

İçme suyu ile farklı dozda ve değişik sürede kurşun alımının albino farelerde böbrek ve sinir sistemi üzerine etkisi*

Arif ALTINTAŞ¹, Ali BİLGİLİ², Sefa ÇELİK¹, Gökhan ERASLAN²

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara; ² Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

Özet: Çalışmada, içme suyu ile kronik olarak 250 ve 1000 ppm kurşun (asetat şeklinde) alımının böbrek ve sinir sistemi üzerine etkisinin albino farelerde incelenmesi amaçlanmıştır. Aynı deneme koşullarında pelet yem ile beslenen ve aynı suyu tüketen 35-40 g ağırlığında 6 aylık toplam 120 erkek beyaz fare (Swiss albino) çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Denemenin ikinci, üçüncü ve dördüncü aylarında hayvanlardan kan ve idrar örnekleri alınarak biriktirilmiş (pool) ve serum örneklerinde üre, kreatinin, albümin, kreatinin-fosfokinaz, kolinesteraz ve monoaminoksidad analizleri; idrar örneklerinde ise, protein elektroforezi gerçekleştirilmiş ve hayvanların davranışları izlenmiştir. Araştırma sonunda, kronik kurşun alımının farelerde böbrek ve sinir sistemini olumsuz etkilediği ve klinik biyokimyasal olarak tubuler proteinüri, serum enzim değerlerinde artış, titremeler ve davranış bozuklukları ile kendini gösterdiği, titremelerin yüksek serum MAO aktivitesi ile ilişkili olduğu, serum kreatinin değerlerinin denemenin dördüncü ayında yükseldiği saptanmış ve serumda CPK ve idrarda 36 kDa protein değer artışlarının kronik kurşun alımının doz ilişkili belirteçleri olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Albino fare, böbrek toksisitesi, idrar protein elektroforezi, kronik kurşun alımı, sinir toksisitesi

Effects of the chronic lead intake via drinking water on the kidney and nervous system of albino mice

Summary: The purpose of this study was to investigate the effects of the chronic lead intake via drinking water at the dosages of 250 and 1000 ppm of lead acetate on the kidney and nervous system of albino mice. Six-months old 120 white male albino mice with a weight of 35 and 40 g fed with same pelet feed and water were used as the material in this study. Samples of blood and urine were taken from the animals and pooled together in the second, third and fourth months of the trials. Analysis of urea, creatinine, albumin, creatine-phosphokinase, cholinesterase and monoaminoxidase in serum and electrophoresis of proteins in urine were performed in these collected samples, and behaviours of animals were followed. Results of the experiments are as follows: Chronic lead intake via drinking-water showed toxic effect on the kidney and nervous system with clinical symptoms of tubular proteinuria, tremor and disorders of behaviour in animals. Moreover, death of animals was seen sporadically. Urine protein electrophoresis determines the effects of lead intake on the kidney without increase in serum urea and creatinine. There was an increased level of creatinine in the fourth months of trials were proportional with amount of lead intake. Tremors seen in the trial groups may be related to high serum MAO activity. Serum CPK activity and a urine protein band seen at 36 kDa size on the gel were increased regularly during the lead intake of trial groups and therefore, they can be suggested to use as a dose dependent markers in the chronic lead toxicosis conditions.

Key words: Albino mice, chronic lead exposure, nephrotoxicity, neurotoxicity, urine protein electrophoresis

Giriş

Vücut sıvıları ve dokularında eser miktarda rastlanan kurşun kontamine toksik elementlerden olup (1) tüm dünyada endüstri dallarında yaygın olarak kullanılmakta (38) ve bu nedenle önemli bir çevre kirleticisi olarak ekolojik dengenin bozulmasına veya besin zincirine girerek insan ve hayvanlarda akut ya da kronik zehirlenmelere neden olmaktadır (6,9,21,22,41). Kurşun, ilk emildiğinde öncelikle eritrositlerde difosfatları halinde yoğunlaşır, daha sonra hızla böbrek ve karaciğer gibi yumuşak dokularda ve son olarak da kemik dokusunda birikerek (14,39) alım düzeyine ve bulaşmanın süresine bağlı olarak söz konusu doku ve organ fonksiyonlarını etkiler (34).

Kurşunun, insanlarda ve ratlarda böbrek ve sinir sistemi üzerinde nefrotoksik, nörotoksik ve nefrokarsinogenik etkiler sergilediği (39,40), farelerde ise, daha çok nörotoksik etkisini esas alan davranış bozukluklarına da neden olduğu bildirilmiştir (8-11). İçme suyu ile %0,25'lik kurşun-asetat çözeltisi şeklinde kurşun alan laboratuvar farelerinde davranışların ve sosyal ilişkilerin bozulduğu, büyüme ve gelişmenin yavaşladığı gözlenmiştir (12). İçme suyu ile 1000 ppm kurşun alan ratlarda da davranış fonksiyonları incelenmiş ve kurşun alımının ratların öğrenme kapasitesini değiştirmede, lokomotor aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır (24).

Kurşun alımının biyokimyasal etkileri, nörotransmitter sistem bozukluğu ve protein-kinazlardaki değişiklikler

* Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Etik Kurul Onayı alınmıştır.

ile karakterize olup, davranış bozukluklarının nörobiyolojik mekanizmasının da temelini oluşturur. Gelişme dönemlerine göre bunlar dopaminerjik, kolinerjik, serotoninerjik, GABAnerjik, glutaminerjik ve narkotik sistemleri içerir (33). Kolinesteraz (ChE: EC.3.1.1.7) ve monoaminoksidaz (MAO: EC.3.4.1.4) bu sistem içindeki bazı nörotransmitterlerin metabolizmasından sorumlu iki enzimdir (26,42). Sinir ve davranış bozukluklarında serum kreatinfosfokinaz (CPK: EC.2.7.3.2) aktivitesinde artış beklenir (5).

Kurşunun nörotoksik etkisi, muhtemelen membran geçirgenliğini bozarak kan-beyin engelini aşması sonucu merkezi sinir sisteminde, bilhassa beyinde yaptığı hasar ile ilişkilidir (32). Nefrotoksik etkisi ise karmaşık olup (40) idrarın, kurşunu vücuttan uzaklaştırmada başlıca yol olması (15) ve bilhassa proksimal tubullerin esasen yüksek olan kurşun geri emilimine duyarlı olması ile ilgilidir (15,25). Nefrotoksik etki kurşunun kimyasal şekline, dozuna ve alımının akut ya da kronik oluşuna göre değişir (25).

Nefrotoksik etkinin erken belirteci olarak idrar N-asetil β -D-glikozaminidaz aktivitesindeki artıştan yararlanılabileceği, ancak, bunun kronik kurşun nefropatisinin bir belirteci olarak kullanışlı olmadığı ve bu nedenle, kronik kurşun alımının neden olduğu nefropatinin erken biyolojik belirteçlerinin tespitine gereksinim olduğu ifade edilmiştir (7).

Üzerinde çalışma yapma kolaylığı ve sonuçların çiftlik hayvanlarına aktarılabilirliği açısından bir model oluşturacağı düşüncesiyle materyal seçilen farelerde değişik dozda ve sürede kurşun alımının böbrek ve sinir sistemi üzerindeki etkisinin incelenmesi ve kronik kurşun alımının belirteci olabilecek parametrelerin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışma, 120 adet, 35-40 gram ağırlığında ve 6 aylık erkek beyaz fare (Swiss albino) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Fareler deney aşamasında Korkuteli Yem Sanayii'nden temin edilen fare pelet yemi ile beslenmişlerdir (Tablo 1). Her birinde 40'ar fare bulunacak şekilde bir kontrol ve iki deneme olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Çalışma süresince (4 ay) kontrol grubuna kurşunsuz su, birinci deneme grubuna 250 ppm ve diğer deneme grubuna 1000 ppm kurşun içeren su önlerinde sürekli olarak (*ad libidum*) bulundurulmuştur.

Tablo 1. Fare pelet yemin içeriği ve kalori düzeyi.
Table 1. Calorie level and content of the mouse's feed.

Su	En çok	%12.00
Ham protein	En az	%23.00
Ham selüloz	En çok	%7.00
Ham kül	En çok	%8.00
HCl'de çözünmeyen kül	En çok	%2.00
NaCl	En çok	%1.00
Kalsiyum	En az	%1.00-1.80
Fosfor	En az	%0.90
Lizim	En az	%1.00
Metionin	En az	%0.30
Metabolik enerji (kcal/kg)	En az	2600

Denemenin 2. 3. ve 4. aylarında hayvanlardan hafif eter anestezisi altında kalbe girilerek kan ve sistosentez yolu ile de idrar örnekleri alınmıştır. En az 3 fareden alınan ve biriktirilen (pool) kan örneklerinden serum elde edilmiştir. İdrar örnekleri ise 7-8 fareden alınan ve biriktirilen (pool) idrardan oluşmuştur.

Farelerin barındırıldıkları yer ve çevre koşulları deneme süresince sık sık kontrol edilmiş, altlıklar temizlenmiş ve davranışları izlenmiştir.

İçme sularının hazırlanması

Stok kurşun çözeltisi (5000 ppm): Kurşun asetat [Merck, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$] 9,153 g tartılarak bir balona alınmış, biraz deiyonize su ile çözülürülerek litreye tamamlanmıştır (5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =5000 ppm). Bu stok çözelti her hafta yenilenmiştir.

250 ppm kurşun içeren içme suyu: Stok çözeltiden 50 ml alınmış ve deiyonize su ile litreye tamamlanarak her gün taze hazırlanmıştır.

1000 ppm kurşun içeren içme suyu: Stok çözeltiden 200 ml alınmış ve deiyonize su ile litreye tamamlanarak her gün taze hazırlanmıştır.

Metot

Serum üre analizleri Gentzkow'un modifiye metodu (3) ile, kreatinin analizleri hemolizsiz örneklerde Jaffe reaksiyonu ile (37), albümin miktarı ise biüret reaksiyonu ile (29) tayin edilmiştir. Serum MAO aktivitesi 0.2 M fosfat tamponda (pH 7.2) substrat olarak 8 mM benzilaminin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle (28), CPK ve ChE enzim aktiviteleri ticari kitleri (Diasyes kreatin fosfokinaz; Boehringer, Mannheim Kolinesteraz) kullanan spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. İdrar proteinlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi ultrafiltrasyon işlemini takiben (Millipor 10.000 NMWL rejenere selüloz, ultrafiltrasyon filtresi ile) %10 poliakrilamid jel üzerinde gerçekleştirilmiş ve protein boyası olarak Coomassie blue kullanılmıştır (4). İdrar proteinlerine ait bandların dansitometrik değerlendirilmesinde Helena Junior 24 model dansitometreden yararlanılmıştır.

Kontrol ve deneme gruplarına ait ortalama değerler arası fark varyans analizi ile incelenmiş ve önemlilik için dönemler arası Kruskal Wallis, gruplar arası ise Mann-Whitney testleri bilgisayar ortamında uygulanmıştır (31).

Bulgular

Deneme sonunda elde edilen ortalama değerler ile gruplar arası farklılıkların istatistik önemlilikleri Tablo 2'de sunulmuştur. İçme suları ile 250 ve 1000 ppm kurşun alan gruplarda idrar proteinlerinin elektroforetik incelenmesi sonucu elde edilen elektroforegramlara bir örnek Şekil 1'de, bandların dansitometrik dağılımlarına birkaç örnek Şekil 2'de gösterilmiştir.

İçme suları ile iki ay, üç ay ve dört ay 250 ve 1000 ppm kurşun alan farelerin idrar protein elektroforezinde kantitatif olarak 36 kDa'lık banda gözlenen farklılıklar önemli bulunmuştur (Şekil 1 ve 2; Tablo 3). Söz konusu proteinin gruplar arasındaki dağılımı denemenin üçüncü ayı dışında doza bağlı bulunmuştur. Denemenin ikinci

Tablo 2. İçme suyu ile farklı dozda kronik kurşun alımının farelerin kan parametrelerine etkisi.
Table 2. The effect of the chronic lead intake at various dosages on the blood parameters of mice.

Parametre	Kontrol			250 ppm			1000 ppm			P
	n	x	Sx	n	x	Sx	n	x	Sx	
Denemede ikinci ay										
Üre (mg/dl)	5	40,20a (32,5 - 49,3)	3,21	9	77,88b (44,4 - 136,5)	10,39	9	93,31b (59,6 - 139,2)	8,77	P< 0,01
Kreatinin (mg/dl)	5	0,37a (0,33 - 0,41)	0,01	9	0,54a (0,30 - 1,20)	0,09	9	0,41a (0,33 - 0,46)	0,01	Ö.D
Albumin (g/dl)	8	2,80a (2,73 - 2,92)	0,02	8	3,02b (2,80 - 3,22)	0,04	8	2,92b (2,85 - 3,15)	0,03	P< 0,01
MAO (McEw. Ünite)	5	20,16a (16,0 - 24,0)	1,42	5	27,84b (25,6 - 28,8)	0,59	5	25,46c (24,0 - 26,4)	0,45	P< 0,05
CPK (İÜ/L)	8	26,25a (14,0 - 37,0)	2,80	8	58,13b (45,0 - 70,0)	2,73	8	72,25c (56,0 - 89,0)	3,82	P< 0,01
ChE (U/L)	8	4,15a (3,80 - 4,50)	0,09	8	5,14b (4,70 - 5,80)	0,13	8	5,84c (5,00 - 6,40)	0,18	P< 0,01
Denemede üçüncü ay										
Üre (mg/dl)	5	53,64a (51,2 - 55,6)	0,71	5	60,68b (54,5 - 66,3)	2,47	5	51,95a (45,8 - 55,4)	1,43	P< 0,05
Kreatinin (mg/dl)	5	0,50a (0,46 - 0,58)	0,02	5	0,42b (0,40 - 0,46)	0,01	5	0,47ab (0,40 - 0,58)	0,03	P< 0,05
Albumin (g/dl)	8	2,80a (2,73 - 2,92)	0,02	8	3,17b (2,91 - 3,56)	0,06	8	2,80a (2,48 - 3,05)	0,08	P< 0,05
MAO (McEw. Ünite)	5	21,04a (17,6 - 25,2)	1,43	5	35,20b (29,6 - 40,0)	1,73	6	28,00c (25,6 - 33,6)	1,29	P< 0,05
CPK (İÜ/L)	8	29,38a (16,0 - 49,0)	3,82	8	135,38b (100,0 - 156,0)	6,82	8	155,63c (124,0 - 198,0)	7,43	P< 0,01
ChE (U/L)	8	4,15a (3,80 - 4,50)	0,09	8	5,87b (5,10 - 6,50)	0,17	8	5,19c (4,50 - 6,90)	0,30	P< 0,05
Denemede dördüncü ay										
Üre (mg/dl)	5	64,70a (50,6 - 81,7)	7,00	5	85,46a (42,8 - 151,0)	18,85	5	82,24a (54,5 - 143,9)	16,37	Ö.D.
Kreatinin (mg/dl)	7	0,33a (0,30 - 0,37)	0,09	5	0,36b (0,33 - 0,41)	0,01	6	0,40b (0,33 - 0,46)	0,01	P< 0,05
Albumin (g/dl)	8	2,80a (2,73 - 2,92)	0,02	8	3,02b (2,86 - 3,50)	0,08	8	3,45c (3,20 - 3,90)	0,11	P< 0,01
MAO (McEw. Ünite)	5	25,76a (20,80 - 32,00)	1,93	5	30,56ab (28,0 - 33,6)	1,02	5	33,92b (28,0 - 40,0)	2,00	P< 0,05
CPK (İÜ/L)	8	29,75a (16,0 - 46,0)	3,71	8	186,88b (179,0 - 196,0)	2,19	8	206,25b (94,0 - 306,0)	28,02	P< 0,01
ChE (U/L)	8	4,15a (3,80 - 4,50)	0,09	8	5,49b (3,90 - 6,60)	0,38	8	5,22b (4,80 - 5,90)	0,15	P< 0,01

*: n sayısının herbiri en az 3 fareden alınan kan örneğini temsil etmektedir.

*: n demonstrates the number of the blood samples taken from 3 mice.

Tablo 3. İdrarın 36 kDa protein bandına ait değerlerin deneme süresi ve doza göre dağılımları (%).
Table 3. According to trial time and dose distribution of the 36 kDa urine protein (%).

Protein bandı	Denemenin 2. ayı			Denemenin 3. ayı			Denemenin 4. ayı		
	K	250 ppm	1000 ppm	K	250 ppm	1000 ppm	K	250 ppm	1000 ppm
36 kDa (%)		3,8	10,1		9,0	21,0		9,8	13,4
		51	13,5		22,7	12,9		12,2	14,8
		2,9	15,0		21,0	15,6		9,6	10,0
	2,3	7,4	9,5	11,3	21,9	14,0	3,0	8,5	17,8
		6,7	9,8		-	16,6		19,6	-
		7,8	20,7		-	14,4		-	-
		10,8	22,6		-	29,1		-	-
Ortalama	2,3	6,49	14,32	11,3	18,65	17,66	3,0	11,94	14,0
Kontrolün katı		2,82	6,22		1,65	1,56		3,98	4,67

K: Kontrol

ayında 250 ppm kurşun alan grupta kontrollerine göre yaklaşık 3 kat olan artış 1000 ppm kurşun alan grupta 6 katından fazla hesaplanmıştır. Bu durum, denemenin 4. ayında da gözlenmiştir (Tablo 3).

İdrarda 13,5 ve 13,8 kDa protein bloğunun kontrollerine göre 2. 3 ve 4 ay süreyle 250 ve 1000 ppm kurşun alan deneme hayvanlarında düşüşe meyilli olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).

Denemenin ikinci ayı sonunda elde edilen verilerden hareketle, böbreklerin hafif, sinir sisteminin ise alınan kurşun miktarına bağlı olarak önemli düzeyde etkilendiği sonucuna varılmıştır. Bu dönem içerisinde serum MAO, CPK ve ChE aktivitelerinde doza bağlı önemli artışlar ($p < 0.05$) gözlenmiştir. Enzim aktivitelerindeki doza bağlı bu artışlar denemenin 3. ayında da devam etmiştir. Bu dönem 250 ppm kurşun alan grupta serum üre artışı, albümin düşüşü ve proteinüri gözlenmiştir. Bu farelerin 36 kDa idrar protein bandında kontrollerine oranla hafif, 1000 ppm kurşun alan grupta önemli artış gözlenmiştir (Şekil 2; Tablo 3).

Denemenin 4. ayında, serum kreatinin miktarı ile idrarın 36 kDa protein bandında ve serum MAO ile CPK aktivitelerinde alınan kurşun dozuna bağlı düzenli, ChE aktivitesinde ise doza bağlı düzensiz artışlar gözlenmiştir (Tablo 2 ve 3). Serum albümin değerlerinde doza bağlı ve önemli ($p < 0.05$), üre değerlerinde ise önemsiz artışlar saptanmıştır (Tablo 2).

Deneme grubunu oluşturan farelerde birbirlerini ısırma girişimleri, endişeli bakışlarla etrafı izleme, durgunluk vb. davranış bozuklukları ve titremeler gözlenmiştir. Sinirsel belirtiler olarak değerlendirilen bu gözlemler, alınan kurşun dozu ile orantılı bulunmuş ve gözlenen titremelerden, alınan kurşun dozuna ilişkin olarak deneme boyunca kaydedilen yüksek MAO aktivitesi

sorumlu tutulmuştur. Deneme süresince, her grupta 2-3 ölüm olayına rastlanmış ve bireysel olarak değerlendirilmiştir.

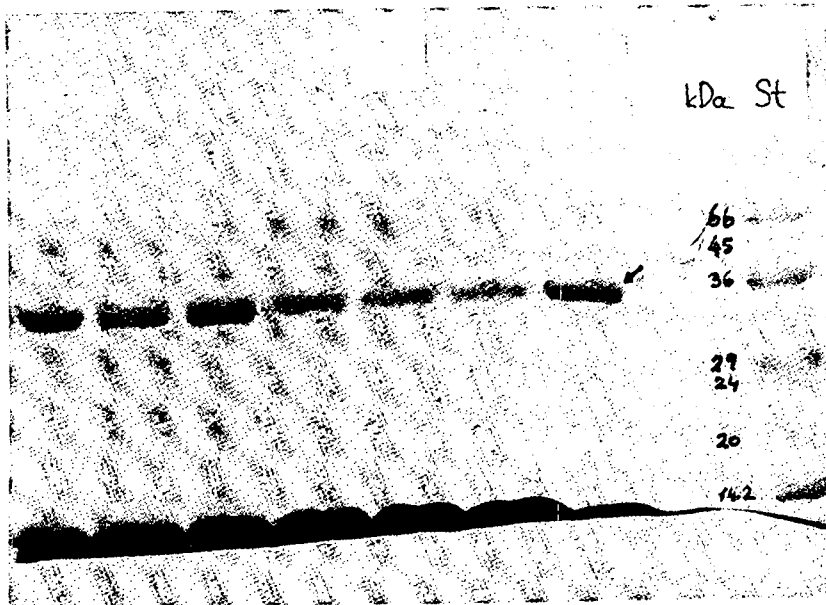
Tartışma ve Sonuç

Elde edilen serum parametrelerine ait ortalama değerler ile gruplar arası farkların istatistik önemlilikleri kontrol ve deneme gruplarına ve deneme süresine göre Tablo 2'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

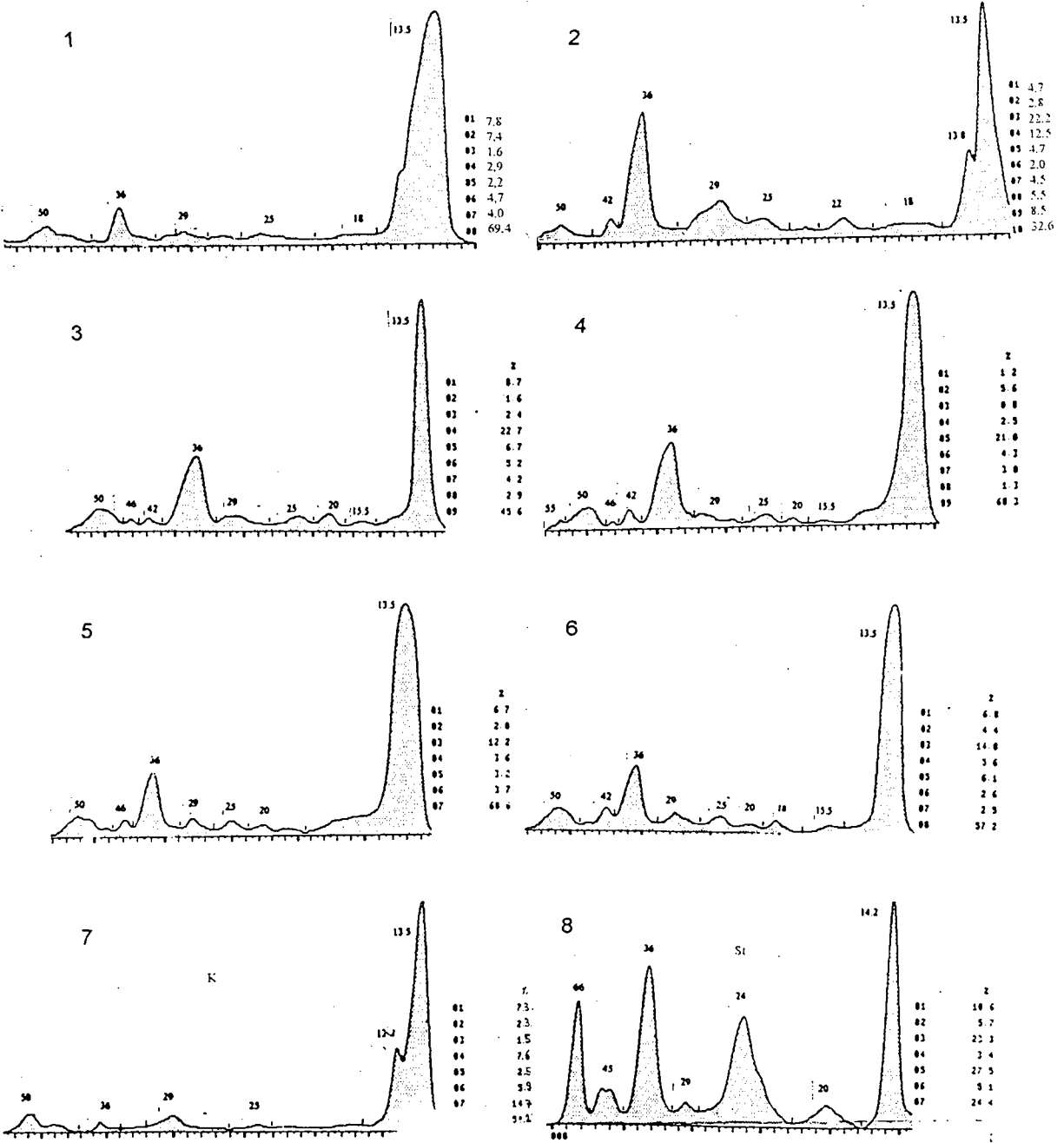
Farelerde normal serum değerleri albümin için 2,8 g/dl (36), $3,5 \pm 0,7$ g/dl (27); üre için 41,4 mg/dl (36), 33,6 mg/dl (23), $49,86 \pm 8,1$ mg/dl (27); kreatinin için 0,5-1,4 mg/dl (19), 0,48 mg/dl (36) ve $0,6 \pm 0,1$ mg/dl (27); CPK için 368 IU/L (36) ve 334 ± 229 IU/L (27) olarak bildirilmiştir. Serum MAO ve ChE aktiviteleri için farelerde normal değerler hakkında herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

Kontrol farelerde serum üre ve albümin değerleri literatür veri ile uyumlu bulunmuştur. Deneme süresine bağlı olarak serum üre artışı yaş ile ilişkilendirilebilir. Serum kreatinin ve CPK değerlerinin literatür değerine altında kaldığı belirlenmiştir. Serum MAO aktivitesi, McEwen Ünite biriminden, kontrol farelerde ikinci ay $20,16 \pm 1,42$; üçüncü ay $21,04 \pm 1,43$ ve dördüncü ay $25,76 \pm 1,93$ olarak hesaplanmış ve ikinci ay ile dördüncü ay değerleri arasında önemli farklılık olduğu saptanmıştır. Serum ChE aktivitesi ortalama değerleri ise, ikinci, üçüncü ve dördüncü aylarda $4,15 \pm 0,09$ U/L olarak bulunmuş ve gruplar ve dönemler arasında fark olmadığı görülmüştür (Tablo 2).

Denemenin 2. ayında, serum kreatinin dışındaki diğer parametrelerde istatistik olarak önemli ($p < 0.05$) farklılıklar saptanmıştır. Serum kreatininde kontrol gruba oranla deneme gruplarında belirgin artışlar gözlenmiş-



Şekil 1. İdrar protein elektrofogramı.
Figure 1. Electrophoregram of the urine protein.



Şekil 2. İçme suları ile 250 ve 1000 ppm kurşun alan (deneme) ve almayan (kontrol) farelere ait idrar örneklerinde proteinlerin elektroforetik (SDS-PAGE) ve dansimetrik incelenmesi. 1: 250 ppm, 2.ay; 2: 1000 ppm, 2.ay; 3: 250 ppm, 3.ay; 4: 1000 ppm, 3.ay; 5: 250 ppm, 4.ay; 6: 1000 ppm, 4.ay; 7: Kontrol; 8: Standart

Figure 2: Protein electrophoresis (SDS PAGE) and densitometric analysis of the urine taken from mice consumed the 250 and 1000 ppm Pb via drinking water, and from control mice with no Pb intake. 1: 250 pp, 2nd month; 2: 1000 ppm, 2nd month; 3: 250 ppm, 3rd month; 4: 1000 ppm, 3rd month; 5: 250 ppm, 4th month; 6: 1000 ppm, 4th month; 7: Control; 8: Standard

ancak bunların istatistik önem düzeyinde olmadıkları görülmüştür. Serum üre, CPK ve ChE değerlerinde gözlenen artışların alınan kurşun düzeyleri ile doğru ilişkili oldukları gözlenmiştir. Farelerin 250 ppm kurşun alanlarında olduğu gibi, 1000 ppm kurşun alanlarında da artışlar devam etmiş ve 250 ppm kurşun alanlardakinden önemli derecede farklı bulunmuştur. Serum üre, kreatinin

ve albümin miktarları açısından 250 ve 1000 ppm'lik gruplar arası fark önemli değildir (Tablo 2).

Serum MAO aktivitesi, 250 ppm kurşun alan deneme grubunda 1000 ppm kurşun alan gruptakinden daha büyük artış göstermiş ve klinik olarak gözlenen titremelerden sorumlu tutulmuştur. Serum albümin miktarında beklenenin aksine her iki deneme grubunda da

kontrollerine oranla artış gözlenmiştir. Serum üre değerleri deneme gruplarında kontrollerine oranla belirgin artış göstermiş, ancak artışlar sadece 250 ppm'lik grupta istatistik önem düzeyinde ($p<0.05$) bulunmuştur (Tablo 2).

İdrar proteinlerinin elektroforetik dağılımında 36 kDa protein bandı dikkat çekici bulunmuş (Şekil 1) ve bandın 250 ppm kurşun alan grupta hafif artış göstermesine karşın, 1000 ppm kurşun alan grupta belirgin olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). 250 ppm'lik grupta artış kontrol değerinin yaklaşık 3 katı iken 1000 ppm'lik grupta bu değerinin kontrollerin 6 katından da fazla olduğu hesaplanmıştır (Tablo 3).

Bu bulgular ışığında, içme suları ile 2 ay süreyle 250 ve 1000 ppm kurşun alımının albino farelerde böbrekleri hafif, sinir sistemini ise alınan kurşun miktarına bağlı olarak önemli düzeyde etkilediği söylenebilir.

Serum MAO, CPK ve ChE aktivitelerindeki doza bağımlı önemli artışlar ($p<0.05$) denemenin 3. ayında da gözlenmiştir. Serum üre ve albümin miktarlarındaki artışlar sadece 250 ppm kurşun alan grupta sınırlı kalmıştır. Serum kreatinininde ise, kurşun alan gruplarda kontrol gruba göre düşüş gözlenmiştir (Tablo 2).

İçme suları ile 3 ay boyunca kurşun alan farelerin 250 ppm kurşun alanlarında gözlenen serum üre artışı yanında proteinüri ve serum albümin düşüşü böbrek fonksiyonlarının olumsuz etkilendiğine yorumlanabilir. Bu aşamada, 250 ppm kurşun alan fare idrarlarında 36 kDa protein bandında kontrollerine oranla hafif, 1000 ppm kurşun alan grupta ise önemli artış gözlenmesi (Şekil 2; Tablo 3) kurşun dozu ile ilişkilendirilebilir ve muhtemelen proteinin idrarda kurşun taşımada görevli bir koloid olabileceğini ve kronik kurşun alımında böbrekteki varlığından söz edilen inklüzyon cisimlerini düşündürmektedir. Çünkü, kronik kurşun alımında, kurşunun %90'dan fazlasının böbrekte protein-kurşun kompleksleri olan inklüzyon cisimleri halinde görüldüğü ve bunların detoksifikasyon görevi üstlendikleri bildirilmiştir (39). Bu proteinin kaynağı tam olarak bilinmemekle beraber (39), izole inklüzyon cisimlerinde merkezi sinir sisteminin bir kurucu proteininin yoğun olarak bulunduğu ileri sürülmüştür (13).

Serumda CPK, MAO ve ChE aktivitelerindeki artışlar da sinir sisteminin önemli düzeyde etkilendiğine yorumlanabilir (5,16,18,26,30). Kolinesteraz sinir uyarılarının ileticisi asetilkolin yapımında ve yıkımında görevli olup sinirsel bozuklukların sorumlusu olabilir. Çünkü, enzim inhibisyonu sonucu beyinde asetilkolin birikir ve hayvanda epileptiform benzeri bozukluklar görülebilir. Kolinergik sistemin aşırı aktivitesinde ise, insanlardaki Parkinson benzeri belirtilere rastlanır (26). Sempatik sinir sonlarında, adrenal medullada ve beyinin değişik bölgelerinde mitokondrial enzim olan MAO aktivitesi de sinirsel bozukluklarda rol alabilir (16,18,42). Çünkü, enzim aktivitesinde yetersizlik beyinde aminlerin birikimine neden olur ve sinirsel belirtiler gelişebilir (30,42). Nor-

adrenalin ve serotonin insanda manyak depresif psikozun moleküler mekanizmasına iştirak eden nörotransmitterlerdir. Noradrenalin değerinde artış manyak hali oluşturabilir, aminlerde azalma ise depresif hali uyandırabilir (30). Sinirsel rahatsızlıklarda ya da davranış bozukluklarında klinik biyokimyasal olarak serum CPK aktivitesinde artış beklenir (5).

Denemenin 4. ayında, serum kreatinin miktarı ile idrarın 36 kDa protein bandında ve serum MAO ve CPK aktivitelerinde gözlenen kurşun dozuna bağlı düzenli ve ChE aktivitesinde ise doza bağlı düzensiz artışlar ($p<0.05$) böbrek ve sinir sisteminin olumsuz etkilendiğine yorumlanabilir (Tablo 2 ve 3). Serum üre değerlerinde gözlenen artışların istatistik önem düzeyinde olmadığı, albümin miktarında gözlenen artışların ise doza bağlı ve önemli olduğu saptanmıştır (Tablo 2) ve hayvanların grup özellikleri ile ilişkilendirilememiştir.

Deneme boyunca CPK aktivitesinin içme suyu ile alınan kurşun miktarına bağlı olarak düzenli bir artış gösterdiği ve bu nedenle kurşun zehirlenmesinin klinik laboratuvar göstergesi olabileceği kanısına varılmıştır. Diğer iki enzimin de (MAO ve ChE) deneme boyunca artış gösterdikleri dikkat çekici bulunmuş fakat, bu artışların daha çok 250 ppm kurşun dozu ile doğru orantılı oldukları saptanmıştır. Deneme boyunca gözlenen serum MAO aktivite artışları farelerde Parkinson benzeri titremelerden sorumlu tutulmuştur. Çünkü, yüksek MAO aktivitesi merkezi sinir sisteminin nöromediyatörleri olan noradrenalin, dopamin ve serotonin gibi monoaminlerin aşırı yıkılmaları nedeniyle aminlerin yetersizliğine ve bu yolla da Parkinson benzeri titremelere neden olabileceği kaydedilmiştir (26).

Serum üre artışlarının denemenin 2. ve 3. aylarında önemli düzeylerde seyrettiği, fakat 4. ayda bireysel artışlara rağmen istatistik önem düzeyine ulaşamadığı gözlenmiştir. Serum kreatinin değerlerinde önemli artışlara denemenin ancak 4. ayında rastlandığı ve artışların alınan kurşun dozu ile doğru orantılı olarak seyrettiği belirlenmiştir.

İçme suları ile iki ay 250 ppm kurşun alan farelerin idrar protein elektroforezinde kantitatif olarak 36 kDa'lık bantlarda gözlenen önemli tarklılık dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 2, no 1; Tablo 3). Kontrollerde zayıf olan protein bandı deneme hayvanlarında belirgin olarak elde edilmiştir (Şekil 2, no 1 ve no 7). Bu farklılık 2 ay süre ile 1000 ppm kurşun alan deneme hayvanlarında daha da belirgin hal almıştır (Şekil 2, no 2-7). Aynı farklılık denemenin 3. ve 4. ayında da kendini göstermiştir (Şekil 2, no 3-4-5-6). Bu protein ya da peptid bandından kronik kurşun zehirlenmesinin belirteci olarak yararlanılabilir. Benzer şekilde, tavşanların böbrek proteinlerinde gözlenen değişikliklerin kurşun zehirlenmesinin ve dolayısıyla nefrotoksisitenin göstergesi olabileceği bildirilmiştir (20).

İdrar proteinlerinin SDS-PAGE ile incelenmesinde 13,5+13,8 kDa'lık protein bloğunda da farklılıklar olduğu

ve deneme grubunda % değerlerin kontrollerine göre genelde düşmeye meyil gösterdiği (Şekil 2, no 1-8) saptanmış fakat, bu bandı alınan kurşun dozu ile ilişkilendirmenin hatalı olacağı kanısına varılmıştır.

Deneme grubunu oluşturan farelerde idrarla protein uzaklaştırıldığı (proteinüri) gözlenmiştir. Özellikle idrar toplam proteinin %70'den fazlasının 13,5+13,8 kDa proteinin ve yaklaşık %80'ini çok düşük molekül ağırlıklı (<25kDa) bandların oluşturması (Şekil 2, no 1-8) tubuler bozukluğa yorumlanabilir (2). Benzer şekilde, içme sularıyla 5 ay sürede %0,5 kurşun-asetat almış gelişmekte olan ratlarda böbrek fonksiyonları incelenmiş ve her iki cinsiyette de kurşun maruziyetinin böbrek ağırlığını önemli derecede artırdığı ve uygulamanın 3. ayından sonra erkek ve dişi ratların tubuler bozukluk belirtileri sergiledikleri gözlenmiş ve kurşunun nefrotoksik etkisinin cinsiyet farkı gözetmediği saptanmıştır (35). Ancak, bu hayvanların serum üre ve kreatinin değerlerinin normal sınırlarda olması idrar protein elektrozofrezinin böbrek bozukluklarının erken tanısında kullanılabilir olması ile (2) açıklanabilir. Rutin klinik laboratuvar testlerinin ağır metal alımının erken böbrek etkilerinin belirlenmesinde duyarsız oldukları bildirilmiştir. Kurşun alımındaki 6 yetişkin üzerinde böbrek glomeruler ve tubuler fonksiyonları detaylı araştırılmış ve tüm bireylerde böbrek hasarına rağmen, serum üre ve kreatinin yoğunluklarının normal sınırları içinde buldukları saptanmıştır (17).

İdrarın 36 kDa'lık protein bandında rastlanan en büyük artış denemenin 2. ayında 1000 ppm kurşun alan farelere ait idrar örneklerinde ortaya çıkmıştır. Artış, kontrollerin yaklaşık 6 katı olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Farklılık, alınan kurşun miktarı ve süresi ile ilişkili olarak nefrotoksik etki derecesinin de farklı oluşu ile (25) açıklanabilir.

Doza bağlı olarak 36 kDa idrar protein bandında artış farkı 2. ve 4. aylarda gözlenmiş, 3. ayda belirgin bir fark bulunamamıştır. İki ay 250 ppm kurşun alan grupta 36 kDa idrar proteinini kontrollerin 2.82 katı iken 1000 ppm alan grupta 6.22 kat olarak hesaplanmıştır. Dört ay 250 ppm kurşun alan grupta kontrollerin 3.98 katı ve 1000 ppm kurşun alan grupta 4.67 katı olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Bu sonuca göre, alınan kurşun miktarına paralel olarak idrarda 36 kDa protein fraksiyonunda artış olduğu ve proteinin muhtemelen idrarla kurşun uzaklaştırılmasında kolloid görevi üstlendiği düşünülebilir.

Sonuç olarak, içme suyu ile kronik kurşun alımının, farelerde böbrek ve sinir dokuları üzerine zehir etkisi gösterdiği, klinik olarak davranış bozuklukları ve titremeler ile, biyokimyasal olarak da serum CPK, MAO, ChE, üre, kreatinin artışı, idrarla düşük molekül ağırlıklı protein uzaklaştırılması (tubuler proteinüri) şeklinde kendini gösterdiği, davranış bozuklukları ile titremelerin serum MAO artışı ile ilişkili olduğu; serum CPK ve 36 kDa idrar protein bandındaki artışlarının kronik kurşun alımının klinik tanısında ve izlenmesinde gösterge olabilecekleri kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Altıntaş A (1990): *Mineral madde metabolizmasına bir bakış*. Tarımda Kayn. 1, 19-21.
2. Altıntaş A, Şahal M, Çelik S, Duru Ö, Öcal N (2000): *Serum ve idrar proteinlerinin elektroforetik analizi ve Veteriner Hekimlikteki önemi*. Turk J Vet Anim Sci. 25. (Baskıda).
3. Annino JS (1964): *Clinical Chemistry*. Little, Brown and Co. London.
4. Anonim (1993): *Instructions SE 250-Mighty Small II Slab Gel Electrophoresis Unit*. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco.
5. Bernard S (1985): *Biochimie Clinique. Instruments et Techniques de Laboratoire Diagnostique Medico-Chirurgicales*. Maloine, Paris.
6. Bilgili A, Şanlı Y (1997): *Stıgırlarda kurşunun sebep olduğu zehirlenme*. Etlik Mikrobiol Derg. 9, 22-30.
7. Chia KS, Jeyaratnam J, Lee J, Tan C, Ong HY, Ong CN, Lee E (1995): *Lead-induced nephropathy: relationship between various biological exposure indices and early markers of nephrotoxicity*. Amer J Ind Med. 27, 883-895.
8. Cutler MG (1977): *Effects of exposure to lead on social behaviour in the laboratory mouse*. Psychopharmacol. 52, 279-282.
9. Deberdt P, Darnis L, Ramisse J, Lepareur F (1987): *Lead poisoning in cattle*. Point Vet. 19, 249-252.
10. Donald JM, Cutler MG, Moore MR (1987): *Effects of lead in the laboratory mouse. Development and social behaviour after lifelong exposure to 12 µM lead in drinking fluid*. Neuropharmacol. 26, 391-399.
11. Donald JM, Cutler MG, Moore MR, Bradley M (1981): *Development and social behaviour in mice after prenatal and postnatal administration of low levels of lead acetate*. Neuropharmacol. 20, 1097-1104.
12. Donald JM, Cutler MG, Moore MR, Bradley M (1986): *Effects of lead in laboratory mouse. 2. Development and social behaviour after lifelong administration of a low dose of lead acetate in drinking fluid*. Neuropharmacol. 25, 151-160.
13. Egle P, Shelton KR (1986): *Chronic lead intoxication causes a brain specific nuclear protein to accumulate in the nuclei of cells lining kidney tubules*. J Biol Chem. 261, 2294-2298.
14. Ellenhorn MJ (1997): *Ellenhorn's Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. 2nd ed. Ellenhorn Seth Schonwald Gary Ordog. Jonathan Wasserbergen.
15. Fowler BA (1993): *Mechanisms of kidney cell injury from metals*. Environ Health Perspect. 100, 57-63.
16. Goridis C, Neff NH (1971): *Monoamine oxidase in sympathetic nerves. A transmitter specific enzyme type*. Br J Pharmacol. 43, 814-818.
17. Hong Cd, Hanenson IB, Lerner S, Hammond PB, Pesce AJ, Pollak VE (1980): *Occupational exposure to lead: effects on renal function*. Kidney Int. 18, 489-494.
18. Jarott B (1971): *Occurrence and properties of monoamine oxidase in adrenergic neurons*. J Neurochem. 18, 7-16.
19. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (1997): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Fifth ed., XIII+932. Academic Press Inc, California.
20. Kanitz MH, Witzmann FA, Zhu H, Fultz CD, Skaggs S, Moorman WJ, Savage RE Jr (1999): *Alteration in rabbit kidney protein expression following lead exposure as*

- analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. **20**, 2977-2985.
21. **Kaya S, Yavuz H** (1989): *Siğirtalarda akut kurşun zehirlenmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. **36**, 745-749.
 22. **Kwatra MS, Gill BS, Singh R, Singh M** (1986): *Lead toxicosis in buffaloes and cattle in Punjab*. Indian J Anim Sci. **56**, 412-413.
 23. **Long C** (1961): *Biochemists' Handbook*. E and FN Spon Ltd, London.
 24. **Ma T, Chen HH, Ho IK** (1999): *Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats*. Toxicol Lett. **105**, 111-121.
 25. **Madden EF, Fowler BA** (2000): *Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review*. Drug Chem Toxicol. **23**, 1-12.
 26. **Mandel P, Vincendon G** (1977): *Neurologie et Psychiatrie*. 441-468. In: P Boulanger, J Polonovski, F Tayeau, P Mandel, G Biserte (Eds). Biochimie Médicale. Fascicule IV. Biochimie Patologique. Masson, Paris.
 27. **Matsuzawa T, Nomura M, Unno T** (1993): *Clinical pathology reference ranges of laboratory animals*. J Vet Med Sci. **55**, 351-362.
 28. **Mc Ewen CM Jr, Cohen JD** (1963): *An amine oxidase in normal human serum*. J Lab Clin Med. **62**, 766-770.
 29. **Natelson S** (1961): *Microtechniques of Clinical Chemistry*. 2nded. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Illinois.
 30. **Robinson DS, Nies A, Davis JN, Bunney WE, Davis J** (1972): *Ageing, monoamines and monoamin-oxidase levels*. Lancet. **5**, 290-291.
 31. SPSS (-) Version 7.5 Bilgisayar istatistik programı.
 32. **Struzynska L, Walski M, Gadamski R, Dabrowska-Bouta B, Rafalowska U** (1997): *Lead-induced abnormalities in blood-brain barrier permeability in experimental chronic toxicity*. Mol Chem Neuropathol. **3**, 207-224.
 33. **US EPA** (1986): *Air Quality Criteria for Lead*. Washington DC. Environmental Protection Agency (EPA 600/8-83/028aF-dF).
 34. **Van Der Veen NG, Vreman K** (1986): *Transfer of cadmium, lead, mercury and arsenic from feed into various organs and tissues of fattening lambs*. Netherlands J Agr Sci. **34**, 145-153.
 35. **Vyskocil A, Semecky V, Fiala Z, Cizkova M, Viau C** (1995): *Renal alterations in female rats following subchronic lead exposure*. J Appl Toxicol. **15**, 257-262.
 36. **Waynforth HB** (1980): *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. Academic Press, London.
 37. **White WL, Erickson MM, Stevens SC** (1976): *Chemistry for the Clinical Laboratory*. 4th ed. IX+756. The Mosby Comp. Saint Louis.
 38. **WHO** (1977): *Environmental Health Criteria 3. Lead*. Geneva.
 39. **WHO (IPCS)** (1995): *Environmental Health Criteria 165. Inorganic Lead*. Geneva.
 40. **Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Korn-guth SE, Siegel FL** (1999): *Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure*. Electrophoresis. **20**, 943-951.
 41. **Yarsan E, Özdemir M, Turhan E** (1996): *Siğirtalarda kurşunla akut zehirlenme olgusu*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. **43**, 277-279.
 42. **Youdim, MBH** (1975): *Monoamin deaminating systems in mammalian tissues*. Physiol Pharmacol Biochem. **12**, 169-209.

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Arif Altıntaş
 AÜ Veteriner Fakültesi
 Biyokimya Anabilim Dalı
 06110, Ankara
 E-Mail: altintas@veterinary.ankara.edu.tr