 ekor) disimpan di dalam ruangan bebas asap rokok. Kelompok eksperimental (10 ekor) diberi pajanan asap rokok 2 batang rokok per pajanan selama 1 jam, 2 kali sehari, setiap hari kerja selama 6 bulan dari bulan Juli 2004-Februari 2005. Koklea tikus diperiksa secara histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Hasil: Dari seluruh sampel didapatkan pada masing-masing kelompok 1 sampel mati, sedangkan 18 ekor tikus yang berhasil hidup sampai akhir masa pajanan (masing-masing kelompok 9 ekor) terdapat kelainan histologi pada 7 (77,7%) ekor tikus kelompok pajanan dengan RR 3,5 (95% CI: 0,66-34,53). Perubahan histopatolgi yang terjadi berupa kongesti pembuluh darah, degenerasi vakuoler, foam cell dan nekrosis sel rambut getar.

Simpulan: Asap rokok berpengaruh pada kerusakan integritas histologis koklea. Kerusakan koklea pada kelompok pajanan asap rokok lebih besar dibanding kelompok kontrol dengan risiko relatif/RR sebesar 3,5.

* Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung dan Tenggorokan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Jl. Kesehatan No. 1 Sekip Utara Bulaksumur, Yogyakarta – 55284

PENDAHULUAN

Fungsi pendengaran memegang peran sangat penting dalam kehidupan manusia sebagai makhluk sosial. Pendengaran tidak hanya diperlukan untuk proses komunikasi sosial tetapi juga untuk orientasi lingkungan.¹ Sebenarnya aktivitas komunikasi verbal tidak saja hanya bermanfaat untuk bertukar informasi tetapi juga untuk meningkatkan kemampuan intelektual, emosional dan spiritual (etika, perilaku) serta sosialisasi sehingga dapat mengantar manusia menjadi umat yang berbudaya.²

Organ pendengaran merupakan salah satu panca indera manusia yang berfungsi sebagai penerima informasi berupa getaran suara seperti halnya dengan antena pada pesawat radio dan televisi. Gangguan terhadap organ pendengaran selain akan menyebabkan cacat fisik juga menimbulkan masalah psikososial.¹ Berdasarkan hal tersebut dapat dimengerti bila pendengaran tidak berfungsi dengan baik sejak masa prelingual maka manusia tidak mampu mengembangkan budayanya.²

Beberapa hal yang mempengaruhi fungsi pendengaran, misalnya presbiakusis (perubahan pendengaran karena proses ketuaan), nosoakusis (perubahan pendengaran yang disebabkan oleh proses penyakit), sosioakusis (perubahan pendengaran disebabkan oleh bising pada kehidupan sehari-hari dan zat ototoksik). Kelainan-kelainan yang ditimbulkan oleh keadaan tersebut di atas bersifat tuli sensorineural. Diperkirakan bahwa pada masyarakat primitif (*primitive societies*) gangguan pendengaran pada usia lanjut lebih sedikit jumlahnya dan lebih ringan dibanding pada masyarakat industri (prevalensi presbiakusis 8% pada suku Mabaan di Sudan dan 20% di Inggris).³ Beberapa studi mendapatkan 83% pasien kardiovaskuler mengalami penurunan pendengaran yang diduga faktor penyebabnya adalah terdapat perbedaan gaya hidup (minuman keras/alkohol, merokok) dan pola konsumsi makanan (makanan yang berlemak) serta kebisingan lingkungan, yang juga sebanding dengan prevalensi penyakit kardiovaskuler pada masyarakat industri.³ Kejadian presbiakusis juga dipengaruhi oleh faktor endogen yaitu herediter dan penyakit serta faktor eksogen yaitu nutrisi, pengaruh stress dan bising.⁴

Hubungan antara kebiasaan merokok dengan penurunan pendengaran telah diteliti dalam beberapa studi, di mana didapatkan bahwa merokok merupakan faktor risiko untuk terjadinya *noise induced hearing loss* (NIHL) pada pekerja yang terpajan bising.^{5,6} Sebuah studi ketulian pada pekerja pabrik di Jepang mendapatkan bahwa merokok dan pajanan bising mempunyai sifat yang sinergis terhadap terjadinya penurunan pendengaran

pada pekerja yang terpajan bising dengan *odds ratio* 2,56.⁷ Peneliti lain menyatakan bahwa faktor risiko penyebab penurunan pendengaran adalah penyakit kardiovaskuler, diabetes mellitus, merokok dan kadar lemak dalam darah.⁸

Jumlah perokok di seluruh dunia sangat bervariasi di berbagai negara. Prevalensi perokok laki-laki di negara Pasifik barat cukup tinggi, yaitu di Korea Selatan (68%), China (61%) dan Jepang (59%). Pada perempuan terdapat perbedaan yang sangat tajam antara negara maju (24%) dan negara berkembang (7%). Di banyak negara jumlah perokok muda bertambah, di Inggris pada usia 15 tahun 28% laki-laki dan 33% perempuan adalah perokok.¹² Di Indonesia jumlah laki-laki perokok di atas 15 tahun berkisar 50%-59%, sedangkan perbandingan antara laki-laki dan perempuan perokok adalah 10:1.¹⁰

Menurut sejarah, tembakau yang merupakan unsur utama komponen rokok, secara alamiah dapat tumbuh hampir di seluruh dunia, pertama kali dibudidayakan oleh masyarakat Indian sebelum Columbus menemukan benua Amerika tahun 1492. Masyarakat Indian menggunakan tembakau dengan menghisap lewat pipa, mengunyah dan menghirup langsung serbuk tembakau. Kandungan dalam tembakau terdapat bahan alkaloid yang penting, yaitu nikotin.¹¹

Banyak penelitian membuktikan bahwa kebiasaan merokok menyebabkan kelainan pada pembuluh darah dan merupakan salah satu faktor risiko pada penyakit jantung koroner, penyakit ginjal, penyakit pembuluh darah perifer, dan otak, serta berat badan lahir rendah pada anak dengan ibu perokok.¹²⁻¹⁶ Beberapa zat yang terkandung dalam asap rokok seperti antara lain: nikotin, karbon monoksida dan nitrit oksida diduga berperan pada terjadinya aterosklerosis pembuluh darah.¹⁷⁻²¹

Koklea adalah organ tubuh yang bekerja terus menerus sehingga siap melaksanakan proses pendengaran selama 24 jam, menerima vaskularisasi dari arteri yang sangat kecil (a. koklearis) tanpa sistem kolateral dan stria vaskularis yang merupakan sumber energi untuk sel-sel rambut di organ Corti bersifat sebagai *end artery*. Kerusakan pembuluh darah ke koklea menyebabkan gangguan vaskularisasi ke koklea, mengakibatkan gangguan suplai nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan oleh sel-sel di koklea untuk menjalankan fungsinya.^{22,23} Beberapa peneliti berpendapat, bahwa penyakit kardiovaskuler merupakan faktor risiko gangguan pendengaran.^{24,25} Peneliti lain berpendapat bahwa merokok selain sebagai faktor risiko pada penyakit kardiovaskuler juga berpengaruh pada gangguan pendengaran.^{6,7,26}

METODE

Desain pada penelitian ini adalah *post test only experimental*, pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2004 sampai bulan Februari 2005 di Unit Pelaksana Hewan Percobaan (UPHP) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Kriteria inklusi: tikus putih yang berumur 12 minggu, merupakan keturunan induk yang sama dari galur *Sprague-Dowley*, berjenis kelamin jantan, dinyatakan sehat oleh dokter hewan.

Jumlah sampel sebanyak 20 ekor, dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok dipajan asap rokok (intervensi) dan kelompok kontrol (tanpa pajanan rokok) masing-masing 10 ekor. Setiap tikus masing-masing kelompok dimasukkan ke kandang yang berukuran 50x30x20 cm. Di setiap kandang disediakan makan dan minum yang bisa diakses oleh tikus setiap saat.

Terhadap kelompok intervensi diberikan pajanan asap rokok sehari 2 kali, pada pagi hari dan siang hari, setiap hari kerja selama 6 bulan. Setiap kali pajanan digunakan 2 batang rokok sigaret standar tanpa filter yang asapnya diarahkan ke kandang menggunakan alat penghisap rokok. Selama proses pajanan, bagian atas kandang ditutup selama 1 jam. Kelompok kontrol ditempatkan di tempat yang bebas dari pajanan asap rokok. Pada kedua kelompok yang dibandingkan terdapat masing-masing 1 sampel mati sebelum akhir masa *follow up*.

Pada akhir masa pajanan, tikus dimatikan dan diambil

tulang temporalnya untuk dibuat preparat dan diperiksa kokleanya secara histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Variabel yang diukur adalah jumlah kerusakan histopatologis yang terjadi pada koklea. Perbedaan jumlah kerusakan yang terjadi pada kedua kelompok dianalisis statistik menggunakan Fisher's *exact test*.

HASIL

Pada seluruh tikus kelompok kontrol, tidak didapatkan kelainan histopatologik koklea, sedangkan pada kelompok intervensi didapatkan kelainan histopatologik. Hasil pemeriksaan histopatologi pemeriksaan koklea kelompok intervensi berupa kongesti kapiler, nekrosis endotel, pembentukan *foam cells*, degenerasi vakuoler dan nekrosis sel rambut getar (Tabel 1).

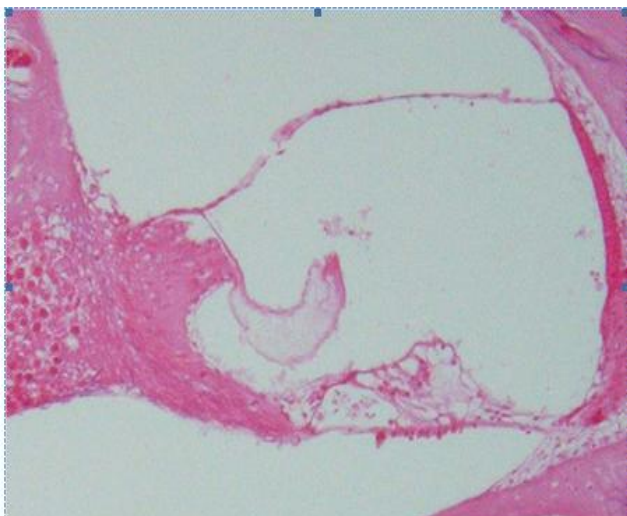
Seperti terlihat pada Tabel 1, kerusakan sel yang terjadi mulai dari derajat kerusakan sel yang paling ringan sampai yang paling berat, mulai dari kongesti kapiler, *foam cell*, sampai nekrosis sel rambut. Gambar 1 menunjukkan koklea normal tikus kelompok kontrol, sedangkan kelainan pada tabel diatas dapat divisualisasikan secara patologi anatomi seperti pada Gambar 1 sampai 5 yaitu: nekrosis endotel, degenerasi vakuoler, degenerasi stria vaskularis, dan *foam cell*. Berdasarkan perhitungan *relative risk* untuk terjadi kerusakan pada koklea akibat asap rokok bisa dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Kerusakan pada pemeriksaan histopatologi koklea kelompok pajanan

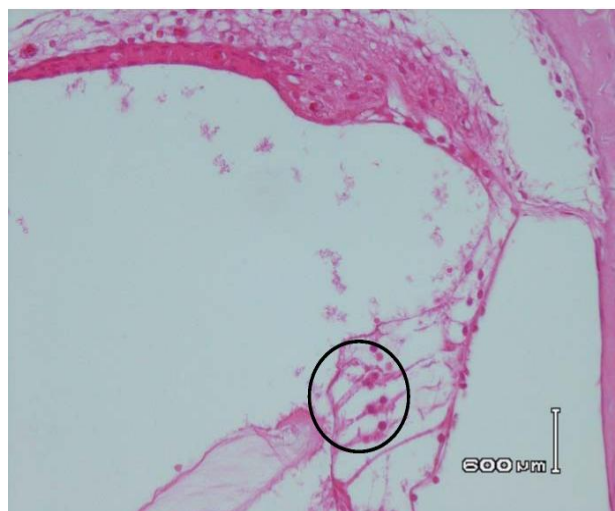
Kelainan histopatologi	Kelompok intervensi		Kelompok kontrol	
	Nomer tikus	Jumlah (%)	Nomer tikus	Jumlah
Kongesti kapiler	3,4,9	3 (33,3)	-	-
Nekrosis endotel	1,6	2 (22,2)	-	-
<i>Foam cell</i>	8	1 (11,1)	-	-
Degenerasi vakuoler	2	1 (11,1)	-	-
Nekrosis sel rambut	2	1 (11,1)	-	-
Normal	5,7	2 (22,2)	1,2,3,4,5,6,7,8,9	9

Tabel 2. Hasil perhitungan *relative risk* (RR) kerusakan koklea antara kelompok intervensi dan kontrol

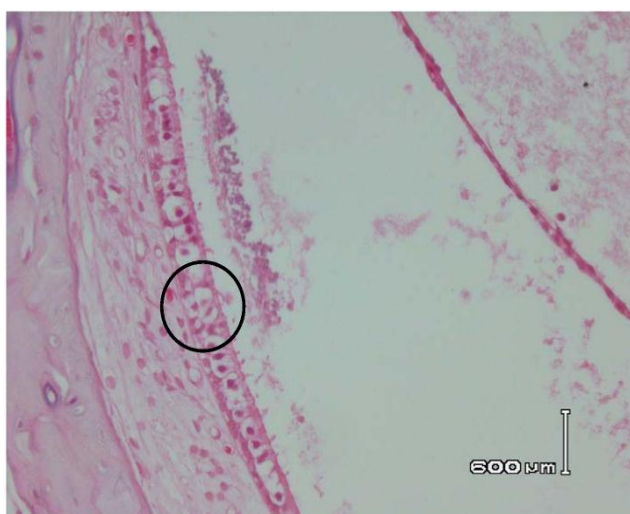
Kelompok	Pemeriksaan PA		<i>Relative Risk</i> (RR)	95% CI
	Kerusakan (+)	Kerusakan (-)		
Intervensi	7	2	3,5	0,66 – 34,53
Kontrol	0	9		



Gambar 1. Potongan koklea normal



Gambar 2. Nekrosis sel rambut (lingkaran)



Gambar 3. Degenerasi vakuoler (lingkaran)



Gambar 4. Degenerasi stria vaskularis (lingkaran)



Gambar 5. *Foam cell* (lingkaran)

PEMBAHASAN

Kerusakan koklea secara patologi anatomi yang terjadi menggambarkan tingkat kerusakan sel. Hal ini disebabkan oleh gangguan vaskularisasi yang mengakibatkan gangguan suplai oksigen dan nutrisi. Jenis kerusakan terbanyak adalah kongesti kapiler (33,3%). Kongesti kapiler yang terjadi merupakan proses awal sebagai respon terhadap adanya perlukaan (*injury*). Disfungsi endotel yang disebabkan perlukaan akan mengakibatkan respon kompensasi sehingga mempengaruhi kemampuan homeostasis normal dari endotel. Perlukaan selanjutnya meningkatkan daya adhesif endotel terhadap lekosit dan platelet serta terjadinya perubahan permeabilitas. Disfungsi endotel ditandai dengan gangguan keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi, mediator anti dan pro koagulan, atau faktor yang meningkatkan dan menghambat pertumbuhan. Jika respon inflamasi tidak efektif untuk menetralkan/menghilangkan agen penyebab perlukaan maka prosesnya akan berlanjut sampai terjadi lesi.²⁷⁻³¹

Kerusakan yang terjadi pada tingkat awal bersifat tidak menetap (*reversible*) sehingga masih ada kemungkinan membaik kembali dengan suplai oksigen dan nutrisi yang cukup. Tingkat kerusakan sel yang paling berat adalah nekrosis endotel (22,2%), nekrosis sel rambut (10%). Bila sudah terjadi nekrosis, sel tidak bisa kembali normal maupun diperbaiki lagi (*irreversible*) meskipun diberi oksigen dan nutrisi yang cukup. Pada kelompok intervensi juga didapatkan 2 ekor tikus dengan morfologi koklea normal. Hal ini dimungkinkan karena kerusakan masih minimal sehingga belum berakibat pada kerusakan struktur, tetapi kelainan secara biokimiawi atau enzimatis mungkin sudah ada, yang hanya bisa dideteksi dengan pemeriksaan histokimia atau biomolekuler.^{27,28}

Dari tabel 2x2 (Tabel 2) didapatkan hasil 7 dari 9 (77,7%) tikus kelompok intervensi terdapat kerusakan histologik. Kerusakan yang didapat sesuai dengan urutan tingkat kerusakan yang terjadi pada sel akibat keadaan hipoksia.^{27,28} *Relative risk* pada tikus yang mendapat pajanan asap rokok untuk mengalami kerusakan secara histopatologis adalah 3,5 (95% CI: 0,66-34,53) dibanding tanpa pajanan asap rokok.

Penelitian pada primata bukan manusia memperlihatkan bahwa adhesi lekosit pada endotel pembuluh darah merupakan keadaan/lesi awal kejadian aterosclerosis yang kemudian akan diikuti oleh migrasi lekosit terutama monosit dan LDL teroksidasi yang akan membentuk *fatty streak* yang kemudian oleh makrofag diubah menjadi *foam cell*.^{29,32} Pada penelitian pengaruh asap rokok terhadap terjadinya hiperplasi tunika intima arteri karotis pada tikus, didapatkan hubungan antara

dosis paparan asap rokok dengan kejadian hiperplasia. Semakin banyak jumlah rokok yang diberikan semakin meningkat kejadian hiperplasi tunika intima. Paparan 8 batang rokok perhari didapatkan prosentase perkembangan hiperplasi tunika intima sebesar $43,5 \pm 15,5$ kali.³² Studi *in vivo* lain pada hamster yang bertujuan untuk mengetahui efek kronis nikotin terhadap endotel pada reaktivitas resistensi arteriol dengan cara injeksi nikotin dengan dosis yang sama besar dengan kadar nikotin pada perokok, didapatkan hasil terjadi gangguan endotel pada proses dilatasi arteriol.³³

Studi pada manusia tentang rokok sebagai faktor risiko pada kelainan kardiovaskuler di Itali meneliti fungsi ginjal pada orang tua dengan periode *follow-up* rata-rata 3,6 tahun. Hasilnya dari 5 faktor risiko yang diteliti yaitu umur, hipertensi, diabetes, kadar fibrinogen dan kebiasaan merokok menunjukkan bahwa faktor risiko yang paling besar adalah kebiasaan merokok dengan OR 2,3 (CI 95%: 1,2-5,3).³⁴ Pengaruh rokok langsung pada pembuluh darah telah diteliti dengan melibatkan partisipan yang cukup besar yaitu sebanyak 10.914 orang dengan cara mengukur ketebalan tunika-media arteri karotis. Setelah *follow-up* 3 tahun didapatkan hasil bahwa perokok sigaret berhubungan dengan 50% peningkatan progresifitas aterosklerosis.³⁵

Hubungan antara merokok terhadap penurunan pendengaran telah diteliti pada beberapa penelitian, walaupun masih berbarengan dengan pengaruh pajanan bising.⁵⁻⁷ Studi populasi tidak terpajan kebisingan, penurunan pendengaran frekuensi 500, 1000, 2000 dan 4000 kHz pada kelompok terpajan (kebiasaan) merokok mempunyai OR: 1,69 (95%: 1,31-2,17) dibanding kelompok kontrol (tidak terpajan rokok), sedangkan pada populasi terpajan kebisingan didapatkan OR perokok aktif dibanding perokok pasif sebesar 1,94 (95% CI: 1,00-3,74).^{30,36,37}

Perdebatan tentang besarnya dosis rokok yang dapat menyebabkan atau menimbulkan kerusakan endotel sudah mulai terdapat kesamaan pendapat. Studi tentang tipe rokok, jenis rendah tar, rendah nikotin atau yang biasa (*full flavour*), jumlah batang rokok per hari, aktif atau pasif, semuanya jauh lebih berisiko untuk terjadinya kerusakan endotel dibandingkan tanpa asap rokok.³⁸

Setelah terjadi paparan asap rokok akan membuat keadaan hipoksia relatif karena adanya ikatan gas CO dengan hemoglobin. Keadaan ini menimbulkan stres oksidatif yang diduga sebagai faktor penentu kejadian disfungsi endotel.⁴³ Keadaan hipoksia relatif juga akan menghasilkan produksi oksigen radikal dalam tubuh.⁴⁴ Seperti telah diketahui bahwa radikal oksigen selain mempunyai fungsi khusus pada makhluk hidup, juga bersifat toksik bagi sel, seperti menghidrolisis lipid,

mengganggu fungsi dan memecahkan struktur enzim, menghambat pembentukan ATP dan menghancurkan DNA.^{38,39}

Pada penelitian ini tikus diberi pajanan asap rokok 2 kali sehari, 2 batang rokok setiap pajanan, setiap hari kerja selama 6 bulan. Walaupun sebagai perokok pasif ternyata didapatkan perubahan secara histopatologis pada potongan koklea yaitu 7 dari 9 ekor (77,77%). Hal ini sesuai dengan hasil yang didapatkan oleh Cruickshanks *et al.* bahwa risiko kecenderungan perokok pasif untuk menderita penurunan pendengaran sebesar 1,94 kali.⁴⁰

Temuan pada penelitian ini yaitu asap rokok berpengaruh pada kerusakan integritas histologi koklea, tingkat kelainan berupa kongesti kapiler, nekrosis endotel, *foam cel*, nekrosis stria vaskularis, degenerasi vakuoler dan nekrosis sel rambut. Dari hasil ini dapat diambil interpolasinya karena adanya kesesuaian struktur koklea tikus dengan koklea manusia, bahwa kebiasaan merokok sangat mungkin dapat menyebabkan kerusakan koklea pada perokok yang akan berakibat pada penurunan pendengaran, seperti hasil yang didapat pada studi-studi terdahulu yang mendapatkan adanya hubungan antara merokok dengan penurunan pendengaran.^{5,6,7,40}

SIMPULAN

Secara pemeriksaan histopatologis asap rokok berpengaruh pada kerusakan integritas histologis koklea. Kerusakan koklea pada kelompok pajanan asap rokok lebih banyak dibanding dengan kelompok kontrol dengan *relative risk/RR* sebesar 3,5 (95% CI: 0,66-34,53). Disarankan agar dilakukan penelitian berikutnya dengan melakukan pemeriksaan fungsi pendengaran sebelum dan sesudah pajanan, misalnya dengan menggunakan *otoacoustic emission* (OAE), sehingga bisa dibuktikan secara klinis adanya *sensory hearing loss* dengan dasar bukti kelainan histologis pada koklea.

DAFTAR PUSTAKA

- Espmark AK, Rosenhall U, Erlandsson S, Steen B. The two faces of presbycusis: hearing impairment and psychosocial consequences. *Int J Audiol.* 2002;4:125-35.
- Soewito A. Peran indera pendengar dalam kehidupan manusia. Seminar pendengaran pada usia lanjut. Yogyakarta 2003.
- Jennings CR, Jones NS. Presbycusis: review article. *J Laryngol Otol.* 2005;115:171-8.
- Oeken J, Lenk A, Bootz F. Influence of age and presbycusis on DPOAE. *Acta Otolaryngol.* 2006;120:396-403.
- Barone JA, Peters JM, Garabrant DH, Bernstein L, Krebsbach R. Smoking as a risk factor in noise induced hearing loss. *J Occup Med.* 2005;29:741-5.
- Starck J, Toppila E, Pyykko I. Smoking as a risk factor in sensory neural hearing loss among workers exposed to occupational noise. *Acta Otolaryngol.* 2005;119: 302-5.
- Mizoue T, Miyamoto T, Shimizu T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. *Occup Environ Med.* 2003;60:56-9.
- Gates GA, Cobb JL, D'Agostino RB, Wolf PA. The relation of hearing in elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;119:156-61.
- Fagrestrom K. The epidemiology of smoking: health consequences and benefit of cessation. *Drugs.* 2002;62 (Suppl):1-9.
- World Health Organization. Tobacco control. World Health Organization. New York. 2004.
- Sapundzhiev N, Werner JA. Nasal snuff: historical review and health related aspects. *J Laryngol Otol.* 2003;117:686-91.
- Thomas AR, Hedberg K, Fleming DW. Comparison of physician based reporting of tobacco attributable deaths and computer derived estimates of smoking attributable death, Oregon, 1989 to 1996. *Tob Control.* 2001;10: 161-4.
- Kuo-Meng L, Chien-Jen C. Mortality attributable to cigarette smoking in Taiwan: a 12-year follow-up study. *Tob Control.* 2004;7:141-8.
- Prescott E, Scharling H, Osler M, Schnohr P. Importance of light smoking and inhalation habits on risk of myocardial infarction and all cause mortality: A 22 year follow up of 12 149 men and women in The Copenhagen City Heart Study. *J Epidemiol Community Health.* 2002;56:702-6.
- Enstrom JE, Kabat GC. Environmental tobacco smoke and tobacco related mortality in a prospective study of Californians, 1960-98. *BMJ.* 2003;326:1-10.
- Marin R, Fernandez-Vega F, Escalada P, Estevan JM, Barreiro A, Alvarez J. Cardiovascular risk factors in peripheral arterial disease: A study of 403 cases, *Rev Clin Esp.* 2003;193:357-62.
- Novo S. Classification, epidemiology, risk factors, and natural history of peripheral arterial disease. *Diabetes Obes Metab.* 2002;4(Suppl):S1-S6.
- Bleyer AJ, Shemanski LR, Burke JL, Hansen KJ, Appel RG. Tobacco, hypertension, and vascular disease: risk factors for renal functional decline in an older population. *Kidney Int.* 2000;57:2072-9.
- Lhotta K, Rumpelt HJ, Konig P, Mayer G, Kronenberg F. Cigarette smoking and vascular pathology in renal biopsies. *Kidney Int.* 2002;61:648-54.
- Hadjieva DI, Minevab PP, Vukova MI. Multiple modifiable risk factors for first ischemic stroke: a population-based epidemiological study. *Eur J Neurol.* 2003;10:577-82.

21. Stephanie J, Ventura MA, Hamilton BE, Mathews TJ, Chandra A. Trends and variations in smoking during pregnancy and low birth weight: evidence from the birth certificate, 1990-2000. *Pediatrics*. 2003;111:1176-80.
22. Nair S, Kulkarni S, Camoens HMT, Ghosh K, Mohanty D. Changes in Platelet glycoprotein receptors after smoking-a flow cytometric study. *Platelet*. 2001;12:20-6.
23. Santi AP, Mancini P. Cochlear anatomy and central auditory pathway. In Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE. Editors. *Otolaryngology head and neck surgery*. [CD-ROM]. St. Louis: Mosby Inc; 1999.
24. Pyykko I, Koskimies K, Starck J, Pekkarinen J, Inaba R. Evaluation of factors affecting sensory neural hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 2003;449(Suppl):155-158.
25. Cadoni G, Agustino S, Scipione S, Galli J. Low serum folat levels: A risk faktor for sudden sensorineural hearing loss? *Acta Otolaryngol*. 2004;124:608-11.
26. Itoh A, Nakashima T, Arao H, Wakai K, Tamakashi A, Kawamura T, *et al*. Smoking and drinking habits as risk factors for hearing loss in the elderly: epidemiological study of subjects undergoing routine health checks in Aichi, Japan. *Public Health*. 2001;115:192-6.
27. Anderson WAD, Scotti TM. Cell injury and genetic disorder. In synopsis of pathology 10th ed. St. Louis: Mosby Co. 1980:1-21.
28. Anderson Jr. Cell damage. In Muir's text book of pathology 10th ed. London: Edward Arnold Pub Ltd. 1976:1-32.
29. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 2006;340(2):115-26.
30. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis atherosclerosis. *Int Angiol*. 2002;21:109-16.
31. Ogita H, Liao JK. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. 2004;11:123-32.
32. Fern GAA, Lamb DJ. Coronary heart disease: pathophysiological events and risk factors. *Nutr Bull*. 2001;26:213-18.
33. Petrik PV, Gelabert HA, Moore WS, Quinones-Baldrich W, Law MM. Cigarette smoking accelerates carotid artery intimal hyperplasia an a dosedependent manner. *Stroke*. 2005;26:1409-14.
34. Mayhan WG, Sharpe GM. Chronic exposure to nicotine alters endothelium dependent arteriolar dilatation: effect of superoxide dismutase. *J. Appl. Physiol*. 1999;86(4): 1126-34.
35. Bagio B, Budakovic A, Perissinoto E, Maggi S, Cantaro S, Enzi G, *et al*. Atherosclerotic risk factors and renal function in elderly: the role of hyperfibrinogenaemia and smoking. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;20:114-23.
36. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GK, McGovern P, *et al*. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: the atherosclerosis risk in communities study. *JAMA*. 1998;119-24.
37. Hoshijima H, Makimoto K. Decrease in cochlear blood flow with infusion of nitric oxyde synthase inhibitor and its recovery with L-arginin infusion: comparison with abdominal blood flow and auricular blood flow. *Acta Otolaryngol*. 2002;122:808-15.
38. Ido Y, Chang KC, Lejeune WS, Bjercke RJ, Reiser KM, Williamson JR, *et al*. Vascular dysfunction induced by age is mediated by VEGF via mechanisms involving reactive oxygen species, guanylate cyclase, and protein kinase C. *Microcirculation*. 2001;8:251-63.
39. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Stamatelopoulos KS, Karatzis EN, Protogerou AD, Papaioannou TG, *et al*. Endothelial dysfunction and type of cigarette smoked: the impact of light versus regular cigarette smoking. *Vasc Med*. 2004;9:103-5.
40. Hitka P, Vizek M, Wilhelm J. Hypoxia and reoxygenation increase H2O2 production in rats. *Exp Lung Res*. 2003;29:585-92.
41. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BEK, Wiley TL, Nondahl DM, Tweed TS. Cigarette smoking and hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. *JAMA*. 1998;279(21):1715-9.