

BEYAZ KAS HASTALIKLI KUZULARIN KALP, İSKELET KASI ve KARACİĞERLERİNDE REDÜKTE GLUTATYON ve MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ İLE KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Ebru BEYTUT*

Mine ERİŞİR**

Mesut AKSAKAL***

Geliş Tarihi : 01.11.2000

Özet: Bu çalışmada Beyaz Kas Hastalıklı (White Muscle Disease-WMD) kuzuların kalp ve iskelet kasları ile karaciğerlerinde lipid peroksidasyon (LPO) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT: EC, 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 15 hastalıklı ve 15 sağlıklı Morkaraman kuzu kullanıldı. Hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kaslarında GSH düzeylerinde önemli ($p<0.001$) derecede düşme görüldü. WMD'li kuzuların kalp kaslarında CAT enzim aktivitelerindeki düşüş anlamlı ($p<0.01$) iken, iskelet kaslarında oldukça önemli ($p<0.001$) tespit edildi. Ancak, karaciğerlerde anlamlı bir düşüş belirlenmedi ($p>0.05$). Lipid peroksidasyon düzeyleri ise, hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kaslarında sırasıyla önemli ($p<0.01$, $p<0.001$) düzeyde artarken, karaciğerdeki artış anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Anahtar Sözcükler: kuzu, beyaz kas hastalığı, glutatyon, katalaz, malondialdehit

Reduced Glutathione and Malondialdehyde Levels with Catalase Enzyme Activity in the Heart, Skeletal Muscle and Liver of Lambs with White Muscle Disease

Summary: The aim of this study was to determine lipid peroxidation (LPO) and reduced glutathione (GSH) levels and the activity of catalase enzyme (CAT: EC, 1.11.1.6) in the heart, skeletal muscles and liver of lambs with White Muscle Disease (WMD). Fifteen lambs with WMD and 15 healthy Morkaraman lambs were the subject of this study. Reduced glutathione levels in the heart and skeletal muscles were significantly ($p<0.001$) reduced in affected lambs with the disease. The reduction in CAT enzyme activity was highly significant ($p<0.001$) in the skeletal muscles of affected lambs and significant ($p<0.01$) in the heart muscles. However, the reduction in the same parameters was not significant ($p>0.05$) in the liver. Lipid peroxidation levels in the heart and skeletal muscles of affected lambs were significantly ($p<0.01$, $p<0.001$) increased although the increase in the liver was not significant ($p>0.05$).

Key Words: lamb, white muscle disease, glutathione, catalase, malondialdehyde

GİRİŞ

Beyaz Kas Hastalığı (White Muscle Disease-WMD) Dünya'nın bir çok ülkesinde önemli ekonomik kayıplara neden olan, kalp ve iskelet kaslarında hiyalin dejenerasyonu ile karakterize nutrisyonel bir hastalıktır¹⁻³. Beyaz Kas Hastalığı, ülkemiz koyun yetiştiriciliği için de ciddi bir sorun oluşturmakta, özellikle Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yoğunlaşmaktadır^{4,5}.

Beyaz Kas Hastalığının etiolojisinde en önemli etken E vitamini ve/veya selenyum (Se) noksanlığı olup, bunların antioksidatif etkilerindeki yetersizliğe bağlı olarak oluşan serbest ra-

dikaller hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadırlar^{6,7}.

Serbest radikaller, hücre membranlarındaki doymamış yağ asitleri, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerinde toksik etkiler yaparak oksidatif hasarlara neden olmaktadır⁸⁻¹². Organizma serbest radikallerin neden olduğu bu oksidatif hasarların oluşumunu engellemek için değişik koruma sistemlerine sahiptir. Reaktif ortamların yok edilmesi veya başlangıçta engellenmesi için, gerekli olan koruma sistemlerinden biri antioksidan koruma sistemidir. Bu antioksidan koruma sistemi

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

** Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

*** Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzimleri ile glutatyon (GSH), ürik asit, E ve C vitaminlerinden oluşmaktadır 8.10.13.14.

Önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır¹⁵. Peroksitlerin veya oksitlenmiş sülfidril gruplarının indirgenmesi ile oksijen ihtiyacının artması ve oluşan oksidatif stres sonucu GSH konsantrasyonunun karaciğer ve diğer organlarda azaldığı bazı çalışmalarda^{16,17} ortaya konulmuştur.

Türkiye koyun yetiştiriciliğinde önemli bir paya sahip olan Kars ili ve çevresinde Beyaz Kas Hastalığı kuzularda ölümlere neden olmaktadır. Hastalığın klinik tanısında bazı kas ve karaciğer enzimlerinin önemini bilmesine rağmen, GSH ve MDA düzeyleri ile CAT enzim aktivitesinin yeterince araştırılmadığı yapılan literatür incelemelerinde dikkati çekmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma ile, Beyaz Kas Hastalıklı ve sağlıklı kuzulara ait kalp, iskelet kasları ve karaciğer dokularında anılan parametrelerin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın materyalini, 1998-2000 yılları nisan ve mayıs ayları arasında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne teşhis amacıyla getirilen ve Patoloji Anabilim dalında yapılan makroskopik ve mikroskopik muayeneler sonucunda WMD teşhisi konulan, 1-3 aylık 15 adet hastalıklı kuzu ile aynı yaşlarda klinik olarak sağlıklı 15 adet Morkaraman kuzu oluşturdu.

Kuzuların, kalp (sağ ventrikül) ve iskelet kasları (gluteal kaslar) ile karaciğerlerinden 1'er g tartılarak % 0.9'luk NaCl solüsyonu (serum fizyolojik) ile yıkayıp filtre kağıdı ile kurutulduktan sonra analizler yapılmaya kadar (2 ay) - 20 °C'de donduruldu. Doku örnekleri, buz içerisinde havadaki oksijenin örneklerdeki radikal miktarını arttırmasını önlemek için bir antioksidan olan Butylated Hydroxytoluene (BHT) ilave edilerek metotlarda^{18,21} belirtildiği şekilde ve Potter-Elvenjem cam-cam homojenizatörü ile homojenize edildi. Ho-

mojenatlar 10 000 g'de 15 dk. soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) santrifüj işlemine tabii tutularak elde edilen süpernatantlar CAT enzimi, GSH, LPO düzeyleri ve doku proteini tayininde kullanıldı. Bununla birlikte CAT enzim aktivitesindeki azalmayı önlemek için dokular % 1'lik Triton-X 100 ile homojenize edildi. Daha sonra dokuların redükte GSH düzeyleri Ellman's reagent kullanılarak spektrofotometrik olarak 412 nm'de belirlendi¹⁸. Dokuların CAT (EC, 1.11.1.6) enzim aktivitesinin tayini için de, oda ısısında (20 °C) H₂O₂'nin enzimatik dekompozisyonuna bağlı olarak 240 nm'deki optik dansitesine dayanan Aebi¹⁹'nin tanımladığı yöntem kullanıldı. Enzim aktivitesi k/mg prot. olarak belirtildi. Dokularda protein tayini ise Lowry ve ark²⁰'nin tanımladığı metoda göre yapıldı.

Serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak en yaygın uygulanan metot Tiobarbiturik asit (TBA) metodudur. Bu metod LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan Malondialdehit (MDA) ile TBA'nın reaksiyonu temeline dayanır. Dokularda LPO tayini (MDA) Placer ve ark.²¹'nin tanımladığı yöntemle göre spektrofotometrik olarak 532 nm'de belirlendi. Standart olarak 1,1,3,3 tetra-ethoxypropane çözeltisi kullanıldı. Dokulardaki değerler nmol/g olarak ifade edildi.

Hasta kuzuların kalp, iskelet kası ve karaciğerlerindeki CAT enzim aktiviteleri ile MDA ve GSH düzeylerinin sağlıklı kuzulara göre farklı olup olmadığını saptamak için SPSS (version 6.0, 1993) istatistik programı kapsamında "t-testi" kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak belirtildi ve p<0.05 istatistiksel farklılığı gösterdi.

BULGULAR

Hastalıklı ve sağlıklı kuzuların kalp ve iskelet kasları ile karaciğerlerinin GSH ve MDA düzeyleri ile CAT enzim aktiviteleri ve istatistiksel önemlilikleri Tablo'da verilmiştir.

Tablo'da da görüldüğü gibi, Beyaz Kas Hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kaslarında GSH düzeyleri sağlıklı olanlara kıyasla önemli (p<0.001) derecede düşük tespit edildi. Has-

Tablo 1. Beyaz kas hastalıklı ve sağlıklı kuzuların doku GSH ve MDA düzeyleri ile CAT enzim aktiviteleri.
Table 1. GSH and MDA levels and the activities of CAT enzyme in the tissues of lambs with WMD and healthy.

Dokular	Gruplar n=15	GSH (nmol/g prot.) $\bar{X} \pm SD$	CAT (k/mg prot.) $\bar{X} \pm SD$	MDA (nmol/g prot.) $\bar{X} \pm SD$
Kalp	Kontrol	1.11±0.45	14.72±1.03	9.56±1.39
	WMD	0.80±0.02 ^b	13.81±0.61 ^a	14.12±0.62 ^a
İskelet kası	Kontrol	1.95±0.09	93.61±6.33	2.43±0.38
	WMD	0.99±0.03 ^b	54.03±8.54 ^b	4.51±0.20 ^b
Karaciğer	Kontrol	0.52±0.02	656.05±63.17	10.64±1.06
	WMD	0.49±0.03	646.88±45.11	10.75±1.90

a p<0.01. b p<0.001

talıklı kuzuların kalp kaslarında CAT enzim aktivitesindeki düşüş önemli (p<0.01) iken, iskelet kaslarında oldukça önemli (p<0.001) düzeyde belirlendi. Hastalıklı kuzuların kalp kaslarında LPO (MDA) düzeyindeki artış önemli (p<0.01) iken, iskelet kaslarında çok önemli (p<0.001) olarak saptandı. Karaciğerde ise bu parametreler istatistiksel olarak önemli bulunmadı (p>0.05).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Serbest radikallerin kas hastalıklarının patogeneziinde rol oynadıkları ifade edilmektedir¹⁵. Bu nedenle Beyaz Kas Hastalığında, E vitamini ve Se gibi antioksidanların yetersizliğine bağlı olarak LPO ve dolayısıyla dokularda MDA konsantrasyonlarında artış beklenmektedir^{7,11,22,23}. Zira yapılan bir çalışmada⁷, musküler distrofi bireylerin hem kaslarında hem de kanlarında LPO'nun oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fry ve ark.²²'de E vitamininden yoksun diyetle beslenen koyunlarda antioksidatif etkinin eksikliğine bağlı olarak oluşan oksidatif stresin, iskelet kaslarında MDA düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir. Atroshi ve ark.²³ E vitamini ve Se'dan yoksun diyetle beslenen ratlarda T-2 toksik maddesi ve vomitoxin ile toksikasyon oluşturulduktan sonra parankim dokularda Thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) değerinin belirgin bir şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Benzer biçimde araştırmamızda da Beyaz Kas Hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kasları ile karaciğerlerindeki MDA düzeylerinin sırasıyla 14.12±0.62,

4.51±0.20, 10.75±1.90 ve sağlıklı kuzularda ise 9.56±1.39, 2.43±0.38, 10.64±1.06 olarak saptanması, hastalığın kalp ve iskelet kaslarında MDA düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu bulguların bu yöndeki bildirimler^{7,22,23} ile uyum içinde olduğu görülmüştür. Karaciğerlerde LPO düzeylerinde artış olmayışı, hastalığın bu dokuda oksidatif hasar şekillendirecek kadar reaktif oksijen türlerini açığa çıkarmadığı görüşünü akla getirmektedir.

Selenyum içeriği yetersiz yemlerle beslenen kuzuların iskelet kaslarında sülfidril ve GSH düzeylerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada²⁴ kaslarda GSH düzeylerinde azalma rapor edilmiştir. Bir başka araştırmada ise, E vitamini ve Se içeriği yetersiz yemlerle beslenen ratlarda T-2 toksik maddesi ve vomitoxin ile toksikasyon oluşturulduktan sonra, beyin ve dalakta GSH düzeylerinde belirgin bir azalma bildirilmiştir²⁵. Yine E vitamini ve Se eksikliği ile birlikte seyreden Mulberry kalp hastalığı, domuzlarda deneysel olarak oluşturulduktan sonra kalp ve iskelet kaslarında GSH düzeylerine bakılmış ve özellikle iskelet kaslarında GSH düzeylerinde belirgin bir azalma tespit edilmiştir²⁶. Bunlara paralel olarak çalışmamızda da Beyaz Kas Hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kasları ile karaciğerlerinde GSH düzeyleri sırasıyla 0.80±0.02, 0.99±0.03, 0.49±0.03 ve sağlıklılarda ise aynı sıraya göre 1.11±0.45, 1.95±0.09, 0.52±0.02 olarak tespit edilmiştir. İskelet ve kalp kası dokularında belirgin olan bu düşüşün, bazı ya-

zararların²⁴⁻²⁶ da bildirdikleri üzere, Se ve E vitamini eksikliği sonucu oluşan süperoksid ve hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri korumak amacıyla şekillenen GSH'nın reaksiyona girmesine bağlı olarak oluşabileceği kanaatine varılmıştır. Karaciğerde ise, LPO ile ilişkili bir antioksidan ajan olan GSH düzeyinde önemli bir düşüş olmaması, ortamda LPO oluşmasına neden olacak düzeyde oksidatif dokü hasarının oluşmadığı fikrini akla getirmektedir.

Katalaz, serbest radikallerin birikmesini ve LPO'nun başlamasını önleyen önemli bir enzimdir. Bu enzim mevcut serbest radikalleri daha az zararlı moleküllere dönüştürmekte, ya da serbest radikallerin diğer moleküllerden teşekkülünü önleyerek etkisini göstermektedir.^{11,14} E vitamini ve Se içeriği yetersiz diyetle beslenen ratlarda T-2 toksini ve vomitoxin ile toksikasyon oluşturulan bir çalışmada²³ karaciğerde CAT enzim aktivitesinde önemli bir azalma bildirilmiştir. Araştırmamızda da Beyaz Kas Hastalıklı kuzuların kalp ve iskelet kasları ile karaciğerlerinde CAT enzim aktiviteleri sırasıyla 13.81 ± 0.61 , 54.03 ± 8.54 , 646.88 ± 45.11 iken, sağlıklı kuzularda 14.72 ± 1.03 , 93.61 ± 6.33 ve 656.05 ± 63.17 olarak saptanmıştır. Hastalıklı kuzulara ait kalp ve iskelet kaslarında CAT enzim aktivitesindeki düşüş, hastalık esnasında oluşan reaktif oksijen türlerini durdurmak ya da yok etmek için, bir antioksidan enzim olan CAT'ın reaksiyona girmesi ile izah edilebilir²³. Karaciğerde ise, CAT enzim aktivitesinde önemli bir değişikliğin gözlenmemesi, LPO ile sonuçlanan oksidatif dokü hasarının şekillenmemesine yorumlanabilir.

Bu çalışmada, elde edilen verilere dayanılarak, Beyaz Kas Hastalığı'nın özellikle kalp ve iskelet kaslarında E vitamini ve Se eksikliğine bağlı olarak LPO'nu (MDA) arttırdığı ve bunun da bu dokularda GSH düzeyleri ile CAT enzim aktivitelerinde düşüşe neden olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lannek N, Lindberg P: Vitamin E and selenium deficiencies (VESD) of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, 19: 127-164, 1975.
2. Çamaş H, Seehawer J, Köküslü C, Bronsch K, Salmann HP und Drommer W: Zur ursache der ernährungsbedingten Muskel-dystrophie bei sauglaemmern in der Türkei, *J Vet Med A*, 33: 509-522, 1986.
3. Blood DC, Radostits OM: *Veterinary Medicine*. 7th ed, 1187-1202, Bailliere Tindall, 1989.
4. Özcan C, Aytuğ CN: Gebe koyunlar ve kuzularda sodyum selenit ve vitamin E tatbikatlarının beyaz kas hastalığı üzerine profilaktik etkisi ile ilgili saha denemeleri. *AÜ Vet Fak Derg*, 19:63-75, 1972.
5. Aytuğ CN, Alaçam E, Özkaç Ü, Yalçın C, Türker H, Gökçen H: Koyun keçi hastalıkları ve yetiştiriciliği. Tüm Vet Hayvancılık Hizmetleri Yayını, No: 2, İstanbul, 1990.
6. Jackson MJ, Edwards RHT: Free radicals and trials of antioxidant therapy in muscle disease, In: antioxidants in therapy and preventive medicine. Edited by J. Emerit et. al. Plenum Press, New York, 1990.
7. Horwitt MK: Role of vitamin E, selenium and polyunsaturated fatty acids in clinical and experimental muscle disease. *Fed Proc*, 24: 68-72, 1965.
8. Naqui A, Chance B: Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann Rev Biochem*, 55: 137-166, 1986.
9. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem*, 58:79-110, 1989.
10. Czapski G: Reaction of OH: In Colowick SP, Kaplan NO (eds). *Methods in Enzymology*, Volume 105, Academic Press, 209-215, Inc, New York, 1984.
11. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47: 412, 1982.
12. Seven A, Seymen O, Hatemi S, Hatem H, Yiğit G, Candan G: Lipid peroxidation and vitamin E supplementation in experimental hyperthyroid state. *Tr J Med Sci*, 25:257-259, 1995.
13. İnal M, Kanbak G, Alataş Ö: Antioxidant enzyme activities in diabetes mellitus. *Tr J Med Sci*, 21: 155-157, 1993.
14. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73: 334-339, 1989.
15. Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, 1. Baskı, Konya, 1995.
16. Meister A: New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rew*, 42(12): 357-410, 1984.

17. Singh A, Lee KJ, Lee CY: Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 80 (6): 1795-1804, 1989.
18. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total protein-bound and, nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205, 1968.
19. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105: 121-126, 1984.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
21. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16:359-364, 1966.
22. Fry JM, Smith GM, McGrath MC, Speijers EJ, Alten JG: Plasma and tissue concentrations of alpha-tocopherol during vitamin E depletion in sheep. *Br J Nutr*, 69(1):225-232, 1993.
23. Atroshi F, Rizzo A, Biese I, Salonen M, Lindberg LA, Saloniemi H: Effects of feeding T-2 toxin and deoxynivalenol on DNA and GSH contents of brain and spleen of rats supplemented with vitamin E and C and selenium combination, *J Anim Physiol Anim Nutr*, 74(3):157-164, 1995.
24. Broderius MA, Whanger PD, Weswik PH: Tissue sulfhydryl groups in selenium-deficient rats and lambs. *J Nutr*, 103(3): 336-341, 1973.
25. Nolan MR, Kennedy DG, Blanchflower WJ, Kennedy S: Feeding corn oil to vitamin E-deficient pigs increases lipid peroxidation and decreases tissue glutathione concentrations. *J Vit Nutr Res*, 65(3):181-186, 1995.
26. Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M, Sankari S, Elovaara E: Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J Vet Med A*, 41(2):81-90, 1994.