

Mastitisli İneklerde Kan MDA ve GSH Düzeylerinin Araştırılması [1] [2]

Haci Ahmet DEVECİ *

Aysel GÜVEN *

[1] KAÜ Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: FEF-07).

[2] Bu makale ilk isim yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

* Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kars, TÜRKİYE

Yayın Kodu (Article Code): 2008/05-A

Özet

Bu çalışmada, mastitisli ve sağlıklı ineklerde kan malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, Kars ve Ardahan yöresinde değişik köylerde halk elinde yetiştirilen yaşları 3 ile 7 arasında değişen 20 sağlıklı ve 20 klinik mastitisli inek seçildi. Hayvanlardan kan örnekleri alınmadan önce mastitisli olup olmadıkları Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ile belirlendi. Daha sonra eritrosit GSH ve plazma MDA düzeylerine bakıldı. Sağlıklı ve mastitisli gruplarda eritrosit GSH ($p<0.001$) ve plazma MDA ($p<0.001$) düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu. Sonuç olarak, mastitisin lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda MDA düzeylerinde bir artışın meydana geldiği, yine aynı şekilde endojen bir antioksidan olan GSH düzeylerinin mastitisli hayvanlarda önemli bir azalmaya uğradığı görüldü.

Anahtar sözcükler: İnek, Mastitis, Malondialdehit (MDA), Redükte glutatyon (GSH), Lipid peroksidasyonu

Investigation of Blood MDA and GSH Levels in Cow with Mastitis

Summary

In this study it was aimed to determine the levels of blood lipid peroxidation (MDA) and GSH levels in healthy and mastitic cows. In this study, 20 healthy and 20 clinic mastitic cows ages between 3 and 7 were selected from different villages in Kars and Ardahan region. Firstly, the animals by California Mastitis Testing (CMT) in order to determine whether they have mastitis or not. Then, the erythrocyte GSH and plasma MDA levels were determined. The differences between erythrocyte GSH ($p<0.001$) and plasma MDA ($p<0.001$) levels between healthy and mastitic groups were found statistically different. In conclusion, it was found that mastitis resulted in lipid peroxidation and which was measured by caused an increase in the levels of MDA. Similarly, the levels of GSH an endogenous antioxidant caused a significant decrease in mastitic animals.

Keywords: Cow, Mastitis, Malondialdehyde (MDA), Reduced glutathione (GSH), Lipid peroxidation

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2426800/1019

e-mail: h.ahmet_deveci@hotmail.com

GİRİŞ

Süt inekçiliğinde gerek süt üretimi ve kalitesini, gerekse hayvan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden hastalıklardan biri olan mastitis, ineklerde meme bezlerinde mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen iltihabi bir meme hastalığıdır. Hastalık süt veriminin azalması, süt bileşiminin değişimi ve bozulmasının yanında meme loblarında sıcaklık artışı, kızarıklık ve şişkinlik gibi belirtilerle kendini belli eder ¹. Mastitisler, hastalığın seyri ve yangı belirtilerine göre değişik şekillerde sınıflandırılır. Patolojik bulgulara göre mastitisler genel olarak, subklinik ve klinik mastitis olarak sınıflandırılmıştır ^{2,3}.

Aerobik organizmalarda moleküler oksijenin varlığı ve bunların elektron alma eğilimlerinden dolayı, hücrelerde sürekli reaktif oksijen türleri meydana gelmekte ve bunun sonucu olarak da lipit peroksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Oksijen, aerobik canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olmasına karşın potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Serbest radikaller, moleküler oksijeni metabolize eden bütün canlılarda oluşur ⁴. Poli-ansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerince zengin olan eritrosit zarları birden çok mekanizma ile sürekli olarak peroksit anyonlarının oluşmasına neden olurken aynı zamanda granülositler, makrofajlar ve metabolik aktif hücrelerde süperoksit anyonları üretilir ^{5,6}.

Organizma için oksidatif stres kaynağı olan gebelik, doğum ve laktasyon gibi durumlar plazmada serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca bulaşıcı hastalıklar, stres ve mastitis gibi hastalıklarda da serbest radikal artışı kaçınılmazdır ^{7,8}. Serbest radikallerin artması sonucu meydana gelen oksidatif hasara bağlı olarak, membran bütünlüğünün bozulduğu, DNA zincirlerinde kopma olduğu, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının değiştiği, sonuçta çeşitli biyolojik indikatörlerin düzeylerinde değişikliklerin meydana geldiği ve bunun yangı oluşumuyla birlikte ortaya çıkan klasik bulgularla doğrudan ilişkili olduğu ifade edilmektedir ⁹.

Savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı zaman serbest radikaller, membrandaki yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu, organizmada bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidro-

jen uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur. Malondialdehit ise lipit peroksidasyonunun saptanmasında yaygın olarak kullanılır ^{10,11}.

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada antioksidan olarak ifade edilen koruyucu mekanizmalar vardır. Bu koruyucu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlerken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Organizmada bulunan endojen ve eksojen antioksidanlar reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidanlardan biri de redükte glutatyon (GSH)'dur. Glutatyon, glutamik asit, sistin ve glisinden ibaret bir tripeptit olup, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır ⁷. Yapılan araştırmalarda; antioksidanlar düzeyinde meydana gelen azalmanın mastitis riskini arttırabileceği ve antioksidan takviyesinin ise bunun önlenmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir ^{12,13}.

Bu çalışmada, süt sığırcılığının önemli bir sorunu olan ve büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitisin ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerini nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu araştırma, Kars ve Ardahan yöresindeki değişik köylerde halk elinde yetiştirilen, yaşları 3 ile 7 arasında değişen 20 sağlıklı ve 20 klinik mastitisli olmak üzere toplam 40 baş inek üzerinde yürütüldü. İneklerin mastitisli olup, olmadıkları Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ile belirlendi.

Kan Örneklerinin Alınması

Mastitisli ve sağlıklı inekler belirlendikten sonra V. jugularis'ten 10 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri buz çantasında laboratuvara getirildi. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan plazma kısmı kapaklı polipropilen tüplere alındı. Alınan bu plazmalar, plazmada lipit MDA düzeyleri belirleninceye kadar -20°C'de deep freeze'de saklandı. Plazma kısmı ayrıldıktan sonra altta kalan kırmızı kan hücreleri üç defa serum fizyolojik ile yıkanarak eritrosit paketleri yapıldı. Bu eritrosit paketleri yine kapaklı

polipropilen tüplere alındı ve eritrosit GSH düzeyleri belirleninceye kadar -20°C 'de deep freeze'de saklandı.

Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Düzey Tayini

Plazmada lipit peroksidasyonu ürünü MDA'yı belirlemek için Ohkawa ve ark.¹⁴'ün tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Eritrositte GSH düzeylerini belirlemek için Sedlak ve Lindsay¹⁵'in tanımladığı spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel hesaplamalar MINITAB for Windows Release 12.1 bilgisayar programı kullanılarak gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel önemliliği *2-Sample t-testi* kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Önemli bir sağlık ve ekonomik problem olan mastitisin, ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerini nasıl değiştirdiğini araştırmak için yapılan bu çalışmada Tablo.1'den de anlaşılacağı üzere, mastitisli ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta GSH değerleri yüksek iken mastitisli grupta ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca lipit peroksidasyonu ürünü olan MDA'nın sağlıklı grupta düşük, mastitisli grupta ise yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarına ait GSH ve MDA

Table1. GSH and MDA values from control and treatment groups

GRUPLAR (n=40)	GSH ($\mu\text{mol/ml}$) $\bar{X}\pm\text{SD}$	MDA (nmol/ml) $\bar{X}\pm\text{SD}$
Kontrol Grubu (n=20)	1.39 \pm 0.02	4.55 \pm 0.20
Deney Grubu (n=20)	1.33 \pm 0.03*	5.26 \pm 0.40*

*p < 0.001

TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt sığırcılığında sık görülen ve önemli bir yangısal hastalık olan mastitis, tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz hayvancılığında da büyük oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunun için mastitisin erken teşhis edilmesi, uygun tedavinin

ve korunma yöntemlerinin uygulanması önerilmektedir¹⁶.

Bu çalışmada, mastitisin ineklerde kan MDA ve GSH düzeylerini ne ölçüde etkileyebileceği ile hayvanlarda teşhis ve tedavinin erken yapılmasında biyokimyasal parametrelerin önemini tartışmak amaçlanmıştır. Çalışmada mastitisli ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, sağlıklı grupta GSH değeri 1.39 ± 0.02 $\mu\text{mol/ml}$, mastitisli grupta ise 1.33 ± 0.03 $\mu\text{mol/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Yine sağlıklı grupta MDA değeri 4.55 ± 0.20 nmol/ml iken mastitisli grupta 5.26 ± 0.40 nmol/ml olarak bulunmuştur.

Farklı türlerde, yangısal hastalıklarda yangının gelişimi ve ilerlemesinde serbest radikal oluşumunun direkt ve indirekt bir rol oynadığını gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır^{13,17,18}. Meme bezi yangılarında fagositik hücrelerin yangı yerine göçü sonucu aktivitelere bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipit peroksidasyonu oluşmakta ve lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA düzeyi artmaktadır¹⁹.

Dündar ve ark.²⁰, sağlıklı ve mastitisli ineklerde kan MDA düzeyi farkını önemli bulurken, süt MDA düzeyini farkını ise önemsiz bulmuşlardır. İncelenen literatürlere göre mastitisli ineklerde MDA değerlerinin sağlıklı ineklere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir^{13,21}. Başka bir çalışmada ise sağlıklı ve mastitisli koyunlar arasında plazma MDA düzeyi farkı önemsiz bulunmuştur²². Şındak ve ark.²³, sağlıklı ve çeşitli ayak hastalığı olan sığırlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise değişik ayak hastalığı olan sığırların, sağlıklı sığırlarla kıyaslandığında plazma MDA düzeylerinde önemli bir artışın meydana geldiğini saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen MDA değerleri de literatür çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir^{18,19,20,21,23}.

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler, kuvvetli bir endojen antioksidan olan GSH tarafından peroksidasyonun erken dönemlerinde zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini koruyarak oksidatif strese karşı savunma hattını oluşturmasıyla önlenmektedir²⁴. Bazı araştırmacılar, mastitisli ineklerde GSH seviyesinin sağlıklı ineklere oranla daha düşük olduğunu bildirmektedirler^{13,21,25}.

Mastitis olgularında yangıya bağlı olarak mey-

dana gelen serbest radikallerin etkisi sonucu antioksidan kullanımını artmakta, bunun sonucunda da antioksidanların düzeyleri azalmaktadır. Bu çalışma, mastitisli ineklerde GSH değerleri kontrollerle kıyaslandığında yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir^{13,18,21,25}. Gürgöze ve ark.¹⁸, sağlıklı ve bursitis prekarpalis'li sığırlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, GSH düzeylerinin azaldığını, plazma MDA düzeylerinin ise arttığını saptamışlardır.

Şimşek ve ark.²⁴, yaptıkları bir araştırmada sağlıklı ve mastitisli gruplar arasındaki farkı istatistiksel olarak plazma MDA düzeyinde artış ve eritrosit GSH düzeyinde ise azalmanın olduğunu bildirmişlerdir (p<0.001). Yapılan bu çalışmada elde edilen GSH ve MDA düzeyleri Şimşek ve ark.²⁴ ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak bu araştırmada, mastitisli ineklerde lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA ve önemli bir endojen antioksidan olan GSH düzeylerinde önemli değişikliklerin olduğu saptandı. Bu aynı zamanda mastitisin erken teşhis ve tedavisi ya da diğer hayvanlara bulaşmasını önlemek açısından da önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Timurkan H:** Sığırların meme yangısı. *Yüzüncü Yıl Üniv. Vet Fak Derg*, 4 (1-2): 237-250, 1993.
2. **Eskiizmirliler S:** Sığırlarda Mastitis. *Büyükbaş Hayvan Hastalıkları, Çiftçi Eğitim Serisi Yayınları*, Ankara, 6, 21-35, 2004.
3. **Huang LQ, Rongxiang-Cai MS:** Correlation between somatic cell counts, bacteria and enzymes in milk of subclinical mastitis. *Proceeding of the Third IDF International Mastitis Seminar*. Telaviv, Israel, 88-91, 1995.
4. **Stolon I, Oros A, Moldaveanu E:** Mineral view, apoptosis and free radicals. *Biochem Mol Med*, 59, 93-97, 1996.
5. **Sözmen EY, Onat T, Tanyolaç T, Erlaçın S:** Eritrositlerin antioksidan enzimlerde yaşa bağlı değişiklikler. *Biyokimya Derg*, 18 (3): 83-89, 1993.
6. **Güven A, Güven A, Kamiloğlu NN:** Kefirin lipit peroksidasyonuna etkilerinin araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 10 (2): 165-169, 2004.
7. **Akkuş İ:** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
8. **Arıkan S, Konukoğlu D, Arıkan Ç, Akçay D, Davas İ:** Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest*, 51, 145-149, 2001.
9. **Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC:** The role of oxidative stress in inflammation in patients with juvenil rheumatoid arthritis. *J Pediatr*, 76 (2): 125-132, 2000.
10. **Esterbauer H, Cheeseman KM, Dianzani MU, Poli G, Slater TF:** Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidations stimulated in rat liver microsomes. *Biochem J*, 208, 129-140, 1982.
11. **Yerer MB, Aydoğan S:** Oksidatif stres ve antioksidantlar. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg.*, 9 (1): 49-53, 2000.
12. **Tekkes Y:** Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv, Fen Bil Enst., Kahramanmaraş, 2006.
13. **Şimşek H, Aksakal M:** Subklinik mastitisli ineklerde E vitamininin plazma A vitamini, beta- karoten, glutatyon peroksidaz, redükte glutatyon ve süt A vitamini düzeylerine etkisi. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 20 (3): 199-203, 2006.
14. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi:** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358, 1979.
15. **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.
16. **Smith KL:** Mastitis control: A discussion. *J Dairy Sci*, 66, 1790- 1794, 1983.
17. **Kızıl Ö, Gül Y:** Şap aşısı uygulanan besi sığırlarında antioksidan vitaminlerin klinik ve hematolojik parametreler ile antioksidan enzim ve lipit peroksidasyon düzeylerine etkisi. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 18 (2): 97-106, 2004.
18. **Gürgöze SY, Şındak N, Yılmaz S, Sertkaya H, Ozan ST:** Bursitis prekarpalisli sığırlarda kortikosteroid tedavisinin bazı antioksidan enzim ve lipit peroksidasyon seviyeleri üzerine etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 14 (2): 97-101, 2003.
19. **Mayer SJ, Wterman AE, Keen PM, Craven N:** Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of oxygen tension. *J Dairy Sci*, 55, 513-519, 1988.
20. **Dündar Y, Eryavuz A, Aslan R, Uçar M:** Malondialdehyde and glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in healthy and subclinical mastitis cows. *Yüzüncü Yıl Üniv Sağlık Bil Dergisi*, 6, 84-86, 2000.
21. **Atroshi F, Työppönen J, Sankari S, Kanganstemi R, Parantainen J:** Possible roles of vitamin E and glutathione metabolism in bovine mastitis. *Interna J Vit Nutr Res*, 57, 37-43, 1986.
22. **Colitti M, Stradaidi G, Stefanon B:** Effect of α -tocopherol deprivation on the involution of mammary gland in sheep. *J Dairy Sci*, 83, 345-350, 2000.
23. **Şındak N, Gürgöze SY, Sertkaya H, Biricik HS:** Bazı ayak hastalıklarının antioksidan enzim ve lipit peroksidasyon düzeyleri üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 15 (1-2): 5-9, 2004.
24. **Şimşek H, Aksakal M:** Subklinik mastitisli ineklerde kan ve sütte lipit peroksidasyon ve bazı antioksidanlar üzerine E vitamininin etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 52, 71-76, 2005.
25. **Atroshi F, Parantainen J, Sankari S, Osterman T:** Prostaglandins and glutathione peroxidase in bovine mastitis. *Res Vet Sci*, 40, 361-366, 1986.