

## Koyun kanında iz element (Zn ve Cu) analizi için kullanılan bazı numune hazırlama metotlarının karşılaştırılması

Yeter Değer Semiha Dede

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

**Özet:** Koyunların kan serumu ve plazmasında Zn ve Cu konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan iki farklı metodun karşılaştırıldığı bu çalışmada materyal olarak, 15 adet sağlıklı koyundan alınan kan örneklerinden yararlanıldı. HCl ile sulandırılarak yapılan metot A ve protein çöktürme esasına dayanan metot B ye göre numuneler hazırlandı. İz element analizleri atomik absorpsiyon spektrofotometresinde yapıldı. Metot A ya göre hazırlanan serum ve plazma örneklerinde Cu konsantrasyonları bakımından önemli bir farkın olmadığı görüldü. Aynı şekilde metot B’ de de serum ve plazma Cu konsantrasyonlarının birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi. Ancak metot A serum ve plazma bakır seviyelerinin metot B den önemli oranda yüksek ( $p<0.05$ ) olduğu saptandı.

Metot A ya göre hazırlanan plazma ve serum örnekleri arasında Zn konsantrasyonları bakımından istatistiksel olarak ( $p<0.05$ ) oranında anlamlı bir fark saptanırken, metot B deki serum Zn seviyeleri plazmaya göre nispeten yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı. Ancak metot A serum ve plazma çinko düzeylerinin metot B den önemli oranda farklı ( $p<0.05$ ) olduğu saptandı. Sonuç olarak metot A ya göre hazırlanan hem plazma, hem de serumda geri alma yüzdelerinin her iki iz element için de daha yüksek olduğu ortaya konuldu.

**Anahtar Kelimeler:** İz element analizi, Numune hazırlama, Kan, Koyun.

### Comparison of some sample preparation methods used for determination of trace elements in sheep blood

**Abstract:** Atomic absorption spectrophotometer (AAS) is unique instrument for determination of trace elements in different biological materials. There are so many procedure for this purpose. In this study, two different methods were used for the determination of plasma and serum Zn and Cu levels. Fifteen sheep were used as research material. Blood samples were taken from V. Jugularis in to heparinized test glass tubes for plasma and serum samples preparation, respectively. Two different samples preparation methods were used as named A and B. In method A, proteins were diluted by HCl and, in method B, they were precipitated by TCA, later Zn and Cu levels were determined by AAS. It was concluded that there were no significant differences in methods A and B on the levels of plasma and serum. But the levels of serum and plasma Cu was significantly high ( $p<0.05$ ) in method A than method B.

The zinc content of plasma and serum of sheep were significantly different  $p<0.05$  in method A. It was high of serum Zn than plasma Zn levels in method B, but there was no significant difference between plasma and serum levels. The Zn levels of serum and plasma in methods A was significantly higher than method B ( $p<0.05$ ). As conclusion, the levels and recovery of this elements was estimated higher in method A than method B.

**KeyWords:** Trace element analysis, Sample preparation, Blood, Sheep.

### GİRİŞ

İz elementler, besinler ve su ile dışarıdan alınan, insan, hayvan ve bitkilerin sağlıklı büyüme, gelişme ve canlılıklarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan anorganik maddelerdir. Vücuda giren iz elementler çeşitli kan proteinlerine bağlanarak bütün dokulara dağılırlar (1). Organizmanın iz element profilini ortaya koymak için, tüm kan, kan serumu ve plazması başta olmak üzere bütün doku ve organlar materyal olarak kullanılmaktadırlar. Yaş, hastalık, fizyolojik durumlar,

cinsiyet, çevresel faktörler vücudun iz element seviyelerini etkiledikleri gibi (2-5), konsantrasyonlarının saptanmasında kullanılan teknikler de oldukça önemlidir. Kan serumu ve plazmasındaki iz element konsantrasyonlarının belirleneceği numunelerin hazırlanmasında; protein çöktürme (6), asit ile sulandırma (7), bidistile deiyonize su ile sulandırma (8) gibi metotlar kullanılmaktadır. Numunelerin hazırlanmasını takiben, iz element tayinleri atomik absorpsiyon spektrofotometresinde

(AAS) yapılmaktadır. Bu metotlardan başka, numunelerin  $\text{HClO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{HNO}_3$  (2:1:4) karışımıyla yıkılmasından sonra bakır konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak tayin edildiği bir teknik de bildirilmiştir (9).

AAS ile çinkonun da kandaki konsantrasyonları saptanmaktadır (10). Çinko analizlerinde, serum proteinlerinin interferensini önlemek için serum sulandırılmakta (11), bir başka ucuz ve kolay metotta ise örnekler asit ile işleme tabi tutulmakta, böylece bir yandan ölçüm 0.02-2.0 ppm' e kadar duyarlı olurken, diğer taraftan geri alma yüzdesi 95-105 'e kadar çıkmaktadır (12). Farklı proteinlere bağlı olan çinko tayininde, numuneler ultrafiltrasyona tabi tutularak taşıyıcı proteinlerden ayrılması sağlamakta, daha sonra AAS ile ölçüm yapılmaktadır (13). Ayrıca çinkonun farklı yükteki atomlarının saptanması için AAS yerine, Zn taşıyıcı proteinlerin kolon kromatografide bağlanması esasına dayanan metot kullanılmakta ve insan serum proteinleri çöktürülerek konsantrasyonları belirlenmektedir (14).

Bu çalışma, iz element tayininde plazma ve serum kullanmanın ve numune hazırlanmasında kullanılan protein çöktürme ve HCl ile sulandırma yöntemlerinin birbirine bir avantajının olup olmadığını araştırmak amacıyla planlandı.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada, araştırma materyali olarak, Van Belediye Mezbahasında kesilmek üzere bulunan 15 adet koyunun V.jugularisinden, antikoagülanlı (lithium heparin) ve cam serum tüplerine ayrı ayrı, usulüne uygun olarak alınan kan örnekleri kullanıldı. Numunelerin 3000 rpm de plazma ve serumları ayrıldı. Böylece aynı hayvandan hem plazma hem de serum örnekleri elde edilmiş oldu. Örneklerde Cu ve Zn analizlerine hazırlık amacıyla, iki farklı metot kullanıldı:

### Metot A.

Cu ve Zn analizleri için serum ve plazma 0.1 N HCl ile 1/20 oranında sulandırıldı (7).

### Metot B.

Cu ve Zn analizleri için, serum ve plazma örnekleri üzerine eşit miktarda %15 TCA ilave edilir. 5 kağı sulandırılıncaya kadar distile su ile tamamlandı. 10 dakika bekletildikten sonra 5 dakika süreyle 3000 rpm de santrifüjlendi. Üstte toplanan berrak sıvıda mineral tayinleri gerçekleştirildi (6).

Her bir koyun için dört adet olmak üzere hazırlanan örneklerde iz element konsantrasyonları UNICAM marka AAS (atomik absorpsiyon spektrofotometresi) cihazında çift okuma yapılarak

saptandı. Aynı numunelerin üzerlerine belirli konsantrasyondaki (1 ppm) standart solüsyonlardan numune ile eşit miktarda ilave edilerek geri alma (recovery) numuneleri hazırlandı. Bunların tekrar AAS de okunması ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle göre değerlendirilerek numunelerin geri alma yüzdesi (recovery) hesaplandı (15).

$$\frac{a}{b+c} \times 100$$

- a:** geri alma numunesinde alınan değerlerin ortalaması  
**b:** çalışma sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması  
**c:** çalışma standartlarının ortalaması

Sulandırma oranları dikkate alınarak iz element konsantrasyonları hesaplandı. Çalışma sonucunda her bir iz element için, iki metodun serum ve plazmasındaki Cu ve Zn düzeylerine ait değerler istatistiksel olarak değerlendirildi (16).

## BULGULAR

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Tablo 1 ve 2 de özetlenmiştir. Metot A ya göre hazırlanan serum ve plazma örneklerinde Cu konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Metot B ye göre hazırlanan plazma ve serum örneklerindeki Cu konsantrasyonları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Metot A ya göre hazırlanan örneklerdeki Cu konsantrasyonlarının, metot B den anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ).

Metot A ya göre hazırlanan serum ve plazma örnekleri arasında Zn konsantrasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ( $p < 0.05$ ), metot B deki plazma ve serum Zn düzeyleri arasında önemli bir fark olmadığı görüldü. Metot A ve B arasında hem serum, hem de plazmadaki Zn düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli fark ( $p < 0.05$ ) olduğu saptandı.

Ayrıca her iki element için de geri alma yüzdesinin metot A ya göre hazırlanan numunelerde daha yüksek olduğu görüldü.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlı organizmanın iz element durumunu ortaya koymak amacıyla en çok kullanılan materyal kandır. Kandaki iz element konsantrasyonları tür, yaş v.s. başta olmak üzere fizyolojik ve patolojik koşullardan etkilenmekle birlikte, normal sağlıklı koyunların kan plazmasındaki Cu konsantrasyonları 46-137  $\mu\text{g}/\text{dl}$  olarak saptanmıştır (1,17). Çeşitli koyun ırkları üzerinde ve farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda

serum bakır miktarlarının 63-115 µg/dl arasında değiştiği bildirilmektedir (18, 19).

Koyunların kan serumunda ortalama çinko konsantrasyonları da çeşitli fizyolojik dönemlerden etkilenmekle birlikte 60-80 µg/dl (20), plazmada ise ortalama 30-110 µg/dl arasında değişmektedir (1, 11, 21).

Kan plazması ve serumunda iz element analizlerinin yapılmasında kullanılan numune hazırlama tekniklerini karşılaştırmak amacıyla planlanan bu çalışmada, koyunların Zn ve Cu düzeylerinin, yukarıdaki literatürlerde bildirilen sınırlar arasında olduğu bulunmuştur.

**Tablo1.** Koyun kan serumu ve plazması bakır konsantrasyonları (µg/100 ml) ve geri alma yüzdeleri.

	NUMUNE HAZIRLAMA METOTLARI			
	METOT A		METOT B	
	Plazma (x±Sx)	Serum (x±Sx)	Plazma (x±Sx)	Serum (x±Sx)
Çalışma numunesi	87.67 ± 4.20	86.11 ± 2.83	52.78 ± 3.75	42.13 ± 1.56
Geri alma numunesi	157.64 ± 7.44	141.44 ± 6.49	100.84 ± 3.28	105.18 ± 3.91
Geri alma % si	%84	%76	%66	%74
Numune sayısı	15	15	15	15

**Tablo 2.** Koyun kan serumu ve plazması çinko konsantrasyonları (µg/100 ml) ve geri alma yüzdeleri.

	NUMUNE HAZIRLAMA METOTLARI			
	METOT A		METOT B	
	Plazma (x±Sx)	Serum (x±Sx)	Plazma (x±Sx)	Serum (x±Sx)
Çalışma numunesi	41.80 ± 1.46	45.47 ± 1.43	35.97 ± 3.55	36.04 ± 5.10
Geri alma numunesi	119.11 ± 6.23	122.19 ± 7.91	103.34 ± 4.35	99.31 ± 6.76
Geri alma % si	%82	%84	%76	%73
Numune sayısı	15	15	15	15

Sunulan çalışmada, her iki numune hazırlama metoduna göre hazırlanan plazma ve serum örnekleri arasında Cu konsantrasyonları arasında önemli bir fark olmadığı saptandı. Memelilerin kan plazmasındaki Cu konsantrasyonu eritrositte bulunandan daha yüksektir. Plazma bakırının % 80 i seruloplazmin tarafından taşındığı için daha stabildir ve bu nedenle iz element durumunu ortaya çıkarmak için daha iyi bir indikatördür (1, 19, 20). Geri alma yüzdesinin metot A ya göre hazırlanan, proteinlerin mevcut olduğu plazma örneklerinde en yüksek bulunması bu görüşü doğrular mahiyettedir. Bu durum, kanda bakır düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda söz konusu metotların güvenle kullanılabilceğini düşündürmektedir. Ancak metot A da bakır konsantrasyonlarının ve geri alma yüzdelerinin daha yüksek bulunmasının, metot B deki bakırı taşıyan proteinlerin çöktürülmesinden kaynaklandığı söylenebilir.

Metot A ya göre hazırlanan plazma örneklerindeki Zn konsantrasyonları ile serum örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05) bulundu. Bu sonuç insan serumundaki çinko miktarlarının, plazmadakinden ortalama %16 daha yüksek olduğu bilgileri (1) ile uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte, metot B deki serum Zn seviyeleri

plazmadakine oranla yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı. Metot A ya göre hazırlanan serum örneklerindeki Zn konsantrasyonlarının metot B ye göre hazırlanan serum örneklerinden anlamlı (p<0.05) şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Kelson ve Schamberger (22), TCA ile deproteinize edilerek ölçülen serum Zn konsantrasyonlarının, su ile sulandırıldıktan sonra ölçülen serum Zn dan daha yüksek olduğunu, ama serum ve eritrositteki çinkonun çoğu α2-makroglobulin, metallothionin, karbonik anhidraz, süperosit dismutaz gibi proteinlere bağlı olduğu için deproteinizasyondan sonra ölçülürse, çinkonun bir kısmının geri çekilebileceğini bildirmektedirler. Nitekim bu çalışmada da TCA ile proteinlerin çöktürülmesi esasına dayanan metot B deki Zn konsantrasyonlarının 0.01 N HCl ile sulandırılan örneklerden daha düşük bulunmasının, söz konusu iz elementlerin yapısında bulunduğu proteinlerin çökmesine bağlı olduğu kanısına varıldı.

Sonuç olarak kan bakır analizleri için kan plazması ve serumu arasında önemli bir farklılık gözlenmezken, metot B ye göre hazırlanan numunelerin bakır düzeylerinin metot A ya göre önemli

ölçüde düşük olmasının, söz konusu metotta bakır içeren proteinlerin çöktürülmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Kan plazması Zn konsantrasyonları serumunkinden daha yüksek bulundu. Ayrıca metot A geri alma yüzdelерinin daha yüksek bulunması, bu metodun en azından bu koşullar altında daha elverişli olduğunu düşündürmektedir.

### KAYNAKLAR

- Underwood EJ: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4. Th. Ed., Academic Press, New York, London, (1977).
- Uyanık F, Saraymen R, Çınar M: Kayseri Yöresinde Endüstriyel Alanlarda Yetiştirilen Süt İneklerinde Çinko Düzeyleri. 1. Ulusal Çinko Kongresi, 619-624, (1998).
- Enigk K, Feder H, Dey-Harza A, Weingartner E: Element Content of Blood Plasma, Erythrocytes and Liver During The Prepatent Period of Fascioliasis in Cattle. Helminth. Abs. Series-A, 043-05089, (1974).
- Millar KR, Albyrt AT, Meads WJ, Sheppard AD: Changes in Blood Levels of Zinc, Copper, Selenium, Glutathione Peroxidase, Vitamin B 12 and Total and Free Thyroxine in Sheep Removed From Pasture and Held without Food 50 Hours. N.Z.Vet.J., 34:1/2, 1-3, (1986).
- Ghosal AK, Shekhawat VS: Observations on Serum Trace Elements Levels (Zinc, Copper and Iron) in Camel (Camelus Dromedarius) in The Arid Tracts of Thar Desert in India. Vet. Bul. 063-05481, (1993).
- Attıyat AS, Christian GD: Flow Injection Analysis-Atomic Absorbstion Determination of Serum Zinc. Clin. Chim. Acta, 137, 151-157, (1984).
- Anonim: Atomic Absorption Spectrophotometry: John Edward Cattle Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York,(1982).
- Gromadzka-Ostrowska J, Zalewska B, Jakubow K, Gozłinski H: Three Year Study on Trace Element Concentration in The Blood Plasma of Shetland Pony Mares. Comp. Biochem. Physiol. 82A:3, 651-660, (1985).
- Bayşu N, Dündar Y, Bayrak S: Koyun ve Kuzularda Yün ve Kan Bakır Değerleri Arasındaki İlişki ve Bunun Diagnostik Önemi. TÜBİTAK Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje No:VHAG-563, Ankara, (1983).
- Jepsen LV: Determination of Zinc in Erythrocytes, Granulocytes and Serum by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. Scand.J.Clin.Invest., 299-303, (1984).
- Antaplı M: Koyunların Kanında Çinko Seviyeleri ile Karbonik Anhidraz Aktiviteleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması. Doktora Tezi. U. Ü. Sağ. Bil. Ens. Biyokimya A.B.D., (1988).
- De-Blas OJ, Rodriguez RS, Mendez JH, Tomero JA, Gomez BL, Gonzalez SV: Determination of Zinc in Serum, Blood, and Ultrafiltrate Fluid From Patients on Hemofiltration by Graphite Furnace/ Atomic Absorption Spectroscopy or Flow Injection Analysis/ Atomic Absorption Spectroscopy. J.AOAC.Int., 77:3, 722-727, (1994).
- Lin TH, Cheng SY: Determination of Zinc Fractions in Human Blood and Seminal Plasma by Ultrafiltration and Atomic Absorption Spectrophotometry. Biol.Trace Elem. Res., 51:3, 267-276, (1996).
- Reyes JG, Santander M, Martinez PL, Arce R, Benos DJ: A Fluorence Method to Determine Picomole Amounts of Zn (II) in Biological Systems. Biol.Res., 27:1, 49-56,(1994).
- Akyüz A: Van Gölünde Yaşayan İnci Kefali (Chalcaburnus Tarichi, Pallas,1811) Balğındaki Vitamin E Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Y.Y.Ü. Sağ. Bil. Ens. Biyokimya A.B.D., Van, (1995).
- Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O, Gürbüz F: Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları-1) A.Ü. Zir. Fak. Yay. No:1021, Ankara, (1987).
- Mert N, Güler A, Çetin M, Oğan C: Plasma Copper Levels of Five Different Breeds of English Sheep. 150. Years of Veterinary Education, Proceedings, 24-31 May1992, 462-464, Ankara- Cappadocia-İstanbul, (1992).
- Niekerk FE, Van Cloete SWP, Heine EWP, Van-Niekerk FE: Concentrations of Blood Elements and Metabolites, As Well As Production Characteristics of Angora Goats in The Southern Cape. Vet.Bull. 061-03775, (1991).
- Mc Dowell LR, Conrad JH, Ellis GL, Loosli JK: Elements for Grazing Ruminants in Tropical Regions. Bulletin, Dept. Anim. Sci. Center Trop. Agr. University of Florida, Gainville, The U.S. Agency For International Deveopment. Library Of Congress, Cat.No: 84-70238, (1983).
- Ramos JJ, Fernandez A, Peiro JM, Ferre LM, Verde MT, Sanz MC: Study on The Serum Levels of Copper in Sheep from The Valle Medio Del Ebro, Spain. Index Vet.061-00012, (1993).
- Güçüş AI, Öncüler A, Kalkandelen G, Bakioğlu T: Koyun ve Sığırlarda Plazma Çinko Düzeyinin Bölgesel ve Mevsimsel Değişimleri. 1. Ulusal Çinko Kongresi, 629-636, (1998).
- Kelson JR, Schamberger RJ: Methods Compared for Determining Zinc in Serum by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. Clin.Chim., 24, 240-244, (1978).

### Yazışma Adresi:

Yeter Değer  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
VAN / TÜRKİYE