

Theileria annulata ile Enfekte Sığırlarda GSH-Px, G6PD, Arginaz Aktiviteleri ile Bazı Biyokimyasal Parametreler

Sema Temizer OZAN, Sema YARALIOĞLU, Seval YILMAZ
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE
Edip ÖZER, Cem Ecmel ŞAKI, Murat SEVGİLİ
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.01.1998

Özet: *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerin ara konakçılık yaptığı *Theileria annulata*, sığırlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Çalışmada doğal olarak *T.annulata* ile enfekte olmuş 15 adet siğir ile sağlıklı 15 adet siğirin kanı kullanılmıştır.

Eritrositlerde serbest radikal metabolizmasında rol alan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), aktiviteleri ile arginaz aktivitesi ve serum aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), total bilirubin, kolesterol, trigliserid, total protein, albumin, üre, ürik asit, hemoglobin, hematokrit düzeyleri ölçülmüştür. Eritrosit GSH-Px ve G6PD aktiviteleri Beutler, arginaz aktivitesi modifiye edilmiş TDMU yöntemi ile ölçülmüş olup, diğer serum parametreleri ile Tecnicon RA-XT otoanalizörde çalışılmıştır.

GSH-Px ve arginaz aktiviteleri hasta grupta kontrol grubuna göre daha düşük bulunurken ($p<0.005$), G6PD aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0.005$). *T.annulata* ile enfekte sığırlarda AST, ALT, total bilirubin, direkt bilirubin, kolesterol, üre, hemoglobin, hematokrit değerlerinde ($p<0.005$) kontrollere göre bir artış olurken, trigliserid, total protein, ürik asit, albumin değerlerinde ise önemli bir değişiklik ($p>0.005$) gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, *T.annulata* ile enfekte hasta sığırlarda GSH-Px antioksidan sistemin yetersiz olabileceği görüşü ileri sürülebilir.

Anahtar Sözcükler: *Theileria annulata*, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, arginaz.

GSH-Px, G6PD and Arginase Activities and Some Biochemical Parameters in Cattle Infected with *Theileria annulata*

Abstract: *Theileria annulata*, for which *Hyalomma* tick species serve as intermediate host, causes an economically important disease in cattle. 15 cattle infected with *T.annulata* and 15 healthy cattle were used in the study.

The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) and arginase that play role in the free radical metabolism in erythrocytes, and serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), total bilirubin, cholesterol, triglycerid, total protein, albumin, urea, uric acid, haemoglobin, haematocrit levels were measured. Erythrocyte GSH-Px and G6PD activities were measured by beutler, arginase activity by the modified TDMU method and other serum parameters were evaluated in the Tecnicon RA-XT otoanalyser.

While GSH-Px and arginase activities were found to be lower in the infected group than the control group ($p<0.005$), there was no statistically significant difference in the G6PD activity between the groups ($p>0.005$). While there was an increase in AST, ALT, total bilirubin, direct bilirubin, cholesterol, urea, haemoglobin, haematocrit values in the infected group compared to the control group ($p<0.005$), no significant changes were observed in triglycerid, total protein, uric acid, albumin values ($p<0.005$).

It can be concluded that GSH-Px antioxidant system may be inadequate in cattle infected with *T.annulata*.

Key Words: *Theileria annulata*, glutathione peroxidase, glukoz-6-phosphate dehydrogenase, arginase.

Giriş

Theileriosis, *Theileria annulata*'nın yurdumuz sığırlarında önemli ekonomik kayıplara sebep olduğu paraziter bir hastalıktır. Parazitler hematopoetik organları (kemik iliği, dalak, karaciğer, lenf yumruları) tahrip ederek ağır lezyonlar meydana getirmektedir. Has-

talığın sağıtımında bugüne kadar etkili bir ilacın bulunamamış olması sonucu semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Bu da, hastalık etkeninin meydana getirdiği bozuklukların iyi bilinmesini gerektirmektedir (1,2).

Organizmalar serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı biyolojik bütünlüklerini korumak için, endojen

koruyucu antioksidan savunma sistemine sahiptirler (3). Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz [G6PD (E.C.1.1.1.49)], oksijen sitotoksitesine karşı hücrel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir antioksidan enzimdir (4). Glutasyon peroksidaz [GSH-Px (E.C.1.11.1.9)] eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup hidrojen peroksit ve lipid peroksidlerin redüksiyonunu katalize eden, tetramerik ve 4 selenyum atomu içeren sitozolik mitokondriyal bir enzimdir (3).

GSH-Px ve G6PD enziminin organizmada eritrositlerde bulunuşu bilhassa klinik açıdan önemli olup, GSH-Px ile G6PD aktivitesi çeşitli hastalıklara ve durumlara bağlı olarak normalden sapmalar gösterebilmektedir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve hücre hasarına yol açmaktadır (3). G6PD enzim eksikliğinde, detoksifikasyon sırasında azalan GSH, yeterli NADPH oluşturulamadığı için tekrar eski etkinliğini kazanamamakta ve eritrositin gerek membranının gerekse intrasellüler kısmının oksidan etkisinde kalmasına neden olmaktadır (5). Eritrosit membranı hemen hemen eşit miktarda lipid ve proteinden oluşmaktadır. Enzim eksikliği eritrosit membranının her iki fraksiyonunu da etkilemekte, membran akışkanlığının değişmesine neden olmaktadır. Enzim eksikliğinde, membranın doymamış yağ asitlerinden olan palmitik ve stearik asitlerin azaldığı, poliansatüre yağ asitlerinden de özellikle araşidonik asitin arttığı bildirilmektedir. Ortamda fazla miktarda oksidan madde varlığında, G6PD enzim eksikliği olan eritrositlerin membranlarında peroksidasyon miktarının arttığı belirtilmektedir (6).

Varlığı ilk kez 1904 yılında Kossel ve Dakin (7) tarafından saptanan arginaz (L-Arginin amidinohidrolaz, E.C. 3.5.3.1.); arginini üre ile ornitine parçalayan enzimdir. Karaciğer; üre sentezinin dolayısıyla arginazın ana kaynağı olmakla birlikte, arginaza; eritrosit, lökosit, trombosit, beyin, bağırsak, böbrek, tükrük bezi, deri ve testislerde de rastlanmaktadır (8).

Bu araştırmada, *T. annulata* ile enfekte sığır kanlarında bazı antioksidan savunma sistemlerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırmanın materyalleri, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerince Elazığ ve yöresi sığırlarından temin edilmiştir.

Çalışmada, deney grubunu theileriosis tanısı konmuş 15 hasta, kontrol grubunu ise 15 sağlıklı sığır oluşturmuştur. Vena jugularisten EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin bir miktarı GSH-Px tayini için ayrılmıştır. Arta kalan kan örnekleri üç kez serum fizyolojik (% 0.9'luk NaCl) solüsyonu ile yıkanarak eritrositler izole edilmiş, arginaz ve G6PD tayini yapılmıştır. Diğer analizler aynı örneklerin serumlarında çalışılmıştır.

Eritrosit GSH-Px aktivite ölçümünde Beutler yöntemi (9), G6PD düzeylerinin ölçümünde NADP'nin NADPH'a indirgenmesi esasına dayanan kinetik yöntem (10) uygulanmış ve eritrosit arginaz aktivitesi, arginin-arginaz reaksiyonu sonucu oluşan ürenin "Tiyosemikarbazid Diasetilmonoksim Üre (TDMU)" metodu ile (11) spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Hemoglobin tayininde siyanomethemoglobin oluşumu esasına dayalı Drabkin (12) yöntemi kullanılmıştır.

Serumda biyokimyasal parametreler Tecnikon RA-XT otoanalizörde yapılmıştır.

Sonuçlar, "Mann-Whitney U Testi" uygulanarak değerlendirilmiştir (13).

Bulgular

Tablo 1'de görüldüğü gibi serum total bilirubin, direkt bilirubin, üre, ürik asit, protein, albumin, kolesterol, trigliserid düzey ölçümleri sırasıyla kontrol grubunda 0.19 ± 0.03 mg/dl, 0.11 ± 0.02 mg/dl, 30.33 ± 3.09 mg/dl, 0.97 ± 0.08 mg/dl, 6.31 ± 0.25 g/dl, 2.84 ± 0.24 g/dl, 120.60 ± 11.30 mg/dl, 142.07 ± 10.91 mg/dl iken, *T.annulata* ile enfekte olmuş grupta 1.03 ± 0.58 mg/dl, 0.32 ± 0.20 mg/dl, 47.86 ± 12.5 mg/dl, 1.10 ± 0.19 mg/dl, 6.04 ± 0.45 g/dl, 2.83 ± 0.23 g/dl, 161.43 ± 12.93 mg/dl, 159.71 ± 16.07 mg/dl olarak bulunmuştur. Hasta grupta total bilirubin, direk bilirubin, üre ve kolesterol düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p < 0.05$), total protein, albümin, ürik asit, trigliserid düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Kan metabolitlerinde meydana gelen değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 2'de verilmiştir. Kontrol grubunda eritrosit hemoglobin ve hematokrit düzeyleri sırası ile 12.13 ± 0.43 g/dl, 28.73 ± 0.69 g/dl iken, *Theileria* ile enfekte grupta 7.14 ± 0.50 g/dl, 20.87 ± 1.62 g/dl olarak bulunmuştur. Hasta grupta eritrosit hemoglobin ve hematokrit düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşmüştür ($p < 0.05$).

Tablo 1. *T.annulata* ile Enfekte Sığırlarla Kontrol Grubu Sığırlarında Bazı Serum Biyokimya Parametreleri

Gruplar	n	Total Bilirubin (mg/dl)	Direk Bilirubin (m/dl)	Üre (mg/dl)	Ürik asit (mg/dl)	Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Kolesterol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)
Enfekte	15	1.03±0.58	0.32±0.20	47.86±12.5	1.10±0.19	6.04±0.45	2.83±0.23	161.43±12.93	159.71±16.07
Kontrol	15	0.19±0.03	0.11±0.02	30.33±3.09	0.97±0.08	6.31±0.25	2.84±0.24	120.60±11.30	142.07±10.91
p		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

Tablo 2. *T.annulata* ile Enfekte Sığırlarla Kontrol Grubu Sığırlarda Hemoglobin ve Hematokrit Değerleri

Gruplar	n	Hemoglobin (g/dl)	Hematokrit (g/dl)
Enfekte	15	7.14±0.50	20.87±1.62
Kontrol	15	12.13±0.43	28.73±0.69
p		p<0.05	p<0.05

Tablo 3. *T.annulata* ile Enfekte Sığırlarla Kontrol Grubu Sığırlarda Eritrosit Arginaz ve Üre Değerleri

Gruplar	n	Arginaz (µmol üre/gHb)	Üre (mg/dl)
Enfekte	15	41.09±4.07	0.41±0.05
Kontrol	15	47.09±2.70	1.70±0.23
p		p<0.05	p<0.05

Tablo 3'de ise kontrol grubunda eritrosit arginaz ve üre aktiviteleri sırasıyla 47.09±2.70 µmol üre x saat/g Hb, 1.70±0.23 mg/dl iken *T.annulata* ile enfekte olmuş grupta 41.09±4.07 µmol üre x saat/g Hb, 0.41±0.05 mg/dl olarak bulunmuştur. Enfekte grupta eritrosit arginaz ve üre değerleri kontrollere göre istatistiksel açıdan önemli düşüş göstermiştir (p<0.05).

Tablo 4'de görüldüğü gibi; AST, ALT, GSH-Px, G-6-PD, kontrol grupta 76.73±4.26 U/L, 30.73±2.80 U/L, 75.62.62 U/g Hb, 4.70±0.42 U/g Hb, *Theileria* ile enfekte olmuş grupta ise 182,86±15,69 U/L, 37,86±10,13 U/L, 25,27±3,16 U/L, 3,82±0,42 U/L olarak bulunmuştur. Kontrollere göre, hasta grupta serum AST- ALT düzeyleri anlamlı derecede yüksek, eritrosit GSH-Px anlamlı derecede düşük saptanmıştır (p<0.05). G6PD aktivitesinde ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Tartışma

T.annulata'nın sebep olduğu theileriosis sığırların kan tablosunda önemli değişiklikler meydana getirmektedir (1,14-17). Nitekim çeşitli araştırmacılar (14-17), *T.annulata* ile enfekte sığırlarda eritrosit miktarının önemli derecede düştüğünü ve buna bağlı olarak anemik bir tablonun ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da hemoglobin ve hematokrit değerlerinin istatistiksel açıdan önemli derecede düştüğü görülmektedir. Anemi tablosunun şekillenmesi, hastalık etkeninin hematopoetik organlara yerleşmesi sonucu mm³ kandaki alyuvar sayısının düşmesine bağlılanmaktadır.

Laiblin ve ark. (18), *T.annulata* ile enfekte edilmiş genç sığırlarda total bilirubin arttığı, çok az istisna ile üre miktarının normal oranda bulunduğu, Can (19), theileriosisli hastaların kliniğe geliş günü üre ve total bilirubin miktarlarının fizyolojik sınırların üst hudutlarında

Gruplar	n	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glutasyon peroksidaz (U/gHb)	G-6-PD (U/gHb)
Enfekte	15	182.86±15.69	37.86±10.13	25.27±3.16	3.82±0.42
Kontrol	15	76.73±4.26	30.73±2.80	75.62±4.62	4.70±0.42
p		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

Tablo 4. *T.annulata* ile Enfekte Sığırlarla Kontrol Grubu Sığırlarda Bazı Enzim Düzeyleri

bulunduğunu, Sina ve ark. (20), serum bilirubin değerlerinin yükseldiğini, Dumanlı ve ark. (21), *T.annulata* ile enfekte danalarda kan total bilirubin düzeylerinde artış meydana geldiğini, üre düzeylerinde ise önemli bir değişiklik görülmediğini saptamışlardır. Bu çalışmada, belirlenen total bilirubin ve direkt bilirubin miktarlarındaki artışların ikterus sonucu şekillenebileceği, üre miktarındaki artışın ise karaciğerdeki dejenerasyonlar sonucu meydana gelebileceği düşünülmektedir. Ürik asit, total protein ve albumin miktarlarında değişimler ise önemsiz bulunmuştur.

Yadav ve ark. (22)'nin saptadıkları bilirubin ile kolesterol düzeylerinde yükselme bu araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Trigliserit düzeyinde istatistiki açıdan önemsiz de olsa bir artış gözlenmiştir. Kolesterol ve trigliserit düzeylerindeki artışların lipid pe-

roksidasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Amer ve ark. (23), serum AST, ALT düzeylerindeki artış olduğunu bildirirken, bu çalışmada da, AST ve ALT düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artış, GSH-Px ($p<0.05$) ve G6PD ($p>0.05$) düzeylerinde ise düşüş olduğu saptanmıştır.

Enfekte sığırların eritrosit arginaz ve üre düzeylerindeki düşüşler ($p<0.05$) Güneş (24)'in bildirdiği sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, *T.annulata* ile enfekte olmuş sığırlarda meydana gelen çeşitli biyokimyasal değişikliklerin karaciğer ve diğer organlarda meydana gelen şiddetli hasara bağlı olduğunu ve hastalığın patogenezinde antioksidan savunma sisteminin (GSH-Px, G6PD) bozulmasının önemli etken faktörlerden biri olabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

- Mimioğlu, M., Ulutaş, M. ve Güler, S.: Yurdumuz Sığırlarında Theileriosis Etkenleri ve Diğer Kan Parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayii. Ankara. 28, 32, 1971.
- Aytuğ, C.N., Alaçam, E. ve Görgül, S.: Sığır Hastalıkları. Teknolojik Matbaa. İstanbul. 271-272, 1989.
- Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yay. Konya. 51: 54, 1995.
- Gözükara, E.M.: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Özellikleri, Metabolik ve Klinik Açısından Önemi. Biyokimya Dergisi. 1978; 2, 17.
- Schaeffer, F. and Stainer, R.Y.: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. Kinetics and Molecular Properties. Arc. Microbiol. 1978; 116, 9.
- Clemens, M.R., Einsele, H. and Waller, H.D.: The Fatty Acid Composition of Red Cells Deficient in Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Their Susceptibility to Lipid Peroxidation. Clin. Wschr. 1985; 63: 578-582.
- Kossel, A. and Dakin, H.D.: Über Die Arginase. Z. Physiol Chem. 1904; 41: 321-326.
- Güner, S.R.: Gebelerde ve Hiperprolaktinemililerde Tükürük ve Eritrosit Arginazı Aktivite Düzeyleri. (Uzmanlık Tezi), Trakya Üniv. Edirne, 1995.
- Beutler, E.: Red Cell Metabolism A. Manual of Biochemical Methods Grunef Strottan New York, 66, 1973.
- Beutler, E.: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in "The Metabolic Basis of the Inherited Disease" Ed. by. Stanburg Jbet al. Mc Graw Hill, new York. 1983; 1629-1653.
- Aminlari, M. and Vaseghi, T.: Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. Comp. Biochem. Physiol. 1992; 103, (2): 385-389.
- Frankel, S., Reitman, S. and Sonnenwirth, A.C.: Grandwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Seventh edition, 1: 403-404, 1970.
- Sümbüloğlu, K. and Sümbüloğlu, V.: Biyoistatistik. 4. Baskı. Özdemir Yayıncılık. Ankara, 114-117, 1987.
- Özcan, H.C.: Ankara ve Civarında Evcil Hayvanlarda Görülen Piroplasmose Vakaları ve Tedavileri Üzerine Araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Yay. Ankara, 143: 1961.
- Laiblin, Ch.: Klinische Untersuchungen zur Theileria annulata Infektion des Rindes II. Hematologische Untersuchungen. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 1978; 91: 48-50.
- Hooshmand-Rad, P.: The Pathogenesis of Anemia in Theileria annulata Infection. Res. Vet. Sci., 1976; 20: 324-329.
- Hashemi-Feshaeki, R.: Haematological Observation in Calves Inoculated with Non-Erythrocytic Forms of Theileria annulata Strain. The First mediterranean Conference on Parasitology. İzmir, Turkey. 1977.
- Laiblin Ch., Bayşu, N. und Müller, M.: Klinische Untersuchungen zur Experimentelle Theileria annulata Infektion des Rindes I. Klinische Chemische Untersuchungen, Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 1978; 91: 25-27.
- Can, R.: Theileria annulata (Dschunkowsky et Luhs, 1904)'dan İleri Gelen Theileriosis Üzerinde Klinik Patolojik Çalışmalar ve Tedavi Denemeleri, Tübitak VII. Bilim Kongresi, İstanbul. 1980.
- Sina, M. ve Günay, M.: Theileria annulata Attenu ve Virulent Şizontları ile İnokule Edilen Dalaklı ve Dalakları Çıkarılmış Danalarda Eritrosit, Lökosit, Hemoglobin PVC ile Kanda Total Bilirubin ve Bakır Değerlerinin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Pendik Vet.Kont. Araşt. Enst. Derg. 1981; 13 (1): 35-39.

21. Dumanlı, N., Keleştimur, H. ve Nizamlioğlu, M.: Theileria annulata ile Deneysel Olarak Enfekte Edilmiş Danalarda Hematolojik Araştırmalar. Doğa TU Vet. ve Hay. D., 1987; 11 (2): 108-114.
22. Yadav, C.L. and Sharma, N.N.: Changes in Blood Chemical Components during Experimentally Induced Theileria annulata Infections in Cattle. Vet. Parasitol. 1986; 21, (2): 91-98.
23. Amer, A.A., Mourd, M.I. and Salem, H.A.: Theileriasis in Friesian cattle in Upper Egypt. Assiut. Vet. Med. J. 1987; 18 (36): 148-152.
24. Güneş, H.N.: Serumdaki Eksojen Üre Düzeyinin Eritrositlerde Endojen Üre Düzeyine ve Arginaz Aktivitesine Etkisi. (Doktora Tezi) Trakya Üniv. Edirne, 1997.