

BRUCELLA ABORTUS İLE ENFEKTE SIĞIRLARIN ERİTROSİT ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ve LİPİT PEROKSİDASYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLER

Ebru BEYTUT*

Nadide Nabil KAMILOĞLU*

Yayın Kodu: 2005/16-A

Özet: Bu çalışmada, *Brucella abortus* (*B. abortus*) ile enfekte olmuş sığırların eritrositlerindeki redükte glutatyon (GSH), lipid peroksidasyonunun bir indikatörü olan tiyobarbiturik asit substratları (TBARS) düzeyleri, glutatyon peroksidaz aktivitesi (GSH-Px, EC. 1.11.1.9), ile plazma TBARS, β -karoten, A ve E vitaminlerinin düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için, Kars ve yöresinin değişik köylerinden ve bölgedeki iki kesim haneden sağlanan 20 sağlıklı ve 20 adet ikinci trimesterde abort yapmış ve serolojik testlerle *B. abortus* ile enfekte olduğu belirlenen toplam 40 sığırdan alınan kan numuneleri kullanılmıştır. *B. abortus* ile enfekte sığırların plazma TBARS düzeylerinin kontrollere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu ($p<0.01$), bununla birlikte eritrosit GSH-Px aktivitesinin ve GSH düzeylerinin ise düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). Yine, plazma E, A vitamini ile β -karoten düzeyleri de kontrollere göre düşük olarak belirlendi ($p<0.01$). Sonuç olarak; sığırlarda *B. abortus*'a bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres, plazma TBARS düzeylerini artırırken, eritrosit GSH düzeyleri ve GSH-Px aktiviteleri ile plazma A, E vitaminleri ve β -karoten düzeylerinde azalışa neden olmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Brucella abortus*, GSH, GSH-Px, TBARS, E vitamini, A vitamini.

Lipid Peroxidation and Antioxidant Defence System in Erythrocyte of Cattles Infected with *Brucella Abortus*

Summary: The aim of this work was to determine the levels of β -carotene, vitamin A, E and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as indicator of lipid peroxidation in the plasma and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px, EC. 1.11.1.9) and the levels of reduced glutathione (GSH) and the TBARS in red blood cell of cattle infected with *Brucella abortus* (*B. abortus*). In this study, blood samples of 20 healthy and 20 heifers aborted in second trimester of gestation found to be brucella-positive by serological tests were used. The cattle were brought from various villages in Kars region and slaughtered in two local abattoirs. Our results show that the TBARS levels in the cattle infected with *B. abortus* were significantly ($p<0.01$) increased and GSH-Px activity and GSH levels in the erythrocytes were significantly decreased as compared to the healthy cattle. Also, vitamin E, A and β -carotene levels in the plasma of the infected animals were significantly decreased. These results indicate that *B. abortus* infection-induced oxidative stress was reduced the vitamin E, A and β -carotene levels in plasma and GSH levels and GSH-Px activity in the erythrocytes of cattle.

Keywords: *Brucella abortus*, GSH, GSH-Px, TBARS, vitamin E and vitamin A.

GİRİŞ

Brusellozis, dünyanın pek çok ülkesinde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bir zoonozdur. Enfeksiyon genellikle plasental dokularla oral veya konjunktival temas veya enfekte süt ve süt ürünlerini tüketmek suretiyle bulaşmaktadır^{1,2}. Ruminantlarda brusellozis, *Brucella abortus*'un (*B. abortus*) plasentanın korio-allantoik hücrelerine yerleşip çoğalmasıyla plasentit, fetal ölüm ve genellikle gebeliğin ikinci veya son trimesterinde oluşan yavru atımıyla kendini gösterir^{3,4}. *B. abortus*, fakültatif, hücre içi gram negatif bir bakteridir. Bütün aerobik organizmalar oksidatif bileşiklere karşı koruyucu mekanizmaya sahiptir^{5,6}. Bununla birlikte fagositik hücreler bu bakterileri yok etmek için oksijen radikallerini kullanır⁶⁻⁸.

Normal koşullar altında reaktif oksijen türlerinin

(ROS) oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında ince bir denge bulunur. Serbest radikaller, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotidler ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olabilirler^{9,10}. Serbest radikal hasarına karşı ilk savunma glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), ve süperoksitdismutaz (SOD)'ı içeren antioksidan enzimler ile başlatılır. Diğer taraftan ikincil olarak ise E, A, C vitamini, β -karoten ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar serbest radikalleri yakalayarak ve zincir reaksiyonlarını kırarak hasar verici etkilerini önler^{10,11}.

Bitkisel orijinli ve yağda eriyen E, A vitamini ve β -karotenin üreme, dolaşım, sinir sistemi ve immun sistemin düzenlenmesi ve optimal çalışması için esansiyel olduğu bilinmektedir¹²⁻¹⁴. Bu vitaminler direkt olarak immun hücreleri etkileyerek veya indirekt olarak

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

geri dönüşümlü biçimde immün fonksiyonları etkileyen metabolik ve endokrin parametreleri değiştirerek aktivite gösterirler^{12,15,16}. Bunların immün fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bu etkilerinin büyük oranda bunların antioksidan potansiyelleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir^{12,17}. Enfeksiyöz hastalıkların oluşturduğu stres koşulları altında E, A, C vitamini ve β -karotenin emilimi bozulur ve bunlara olan ihtiyaç artar^{12,14,15}. Aynı şekilde GSH-Px ve SOD gibi enzimlerin yapısına giren Se, Fe, Zn ve Cu gibi minerallerin de emilim düzeylerinde strese bağlı azalma olduğu bilinmektedir¹⁴. Bununla birlikte, enfeksiyon etkenlerine karşı organizmanın geliştirdiği immün yanıt esnasında, nötrofiller ve marofajlar tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin baskılanmasında, bu antioksidanların rolü oldukça önemlidir^{8,12,16,18}.

Bu çalışmada, Brusella abortus ile enfekte sığırların eritrosit ile plazma antioksidan ve lipid peroksidasyon (LPO) düzeylerindeki değişiklikleri belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın materyalini, Kars ve yöresinin değişik köylerinden ve bölgedeki iki kesim haneden sağlanan 20 sağlıklı ve 20 de ikinci trimesterde abort yapmış, ayrıca serolojik testlerle brusella ile enfekte olduğu belirlenen toplam 40 sığır oluşturdu.

Plazmada A, E vitamini, β -karoten ve lipid peroksidasyon düzeylerinin ve eritrositlerde GSHPx aktivitesi (EC: 1.11.1.9) ve glutatyon düzeylerinin belirlenmesi için kan numuneleri heparinli vakumlu tüplere v. jugularisten alındı. Plazma ve kırmızı kan hücreleri santrifüj edilerek ayrıldı (4°C ve 2500 g'de 15 dakika). Plazmalar analizleri yapıncaya kadar -20°C de deep-freeze de saklandı. Kırmızı kan hücreleri 0.9 % NaCl ile üç kez yıkandı ve hemolizatlar 1/10 oranında distile su ilave edilerek hazırlandı ve analiz için çözündürülünceye kadar -20°C de deep-freeze de saklandı. Plazma numuneleri A, E vitamini, β -karoten ve LPO için ve hemolizat ise GSH-Px ve GSH için kullanıldı.

LPO bir göstergesi olarak en yaygın uygulanan metod tiobarbitürik asit (TBA) metodudur. Bu metod LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) ile TBA'nın reaksiyonu temeline dayanır. Plazma LPO tayini Placer ve ark.'nın¹⁹ tanımladığı yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Standart olarak 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma, Chemical Company St. Louis, MO, USA) kullanıldı.

Plazma vitamin E düzeyleri Emmerie-Engel reaksiyonu

kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü²⁰. A vitamini ve β -karoten düzeylerini belirlemek için Suzuki ve Katoh'un²¹ tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

Eritrositte GSH düzeylerini belirlemek için Sedlak ve Lindsay'in²² tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı. GSH'nın sülfidril grubunun asitte çözünerek, tiyol grubunun enzimatik veya kimyasal işlemler ile ölçülmesi bu bileşiğin miktar tayininin temelini oluşturur. Belirlenen absorbans değerleri GSH standart eğrisinden mmol/ml kırmızı kan hücresi olarak hesaplandı. GSH-Px aktivitesi co-substrat olarak cumene hydroperoxide ve indirgenmiş GSH kullanılarak ölçüldü. Ayrıca, enzimatik reaksiyonlar sonunda GSH düzeylerinde meydana gelen azalış Ellman's reagent ile spektrofotometrik olarak 37°C'de ve 412 nm'de Lawrence ve Burk'un²³ tanımladığı yöntemle göre belirlendi. Hemoglobinin (Hb) miktarları siyanmethemoglobin metoduna göre belirlendi²⁴.

Veriler SPSS istatistik programı (versiyon 9.05) kapsamında T testi ile analiz edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak belirtildi ve p<0.05 istatistiksel farklılığı gösterdi.

BULGULAR

B. abortus ile enfekte ve sağlıklı sığırların plazma A, E vitamini, β -karoten ve lipid peroksidasyon (TBARS) düzeyleri ile eritrosit TBARS, glutatyon (GSH) değerleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. B. abortus ile enfekte ve sağlıklı sığırların plazma ve eritrosit antioksidan düzeylerindeki değişiklikler.

Table 1. Changes in Plasma and erythrocyte antioxidant levels of the healthy and B. abortus infected cattle.

Parametre	Gruplar	
	Sağlıklı X \pm SD ¹	Enfekte X \pm SD
TBARZ Plazma (nmol/mL)	1.88 \pm 0.75	6.25 \pm 0.57*
TBARZ Eritrosit (nmol/mL)	2.53 \pm 0.82	7.76 \pm 0.90*
GSH (nmol/ml RBC)	2.52 \pm 7.95	0.65 \pm 0.18*
GSH-Px (U/g Hb)	43.64 \pm 7.32	20.71 \pm 4.24*
E Vitamini (μ g/dL)	738.75 \pm 71.61	350.10 \pm 98.47*
A Vitamini (μ g/dL)	31.71 \pm 3.7	17.64 \pm 2.52*
β-Karoten (μ g/dL)	342.03 \pm 54.59	106.67 \pm 10.78*

*: p<0.001, ¹: Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

B. abortus ile enfekte sığırların plazma A, E vitaminleri ve β -karoten değerleri sağlıklı olanlara kıyasla önemli derecede düşük tespit edildi ($p<0.001$). Bununla birlikte, *B. abortus* ile enfekte sığırların plazma ve eritrosit TBARS düzeyleri sağlıklı olanlara kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Diğer taraftan eritrosit GSH ve GSH-Px düzeyleri ise sağlıklı olanlara göre önemli derecede düşük olarak belirlendi ($p<0.001$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

B. abortus sığır burusellozuna sebep olan bir bakteridir. Hastalık ateş, yavru atımı, erkeklerde epididimitis ve sterilite ile karakterize üreme bozuklukları oluşturmakla karakterizedir^{1,3}. *B. abortus* ile enfekte sığırların salgılarının konjunktival olarak veya sindirim yoluyla bulaşmasından sonra bakterilerin büyük çoğunluğu alıcının fagositik hücreleri tarafından fagosite edilir⁸. Vücuda giren bakteriler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından oluşturulan kuvvetli bir oksidatif ortam ile karşılaşır. Enfeksiyon oluşunca bu fagositler, aniden oksijen tüketimini artırır ve H_2O_2 , süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi kuvvetli radikalleri oluşturur^{5,18}. Keza, aerobik canlı hücreler için başlıca risk reaktif oksijen ortamlar ve oksijen metabolizması ara ürünleridir^{5,6}. Bir çok araştırmacı^{6,12,25} pek çok patojenin serbest radikal yapımını uyararak savunma sistemini baskıladığını ve doku harabiyetine neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *B. abortus* ile enfekte sığırların artan plazma ve eritrosit LPO (MDA) düzeyleri de oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Antioksidan aktivite, vücuda giren patojenlere karşı canlının geliştirdiği savunma sisteminin desteklenmesinde esansiyel bir role sahiptir. Antioksidan enzimler serbest radikalleri indirgeyerek LPO artışını ve buna bağlı olarak oluşabilecek hasarı önlemekte görev yaparlar⁹⁻¹¹. Yaptığımız literatür incelemelerinde, *B. abortus* ile enfekte durumlarda antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelebilecek değişiklikleri araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, çalışmamızda, *B. abortus* ile enfekte ve sağlıklı sığırların GSH düzeyleri sırasıyla 2.52 ± 7.95 ve 0.65 ± 0.18 olarak tespit edildi. Yine, *B. abortus* ile enfekte ve sağlıklı sığırların GSH-Px enzim aktivitesi, H_2O_2 'nin katalitik indirgeyicisi, sırasıyla 43.64 ± 7.32 ve $20,71\pm 4.24$ olarak belirlenmiştir. *B. abortus* ile enfekte sığırlarda gözlenen GSH-Px aktivitesi ve GSH düzeylerindeki düşüşün nedeni; hücreleri süperoksit ve hidroksil radikallerinin yıkıcı etkisine karşı korumak için reaksiyona girmelerine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmalar hem humoral hem de hücrel immun cevabın E, A vitaminleri ile β -karotenin antioksidan etkinliği sayesinde atırlabileceğini bildirmektedir^{25,26}. Keza, E vitaminin hem normal metabolizma hem de enfeksiyon etkenlerinin uyardığı inflamasyon sırasında serbest radikallerin artışı ile oluşabilecek patolojik bozuklukları azalttığı belirtilmektedir²⁷. Benzer şekilde, A vitamininin de, brusella enfeksiyonuna karşı periferik monosit fonksiyonunu ve monosit-makrofaj sistemini desteklemek suretiyle etkin bir cevap oluşturduğu ifade edilmektedir^{14,16}. Yine β -karotenin özellikle fizyolojik koşullar altında pek çok dokuda oksijen kısmi basıncının düşük olduğu durumlarda kuvvetli bir antioksidan olarak immun cevabı desteklediği bildirilmektedir^{13,28}. Bu çalışmada, E, A vitaminleri ve β -karoten düzeylerinin düşük oranlarda tespit edilmesinin nedeni olarak; enfeksiyona bağlı LPO'nu ve bu vitaminlerin emilimindeki azalış gösterilebilir. Bu durumda, böyle enfeksiyonlarda bu vitaminlerin takviyesinin canlıların immun sisteminin önemli destekleyicisi olabileceği ifade edilebilir.

Sonuç olarak, *B. abortus*'un serbest radikal artışına neden olabileceği ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıfladığı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 Meador VP, Warner DP, Deyoe BL: Distribution of Brucella abortus organisms in calves after conjunctival exposure. *Am J Vet Res*, 49(12): 2015-2017, 1988.
- 2 Hamdy MER, Amin AS: Detection of Brucella species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet J*, 163: 299- 305, 2002.
- 3 Alexander B, Schnurrenberger PR, Brown RR: Numbers of Brucella abortus in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. *Vet Rec*, 108:500, 1981.
- 4 Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N: Pathology of domestic animals, 3rd ed., vol 3, pp. 346-347, Academic Pres, New York, NY, 1985.
- 5 Beaman L, Beaman B L: The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol*, 38:27-48, 1984.
- 6 Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM, Halling SM: Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of Brucella abortus: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect Immun*. 60(7):2863-2869, 1992.
- 7 Kim JA, Sha Z, Mayfield JE: Regulation of Brucella abortus catalase. *Infect Immun*, 68 (7): 3861-6, 2000.
- 8 Babior BM: Oxygen-dependent killing by phagocytes. *N Engl J Med*, 298:659-668, 1978.
- 9 Halliwell B, Gutteridge JM: Free radicals, lipid peroxidation and cell damage. *Lancet*, 2(8411): 1095, 1984.
- 10 Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease-free radical and tissue injury. *Lab Invest*, 47: 412, 1982.
- 11 Halliwell B: Antioksidants in human health and disease. *Ann*

- Review Nutr*, 16: 33-50, 1996.
- 12 **Biesalski HK, Frank J:** Antioksidants in nutrition and their importance in the anti-/oxidative balance in the immune system. *Immun Infekt*, 23(5):166-73, 1995.
 - 13 **Chew BP, Park JS, Wong TS, Kim HW, Weng BB, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA:** Dietary beta-carotene stimulates cell-mediated and humoral immune response in dogs. *J Nutr*, 130(8):1910-3, 2000.
 - 14 **Albers R, Bol M, Bleumink R, Willems AA, Pieters RH:** Effects of supplementation with vitamins A, C, and E, selenium, and zinc on immune function in a murine sensitization model. *Nutrition*, 19(11-12):940-6, 2003.
 - 15 **Lopez MC, Giraudo Conesa LC:** Importance of the retinoids in malnutrition, the immune response in cancer. *Medicina (B Aires)*, 42(4):438-44, 1982.
 - 16 **Ritacco KA, Nockels CF, Ellis RP:** The influence of supplemental vitamins A and E ovine humoral immune response. *Proc Soc Exp Biol Med*, 182 (3): 393-398, 1986.
 - 17 **Leshchinsky TV, Klasing KC:** Relationship Between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poult Sci*, 80: 1590-1599, 2001.
 - 18 **Boura P, Tsapas G, Papadopoulou A, Magoula I, Kountoras G:** Monocyte locomotion in anergic brucellosis patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 11(1): 119-129, 1989.
 - 19 **Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC:** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16: 359-364, 1966.
 - 20 **Kayden HJ, Chow CK, Bjornson LK:** Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J Lipid Res*, 14: 533-540, 1973.
 - 21 **Suzuki JI, Katoh N:** A simple and cheap methods for measuring serum vitamin A in cattle only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci*, 52 (6): 1281-1283, 1990.
 - 22 **Sedlak J, Lindsay RH:** Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205, 1968.
 - 23 **Lawrence RA, Burk RF:** Glutathione-peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71: 952-955, 1976.
 - 24 **Drapkin DL:** Haemoglobin spectrometric studies, part XIV. *J Biol Chem*, 164: 703-708, 1946.
 - 25 **Tengerdy RP, Ameghiono E, Riemann H:** Serological responses of rams to a Brucella ovis vitamin E adjuvant vaccine. *Vaccine*, 9: 273-276, 1991.
 - 26 **Nockels CF:** Protective effects of supplemental vitamin E against infection. *Fed Proc*, 38 (7): 2134-8, 1979.
 - 27 **Gershwin MR, Beach R, Hurley L:** The potent impact of nutritional factors on immune response. *Nutr Immun*, PP 1-7, Academic Pres, New York, NY, 1985.
 - 28 **Burton GW, Ingold KU:** β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573, 1984.

Yazışma Adresi (Correspondence address)

Doç.Dr. Ebru BEYTUT
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars- TÜRKİYE
Tel: +90 474 2426800-1147
Fax: +90 474 2426853