

İçme Sularında Yüksek Nitrat Bulunan Akkaraman Koyunlarda Serum Seruloplazmin, Paraoksanaz ve Nitrik Oksit Düzeyleri ^[1]

Farnoud NASIRI ¹ ✍
Görkem KISMALI ¹

Volkan GÜNEŞ ¹
Berrin SALMANOĞLU ¹

Öğünç MERAL ¹ Mert PEKCAN ¹
Tevhide SEL ¹

^[1] 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi (25-27 Haziran 2013, Kars)'inde poster bildiri olarak sunulmuştur

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, TR-06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-9919

Özet

Nevşehir/Hacıbektaş ilçesinde kuyulardan alınan su örneklerinde, Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinde analizi neticesinde, sulara normalin üstünde nitrat olduğu anlaşılmıştır. İzleme çalışmaları kapsamında Yalnızagıl mevkiindeki 3 kuyudan alınan su numunelerinde 69.7 mg/L, 56.8 mg/L ve 59.4 mg/L oranlarında nitrata rastlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, içme sularında yüksek düzeyde nitrat bulunan Akkaraman koyunlarında serum seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit düzeylerindeki değişimleri araştırmaktır. Çalışmada bölgedeki Akkaraman koyunları materyal olarak kullanılmıştır. İçme sularında yüksek oranda nitrat bulunan koyunlardan kan örnekleri alınarak serum seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit düzeyleri analiz edilmiştir. Serum seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Serum seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit düzeyleri kontrol ve çalışma gruplarında sırasıyla 10.68±0.14 uM; 10.80±0.32 uM; 151.36±14.95 U/ml; 142.57±17.85 U/ml ve 2.01±0.30 U/ml; 0.99±0.11 U/ml bulunmuştur. Serum seruloplazmin düzeyleri çalışma grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Serum paraoksanaz ve nitrik oksit düzeyleri gruplar arasında istatistiksel önemli farklılık göstermemekle birlikte serum paraoksanaz düzeyleri çalışma grubunda daha düşük düzeylerde ölçülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, Akkaraman koyunlarda nitratin olumsuz etkilerinin mevcut konsantrasyonlarda meydana geldiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Seruloplazmin, Paraoksanaz, Nitrik oksit, Akkaraman, Nitrat

Serum Ceruloplasmin, Paraoxanase and Nitric Oxide Levels in Akkaraman Sheep with High Nitrate in Drinking Water

Summary

The data obtained by Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha center, in the scope of the routine monitoring works carried out at Nevşehir/Hacıbektaş regions' wells were found high nitrate content. Nitrate values of three well water sampling points in the province of Yalnızagıl obtained from the monitoring works 69.7 mg/L, 56.8 mg/L and 59.4 mg/L nitrate ratios were found. The purpose of this study is to investigate the changes of serum ceruloplasmin, paraoxanase and nitric oxide levels in Akkaraman sheep with high nitrate in drinking water. In this study, Akkaraman sheep which is the animal population of region were used as material. The blood samples collected from Akkaraman sheep were analyzed in terms of ceruloplasmin, paraoxanase and nitric oxide levels by spectrophotometry. Serum ceruloplasmin, paraoxanase and nitric oxide levels was found, 10.68±0.14 uM; 10.80±0.32 uM; 151.36±14.95 U/ml, 142.57±17.85 U/ml and 2.01±0.30 U/ml, 0.99±0.11 U/ml by means of control and study groups respectively. Statistically, Serum ceruloplasmin levels were significantly lower in the study group compared with control group. In addition, although paraoxanase and nitric oxide levels in serum were not show significant differences between groups, measurements reveal that paraoxanase levels were lower in study groups. These results suggest that adverse effects of nitrates on Akkaraman sheep occur at concentrations present in the fields.

Keywords: Ceruloplasmin, Paraoxanase, Nitric oxide, Akkaraman, Nitrate

GİRİŞ

Sularda yüksek düzeyde nitrat bulunması hem hayvan hem de insan sağlığı açısından problem oluşturmaktadır ^[1-4].

Sularda artan nitrat konsantrasyonu çevre ve sağlık problemlerine neden olduğundan Avrupa Birliği Komis-



İletişim (Correspondence)



+90 312 3170315/4425



farnoud_nasiri@hotmail.com

yonu 1991 yılında nitrat direktif uygulamalarını kabul etmiştir. Sularda 50 mg/l nitrat konsantrasyonu veya 10 mg/L nitrat-N nitrat kirliliği olarak kabul edilmektedir [5]. Hacibektaş ilçesinin su ihtiyacının karşılandığı kuyulardan alınan su örneklerinin, Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinde analizi neticesinde, sularda normalin üstünde nitrat olduğu anlaşılmıştır. İlçenin su ihtiyacının karşılayan ve 15 kilometre uzaklıkta bulunan Yalnızcağıl mevkiindeki kuyulardan alınan su numunelerinde 69.7 mg/L, 56.8 mg/L ve 59.4 mg/L oranlarında nitrata rastlanması üzerine bu kuyulardan şebekeye su verilmesi durdurulmuştur [6].

Seruloplazmin bir α -2 glikoprotein olup karbonhidrat içeriğini sialik asit oluşturur [7]. Seruloplazmin; plazmada bakır taşınmasında görevli temel protein olup toksik ferro demirin, toksik olmayan ferri demire oksitlenmesini sağlar. Aynı zamanda demirle ilişkili serbest radikal yaralanmalardan dokuları korur ve daha başka antioksidatif ve sitoprotektif aktivitelerde de görev alır [8].

Paraoksonaz (PON1), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, glikoprotein yapısında olan kalsiyum bağımlı bir ester hidrolazdır [9]. PON1'in, LDL'nin hücre kaynaklı oksidasyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir [10]. PON1'in bu antioksidan kapasitesinden 284. pozisyonundaki serbest sisteinin sorumlu olduğu bildirilmiştir [11].

Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Antioksidan ve antienflamatuvar etkileri yanında bir çok düzenleyici role de sahip olan NO'nin, yüksek yoğunlukta bulunduğu durumlarda, DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna sebep olmak, antioksidanları tüketmek, enzim inhibisyonu yapmak ve bir çok toksik etkene duyarlılığı arttırmak gibi zararlı etkileri de mevcuttur. Düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olan NO, stabil ürünleri olan nitrit ve nitrata okside olur [12].

Bu çalışmanın amacı, içme sularında yüksek düzeyde nitrat bulunan Akkaraman koyunlarında serum seruloplazmin paraoksonaz ve nitrik oksit düzeylerindeki değişimleri araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'ndan Etik Kurul Kararı (Karar no: 2012-4-15) esaslarına uygun olarak yürütülmüştür.

Çalışmada, belediyenin veteriner hizmetleri kapsamında Hacibektaş yöresinde yüksek nitrat tesbit edilen kaynak sularını içme suyu olarak kullanan 30 adet Akkaraman koyunundan kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak belediyenin veteriner hizmetleri kapsamında yaptığı analiz-

lerde, sularında nitrat düzeyi düşük olarak tesbit edilen, aynı bölgedeki farklı köyden 10 adet sağlıklı Akkaraman koyundan kan alındı. Kan örnekleri, en kısa zamanda laboratuvara getirilerek 10 dak. 2.500 devirde santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Elde edilen serum örnekleri, seruloplazmin, paraoksonaz ve nitrik oksit analizlerinde kullanıldı.

Örneklerin Analizi

Seruloplazmin düzeyleri Ceron ve Suibela-Martinez tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü [13]. pH 5.2 ve 37°C koşullarında asetat tamponunda hazırlanan P-fenilen diammin diklorid (PPD) serum örnekleri ile oluşan renkli ürünün absorbansı spektrometrede 550 nm'de okunarak serum seruloplazmin ölçümleri incelendi [14].

Paraoksonaz aktivitesi Armstrong tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü [15]. Bu yöntemle, 1 mM CaCl₂ ve 4 mM paraokson ihtiva eden 50 mM glisin; pH 10.5 tamponu kullanılarak paraoksonazın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün 412 nm'deki optik dansiteleri ölçülerek, paraoksonaz aktiviteleri incelendi.

Nitrik-oksit konsantrasyonu Gilliam ve ark.[16] tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü.

Toplam nitrit, her bir örneğin 550 nm'de optik yoğunluğunun okunmasıyla değerlendirildi. Nitrik oksit konsantrasyonu, bir potasyum nitrat standart eğrisiyle (0 ile 80 μ M arasında) karşılaştırma yapılarak belirlendi [16].

İstatistiksel Analiz

Gruplar arası farklılık bağımsız gruplarda t testi kullanılarak incelenmiştir [17]. Elde edilen veriler aritmetik ortalama ve standart hata şeklinde verilmiştir. İstatistiksel olarak önemlilik $P < 0.05$ şeklinde ifade edilmiştir.

BULGULAR

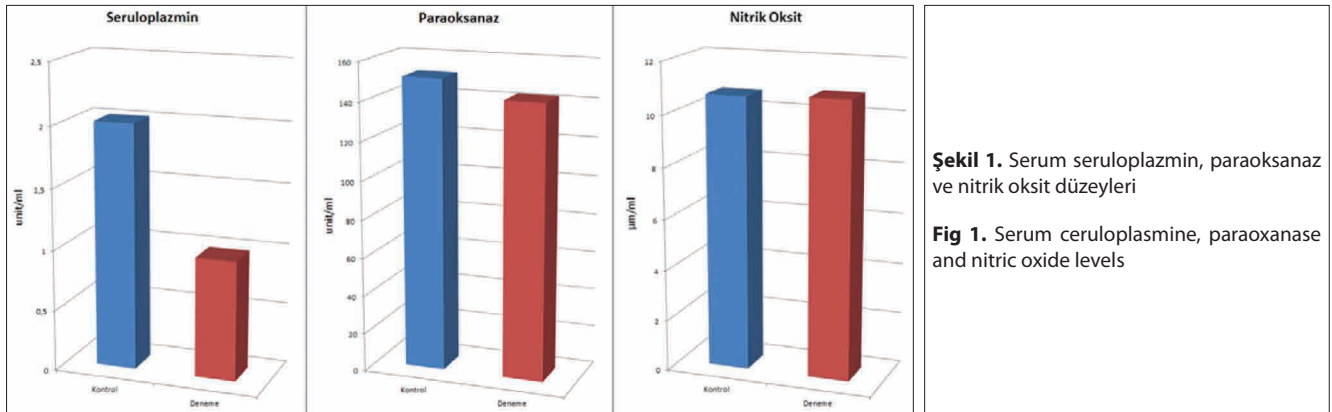
Serum seruloplazmin, paraoksonaz ve nitrik oksit düzeylerine ait sonuçlar *Tablo 1* ve *Şekil 1*'de gösterilmiştir.

Serum seruloplazmin düzeyleri, deneme grubunda 0.99 ± 0.11 U/ml; kontrol grubunda 2.01 ± 0.30 U/ml olarak tespit edilmiş (*Tablo 1, Şekil 1b*) ve gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). Serum paraoksonaz düzeyleri ise, deneme grubunda 142.57 ± 17.85 U/ml; kontrol grubunda 151.36 ± 14.95 U/ml olarak tesbit edilmiştir (*Tablo 1, Şekil 1c*). Deneme grubu paraoksonaz düzeyleri kontrole göre düşük olmakla birlikte, gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Serum nitrik oksit düzeyleri, deneme grubunda 10.80 ± 0.32 μ mol/ml, kontrol grubunda 10.68 ± 0.14 μ mol/ml olarak tesbit edilmiştir (*Tablo 1, Şekil 1a*). Gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Tablo 1. Kontrol ve çalışma grubu Akkaraman koyunlarına ait serum seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit düzeyleri**Table 1.** Serum ceruloplasmine, paraoxanase and nitric oxide levels of control and study group Akkaraman sheeps

Ölçülen Parametre	Kontrol Grubu		Deneme Grubu		P
	n	X±Standard Hata	n	X±Standard Hata	
Seroplazmin (U/ml)	10	2.01±0.30	28	0.99±0.11	P<0.001
Paraoksanaz (U/ml)	10	151.36±14.95	28	142.57±17.85	P>0.05
Nitrik mg/mlasit	10	10.68±0.14	30	10.80±0.32	P>0.05



TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyadaki yeraltı sularının en yaygın kimyasal kirlenici nitratıdır. Nitrat, genotoksik bileşiklerin bir sınıfı olan aynı zamanda hayvanlarda karsinogen etkili N-nitrozo bileşiklerin oluşumunda bir ön maddedir [18]. Nitrat, çiftlik hayvanlarında toksik etki göstermemekle birlikte, alınan nitrat rumen bakterilerince nitrite dönüştürülmektedir. Nitrit ise yüksek düzeyde toksik etkiye sahiptir ve daha ileri okside olarak amonyağa dönüşür. Yüksek düzeyde nitrat alımı sonucu kanda toksik düzeyde nitrit birikimi oluşur. Bunun sonucunda, hemoglobinin yapısında yer alan demir iyonu ferröz (Fe^{+2}) formdan ferrik (Fe^{+3}) forma dönüşür ve methemoglobin oluşur. Hemoglobindeki demirin Fe^{+3} şekli eritrositlerin oksijen taşıma kapasitesini düşürür. Nitrat toksitesinin belirtileri hemoglobinin %20'sinin methemoglobine dönüştüğünde görülür. Rumende oluşan nitritin kan dolaşımına transferinde, alınan nitrat miktarı, yemlerin sindirim hızı, nitratın nitrite dönüşüm hızı ve rumenden nitritin absorpsiyonuna bağlı değişim gösterir. Nitrat/nitrit toksikasyonunda maruz kalma süresi ve hızı yanında bireysel tolerans ve metabolizma kapasitesi de etkilidir [19]. Sularda artan nitrat konsantrasyonu, çevre ve sağlık problemlerine neden olduğundan, Avrupa Birliği Komisyonu 1991 yılında nitrat direktif uygulamalarını kabul etmiştir. Sularda 50 mg/L nitrat konsantrasyonu veya 10 mg/L nitrat-nitrojen, nitrat kirliliği olarak kabul edilmektedir. Nevşehir'in Hacıbektaş ilçesindeki kuyulardan alınan su örneklerinin, Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezindeki analizi neticesinde, sularda normalin üstünde nitrat olduğu anlaşılmıştır. İzleme çalışmaları kapsamında Yalnızgöl mevkiindeki 3 kuyudan alınan su numunelerinde 69.7 mg/L, 56.8 mg/L ve 59.4 mg/L oranlarında nitrate

rastlanmıştır. Çalışmada, içme sularında yüksek nitrat bulunan Hacıbektaş yöresi Akkaraman koyunların serum örneklerinde antioksidan etkili seruloplazmin, paraoksanaz ve nitrik oksit aktiviteleri belirlenerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Kontrol ve çalışma grubu Akkaraman koyunlarında serum nitrik oksit düzeyleri bakımından, gruplar arasında istatistiksel olarak fark önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Organizmada çok düşük yarı ömre sahip olan NO, stabil ürünleri olan nitrit ve nitrate okside olmaktadır [12]. Yüksek nitrat alımına bağlı serum nitrik oksit düzeylerinde beklenen artışın görülmemesi, yüksek nitrat alımına karşı koyunlarda fenotipik varyasyonların olduğu, bir çok karaciğer enziminin genetik ekspresyonunun nitrat toksikasyonuna farklı yanıtlar verdiği bildirilmektedir [20]. İçme sularına 100 mg/L, 250 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyonlarında nitrat katılan ratlarla yapılan çalışmada, 250 mg/L ve 500 mg/L düzeyindeki yüksek dozlarda nitrat içeren içme sularını tüketen ratlarda NO düzeyi nitrat konsantrasyonundaki artışa paralel artış göstermiştir. Fakat 100 mg/L nitrat içeren sulardan tüketen ratlarda NO düzeyi değişim göstermemiştir [21]. Ratlarla yapılan deneysel çalışmanın NO sonuçları çalışmamızla uyumlu görülmektedir. Hacı Bektaş yöresi kaynak sularında nitrat düzeyi 100 mg/L geçmediği ve koyunların serum NO düzeyinde de önemli bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Koyunlar, nitriti amonyağa dönüştürmede daha etkili olduklarından, sığırlara göre nitrit/nitrat zehirlenmesine daha az duyarlıdır [22].

Kontrol ve çalışma grubu Akkaraman koyunları serum seruloplazmin düzeylerinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.001$). Serum paraoksanaz düzeyleri ise, çalışma grubu paraoksanaz

düzeyleri kontrole göre düşük olmakla birlikte, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Nitrat/nitrit toksikasyonlarında antioksidan etkili moleküllerde azalma/enzimlerde inhibisyon bildirilmektedir. Yüksek reaktivitede peroksinitrit oluşumunun antioksidan enzimlerde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir^[23]. İçme sularına yüksek konsantrasyonlarda nitrat katılan ratlarla yapılan çalışmada, oksidatif stres oluşturularak lipid peroksidasyon belirteçi olan MDA düzeylerine bakılmıştır. Serum MDA düzeyinde bir değişim gözlenmezken karaciğer doku MDA düzeyinde artış gözlenmiştir. Yüksek dozlarda nitrat alınımının serum MDA düzeyini etkilememesi, kan plazmasındaki mevcut antioksidan sistemlerinin serum MDA düzeylerini düşürmede etkili olabilecekleri ileri sürülmüştür^[24]. Çalışmadaki antioksidan seruloplazmin ve paraoksanaz aktivitelerindeki düşüklük, içme sularındaki yüksek nitratın oluşturacağı oksidatif strese karşı kullanılmış olmalarından ileri gelebilir.

Sonuç olarak, Akkaraman koyunlarda nitratın olumsuz etkilerinin mevcut konsantrasyonlarda meydana geldiği düşünülmektedir.

Çiftlik hayvanlarında subakut ve kronik nitrat toksikasyonuna bağlı biyobelirteçlerin gelişimi için bir temel sağlaması açısından ve belirli sınırlarda nitrate maruz kalma ve ilgili sağlık etkileri değerlendirmek için daha kapsamlı ve kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Altıntaş A:** Buzağlarda bakarkörlük ve vitamin A yetersizliği. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42, 479-485, 1995.
- Altıntaş A, Maraşlı Ş, Varol HH:** Kapadokya bölgesindeki buzağlarda görülen amaurosis'de kanda vitamin A, Beta-karotin, T3 ve T4 düzeyleri. *Tr J Vet Anim Sci*, 19, 43-50, 1995.
- Bruning CS, Kaneene JB:** The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on animal health: A review. *Vet Human Toxicol*, 35 (3): 237-253, 1993.
- Bruning CS, Kaneene JB:** The effects of nitrate, nitrite and N-Nitroso compounds on human health: A review. *Vet Human Toxicol*, 35 (6): 521-538, 1993.
- Anonim:** Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. 6th ed., Communication Group-Publishing. Ottawa, Canada, 1996.
- Anonim:** Hacibektaş kuyu sularında yüksek nitrat bulundu. [http://www.hacibektas.com]. Erişim tarihi: 05.03.2012.
- Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E:** Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci*, 56 (21): 1749-58, 1995.
- Coşkun A, Şen İ:** Kedi ve köpek hastalıklarının teşhisinde akut faz proteinlerin önemi. *Vet Cerrahi Derg*, 11 (1-2-3-4): 56-59, 2005.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI:** Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 473-480, 2001.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN:** Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 286, 152-154, 1991.
- Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C:** Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1617-1624, 1998.
- Kılınç A, Kılınç K:** Nitrik oksit. Palme Yayıncılık, Ankara, 2003.
- Cerón JJ, Martínez-Subiela S:** An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res*, 35 (6): 671-679, 2004.
- Curzon G, Vallet L:** The purification of human ceruloplasmin. *Biochem J*, 74, 279-287, 1960.
- Armstrong D:** Advanced Protocols in Oxidative Stres-I. 265, ISBN: 978-1-60327-218-6 Humana Press, New York, 2008.
- Gilliam AB, Sherman MD, Griscavage JM, Ignarro LJ:** A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by Aspergillus nitrate reductase. *Anal Biochem*, 212, 359-365, 1993.
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V:** Biyoistatistik. Dokuzuncu Baskı. Hatiboğlu Yayınları, No: 53, Ankara, 2000.
- Ward MH, Dekok TM, VanDerslice J:** Workgroup report: Drinking-water nitrate and health: Recent findings and research needs. *Environ Health Perspect*, 113 (11): 1607-1614, 2005.
- Cockrum RR, Austin KJ, Ludden PA, Cammack KM:** Effect of subacute dietary nitrate on production traits and plasma analytes in Suffolk ewes. *Animal*, 4 (5): 702-708, 2010.
- Cockrum RR, Austin KJ, Kim JW, Garbe JR, Fahrenkrug SC, Taylor JF, Cammack KM:** Differential gene expression of ewes varying in tolerance to dietary nitrate. *J Anim Sci*, 88, 3187-3197, 2010.
- El-Wakf AM, Hassan HA, El-said FG, El-Said AE:** Hypothyroidism in male rats of different ages exposed to nitrate polluted drinking water. *Mansoura J Forensic Med Clin Toxicol*, 16 (2): 77-90, 2008.
- Robson S:** Nitrate and nitrite poisoning in livestock. *Primefacts*, 415, 1-4, 2007.
- Chow CK, Hong CB:** Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology*, 180, 195-207, 2002.
- Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H, Hadse M:** High nitrate intake impairs liver function and morphology in rats: Protective effects of alfa-tocopherol. *Environ Toxicol Pharmacol*, 20, 161-166, 2005.