

Maraşotu (*Nicotiana rustica* L.) kullanımının lenfosit alt gruplarına etkilerinin araştırılması

Investigation of the effects of lymphocyte sub-groups of the use of Maraş powder (*Nicotiana rustica* L.)

Murat ARAL¹, İbrahim ARAL², Hasan Çetin EKERBİÇER¹,
Mustafa ÇELİK¹, Serpil Şeriban DOĞAN¹, Nuriye İsmihan Ece PAKÖZ¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; maraşotu kullanımının lenfosit alt gruplarına olan etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, sigarayı bırakmak için maraşotu kullanmaya başlayan ve bu otun bağımlısı olan sağlıklı gönüllüler olgu grubu ve sağlıklı, herhangi bir tütün ürünü kullanmayan gönüllüler kontrol grubu oluşturulmuştur. Gönüllülerden bir defa alınan tam kan örneklerinde hücresel immün sisteme ait lenfosit alt grupları kitler (Becton Dickinson) kullanılarak akım sitometrik yöntemle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgu ve kontrol gruplarındaki tüm denekler erkek olup yaş ortalamaları açısından gruplar birbirine benzer oluşturulmuştur. Olgu grubunun CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranları, CD19⁺ (B lenfosit) ve CD4⁺ (T helper lenfosit) hücre yüzdeleri ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, olgu grubunun CD16⁺56⁺ (natural killer lenfosit) ve CD8⁺ (T sitotoksik lenfosit) hücre yüzdeleri ortalamaları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek belirlenmiştir. CD3⁺ (total T lenfosit) hücre yüzdeleri ortalamaları ise her iki grupta da benzer olarak saptanmıştır.

Sonuç: Maraşotu kullanımının tiryakilerde hücresel immüniteyi göreceli olarak arttırdığı, humoral immüniteyi ise azalttığı düşünülmektedir. Neticede

ABSTRACT

Objective: This study was to investigate the effects of lymphocyte sub-groups of the use of Maraş powder.

Method: This study used healthy volunteers, and no smoking or Maras powder (control group) used healthy volunteers. The blood samples for lymphocyte subsets of the cellular immune system lymphocyte subsets of antibodies were evaluated with Becton Dickinson kits using a flow-cytometric method.

Results: Case group averages of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios, CD19⁺ (B lymphocytes) and the mean percentage of CD4⁺ T lymphocytes were significantly lower than the control group (p<0.05). Case group of CD16⁺56⁺ (NK cells) and CD8⁺ T lymphocytes were significantly higher in the control group averages (p<0.05). The mean percentage of CD2 and CD3⁺ T lymphocytes were similar in both groups (p>0.05).

Conclusions: Maras powder increases the cellular immunity relative in the smoking addictive people, while humoral immunity declines. As a result, immune responses that is resulting with any deviation, predisposing factor for a variety of diseases. Therefore, informing of the maras powder users should be considered for

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, KAHRAMANMARAŞ

² Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : İbrahim ARAL

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, ANKARA

Tel : +90 312 565 54 74

E-posta / E-mail : aralibrahim@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.11.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 09.05.2013

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2013.88155

Aral M, Aral İ, Ekerbiçer HÇ, Çelik M, Doğan ŞŞ, Ece-Pak Nİ. Maraşotu (*Nicotiana rustica* L.) kullanımının lenfosit alt gruplarına etkilerinin araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(1): 21-6.

her türlü sapma ile sonuçlanan immün yanıtlar, çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabilmektedir. Bu nedenle, sigara konusunda olduğu gibi, maraşotunun kullanıcılarının da sağlığına olabilecek etkiler konusunda uyarılması önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Maraşotu, dumansız tütün, lenfosit alt grupları, immün sistem, *Nicotiana rustica* L.

harming their health as smoking as well.

Key Words: Maras powder, smokeless tobacco, lymphocyte subsets, immune system, *Nicotiana rustica* L.

GİRİŞ

“Maraşotu” veya “ağız otu” (*Nicotiana rustica* L.), Kahramanmaraş ve çevresinde oldukça fazla sayıda tiryakisi bulunan bir tütün çeşididir. *Nicotiana rustica* L. kullanılmadan önce yaprakları toz haline getirildikten sonra meşe, ceviz veya asma çubuğundan elde edilen kül 1/2 veya 1/3 oranında karıştırılarak ezilir ve hafif nemlendirilir. Tütünün hazırlanması esnasında karıştırılan külün, ortamı alkali yaparak ağız mukozasından emilimi kolaylaştırdığı bilinmektedir (1). Maraşotu çoğunlukla sigarayı bırakmak için başvurulmuş bir tütün çeşidi olmakla birlikte, kendisi de bağımlılık oluşturan ve oral olarak alınan bir dumansız tütündür. İnsan sağlığına olumsuz etkileri detaylı bir şekilde aydınlatılamamıştır.

Maraşotunun bir benzeri Sudan’da “toombak” adı ile bilinmektedir. Toombak kullanımının, Sudan’da oral squamöz hücreli kanser etiyolojisinde önemli rol oynadığı ayrıca, tükürük bezi kanserleriyle de ilişkili olabileceği bildirilmiştir (2). Dumansız tütün, oral olarak alındığından, oral mukozadaki lenfoid dokuların tütün ile kronik stimülasyonunun, kullanıcılardaki artmış gingivitis, lökoplaki ve oral kanser insidansı ile ilişkili olabileceği, yine yüksek nikotin içeriği ve ortalama kullanım süresinin uzun olması nedeniyle sigaradan daha fazla nikotin alımına ve daha fazla bağımlılık yapma potansiyeline neden olabileceği bildirilmiştir (3).

Tütün kullanımı ile ilişkili hastalıkların birçoğu bugüne kadar net bir şekilde aydınlatılmamıştır. ABD’de halen sigaradan her yıl 400.000’in üzerinde insan ölmekte ve sigaraya bağlı hastalıklar nedeniyle ortaya çıkan direkt sağlık bakım maliyetleri 50 milyar doları aşmaktadır (4).

Tütün kullanımının immün sistem üzerine olan etkisi ve aralarındaki ilişki halen açık değildir. Tütünün kimyasal bileşimi komplekstir. Yapılan çalışmalar, sigaranın immünotoksik ve genotoksik etkilerinin, sigaranın buhar fazından çok partikül fazından kaynaklandığını ortaya koymuştur. Partikül fazı, nikotin başta olmak üzere binlerce maddeden oluşmaktadır. Nikotinin sigarada ve/veya dumansız tütündeki major immünosupresif ajan olduğu yönünde birçok bulgu vardır. Nikotinin Th1/Th2 (Th: T helper lenfosit) oranına etki ettiği ve Th1 yanıtını inhibe ettiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Nikotin, ACTH ve katekolaminlerin salgılanmasına neden olur. Bunların da immün sistemini baskılayıcı etkileri vardır (4).

Akım sitometri ve monoklonal antikor teknolojisindeki gelişmeler, farklı fonksiyonel ve antijenik karakteristikleri olan lenfosit alt popülasyonlarının tanınmasına imkan verecek şekilde, hücresel immün sisteme yeni bakış açıları kazandırmıştır. Değişik hastalık durumlarında T hücre alt grubu farklılaşmaları tanımlanmıştır fakat

dumansız tütün kullanımının etkisiyle ilgili veriler sınırlı ve çelişkilidir. Dumansız tütün kullanımı ile immün sistem parametreleri arasındaki ilişkinin çözümü biyolojik sürecin anlaşılması için hayati önem taşımaktadır.

Bu çalışmada; maraşotu kullanımının lenfosit alt gruplarına olan etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

YÖNTEM

Çalışmada; sigarayı bırakmak için maraşotu kullanmaya başlayıp bu ota bağımlı hale gelen 21 sağlıklı gönüllü olgu grubunu ve herhangi bir tütün ürünü kullanmayan sağlıklı 24 gönüllü ise kontrol grubu şeklinde oluşturulmuştur. Bireylerin maraşotu grubuna seçilme kriteri olarak en az 10 yıl günde bir paket maraşotu (bir paketi ortalama 16 g ± 3 g SS) kullanmaları esas alınmıştır. Kişilerden bir defada alınan 2 mL'lik kan örneklerinde hücresel immün sisteme ait lenfosit alt gruplarından CD4⁺ (T helper lenfosit), CD8⁺ (T sitotoksik lenfosit), CD3⁺ (total T lenfosit), CD19⁺ (B lenfosit), CD16⁺ 56⁺ (natural killer lenfosit) hücreleri kitler (Becton Dickinson Immünocytometry Systems 2350 Qume Drive San Jose, CA 95131-1807) kullanılarak akım sitometri yöntem ile değerlendirilmiştir.

Lenfosit alt grupları için çalışma ve kontrol grubundan steril EDTA'lı tüplere 2'şer mL venöz kan alınmıştır. Bu tüplerden CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺56⁺ hücrelerinin her biri için 100'er µL kan alınarak ayrı birer tüpe konulmuş ve üzerine uygun monoklonal antikordardan 20'şer µL eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım 15 dak süre ile oda ısısında ve karanlıkta inkübe edilmiş. Ardından T-Q prep cihazından geçirilerek eritrosit lizi ve fiksasyonu sağlamıştır. Bu şekilde periferik kan mononükleer hücreleri elde edilmiştir. Bu hücrelerden Coulter Epics XL-MLC (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) akım sitometri cihazında FITC (fluorescein isothiocyanate) veya PE (phycoerythrin) ile konjuge halde çift veya tek renkli monoklonal antikordlar kullanılarak

analizler yapılmıştır. Her bir örnek için uygun izotipik kontroller kullanılmıştır. Lenfositler tanımlanarak gate (kapı) içine alınmış ve her kapı içerisinde 10.000 hücre sayılmıştır. Her monoklonal antikordla reaksiyon veren lenfositler floresan özelliklerine göre ayrılıp sayıları yüzde olarak belirlenmiştir (5). Veriler, Expo 32 ADC software (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel analizlerde sürekli değişkenler t-testi ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Olgu ve kontrol gruplarındaki bireyler erkek olarak seçilmiştir. Olgu grubunun yaş ortalaması 35,0 ± 7,53 SS, kontrol grubunun yaş ortalaması ise 34,7 ± 9,0 SS olarak belirlenmiştir. Yaş ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,05).

Olgu grubunun CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranları, CD19⁺ (B lenfosit) ve CD4⁺ (Th) lenfosit yüzdeleri ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p<0,05). Bununla birlikte olgu grubunun CD16⁺56⁺ (NK) ve CD8⁺ (sitotoksik T) lenfosit yüzdeleri ortalamasının kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). CD3⁺ (total T lenfosit) yüzdeleri ortalamasının ise her iki grupta da benzer olduğu bulunmuştur (p>0,05) (Tablo 1).

Tablo 1: Olgu ve kontrol gruplarında lenfosit alt grup yüzde değerlerinin karşılaştırılması

Parametre	Olgu Grubu (n=21) Ort.±SS	Kontrol Grubu (n=23) Ort.±SS	P değeri
CD3 ⁺	68,82±7,41	67,2±6,81	>0,05
CD4 ⁺	36,24±6,08	43,81±5,12	<0,05
CD8 ⁺	39,33±6,98	24,91±3,83	<0,05
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,96±0,29	1,78±0,24	<0,05
CD19 ⁺ **	10,06±3,05	14,05±5,46	<0,05
CD16 ⁺ 56 ⁺ **	40,34±16,23	20,91±7,16	<0,05

TARTIŞMA

Maraşotu (*Nicotiana rustica* L.), Kahramanmaraş ve çevresinde oldukça fazla sayıda tiryakisi bulunan bir tütün çeşididir. Alkaloid içeriği *Nicotiana tabacum* L.'nin 6-10 katı olabilmektedir (5, 6). Maraşotunun Sudan'da kullanılan benzeri olan toombakta tütüne özgü nitrozaminlerin oldukça yüksek olduğu ve bunun bugüne kadar dökümanite edilmiş en yüksek düzeyde mesleksel olmayan kanserojen olduğu bildirilmiştir. Yine, toombakta İsveç ve Amerika'da kullanılan dumansız tütüne göre tütüne özgü nitrozaminlerin 100 kat daha fazla bulunduğu bildirilmiştir (3, 7).

Tütün kullanımının birçok zararlı etkisi tüm dünyaca bilinmektedir. Tütün kullanımının hem hücrel hem de humoral immüniteyi çeşitli düzeylerde olumsuz etkilediği bildirilmiştir (8-10).

Ancak, bu etkilemenin ne düzeyde olduğu henüz net bir şekilde ortaya konmamıştır (11-13). Goud ve ark. (14), dumansız tütün ile artan lenfosit profilyasyonu ve poliklonal IgM yanıtı bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Lindemann ve Park (15), suda çözülebilen dumansız tütün ekstresinin periferik lenfositlerde antisitolitik ve antiprofleratif etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu görüş ayrılığının nedenleri anlaşılabilir.

CD4⁺ T lenfositleri, antikor yapıcı B hücrelerinin ve sitotoksik T hücrelerinin aktivitelerini şiddetlendirirler. CD4⁺ T lenfositlerinin azlığında efektör T ve B hücrelerinin antijene cevabı zayıf olur. Ayrıca, bu hücreler çeşitli lenfokinler salgılayarak T hücrelerinin, monosit ve makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe güçlenmelerini sağladıklarından dolayı yardımcı T lenfositleri immün orkestranın şef hücreleri olarak tanımlanmaktadır (16). Bu hücrelerde önemli derecede azalma sonucu yukarıda bahsedilen fonksiyonlardaki kayıba bağlı olarak edinsel immün yanıtta defektler oluşabilir. Bu nedenle, tütün kullananlarda immün yanıt eksikliği açısından zaman zaman takip gerekebilir. Natural killer hücreler lenfositler içerisinde heterojen bir gruptur ve diğer lenfositlerden farklı olarak daha önce

karşılaşma gereksinimi olmadan, virüslerle enfekte hücreleri ve tümör dokusunu tanıma ve öldürme kapasitesine sahiptirler. NK lenfositlerinin, IFN- γ , TNF, IL-2 sitokinleri ile hedef hücreleri lizise uğratma yetenekleri artar. Hedef hücrelerin NK tarafından öldürülmesi için IgG ile önceden kaplanması gerekmektedir. NK hücreleri ve B hücre aktivasyonu yaşa, cinsiyete göre değişim göstermektedir (17, 18).

Birçok çalışmada sigara içenlerde sadece B lenfositlerin değil T lenfositlerinin de dolaşımdaki sayısında ve fonksiyonel alt kümelerinde farklılaşma olduğu gösterilmiştir (19). Moszczynski ve ark. (20), sigara dumanının immün sistem üzerindeki baskılayıcı etkisine bağlı olarak immunoglobulinlerin ve lizozimin serum konsantrasyonlarında düşme, özellikle 10 yıldan fazla sigara içenlerde, NK hücre sayısında düşme ve T sitotoksik lenfosit sayısında artma, buna bağlı olarak da CD4⁺/CD8⁺ T lenfosit oranında düşme gözlemlenmişlerdir. Tollerud ve ark. (11), bu yayınların popülasyon açısından sınırlı, klinik ve demografik veri açısından yetersiz olduğunu savunmuşlardır. Yine, çalışmalarında yaş ve cinsiyetin, sigaranın CD4⁺ T lenfosit alt gruplarına etkisini değiştirebileceğini göstermişlerdir. Sigara içenlerde CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranındaki değişimler doz, süre ve etnik durumdan da etkilenebilmektedir (13). Örneğin Tollerud ve ark. (21), hem siyahlarda hem de beyazlarda doz-yanıt ilişkisini, günlük içilen sigara sayısına bağlı olarak CD4⁺ T hücre düzeyinde belirgin olarak bulmuşlardır. Beyazlarda içilen her 10 sigaraya karşılık CD4⁺ T hücre sayısı %1,2 artarken siyahlarda %2 azaldığı belirlenmiştir. Her iki ırkta da sigaranın CD4⁺ T hücreleri üzerindeki etkisinin, sigarayı bıraktıktan sonra 1-2 yıl içinde geçtiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, CD3⁺ total T hücre yüzde ortalamaları her iki grupta da benzer olarak bulunmuştur ($p>0,05$). Olgu grubunun NK ve sitotoksik T lenfosit yüzde ortalamaları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0,05$); CD4⁺/CD8⁺ oranlarının ortalamaları, B lenfosit ve Th lenfosit yüzde ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Total T lenfosit oranı

değişmediğinden bu veriler, olgu grubunda hücrel immünitenin göreceli olarak arttığını, humoral immünitenin ise azaldığını düşündürmektedir. Her türlü sapma ile sonuçlanan immün yanıtlar bir takım hastalıklara zemin hazırlayacağı için önem taşımaktadır. Özellikle immün sistemin yönetici hücreleri olan Th hücrelerinin olgu grubundaki gibi sayı ve/veya fonksiyonlarındaki azalmalar daha vahim sonuçlar doğurabilecektir. Muhtemelen, bu durumun kompensasyonu için olgu grubunda NK hücre ve sitotoksik T lenfosit yüzdesinde artış olmuştur. Bu hücrelerin savunmada özellikle viral enfeksiyonlar ve malignansilerde etkin rol oynayabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak; maraşotu kullanımının tiryakilerde hücrel immüniteyi göreceli olarak arttırdığı, humoral immüniteyi ise azalttığı düşünülmektedir. Her türlü sapma ile sonuçlanan immün yanıtlar, çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabilir. Bu nedenle, sigara konusunda olduğu gibi, maraşotunun kullanıcılarının da sağlığa olabilecek olumsuz etkiler konusunda uyarılması önem taşımaktadır.

Daha fazla olgu ile hem sayısal hem de fonksiyonlar açısından immün sisteme ait hücre ve diğer elemanların analizlerinin yapılması, bu tütün alışkanlığının immün sisteme olan zararlı etkilerini açıklamak açısından tatmin edici bilgiler verebilir.

KAYNAKLAR

1. Erenmemişoğlu A, Tekol Y, Kartal M, Kurucu S. The use of a smokeless tobacco in our country "maraşotu" Second International Symposium of Pharmaceutical Sciences. Ankara-Turkey, June, 11-14, 1991.
2. Idris AM, Ibrahim YE, Warnakulasuriya KA, Cooper DJ, Johnson NW, Nilsen R. Toombak use and cigarette smoking in the Sudan: estimates of prevalence in the Nile state. *Prev Med*, 1998; 27(4): 597-603.
3. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Johannessen AC, Idris AM, Magnusson B, Nilsen R, et al. Mutations of the p53 gene in oral squamous-cell carcinomas from Sudanese dippers of nitrosamine-rich toombak and non-snuff-dippers from the Sudan and Scandinavia. *Int J Cancer*, 1999; 81(4): 527-34.
4. Sopori LM, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol*, 1998; 83, 148-56.
5. Ozkul Y, Erenmemişoğlu A, Cucer N, Menevse A, Saatci CA. Sister-chromatid exchange inducing effect of smokeless tobacco using on T-lymphocyte chromosomes. *Mutat Res*, 1995; 334(2): 209-12.
6. Erenmemişoğlu A, Ustun H, Kartal M. Carcinoma of buccal mucosa in smokeless tobacco users: a preliminary study of the use of cytology for early detection. *Cytopathol*, 1995; 6(6): 403-8.
7. Idris AM, Ibrahim SO, Vasstrand EN, Johannessen AC, Lillehaug JR, Magnusson B, et al. The Swedish snus and the Sudanese toombak: are they different? *Oral Oncol*, 1998; 34(6): 558-66.
8. Holt PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax*, 1987; 42: 241-9.
9. Gulsvik A, Fagerhol MK. Smoking and immunoglobulin levels. *Lancet*, 1979; 1: 449.
10. Tollerud DJ, Clark YW, Brown LM, Nevla'nd CY, Mann DL, Pankiw-Trost LK, et al. Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis*, 1989; 139(1):194-8.
11. Tollerud DJ, Clark JW, Brawn LM, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trast LK, et al. The effects of cigarette smoking on T-cell subsets. a population-based survey of healthy caucasians. *Am Rev Respir Dis*, 1989; 139(6): 1446-51.

12. Buckley CE, Darsey FC. Serum immunoglobulin levels throughout the life span of healthy man. *Ann Intern Med*, 1971; 75: 673-82.
13. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trast LK, Blattner WA, et al. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy nonsmokers. *J Clin Immunol*, 1989; 9(3): 214-22.
14. Goud SN, Zhang L, Kaplan AM. Immunostimulatory potential of smokeless tobacco extract in in vitro cultures of murine lymphoid tissues. *Immunopharmacol*, 1993; 25(2): 95-105.
15. Lindemann RA, Park NH. Inhibition of human lymphokine-activated killer activity by smokeless tobacco(snuff) extract. *Arch Oral Biol*, 1988; 33(5): 317-21.
16. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3.Baskı, İstanbul; Güneş Nobel Kitabevi, 2003; 15-51.
17. Belkastro AN, Arthur GD, Albisser RA, Raj DA. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol*, 1996; 80: 1331-5.
18. Fry RW, Morton AR, Keast D. Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur J Appl Physiol*, 1992; 64: 335-44.
19. Larramendy LM, Knuutila S. Increased frequency of micronuclei in B and T8 lymphocytes from smokers. *Mutat Res*, 1991; 259: 189-95.
20. Moszczynski P, Zabinski Z, Moszczynski P Jr, et al. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett*, 2001; 118(3): 121-7.
21. Tollerud DJ, Clark JW, Brawn LM, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trast LK, et al. T cell subsets in healthy black smokers and nonsmokers. Evidence for ethnic group as an important response modifier. *Am Rev Respir Dis*, 1991; 144: 612-6.