

Sıçan kardiyak miyositlerinde kasılmanın ve iyonik akımların sodyum metabisülfid tarafından modülasyonu

Modulation of contraction and ionic currents by sodium metabisulfite in rat cardiac myocytes

Nihal ÖZTÜRK¹ (ID), Nazmi YARAŞ¹ (ID), Semir ÖZDEMİR¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Sülfür dioksit (SO₂) ve bileşikleri özellikle gelişmekte olan ülkelerde solunum ve beslenme yoluyla vücuda giren önemli toksik ajanlardır. SO₂ bileşiği olan sodyum metabisülfid (SMB; Na₂S₂O₅)'in gıda, içecek ve ilaçlarda yaygın şekilde koruyucu madde olarak kullanılması nedeniyle belirlenen günlük güvenli dozun üzerinde tüketildiği ve zararlı etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Ancak SMB'nin uzun süreli tüketiminin kalbin fonksiyonu üzerine olan etkisi bilinmezliğini korumaktadır. Çalışmamızda, kronik SMB uygulamasının kardiyomiyositlerde kasılma ve iyonik akımlar üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Hücre izolasyonu Langendorff sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kanüle edilmiş kalplerdeki kanın tamamının uzaklaştırılabilmesi için 3-5 dakika Ca-free solüsyonu ile perfüzyon yapıldıktan sonra dakika kollejenaz (0,7 mg/ml) ve proteaz (0,06 mg/ml) karışımı içeren Ca-free solüsyonu ile perfüzyona devam edilmiştir. Tüm kayıtlar, sıçan kalbinin taze izole edilmiş sol ventriküler miyositlerinden alınmıştır. Kardiyomiyositlerin kasılma ve gevşeme kinetiği, alan uyarımı altında sarkomer uzunluğundaki değişiklik kaydedilerek değerlendirilmiştir. Aksiyon potansiyeli

ABSTRACT

Objective: Sulfur dioxide (SO₂) and derivatives are major toxic agents that enters the body by inhalation and nutrition especially in developing countries. Sodium metabisulphite (SMB; Na₂S₂O₅), which is a SO₂ derivative, is a widely used preservative in food, beverages and medicines, has been reported to exert toxic effects when it is consumed above the daily safe dose. However, the effect of long-term consumption of SMB on heart function remains unknown. In our study, we aimed to determine the effects of chronic SMB administration on cardiomyocyte contraction and ionic currents.

Methods: For this purpose, 3-month-old male rats were used and divided into two groups: control (KON) and SMB. SMB (100 mg / kg / day) was administered for 6 weeks by gavage. Cell isolation was performed by Langendorff apparatus. Cannulated hearts were perfused for 3-5 min to remove the remaining blood with Ca²⁺ free solution and this was followed by perfusion with the Tyrode's solution containing 0,7 mg/ml collagenase and 0,06 mg/ml protease for 20-25 min. All recordings were taken from freshly isolated left ventricular myocytes of a rat heart. The contraction and relaxation kinetics of cardiomyocytes were evaluated by recording the change in sarcomere length under field stimulation. Myocyte

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Nihal ÖZTÜRK

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Antalya - Türkiye

E-posta / E-mail : nozturk@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 01.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 25.02.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.47640

Öztürk N, Yaraş N, Özdemir S. Sıçan kardiyak miyositlerinde kasılmanın ve iyonik akımların sodyum metabisülfid tarafından modülasyonu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78(1): 87 - 100

(AP), potasyum akımları ve L-tipi Ca^{2+} akımları (ICaL) voltaj clamp tekniği ile kaydedilmiştir.

Bulgular: SMB uygulaması kasılma genliğinde azalmaya sebep olurken, AP'nin repolarizasyon fazlarında uzamaya ve genliğinde azalmaya neden olmuştur ancak kasılma kinetikleri üzerinde değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, dinlenme membran potansiyelinin daha pozitif değerlere kaydığı gözlenmiştir. Kronik SMB uygulaması miyositlerde transient outward potasyum akımlarının baskılanmasına sebep olurken kuyruk akımlarını ve inward rectifier potasyum akımlarını etkilememiştir. Ek olarak SMB, ICaL'nin yoğunluğunda değişikliğe sebep olmamıştır ancak aktivasyon eğrisini daha pozitif potansiyellere kaydırmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, elde edilen sonuçlara göre ve günlük tüketiminin toksik dozlara ulaşabileceği göz önünde bulundurulduğunda, SMB'nin kalpte voltaja duyarlı iyonik akımları modüle ederek kardiyak fonksiyonlarda anormal değişikliklere sebep olabileceği gösterilmiştir. SMB ile indüklenen negatif inotropik etkinin moleküler mekanizmaları, SMB ile ilişkili kardiyovasküler hastalıkların patogenezi katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Aksiyon potansiyeli, iyonik akımlar, kasılma, sodyum metabisülfite

shortening, action potential (AP), potassium currents and L-type Ca^{2+} currents (ICaL) were recorded via voltage clamp technique.

Results: Chronic SMB administration caused a significant decrease in the contraction of myocytes along with prolongation in the repolarization phase of AP and decrease in the amplitude but no change was observed in the contraction kinetics. However, the resting membrane potential shifted to more positive values. Chronic SMB application significantly reduced the transient outward potassium currents of ventricular myocytes, but did not affect the tail currents and inward rectifier potassium currents. In addition, SMB did not change the density of ICaL although it elicited a shift to more positive potentials in the activation curve.

Conclusion: According to the results obtained in our study and considering that its daily consumption can reach toxic doses, it has been shown that SMB can cause abnormal changes in cardiac functions by modulating voltage-sensitive ionic currents in the heart. Molecular mechanisms of SMB-induced negative inotropic effect may contribute to the pathogenesis of SMB-associated cardiovascular diseases.

Key Words: Action potential, ionic currents, contraction, sodium metabisulphite

GİRİŞ

Sülfür dioksit (SO_2) bileşikleri olan sodyum metabisülfite (SMB; $Na_2S_2O_5$) veya sodyum piro-sülfite çeşitli gıda ürünlerinde ve birçok içeceklerde koruyucu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında ilaçlarda ve parenteral amino asit solüsyonlarında da SO_2 bileşikleri kullanılmaktadır (1). Ayrıca, SO_2 fosil yakıtların yanması ile atmosfere salınan önemli bir hava kirleticisidir. Solunan SO_2 , solunum yolunda sülfürik asit üretmek için kolaylıkla hidratlanabilir ve sonrasında bileşikleri olan bisülfite ve sülfite (nötr sıvıda 1: 3 M/M) oluşturmak üzere ayrılmaktadır

(2). Üretilmiş olan bisülfite ve sülfite, kan veya diğer vücut sıvılarında absorbe edilebilir. Diğer yandan SO_2 , kardiyovasküler sistemde endojen olarak üretilen biyolojik bir gazdır (3). Nitrik oksit, karbon monoksit ve hidrojen sülfür gibi diğer endojen gazlı moleküllere benzer şekilde, SO_2 'nin toksik etkilerinden farklı olarak kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde fizyolojik bir rol üstlendiği de öngörülmektedir (4). Ancak canlı sistemin farklı yollardan toksik dozda SO_2 'ye maruz kalması ve bunun sonucunda çeşitli biyolojik etkilerin oluşması muhtemeldir (5,6).

Birçok epidemiyolojik çalışma, SO₂ bileşiklerinin kardiyovasküler hastalık riskini ve kardiyovasküler hastalığa bağlı mortaliteyi artırdığını göstermiştir (7-9). Örneğin, SO₂ bileşiklerinin eksojen uygulaması hem spontan hipertansif sıçanlarda hem de normal sıçanlarda kan basıncını düşürmüştür (5). Hem SO₂ hem de SO₂ bileşiklerinin izole aort dokularında konsantrasyona bağlı vazodilatasyona sebep olduğu gösterilmiştir (6). Akut SO₂ uygulamasının aynı zamanda hemodinamik parametreler ve miyokardiyal kontraktilite üzerine doz bağımlı olarak negatif inotropik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (10).

Kardiyak elektrofizyolojik uyarım ve geri dönüşün düzenli olarak yayılması, miyositler aracılığıyla normal bir kardiyak aksiyon potansiyeli (AP) oluşumuna bağlıdır. AP'nin depolarizasyonuna ve repolarizasyonuna, spesifik membran iyon kanallarının etkisine bağlı olarak farklı iyon yükü taşıyıcılarının aracılık ettiği çoklu, etkileşen, içe ve dışa akımlar aracılık eder (11). Başlangıç depolarizasyon fazı hızlı bir yukarı çıkış (upstroke) şeklinde gerçekleşir ve esas olarak voltaja duyarlı sodyum kanalları yoluyla içeriye doğru Na⁺ akımı (I_{Na}) oluşturularak meydana getirilir. Bunu izleyen plato fazına içe doğru Ca²⁺ akımı (L-tipi Ca²⁺ kanal akımı; I_{CaL}) ve potasyum akımları hakimdir (12). Sonuçta hücre içine Ca²⁺ girişi sarkoplazmik retikulumdan Ca²⁺ salınımını indükler, böylece uyarılma-kasılma çiftlenimi aktive olur. Membranı nihai olarak dinlenim potansiyeline döndüren repolarizasyon, esas olarak voltaj kapılı K⁺ kanallarından dışarı doğru oluşan akım tarafından yönlendirilir (13). K⁺ kanalı aktivitesi, depolarizasyon süresini ve dolayısıyla Ca²⁺ aracılı kasılmanın zaman sürecini ve refrakter periyodu sınırladığı için AP süresinin (APD) temel belirleyicisidir. Ayrıca içeri doğrultucu potasyum akımları (inward rectifier potassium currents; I_{K1}), repolarizasyonun terminal fazında büyük öneme sahiptir ve kardiyomiyositlerin dinlenim membran potansiyelini (DMP) sürdürmesi için gereklidir (14,15). Bu akımlar, AP'nin geliştirilmesi, sürdürülmesi ve sonlandırılmasına kesin olarak zamanlanmış ve düzenlenmiş bir şekilde

katkıda bulunur (11).

SO₂ bileşiklerinin sıçanların hipokampal CA1 ve dorsal kök ganglion nöronlarında Na⁺ ve K⁺ akımlarında değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir (16-18). Kardiyomiyosit hücrelerinde yapılan çalışmalarda SO₂ bileşiklerinin doz bağımlı olarak geçici dışarı potasyum akımları (transient outward potassium currents; I_{to}) ve I_{K1}'i artırdığı, ancak kuyruk akım değerlerini (steady-state potassium currents; I_{ss}) etkilemediği ve aynı şekilde I_{Na}'yı da doz bağımlı olarak artırdığı sonucuna varılmıştır (19,20). Bununla birlikte, SO₂ bileşiklerinin memeli hücrelerinin I_{CaL} akımları üzerindeki akut etkileri hakkında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Zhang ve ark. (21) yapmış oldukları çalışmada; miyositler üzerine uygulanan SO₂ bileşiklerinin doz bağımlı olarak Ca²⁺ akımlarını baskıladığını ileri sürerken Meng ve ark. (22), SO₂ bileşiklerinin I_{CaL}'yi konsantrasyona bağlı bir şekilde artırdığını göstermiştir. Ayrıca yakın dönemde yapılan bir başka çalışmada da yine AP süresinin (APD) uzadığı gösterilmiştir (23).

Birleşmiş Milletler Gıda Katkı Maddeleri Birliği FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations - Amerika Gıda ve Tarım Örgütü (GTÖ)) / (World Health Organization) 1974 yılında günlük kabul edilebilir SO₂ bileşiklerinin dozunu 100 katlık güvenlik faktörü de ekleyerek 0,7 mg/kg/gün olarak belirlemiş ve 2000 yılında da bu doz tekrar teyit edilmiştir (24). Ancak insanların, metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında endojen sülfite, katkı maddesi olarak eklendiği ürünlerin tüketilmesi ve hava kirliliğinin artması sonucu ise eksojen SO₂ ve bileşiklerine maruz kalması sonucu günlük kabul edilebilir dozun aşılması çok muhtemel bir durumdur (25). Kardiyomiyositlerde SO₂ bileşiklerinin oluşturduğu değişikliklerin incelendiği çalışmalarda, genellikle akut etkiler üzerine odaklanılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda; altı hafta boyunca kronik olarak uygulanan 100 mg/kg/gün dozundaki SMB'nin izole edilen kardiyomiyositlerde kasılma ve iyonik akımlar

üzerine olan etkileri incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda; üç aylık genç erişkin Wistar cinsi toplam 20 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen sıçanlar, sıcaklığı $22\pm 2^\circ\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı ile 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulmuş ve ticari sıçan yemi ile suya herhangi bir kısıtlama olmaksızın ulaşmaları sağlanmıştır. Sıçanlar çalışmanın başlangıcında rastgele olmak üzere iki gruba ayrılmıştır: Kontrol grubu (KON, n=10) ve SMB grubu (n= 10). SMB grubuna altı hafta boyunca günlük 100 mg/kg SMB gavaj yoluyla verilerek kronik hayvan modeli oluşturulurken KON hayvanlarına da aynı oranda distile su verilmiştir.

Altı haftanın sonunda deney gruplarında bulunan hayvanlar hafif anestezi altındayken (50 mg/kg sodyum pentobarbital) kalpler hızlı bir şekilde çıkarılmış ve Langendorff sistemine bağlanmıştır. Asılı kalpler önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO_4 ; 1,2 KH_2PO_4 ; 5,8 HEPES; 20 glikoz olan ve pH 7,2 dengesinin sağlanması için %5 CO_2 -%95 O_2 ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 20-25 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (0,7 mg/mL) ve proteaz (0,06 mg/mL) karışımı enzim geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabın içine alınmış ve sol ventrikülü ayrıştırılarak, makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilen hücreler birkaç yıkama işleminden geçirilmiştir. Ortamdaki hücrelerin Ca^{2+} adaptasyonu kademeli olarak sağlanmıştır (26).

Kontraktıl Parametreler

İzole edilen hücreler, içinden Tyrode solüsyonu [(mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 11,8 Na-Hepes, 10 glikoz, pH:7,35] geçen ve iki ucunda

elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınmıştır. Bu hücrelerden uyarılabilir olanlar seçilerek 5-10 V genliğindeki 0,5 Hz frekanslı pulsların oluşturduğu kasılma miktarları kaydedilmiştir (Şekil 3a) (IonOptix LLC, Milton USA). Alınan kayıtların, IonWizard (IonOptix, USA) programı aracılığıyla % kasılma oranı (L/L_0), gerimin tepesine çıkış süresi (TP) ve gevşemenin %50'sine (RT_{50}), gevşemenin %75'ine (RT_{75}), gevşemenin %90'ına (RT_{90}) iniş süreleri hesaplanmıştır.

Aksiyon Potansiyeli ve Potasyum Akımlarının Kaydı

Çalışmamızda, sol ventrikül miyositlerinden AP kayıtları da alınmıştır. Tüm kayıtlar direnci 2-2,5 $\text{M}\Omega$ 'luk elektrotlar yardımıyla 1 Hz'lik frekansta yapılmıştır. Pipet içi solüsyon içeriği (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 6,8 MgCl_2 ; 5 Na_2ATP ; 5; 0,4 Na_2GTP ; 10 EGTA; 4,7 CaCl_2 ; 20 HEPES (pH=7,4) olacak şekilde hazırlanmıştır. AP için akım kenetleme konfigürasyonunda; hücre içine küçük depolarize edici akım pulsları enjekte edilerek hücrenin uyarılmasıyla membranda oluşan potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Elde edilen AP'nin repolarizasyon fazlarının %25, 50, 75, 90 ($\text{APD}_{25, 50, 75, 90}$) süreleri değerlendirilmiştir (26).

Potasyum Akımlarının Kaydı

Bütün kanal akımları voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alınmıştır. Bunun için hücrenin $G\Omega$ düzeyinde direnç oluşturacak şekilde elektrot ucuna yapışması sağlandıktan sonra elektrik pulsu uygulanarak hücre zarı kırılmıştır.

Kayıt için, -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere 600 ms'lik -40 mV'luk ön-puls uygulanarak sodyum (Na^+) akımları inaktif duruma getirilmiştir. Sonra hücrelere 3 sn'lik pulslar 4 s'lik aralıklarla ve 10 mV'luk basamaklar şeklinde -120 mV'tan +60 mV'a kadar 19 defa uygulanarak total potasyum akımları kaydedilmiştir. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen potasyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme

hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir.

Kayıt için 1,5-2,5 MΩ'luk elektrotlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş direncinin 4 MΩ ve altında olması sağlanmıştır. Akım kayıtları için gerekli hücre dışı ortam, solüsyonların kapiller borular aracılığıyla ve yer çekimi yardımıyla direkt hücre üzerine uygulanması aracılığıyla sağlanmıştır. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl₂; 0,5 MgCl₂; 10 Glikoz; 11,8 HEPES (pH=7,35), pipet için ise (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 10 NaCl; 5 MgATP; 10 K-HEPES (pH=7,2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca Ca²⁺ akımlarını bloke etmek için kapiller içi ortama CaCl₂ (250 μM) eklenmiştir. Geçici I_{ss} değerleri çıkarılarak hesaplanmıştır. I_{K1} akımları ise -120 mV ile +10 mV potansiyel basamaklarında elde edilen akım kayıtlarının kuyruk kısımları analiz edilerek elde edilmiştir. Daha sonra, ölçülen değerlerde hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hücre sığasına bölünerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir (26).

Kalsiyum Akımlarının Kaydı

I_{CaL} akımları tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1-1,5 MΩ'luk elektrotlar kullanılarak kaydedilmiştir. Ölçümler için pipet solüsyonu olarak (mM): 120 L-aspartate, 20 CsCl, 10 NaCl₂, 5 MgATP, 10 HEPES ve 10 EGTA (pH = 7,2) ve banyo solüsyonu olarak (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl₂; 0,5 MgCl₂; 10 Glikoz; 11,8 HEPES (pH=7,35) içeren solüsyonlar kullanılmıştır. Ölçümler için voltaj kenetlemenin tüm hücre konfigürasyonu kullanılmıştır. Kayıt için, -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere -40 mV'luk ön-puls uygulanarak bu seviyede bir süre tutulmuş ve sodyum (Na⁺) akımları bloke edilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde akım kayıtları alınmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular

Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen kalsiyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiş ve Clampfit 11.0.3 yazılımı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 300 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir (26).

Kararlı durum aktivasyonunu tahmin etmek için, test potansiyellerine karşı Ca²⁺ kanalı iletkenliklerinin grafiği çizdirilmiştir. Sürücü kuvvet göz önünde bulundurularak elde edilen akım değerleri Boltzmann denkleminde: $G/G_{maks} = \{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]\}^{-1}$ fit edilerek aktivasyon eğrisi elde edilmiştir. Denklemden G/G_{maks} , maksimum iletkenlik ile normalize edilen bağıl iletkenliği, $V_{1/2}$ yarı aktivasyon potansiyelini ve k Boltzmann katsayısını temsil etmektedir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, Clapmfit11.0.3 programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± SEM (standart hata) olarak verilmiştir. Her değişken için Shapiro-Wilk normallik testi sonrasında da Student's t-testi uygulanmıştır. P<0,05'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

BULGULAR

SMB Uygulamasının Fraksiyonel Kısalma Üzerine Etkileri

SMB'nin sıçan kalbinde yol açtığı değişikliklerin fonksiyonel parametrelere etkisini belirlemek amacıyla kasılma cevaplarına bakılmıştır. Bunun için alan uyarısı altında 0,5 Hz'lik uyarılar gönderilerek kardiyomiyosit boyundaki kısalmanın başlangıç boyuna oranı (fraksiyonel kısalma) ölçülmüştür ve Şekil 1A'da örnek kayıtlar verilmiştir. Kalbin mekanik aktivitesine bakıldığında, SMB uygulamasının miyositin fraksiyonel kısalma miktarını anlamlı düzeyde azalttığı

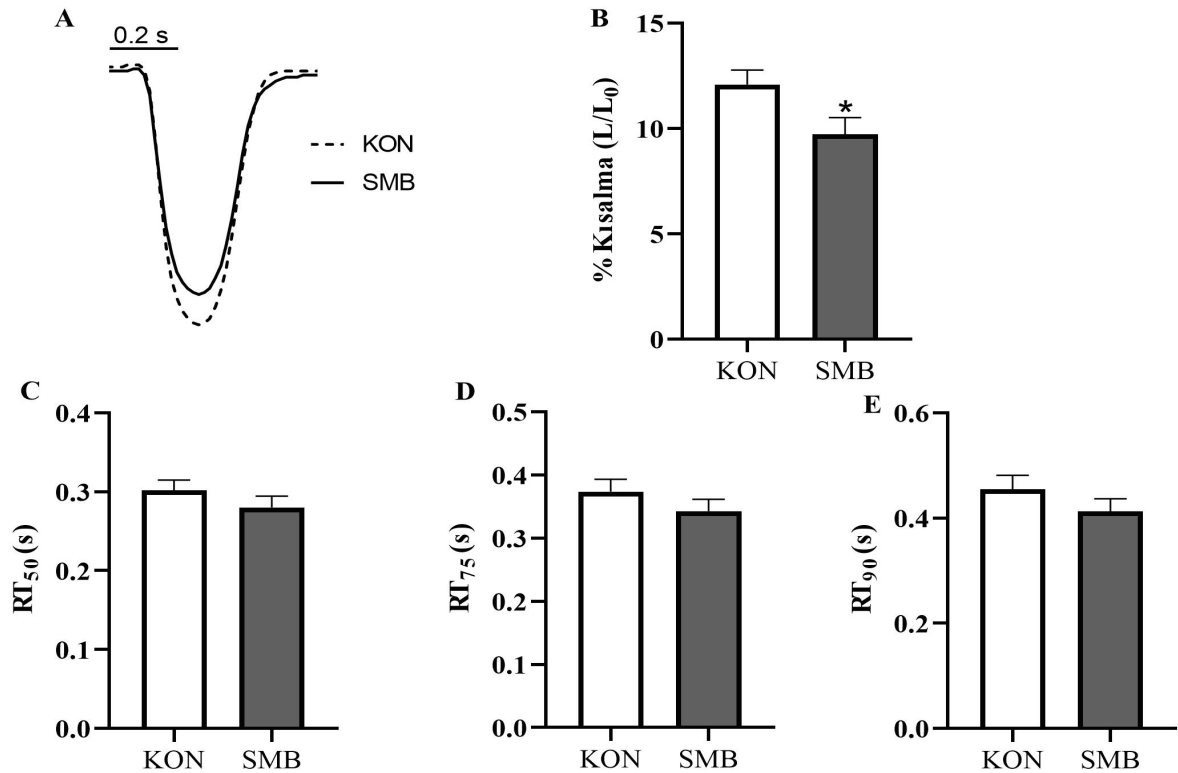
belirlenmiştir (Şekil 1B). Aynı kayıtların TP ve RT_{50} , RT_{75} , RT_{90} süreleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 1C, D, E). SMB uygulaması % kasılma oranında azalmaya sebep olmasına karşın relaksasyon kinetikleri üzerinde etkili olmamıştır.

SMB Uygulamasının Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkileri

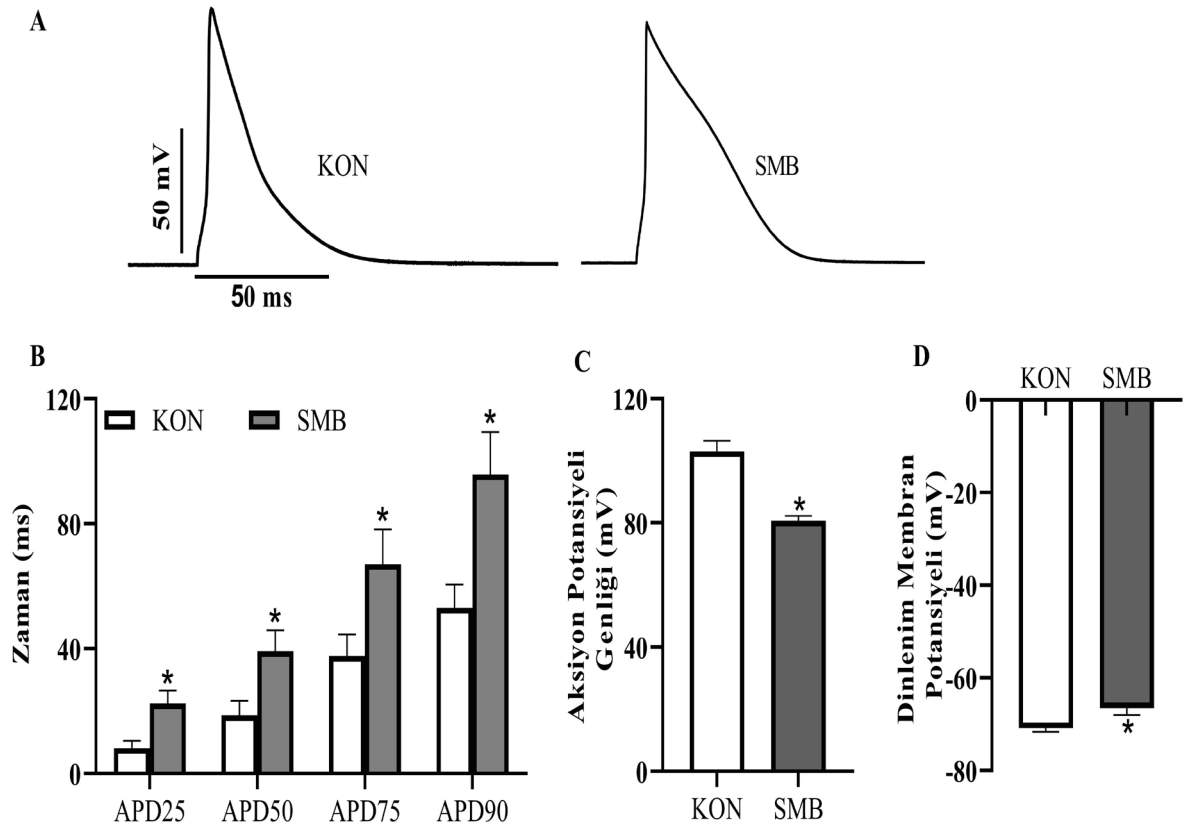
Aksiyon potansiyeli analizlerinde DMP, AP tepe değeri ve repolarizasyonun fazları incelenmiştir. Gruplardan elde edilen AP'lere ilişkin örnek kayıtlar Şekil 2.A'da verilmiştir. Analizlerin sonucunda SMB grubunun repolarizasyon sürelerinin ($22,45 \pm 4,11$ ms; $39,10 \pm 6,74$ ms; $67,06 \pm 11,05$ ms; $95,71 \pm 13,68$ ms), kontrol değerlerine ($8,12 \pm 2,35$ ms; $18,69 \pm 4,53$ ms; $37,63 \pm 6,92$ ms; $53,02 \pm 7,5$ ms) göre anlamlı düzeyde uzun olduğu görülmüştür (Şekil 2B).

Ayrıca AP genliği incelendiğinde KON grubuna göre SMB grubunda genliğin anlamlı düzeyde düştüğü belirlenmiştir ($101,99 \pm 3,45$ mV; $80,62 \pm 1,67$ mV, KON ve SMB grupları sırasıyla) (Şekil 2C). Diğer yandan altı haftalık deney sürecinin sonunda SMB grubu sıçanlarından izole edilen miyositlerden elde edilen AP kayıtlarında DMP değerlerinin de daha pozitif olduğu görülmüştür (KON: $-70,86 \pm 0,77$ mV; S: $-66,52 \pm 1,55$ mV) (Şekil 2D).

Kardiyak elektrofizyolojik uyarım ve geri dönüşün düzenli olarak yayılması, miyositler aracılığıyla normal bir kardiyak AP oluşumuna bağlıdır. AP'nin depolarizasyon ve repolarizasyon evreleri ise voltaja duyarlı iyon kanalları aracılığıyla oluşturulan akımlar aracılığıyla sürdürülür. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen kasılma ve AP'lerde oluşan değişikliklerin altında yatan iyonik mekanizmaları açığa çıkarmak



Şekil 1. 0,5 Hz frekansta uygulanan elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomiyositlerde elde edilen kasılma yanıtları. A. 0,5 Hz frekanslı uyarı için miyosit kasılma örneği, B. Miyosit % kısılma oranı, C. Tepeden relaksasyonun %50'sine iniş zamanı, D. Tepeden relaksasyonun %75'ine iniş zamanı, E. Tepeden relaksasyonun %90'ına iniş zamanı. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. KON grubu n= 22, SMB grubu n= 29, KON grubundan fark *p<0,05.



Şekil 2. Gruplara ait örnek aksiyon potansiyeli kayıtları ve AP analiz parametreleri. A. Gruplar için örnek AP kayıtları, B. Miyosit hücresi AP repolarizasyon evresinin %25, 50, 75 ve 90 (APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅, APD₉₀)'ne inme süreleri, C. Aksiyon potansiyeli genliği, D. Dinlenim membran potansiyeli. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. KON grubu n= 15, SMB grubu n= 10, KON grubundan fark *p<0,05.

amacıyla miyosit hücrelerinde I_{to} , I_{ss} , I_{K1} ve I_{CaL} akımları incelenmiştir.

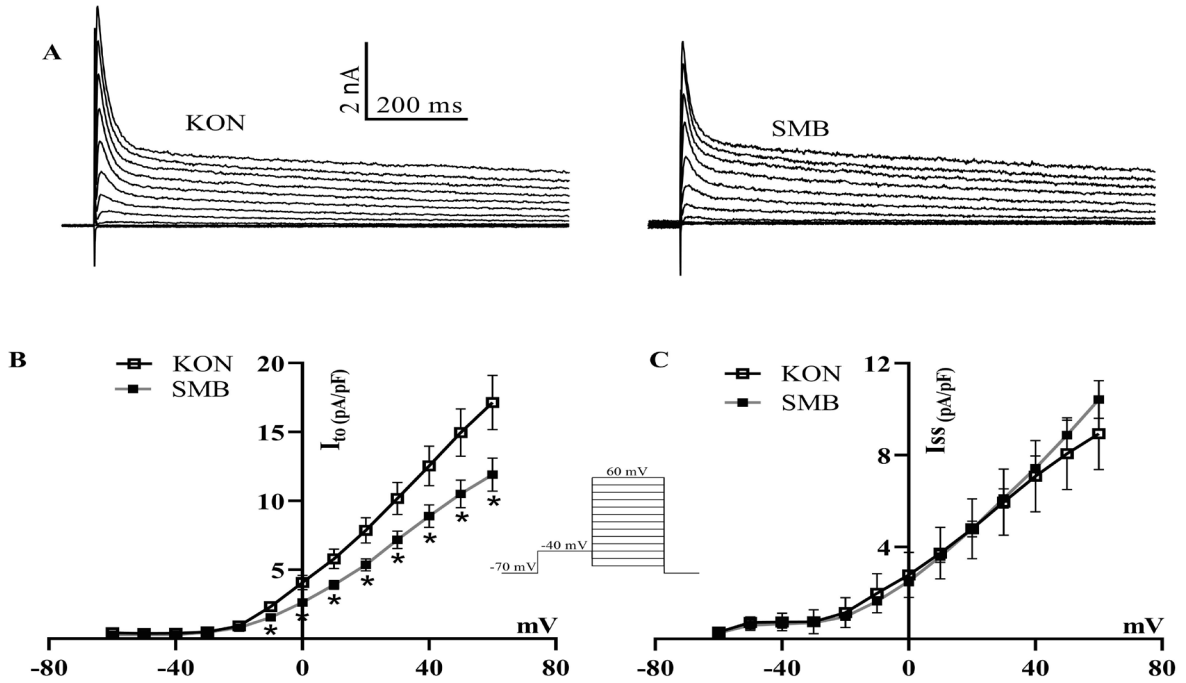
SMB Uygulamasının K^+ Akımları Üzerine Etkisi

Potasyum akımları AP'nin erken ve geç repolarizasyon fazlarının oluşmasında ve DMP'nin stabilizasyonunda görev olan iyonik akımlardır. Bu nedenle çalışmamızda, öncelikli olarak repolarizasyon sürecinin en önemli belirleyicilerinden olan I_{to} , I_{ss} akımları analiz edilmiştir. Gruplara ait ortalama akım yoğunluklarının zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve örnek akım kayıtları Şekil 3'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, KON grubuna kıyasla SMB grubunda I_{to} tepe değerinin anlamlı seviyede baskılandığı gözlenmiştir (KON: $17,14 \pm 1,97$ pA/pF; S: $11,91 \pm 1,20$ pA/pF, +60 mV için elde edilen değerler).

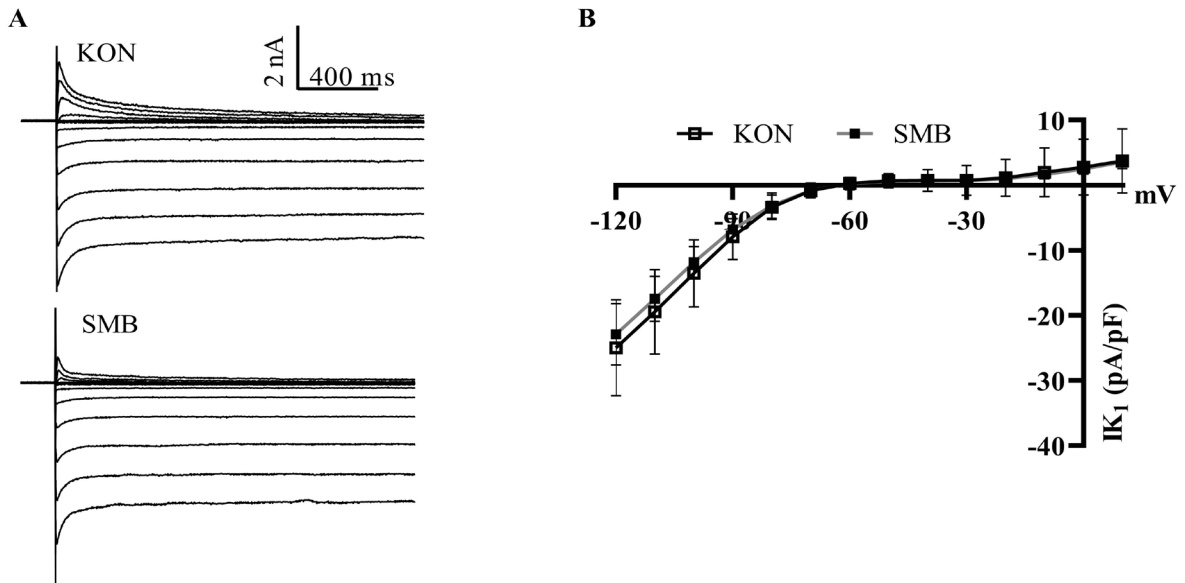
SMB uygulaması I_{ss} akımları üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır (KON: $8,93 \pm 1,56$ pA/pF; S: $10,43 \pm 0,83$ pA/pF, +60 mV için elde edilen değerler). Öte yandan dinlenim membran potansiyelinin stabil olmasını sağlayan I_{K1} akımları SMB uygulaması ile değişim göstermemiştir (Şekil 4A, B).

SMB Uygulamasının Ca^{2+} Akımları Üzerine Etkisi

L-tipi Ca^{2+} kanal akımları AP'nin oluşumunda etkili olmanın yanında, SR'dan RyR aracılığıyla Ca^{2+} salınımını tetikleyerek uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen primer hücrel mekanizmaların başında gelir. Bu nedenle çalışmamızda, SMB'in I_{CaL} akımları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Şekil 5A'da örnek akım kayıtları verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, kronik SMB uygulamasının I_{CaL} genlikleri üzerinde anlamlı



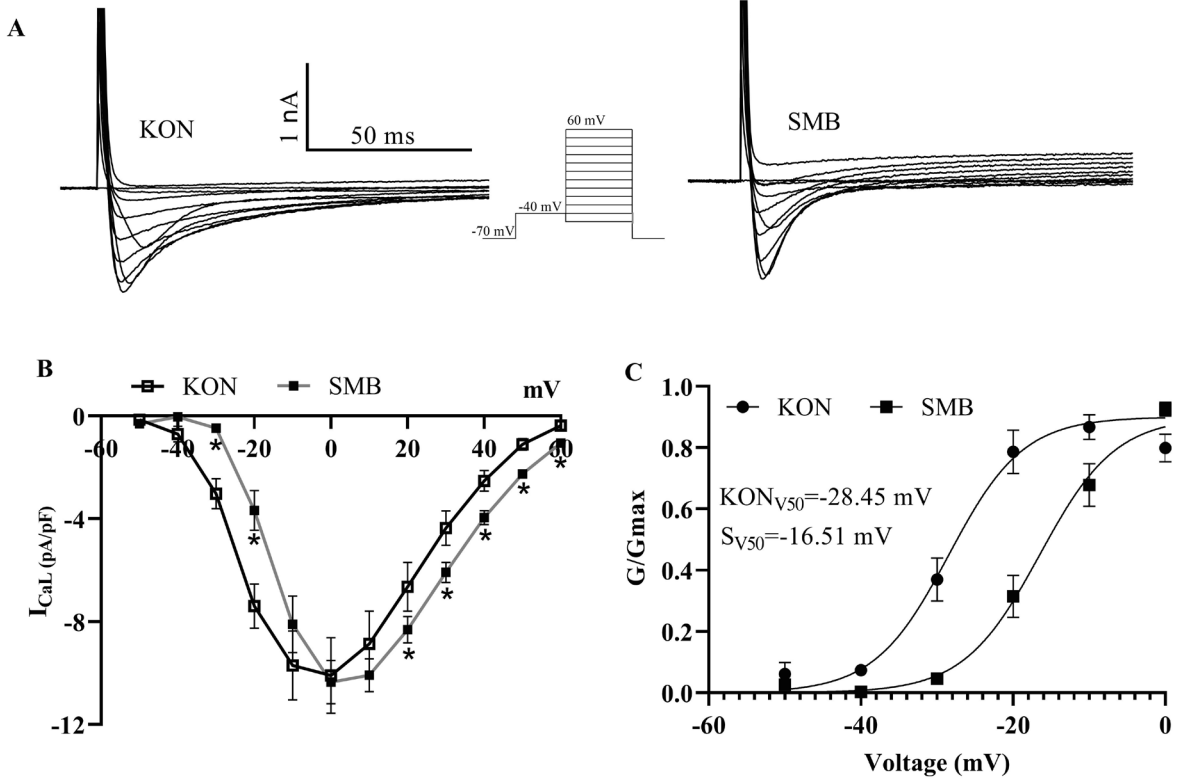
Şekil 3. Gruplara ait I_{to} - I_{ss} akımları ve I-V değişim eğrileri. A. Gruplara ait örnek potasyum akımları, B. I_{to} için I-V grafiği, C. I_{ss} için I-V grafiği. K⁺ akımları -120 mV ile +60 mV arasında 10 mV'luk artışlarla 3 s süreli test pulsarı uygulanarak elde edilen kayıtların -60 mV ile +60 mV arasında kalan kısımlarının analizi ile elde edilmiştir. I_{to} , K⁺ akımının tepe değerlerinden kuyruk kısmının (I_{ss}) çıkarılması ile elde edilmiştir. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. KON grubu n= 19, SMB grubu n= 16, KON grubundan fark *p<0,05.



Şekil 4. Gruplara ait I_{K1} akımları ve I-V değişim eğrisi. A. Gruplara ait örnek I_{K1} akımları, B. I_{K1} için I-V grafiği. I_{K1} akımları -120 mV ile +60 mV arasında 10 mV'luk artışlarla 3 s süreli test pulsarı uygulanarak elde edilen kayıtların -120 mV ile +10 mV potansiyelleri arasında kalan kayıtların kuyruk kısımlarının analizi ile elde edilmiştir. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. KON grubu n= 19, SMB grubu n= 16, KON grubundan fark *p<0,05.

etki oluşturmadığı (KON: $-10,10 \pm 1,47$ pA/pF; S: $-10,36 \pm 0,85$ pA/pF, 0 mV için elde edilen değerler) belirlenmiştir (Şekil 5B). Diğer yandan, SMB uygulaması I_{CaL} akımlarının kararlı durum aktivasyon dinamiklerinde (G/G_{maks}) anlamlı değişikliğe sebep olmuştur (Şekil 5C).

I_{CaL} akımlarının kondüktans-voltaj eğrisi incelendiğinde V_{50} değeri KON grubu için $-28,45$ mV ($k=4,88$) ve SMB grubu için $-16,51$ mV ($k=4,99$) elde edilmiştir. Sonuç olarak SMB uygulamasının aktivasyon potansiyelini daha pozitif potansiyellere kaydırıldığı bulunmuştur.



Şekil 5. Gruplara ait I_{CaL} akımları A. Gruplara ait örnek I_{CaL} akımları, B. I_{CaL} için I-V grafiği, C. Ca akımlarının kararlı durum aktivasyon dinamiği (G/G_{maks}). Kayıtlar -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla $+60$ mV'a kadar 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde alınmıştır. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. KON grubu $n=14$, SMB grubu $n=19$, KON grubundan fark $*p<0,05$.

TARTIŞMA

İnsanlar hem eksojen hem de endojen olarak SO_2 ve bileşiklerine maruz kalırlar. Endojen sülfidler, vücudun sülfür içeren amino asitlerinin normal işleyişinin bir sonucu olarak üretilir (27). Öte yandan eksojen SO_2 bileşikleri, bazı yiyecek ve içeceklerde koruyucu olarak veya bir fermantasyon ürünü olarak bulunur (28). SMB'nin asitler ve suyla

reaksiyona girerek toksik SO_2 gazı açığa çıkardığı ve sodyum bisülfid ile karşılaştırıldığında asitler ve suyla reaksiyona girmeye daha yatkın olduğu bilinmektedir (29). Daha önce yapılan çalışmalar, SO_2 'ye maruz kalmanın birçok kardiyovasküler hastalık, nörotoksisite, genotoksisite ve ölüm oranı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (30). Bu nedenle çalışmamızda, gereksiz morbidite ve mortaliteyi ortadan kaldırmak için kronik olarak uygulanmış

olan SMB'nin sıçan kardiyomiyositlerinde kasılma ve iyonik akımlar üzerine olan etkileri incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar: 1) SMB uygulanan sıçan kardiyomiyositlerinde fraksiyonel kasılma azalmış ancak relaksasyon zamanları etkilenmemiştir. 2) Uyarılma kasılma çiftleniminin temelini oluşturan AP'nin analizleri sonucunda APD'nin tüm fazlarda uzadığı, genliğinin azaldığı ve DMP'nin ise daha pozitif değerlere kaydığı gözlenmiştir. 3) AP oluşumunda görev alan K⁺ akımlarından I^{to} önemli düzeyde baskılanırken I^{ss} ve I^{K1} akımları etkilenmemiştir. 4) Kasılmanın düzenli sürdürülmesinde çok önemli bir yere sahip olan Ca²⁺ akımlarının yoğunluğunun değişmediği ancak kondüktans-voltaj ilişkisinin önemli düzeyde pozitif kaydığı tespit edilmiştir.

İnsanlar, metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında endojen sülfite, katkı maddesi olarak eklendiği ürünlerin tüketilmesi (25) ve hava kirliliği sonucu ise ekzojen SO₂ bileşiklerine maruz kalmaktadırlar. SO₂ bileşiklerin 1959 yılından beri FDA onayıyla gıda katkı maddeleri olarak sofralarımızda yer almaktadır (31). Yapılan bir çalışmada, 72 mg/kg/gün dozunda alınan SO₂ bileşiklerinin zararlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (32). Bu çalışmaya dayanarak WHO, 100 katlık güvenlik faktörünü de ekleyerek günlük 0,7 mg/kg sülfid dozunun zararlı etkisinin olmayacağını açıklamıştır. Ancak, SO₂ ve bileşiklerini içeren ürünlerin tüketilme oranları ve sıklığına bağlı olarak bu dozun üzerine çıkılabileceği pek çok araştırma ile ortaya konmuş, hatta toksik etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (28,33). Gerek ani anafilaktik reaksiyonlar gerekse solunum yollarındaki ve ciltteki iritan etkileri sebebiyle SO₂ bileşiklerinin diyet yoluyla alımı bilim camiası tarafından inceleme altına alınmıştır. Bu nedenle bir yandan deneysel araştırmalarla SO₂ bileşiklerinin alımının çeşitli sistemler üzerindeki doz bağımlı etkileri incelenirken, diğer yandan halk sağlığı taramaları ile farklı popülasyonlarda SO₂ bileşiklerine maruziyetin maruziyetinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

devam etmektedir (34,35). SMB'nin doz bağımlı etkileri incelenen çalışmada, beyin dokusunda 100 mg/kg/gün dozunun toksik etki oluşturduğunu gösterilmiştir (36). Bu nedenle çalışmamızda daha önce toksik etkileri saptanan 100 mg/kg/gün SMB dozunun kardiyomiyositler üzerine olan etkilerinin çalışılması uygun bulunmuştur.

Hayvan deneylerinde ve klinik araştırmalarda, SO₂'nin kalp atım hızını değiştirmek, hipertansiyonu azaltmak ve enflamatuar reaksiyonlara katılmak gibi çeşitli kardiyovasküler fonksiyonlara sahip olduğu bulunmuştur (10,37). SO₂ bileşiklerinin (Na₂SO₃ / NaHSO₃) fizyolojik bir dozunun izole arterlerde hafifçe gevşemeye sebep olduğu ve etkinin konsantrasyon bağımlı (1-12 mmol/L) bir etki olduğu gözlenmiştir (38). Ayrıca yapılan bir çalışmada ekzojen SO₂ bileşiklerinin miyokard üzerinde negatif bir inotropik etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (10). Toksik doz olan 100 mg/kg SMB'nin kasılmayı baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ancak relaksasyon zamanları üzerinde etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca miyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimini büyük oranda kontrol eden AP'nin süresinin uzadığını gösterdik. Lai ve ark. (23) yapmış oldukları çalışmada; HL-1 atriyum miyositler üzerine uyguladıkları 30 µM SMB'nin bizim sonuçlarımızla benzer şekilde APD₉₀'ı önemli ölçüde uzattığını ancak DMP'yi etkilemediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda ise hem DMP'de hem de AP genliğinde değişim elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların farklılığı çalışılan hücre tipinin farklı olması ya da SO₂ bileşiklerinin kronik ve akut etkilerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda; kronik olarak uygulanmış olan SMB'nin AP'de neden olduğu değişimlerin altında yatan mekanizmayı açıklayabilmek amacıyla ilk olarak APD'nin temel belirleyicisi olan K⁺ akımları incelenmiştir. APD'nin uzaması ile tutarlı olarak I_{to} baskılanmıştır ancak SMB uygulaması I_{ss}'ler üzerinde etkili olmamıştır. Önceki çalışmalar, SMB'nin farklı K⁺ akımlarının genliğini arttırdığını bildirmiştir (19,39).

Ancak yakın dönemde yapılan bir çalışmada, delayed rectifier K^+ akımlarının SMB uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir. SMB uygulamasının I_{ss} üzerinde etkili olmaması yapılan çalışmalarda ortak sonuç gibi görünmektedir. Ribera ve ark. (40) 10 mg SO_2 /kg veya 25 mg/kg/gün ile 28 günlük pişmiş bisküvi diyetinden sonra sıçanlarda hiçbir yan etki gözlemlenmediğini bildirmiştir. Elde edilen çelişkili bulgular SMB'nin yan etkilerinin doz ve maruz kalınan süre ile doğrudan ilişkili olabileceğini göstermektedir.

SMB'in AP'nin genliği üzerine olan etkilerine dair direkt yapılan analiz yoktur ancak AP'nin tetiklenmesinden ve genliğin büyüklüğünden sorumlu olan I_{Na} ile ilgili değişimler incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, perfüzyonla hücre üzerine uygulanan farklı dozlarda SO_2 bileşiklerinin doz bağımlı olarak I_{Na} akımlarını artırdığı, inaktivasyon eğrisinde pozitif kaymaya neden olduğu (23), iletkenlik-voltaj ilişkisini hiperpolarizasyon yönünde kaydıracağı gösterilmiştir (19). Ancak bizim AP genliğinde anlamlı bir azalma olmuştur ve bu I_{Na} baskılanması ile ilişkili olabilir. Uygulamış olduğumuz doz toksik seviye olarak kabul edilmektedir ve uzun süreli sistemik maruziyet söz konusudur. Dolayısıyla K^+ akımlarında farklı dozlarda elde edilen farklı sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak AP genliğindeki azalmanın I_{Na} 'daki azalma ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca negatif membran potansiyellerinde, I_{K1} iletkenliği diğer herhangi bir akımdan çok daha büyüktür ve DMP'nin K^+ denge potansiyeline yakın bir değerde sürdürülmesinde çok önemli bir role sahiptir. Bu nedenle I_{K1} 'in fizyolojik modülasyonunun uyarılabilirlik üzerinde önemli etkileri olması muhtemeldir. Çalışmamızda, I_{K1} akımlarında bir değişim elde edilmemiştir ancak DMP değerlerinde pozitif kayma gözlenmiştir. Bu sonuç SMB'nin DMP'nin oluşumunda ve korunmasında görev alan asetilkolin ile aktive olan K^+ kanalları, büyük kondüktanslı Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları ya da

klorür akımları gibi diğer bazı yapılar üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. SMB'in DMP'de meydana getirdiği değişimler ve I_{K1} üzerinde etkili olmaması bu olayların daha detaylı çalışılması gerektiğini göstermektedir.

Kardiyak AP süresinin uzamasına neden olabilecek bir diğer iyon akımı da I_{CaL} akımıdır. Eksojen SO_2 bileşiklerinin, I_{CaL} ile ilişkili bir mekanizma yoluyla miyokard üzerinde negatif bir inotropik etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (10). Zhang ve ark. (21), yapmış oldukları çalışmalarda; SO_2 ve SO_2 bileşiklerinin sıçan kardiyomiyositlerindeki I_{CaL} 'yi baskılayabileceğini doğrulamıştır (21). Ancak bazı sonuçlar bu bulgulardan farklıdır. İlk çalışmalarında Nie ve Meng (22), SO_2 bileşiklerinin doz bağımlı olarak izole sıçan ventriküler miyositlerinde I_{CaL} 'yi artırdığını göstermiştir. Diğer yandan 30 μ M SMB uygulanan bir çalışmada ise I_{CaL} 'nin değişmediği gösterilmiştir. Çalışmamızda; SMB'in uzun süreli uygulamasının sonucunda I_{CaL} akım yoğunluğunun değişmediğini ancak kondüktans-voltaj ilişkisinin pozitif kaydığı gösterilmiştir. Bu sonuç I_{CaL} 'nin de APD uzamasına katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Ancak SO_2 ve bileşiklerinin L-tipi Ca^{2+} kanallarının özelliği üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda, kronik olarak uygulanan SO_2 ve türevlerinin sıçan kardiyak miyositlerinde voltaj kapılı iyon kanallarını modüle edebileceği ve bu modülasyonu I_{to} 'nun akım yoğunluğunu baskılayarak ve I_{CaL} akımının aktivasyon kinetiğini değiştirerek meydana getirdiği ortaya konulmuştur. İyonik akımlarda meydana gelen bu değişimler AP ve kasılma üzerinde önemli değişikliklere sebep olmuştur. Bu nedenle çalışmamız, inhalasyon ile alınan SO_2 veya bileşiklerini içeren besinlerin (bisülfid, metabisülfid vb.) alınımının kardiyak miyositlerde voltaja duyarlı iyon kanalları üzerinde etkili olarak aritmilere yol açabileceğini öne sürmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım-Kullanım ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 07/04/2008 ve Karar No: 06).

KAYNAKLAR

1. Kayraldiz A, Kaya FF, Canimoğlu S, Rencüzoğulları E. Mutagenicity of five food additives in Ames/Salmonella/microsome test. *Ann Microbiol*, 2006;56(2):129-33.
2. Shapiro R. Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide). *Mutat Res*, 1977;39(2):149-75.
3. Jin H, Du S, Zhao X, Wei H, Wang Y, Liang Y, et al. Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2008;29(10):1157-66.
4. Du J, Zhang C, Yan H, Tang C. A newly found gasotransmitter, hydrogen sulfide, in the pathogenesis of hypertension and other cardiovascular diseases. *Curr Hypertens Rev*, 2006;2(2):123-6.
5. Meng Z, Zhang H. The vasodilator effect and its mechanism of sulfur dioxide-derivatives on isolated aortic rings of rats. *Inhal Toxicol*, 2007;19(11):979-86.
6. Meng Z, Geng H, Bai J, Yan G. Blood pressure of rats lowered by sulfur dioxide and its derivatives. *Inhal Toxicol*, 2003;15(9):951-59.
7. Chang C-C, Tsai S-S, Ho S-C, Yang C-Y. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan. *Environ Res*, 2005;98(1):114-9..
8. Wong TW, Tam WS, Wong AH. Association between daily mortalities from respiratory and cardiovascular diseases and air pollution in Hong Kong, China. *Occup. Environ Med*, 2002; 59(1): 30-5.
9. Xu Z, Yu D, Jing L, Xu X. Air pollution and daily mortality in Shenyang, China. *Arch Environ Health*, 2000;55(2):115-20.
10. Zhang SQ, Du JB, Tian Y, Geng B, Tang CS, Tang XY. Effects of sulfur dioxide on cardiac function of isolated perfusion heart of rat. *Procedia Environ Sci*, 2008;88(12):830-4.
11. Walsh KB, Parks GE. Changes in cardiac myocyte morphology alter the properties of voltage-gated ion channels. *Cardiovasc Res*, 2002;55(1):64-75.
12. Xiao YF, Zeind AJ, Kaushik V, Perreault-Micale CL, Morgan JP. Mechanism of suppression of cardiac L-type Ca(2+) currents by the phospholipase A(2) inhibitor mepacrine. *Eur J Pharmacol*, 2000;399(2-3):107-16.
13. Huang CLH. Murine electrophysiological models of cardiac arrhythmogenesis. *Physiol Rev*, 2017;97(1):283-409.
14. Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol*, 2001;33(4):625-38.

15. Miake J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest*, 2003;111(10):1529-36.
16. Meng Z-Q, Sang N. Effect of SO₂ derivatives on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Sheng Li Xue Bao*, 2002;54(3):267-70.
17. Du Z, Meng Z. Effects of derivatives of sulfur dioxide on transient outward potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons. *Food Chem Toxicol*, 2004;42(8):1211-6.
18. Du Z, Meng Z. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Res*, 2004;1010(1-2):127-33.
19. Nie A, Meng Z. Sulfur dioxide derivative modulation of potassium channels in rat ventricular myocytes. *Arch Biochem Biophys*, 2005;442(2):187-95.
20. Nie A, Meng Z. Study of the interaction of sulfur dioxide derivative with cardiac sodium channel. *Biochim Biophys Acta*, 2005;1718(1-2):67-73.
21. Zhang R-Y, Du J-B, Sun Y, Chen S, Tsai H-J, Yuan L, et al. Sulfur dioxide derivatives depress L-type calcium channel in rat cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011;38(7):416-22.
22. Nie A, Meng Z. Modulation of L-type calcium current in rat cardiac myocytes by sulfur dioxide derivatives. *Food Chem Toxicol*, 2006;44(3):355-63.
23. Lai MC, Hung TY, Lin KM, Sung PS, Wu SJ, Yang CS, et al. Sodium metabisulfite: effects on ionic currents and excitotoxicity. *Neurotox Res*, 2018;34(1):1-15.
24. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2000;894:i-xii, 1-253.
25. Woo WH, Yang H, Wong KP, Halliwell B. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;305(3):619-23.
26. Ozturk N, Yaras N, Ozmen A, Ozdemir S. Long-term administration of rosuvastatin prevents contractile and electrical remodelling of diabetic rat heart. *J Bioenerg Biomembr*, 2013;45(4):343-52.
27. Cooper AJ. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem*, 1983;52:187-222.
28. Lester MR. Sulfite sensitivity: significance in human health. *J Am Coll Nutr*, 1995;14(3):229-32.
29. Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. Sodium metabisulfite and SO₂ release: an under-recognized hazard among shrimp fishermen. *Ann Allergy*, 1993;71(6):563-6.
30. Meng Z. Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent. *Inhal Toxicol*, 2003;15(2):181-95.
31. Schroeter LC. Sulfur Dioxide, Applications in Foods, Beverages and Pharmaceuticals, First Edition. London: Pergamon Press Inc., 1966.
32. Til HP, Feron VJ, De Groot AP. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet Toxicol*, 1972;10(3):291-310.
33. Gunnison AF, Jacobsen DW, Schwartz HJ. Sulfite hypersensitivity. a critical review. *CRC Crit Rev Toxicol*, 1987;17(3):185-214.
34. Bemrah N, Vin K, Sirot V, Aguilar F, Ladrat A-C, Ducasse C, et al. Assessment of dietary exposure to annatto (E160b), nitrites (E249-250), sulphites (E220-228) and tartaric acid (E334) in the French population: the second French total diet study. *Food Addit Contam Part A*, 2012;29(6):875-85.

35. Zhang Q, Bai Y, Yang Z, Tian J, Meng Z. The molecular mechanisms of sodium metabisulfite on the expression of K ATP and L-Ca²⁺ channels in rat hearts. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015;72(3):440-6.
36. Ozturk N, Yargicoglu P, Derin N, Akpınar D, Agar A, Aslan M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. *Neurotoxicol Teratol*, 2011;33(2):244-54.
37. Zhao X, Jin HF, Du SX, Tang CS, Du JB. The effect of sulfur dioxide on blood pressure and aortic structure of spontaneously hypertensive rat. *Chinese Pharmacol Bull*, 2008.
38. Du S, Jin H, Bu D, Zhao X, Geng B, Tang C, et al. Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats 1. *Acta Pharmacol Sin*, 2008;29(8):923-30.
39. Nie A, Wei C, Meng Z. Sodium metabisulfite modulation of potassium channels in pain-sensing dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Res*, 2009;34(12):2233-42.
40. Ribera D, Jonker D, Narbonne JF, O'Brien J, Antignac E. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. *Food Addit Contam*, 2001;18(2):103-14.