

Kükürtdioksitin Diyabetik Sıçanlarda Makrofaj Fagositik Aktivitesine Etkisi

Vecihe Nimet İZGÜT-UYSAL

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya-TÜRKİYE

Vural KÜÇÜKATAY

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya-TÜRKİYE

Aysel AĞAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya-TÜRKİYE

Piraye YARGIÇOĞLU

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Antalya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.03.2000

Özet: Hava kirliliği kriterlerinden biri olarak kabul edilen kükürtdioksitin, diyabetli bireylerin peritoneal makrofajlarının fagositik aktivitelerini olumsuz yönde etkileyip etkilemediğinin incelendiği çalışmada, 200-250 g ağırlığında erkek albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 1) kontrol, 2) kükürtdioksit, 3) diyabet ve 4) diyabet+kükürtdioksit grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol ve diyabet grubuna özel bir düzeneğe 8 hafta boyunca günde 1 saat filtre edilmiş atmosfer havası solutulurken kükürtdioksit ve diyabet+kükürtdioksit grubuna aynı düzeneğe ve aynı sürede 10 ppm dozunda SO₂ solutulmuştur. Kükürtdioksit ve diyabet+kükürtdioksit gruplarındaki hayvanlar, kaudal venlerinden alloksan (5 mg/100 g) verilerek diyabetik hale getirilmiş ve deney süresinin sonunda hayvanların peritonlarından makrofajlar izole edilerek fagositik aktiviteleri incelenmiştir. Kan glukoz değerleri incelendiğinde en fazla SO₂ solutulan diyabetik sıçanlarda olmak üzere kan glukozunun tüm deney hayvanlarında yükseldiği gözlenmiştir. Makrofaj fagositik aktivitesinin ise gene en belirgin SO₂ solutulan diyabetik sıçanlarda olmak üzere tüm deney gruplarında, kontrol grubuna göre düştüğü tesbit edilmiştir.

Sonuç olarak; kükürtdioksitin makrofajların fagositoz fonksiyonunu baskılayıcı etkisi, diyabetik bireylerde daha da belirgin hale gelmektedir.

Anahtar Sözcükler: kükürtdioksit, makrofaj, makrofaj fagositik aktivitesi, diabetes mellitus

The Effect of Sulphur Dioxide on Macrophage Phagocytic Activity in Diabetic Rats

Abstract: Sulphur dioxide as a criterion of air pollution supresses macrophage functions. Some immunological changes in diabetes mellitus have been detected. In the present study, we examined the effect of sulphur dioxide on macrophage phagocytic activity in diabetic rats. The animals were separated into four groups as: 1) Control, 2) Sulphur dioxide, 3) Diabetes mellitus, 4) Diabetes mellitus+sulphur dioxide. The first and the third groups of animals were respirationed with filtered

atmosphere air in a special chamber one hour daily for eight weeks, while the other groups were exposed to 10 ppm sulphur dioxide in the same conditions and periods. The diabetic condition was induced in the third and fourth groups by administration of 5 mg/100 g bw alloxane. At the end of the experimental period, blood glucose levels significantly increased in the experimental groups compared to the control. While the phagocytic activity in peritoneal macrophages decreased in all experimental groups compared to the control.

In conclusion, the suppressive effect of sulphur dioxide on macrophage phagocytic activity increased the effects of diabetes.

Key Words: sulphur dioxide, macrophage, macrophage phagocytic activity, diabetes mellitus

1. Giriş

Diabetes mellitus organizmanın pekçok dokusunda olduğu gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin fonksiyonlarına da olumsuz etki yapan endokrin bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli klinik gözlemlerden yola çıkılarak yapılan deneysel çalışmalarda, diyabet oluşturulmuş deneklerde, makrofajların fagositik fonksiyonlarının bozulduğu (1, 2, 3, 4) ve lenfositlerin mitojene cevabının ve enfeksiyona direncin azaldığı gösterilmiştir (5, 6).

Hava kirliliği de insan sağlığını tehdit eden önemli bir faktördür. Büyük şehirlerde kentleşme ile birlikte başlayan hava kirliliğinde, özellikle kükürtdioksit, karbonmonoksit, azotoksitler, ozon ve parçacık halindeki kirleticiler önem taşımaktadır (7, 8). Lokal etkilerinin yanısıra sistemik etkileri ile de pekçok doku ve organa zararlı olan bu kirleticilerin enfeksiyona meyli arttırdıkları bilinmektedir (9, 10). Yapılan çalışmalarda, kükürtdioksite maruz kalan sıçanların pulmoner lavaj sıvısında, polimorf nükleer lökositlerin ve eozinofillerin yüzdesinde artış tesbit edilmiştir (11, 12). Pulmoner makrofajların sayısında ise azalma ile birlikte enfeksiyon oranının arttığı dikkati çekmiştir (13).

Çalışmamız, hava kirliliği olan bölgelerde kükürtdioksitin diyabetli bireylerde bağışıklık sistemini daha da baskılayabileceği ve enfeksiyona meyli arttıracığı düşünülerek planlanmış, diyabet oluşturulmuş ve kükürtdioksit solutulmuş sıçanlarda nonspesifik immün sistemin göstergesi olarak makrofaj fagositik aktivitesinin, bu faktörlerin etkisinde değişip değişmediği incelenmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılan bu çalışmada ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 32 adet erkek albino sıçan kullanılmıştır.

2.1. Deneklerin hazırlanması: Çalışmada kullanılacak her sıçan ayrı bir kafese alınarak 8 hafta süresince ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Günlük yem ve su tüketimleri ile vücut ağırlıklarındaki haftalık değişiklikler kaydedilmiştir. Sıçanlar, her bir grupta

8 denek olmak üzere kontrol grubu, kükürtdioksit grubu, diyabet grubu, diyabet+kükürtdioksit grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bunlardan 1. ve 3. gruba özel bir düzenekte 8 hafta süresince günde 1 saat filtre edilmiş atmosfer havası solutulurken, 2. ve 4. gruba aynı düzenekte ve aynı sürede 10 ppm SO₂ içeren hava solutulmuştur.

2.2. Diyabet oluşturulması: Diyabet oluşturulacak sıçanlara 24 saatlik açlığı takiben eter anestezisi altında kuyruk venlerinden 5 mg/100 g dozunda alloksan (Sigma Chemical CO.) enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 1 saat sonra hayvanlara 2 ml %5'lik glukoz çözeltisi ve 24 saat boyunca içme suyu olarak %10'luk sükröz çözeltisi verilmiştir. Diyabet protokolünün uygulanmasından 48 saat sonra, açlık kan glukozu kuyruk venlerinden alınan kanda Ames (Bayer Diagnostik) marka glukometre ile ölçülmüş, diyabetik oldukları saptananlar deneyde kullanılmıştır. Diyabetik hayvanlardan açlık kan glukozu 30 mM/L'den yüksek olanlara 0.5-1 ünite insülin enjeksiyonu yapılmıştır.

2.3. Filtre edilmiş atmosfer havası ve kükürtdioksit solutulması: Filtre edilmiş atmosfer havası ve SO₂ solutulması için 100x50x50 cm boyutlarında tüm yüzeyleri cam olan bir düzenek hazırlanmıştır. Düzeneğin bir kenarına açılan iki delikten biri filtre edilmiş atmosfer havasını vermek için kullanılırken, diğerine MRU-35 marka baca gazı ölçüm cihazına ait prob yerleştirilmiştir. Diğer kenara açılan delik ise düzeneğin içine SO₂ verilmesi için kullanılmıştır. Düzeneğe verilen SO₂'nin her tarafa eşit konsantrasyonda dağılabilmesi, düzeneğe eklenen vantilatör aracılığı ile sağlanmıştır. Ortama verilen 10 ppm SO₂ konsantrasyonu MRU-35 marka baca gazı ölçüm cihazı ile sürekli olarak izlenmiştir. Soluk havasındaki subuharı ve CO₂, düzenek içine yerleştirilen silika jel ve soda lime ile uzaklaştırılmıştır. 1. ve 3. gruplardaki hayvanlara ise aynı düzenekte aynı protokol uygulanarak, sadece filtre edilmiş atmosfer havası solutulmuştur.

2.4. Peritoneal makrofajların fagositik aktivitelerinin belirlenmesi: Deney süresi sonunda hayvanlar ürean ile anestezi edildikten sonra peritoneal makrofaj izole edilmiş ve fagositik aktiviteleri ölçülmüştür. Peritoneal makrofaj elde etmek için 37°C de 10 ml Krebs fosfat solüsyonu (137 mM NaCl, 1.82 mM CaCl₂, 1.66 mM MgSO₄, 5.40 mM KCl, 0.74 mM KH₂PO₄, 1.01 mM NaHCO₃, 11.11 mM glukoz, pH:7.4) periton içine enjekte edilmiş, 3 dakika sonra orta hat kesisi yapılarak periton içindeki sıvı toplanmıştır. 0.5 ml hücre süspansiyonu eşit hacimde %1 aktif karbon partikülü ile 1 saat inkübe edildikten sonra, hücrelerin fagosite ettiği partikül sayısı ışık mikroskobu kullanılarak 100x10 büyütme ile sayılmıştır. 100 hücrede sayım yapılarak, hücre başına düşen partikül sayısı makrofaj fagositik aktivitesi olarak belirlenmiş, ayrıca hücrelerin canlılıkları %1 Trypan blue boyası ile tesbit edilmiştir.

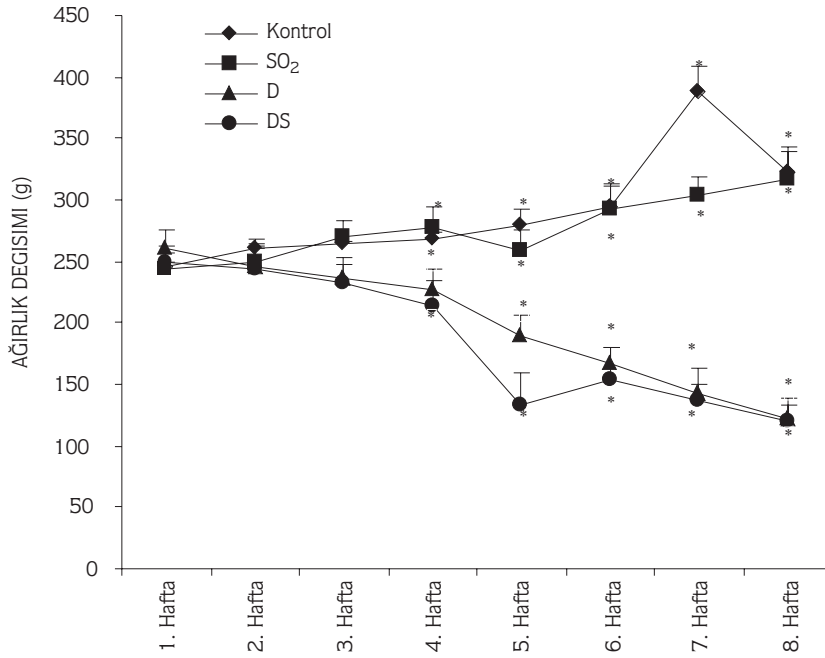
2.5. İstatistiksel analiz: İstatistiksel değerlendirmede SPSS (Statistical Package for Social Sciences) kullanılmıştır. Gruplar arası farklar için tek yönlü (One way) ANOVA kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırması ise "iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi" (t testi) ile yapılmıştır ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Genel bulgular: Kontrol ve kükürtdioksit grubunu oluşturan hayvanların görünüm ve davranışlarında önemli bir farklılık dikkati çekmemiştir. Diyabet ve diyabet+ kükürtdioksit gruplarında ise klinik diyabet belirtileri ortaya çıkmış, bu hayvanlarda besin ve su tüketimindeki artışla beraber poliüri, kilo kaybı, güçsüzlük ve yorgunluk belirtileri gözlenmiştir.

Kontrol ve deney grubundaki hayvanların haftalara göre ağırlık değişimleri incelendiğinde, kükürtdioksit grubundaki hayvanların ağırlık artışının kontrolden farklı olmadığı saptanmış, buna karşın diyabet ve diyabet+kükürtdioksit grubundaki hayvanların ağırlık artışının 3. haftadan itibaren kontrole göre belirgin az olduğu tesbit edilmiştir. Diyabet ve diyabet+kükürtdioksit grupları arasında, ağırlık değişimi yönünden farklılık bulunmamıştır (Şekil 1).

3.2. Kan glukoz değeri: Sıçanlara 8 hafta süre ile günde 1 saat 10 ppm SO₂ içeren hava solutulması kan glukozunda anlamlı yükselmeye neden olmuştur. Kan glukoz değeri, kontrol grubunda 137.70±21.15 mg/dL iken, kükürtdioksit grubunda 185.64±39.11 mg/dL'ye



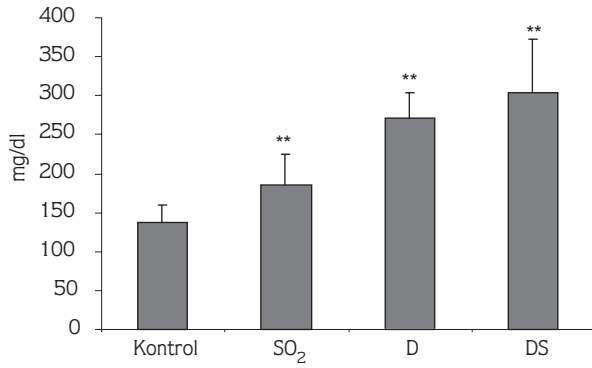
Şekil 1. Kontrol, kükürtdioksit (SO₂), diyabet (D), diyabet+kükürtdioksit (DS) gruplarındaki hayvanların haftalık ağırlık değişimi.

* p<0.05 (Karşılaştırma her gruba ait başlangıç değerleri ile yapılmıştır)

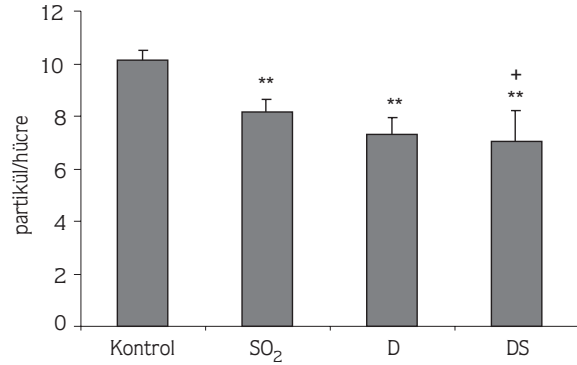
yükselmiştir ($p<0.01$). SO_2 solutulmasının kan glukozunu arttırıcı etkisi diyabetik sıçanlarda da gözlenmiştir. Diyabetiklerde 270.91 ± 32.89 mg/dL (kontrole göre $p<0.01$) olan kan glukoz değeri, SO_2 solutulmuş diyabetli hayvanlarda 304.61 ± 67.70 mg/dL (kontrole göre $p<0.01$) olarak saptanmıştır. Ancak kan glukoz değerleri yönünden diyabet grubu ile diyabet+kükürtdioksit grubu arasında farklılık gözlenmemiştir ($p=0.22$) (Şekil 2).

3.3. Makrofaj fagositik aktivitesi: Kontrol grubunda 10.14 ± 0.39 partikül/hücre olan fagositik aktivitenin, diyabet grubunda 8.15 ± 0.47 partikül/hücre'ye düştüğü ($p<0.001$), kükürtdioksit grubunda 7.31 ± 0.62 partikül/hücre olan değer ($p<0.001$), SO_2 solutulan diyabetli sıçanlarda daha da azaldığı (7.03 ± 1.20 partikül/hücre) saptanmıştır (Şekil 3).

Trypan blue ile yapılan canlılık testinde ise gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Kontrol grubunda $\%95\pm5.87$ olan canlılık oranının, diyabet grubunda $\%91\pm3.81$, kükürtdioksit grubunda $\%93\pm3.01$, diyabet+kükürtdioksit grubunda $\%89\pm6.20$ olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Kontrol, kükürtdioksit (SO_2), diyabet (D), diyabet+kükürtdioksit (DS) gruplarındaki hayvanların kan glukoz değerleri. ** $p<0.01$ (Karşılaştırma kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yapılmıştır)



Şekil 3. Kontrol, kükürtdioksit (SO_2), diyabet (D), diyabet+kükürtdioksit (DS) gruplarındaki hayvanların peritonlarından izole edilen makrofajların fagositik aktiviteleri. ** $p<0.01$ (Karşılaştırma kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yapılmıştır) + $p<0.05$ (Karşılaştırma diyabet grubu ile diyabet+kükürtdioksit grubu arasında yapılmıştır)

4. Tartışma

Çalışmamızda elde ettiğimiz genel bulgular ve kan glukoz değerleri 5 mg/100 g alloksan ile diyabet oluşturulduğunu göstermektedir. İki deney grubunda kullanılan 10 ppm'lik SO₂ dozu ise insanlar için kabul edilen maksimum dozun oldukça üzerinde olmasına rağmen, deneysel çalışmalarda çevre kirliliği etkilerinin kısa sürede taklit edilebilmesi için kabul edilen dozdur (8, 9). 8 haftalık deney süresi ise 10 ppm SO₂'in uygulandığı çalışmalarda toksisitenin oluştuğu süre olarak belirlenmiştir (10, 14).

Makrofaj fagositik aktivitesi incelendiğinde, diyabet oluşturulmuş sıçanlarda beklentimize uygun şekilde kontrol grubuna göre belirgin azalma tesbit edilmiştir. Bu sonuç daha önce yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir (2, 6, 15, 16). Chu ve ark.'ları diyabete bağlı hiperlipideminin monosit farklılaşmasını bozarak, bu hücrelerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermişlerdir (17). Araştırmacılar diyabetle ilgili olarak yaptıkları çalışmalarda metabolik bir hastalık olan diyabetin hücrelerde plasma membranının fizikokimyasal özelliklerini bozduğunu, membran akışkanlığını azaltarak membrana bağlı fonksiyonlarda da azalmaya neden olduğunu tesbit etmişlerdir. (18, 19). Makrofajların fagositozis özelliği de membrana bağlı bir fonksiyon olduğuna göre bu fonksiyonun bozulmasında en doğal beklenti olmalıdır. SO₂ de immün sistemin fonksiyonlarını etkileyen önemli bir faktördür. Hava kirliliğinin derecesine göre farklı dozlarda SO₂'e maruz kalan canlılarda farklı değişiklikler gözlenmiştir. Borska ve ark.'ları (20) tarafından, 3 saat süresince 400 ppm gibi çok yüksek bir dozda SO₂'ye maruz kalmanın akciğerde makrofaj fagositik aktivitesini değiştirmediği gösterilirken, Sandström ve ark.'ları (21) tarafından, 4 ppm SO₂'ye uzun süre maruz kalmanın alveolar makrofaj aktivitesinde ve sayısında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Buna karşılık bizim çalışmamızı destekler nitelikteki bir başka çalışmada (22) ise dinlenim ve egzersiz halinde SO₂ ile karşılaşmanın makrofaj endositoz aktivitesini azalttığı belirtilirken, Jakab ve ark.'ları da (13) SO₂ inhalasyonunun alveolar makrofaj fagositoz aktivitesini azalttığını göstermişlerdir.

Alveolar makrofajlar üzerine olan lokal etkisinin yanısıra SO₂'in, kana geçtiği ve sistemik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (23). Biz de çalışmamızda SO₂ grubunda peritoneal makrofajların fagositik aktivitelerinin azaldığını ve bu azalmanın diyabet grubuna göre daha fazla olduğunu gözledik. Bunun yanısıra SO₂ solutulan diyabetik hayvanlarda fagositik aktivitenin, SO₂ solutulmuş normal hayvanlardan farklı olmadığı tesbit edilmiştir. Bu da SO₂'in lokal etkisinin yanısıra sistemik olarak da immün sistemi etkilediğini ve baskılayıcı etkisinin diyabete göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Diyabet oluşturulmuş ve SO₂ solutulmuş sıçanlarda nonspesifik immün sistemin göstergesi olan makrofaj fagositik aktivitesi sadece SO₂ solutulmuş gruba göre daha da baskılanmış olarak bulunmuştur. Bu da çevre kirliliği olan ortamlarda bulunan diyabetik bireylerde enfeksiyona meylin daha fazla olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; Hava kirliliğinde önemli bir etken olan kükürtdioksitin makrofaj fonksiyonlarına önemli baskılayıcı etkisi vardır ve diyabet gibi ikinci bir risk faktörü ile birarada olması halinde etkisi daha belirgin hale gelmektedir.

Kaynaklar

1. Horn W., Current theories of phagocytosis and methodological problems in the study of phagocytosis defects in diabetics. *Immun Infekt.* 12 (1): 13-19, 1984.
2. Ptak W., Klimek M., Bryniarski K., Ptak M., Majcher P., Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. *Clin. Exp. Immunol.* 114 (1): 13-18, 1998.
3. Geerlings S.E., Hoepelman A.I., Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM); *FEMS Immunol. Microbiol.* 26 (3-4): 259-265, 1999.
4. Inoue H., Shinohara M., Ohura K., The effect of leukocyte function of streptozotocin-induced diabetes in naturally occurring gingivitis rat. *J. Osaka Dent. Univ.* 31 (1-2): 47-54, 1997.
5. Federlin K., Diabetes mellitus and immunology: A manifold interrelation. *Immun Infekt.* 13 (5): 193-199, 1985.
6. Grant-Theule D.A., Periodontal disease, diabetes and immune response: a review of current concepts. *J. West Soc. Periodontal Abstr.* 44 (3): 69-77, 1996.
7. Rusznak C., Devalia J.L., Davies R.J., Airway response of asthmatic subjects to inhaled allergen after exposure to pollutants. *Thorax* 51: 1105-1108, 1996.
8. Wagner V., Wagnerova M., Kriz J., Kodl M., Wokounova D., Relationship of blood protein levels to outdoor air pollutant concentrations in a semicohort of school-age children living in urban areas differing by quality of air. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 32 (2): 121-136, 1988.
9. Frank N.R., Yoder R.E., Brain S.D., Yokoyama E., SO₂ (35S labeled) absorption by the nose and mouth under conditions of varying concentration and flow. 18: 315-322, 1969.
10. Alarie Y., Ulrich C.E., Busey W.M., Longterm continuous exposure to sulfur dioxide in cynomolgus monkeys. *Arch. Env. Health* 24: 115-127, 1972.
11. Faroni A., Huang S., Paulauskis J., Kobzik L., Airway neutrophilia and chemokine mRNA expression in sulfur dioxide-induced bronchitis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12 (3): 345-350, 1995.
12. Grose E.C., Grady M.A., Illing J.W., Daniels M.J., Selgrade M.K., Hatch G.E., Inhalation studies of Mt. St. Helens volcanic ash in animals. *Environ. Res.* 37, 84-92, 1985.
13. Jakab G.J., Clarke R.W., Hemenway D.R., Longphre M.V., Kleeberger S.R., Frank R., Inhalation of acid coated carbon black particles impairs alveolar macrophage phagocytosis. *Toxicology Letters* 88: 243-248, 1996.
14. Lovati M.R., Manzoni C., Daldossi M., Spolti S., Sirtori C.R., Effects of sub-chronic exposure to SO₂ on lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Arch. Toxicol.* 70 (3-4): 164-173, 1996.
15. Liu B.F., Myata S., Kojima H., Uriuhara A., Kusunoki H., Suzuki K., Kasuga M., Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages in diabetic mice: relevance to the formation of advanced glycation end products. *Diabetes* 48 (10): 2074-2082, 1999.

16. Walsh N.P., Blannin A.K., Robson P.J., Gleeson M., Glutamine, exercise and immune function. Links and possible mechanism. *Sports Med.* 26 (3): 177-191, 1998.
17. Chu X., Newman J., Park B., Nares S., Ordonez G., Iacopino A.M., In vitro alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids. *Cell Tissue Res.* 296 (2): 331-337, 1999.
18. Mazzanti L., Rabini R.A., Faloa E., Fumelli P., Bertoli E., Pirro R., Altered cellular Ca^{++} and Na^{+} transport in diabetes mellitus. *Diabetes* 39: 850-854, 1990.
19. Winocour P.D., Bryszewska M., Watala C., Rand M.L., Epanand R.M., Kinlough-Rathbone R.L., Packham M.A., Mustard J.F., Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes* 39: 241-244, 1990.
20. Borska L., Fiala Z., Sedlacek J., Visnousky P., Effect of acute exposure to SO_2 on cellular defense mechanisms in the lung. *Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl* 41 (1):23-26, 1998.
21. Sandström T., Stjernberg N., Andersen M.C., Kalmodin-Hedman B., Lundgren R., Angsröm T: Is the short term limit value for sulphur dioxide exposure safe? Effects of controlled chamber exposure investigated with bronchoalveolar lavage. *Br. J. Industrial Med.* 46:200-203, 1989.
22. Skornik W.A., Brain J.D., Effect of sulfur dioxide on pulmonary macrophage endocytosis at rest and during exercises. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 655-659, 1980.
23. Mazumdar S., Sussman N., Relationships of air pollution to health: results from the Pittsburg study. *Arch. Environ. Health* 38 (1): 17-24, 1983.