Ankara Üniv Vet Fak Derg, **64**, 161-164, 2017
DOI: 10.1501/Vetfak_0000002793

Septisemili buzağılarda lipid peroksidasyon düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri

Öğünç MERAL[1], Nazlı ERCAN[2], Ulvi Reha FİDANCI[1]

[1]Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara; [2]Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye.

Özet: Oksidatif stres ile hastalıkların patogenezi arasındaki ilişki son yıllarda gerçekleştirilen değişik çalışmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada septisemili buzağılarda lipid peroksidasyon ürünü olan serum malondialdehit (MDA) ve antioksidan savunma sisteminin parametreleri olan serum glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile total bilirubin ve albumin düzeylerinin belirlenerek neonatal septisemi ile ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini 13 sağlıklı ve 40 septisemili buzağı serum örnekleri oluşturmaktadır. Septisemili grup ile kontrol grubu arasında serum MDA ve albümin düzeyleri arasında fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Septisemili buzağıların serum GPx, SOD ve total bilirubin düzeylerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Elde edilen bu bulgular buzağılarda görülen septiseminin patogenezinde oksidatif stresin rolü olduğu kanaatini oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Glutatyon peroksidaz, neonatal septisemi, oksidatif stres, süperoksit dismutaz.

Lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities in septicemic calves

Summary: In recent years, studies showed that there is a close relationship between oxidative stress and pathogenesis of the disease. The aim of the study is to determine the serum malondialdehyde (MDA) levels for lipid peroxidation status and serum glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), total bilirubin and albumin levels for antioxidant activities to find out the possible relationship between oxidative stress and septicemia in calves. The materials of this study are 40 septicemic and 13 healthy calves. No significant differences were observed for serum MDA and albumin levels between septicemic and healthy groups ($p>0.05$). Septicemic calves had significantly higher levels of GPx, SOD and total bilirubin as compared to the controls ($p<0.001$). The results obtained from this study suggest that septicemia in calves induced changes of antioxidant enzymes activity. The data obtained from this study indicates that oxidative stress might play important roles in the pathogenesis of septicemia in calves.

Keywords: Glutathione peroxidase, neonatal septicemia, oxidative stress, superoxide dismutase.

Giriş

Buzağılarda neonatal dönemde gram negatif bakterilerin neden olduğu septisemi yaygın olarak görülmekte olup, bu durum ani ölümlere ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (2, 11, 15). Buzağılarda septiseminin gelişmesi, kolostral immunoglobinlerin azalan pasif transferi (28) ve invaziv bakteriyel serotiplere maruz kalma gibi risk faktörlerine bağlıdır. Özellikle gram negatif bakteriyel sepsis yeni doğan buzağılarda önemli bir problem olup (2), patojenik diyare ve ekstraintestinal enfeksiyon oluşturabilen birden fazla virülens faktörüne sahip olan *Escherichia coli*, neonatal buzağı enfeksiyonlarından primer veya sekonder etken olarak izole edilen gram negatif bakteridir (13, 25).

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan reaktif oksijen türevleri, vücudun antioksidatif savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Yüksek miktarda oksijen türevi serbest radikallerin meydana gelmesi ve antioksidatif cevaptaki yetersizlik, kısaca oksidatif stres; biyolojik sistemlerdeki yapı taşlarını olumsuz etkilemekte, bunun sonucu olarak da hücrelerin yapısında, işlevlerinde ve genetik aktivitelerinde önemli hasarlar oluşmaktadır (5).

Canlı organizmada oluşan reaktif oksijen türlerinin etkin ve güvenli bir biçimde uzaklaştırılmasında görev alan antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan SOD ve GPx enzimatik antioksidan olarak etki gösterirken serum albümin ve bilirubin gibi maddeler moleküler antioksidanlar sınıfında yer almaktadır (14, 26, 29).

Bu sürecin gelişimi sırasında şekillenen bir dizi reaksiyon sonucu membran hasarını gösteren önemli biyolojik belirteçlerden MDA ortaya çıkar. MDA miktarının ölçümü ile indirekt olarak lipid peroksidasyonun derecesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (32).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla oksidatif stresin yeni doğan ve erişkinlerde çeşitli sağlık problemlerinin oluşmasının altında yatan en önemli nedenlerden biri olduğu gösterilmiştir (5, 9, 10, 30). Bu çalışmada septisemili buzağılarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak serum MDA ve antioksidan savunma sisteminde yer alan serum GPx ve SOD enzimlerinin aktiviteleri ile total albümin ve bilirubin düzeyleri belirlenerek septisemili buzağılarda lipid peroksidasyonu ve antioksidatif metabolizma değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, Sivas yöresinde bulunan işletmelerde doğan buzağılardan alınan ve kan örneklerinde bakteriyolojik olarak *Escherichia coli* tespit edilen 40 kolibasillozisli ve 13 sağlıklı buzağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

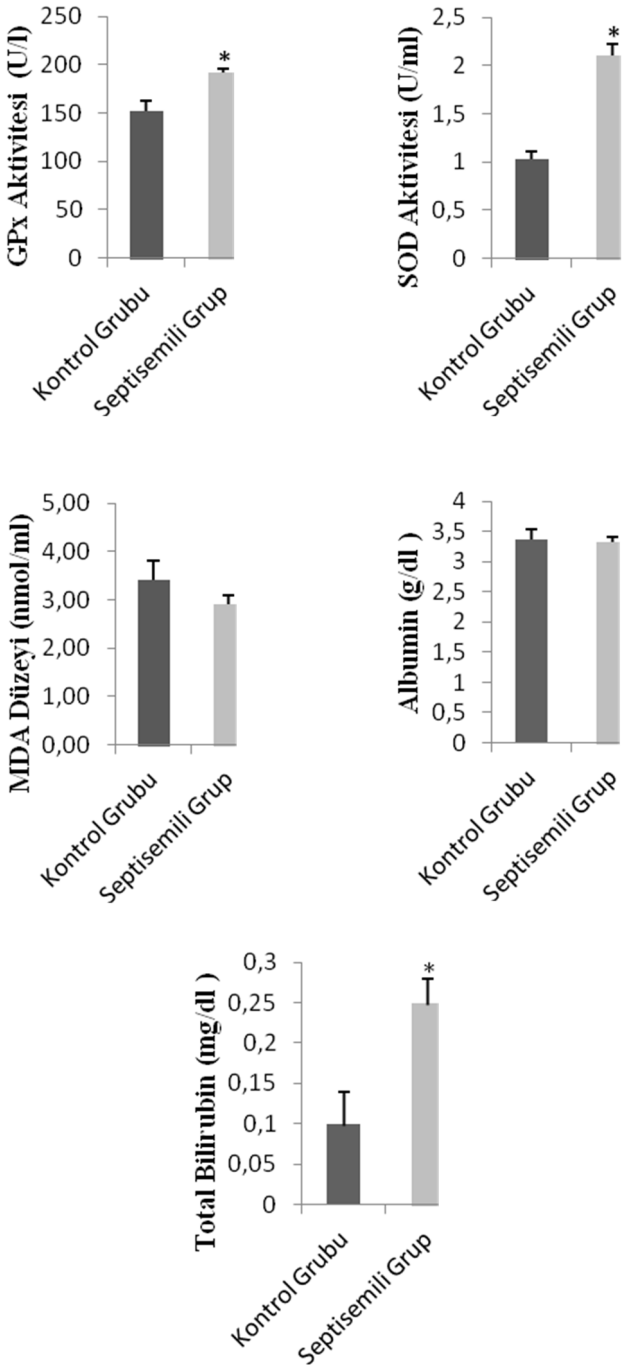
Septisemik kolibasillozis teşhisi için antikoagulanlı kan örneklerinde *Escherichia coli* izolasyonu klasik yöntemlerle yapıldı. Bu amaçla kan örnekleri %5 koyun kanlı agar, çikolata agar, McConkey agar ve 1/5 oranında Triptik Soy Broth'a (TSB) ekildi. Kültürler 36℃'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Besi yerleri her gün koloni oluşumu, bulanıklık yönüyle makroskobik olarak incelendi. Ayrıca TSB kullanılarak zenginleştirme yapılan örneklerden kanlı agar, Mac Conkey agar ve eozin metilen blue (EMB) agara pasajlar yapıldı. Serum MDA düzeyi Yoshioka ve ark. (33) tarafından bildirilen, serum GPx düzeyi Paglie ve Valentie (27) tarafından bildirilen, serum SOD düzeyi Sun ve ark. (31) tarafından bildirilen yöntemlere göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Serum total bilirubin ve albumin miktar tayinleri ticari kitler (ERBA) kullanılarak otoanalizörde (ERBA XL 600) gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçların gruplar arasında göstermiş olduğu farklılık ve bu farklılıkların istatistik önemlerinin gösterilmesi için Student T testi ve Mann-Whitney U analizlerinden faydalanıldı (22).

Bulgular

Kontrol grubu ile septisemili gruptaki hayvanlara ait serum GPx, SOD, MDA, albümin ve total bilirubin düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara uygulanan normallik testi sonucunda MDA, GPx ve SOD ile albümin parametrelerinin normal dağılım gösterdikleri, total bilirubin parametresinin ise normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Normal dağlım gösteren değişkenlerde grup ortalamaları arası farkın önemliliği t testi ile karşılaştırılmış (22), GPx ve SOD ortalamaları arası fark anlamlı ($p<0.001$) bulunurken MDA ve albuminde meydana gelen fark istatistik olarak anlamlı çıkmamıştır ($p>0.05$). Total bilirubin sonuçları için uygulanan Man-Whitney testi sonucunda (22) gruplar arası fark deneme grubunda anlamlı olarak yüksektir ($p<0.001$).



Tablo 1. Sağlıklı ve septisemili buzağıların serum GPx, SOD, MDA, albumin ve total bilirubin düzeyleri (*$p<0.001$).
Table 1. Serum GPx, SOD, MDA albumin and total bilirubin levels of healthy and septicemic calves (*$p<0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Fizyolojik koşullarda organizmada bir denge halindeki oksidatif ajanlar ve antioksidan mekanizmalar arasındaki ilişki, serbest radikallerin artması veya antioksidanların azalması sonucu bozularak oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres ve oksidatif hasarın bilinen pek çok hastalığın patogenezinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır (9, 20, 24).

Lipidler serbest radikallerin meydana getirdiği hasara çok duyarlı olup, lipid peroksidasyonunun belirteçleri oksidatif stres için en iyi gösterge olarak kabul edilmektedir (6). MDA radikallerin uyarımı sonucu çoklu doymamış yağ asitlerinin dekompozisyonu sırasında oluşan düşük molekül ağırlıklı birkaç son üründen birisidir ve kolaylıkla tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek spektrofotometrik olarak ölçülebilen kırmızı renkli bir pigment oluşturur (18). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasara bağlı olarak çeşitli hastalıklarda MDA seviyesin arttığını bildiren pek çok çalışma vardır (1, 7, 8, 12, 19). Ercan ve Fidancı (9) piyoderma tanılı köpeklerde yaptıkları çalışmada MDA seviyelerinin piyodermalı köpeklerde istatiksel olarak arttığını tespit etmişler; tedavi edilmediği durumlarda DNA hasarı oluşabileceği kanısına varmışlardır. Bununla beraber Kumar ve ark. (21) yaptıkları çalışmada neonatal hiperbilirubinemili hastalarda MDA seviyelerinin düştüğünü ve MDA ile bilirubin seviyeleri arasında negatif korelasyon görüldüğünü saptamışlardır.

Bu çalışmada da septisemili buzağıların serum MDA düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak bu düşüklük anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Buna rağmen bilirubin seviyesindeki anlamlı artış ($p<0.001$) MDA seviyelerinin septisemili buzağılarda artmamasının, bilirubin seviyesindeki kaydedilen önemli artışa bağlı olarak baskılanmasından kaynaklandığı kanaati oluşturmuştur. Bu negatif korelasyon, Kumar ve ark. (21) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile de uyumludur.

Birçok antioksidan enzim yapısında olup, toksik molekülleri ya hücrelere zarar vermeden önce yok ederler veya onlardan oluşacak olan toksik moleküllerin meydana gelmesini önlerler (23). SOD antioksidatif sistemde ilk harekete geçen enzim olup, çok toksik olan süperoksit anyonunun dismutasyonunu katalizlemektedir. Süperoksit anyonunun dismutasyonu yoluyla oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ise GPx veya CAT yoluyla inaktive olmaktadır. GPx enzimi, dokuları H_2O_2 ve lipoperoksitlerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyan başlıca enzimdir ve plazma GPx aktivitesi oksidatif stres için iyi bir göstergedir (5). Yine antioksidan metabolizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen yağda çözünen ve radikal tutucu bir antioksidan olan bilirubin, albümine bağlı yağ asitlerini peroksidasyondan korumaktadır (16).

Hayvanlardaki değişik hastalıklarda antioksidatif savunmaya ilişkin çalışmalarda SOD ve GPx aktivitelerine ilişkin farklı sonuçlar bildirilmektedir. Benzer ve Ozan (4) yaptıkları çalışmada *Fasciola hepatica* ile enfekte koyunlarda Değer ve ark. (8) ise *Dismatosis* ile enfekte koyunlarda yaptıkları çalışmada GPx aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Ratlarda deneysel diyabet oluşturulan bir diğer çalışmada diyabetli grubun SOD aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (17). Böbrek hastalığının incelendiği bir çalışmada hasta grupta MDA seviyesini yüksek bulurken, SOD ve GPx enzim aktivitelerinin azaldığını tespit edilmiştir (20).

Bu çalışmada septisemili buzağılarda, kontrol grubuna göre SOD ve GPx enzimlerinin aktiviteleri ile total bilirubin seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.001$). Kapoor ve ark. (19) neonatal septisemide lipid peroksidasyonu ve antioksidanlar arasındaki ilişkiyi inceledikleri bir çalışmada MDA, SOD ve GPx seviyelerinin septisemili grupta arttğını, albumin düzeyinin ise kontrol grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir. Bir diğer neonatal sepsisde yapılan çalışmada MDA ve antioksidatif aktivite arasında pozitif korelasyon tespit ederken albumin seviyesinde düşüş tespit etmişlerdir (3). Çalışmanın sonuçları araştırıcıların bildirimleri ile örtüşmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada septisemili buzağılarda kontrol grubuna göre serum MDA seviyesinde azalma ancak antioksidatif metabolizma ürünlerinden SOD, GPx enzimlerinin aktivitelerinde ve total bilirubin seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.001$). Oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde, MDA yaygın olarak kullanılan bir parametre olup pek çok kaynakta artış gözlendiği bildirilmektedir. Ancak bu çalışmada yüksek total bilirubin düzeyleri ve total bilirubin-MDA arasındaki negatif ilişki nedeniyle, MDA'da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beklenen artış görülmemiştir. Diğer taraftan septisemili buzağılarda azalan lipid peroksidasyon ürünü MDA'nın SOD, GPx ve bilirubin gibi artan antioksidatif metabolizma aktivitelerinin regulasyonu ile ilişkili olduğu da görülmektedir. Bu durum buzağılarda septiseminin biyokimyasal tablosunun antioksidatif metabolizma yönü ile detaylı araştırılması gerçeğini ortaya koymaktadır. Buzağı septisemilerinde oksidatif stresin ve hasarının belirlenmesi, prognoz ve tedavide yol gösterici olabilir.

Kaynaklar

1. **Ayala A, Munoz MF, Argüelles S** (2014): *Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Oxid Med Cell Longev, **2014**, 360438.
2. **Basoglu A, Sen I, Sevinc M, Simsek A** (2004): *Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves with presumed septicemia*. J Vet Intern Med, **18**, 238-241.
3. **Batra S, Kumar R, Kapoor AK ve ark.** (2000): *Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis*. Ann Trop Paediatr, **20**, 27-33.
4. **Benzer F, Ozan ST** (2003): *Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri*. Turk J Vet Anim Sci, **27**, 657-661.
5. **Celi P** (2011): *Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine*. Immunopharmacol Immunotoxicol, **33**, 233-240.
6. **Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M ve ark.** (2015): *Today's oxidative stress markers*. Med Pr, **66**, 393-405.

7. **Davutoglu M, Guler E, Olgar S ve ark.** (2008): *Oxidative stress and antioxidant status in neonatal hyperbilirubinemia*. Saudi Med J, **29**, 1743-1748.
8. **Değer Y, Ertekin A, Değer S ve ark.** (2008): *Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver ınfected naturally with distomatosis*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, **32**, 23-26.
9. **Ercan N, Fidancı UR** (2012): *Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2' deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri*. Ankara Univ Vet Fak Derg, **59**, 163-168.
10. **Ercan N, Tuzcu N, Başbug O ve ark.** (2014): *The evaluation of ımportant biomarkers in healthy cattle*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, **20**, 749-755.
11. **Fecteau G, Van Metre DC, Pare J ve ark.** (1997): *Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves*. Can Vet J, **38**, 95-100.
12. **Gazioğlu A, Güvenç M** (2015): *Leptospirozisli danalarda oksidatif stres ve bazı biyokimyasal parametreler*. F Ü Sağ Bil Vet Derg, **29**, 45-48.
13. **Ghanbarpour R, Oswald E** (2009): *Characteristics and virulence genes of Escherichia coli isolated from septicemic calves in southeast of Iran*. Trop Anim Health Prod, **41**, 1091-1099.
14. **Halliwell B, Chirico S** (1993): *Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, **57**, 715-724.
15. **Hassan N, Sheikh GN, Hussian SA ve ark.** (2014): *Variation in clinical findings associated with neonatal colibacillosis in lambs before and after treatment*. Veterinary World, **7**, 262-265.
16. **Heffner JE, Repine JE** (1989): *Pulmonary strategies of antioxidant defense*. Am Rev Respir Dis, **140**, 531-554.
17. **Huang WC, Juang SW, Liu IM ve ark.** (1999): *Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats*. Neurosci Lett, **275**, 25-28.
18. **Janero DR** (1990): *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. Free Radic Biol Med, **9**, 515-540.
19. **Kapoor K, Basu S, Das BK ve ark.** *(2006): Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia*. J Trop Pediatr, **52**, 372-375.
20. **Kargın F, Fidancı UR** (2001): *Böbrek hastalıklı köpeklerde antioksidatif metabolizma*. Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi, **25**, 607-613.
21. **Kumar A, Pant P, Basu S ve ark.** (2007): *Oxidative stress in neonatal hyperbilirubinemia*. J Trop Pediatr, **53**, 69-71.
22. **Kutsal A, Alpan O, Arpacık R** (1990): *İstatistik Uygulamalar*. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
23. **Lykkesfeldt J, Svendsen O** (2007): *Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals*. Vet J, **173**, 502-511.
24. **Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC** (1993): *Oxidative stress, antioxidants, and animal function*. J Dairy Sci, **76**, 2812-2823.
25. **Morris WE, Venzano AJ, Elizondo A ve ark.** (2011): *Necrotic enteritis in young calves*. J Vet Diagn Invest, **23**, 254-259.
26. **Narad SG, Gupta MH, Pakhmode SE** (2013): *Role of non enzymatic antioxidants in neonatal septicemia*. Int J Cur Tr Res **2**, 378-380.
27. **Paglia DE, Valentine WN** (1967): *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med, **70**, 158-169.
28. **Pekcan M, Fidancı UR, Yüceer B ve ark.** (2013): *Estimation of passive immunity in newborn calves with routine clinical chemistry measurements*. Vet J Ankara Univ, **60**, 85-88.
29. **Sies H** (1997): *Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress*. Experimental Physiology, **82**, 291-295.
30. **Sordillo LM, Aitken SL** (2009): *Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle*. Vet Immunol Immunopathol, **128**, 104-109.
31. **Sun Y, Oberley LW, Li Y** (1988): *Simple for clinical assay of superoxide dismutase*. Clin Chem, **34**, 497-500.
32. **Tüközkan N, Erdamar H, Seven I** (2006): *Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performanced liquid chromatography and thiobarbituric acid assay*. Fırat Tıp Dergisi, **11**, 88-92.
33. **Yoshioka T, Kawada K, Shimada T ve ark.** (1979): *Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood*. Am J Obstet Gynecol, **135**, 372-376.

Geliş tarihi:12.04.2016 / Kabul tarihi: 09.08.2016

Yazışma adresi:
Prof. Dr. Ulvi Reha Fidancı
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
06110 Dışkapı/Ankara
e-mail: fidanci@ankara.edu.tr