

Theileriosisli Sığırlarda Hemoglobin Tipleri ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması*

İrfan YOLDAŞ Ali ERTEKİN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Van, Türkiye

Geliş tarihi: 12.03.2009

Kabul Tarihi: 10.04.2009

ÖZET

Bu çalışma theileriosisli sığırlarda hemoglobin tipleri ile glutasyon düzeylerini irdelemek amacıyla planlandı. Bu amaç için Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına hasta olarak getirilen klinik muayene ve laboratuvar bulguları sonucunda kesin tanısı konulan 30 hasta sığır ile 13 sağlıklı sığır kullanıldı. Tüm kanda glutasyon düzeyleri ve çıkarılan hemolizatta ise hemoglobin tip tayinleri yapıldı. Yapılan analizlerde sağlıklı sığırlarda glutasyon düzeyleri $22,52 \pm 5,37$ mg/dl, theileriosisli sığırlarda ise $19,79 \pm 6,36$ mg/dl düzeylerinde saptandı, bu farklılık istatistik olarak anlamlı bulundu ($P<0.001$). Hemoglobin tip tayinlerinde sağlıklı sığırlarda 7 Hb AA, 5 Hb AB ve 1 Hb BB genotipleri tespit edildi. Theileriosisli sığırlarda ise 22 Hb AA, 7 Hb BB ve 1 Hb BB genotipi saptandı. Sonuç olarak theileriosiste olası lipid peroksidasyonuna karşı bir antioksidan olarak GSH miktarlarında anlamlı azalmaların olduğu gözlemlendi. Hb tipleri ile paraziter enfeksiyonlara karşı dayanıklılık arasında ise kayda değer bir ilişki olmadığı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler

Glutasyon, Hemoglobin, Sığır, Theileriosis

Investigation of Haemoglobin Types and Glutathione Levels in Theileriosis Infected Cattles

SUMMARY

This work is planned to explicate haemoglobin types and glutathione levels on Theileriosis's cattles. For this purpose 30 diseased cattles which had been brought to the Faculty of Veterinary Medicine Internal Diseases departments clinic as an ill and diagnosed with certain diagnosis according to the clinic inspections and laboratory findings with 13 healthy cattles have been used. In whole blood glutathione levels and in divested hemolysate haemoglobin medicine specifications have been made. In analysis done; on healthy cattles glutathione levels 22.52 ± 5.37 mg/dl, on Theileriosis's cattles 19.79 ± 6.36 mg/dl levels have been determined. This difference has been found meaningful by the science of statistics ($P<0.001$). In haemoglobin medicine specifications: on healthy cattles 7 Hb AA, 5 Hb AB and 1 Hb BB genotypes have been confirmed and on Theileriosis's cattles 22 Hb AA, 7 Hb BB and 1 Hb BB genotypes have been confirmed. Consequently on GSH amounts (As an antioxidant against lipid peroxydation on Theileriosis) some meaningful diminutions have been seen. Also it has been arrived at a conclusion that there is nothing of note on Hb types between stamina against parasitary infection.

Key Words

Glutathione, Haemoglobin, Cattles, Theileriosis

GİRİŞ

Theileria etkenleri ilk defa Robert Koch tarafından, Doğu Afrika'da sığırların kanında eritrositler içerisinde tespit edilmiş ve bu etkenler küçük piroplasma olarak ifade edilmiştir. Hastalık, vektör kenenin ekolojik özelliklerinden dolayı mevsimsel olarak seyretmekte, ancak yılın değişik mevsimlerinde de bazı vakaların görüldüğü gözlemlenmektedir (Flach ve Ouhellie, 1992). Son yıllarda yurt dışından Türkiye'ye ithal edilen yüksek verimli kültür ırkı sığır sayılarındaki artış, Tropikal Theileriosis' in önemini arttırmıştır. Hastalığın yaygın olduğu bölgelerdeki yerli ırklar Theileriosis' e kısmen dayanıklıdır. Hastalık, özellikle yüksek verimli kültür ırkı sığırlarda ve melezlerde yüksek oranda görülmektedir (Sayın, 1985).

Hemoglobin demir ihtiva eden bir protoporfirindir, dört hem molekülü, bir globin ile birleşerek hemoglobini

meydana getirir. Hemoglobin, oksijenle reverzibl olarak birleşme yeteneğine sahiptir, her bir hem bölümü bir molekül oksijen bağlayabilir (Murray ve ark., 1993).

Glutasyon(GSH), serbest radikal artışına ve lipid peroksidasyon oluşmasına bağlı olarak meydana gelen ürünlerle kolayca reaksiyona girerek metabolizma için zararlı olan bu ürünlerin ortamdan uzaklaştırılması için görev alan güçlü bir antioksidandır (Anderson, 1998). Eritrositlerdeki GSH konsantrasyonu bir çift otozomal allel gen tarafından düzenlenmektedir ve yüksek düzeydeki glutasyonu kontrol eden genin, düşük düzeydeki glutasyonu kontrol eden gene karşı dominant olduğu ileri sürülse de temel gen etkisi çevre ve diğer genetik faktörlerin etkisi altındadır (Rizzi ve ark., 1988).

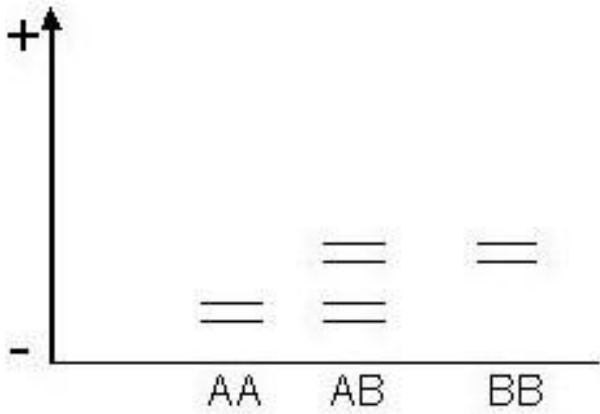
Bu çalışma Theileriosis'li sığırlarda Hb tipleri ve glutasyon seviyeleri'nin belirlenmesi ve belirlenen bu değerlerin hastalıkla ilişkisini ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu araştırmanın canlı materyali Yüzüncü Yıl Üniversitesi İç Hastalıklar Ana Bilim Dalına hasta olarak getirilen, klinik muayene ve laboratuvar bulguları neticesinde theileriosis tanısı konulan hasta sığırlardan oluşturuldu. Hastalığın kesin tanısı kulak venasından alınan kanlardan hazırlanan kan frotilerinin Giemza ile boyanması sonucu eritrositler içerisinde etkenin görülmesi ile konuldu. Bu çalışmada materyal olarak yaşları 6 ay ile 5 yaş arasında değişen 20 adet kültür ırkı ve 10 adet yerli ırk olmak üzere toplam 30 theileriosis'li hayvan kullanıldı.

Hb tip analizleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı. Kanın alyuvarlarında mevcut olan hemoglobinlerin kalıtsal yapıdaki polimorf özelliklerinin, sellüloz asetat kağıtlarında, doğru akım gücü ile ayrıştırılması esasına dayanan metoda göre Hb tip tayinleri çalışıldı (Apaydın, 2006; Aygün, 2006).

Hemoglobin tiplerinin okunmasında elektroforetik göç hızları dikkate alındı. Üç Hb tipi (AA, AB, BB) ve iki allel Hb^A ve Hb^B saptandı. Aşağıdaki şematik diyagramda görüldüğü gibi hızlı giden tip HbA, yavaş giden ise HbB olarak tanımlandı (Yur ve ark.,1998).



GSH, EDTA'lı tam kanın presipite edilmesinden sonra elde edilen sızıntının DTNB ile verdiği renk reaksiyonunun ölçülmesi esasına göre Beutler (Beutler ve ark., 1963)' in metoduna göre ölçüldü.

Theileriosis'li hasta grubundan elde edilen değerler kontrol grubu sağlıklı sığırlardan elde edilen verilerle karşılaştırıldı. Gruplar arası istatistiksel önem, SPSS Sample T testine göre belirlendi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1998). Belirlenen ortalama değerler $x \pm Sx$ olarak ve en yüksek en düşük değerler olarak gösterildi.

BULGULAR

Theieriosis'li ve sağlıklı sığırlara ait hemoglobin tipleri Tablo 1'de, glutatyon değerleri Tablo 2'de gösterildi.

Sağlıklı sığırlarda yapılan hemoglobin tip tayinlerinde (Tablo 1), 13 sağlıklı sığırdan 7'sinde Hb AA, 1'inde Hb BB ve 5'inde ise Hb AB genotipleri gözlemlendi.

Theileriosisli sığırlarda belirlenen genotipler ise 30 hayvandan 22'si Hb AA, 1'i Hb BB ve 7'si Hb AB olarak tespit edildi.

Her iki grupta da Hb AA genotiplerinin daha fazla olduğu saptandı.

Tablo 1. Theileriosis'li ve sağlıklı sığırlarda hemoglobin genotipleri

Table 1. The genotypes of haemoglobin in healthy and theileriosis infected cattle

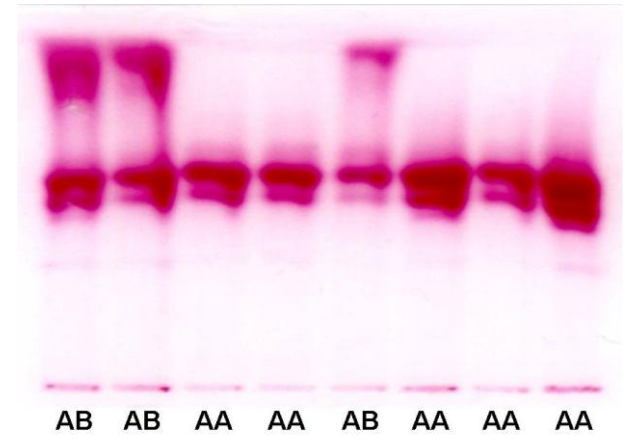
	n	Hemoglobin Genotipleri (%)		
		HbAA	HbBB	HbAB
Theileriosisli sığırlar	30	22 (73.3)	1 (3.3)	7 (23.3)
Sağlıklı sığırlar	13	7 (53.84)	1 (7.66)	5 (38.46)

Tablo 2. Theileriosis'li ve sağlıklı hayvanlara ait glutatyon değerleri

Table 2. The glutation levels of healthy and theileriosis infected cattle

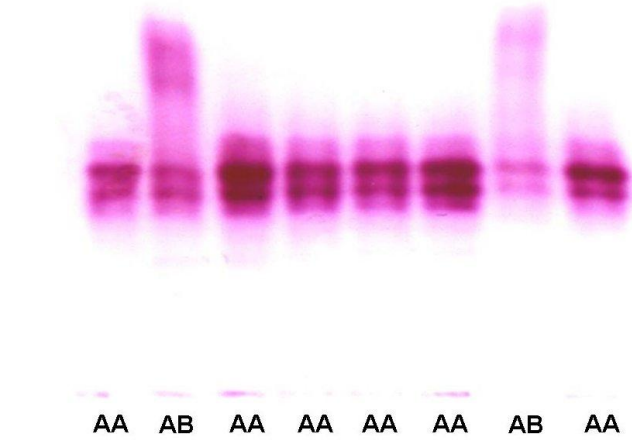
	n	GSH mg/dl $x \pm Sx$	GSH mg/dl En düşük değer	GSH mg/dl En yüksek değer
Theileriosisli sığırlar	30	19.79 \pm 6.36*	17.56	22.01
Sağlıklı sığırlar	13	22.52 \pm 5.37	18.91	26.13

*P<0.001



Şekil 1. Theileriosis'li sığırlarda hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı

Figure 1. The elektroforegram of haemoglobin genotypes in theileriosis infected cattle



Şekil 2. Sağlıklı sığırlarda hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı

Figure 2. The elektroforegram of haemoglobin genotypes in healthy cattle

Theileriosisli ve sağlıklı hayvanlara ait glutatyon değerlerini gösteren Tablo 2 incelendiğinde, sağlıklı

sığırlarda ölçülen GSH değerleri 22.52 ± 5.37 mg/dl düzeylerinde seyrederken bu değer theileriosisli sığırlarda 19.79 ± 6.36 mg/dl olarak gözlemlendi. Kontrol grubuna göre theileriosisli sığırlarda gözlenen bu düşme istatistik olarak anlamlı bulundu ($P < 0.001$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada 15 yılda Doğum ve Jinekoloji Kliniği TROPİKAL theileriosis etkeni olan *T. annulata* Türkiye’de ve Dünyanın birçok ülkesinde (Kuzey Afrika, Güney Avrupa ve Asya) yaygın olarak görülen bir tür olup *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerle taşınmaktadır (Eren ve Tanyüksel, 1996). Hastalık özellikle verim oranı yüksek sığır ırklarında morbidite ve mortaliteye neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu hastalığa bağlı olarak konakçıda yüksek ateş, anemi ve lenf bezlerinde büyüme gibi klinik bulguların yanında konakçının kanında ve kanın biyokimyasında önemli değişimler meydana gelir (Yılmaz ve Özer, 1993).

Theileriosisli sığırlarda gözlenen en önemli bulgunun anemi olduğu değişik literatürlerde bildirilmiştir (Singh ve ark., 2001; Kızıl ve ark., 2007).

Parazitler yerleştikleri konakta organ, doku ve hücrelerde hasara buna bağlı olarak gelişen oksidatif stresin bir sonucu olarak lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Eritrositlere yerleşen parazitler burada oksidatif yıkıma neden olmakta, hücre içi H_2O_2 oranı azalmakta ve hücrelerin dayanıklılığı azalarak oksidantlara karşı hassas hale gelmektedirler (Dede ve ark., 2000).

Hastalıkların çoğunda az veya çok oksidatif stress mevcuttur. Önemli olan bu stresin hastalık patogenezine ne kadar katkıda bulunduğudır. Antioksidan savunma sistemi biyolojik olarak önemli reaktif oksijen radikallerini temizleyerek, onların oluşumundan koruyarak veya onların yaptığı hasarı onararak etki ederler. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik sıklıkla metabolik bozukluk ve hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif strese yol açabilir (Halliwell, 1991).

Sunulan bu çalışmada theileriosisli ve sağlıklı sığırlarda tam kan glutasyon düzeyleri ve hemoglobin tipleri araştırıldı. Hasta ve sağlıklı hayvanlarda çalışılan parametreler bakımından herhangi bir farklılığın olup olmadığı tespit edildi. Hücre membranını lipit peroksidasyonunun yıkıcı etkilerine karşı koruyucu antioksidanların en önemlilerinden olan glutasyon miktarları, yapılan analizlerde sağlıklı hayvan grubunda 22.52 ± 5.37 mg/dl düzeylerinde hesaplanırken, Theileriosis’li grupta 19.79 ± 6.36 mg/dl olarak ölçüldü. Yapılan istatistik analizlerde glutasyon düzeylerinde saptanan değişimler önemli bulundu ($P < 0.001$).

Oksidatif stres durumlarında karaciğer ve diğer dokularda mevcut GSH konsantrasyonu düşmektedir (Spurlock ve Savage, 1992). Bu durum dokulardaki H_2O_2 ’den kaynaklanan peroksidasyonun zararlı etkilerini durdurmak veya azaltmak için GSH’nın oksitlenmesinden kaynaklanmaktadır (Meister, 1984).

P. vivax ve *P. falciparum* ile enfekte eritrositlerde glutasyon konsantrasyonlarının da azalmalarının olduğu literatürlerde bildirilmiştir (Swarup ve ark., 1982, Mohan ve ark., 1992). Benzer şekilde Novak ve ark (1990) da oksidatif stres sonucu lipit peroksidasyonun arttığını, glutasyon seviyesinin düştüğünü rapor etmişlerdir. Glutasyon redoks siklusu eritrositlerdeki reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu için büyük defans sistemlerinden biridir (Saltman 1989). Glutasyon ve Hb arasında kurulan

glutasyonil Hb. yapısı ile, Hb tipi değişmeden oksidatif yıkıma karşı hemoglobinin korunduğu Reischl ve Dafre (1992) tarafından bildirilmiştir.

Genetik olarak nesilden nesile aktarılabilen biyokimyasal polimorfik karakterler temel alınarak ekonomik verim bakımından en üst düzeyde ve hastalıklara karşı dirençli bireylerden kurulan hayvan popülasyonlarının kurulması için pek çok çalışmalar yapılmış veya yapılmaktadır. Polimorfik özellik gösteren bir parametre olan Hb varyantlarının çeşitli hayvan tipleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Örneğin mutant Hb olarak bilinen Hb tipine sahip olan insanların malarya enfeksiyonlarına karşı daha dirençli oldukları ileri sürülmüştür (Singer, 1985). Koyunlarda Hb A ve Hb AB’ye sahip olanların, Hb B’ye sahip olanlara göre daha fazla fertiliteye sahip olduğu yine aynı çalışmada Hb A’ya sahip olanların Hb AB ve Hb B’ye sahip olanlara göre daha fazla vücut ağırlığı ve yapağı ağırlığına sahip oldukları gözlenmiştir (Atroshi, 1979). Buna karşın Yaman ve ark. (1987), Hb tipleri ile canlı ağırlık artışı arasında bir ilişki bulamamışlardır. Bir başka çalışmada Macha ve Dvorak (1986), Hb AB ve Hb BB genotipine sahip boğaların fertilitelerinin yetersiz olmasından dolayı ayıklandıklarını belirtmişlerdir. Fakat diğer araştırmacılar fertilitenin hemoglobinin polimorfizmi arasında bir bağlantı olmadığından bahsetmemişlerdir (Tomar ve ark., 1992; Kliment ve Novy, 1986).

Yapılan çalışmada 13 sağlıklı sığırın 7’si Hb AA (%53.84), 5’i Hb AB (%38.46) ve 1’i de Hb BB (%7.66) genotiplerinde bulundu. Theileriosisli 30 sığırdaki yapılan hemoglobin tip tayininde bunlardan 22’sinde Hb AA (%73.3), 7’sinde Hb AB (%23.3) ve 1’inde Hb BB (%3.3) genotipleri tespit edildi.

Bu sonuçlara bakarak hem sağlıklı hem de theileriosisli sığırların önemli bir kısmı Hb AA genotiplerine sahipler, diğer önemli bir kısmı da Hb AB’ye sahipler. Bu bağlamda sağlıklı hayvanlarla theileriosisli hayvanlar arasında Hb genotipleri bakımından kayda değer bir fark bulunmamaktadır.

Sonuç olarak;

1. Sağlıklı sığırlar ile theileriosisli sığırlar arasında saptanan GSH miktarlarındaki farklılıklar istatistik anlamda önemli bulundu ($P < 0.001$).
2. GSH düzeylerinde saptanan düşmeler, olası lipit peroksidasyonuna karşı bir antioksidan olarak GSH’nın kullanılmasından kaynaklanabilir.
3. Hem sağlıklı hem de theileriosisli sığırlarda en fazla Hb AA genotipi, arkasından Hb AB genotipi tespit edildi. Her iki grupta sadece 1 sığırdaki Hb BB genotipine rastlandı.
4. Tüm bu veriler ışığında Hb tipleri ile paraziter hastalıklara karşı dayanıklılık arasında kayda değer bir anlamın olmadığı kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Anderson ME (1998).** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation, *Chem Biol Interact*, 111, (112), 1-4.
- Apaydın B (2006).** Babesiosisli koyunlarda serum proteinlerinin elektroforetik incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Atroshi F (1979).** Phenotypic and genetic association between production/reproduction traits and blood biochemical polymorphic characters in finnsheep. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Helsinki, Finland.

- Aygün T (2006).** Norduz keçilerinde kan proteinleri polimorfizmi ile kimi süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van.
- Beutler E, Dubon O, Kelly BM (1963).** Improved method for the determination of blood glutathione, *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.
- Dede S, Değer Y, Değer S, Alkan M (2000).** Bazı endoparazitlerle enfekte koyunlarda lipit peroksidasyonu ve antioksidan durumun saptanması. *Türkiye Parazitoloji Derg*, 24, (1), 190-193.
- Eren H, Tanyüksel M, (1996).** İnsan ve hayvan protozoer hastalıkların naklinde rol oynayan vektörler. *Türk Vet Hek Derg*, 8, (1), 42-44.
- Flach EJ, Ouhellie H (1992).** The epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in an endemic area of Morocco, *Vet Parasitol*, 44, (1-2), 51-65.
- Halliwel B (1991).** Reactive oxygen species in living systems: source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med* 91 Suppl. 3C, 14-22.
- Kızıl Ö, Karapınar T, Balıkçı E, Kızıl M (2007).** Tropikal Tayleriyozisli sığırlarda hemogram ve bazı serum parametrelerindeki değişiklikler, *Fırat Üniv Sağ Bil Derg*, 21, (1), 11-14.
- Kliment J, Novy J (1986).** The pheno-groups of biochemical polymorphic systems in relation to the milk efficiency and reproduction of cows, *Zivoc Vyr*, 31, (8), 703-710.
- Macha I, Dvorak J (1986).** Making an analysis of the bull selection as based on the biochemical genotype (Six Polymorphic Systems), *Acta-Universitatis-Agriculturae Brno, -A-Facultas-Agronomica*, 34, (4), 229-242.
- Meister A (1984).** New Aspects of glutathione biochemistry and transport: Selective Alteration of Glutathione Metabolism. *Nutri Rew.*, Vol 42, 397- 410.
- Mohan K, Ganguly NK, Dubey ML, Mahajan RC (1992).** Oxidative damage of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum, *Ann Hematol*, 65,131-34.
- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (1993).** Harper'in Biyokimyasi, Çev. G. Mentec, B. Ersoz, Barış Kitapevi, İstanbul.
- Novak Z, Varga SI, Pataki L, Matkovics B (1990).** Simple method for the measurement of antioxidant, *Clin Chim Acta*, 115-120.
- Reischl E, Dafre AL (1992).** Glutathione mixed disulfides and heterogeneity of chicken hemoglobins. *Comp Biochem Physiol*, 12 (4), 849-853.
- Rizzi R, Caroli A, Bolla P, Acciaiolli A, Pagnacco G (1988).** Vanability of reduced glutathione levels in massese ewes and its effect on daily milk production, *J Dairy Res*, 55, 345-353.
- Saltman P (1989).** Oxidative stress, a radical view. *Semin Haematol*, 26, 249-56.
- Sayın F (1985).** Theileria türlerinin patolojisi, (Ed), Sayın F, "Theileriosis", Bilgehan Basımevi, p: 111-113, İzmir.
- Singer S (1985).** Human Genetics. An Introduction to the Principles of Heredity. Second Ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Singh A, Singh J, Grewal AS, Brar RS (2001).** Studies on some blood parameters of crossbred calves with experimental *Theileria annulata* infections. *Vet Res Commun*, 25, 289-300.
- Spurlock ME, Savage, JE (1992).** Antioxidant activity of Japanese Quail liver cytosol in the absence and presence of reduced glutathione. *Poult Sci*, 71, 928-931.
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V (1998).** Biyoistatistik, Hatipoğlu Yayınevi Ankara.
- Swarup-Mitra S, Bhattacharya J, Mukherji A (1982).** Effect of malaria on erythrocytic reduced glutathione and activity of related enzymes. *Indian J Med Res*, 76, 668-730.
- Tomar SS, Kapatal BG, Parekh HKB (1992).** Haemoglobin Variants and their Relationship with Economic Traits in Zebu-Exotic Cross, *Indian Vet J*, 69, (9), 848-851.
- Yaman K, Erdinç H, Başpınar H, Çamaş H ve Gökçen H (1987).** Merinos erkek kuzularda bazı kan parametreleri (Transferrin, Hemoglobin, Glutasyon, Testesteron) ile besi performansı arasındaki ilişki üzerinde araştırmalar, II. Hemoglobin tipleriyle canlı ağırlık artışı arasındaki ilişki. *YYU Vet Fak Derg*, 5-6 (1-2-3), 35-40.
- Yılmaz K, Özer E (1993).** Parazitli ve parazitsiz buzağılarda demir yetersizliği anemisi yönünden araştırmalar. *FÜ Sağ Bil Enst Derg*, 7, (2), 102-111.
- Yur F, Belge F, Bildik A, Çamaş H (1998).** Norduz koyun ve keçilerinde hemoglobin tipleri, serum protein fraksiyonları ve lipoprotein seviyelerinin belirlenmesi, *YYU Vet Fak Derg*, 9, (1-2), 29-31.