

Tiner ile Çalışan Kişilerde Tiner Solumanın Antioksidan Vitaminler Üzerine Etkisi

Effect of Thinner Inhalation on Antioxidant Vitamins in Individuals Working with Thinner

İhsan HALİFEOĞLU¹

Fikret KARATAŞ²

Bilal ÜSTÜNDAĞ¹

Halil CANATAN¹

Necip İLHAN¹

Özet

Hücrelerde enzimatik olmayan birçok savunma sistemleri vardır. Lipid ve sıvı faz antioksidanlar, serbest radikalleri toplayarak hücreleri hasardan korurlar. Bu çalışmada, meslekleri gereği tiner teneffüsüne maruz kalan insanlarda (n:18) ve sağlıklı kontrollerde (n:18) malondialdehit (MDA, lipid peroksidasyonunun ürünü), ve bazı antioksidan vitamin (vitamin E, A ve C) düzeyleri araştırıldı. MDA düzeyleri kolorimetrik olarak, vitamin düzeyleri ise HPLC ile saptandı. MDA düzeylerinde tiner ile çalışan insanlarda (1.980 ± 0.669 nmol/ml), kontrollere göre (1.033 ± 0.285 nmol/ml) istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Diğer yandan, tiner teneffüsüne maruz kalan işçilerde vitamin E (6.420 ± 0.790 µg/ml) ve vitamin A (44.603 ± 8.175 µg/dl) seviyelerinde kontrollere göre (vitamin E: 8.630 ± 1.590 µg/ml, vitamin A: 58.860 ± 8.840 µg/dl) anlamlı bir düşüş ($p < 0.001$) görüldü. Benzer bir eğilim vitamin C seviyelerinde de (tinere maruz kalanlar: 9.87 ± 0.14 µg/ml, kontrol: 13.12 ± 13.77 µg/ml) gözlemlendi ($p < 0.01$). Biz inanmaktayız ki; MDA düzeylerinde önemli bir artış olduğu zaman antioksidan vitamin düzeylerindeki anlamlı düşüş, antioksidan cevabın bir göstergesidir.

Anahtar kelimeler: Tiner, MDA, antioksidan vitaminler

Abstract

There are several non-enzymatic defence mechanisms in cells. Lipid and liquid phase antioxidants protect cells from damage by collecting free radicals. In this study, we examined malondialdehyde (MDA, product of lipid per-

oxidation), and some antioxidant vitamin (vitamin E, A and C) levels in people (n:18) who were exposed to thinner inhalation during their jobs and healthy subjects (n:18). MDA and vitamin levels were determined colorimetrically and by HPLC, respectively. We observed a statistically significant increase ($p < 0.001$) in MDA levels in people working with thinner (1.980 ± 0.669 nmol/ml) compared to control subjects (1.033 ± 0.285 nmol/ml). On the other hand, there was a significant reduction ($p < 0.001$) in vitamin E (6.420 ± 0.790 µg/ml) and vitamin A (44.603 ± 8.175 µg/dl) levels in workers exposed to thinner inhalation compared to controls (vitamin E: 8.63 ± 1.59 µg/ml, vitamin A: 58.860 ± 8.84 µg/dl). A similar trend was also observed in vitamin C levels [($p < 0.01$), thinner exposed: 9.870 ± 0.14 µg/ml versus controls: 13.120 ± 13.770 µg/ml]. We believe that this significant reduction in antioxidant vitamin levels when there is significant increase in MDA levels is an indicator of antioxidant response.

Key words. Thinner, MDA, antioxidant vitamins

GİRİŞ

Vitaminler, organizmada çok sayıda biyokimyasal ve fizyolojik olaylara katılarak vücudun normal fonksiyonlarının yerine getirilmesinde çok önemli yer tutarlar. Bu nedenle insanların fiziksel, mental ve sosyal yönden sağlıklı ve üretken olabilmeleri için temel besin maddeleri ile birlikte bütün vitaminlerin gerekli miktarlarda alınmaları gerekmektedir (1). Reaktif oksijen metabolitlerinin

1 Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı ELAZIĞ
2 Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü ELAZIĞ



meydana getirebileceği hasarlar antioksidan enzimlerle önlenirken, antioksidan maddeler bu hasarları sınırlandırmaya çalışırlar (2). Katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler, oldukça reaktif hidrksillerin hasar yapıcı etkilerine karşı sınırlı ve direkt bir savunma sağlayabilirler. Bununla birlikte vitamin E ve vitamin C gibi çok sayıda düşük molekül ağırlığına sahip serbest radikal temizleyicileri de reaksiyona girerek onları daha az zararlı ve kararlı türlerine dönüştürebilirler (3). A vitaminin öncüsü olan β -karoten de serbest radikal tutucusu olarak görev yapar ve doku hasarını önlemeye çalışır (4).

Boyacı tineri endüstride oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tiner soluma bağımlılık da yapmakta ve tiner bağımlısı olarak hergün topluma yeni üyeler katılmaktadır. Bu organik çözücünün toksik etkisi reaktif oksijen bileşiklerinin (reactive oxygen species, ROS) oluşması şeklinde ortaya çıkmakta ve bu reaktif oksijen bileşikleri biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açarak hasar meydana getirmektedirler (5,6). Besinsel bir antioksidan olan vitamin E, serbest radikal temizleyicisi olarak fonksiyon gösterir ve membranlarda lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidan vitamin prostasiklin oluşumunu artırır ve tromboksan üretimini azaltır (7). Kalp krizi geçiren veya bypass olan kişilere günlük olarak oral yol ile verilen vitamin C, E ve β -karotenin önemli derecede plazma lipid peroksidasyonunu azalttığı izlenmiştir (8). Hipreoksiye maruz kalan ratlar üzerinde yapılan araştırmada membran permabilitesinin arttığı ve tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS) düzeyinin sinaptik plazma membranında yükselme gösterdiği, ama intraperitoneal olarak uygulanan vitamin E'nin bu anormalliği azalttığı gözlenmiştir. Buradan hareketle oksidatif stresin sebep olduğu sinir uçlarındaki disfonksiyonlara karşı vitamin E'nin koruyucu mekanizmaya katkıda bulunduğu anlaşılmıştır (9). Gebe diabetik ratlar üzerinde yapılan bir başka araştırmada ise vitamin C'nin plasentada α -tokoferol konsantrasyonunu artırdığı ve gebe rata ait yüksek olan serum TBARS düzeyini azalttığı görülmüştür (10). Vitamin C (askorbik asit) insanlar tarafından sentezlenemediğinden esansiyel bir vitamindir. Askorbik asit, kollagen biyosentezinde kullanılan prolin hidroksilaz ve dopamini noradrenaline dönüştüren dopamin β -hidroksilaz için önemli bir kofaktördür. Aynı zamanda güçlü bir elektron vericisi ve do-

layısıyla antioksidan olan vitamin C, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yolu ile dehidroaskorbik asidi (DHA) oluşturur. DHA daha sonra dehidroaskorbat redüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla glutatyon tarafından rejenere edilir. Böylece vitamin C serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapar (3).

Bu çalışma, meslekleri gereği boya işinde çalışan ve boyayı inceltmek için tiner kullanan ve dolayısıyla daima tiner solumaya maruz kalan kişilerde, tinerin etkisini incelemek amacıyla planlandı. Bu amaçla lipid peroksidasyonunun bir ara ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyi ile organizmanın enzimatik olmayan savunma sisteminde görev alan antioksidan vitaminler olan E, C ve A düzeyleri tespit edildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma materyali sanayide çalışan boya işçilerinden sağlandı. Çocukluk dönemlerinden beri aynı işte çalışan ve yaş ortalaması 30.0 ± 8.8 yıl olan 18 kişilik bir grup oluşturularak kararlaştırılan tarihte laboratuvara aç gelmeleri sağlandı. Kontrol grubu olarak da yaş ortalaması 26.0 ± 5.5 yıl olan ve büro işinde çalışan 18 kişilik diğer bir grup oluşturuldu. Her iki grubu oluşturan kişilerden, standart bir açlık süresinden sonra, 5 ml kan alındı. Alınan kanlar hemen gerekli işleme tabi tutularak serumları ayrıldı. Hem kontrol hem de tiner ile çalışan kişilerde sigara içme oranı %72,2 (13'er kişi) olarak tespit edildi. Serum lipid peroksit düzeyi kolorimetrik olarak Satoh (11) ve Yagi (12)'den modifiye edilen tiyobarbitürik asit yöntemi ile ölçüldü. Vitamin E, C ve A düzeyleri ise HPLC (high performance liquid chromatography = yüksek performanslı sıvı kromatografi) ile saptandı. Vitamin E ve A için derin dondurucudan alınan serum örnekleri karanlıkta çözüldükten sonra etanol ile proteinler çöktürüldü ve hekzan ile muamele edilerek vitamin A ve E hekzan fazına alındı. Hekzan fazı azot gazı ile uzaklaştırıldı ve daha sonra örnekler metanolde çözülerek analize hazır hale getirildi ve HPLC uygulamasına geçildi (13-15). Vitamin C tayini için ise serum örnekleri $HClO_4$ ile muamele edilerek proteinler çöktürüldü ve daha sonra HPLC ile tayin edildi (16,17).

Bu çalışmada deneysel olarak elde edilen veriler ortalama \pm standard sapma olarak gösterildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel olarak de-

ğerlendirilmesinde Student t testi kullanıldı.

BULGULAR

Tablo 1'de kontrol grubuna ve tinerle çalışan boya işçilerine ait serum MDA, antioksidan vitaminlerden E, C ve A düzeyleri görülmektedir.

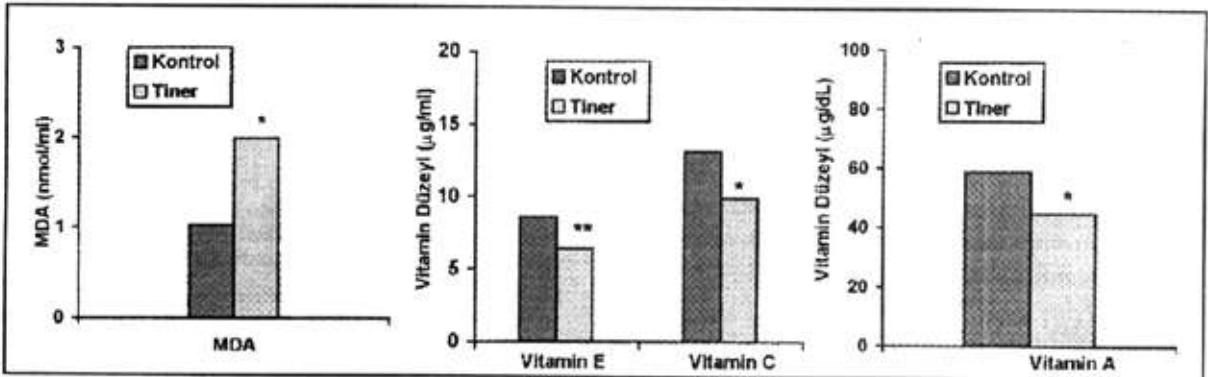
Tablodan da anlaşıldığı gibi MDA düzeyi kontrol grubuna göre tinerle çalışan gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Tablo I. Kontrol ve tinerle çalışan gruba ait MDA ve antioksidan vitamin değerleri

	Kontrol grubu (n=18) X±SD	Tinerle çalışan grup (n=18) X±SD	p
MDA (nmol/ml)	1.033±0.285	1.988±0.669	<0.001
Vitamin E (µg/ml)	8.63±1.590	6.42±0.790	<0.001
Vitamin C (µg/ml)	13.12±3.77	9.87±1.40	<0.01
Vitamin A (µg/dl)	58.86±8.840	44.603±8.175	<0.001

role göre anlamlı bir şekilde artış; antioksidan vitamin (E, C, A) düzeyleri de kontrol grubuna göre düşüş göstermekte olup, istatistiki olarak gruplar arasındaki farklılık oldukça anlamlıdır. Bu durum şekil 1'de daha belirgin olarak görülmektedir.

ölçebilmektedir. Verilerimiz ile bu konuda yapılmış deneysel çalışmalar arasında paralellik mevcuttur (5,6,19). Uzun süreli ve düşük dozlarda vitamin C, vitamin E ve β-karoten verilen yaşlılarda antioksidan defans sisteminin güçlendiği saptanmıştır. Çünkü vitamin E antioksidan olarak biyolojik membranlarda daha etkili olmakta ve doymamış yağ asitlerini ko-

ruyarak membran stabilitesine katkıda bulunmaktadır (20,21). β-karotenin etkisi ise singlet oksijen temizleyicisi olarak görülmektedir. Vitamin C ise serbest radikal temizleyicisi olup vitamin E'nin rejenerasyonu sağlamaktadır (20,22). Vitamin E'nin primer oksidasyon ürünü α-tokoferoksil ra-



Şekil 1. Tinerle çalışan grup ile MDA ve antioksidan Vitaminler. Tinerle çalışan grup kontrolle karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir farklılığın olduğu görülmektedir (*p<0.001, **p<0.01).

TARTIŞMA

Tiner, boyacılar tarafından inceltici olarak kullanılmaktadır. Tineri oluşturan kimyasal bileşiklerin içinde toluen oldukça geniş bir yer tutmakta olup, yaklaşık olarak %65 civarındadır (5,18). Toluenin serbest radikal oluşumunu artırdığı rapor edilmiştir (6,19). Bundan dolayıdır ki soluma yolu ile alınan toluenin metabolizma üzerinde etkisi oldukça fazladır. Ekstrasellüler antioksidanlar diyetle alınan vitamin E, vitamin C, karotenoidler ve glutatyondan oluşmaktadır. Tablo 1 ve Şekil 1'de görüldüğü gibi tiner inhalasyonu lipid peroksidasyonuna yol açmakta ve bu peroksidasyon, MDA (veya TBARS) olarak

dikalidir. α-tokoferoksil radikalinin artışı patolojiktir ama sağlıklı hücrelerde vitamin C tokoferoksil radikalini vitamin E'ye çevirir (22). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre serum lipid peroksidasyonu artarken antioksidan vitaminlerde azalma meydana gelmektedir. Doku düzeyinde yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir (22). Bir antioksidan cevap olarak vitamin düzeylerinde azalma meydana gelmiş olabileceği gibi diyet ile bu vitaminlerin alınması gerektiği göz önüne alınırsa bu azalmanın yeteri kadar vitamin alınıp alınmadığına bağlı olabileceği düşünülebilir. Ancak kan alma zamanımızın yaz mevsimi olması vitamin eksikliği



olasılığını azaltmakta olup, kişilerin beyanlarından da diyetle günlük vitamin ihtiyaçlarını karşıladıkları anlaşılmaktadır. Diğer taraftan hem kontrol hem de tiner ile çalışan grupta sigara içme oranı (%72.2) olduğundan, sigaranın serbest radikal konsantrasyonunda meydana getirebileceği artış (23), her iki grupta dengelenmiştir.

Sonuç olarak; tiner teneffüsüne maruz kalmış kişilerde lipid peroksidasyonu meydana gelmekte ve buna sebep olan ana kimyasal bileşik tinerin yapısında büyük oranda bulunan toluendir. Antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan vitamin E, vitamin C ve primer öncüsü β -karoten olan vitamin A düzeyleri anlamlı bir şekilde azalma göstermektedir. Kanaatimize göre vitaminlerin bu darantısı endojen antioksidan savunma sisteminde görevli SOD, GSH-Px ve katalaz gibi enzimlerin üzerindeki yükü hafifleterek membranların korunmasına katkı sağlamaktadır. Buradan hareketle; uçucu bileşiklerle çalışan sanayi işçilerinin, soluma yolu ile bu bileşiklerin toksik etkilerinden mümkün olduğu kadar az düzeyde etkilenmelerinin sağlanması için işverenler tarafından alınması gereken önlemlerin olacağına inanıyoruz. Bu önlemlerin başında maske kullanımının zorunlu hale getirilmesi; bu kişilerin günlük vitamin ihtiyaçlarının karşılanması ve, hepsinden önemlisi, bu meslekte veya benzeri işlerde çalışan kişilere kullandıkları kimyasal maddelerin önlem alınmadığı takdirde sağlığa olan olumsuz etkilerinin anlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Özer N (1996) Vitamin ve mineraller. Temel Biyokimya (Emerk K, Onat T (ed)) 1.baskı, s.785-819, Saray Kitabevi, İzmir.
2. Dormandy TL (1978) Free-radical oxidation and antioxidant. *Lancet* 1, 647-650.
3. Ererel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A (1992) Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi* 3, 243-250.
4. Burton GW, Ingold KU (1984) Beta-carotene: An unusual type of antioxidant. *Science* 224, 569-573.
5. Ulakoğlu EZ, Saygı A, Gümtiştaş MK, Özbek I, Kökoğlu E (1998) Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lung:relationship between histopathological properties. *Pharmacol. Res.* 38, 209-214.
6. Mattia CJ, LeBel CP, Bondy SC (1991) Effect of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem.Pharmacol.* 42, 879-882.
7. Ak H, Dingiloğlu NT, Habif S, Kültürçay H, Bayındır O, Onat T (1996) Plasma lipid peroxides, vitamin E, superoxide dismutase and glutathione alterations in coronary atherosclerosis. *Turk. J. Med. Sci.* 26, 11-15
8. Panczenko KB, Ziemiński S, Rudnicki S, Wojtulewicz I, Przepiórka M (1998) The influence of vitamin C and E or beta-carotene on peroxidative processes in persons with myocardial ischemia. *Pol. Merkuriusz Lek.* 4, 12-25.
9. Urano S, Sato Y, Dtonari T, Makabe S, Suzuki S, Ogata M, Endo T (1998) Aging and oxidative stress in neurodegeneration. *Biofactors* 7, 103-112.
10. Simon CM, Eriksson UJ (1997) Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia* 40, 1416-1424.
11. Satoh K (1978) Serum lipoperoxides in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 90, 37-43.
12. Yagi K (1984) Assay for plasma lipid peroxides. *Method in Enzymology* 109,328-331.
13. Çetinkaya N, Özcan H (1991) Investigation of seasonal variations in cow serum retinol and b32-carotene by high performance liquid chromatographic method. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, 1003-1008.
14. Catignani N (1983) Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin.Chem.*29, 708-712.
15. Miller KW, Lorr NA, Yang CS (1984) Simultaneous determination of plasma retinol, alpha-tocopherol, lycopene, alpha-carotene, and beta-carotene by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 138, 340-345.
16. Cerhata D, Bauerova A, Ginter E (1994) Determination of ascorbic acid in blood serum using high-performance liquid chromatography and its correlation with spectrophotometric (colorimetric) determination. *Ceska Slov Farm* 43, 166-168.
17. Tavazzi B, Lazzarino G, Di-Piero D, Giardina B (1992) Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of isolated post-ischemic rat heart. *Free Radic.Biol.Med.* 13, 75-78.
18. Zahlsen K, Rygnestad T, Nilsen OG (1985) Oral intake of a toluene-containing thinner. Effects and headspace gas chromatographic analytical diagnosis. *Arch. Toxicol. Suppl.* 8, 412-415.
19. Mattia CJ, Ali SF, Bondy SC (1993) Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol. Chem. Neuropathol.*18, 313-328.
20. Fleck CH, Haubold D, Hillmann T, Braunlich H (1997) Influence of vitamin E treatment on glutathione system after renal ischemia in immature and adult rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 49, 81-86.
21. Girodon F, Balache D, Monget AL, Lombart M, Brunet-Lecompte P, Arnaud J, Richard MJ, Galan P (1997) Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J. Am. Coll. Nutr.*16, 357-365.
22. Dyatlov VA, Makovetskaya VV, Leonhard R, Lawrence DA, Carpenter D (1998) Vitamin E enhances Ca²⁺-mediated vulnerability of immature cerebellar granule cell to ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 793-802.
23. Melhus H, Micha IK, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S (1999) Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J. Bone Miner. Res.* 14, 129-135.

Tiyosiyanatın Sıçanlarda In Vivo Doku Bakır ve Çinko Dağılımlarına Etkisi

Effect of Thiocyanate on the In Vivo Distribution of Copper and Zinc in Rat Tissues

H. Hakan AYDIN¹

Canan ÇOKER²

Biltan ERSÖZ¹

Gülriiz MENTEŞ¹

Özet

Toksik bir anyon olan tiyosiyanatın (SCN^-), sigara dumanı veya endüstriyel kirliliklere bağlı olarak iz element metabolizmasında ortaya çıkan olası dengesizliklerden sorumlu olabileceği varsayılarak tiyosiyanat ile esansiyel iz elementlerden bakır (Cu) ve çinkonun (Zn) doku dağılımları arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla iki ayrı sıçan grubuna sırası ile 60 mg/kg/gün ve 120 mg/kg/gün tiyosiyanat subkütan olarak 15 gün süre ile verilmiş ve bu sürenin sonunda karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası dokularında Cu ve Zn konsantrasyonları ölçülmüştür. Kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada karaciğer dokusu ve iskelet kasındaki Cu konsantrasyonları her iki grupta da anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). Zn konsantrasyonunun ise sadece yüksek doz tiyosiyanat enjeksiyonu sonrası iskelet kasında arttığı saptanmıştır ($p<0.01$). Böbrek ve kalp dokularında Cu ve Zn düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmamıştır. Elde edilen sonuçlar tiyosiyanatın esansiyel iz elementler olan bakır ve çinkonun doku dağılımlarını bir dereceye kadar etkileyebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Tiyosiyanat, bakır, çinko, doku dağılımı, sıçan

Abstract

Thiocyanate (SCN^-) a toxic anion which is generated during smoking or by environmental pollution may be responsible for perturbations in the metabolism of trace elements. Taking in to consideration these possible effects of thiocyanate in this study the interaction between this anion

and the tissue distribution of copper (Cu) and zinc (Zn) both essential trace elements is investigated. Rats were divided into three groups ($n=10$); Group A and B received 60 mg/kg/day and 120 mg/kg/day thiocyanate respectively for 15 days where as saline was injected to controls subcutaneously in the same interval. After rats were killed by decapitation Cu and Zn levels were determined in hepatic, renal and cardiac tissues as well as skeletal muscle. Hepatic tissue and skeletal muscle Cu levels were found to be elevated in both groups ($p<0.05$ and $p<0.01$ respectively) with respect to controls. However, an increase in Zn could only be noted in skeletal muscle specimens of Group B ($p<0.01$). No significant variations in Cu and Zn could be detected in the SCN^- treated rats with respect to myocardial and renal tissues. This study implies that thiocyanate has to some extent an effect in the in vivo distribution of Cu and Zn.

Key Words: Thiocyanate, copper, zinc, tissue distribution, rat

GİRİŞ

Tiyosiyanat (SCN^-) sigara dumanını soluma veya endüstriyel kirlilikler nedeni ile maruz kalınabilen ve toksik bir madde olan hidrojen siyanürün daha az toksik olan temel metabolitidir. Hidrojen siyanür mitokondrilerde bulunan ve rodanaz olarak isimlendirilen, transferaz grubu bir tiyosulfataz aracılığı ile tiyosiyanata çevrilir (1,2). Oluşan tiyosiyanat bir peroksidaz ile tekrar siyanüre dönüşebilir. Gelişmiş ülkelerde tiyosiyanatın esas kaynağı sigara içimidir.

1 Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

2 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.



Bunun yanı sıra özellikle bazı Afrika ülkelerinde tiyosiyanatın primer kaynağının bazı yiyecekler (cassava, badem, lahana, brokkoli ve brüksel lahanası) olduğu bildirilmiş ve tiyosiyanatın guatrojenik rolü üzerinde durulmuştur (3-5). Siyanüre maruz kalma sonucu elemental metabolizma etkilenmektedir. Bazı anyonlara bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi hücresel trafikte yaşamsal önemi olan iz elementler arasında kompleks etkileşimler olduğu bilinmektedir (6-7). Sigara içiminin metabolik fonksiyonları olan iz elementler üzerine oluşturdukları etkiler birçok çalışma ile kanıtlanmış ancak tek başına tiyosiyatın bakır ve çinko gibi esansiyel iz elementlerin doku dağılımları üzerine olası etkileri incelenmemiştir (1.8-9).

Bu çalışmada siyanürün temel metaboliti olan, siyanür entoksikasyonunun bir göstergesi kabul edilen tiyosiyanat (SCN⁻) anyonu ile in vivo bakır ve tiyosiyanatı metabolize eden rodanaz'ın yapısında da bulunan çinko arasındaki etkileşimin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Klinik Araştırma Laboratuvarı ve Deneysel Cerrahi Laboratuvarında yürütüldü. Çalışma kapsamına alınan Swiss Albino 150-200 g ağırlığında 6 ay-1 yaşındaki erkek sıçanlar 3 gruba ayrıldı. A grubuna (n=10) 60 mg/kg/gün, B grubuna (n=10) 120 mg/kg/gün tiyosiyanat subkutan olarak 15 gün süre ile verildi. Kontrol grubuna (n=10) 15 gün boyunca subkutan olarak sadece serum fizyolojik enjekte edildi. A, B ve kontrol gruplarından 15. günün sonunda enjektör ile direkt kalpten heparinli tüplere ~2-3 mL kan örnekleri alındı. Tiyosiyanat tayini için alınan örneklerin plazmaları ayrıldı. Kan örnekleri alındıktan sonra dekapite edilen sıçanların karaciğer, böbrek ve kalpleri ile rectus femoris ve sartorius kaslarından iskelet kası dokuları alındı. Alınan örnekler serum fizyolojik ile dikkatlice yıkandı ve serum fizyolojik içeren daha önceden %10'luk nitrik asid içinde bekletilip distile sudan geçirilerek kurutulmuş ufak cam şişelere konularak laboratuvara ulaştırıldı.

Kuru doku üzerinden yapılacak iz element analizleri için karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası doku örnekleri bidistile su ile yıkandıktan ve kurutma kağıdı ile fazla suları alındıktan sonra etüvde 65°C'de sabit ağırlığa gelinceye dek kurutuldu. Kurutma işlemi sonunda her bir dokudan ~0.15 g gelecek şekilde

doku örnekleri tartıldı ve 50 mL'lik beherlere aktarıldı, ~7-8 mL HNO₃ + H₂SO₄ + HClO₄ (nitrik: sülfirik : perklorik asid, sırasıyla 3:1:1 (v:v) oranında) karışımından konularak saat camı ile beherlerin üstü kapatıldı. 1 gece asid karışımında bekletildikten sonra örnekler 110°C'de dereceli elektrik ocağı üzerinde 1 saat süre ile yakıldı. Daha sonra sıcaklık 200-250°C'ye çıkartılarak ~0.5-1 mL'lik berrak kısım kalıncaya dek yakına işlemine devam edildi. Kalan berrak kısım bidistile su ile çalkalanıp 10 mL'ye tamamlanarak balonjojeye aktarıldı. Tüm doku örnekleri analiz yapıncaya kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Polipropilen heparinize tüplere alınan kan örnekleri 2500 g'de santrifüj edilerek ayrılan plazmanın 1 mL'si %10 (w/v) 9 mL triklorasetik asid solusyonu ile deproteinize edildi. 3000 g'de 15 dakika santrifüjden sonra süpernatanttan 1 mL alınarak modifiye Aldrich yöntemi ile spektrofotometrik (Shimadzu 160 A UV-Vis spektrofotometre) tiyosiyanat tayini yapıldı (8). Tiyosiyanat tayini için kullanılan tüm maddeler Merck (Almanya)'den temin edildi.

Karaciğer, böbrek, iskelet kası ve kalp kasında Cu ve Zn tayini Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spektrometresinde (ICP-AES JY-24 Sequential Spectrometer, Jobin Yvon, France) bakır için 324.754 nm, çinko için 213.856 nm, dalga boyunda gerçekleştirildi. Referans dalga boyu olarak 193.091 nm seçildi. Bakır standart eğrisi için 0 µg/mL'den başlanarak 0.050, 0.100, 0.150 µg/mL'lik standartlar, çinko standart eğrisinin çiziminde ise 0.0, 0.100, 0.200 ve 0.300 µg/mL'lik standartlar kullanıldı. Standartlar dilüsyonlar günlük olarak standart stok solüsyonlardan (Cu için Cat No: 9953, Zn için Cat No: 19786 Titrisol Merck Co.) hazırlandı.

İstatistiksel analizler SPSS for Windows 6.1 (SPSS, Inc.) programı ile yapıldı. Gruplar arası doku element düzey farklılıklarını, plazma tiyosiyanat düzeyleri ile doku element konsantrasyonları arasındaki ve elementlerin kendi aralarındaki ilişkiyi incelemek amacıyla bağımsız örneklili ve eşleşmiş t-testleri, regresyon analizi ve Pearson korelasyon testi yapıldı.

BULGULAR

Kontrol grubu ile kıyaslamalı olarak plazma tiyosiyanat düzeylerinin A ve B gruplarında anlamlı olarak artış gösterdiği bulunmuştur (A grubu için

$p<0.05$, B grubu için $p<0.01$). Kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak A ve B gruplarına ait plazma tiyosiyanat düzeyi değişikliği ile ilgili tanımlayıcı istatistiksel veriler Tablo I'de sunulmuştur. Tiyosiyanat uygulanan her iki gruba ait doku element konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar Tablo II ve III'de sunulmaktadır. Tiyosiyanat enjekte edilen sıçanların iskelet kası Cu konsantrasyonları tiyosiyanat enjekte edilen her iki grupta da kontrol grubuna göre

anlamli farklı bulunurken (A Grubu için $p<0.05$, B Grubu için $p<0.01$). Zn düzeyleri sadece B grubunda kontrol grubuna kıyasla farklı bulunmuştur ($p<0.01$). Renal dokuda Zn ve Cu düzeylerinde bir artış saptanmazken hepatik bakırda her iki tiyosiyanat grubunda anlamlı artış tesbit edilmiştir (A grubu için $p<0.05$, B grubu için $p<0.01$). Kalp kası Cu ve Zn düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık tesbit edilmemiştir.

Tablo I. Kontrol grubu ve tiyosiyanat enjeksiyonu yapılan gruplarda (Grup A = 60 mg/kg/gün, grup B=120 mg/kg/gün) plazma tiyosiyanat düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)

	Kontrol Grubu	A Grubu	B Grubu
Ortalama \pm SD	28.36 \pm 5.74	30.34 \pm 7.44*	107.15 \pm 17.69**
Minimum Değer	21.09	23.46	84.90
Maksimum D.	34.90	46.25	129.77

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Tablo II. Kontrol grubu ve tiyosiyanat enjeksiyonu yapılan gruplarda dokulardaki Cu düzeyleri ($\mu\text{g/g}$)

Bakır (Cu)	Kontrol Grubu	A Grubu	B Grubu
Karaciğer			
Ortalama \pm SD	10.42 \pm 1.34	11.54 \pm 1.87*	17.24 \pm 6.58**
Minimum-Maksimum	9.54 - 13.68	9.1 - 14.65	10.75 - 27.82
Böbrek			
Ortalama \pm SD	13.84 \pm 0.84	16.82 \pm 3.59	14.53 \pm 0.98
Minimum-Maksimum	12.94 - 15.42	13.16 - 22.78	13.57 - 16.3
Kalp Kası			
Ortalama \pm SD	19.02 \pm 2.66	17.19 \pm 1.22	20.48 \pm 2.92
Minimum-Maksimum	17 - 25.45	15.62 - 19.62	17.33 - 24.55
İskelet Kası			
Ortalama \pm SD	1.61 \pm 0.81	2.59 \pm 0.63*	3.48 \pm 0.99**
Minimum-Maksimum	0.57 - 2.43	1.59 - 3.92	2.33 - 5.17

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Tablo III. Kontrol grubu ve tiyosiyanat enjeksiyonu yapılan gruplarda dokulardaki Zn düzeyleri ($\mu\text{g/g}$)

Çinko (Zn) $\mu\text{g/g}$	Kontrol Grubu	A Grubu	B Grubu
Karaciğer			
Ortalama \pm SD	88.79 \pm 7.17	86.75 \pm 10.6	113.92 \pm 29.07
Minimum-Maksimum	77.22 - 101.9	69.07 - 103.1	70.89 - 161.54
Böbrek			
Ortalama \pm SD	58.08 \pm 4.86	56.56 \pm 7.57	60.93 \pm 8.52
Minimum-Maksimum	52.06 - 68.75	48.75 - 71.94	52.61 - 76.43
Kalp Kası			
Ortalama \pm SD	63.70 \pm 6.38	58.37 \pm 8.89	74.51 \pm 8.33
Minimum-Maksimum	55 - 77	47.69 - 77.31	69.67 - 93.18
İskelet Kası			
Ortalama \pm SD	22.31 \pm 11.34	28.20 \pm 3.6	37.04 \pm 5.25**
Minimum-Maksimum	7.89 - 36.43	23.33 - 35.45	30.24 - 46.56

* $p<0.05$, ** $p<0.01$



TARTIŞMA

Bu çalışmada sigara dumanında bulunan siyanürün toksik bir metaboliti olan tiyosiyanatın in vivo farklı dokularda esansiyel iz elementlerden bakır ve çinko düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla yola çıkarken toplum sağlığı açısından önemli bir risk oluşturan, hem kardiyovasküler hastalıklar hem de kansere yol açtığı kanıtlanmış sigara dumanının içeriğindeki siyanürün toksik bir metaboliti olan tiyosiyanatın kanıtlanmış pek çok zararlı metabolik etkileri yanısıra esansiyel elementlerin dengeli dağılımlarını da bozabilecekleri göz önünde tutulmuştur.

Bazı anyonların iz elementlerin hücre içine girişini uyardıkları bazılarının ise hücre içine girişi bozduğu bilinmektedir (6). Bilindiği gibi HCO_3^- ve Cl^- iyonları iz elementlerin hücre içine alınımına stimüle ederken PO_4^{2-} ve SO_4^{2-} iyonları inhibitör etki göstermektedir. Bu çalışmada ise toksik bir anyon olan tiyosiyanatın dokulardaki iz elementlerin dağılımı üzerine olan olası etkisi araştırılmıştır. Çeşitli kimyasal sentezler, metallerin kaplanması gibi endüstriyel işler kronik siyanür zehirlenmesine sebep olabilir. Sigara dumanının inhalasyonu da kronik olarak siyanüre maruz kalmaya sebep olur. Bir sigaradaki hidrojen siyanür miktarı ortalama 2-233 μg 'dır (10). Siyanür öncelikle karaciğerde rodona (tiyosülfat sülfotransferaz: EC 2.8.1.1.) tarafından sülfid ve tiyosiyanata çevrilir. Oluşan tiyosiyanat peroksidazlarla siyanüre geri dönüşebilir ve bir siklus oluşturur.

Toksik bir metabolit olan tiyosiyanatın organizmada çeşitli olası etkileri öne sürülmüştür. Bir elektron donörü olarak in vivo tiyosiyanatın enzimler üzerinde de çeşitli olumsuz etkileri gözlenmiştir. Eriksson ve arkadaşları tiyosiyanatın yüksek pH'da Zn iyonuna bağlandığını ve bu şekilde karbonik anhidrazı inhibe ettiğini göstermişlerdir (11). Reyes, Fukayama, Olea ve arkadaşları ise tiyosiyanatın birçok element ile etkileşime girerek bunların metabolizmasında dengesizliklere yol açtığını göstermişlerdir (3-5).

Biz çalışmamızda tiyosiyanatın esansiyel iz elementler olan bakır ve çinkonun dokulardaki dağılımını bir dereceye kadar etkilediğini saptadık. Tiyosiyanat enjekte edilen sıçanların böbrek ve kalp kası Cu ve Zn konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılığa rastlamamıza karşın,

iskelet kası Cu konsantrasyonları her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı farklı bulduk (A Grubu - Kontrol Grubu için $p < 0.05$, B Grubu-Kontrol Grubu için $p < 0.01$). İskelet kası Zn düzeyleri sadece B grubunda farklılık gösterdi ($p < 0.01$). Hepatik Cu ise hem düşük hem de yüksek doz tiyosiyanat uygulanan A ve B gruplarında artmış bulundu (A Grubu için $p < 0.01$, B Grubu için $p < 0.05$).

Bu sonuçlardan görüldüğü gibi tiyosiyanatın baki- rının dağılımını hem hepatik hem de iskelet kasında etkilediği gösterilmiştir. Bunun için daha düşük olan 60 mg'lık bir tiyosiyanat dozu bile yeterlidir. Tiyosiyanatın aynı ortamlarda çinko dağılımına etkisi ise sınırlıdır ve bu etki için yüksek dozda tiyosiyanat enjeksiyonu gereklidir. Zn düzeyi sadece yüksek doz (120 mg/kg/gün) tiyosiyanat enjeksiyonu sonrası iskelet kasında artma göstermiştir. Ripa'ya göre tiyosiyanat anyonu çinkonun hücre içine alınımını arttırmaktadır. Bu etkisini anionic exchange (değiş dokuş) kanalları ile yapabilir (6). Çalışmamızda saptanan iskelet kasındaki Zn artışı Ripa'nın tiyosiyanatın hücre içine Zn alınımını arttırdığı savı ile uyumluluk göstermektedir (6).

Özetlenecek olunursa toksik anyonlar biyolojik esansiyel elementler için mevcut olan transport yollarını etkilerler. Bu açıdan toksik anyonlar ile esansiyel iz elementler arasında etkileşimler olasıdır. Bu çalışmanın da bulguları gerek sigara dumanı ile gerekse çevresel kirlenme sonucu maruz kalınabilen tiyosiyanatın in vivo Cu ve Zn iz elementlerinin doku dağılımları üzerine bir miktar etkili olduğuna işaret etmektedir. Ancak mekanizmaları aydınlatacak çalışmalar henüz doyurucu değildir. Bu konudaki çalışmaların sürdürülmesi, sigara ile vital iz elementler arasındaki etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasında yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Pre, J., Vassy, R. (1991) Urine thiocyanate: creatinine ratio as a reliable indicator of cigarette smoking. Clin Chim Acta. 204, 87-94.
2. Bliss, R.E., O'Connell, K.A. (1984) Problems with thiocyanate as an index of smoking status. Health Physiol. 3, 563-581.
3. Reyes, R.M., Boelaert, M., El Badavi, S., Eitom, M., Vanderpas, J.B. (1993) Endemic juvenile hypothyroidism in a severe endemic goitre area of Sudan. Clin Endocrinol. 38, 19-24.
4. Fukayama, H., Nasu, M., Murakami, S., Sugarawa, M.

- (1992) Examination of antithyroid effect of smoking products in cultured thyroid follicles; only thiocyanate is a potential antithyroid agent. *Acta Endocrinologica*. 127, 520-525.
5. Olea, F., Parras, F. (1992) Determination of serum levels of dietary thiocyanate. *J Anal Toxicol*. 16, 258-260.
 6. Ripa, S., Ripa, R. (1995) Zinc cellular traffic: physiopathological considerations. *Minerva Med*. 86, 37-43.
 7. Avunduk A.M., Yardımcı, S., Avunduk M.C., Kurnaz L, Kockar M.C. (1997) Determinations of some trace and heavy metals in rat lenses after tobacco smoke exposure and their relationships to lens injury *Exp Eye Res*. 65, 417-23.
 8. Çoker, C., Aydın, H.H., Aşkar, N., Ersöz, B., Akercan, F. (1996) Effect of gestational diabetes and smoking on the elemental status of the maternal, fetal placental unit. *Marmara Medical Journal*. 9, 129-135.
 9. Çoker, C., Aydın, H.H., Ersöz, B., Menteş, G.(1995) Sigara içenlerde plazma tiyosiyanatı ile ilgili spektrofotometrik bir yöntem. *Biyokimya Dergisi*. 20, 23-30.
 10. Rickert, W.S., Hopkins, I.B., Collinshaw, N.E., Baray, D.F. (1983) Estimating the hazards of less hazardous cigarettes. III. A study of the effect of various smoking conditions on yields of hydrogen cyanide and cigarette tar. *J Toxicol Environ Health*. 12, 39-54.
 11. Eriksson, A.E., Klysten, P.M., Jones, T.A., Liljas, A. (1988) Crystallographic studies of inhibitor binding sites in human carbonic anhydrase II: a pentacoordinated binding of the SCN⁻ ion to the zinc at high pH. *Proteins*. 4, 283-293.