DİETLE ALINAN KURŞUNUN ERİTROSİT OSMOTİK DİRENÇ VE KAN VİSKOZİTESİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Derviş ÖZÇELİK, Selmin TOPLAN, Nuran DARIYERLİ, Tevfik GÜLYAŞAR, Şefik DURSUN

Background.- In this study, the effect of lead concentration on blood viscosity and erythrocyte osmotic resistance were tried to be investigated in rats.

Design.- Fourteen Wistar-Albino type female rats were picked and animals were divided into two as control and experimental groups. Nutrition's type and content of both groups was same. But lead acetate was added to the drinking water of experimental group for four weeks. At the end of fourth week, blood samples were drawn from abdominal aorta of rats. Blood viscosity and erythrocyte osmotic fragility were determined.

Results.- While increase in blood lead concentration values of experimental group was detected, the osmotic resistance and blood viscosity values were found to be decreased according to the same parameters of control group.

Conclusion.- Our study indicated that the intake of lead through the drinking water leads to reduce of blood viscosity and osmotic resistance of erythrocytes.

Özçelik D, Toplan S, Darıyerli N, Gülyaşar T, Dursun Ş. The effect of lead concentration on blood viscosity and erythrocyte osmotic resistance. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 129-133.

* *Anahtar Kelimeler:* Osmotik direnç, Viskozite, Kurşun; *Key Words:* Osmotic resistance, Viscosity, Lead; *Alındığı Tarih:* 14 Temmuz 1999; Dr. Derviş Özçelik, Doç. Dr. Selmin Toplan, Msc.Tevfik Gülyaşar, Prof. Dr. Şefik Dursun: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Biyofizik Anabilim Dalı; Doç. Dr. Nuran Darıyerli: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Fizyoloji Anabilim Dalı; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. D. Özçelik, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.
http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2000v31/s3/003a1.htm

Önemli çevre kirleticileri olmaları nedeniyle ağır metal ve metal bileşiklerinin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri son yıllarda giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Çeşitli yollarla alınan kurşun, kanda yeterli bir düzeye ulaştıktan sonra çeşitli organ ve dokularda birikmeye daha sonrada atılmaya başlar. Kan dolaşımına katılan kurşunun %85 ile %90'ı eritrositlere bağlı halde, geri kalanı da kan plazmasındaki proteinlerle birleşmiş olarak bulunur.[1]

Doğada yaygın olarak bulunan ve de endüstride fazlaca tüketilen kurşun, insan ve hayvanlarda zehirlenme kaynağı oluşturan metallerin başında yer alır. Genellikle kolay çözünen kurşun bileşiklerinin toksisitesi daha yüksektir. Buna göre kurşun nitrat, kurşun klörür, kurşun asetat, kurşun oksit, kurşun sülfür ve kurşun fosfat bileşiklerinin toksik etkileri çoktan aza doğru sıralanabilir. Bir defada verilince akut kurşun zehirlenmesi doğuran dozlar, küçük dozlara bölünerek verildiğinde de aynı hayvan türünde kronik zehirlenmeye neden olabilmektedir.

Kurşun toksisitesi tümüyle moleküler ve hücresel düzeyde meydana gelir. Değişik enzim sistemleri üzerinde etkili olur. Kurşun, proteinin sülfidril (-SH) grubuna bağlanarak veya diğer metal iyonları ile yer değiştirerek bazı enzimlerin aktivitesini azaltır. Özellikle ferrokelataz enziminin normal fonksiyonunu bozar. Kurşunun en belirgin etkisi kendini hematopoesis ve hem biyosentezinde gösterir.[2] Kurşun zehirlenmesinin ilk belirtisi olan aneminin nedeni, eritrosit yaşam süresinin normale göre kısalmış olması ve hem sentezindeki bozukluklardır. Bunlara ek olarak, eritrosit Na-K ATPaz enzim etkinliğinin azaldığı görülür. Sodyum pompasındaki etkinlik azalması, eritrosit zarlarının bütünlüğünü koruyamamasına yol açar, dolayısıyla eritrosit yaşam süresi kısalır.[3-5] Kanda hücrelerin (Eritrosit, Trombosit, Lökosit) miktarlarında oluşan

değişiklikler kanın tabakaları arasındaki sürtünmede de değişikliklere neden olur ve bu sürtünmede viskoziteyi belirler.

Bu nedenle çalışmamızda toksik metal olan kurşuna maruz bırakılan sıçanların kan viskozitesindeki değişiklikleri ve eritrositlerin osmotik direncine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmamızda Wistar-Albino türü 14 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol (n=7) ve kurşuna maruz bırakılan (n=7) olmak üzere iki gruba ayrıldı. İki grup aynı tür katı yem ile beslendi. Kontrol grubuna normal şehir şebeke suyu verilirken deney grubunun içme suyuna içerisinde 20ppm kurşun olacak şekilde kurşun asetat katılarak verildi. Dört hafta süren denemenin sonunda anestezi altında abdominal aortadan alınan kan örneklerinde hemositometrik yöntemle kan sayımları (eritrosit, hematokrit), rotasyonel viskozimetre (Wells-Brookfield) ile kan viskoziteleri tayin edildi.[6] Viskozite ölçümü 37°C'de 10rpm rotasyonel hızda, $75s^{-1}$'lik kayma hızında tayin edildi. Osmotik direnç tayini, alınan heparinize kan örneklerinde Suess ve ark.'nın yöntemine göre yapıldı.[7] pH'sı 7.2 olan fosfat tamponlu %1'lik NaCl stok çözeltisi hazırlandı. Ölçüm için %0.20 - %0.72 arasında değişen 14 farklı osmotik değerde tuz çözeltileri hazırlanarak standart deney tüplerine konuldu. Her tüpe 20µl kan örneği ilave edildi.Tüpler ters yüz edilerek hafifce karıştırıldı. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra yirmi dakika süre ile 2000rpm'de santrifüj edildi. Her örneğin süpernatındaki hemoglobin konsantrasyonu tayin edildi. Saptanan değerlerden standart hemoliz ve hemolitik inkrement eğrileri çizildi. Bu eğrilerden eritrositlerin osmotik direnç sınırları değerlendirildi. Ayrıca alevli atomik absorbsiyon spektrometresi [Shimadzu (AA-680)] ile kan kurşun konsantrasyonları tayin edildi.[8] Kontrol ve deney gruplarına ait tüm verilerin istatistiksel değerlendirmeleri "Student's -t" testi ile yapıldı.

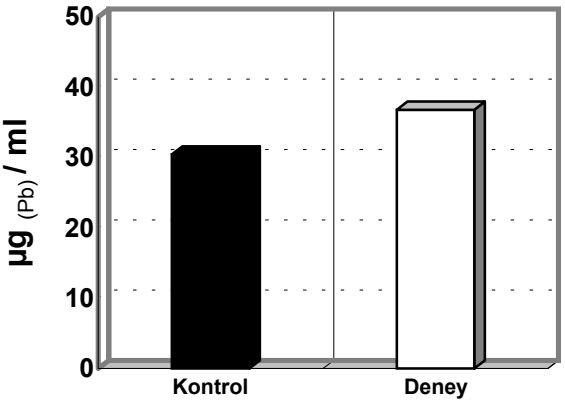
BULGULAR

Çalışmamızda kontrol ve kurşun asetat katkılı su verilen deney gruplarında kan kurşun konsantrasyonları sırası ile 30.44± 9.27 µg/ml ve 36.8±5.72 µg/ml olarak ölçülmüştür. Deney grubunda kan kurşun konsantrasyonunun artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$) (Şekil 1). Deney ve kontrol grubu kan örneklerinde eritrosit sayıları sırası ile 4.93±1.0 ile 7.37±0.19 milyon/mm^3 olarak saptandı. Ayrıca hematokrit (%Hct) değerleri deney grubunda 43±3.67, kontrol grubunda 48.25±0.96 olarak tayin edildi. Deney grubunun eritrosit sayısı ve %Hct değerlerinin kontrollerinkine göre anlamlı olarak azaldığı gözlendi (Tablo I). Kan viskozite değerleri kontrol grubunda 6.43±0.36m PaS, deney grubunda 5.72± 0.27m PaS olarak saptanmıştır (Şekil 2). Osmotik di-

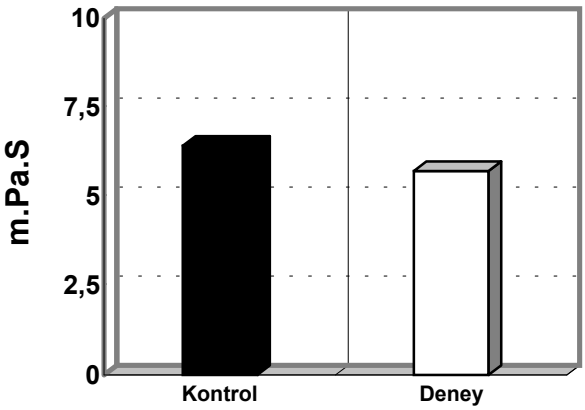
Tablo I. Kurşun Katkılı Su Verilen Deney Grubu ile Kontrol Grubunun Kanlarında Ölçülen Parametrelerin Ortalama (M) ve Standart Sapma (SD) Değerleri

Ölçülen Parametre	Kontrol Grubu (M±SD)	Deney Grubu (M±SD)
Kan Kurşun kons.(µg/ml)	30.44 ±9.27	36.8 ± 5.72*
Max. O. D. (% NaCl)	0.32 ± 0.02	0.52 ± 0.05***
Min. O.D. (% NaCl)	0.52 ± 0.02	0.64 ± 0.05***
% Hemoliz Farkı	0.40 ± 0.02	0.60 ± 0.05***
Hematokrit(% Hct)	48.25± 0.96	43.0± 3.67*
Eritrosit sayısı (mil/mm^3)	7.37±0.19	4.93±1.01**
Vizkozite.(m.Pa.s) (10rpm)	6.43 ±0.36	5.72 ±0.27*

*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$; O.D.: Osmotik direnç



Şekil 1. Kontrol grubu ve deney grubunun kan kurşun konsantrasyonlarının karşılaştırılması

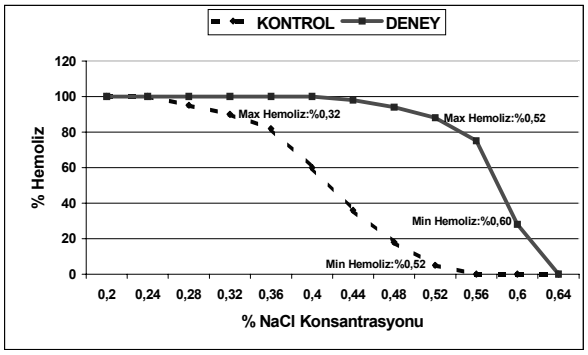


Şekil 2. Kontrol ve deney grubu kan viskozite değerlerinin karşılaştırılması.

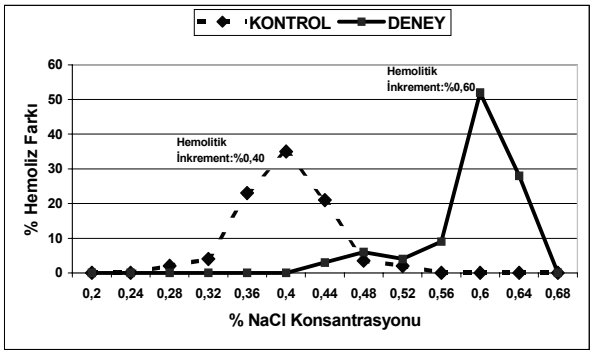
renç sınırları kontrol grubunda maksimal osmotik direnç sınırı %0.32±0.02 NaCl, minimal osmotik direnç sınırı %0,52±0.01 NaCl konsantrasyonlarında, % hemoliz farkı ise %40 NaCl konsantrasyonlarında saptanmıştır. Deney grubunda maksimal osmotik direnç sınırı %0.52±0.05 minimal osmotik direnç sınırı %64±0.05, % hemoliz farkı %0.60±0.05 NaCl konsantrasyonlarında bulunmuştur (Şekil 3,4). Yapılan istatistiksel değerlendirmede eritrositlerin osmotik dirençlerinin deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde kan viskozite değerleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo I).

TARTIŞMA

Araştırmamızda kurşun asetat katkılı yemle beslenen deney grubu sıçanların kan kurşun konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Kandaki kurşun konsantrasyonu verilen kurşun miktarı ve verilme süresine bağlı olarak değişiklik gösterir.[9,10] Kurşun eritrositlerin yaşam süresini kısaltmakta ve hem sentezini bozmaktadır. Ayrıca koproporfirinojen dekarboksilazı da inhibe eder. Yine kurşun demirin protoporfirin IX'a bağlanmasını kuvvetle bloke eder ve hipokrom anemi ile eritrosit deformasyonlarına yol açar.[2,11] Bu bilgiler çalışmamızdaki eritrosit sayısındaki azalmayı açıklayıcı yöndedir. Yine kurşun eritrositlere bağlandığında membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Glikolizi inhibe ederek eritrositlerde ATP seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca eritrosit membranlarının Na^+-K^+ ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir.[12,13] Kurşuna maruz kalan eritrositlerin rigid bir form kazandığı, eritrositlerin sferosit bir form oluşturduğu bildirilmektedir.[14,15] Ayrıca eritrositlerin agregasyon özelliğinde



Şekil 3. Standart hemoliz eğrisi



Şekil 4. Hemolitik inkrement eğrisi

azalma söz konusudur, bu rigid hücreler kolaylıkla tekrar bir araya gelemezler. Çalışmamızda kurşuna maruz kalan gruptaki viskozite azalmasının bu oluşumlardan olduğu düşünülmektedir. Bulgularımızda kurşuna maruz kalan sıçanların kan viskozitelerinin kontrollere göre azalması eritrosit sayısında azalma ve % Hct değerlerinin düşmesiyle de açıklanabilmektedir. Araştırmamızda kurşuna maruz bırakılan sıçanlarda kurşunun eritrosit membranı üzerine etkisini araştırmak için yaptığımız osmotik direnç ölçümleri sonunda, kurşunun eritrositlerin osmotik dirençlerini büyük oranda düşürdüğü görülmüştür. Çalışmamızda deney grubunda osmotik frajilite normale göre oldukça yüksek bulunmuştur. Hipotonik NaCl çözeltilerinde min osmotik direnç sınırı %0.64±0.05 NaCl, max osmotik direnç sınırı %0.52 ± 0.05 NaCl olarak bulunmuştur. Maksimal hemolizin erken olması kurşunun eritrositin osmotik direncini büyük oranda düşürdüğünü göstermektedir. Hemolitik inkrementinde % 0.60 ± 0.05 NaCl konsantrasyonunda büyük bir pik yapması da bunu doğrulamaktadır. Normalde % hemoliz farkı, en yüksek düzeyde %0.40 NaCl çözeltisinde bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda, kurşunun eritrositlerin normal şeklini bozarak sferositoz oluşturduğu ve sferosit formdaki eritrositlerin daha rigid olduğu gösterilmiştir.[14-16] Kurşun Na^+ ATPaz aktivitesini bozduğu için hücre içerisine sodyum girişi fazla olmakta ve hücrenin osmotik basıncını yükseltmektedir. Ayrıca kurşun ATP düzeyini düşürdüğü için sodyumu dışarı atacak enerji sağlanamamaktadır. Bu nedenle eritrositlere giren su molekülleri hücrelerde osmotik hemolize neden olmaktadır. Osmotik direnç ile ilgili bulgularımız osmotik hemolizi destekler yöndedir.

ÖZET

Bu çalışmamızda diet ile alınan kuşunun kan viskozitesi ve eritrosit osmotik direnci üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 14 Wistar Albino türü dişi sıçan kontrol ve deney grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Deney süresince her iki grup aynı tür katı yem ile beslenirken deney grubu sıçanlarının içme suyuna kurşun asetat katıldı. Dört hafta süren deney sonunda abdominal aortadan alınan kan örneklerinde kan kurşun konsantrasyonları ölçümü, kan viskozitesi ve osmotik direnç tayini yapıldı.

Deney grubu sıçanlarda kan kurşun konsantrasyonlarının kontrollere göre arttığı, maksimal ve minimal osmotik dirençte anlamlı azalma olduğu ve kan viskozitesi değerlerinin kontrol değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı saptandı.

Bulgularımız içecek ile alınan kurşunun eritrositlerin osmotik direncini azalttığını, olasılıkla sferosit yapı oluşumu ile osmotik frajilite de artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca kurşunun kan viskozitesini de azaltıdığı ve kan kurşun konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sanlı Y, Kaya S, Prinçci İ, Yavuz H, Baydan E, Demet Ö, Bilgili A. Veteriner Klinik Toksikoloji (Kaya S. Ed.), Medisan Yayınevi, 1995; 72-90.
2. Masci O, Carelli G, Vinci F, Castellino N. Blood lead concentration and biological effects in workers exposed to very low lead levels. J Occup Environ Med 1998; 40: 886-894.
3. Heard MJ, Chamberlain AC. Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. Human Toxicol 1982; 1: 411-415.
4. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization. Genava, 1996; 123-141.
5. Air Quality Guidelines For Europe. Who Regional Publication, European Series No. 23, 1987.
6. Wells RE, Denton R, Merrill EW. Measurement of viscosity of biologic fluids by cone-plate viscometer. J Lab Clin Med 1961; 57: 646-656.
7. Suess J, Limenton D, Dameshek W, Dolloft JMA. Quantitative method for the determination and charting of erythrocyte hypotonic frajility. Blood 1954; 3: 1250-1303.
8. Taylor A, Brown A. Simple and rapid procedure

for the determination of lead whole blood by use of a slotted tube and discrete nebulisation flame atomic-absorption spectrometry. Analyst 1983; 7: 1159-1161.

9. Humphereys DJ. Effects of exposure to excessive quantities of lead on animals. Br Veterinary J 1991; 147: 18-30.
10. Roberts RD, Johnson MS, Hutton M. Lead contamination of small mammals from abandoned metalliferus mines. Environ Pollut 1978; 15: 61-69.
11. Zimmermann L, Pages N, Antebi H, Hafi A, Boudene C, Alcindor LG. Lead effect on oxidation resistance of erythrocyte membrane in rat triton-induced hyperlipidemia. Biol Trace Elem Res Sep 1993; 38: 311-318.
12. Grabowska M, Guminska M. The effect of lead on lactate formation, ATP level and membrane AT-Pase activities in human erythrocytes in vitro. Int J Occup Med Environ Health 1996; 9: 265-274.
13. Jehan ZS, Motlag DB. Metal induced changes in the erythrocyte membrane of rats. Toxicol Lett 1995; 78: 127-133.
14. Osterode W. Hemorheology in occupational lead exposure. Scand J Work Environ Health 1996; 22: 369-373.
15. Skerfving S, Gerhardsson L, Schütz A, Strömberg U. Lead- biological monitoring of exposure and effects. J Trace Elem Exp Med 1998; 11: 289-301.
16. La Celle PL. Effect of sphering on erythrocyte deformobility. Biorheol 1972; 9: 51-59.