

## SÜLFİTİN ORTALAMA ERİTROSİT HACMİ, ORTALAMA ERİTROSİT HEMOGLOBİN KONSANTRASYONU VE ERİTROSİT İÇİ KALSİYUM DÜZEYİNE İN VİTRO ETKİSİ

### IN VITRO EFFECT OF SULFITE ON MEAN CORPUSCULAR VOLUME, MEAN CORPUSCULAR HEMOGLOBIN CONCENTRATION AND INTRAERYTHROCYTIC CALCIUM CONCENTRATION

Melek BOR-KÜÇÜKATAY\*, Vural KÜÇÜKATAY\*, Aysel AĞAR\*\*, OĞUZ Kerim BAŞKURT\*\*

\*Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Denizli  
\*\*Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya

#### Özet

Sülfid, vücutta kükürt içeren amino asitlerin metabolizması sırasında endojen olarak üretilen, ayrıca koruyucu amaçla besin ve ilaç endüstrisinde yaygın şekilde kullanılan bir bileşiktir. Eritrositlerin vücutta sülfid etkilerine en fazla maruz kalan hücreler arasında olduğu düşünülür. Bu çalışmada sülfid donoru sodyum metabisülfid'in ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sağlıklı, 10 erkek denekden alınan kan örnekleri 1 saat süresince 5, 10 ve 20 mM sodyum metabisülfid ile inkübe edilmiştir. Ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu elektronik bir hematoloji analizörü kullanılarak saptanmış, eritrosit sitozolik kalsiyum konsantrasyonu David Dufilho ve arkadaşlarının metoduna göre belirlenmiştir. 5 mM sodyum metabisülfid ile inkübasyon Ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunda bir değişikliğe sebep olmamıştır. 10 ve 20 mM sodyum metabisülfid Ortalama eritrosit hacminde kontrol grubuna göre doz bağımlı bir artışa, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunda ise azalmaya sebep olmuştur. sodyum metabisülfid ile inkübasyon herhangi bir dozda eritrosit içi kalsiyum konsantrasyonunu etkilememiştir. Bu bulgular, sodyum metabisülfid ile inkübasyonun Ortalama eritrosit hacmi ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunda yol açtığı değişikliklerde kalsiyum iyonunun rolü olmadığını düşündürmektedir. (Pam. Tıp Derg, 2008;1:21-25).

#### Abstract

Sulfites are continuously formed in the body during metabolism of sulfur-containing aminoacids. Erythrocytes may be considered to be among the most susceptible cells to sulfite's effects. This study aimed at investigating the effect of sulfite on mean corpuscular volume, hemoglobin concentration and intraerythrocytic calcium concentration. Erythrocytes were incubated with 5, 10 and 20 mM sodium metabisulfite. Mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration were measured using an electronic hematology analyzer and cytosolic calcium concentration in RBC was determined using a method modified from David-Dufilho et al. While incubation with 5 mM sodium metabisulfite did not cause any alteration in Mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration, 10 and 20 mM sodium metabisulfite resulted in an increase in mean corpuscular volume and a decrease in mean corpuscular hemoglobin concentration in a dose-dependent manner. Sodium metabisulfite used in the concentrations here, did not affect intraerythrocytic calcium concentration. The results of this study indicate that, Ca<sup>++</sup> ion may not take part in the alterations in mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration caused by sodium metabisulfite. (Pamukkale Medical Journal,2008;1:21-25).

#### Giriş

Hava kirliliğinin önemli bir bileşeni olarak bilinen ve besinlerle sülfid (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tuzları şeklinde alınan kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>), çeşitli amaçlarla kullanımının antik devirlere kadar dayandığı görülür [1]. Günümüzde ise SO<sub>2</sub> ve onun çeşitli iyonlarla yaptığı tuzlar gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1,2]. SO<sub>2</sub> vücutta kükürt içeren amino asitlerin katabolizması esnasında endojen olarak da üretilmektedir [2-4]. Gerek endojen üretilen gerekse de eksojen yolla

alınan SO<sub>2</sub> vücutta SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e dönmektedir [1,2,5-7]. Toksik bir molekül olan SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in vücutta etkin bir şekilde metabolize edilmesi gerekir. Bu işlem, mitokondrial bir molibdohemoprotein olan Sülfid oksidaz (SOX) enziminin SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'i zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata (SO<sub>4</sub><sup>=</sup>) dönüştürmesi yoluyla gerçekleşir [8-10]. SOX'ın yaşamsal önemi, 1967 yılında Mudd ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar genetik SOX enzim eksikliği olan vakalarda artmış endojen SO<sub>3</sub><sup>-</sup> üretimi nedeniyle şiddetli

nörolojik disfonksiyon, mental gerilik ve hayatın erken döneminde ölümle karakterize bir klinik tablonun meydana geldiğini göstermişlerdir. [11]. Bu şekilde artmış endojen  $SO_3^-$ 'e maruz kalmanın yanı sıra, hava kirliliği ve besinler gibi eksojen yolla maruziyetin toksik etkileri de gösterilmiştir [12-15]. Eksojen  $SO_3^-$  alımının zararlı etkileri ilk olarak 1973 yılında rapor edilmiştir [16]. Bu tarihten şimdiye dek, daha çok allerjik ve astımlı bireylerde olmak üzere  $SO_3^-$  hipersensitivitesi bildirilmiştir [1,2,17-19]. Ek olarak,  $SO_3^-$ 'in özellikle yüksek dozlarda, pek çok hücre yapısı ile etkileşebildiği de gösterilmiştir. Genetik materyalle reaksiyona girerek hasar ve mutasyonlara sebep olabildiği, lipid ve proteinler ile etkileşerek hücrenin yapısal bütünlüğünü bozabildiği [20-24],  $\alpha_1$ -antiproteinaz ve glutamat dehidrogenaz gibi çeşitli enzimleri inhibe ederek [25,26] toksik etkilerini oluşturduğu ileri sürülmektedir.

$^{35}S$ -işaretili  $SO_3^-$  kullanılarak yapılan çalışmalar,  $^{35}S$ 'in %70-90'ının gastrointestinal sistemden kan akımına absorbe olduğunu ve dokulara kan yoluyla taşındığını göstermiştir [27]. Böylece eritrositler vücutta  $SO_3^-$ 'in etkilerine en fazla maruz kalan hücreler arasında sayılabilirler.  $SO_3^-$  tuzlarının eritrositte 2-3 difosfogliserat (2,3-DPG) seviyesini azalttığı [28], Kalsiyum ATPazı ( $Ca^{++}$ -ATPaz) aktive ettiği [29] gösterilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada  $SO_3^-$  donoru sodyum metabisülfid ( $Na_2S_2O_5$ )'e 5, 10 ve 20 mM dozlarda maruz kalmanın insan eritrositlerinin şekil değiştirme yeteneğini (deformabilite) etkilemediği gösterilmiştir.  $Na_2S_2O_5$ 'in in vivo 25 mg/kg/gün dozda uygulanması SOX aktivitesi insana göre 20 kat fazla olan sıçanlarda eritrosit deformabilitesinin artmasına neden olmuştur [30]. Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu çalışmada farklı dozlardaki  $Na_2S_2O_5$ 'in eritrosit hücre içi serbest kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) konsantrasyonu ve ortalama eritrosit hacmi (OEH), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (OEHK) gibi eritrosite ait parametreler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntemler

### *Deney Protokolü, Hematolojik Parametreler*

Haricen sağlıklı olan, gönüllü, erişkin 10 erkek deneğin ön kol venlerinden heparinize (15 IU/ml) kan örnekleri alınmıştır. Santrifüj edilerek (1400 x g, 6 dakika; Jouan CT 422) plazmanın ayrılmasını takiben eritrositler, iki kez izotonik fosfat tamponu (FT, pH: 7.4, 10mM) ile yıkanmış ve izotonik fosfat tamponu içinde hematokrit (Htc) %40 olacak şekilde yeniden süspansiyon edilmiştir. Eritrosit süspansiyonları 1 saat süresince oda ısısında 5, 10 ve 20 mM  $Na_2S_2O_5$  varlığında inkübe edilmiştir. Kan örneklerinde OEH ve OEHK elektronik bir hematoloji analizörü

(Cell-Dyn 3500R, Abbott Diagnostic Division, USA) kullanılarak saptanmıştır.

## **Eritrosit Sitozolik Serbest Kalsiyum Konsantrasyonu Ölçümü**

Hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonları yıkanmış intakt eritrositlerde Fura2-AM (Sigma, St. Louis, MO, USA) floresan probu kullanılarak David Dufilho ve arkadaşlarının bildirdiği metoda göre belirlenmiştir [31]. Eritrositler polisükröz dansite gradienti kullanılarak (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO, USA) lökositlerden arındırılmış ve iki kez izotonik fosfat tamponu ile bir kez de HEPES tamponu (123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 1.3 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Glukoz, 25 mM HEPES, pH:7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra eritrositler HEPES tamponu ile Htc'i %40 olacak şekilde dilüe edilmiş, 3 gruba ayrılarak üzerlerine sırasıyla 5, 10 and 20 mM  $Na_2S_2O_5$  eklenmiştir. Bunu takiben Htc yine HEPES tamponu ile %1'e getirilmiş ve eritrosit süspansiyonları oda ısısında 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda eritrosit süspansiyonlarına 10 nM Fura2-AM eklenerek 37°C'da 30 dakika karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. Böylece toplam inkübasyon süresi 1 saat olmaktadır. Ekstraselüler Fura2-AM'yi uzaklaştırmak için süspansiyon 5 dakika süreyle 350 x g'de (Heraeus Labofuge 200 Sepatech) santrifüj edilmiş, santrifüj sonunda süpernatant atıldıktan sonra hücre süspansiyonlarının üzerine 1'er ml fosfat tamponu eklenmiştir. Bu süspansiyondan spektrofotometrik (Shimadzu UV 1601, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) olarak 546 nm'de Hemoglobin (Hb) tayini yapılmış ve Hb miktarı FT ile %0.05 gr/dl olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu RF-5000, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak 335-385 nm eksitasyon aralığında, 510 nm emisyon dalga boyunda floresans ölçülmüştür. Fura 2- $Ca^{++}$  kompleksi ve şelat oluşturmamış Fura 2'nin floresans yoğunlukları arasındaki oran (F335/F385) eritrositte sitozolik  $Ca^{++}$  konsantrasyonlarını yansıtmaktadır.

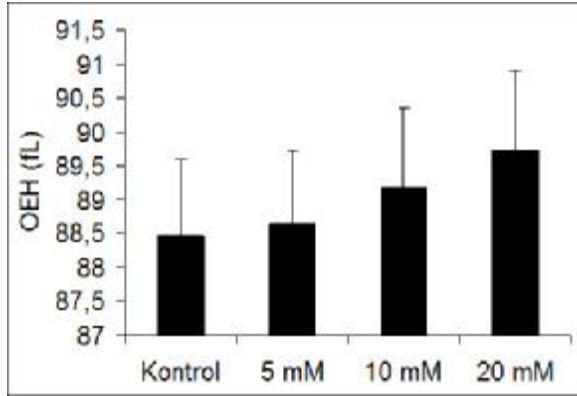
## **Sonuçların Değerlendirilmesi**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar "repeated measures ANOVA" ve onu izleyen "Newman-Keuls" testi ile değerlendirilmiştir.  $P < 0.05$  üzerindeki değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

## **Bulgular**

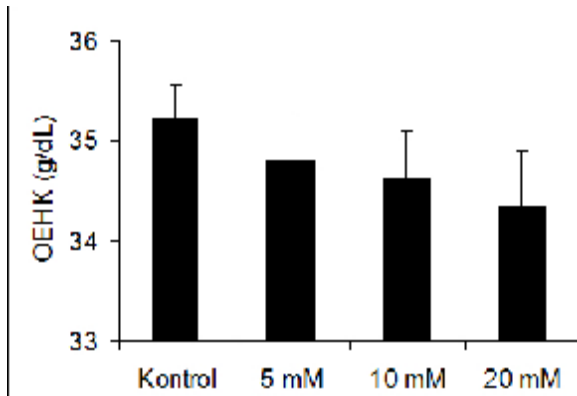
### **Hematolojik Parametreler**

5, 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonda  $Na_2S_2O_5$  inkübasyon OEH'nde doz bağımlı bir artışa sebep olmuştur (Şekil 1).



**Şekil 1.**  $\text{SO}_3^-$  donoru  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (5, 10 ve 20 mM)'in OEH üzerine etkisi. Ortalama  $\pm$  standart hata; n=10, \*: Kontrolden fark,  $p<0,001$ .

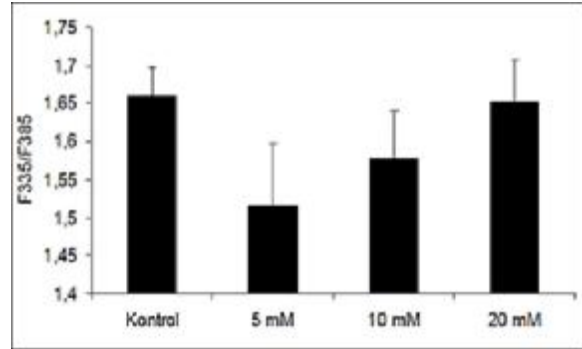
5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  inkübasyonunun oluşturduğu artış kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmazken, 10 ve 20 mM'lık dozlar OEH'nde kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa sebep olmuştur ( $p<0,001$ ). Zıt olarak, artan dozlarda  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyon OEHK'nda doz bağımlı bir azalmaya sebep olmuştur. 5mM'lık  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyonun oluşturduğu azalma kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde değilken, 10 ve 20 mM'lık dozlarda  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  varlığında OEHK kontrole göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 2).



**Şekil 2.**  $\text{SO}_3^-$  donoru  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (5, 10 ve 20 mM)'in OEHK üzerine etkisi. Ortalama  $\pm$  standart hata; n=10, Kontrolden fark \*:  $p<0,05$ ; #:  $P<0,01$ .

#### Eritrosit Sitozolik Serbest Kalsiyum Değerleri

Eritrosit süspansiyonlarının 5mM'lık dozda  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyonları eritrosit sitozolik serbest  $\text{Ca}^{++}$  değerlerinde kontrol grubuna göre azalmaya sebep olmuş ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamıştır. 10 ve 20 mM'lık  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  dozları da eritrosit sitozolik  $\text{Ca}^{++}$  değerlerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 3).



**Şekil 3.**  $\text{SO}_3^-$  donoru  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (5, 10 ve 20 mM)'in eritrosit sitozolik serbest  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonu üzerine etkisi. Ortalama  $\pm$  standart hata; n=10.

#### Tartışma

Bu çalışmada eritrositlerin 1 saat süresince oda ısısında 5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyonunun OEH'de bir değişikliğe sebep olmazken, 10 ve 20 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyonlarının OEH'de doz bağımlı bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, 5 mM'lık  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  OEHK'nu etkilememiştir. 10 ve 20 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyon ise OEHK'da doz bağımlı bir azalmaya sebep olmuştur. 3 değişik dozda  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , F335/F385 şeklinde verilen eritrosit sitozolik serbest  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonunda istatistiksel olarak önemli düzeyde bir değişiklik oluşturmamıştır.

Oldukça reaktif bir molekül olan  $\text{SO}_3^-$ 'in, nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi pek çok biyolojik molekülle reaksiyona girerek toksik etki gösterdiği bildirilmiştir [20-24]. Bu verilerin doğrultusunda  $\text{SO}_3^-$ 'e maruz kalmanın yaratacağı toksik etkilerden korunmak için hava ve besindeki miktarları için limitler konmuştur. Bu limitlere göre,  $\text{SO}_2$  ile kirli havanın günün herhangi bir diliminde 0.14 ppm'i, iş yerlerinde ise 2 ppm'i geçmesi [32], besinlerle alınımı durumunda ise, Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Komitesince (FAO/WHO) belirlenen 0.7 mg  $\text{SO}_2$ /kg düzeyinin üzerine çıkması toksik olarak kabul edilmiştir [33]. Çeşitli deneysel ve klinik araştırmalar sonucu ortaya konan bu rakamların doğrultusunda, besin katkı maddesi olarak  $\text{SO}_3^-$ 'ler genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen (Generally Recognized as Safe-GRAS) maddeler arasında sınıflandırılır. Bununla beraber,  $\text{SO}_3^-$ 'lerin güvenli katkı maddeleri arasında sayılmasına bir takım eleştiriler yapılmaktadır. Şöyle ki, günlük  $\text{SO}_3^-$  alımı her zaman yukarıda verilen rakamlarla uyumlu olamamaktadır. Besin alışkanlıklarının farklılığından dolayı  $\text{SO}_3^-$ 'e maruz kalmanın bireyden bireye değişebileceği ve normal bir restoran öğünündeki  $\text{SO}_3^-$  düzeyinin bile 25 ile 100 mg arasında farklılık gösterebileceği bildirilmiştir. [1,17]. Ayrıca FAO / WHO'ca belirlenen 0.7 mg  $\text{SO}_2$ /kg günlük kabul edilebilir  $\text{SO}_3^-$  düzeyinin insanlar için toksik etkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bu değer insana

göre hayli yüksek SOX aktivite düzeyine sahip sıçan çalışmalarının sonuçlarına göre belirlenmiştir. Dolayısıyla sıçanlar için toksik olmayan bu dozun insanlar için özellikle beslenme alışkanlığına bağlı olarak kronik olarak tüketilmesinin insan sağlığı açısından ciddi tehlikeler yaratacağı ileri sürülmüştür.

Olgun eritrositlerde Hb sentez ve yıkımı olmadığından Hb konsantrasyon değişimleri büyük oranda hücrenin su ve iyon kapsamındaki değişikliklere bağlıdır [34,35]. Eritrosit içi sıvı içeriğinin artmasının OEH'de artışa ve OEHK'da azalmaya sebep olduğu bilinmektedir [36-38]. Eritrosit membranında bulunan iki önemli enzim olan Sodyum-Potasyum ATPaz ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz) ve  $\text{Ca}^{++}$ -ATPaz eritrosit katyon ve su içeriğinin korunması ve değiştirilmesinde önemli rol oynar [35]. Meltzer ve Kassir eritrositlerin 25 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 'le 30 dakika inkübasyonunun kalmodulin varlığında  $\text{Ca}^{++}$ -ATPaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa sebep olduğunu ve  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 'in bu etkisinin eritrositlerin 15-60 dakika  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 'siz ortamda yeniden inkübe edilmeleriyle geri çevrildiğini göstermişlerdir [29].

Eritrosit içinde  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonunun dar sınırlar içinde sabit tutulması fizyolojik açıdan önemlidir. Hücre içi  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonu artışının  $\text{Ca}^{++}$  bağımlı potasyum kanallarının aktivasyonu yoluyla eritrosit dışına potasyum ve buna bağlı sıvı sızmasına neden olduğu bilinmektedir (Gardos etkisi). Bu durum OEH'nin azalmasına ve OEHK'nun artmasına sebep olur [35-37,39]. Bizim çalışmamızda,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile inkübasyon OEH'de doz bağımlı bir artış ve OEHK'da doz bağımlı bir azalmaya sebep olmuştur. Ancak her ne kadar bu çalışmada eritrosit membranında  $\text{Ca}^{++}$ -ATPaz enzim aktivitesi ölçülmemişse de, 5, 10 ve 20 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 'le inkübasyonun eritrosit sitozolik serbest  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonunu istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilemediği gösterilmiştir. Bu bulgu Meltzer ve Kassir'in sonuçları ile uyumlu değil gibi görünmektedir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta, çalışmamızda OEH'deki artışın 10 ve 20 mM gibi kullanılan en yüksek iki  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  konsantrasyonunda gözlenmiş olmasıdır. OEH'deki değişiklik (pompa aktivitelerine ek olarak ve onlardan bağımsız olarak)  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonunu etkiliyor olabilir. Başka bir deyişle, eritrosit sitozolik serbest  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonu sadece  $\text{Ca}^{++}$ -ATPaz aktivitesini yansıtmıyor olabilir.

## Sonuç

Bu çalışmada  $\text{SO}_3^-$ 'in OEH'nde doz bağımlı artışa OEHK'nda ise azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir, ancak bu çalışmanın bulguları bu değişimlerin ortaya çıkmasında  $\text{Ca}^{++}$  iyonunun olası rolünü açıklamak hususunda yeterli

olmamıştır. Bu konuda daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

## Kaynaklar

1. Lester MR. Sulfite Sensitivity: Significance in Human Health. J Am Coll Nutr 1995; 14: 229-32.
2. Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. CRC Crit Rev Toxicol 1987; 17: 185-214.
3. Gunnison AF, Sellakumar A, Currie D, Synder EA. Distribution, Metabolism and Toxicity of Inhaled Sulfur Dioxide and Endogenously Generated Sulfite in the Respiratory Tract of Normal and Sulfite Oxidase-Deficient Rats. J Toxicol Environl Health 1987; 21: 141-62.
4. Kajiyama H, Nojima Y, Mitsuhashi H, Ueki K, Tamura S, Sekihara T at al. Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 923-27.
5. Dalton-Bunnow MF. Review of sulfite sensitivity. Am J Hosp Pharm 1985; 42: 2220-6.
6. Asmus MJ, Sherman J, Hendeles L. Bronchoconstrictor additives in bronchodilator solutions. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 53-60.
7. Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. Sodium metabisulfite and  $\text{SO}_2$  release: an under-recognized hazard among shrimp fisherman. Annals of Allergy 1993; 71: 563-6.
8. Cohen HJ, Fridovich I. Hepatic Sulfite Oxidase. The Nature and Function of The Heme Prosthetic Groups. J Biol Chem 1971; 246: 367-73.
9. MacLeod RM, Farkas W, Fridovich I, Handler P. Purification and Properties of Hepatic Sulfite Oxidase. J Biol Chem 1961; 236: 1841-6.
10. Johnson JL, Rajagopalan KV. Purification and Properties of Sulfite Oxidase from Human Liver. J Clin Invest 1976; 58: 543-50.
11. Mudd SH, Irreverre F, Laster L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. Science 1967; 156(3782): 1599-602.
12. Başkurt OK, Levi E, Çağlayan S, Dikmenoğlu N, Kutman MN. Hematological and hemorheological effects of air pollution. Arch Environ Health 1990; 45: 224-8.
13. Başkurt OK. Acute hematologic and hemorheologic effects of sulfur dioxide inhalation. Arch Environ Health 1988; 43: 344-8.
14. Gümüşlü S, Akbaş H, Alıcıgüzel Y, Açar A, Küçükatay V, Yargıçoğlu P. Effects of sulfur dioxide inhalation on antioxidant enzyme activities in rat erythrocytes. Ind Health 1998; 36: 70-3.
15. Yargıçoğlu P, Gümüşlü S, Açar A, Korgun DK, Küçükatay V. Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status, food intake, and lipid peroxidation during aging. Arch Environ Health 2001; 56: 53-7.
16. Kochen J. Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested. Pediatrics 1973; 52: 145-6.
17. Simon RA. Sulfite sensitivity. Ann Allergy 1986; 56: 281-8.
18. Stevenson DD, Simon RA. Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol 1981; 68: 26-32.
19. Vally H, de Klerk N, Thompson PJ. Alcoholic drinks: important triggers for asthma. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 462-7.
20. Southerland WM, Akogyeram CO, Toghrol F, Sloan L, Scherrer R. Interaction of bisulfite with unsaturated fatty acids. J Toxicol Environ Health 1982; 10: 479-91.
21. Hayatsu H, Miller RC. The cleavage of DNA by the oxygen-dependent reaction of bisulfite. Biochem Biophys Res Commun 1972; 46: 120-4.
22. Rencuzoğulları E, İla HB, Kayraldız A, Topaktaş M. Chromosome aberrations and sister chromatid

- exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res* 2001; 490: 107-12.
23. Shi X, Mao Y. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 141-7.
  24. Cecil R. Intramolecular bonds in proteins. I. The role of sulfur in proteins. The proteins, Composition, Structure, Function. Neurath H ed. New York, Academic Press, pp: 379-476, 1963.
  25. Reist M, Jenner P, Halliwell B. Sulphite enhances peroxynitrite-dependent  $\alpha$ 1-antitrypsinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide?. *FEBS Lett* 1998; 423: 231-4.
  26. Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2004; 279: 43035-45.
  27. Gibson WB, Strong FM. Metabolism and elimination of sulphite by rats, mice and monkeys. *Food Cosmet Toxicol* 1973; 11: 185-98.
  28. Gerlach E, Duhm J, Deuticke B. Metabolism of 2-3 diphosphoglycerate in red blood cells under various experimental conditions. In: Brewer GJ, eds. Red cell metabolism and function. New York, Plenum Press, pp: 155-74, 1970.
  29. Meltzer HL, Kassir S. Enhanced activation of human erythrocyte  $Ca^{2+}$ -ATPase by calmodulin after storage or brief exposure to disulfite. *Biochim Biophys Acta* 1981; 643: 243-50.
  30. Bor-Kucukatay M, Kucukatay V, Agar A, Baskurt OK. Effect of sulfite on red blood cell deformability ex vivo and in normal and sulfite oxidase-deficient rats in vivo. *Arch Toxicol* 2005; 79: 542-6.
  31. Dufilho MD, Garestier TM, Devynck MA. Fluorescence measurements of free calcium concentration in human erythrocytes using the calcium indicator fura2-AM. *Cell Calcium* 1988; 9: 167-79.
  32. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine Particulate Air Pollution and Mortality in 20 U.S. Cities, 1987-1994. *N Engl J Med* 2000; 343: 1742-9.
  33. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17<sup>th</sup> Report, Rome: Food and Agriculture Organization, 1974.
  34. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 1983; 20: 225-42.
  35. Mohandas N, Shohet SB. The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Hematol* 1981; 10: 223-37.
  36. Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, Foerster RJ, Athens JW, Lukens JN:
  37. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30: 171-92.
  38. Mohandas N. Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem Soc Trans* 1992; 20: 776-82.
  39. Noji S, Taniguchi S, Kon H. An EPR study on erythrocyte deformability. *Prog Biophys Molec Biol* 1991; 55: 85-105.