

PAPER DETAILS

TITLE: Kursorun ve civa agir metal iyonlarinin albino farelerde canli agirlik ve serum alkalen fosfataz düzeyi üzerine etkisi

AUTHORS: Emine YALÇIN,Meltem MARAS,Kültigin  AVUSOGLU

PAGES: 61-67

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/223793>

Kurşun ve civa ağır metal iyonlarının albino farelerde canlı ağırlık ve serum alkale fosfataz düzeyi üzerine etkisi

Emine YALÇIN¹, Meltem MARAŞ², Kültiğin ÇAVUŞOĞLU^{1,*}

¹Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Yahşıhan/ Kırıkkale

²Karaelmas Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü Ereğli/Zonguldak.

Özet

Bu çalışmada 70 adet albino fare materyal olarak kullanıldı. Kontrol, deneme 1 ve deneme 2 olmak üzere fareler 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu normal besin (yem ve su), ikinci grup farklı dozlarda kurşun (Pb) içeren besin (yem ve kurşun içeren sulu çözelti), üçüncü grup ise farklı dozlarda civa (Hg) içeren besin (yem ve civa içeren sulu çözelti) ile beslendi. Deneme süresi 15 gün olarak belirlendi. Deneme süresi bitiminde fareler ilk olarak tartıldı ve sonrasında kesim esnasında alınan kan örneklerinde Alkale fosfataz (ALP) enzim düzeyi otoanalizör kullanılarak belirlendi. Farelerde uygulanan metal iyon dozunun artması ile birlikte canlı ağırlık değerlerinde önemli azalmalar belirlendi. Pb ve Hg uygulama dozu ile birlikte serum alkale fosfataz düzeylerinde belirgin azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: Albino fare, kurşun, civa, alkale fosfataz

The effect of lead and mercury heavy metal ions on body weight and serum alkaline phosphatase level in albino mice

Abstract

Seventy albino mice were used as material in this study. The mice divided into three groups as control , treatment 1 and treatment 2. The control group were fed with normal food (food and water), treatment 1 group were fed with food containing Pb with different dosages (food and aqueous solution containing Pb), and treatment 2 group were fed with food containing Hg in different dosages (food and aqueous solution containing Hg). The experimental period lasted 15 days. At the end of the experimental period initially mice were weighed and then alkaline phosphatase (ALP) level were determined in blood taken during the slaughtering using autoanalyzer. The body weight of mice were decreased with increasing metal ion concentration in treatment. It was observed that serum alkaline phosphatase level was significantly decreased ($p<0.05$) with increasing Pb and Hg concentration.

Keywords: Albino mice, lead, mercury, alkaline phosphatase

* Kültiğin ÇAVUŞOĞLU

Makalenin basım kararı 09.06.2007 tarihinde alınmıştır.

1. Giriş

Son yıllarda, çevresel problemler tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de günlük yaşam problemleri arasında yer almaktadır. Hızlı sanayileşme sonucunda artan endüstriyel atıklar çeşitli yollarla hava, su ve karaya geçerek besin zincirine katılmaktadır. Endüstriyel atıklar arasında yaygın olan ağır metal iyonlarının çevreye yayılması birçok yaşam türleri için önemli bir tehlike oluşturmaktadır [1,2]. Metallerin çevreye geçişi dikkate alındığında farklı sektörlerden, farklı işlem kademelerinde metallerin çevreye atılımı gerçekleşmektedir. Temel endüstriler ve bu endüstrilerden çevreye yayılan metaller Tablo 1’de verilmiştir [3].

Tablo 1. Farklı sektörlerden çevreye yayılan metaller

Endüstri	Cd	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt endüstrisi	-	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali üretimi	+	-	+	+	-	+	+
Gübre sanayi	+	+	+	+	+	-	+
Demir çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi(Termik)	+	+	+	+	+	+	+

Tablodan da görüldüğü Kurşun (Pb) ve Civa (Hg) metalleri belirtilen sektörlerin tümünde kullanılmakta ve çevreye yayılmaktadır. Bu nedenle ağır metal kirliliğinin büyük bir yüzdesini Kurşun (Pb) ve Civa (Hg) metal kontaminasyonunun oluşturduğu söylenebilir. Kurşun ve bileşikler boru, oluk, tabak, para, boya üretimi ve kozmetik gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [4,5]. Özellikle kurşunlu benzin kullanımı ile çevresel kurşun kontaminasyonu artmaktadır. Yüksek miktarda ve tekrarlanan kurşun kontaminasyonu ağızda metalik tat, mide ağrısı, kusma, sinir sistemi hasarı ve ölüme kadar uzanan sonuçlar doğurabilir. Önemli bir enzim inhibitörü olan kurşun, özellikle selenyum ve sülfür içeren enzimlerde denatürasyona ve aktivite kaybına neden olmaktadır [6-7]. Civa ise doğada özellikle metalik ve inorganik formda bulunmaktadır. Doğada bulunan civanın %80’i insan aktiviteleri sonucu oluşurken (katı atıkların, fosillerin yanması, madenlerin işlenmesinde, eritilmesinde ve dış dolgu malzemelerinin yapımında vb.) %20’si kullanılan gübreler, termometreler, fungusid ilaçlar ve pil bataryalarından gelmektedir. Mikroorganizmalar tarafından civa, proteinlere bağlanarak onları inhibe eden metilciva formuna dönüştürülmektedir [8,9]. Ayrıca civa metalinin organizmada glutatyon ve diğer tioller azalttığı, serbest radikal oluşumunu ve oksidatif stresi arttırdığı rapor edilmiştir. Civa organizmada üç şekilde zararlı etki oluşturur: i) Civa; enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanabilir ii) Proteinlerin tersiyer yapıları değiştirebilir ve yeni oluşan proteinler organizma için immunojen hale gelebilir iii) Organik civa formları lipofilik organlarda birikir. Örneğin; miyelin kılıflarda biriken civa nörotoksik etkilere neden olmaktadır [10]. Ağır metal olarak tanımlanan kurşun ve civa metallerine ait temel veriler Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Kurşuna ve civa metallerine ilişkin temel veriler

Sınıflandırma	Ağır metal	Ağır metal
	Kurşun	Civa
Renk	Mavimsi	Gümüş
Sembol	Pb	Hg
Atom numarası	82	80
Erime noktası	327.5 °C	-38.8°C
Kaynama noktası	1740 °C	357 °C
Yoğunluk	11.34 g/cm ³	13.456g/cm ³

Bu çalışmada, Pb ve Hg ağır metallerin albino farelerde serum Alkalen fosfataz (ALP) düzeyi ve canlı ağırlığı parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. ALP enziminin varlığı ilk kez 1907 yılında Suzuki ve arkadaşları tarafından fosfatazları ayrı bir enzim sınıfı olarak göstermeleri ile literatüre girmiştir [11]. ALP fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen, fosfat grubu transferini sağlayan ve kofaktör olarak Zn metali içeren bir metaloenzimdir. 1960'lı yıllarda *E.coli* alkalen fosfataz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda, enzimin iki polipeptit zincirinden oluştuğu ve her bir zincirin iki Zn ve bir Mg metal iyonu içerdiği rapor edilmiştir [12-14].

2. Yöntem

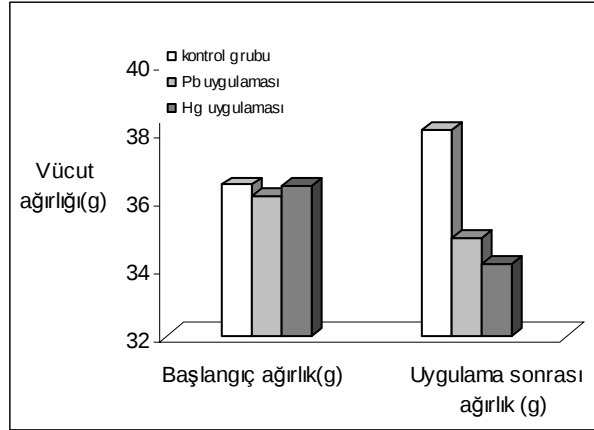
Bu çalışmada 70 adet albino fare kullanılmıştır ve fareler 25°C'de 15 gün süreyle hazır yem ve su ile beslenmiştir. Kontrol grubu, Hg uygulaması ve Pb uygulaması için fareler 3 gruba ayrılmıştır. İlk grup, kontrol amaçlı kullanılan 10 fareden oluşmaktadır. İkinci grupta bulunan fareler distile su içerisinde kurşun sitrat ile hazırlanan üç farklı dozda (10, 15, 20 ppm) Pb çözeltisi ile üçüncü grupta bulunan fareler ise distile su içerisinde civa klorür ile hazırlanan üç farklı dozda (10, 15, 20 ppm) Hg çözeltisi ile beslenmiştir. Her bir doz on fare üzerinde test edilmiştir.

Ağır metallerin farelerde canlı ağırlık üzerine etkisini belirlemek amacıyla deney öncesinde ve 15. gün sonunda tüm bireylerin ağırlıkları hassas terazi kullanılarak saptanmıştır. Tartım sonrasında bir fanus içerisinde dietileter inhalasyonu ile anestezi sonrasında her bir hayvanın kuyruk-karın bölgesi kesimi yoluyla kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek elde edilen serum örnekleri ALP analizi için numaralandırılmıştır. Her bir serum örneğindeki ALP seviyeleri Olympus AU600 otoanalizör cihazı ile belirlenmiştir.

3. Bulgular

Araştırmada incelenen kontrol, Pb ve Hg uygulama gruplarına ilişkin deney öncesi ve 15. gün sonunda belirlenen canlı ağırlıkların aritmetik ortalamaları Şekil 1'de

verilmiştir. Canlı ağırlık değerleri bakımından kontrol grubu ile uygulama grupları arasında belirgin farklılıklar elde edilmiştir. Kontrol grubuna ait bireylerde canlı ağırlıklarda 2.0-3.0 g'lık bir artış söz konusu iken Pb ve Hg uygulama gruplarında canlı ağırlıklarında 2.0-4.0 g'lık bir azalma olduğu saptanmıştır.



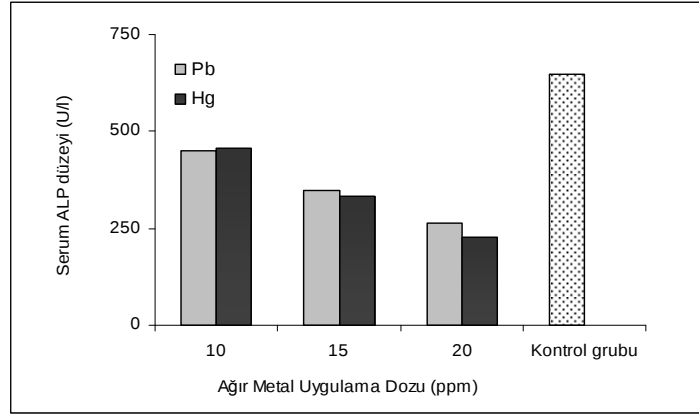
Şekil 1. Hg ve Pb metal iyonlarının farelerde canlı ağırlık üzerine etkisi

Kontrol grubu ve uygulama gruplarına ait serum ALP değerleri Şekil 2’de verilmiştir. Serum ALP değerleri bakımından kontrol grubu ve Pb/Hg uygulama gruplarına ilişkin değerler arasında önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Her iki uygulama grubunda ALP değerlerinde önemli azalmalar saptanmıştır. Uygulama dozuna bağlı olarak ALP değerlerindeki değişim istatistiksel olarak Bonferroni testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 3) ve kontrol grubuna kıyasla Pb ve Hg uygulama gruplarında serum ALP seviyelerindeki azalma istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bulunmuştur.

4. Tartışma

Zararlı çevre kirleticileri arasında yer alan toksik metaller havadan, sudan ve özellikle de alınan besinler yolu ile canlı bünyesine girmektedirler. Günümüzde gelişen endüstriyel faaliyetler sonucunda Pb ve Hg gibi ağır metaller çevreye yayılmakta ve çeşitli yollarla canlı organizmalara geçmektedir. Ağır metaller canlı organizmalarda çeşitli genetik, sitolojik, fizyolojik ve biyokimyasal hasarlara neden olmaktadır.

Bu çalışmada farelerde kontrol, Pb ve Hg uygulama gruplarına ilişkin canlı ağırlık değerleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ve uygulama grupları arasında canlı ağırlık bakımından belirgin sonuçlar elde edilmiştir. Ağır metal uygulanan bireylerde vücut ağırlığının başlangıç ağırlığa kıyasla belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır ve bu sonuç, ağır metal uygulamasının bireylerin beslenme rejimlerinde ve metabolizmalarında çeşitli anormalliklere yol açması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca beslenme yolu ile alınan ağır metallerin vücuttan uzaklaştırılması için metabolizmanın hızlanması ve buna paralel olarak enerji tüketiminin artması canlı ağırlığında azalmalara neden olabilmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar literatürde rastlanan sonuçlar ile desteklenmektedir. Benzer çalışmalarda yemlerine yüksek miktarda ağır metal iyonları katılan canlılarda (rat, fare, tavuk vb.) gelişmenin gerilediği ve canlı ağırlıklarının normalden daha düşük çıktığı rapor edilmiştir [15-17].



Şekil 2. Pb ve Hg ağır metallerinin farelerde serum ALP düzeyi üzerine etkisi (on farede elde edilen verilerin aritmetik ortalaması alınmıştır)

Doğal ve aktif olan ALP enzimi dört Zn ve iki Mg metal iyonu içermektedir. Enzim aktivitesi için gerekli olan Zn kofaktörünün başka bir metal iyonu ile yer değiştirmesi sonucu enzimin optimum pH değeri, hız sabiti ve k_{cat} değeri önemli derecede değişmektedir [18,19]. Şekil 2’de uygulanan Pb ve Hg metal iyonlarının fare serum ALP düzeyine etkisi, Tablo 3’ de ise metal konsantrasyonu ile ALP düzeyindeki değişimin istatistiksel analizi verilmiştir. Hg ve Pb metal iyon konsantrasyonunun artırılması ile serum ALP düzeylerinde belirgin azalmalar gözlenmiştir.

Tablo 3. Bonferroni testi ile istatistiksel analiz

Bonferroni							
Dependent Variable	(I) DOZ	(J) DOZ	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PB	10	10					
		15	101,80 *	18,228	,000	55,27	148,33
		20	182,50 *	18,228	,000	135,97	229,03
	15	10	-101,80 *	18,228	,000	-148,33	-55,27
		15					
		20	80,70 *	18,228	,000	34,17	127,23
	20	10	-182,50 *	18,228	,000	-229,03	-135,97
		15	-80,70 *	18,228	,000	-127,23	-34,17
		20					
	HG	10					
		15	126,50 *	11,701	,000	96,63	156,37
		20	231,80 *	11,701	,000	201,93	261,67
HG	10	10					
		15	-126,50 *	11,701	,000	-156,37	-96,63
		15					
	15	10	105,30 *	11,701	,000	75,43	135,17
		15					
		20	-231,80 *	11,701	,000	-261,67	-201,93
	20	10	-105,30 *	11,701	,000	-135,17	-75,43
		15					
		20					

* Fark 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

Bu çalışmada kullanılan Pb ve Hg metal iyonları ALP enziminin çeşitli fonksiyonel gruplarına (sistein aminoasitlerinin –SH, tirozin aminoasitinin –OH gibi) bağlanarak enzimde konformasyonel bozukluklara ve denatürasyona sebep olmakta bunun sonucunda da enzim aktivitesi azalmaktadır. Enzimatik reaksiyonda fosfat grubuna (substrat) ait oksijen molekülleri, ALP enzim yapısındaki Zn metal iyonu ve Arginin aminoasiti ile etkileşime girerek bağ oluşturmaktadır. ALP aktivitesi için bu etkileşimin önemi büyüktür. Oksijen moleküllerinin bağlandığı bu bölgelerin Pb ve Hg metal iyonları ile maskelenmesi enzim-substrat etkileşimini ve ALP aktivitesini azaltmaktadır. Ayrıca ALP enziminin, Zn metal iyonu ile aynı grupta yer alan IIB grubu geçiş metallerine (Hg, Cd gibi) benzer afinite sergilediği ve bu metallerin Zn metali ile

enzime bağlanma yönünde yarışarak ALP aktivitesinde önemli azalmalara yol açtığı düşünülmektedir. ALP enziminin aktif merkezinde yer alan Zn metal iyonu yerine farklı bir metal iyonunun geçmesi ile enzim molekülünü çevreleyen su molekülünün pKa değeri değişmekte buna bağlı olarak su molekülünün iyonlarına ayrışma derecesi de etkilenmektedir [18,19]. Tüm bu değişimlerin kümülatif bir etkisi sonucunda enzimin maksimum aktivite sergilediği pH'da kaymalar oluşmaktadır ve enzim aktivitesinde azalmalara neden olmaktadır. Tashian ve arkadaşları [19], ALP enziminin Cd metal iyonu varlığında k_{cat} değerinde önemli azalmalar olduğunu rapor etmişlerdir.

Şekil 2'den de görüldüğü gibi Hg metal iyonu uygulanan bireylerde serum ALP düzeyi, Pb uygulanan gruba kıyasla daha düşüktür. Bu durum Hg metal iyonunun Zn metal iyonu ile aynı grupta yer alması ve ALP enziminin Hg metal iyonuna Pb metal iyonuna kıyasla yüksek afinite sergilemesi ile açıklanabilir.

5. Kaynaklar

- [1] Mellor, A., "Lead and zinc in the wallsend burn, an urban catchment in Tyneside UK." **The Science of the Total Environment**, 269: 49-63, (2001).
- [2] Aslan, A., Budak, G., Karabulut, A., "The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca and Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey)" **Journal of Quantative Spectroscopy&Radiative Transfer**, 88 (4): 423-31, (2005).
- [3] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Erişim adresi: <http://www.metalurji.org.tr/dergi>
- [4] Kitman, JL., "The secret history of lead" **The Nation**, (2000).
- [5] Nriagu, J., "Saturnine Gout Among Roman Aristocrats: Did lead poisoning contribute to the fall of the empire" **N Engl J Med**, 308:1, (1983).
- [6] WHO., "Major Poisoning episodes from environmental chemicals" Geneva: 3-15, (1992).
- [7] Göker, Ş., "İstanbul çocuklarında kan kurşun taraması" İstanbul: **İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Uzmanlık tezi** (1996).
- [8] www.ilpi.com/msds/ref/heavymetal/html (2006).
- [9] www.beasinc.org/about/heallead.html (2006).
- [10] <http://www.klinikbiyokimya.com/index.htm> (2006).
- [11] Suzuki, U, Yoshimura, K, Takaishi, M., **Bull. Coll. Argric. Tok. Imp. Univ.**, 7:503, (1907).
- [12] Benson, S. A, Hall, M.N, Silhavy, T. J. **Biochemistry**, 54: 101, (1985).
- [13] Inouye, H., Barnes, W., Beckwith. J., **Bacteriol.**, 149: 434, (1982).
- [14] Michaelis, A., Beckwith, J., **Annu. Rev. Microbiol.**, 36: 435, (1982).
- [15] Takeda, T., Kimura, M., Yokoi, K., Itokawa, Y., "Effect of age and dietary protein level on tissue mineral levels in female rats" **Biol. Trace Elem. Res.**, 54: 55-74, (1996).
- [16] Shan, AS., "Effects of fiber andvarious zinc compound on performance.blood biochemical parameters and zinc concentrations in tissues of chicks" **Acta Vet. Zootec. Sin.**, 24:1, (1993).
- [17] Özçelik, D., Dursun, Ş., Kahraman, R., Kocabağlı, N., Alp, M., Öztekin, GE., "The effect of dietary supplementation of zinc at toxic level on the performance and zinc concentrations of some tissues in broilers" Ankara: Second international Zinc Symposium (1998).

- [18] Muller, P., Coleman, JE., **J. Biol. Chem.**, 245: 4968-76,(1970).
- [19] Tashian, RE., Hewett-Emmett, D., “Biology and Chemistry of the Carbonic Anhydrases”, **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 429:1-640, (1984).