

Sığırlarda lökosit artışı ile seyreden hastalıklarda, lökosit artışı ile lipit peroksidasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması*

Mehtap ÇELİK^a Burhanettin BAYDAŞ^{a*}

^a Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma, lökosit artışının saptandığı hasta hayvanlarda, lökosit artışı ile lipit peroksidasyonu arasında ne tür bir ilişki olduğunu araştırmak üzere planlandı. Lökosit artışı saptanan 20 hasta ve 20 sağlıklı olmak üzere toplam 40 hayvan çalışmanın deney hayvan materyalini oluşturdu. Bu hayvanlardan alınan kan örneklerinden malondialdehit (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) analizleri hemen yapıldı. Malondialdehit değerleri hasta hayvanlarda sağlıklı hayvanlara oranla oldukça yüksek bulunurken, aradaki farkın istatistiksel anlamda önemli olduğu saptandı (P<0.01). Glutatyon, organizmada indirgenmiş (GSH) ve okside (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur. Organizmada serbest radikal düzeyi yükselince, GSH düzeyi azalır. Bu çalışmada da GSH düzeyinin normallere oranla azaldığı ve ikisi arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü (P<0.05). Lökosit artışları arasındaki fark da oldukça anlamlı bulundu (P<0.01). Ancak burada önemli olan granulositlerin tüm lökositlere oranlarıydı. Granulositlerdeki artış daha belirgin olarak görüldü ve bu artışın anlamlı olduğu saptandı (P<0.05). Bu durum, fagositoz özelliği olan hücrelerin lipit peroksidasyonu artışıyla ilgili olduklarını göstermektedir. Sonuç olarak, lökosit artışı ile lipit peroksidasyonu artışı ve antioksidan seviyesinin azalması arasında önemli bir ilişkinin varlığından söz etmek mümkündür.

Anahtar sözcükler: Lökositosis, granulosit, malondialdehit, glutatyon, sığır

Investigation of the relationship between increased leukocyte levels and blood lipid peroxidation in the sick cattle with leukocytosis

Abstract: This study was designed to investigate whether there was a relationship between increased leukocyte levels and blood lipid peroxidation in cows with leukocytosis. Elevation or/and activation of leukocytes cause an increase in the production of free radicals leading to the lipid peroxidation. Malondialdehyde (MDA) is the most important marker for lipid peroxidation. Forty cows were investigated. Twenty animals diagnosed with leukocytosis were chosen to represent sick group. Twenty healthy animals were chosen as Controls. Blood samples were drawn to measure MDA and glutathione levels. It was found that MDA level was significantly higher (P<0.01) in sick group than Controls. Glutathione has two forms; oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH). When free radical levels were increased, conversely GSH levels decrease in the animal. Similarly, in the present study, GSH levels of sick animals decreased (P<0.05) compared to the Controls. Animals with leukocytosis had higher leukocyte number (P<0.01) than Controls. However, most striking result was observed in the granulocytes rate. Granulocyte rate was significantly higher (P<0.05) in sick animals than Controls. This result indicate that fagocytic cells might produce lipid peroxidation in the organism. It is concluded that, leukocytosis produces an increase in the lipid peroxidation and a decrease in the reduced glutathione levels.

Key words: Leucocytosis, granulocits, malondialdehyde, glutathione, cattle

GİRİŞ

Nötrofil ve makrofajlar, mikroorganizmalara karşı bir savunma sistemini oluştururlar ve aktive olduklarında ürettikleri serbest radikaller de bu sistemin ana kısmını oluşturmaktadır (1,2). Enfeksiyöz karakterli solunum yolu hastalıklarında fagosit yapan hücrelerin aktive oldukları ve akciğer dokusuna hareket ettikleri bildirilmektedir. Fagositler tarafından salınan reaktif oksijen türlerinin, mikroorganizmaları etkisiz hale getirme, konakçının dokularına zarar verme ve malondialdehitin artışına neden olma gibi etkileri rapor edilmektedir (3-5). Malondialdehit, lipit peroksidasyonu için iyi bir gösterge olarak kabul edilmektedir (6).

Dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller serbest radikal olarak bilinirler (7,8). Uzun yıllar boyunca radyasyon biyologlarının önemli ilgi alanlarından biri olan serbest radikallerin, normal metabolizmaya ait ürünler olduğu sonraları anlaşılmıştır (9). Serbest radikaller olarak bilinen Reaktif Oksijen Türleri, genetik materyali yıkımlama özelliğine sahiptirler ve hücre membranlarında ve membrana bağlı inaktif durumda olan enzimlerde lipit peroksidasyonu oluşumuna neden olurlar. Lipit peroksidasyonu doğrudan membran yapısına ve dolaylı olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur (9,10). Serbest

radikallerin ayrıca canlılarda yaşlanma (11), hücresel yıkımlanma (12) ve doku hasarına (13) yol açtığı bilinmektedir.

Diğer yandan organizmada oluşan ya da dışardan alınan serbest radikallere karşı antioksidan savunma sistemi mevcuttur ve bu zararlı radikalleri temizleme görevi vardır (14). Bu sistem içinde yer alan glutatyon, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında en çok bulunan, metabolizmada meydana gelen serbest oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri koruyan en önemli antioksidan maddelerden biridir (15, 16) ve serbest radikal harabiyetini azaltıcı bir etkiye sahiptir (17). Glutatyon hücrelerde okside (GSSG) ve indirgenmiş (GSH) formda bulunur ve antioksidan etkisi bu iki form arasındaki döngüsü sırasında gerçekleşir. Glutatyonun esas reaktif grubu olan SH grubu, serbest radikallerin ortaklanmamış elektronu ile bağlanarak radikal oluşumunu azaltır. Lipit peroksidasyonunun oluşması ile ÇrSH düzeyi azalırken, GSSG düzeyi yükselmektedir (15).

Bu çalışmada amacımız, sığırlarda lökosit artışı ile birlikte seyreden olgularda, lökosit artışına paralel olarak lipit peroksidasyonu için gösterge olan MDA ve antioksidan bir madde olan GSH'da ne düzeyde değişimler görüldüğü konusunda bir fikir sahibi olmaktır.

MATERYAL VE METOT

Hayvan materyali olarak Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Hastanesine getirilen 20 hasta ve yöredeki 20 sağlıklı sığır kullanıldı., Bu sığırların aynı

ırktan (Esmer Irk) olmasına itina gösterildi. Hayvan Hastanesine getirilen hasta hayvanlar arasından yine farklı hastalığı olup ancak lökosit artışı gösteren hayvanlar tercih edildi. Tercih edilen hasta hayvanların mümkün olduğu kadar aynı yaş ve beden yapısına sahip olmalarına dikkat edildi. Cinsiyet bakımından dişi olanlar seçildi. Hastalıklar, Klinik Bilimlerdeki Öğretim Üyeleri tarafından yapılan tetkik ve muayeneler sonucunda tespit edildi. Çalışmada kullanılan deneklerin farklı hastalık tablosu gösterecek de lökosit artışı gösterip göstermediklerine dikkat edildi. Çünkü, çalışmanın gereği olarak lökosit artışı ile lipit peroksidasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

Hayvanların klinik muayenesini takiben lökosit sayımı için kulaktan uygun bir miktar kan alındı ve lökosit sayımı yapıldı (18). Lökosit artışı saptanan hayvanların vena jugularislerinden kan alındı. Alınan kan örnekleri, içerisine her ml kan için 2 mg EDTA (Etilendiamin-tetraasetik asit) konulmuş cam tüplere konuldu. MDA, GSH tayinleri derhal yapıldı ve bunu takiben lökosit sayımları formül lökosit yapıldı. Aynı uygulamalar sağlıklı hayvanlar için de gerçekleştirildi. MDA tayini Sushil ve ark. (19), Glutatyon tayini Beutler ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda (20) göre yapıldı.

BULGULAR

Bu çalışmadan elde edilen bulgular bir bütün olarak Tablo 1 'de verilmiştir.

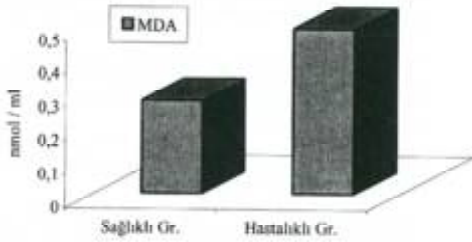
Tablo 1. Sağlıklı ve hasta hayvanlara ait biyokimyasal ve hematolojik değerler. (Aritmetik Ortalama \pm Standart Hata).

	n	Sağlıklı Hayvanlar	Hasta Hayvanlar
MDA (nmol/ml)	20	0.28 \pm 0.025	0.50 \pm 0.021
GSH (mg/dl)	20	23.13 \pm 1.8	18.16 \pm 1.2
Total Lökosit/mm ³	20	7940 \pm 453	1337 \pm 696
Granüllü Lökosit (%)	20	35 \pm 0.96	42 \pm 2.4
Granülsüz Lökosit (%)	20	65 \pm 0.96	58 \pm 2.5

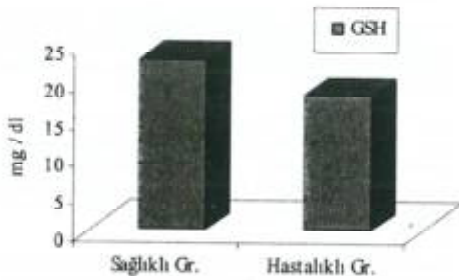
Lipit peroksidasyonu için gösterge olarak kabul edilen MDA değerlerine bakıldığında, hasta hayvanlarda önemli düzeyde bir lipit peroksidasyonu artışının gerçekleştiği, sağlıklı hayvan MDA değerleri ile karşılaştırıldığında da bu artışın anlamlı olduğu belirlendi (P<0.01)

Çalışmadan elde edilen verilere bakıldığında GSH düzeyinin azaldığı saptandı. Sağlıklı hayvanlara kıyasla hasta hayvanlarda görülen bu azalmanın da istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($P<0.05$). Bu göstergeler, MDA'daki artışın ve GSH'daki azalmanın hasta hayvanlarda lökosit artışına paralel olarak devam ettiğini göstermektedir.

Total lökosit, daha da önemlisi granulosit lökositlerde sayısal artış organizmadaki akut bir yangısal olayın mevcudiyetini gösterir. Hasta hayvanlarda önemli düzeyde bir lökosit artışı saptandı. Bu artışın, sağlıklı hayvanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda oldukça önemli bir değere vardığı gözlemlendi ($P<0.01$). Sığırlarda lökosit oranları açısından bakıldığında granülsüz lökositlerin tabloya hakim oldukları bilinmektedir. Bu araştırmada da aynı tabloyu görmek mümkün. Çünkü sağlıklı hayvanlarda görüldüğü üzere granülsüz lökositlerin total oranında tabloya hakim oldukları görülmektedir. Ancak, hasta hayvanlarda granulosit lökositlerin sayısında belli ve önemli düzeyde artış olduğu saptandı ($P<0.05$). Lökosit artışı ile MDA arasında orantılı bir artıştan bahsetmek mümkündür.



Şekil 1. Sağlıklı ve Hasta hayvanlara ait MDA değerlerinin grafiksel yorumu.



Şekil 2. Sağlıklı ve Hasta hayvanlara ait GSH değerlerinin grafiksel yorumu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli iç ve dış faktörlerin etkisiyle oluşan serbest radikaller, canlı organizmada bir takım bozuklukların oluşmasına neden olmaktadır. Organizmada gerçekleştirdikleri bu zararlı etkiler yine organizmada

bulunan bir takım antioksidan mekanizmalarla engellenmektedir. Ancak, aşırı bir serbest radikal üretimi olduğunda bu engelleme mekanizması her zaman yeterli olamamaktadır. Zira bu durumda antioksidan bariyeri aşılmakta ve serbest radikallerin etkileri sonucu lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (9, 10).

Serbest radikaller aynı zamanda alyuvarlar tarafından da üretilmektedirler. Bu, yabancı bir maddeye karşı geliştirilen bir savunma mekanizmasıdır. Nötrofil ve makrofajların gerçekleştirmiş olduğu fagositoz olayı, oksijenin toksik ürünlerinin rol aldığı biyolojik bir olaylar kompleksidir. Polimorfonükleer (PMN) hücrelerin immun kompleksler ve aktive olmuş komplement de dahil çeşitli aktive edici ajanlarla karşılaşması sitotoksik oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur (2, 21, 23).

Mevcut çalışmada MDA değerleri, normallere oranla, lökosit artışının saptandığı hasta hayvanlarda oldukça yüksek düzeyde bulundu. Bu değerler bize lökosit artışı ile orantılı olarak bir MDA artışının varlığını göstermektedir. Lökosit artışı ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran araştırmacıların çoğu aynı olgudan bahsetmektedirler (23, 24). Zaten, yangısal olaylarda sayılan artan ve aktive olan bu hücrelerin kendileri bizzat serbest radikal oluşturmakta ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu oluşumu kaçınılmaz hale gelmektedir (15). Lökosit artışı ve aktivasyonuna bağlı olarak, oksidan ve antioksidanlar arasındaki denge oksidan ajanların lehine bozulduğunda lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA şekillenmektedir (24). Travmaya bağlı olarak travma alanında (25), astımlı bireylerde akciğer dokusunda (26) ve yanık oluşmasına bağlı olarak (27) yanık bölgesinde nötrofil artışını serbest radikal artışının takip ettiği, aynı dokularda yapılan incelemelerde MDA seviyesinin de arttığı bildirilmektedir.

İndirgenmiş glutatyon (GSH), enzimatik olmayan endojen antioksidandır ve organizmayı serbest radikallerden korur. GSH organizmada oluşan serbest radikallerin ortaklanmamış elektronlarını bağlayarak artmalarını engellemekte ve bu esnada kendisi de okside glutatyona (GSSG) dönüşmekte ve miktarı azalmaktadır (15).

Kalpte deneysel olarak oluşturulan iskemi / reperfüzyona bağlı olarak bölgeye polimorfonükleer hücre göçünün ve aktivasyonunun olduğu ve bunun tersine GSH seviyesinde azalmanın görüldüğü bildirilmektedir (28). Villa ve ark (1), deneysel olarak bağırsak ligasyonu ile oluşturdukları sepsis tablosunda bölgeye artan PMNL göçünün olduğunu ve GSH seviyesinin azaldığını ileri sürmektedirler. GSH düzeylerindeki azalma konusunda ileri sürülen görüşler, mevcut çalışmada da saptandı ve bu bağlamda daha önceki çalışmalar desteklendi.

Normal konsantrasyonlarda GSH'nın, Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) enfeksiyon alanına göçü için gerekli olduğu ileri sürülmektedir.

Zira GSH seviyesini azaltan kimyasallar (diethylmaleat) verilerek enfeksiyon alanına PMNL göçünün azaldığı saptanmıştır (1). Öte yandan GSH'nın bir dereceye kadar bağışıklığın tersi bir etkiye sahip olduğu; zira bir çok yangısal sitokinlerin ve kimyasalların oluşumunu engelleyen antiinflamatuvar bir ajan olduğu görüşü ileri sürülmektedir (29). GSH'nın ayrıca aralarında interlökin-2 oluşumu ve sitotoksik T hücre aktivitesi gibi bağışıklık reaksiyonlarında rol aldığı da bildirilmektedir (30).

Sonuç olarak; lökosit artışına paralel olarak çok fazla hastalık mevcuttur. Lökositlerdeki bu sayısal artışlar, aktive olmalarını da beraberinde getirmektedir. Her ne kadar lökositler tarafından oluşturulan bu serbest radikallerin yabancı organizmalar için zararlı etkileri söz konusu ise de, aynı zamanda organizmanın kendisi için de zararlı etkileri söz konusu olabilmektedir. Bu gibi durumlarda, belirtilen durumun dikkate alınması ve gerekirse antioksidan kullanılmasının faydalı olabileceği görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Villa P, Sacconi A, Sica A, Ghezzi P: Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis.*, **15**: 1115-20, (2002).
- Badwey JA, Kamowsky ML: Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem*, **49**: 695-726, (1980).
- MacNee W, Rahman I: Is oxidative stress Central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *TRENDS in Molecular Medicine*, **7**: 55-62, (2001)
- Nowak D, Zieba M, Zawiasa D, Rozniecki J, Krol M: Changes of serum concentration of lipid peroxidation products in patients with pneumonia. *Monaldi Arch Chest Dis*, **51**: 188- 93, (1996).
- Novozhenov VG, Viazitkii PO, Ermakov EV, Kolomoets NM, Chekushin TI: Pathogenesis of acute pneumonia. *Ter Arkh.*, **61**: 84-87, (1989).
- Yano E: Mineral fiber-induced malondialdehyde formation and effects of oxidant scavengers in phagocytic cells, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **61**: 19-23, (1988).
- Floyd RA: Basic free radical chemistry, *Free Radicals In Aging*. Edited By B.P.Yu Boca Raton, F.L: Crc P. 39-55, (1993).
- Fridovich I: The biology of oxygen radicals. *Science Wash*, **201**: 875-880,(1978).
- Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1-60, (1995).
- Nayler VG: Basic mechanism involved in the protection of the ischaemic myocardium. The role of calcium antagonists, *Drugs*, **42**:21-2,(1991).
- Fletcher RH and Fletcher SW: Glutathione and aging: Ideas and evidence. *The Lancet*, **8934**: 1379-1380,(1994).
- Guteeridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, **41**: 1819-1828, (1995).
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner J: Chemistry and biochemistry of malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med*, **11**: 82-128,(1991).
- Florence TM: The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol*, **23**: 3-7, (1995).
- Meistr A, Anderson ME: Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 711-760,(1983).
- Moustafa S A: Effect of glutathione (GSH) depletion on the serum levels of triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), and T3/T4 ratio in aliyi alcohol-treated male rats and possible protection with zinc. *Int J Toxicol*, **20**: 15-20, (2001).
- Ortolani O, Conti A, Raffaele de Gaudio A, Moraldi E, Cantini Q, Gianpaolo N: The effect of glutathione an N-Acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with Early Septic Shock. *Am. JRespir Crit Care Med*, **161**: 1907-1911,(2000)
- Konuk T: Pratik Fizyoloji I, 2. baskı, A. Ü. Basımevi, Ankara, s: 71-73, (1981)
- Sushil JK, Mcvie R, Duett J, Herbst JJ: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, **38**: 1539 - 1543, (1989).
- Beutler E, Dubon O, Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, **61**: 882-888,(1963).
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET: Oxygen radicals and human disease, Davis Conference. *Ann Intern Med*, **107**: 526-545, (1987).
- Boveris A: Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. Packer, L. (Derleyen) *Method in Enzymology*, **105**: 429-435, (1984).
- Witz G, Lawrie NJ, Amoroso MA, Goldstein BD: Inhibition by reactive aldehydes of superoxide anion radical production instimulated human neutrophils. *Chem Biol Interact*, **53**: 13-23, (1985).
- Panus PC, Eddy LJ, Longenecker GLJ: Measurement of malonyldialdehyde production during sodium arachidonate-induced polymorphonuclear leukocyte aggregation. *Pharmacol Methods*, **13**: 179-86,(1985).
- Hu S, Zheng L, Chen B, Xie J, Yang C: The role of the leukocytes in pathogenesis of secondary brain injury. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **24**: 56-8, (1999).
- Zhang H, Lin Y, Ding C: The role of neutrophils and interleukin-8 in pathogenesis of asthma. *Zhonghua Jie He He HuXiZaZhi*, **24**:225.7,(2001).
- Cetinkale O, Konukoglu D, Şenel O, Kemerli GD, Yazar S: Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns*, **25**: 105-12, (1999).
- Lantos J, Temes G, Gobolos L, Jaberansari MT, Roth E: Is peripheral blood a reliable indicator of acute oxidative stress following heart ischemia and reperfusion? *Med Sci Monit*, **7**: 1166-1170, (2001).
- Şato M, Miyazaki T, Nagaya T, Murata Y, Ida N, Maeda K, Seo H: Antioxidants inhibit tumor necrosis factor-alpha mediated stimulation of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and collagenase expression in cultured human synovial cells. *J Rheumatol*, **23**: 432-438, (1996).
- Staal FJ, Ela SW, Roederer M, Anderson MT, Herzenberg LA: Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection. *Lancet*, **339**: 909-912, (1992).

*Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Burhanettin BAYDAŞ
Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı 65080
Kampüs/VAN

e-mail: bbaydas@hotmail.com, bbaydas@yyu.edu.tr

#: Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir