

MASTITİSLİ İNEK SÜTLERİNDE NİTRİK OKSİT DÜZEYİ İLE SOMATİK 1 HÜCRE SAYISI ARASINDAKİ İLİŞKİ*

Aziz Bülbül¹@

Baki Yılmaz²

Relationship Between the Level of Nitric Oxide and Somatic Cell Count in the Cow Milk with Mastitis

Özet: Bu çalışmada somatik hücre sayımı sonuçlarına göre mastitis olgusu belirlenmiş hayvanların sütlerinde nitrik oksit düzeyi ile somatik hücre sayısı arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırmada 4-5 yaşlı laktasyon ortasında bulunan, 64 İsviçre Esmeri süt ineğinin her bir meme lobundan alınmış 256 süt örneği kullanılmıştır. Kalitatif hücre sayım yöntemi kullanılarak elde edilen somatik hücre sayımı (SHS) sonuçlarına göre gruplar oluşturulmuştur. Somatik hücre sayısı ml'sinde 0 - 200000 adet olan 93 örnek kontrol grubu, SHS ml'sinde 200000 - 400000 adet olan 46 örnek mastitis şüpheli grubu, 400000 - 1200000 adet olan 49 örnek 1. grubu, 1200000 - 2200000 adet olan 33 örnek 2. grubu, 2200000'den fazla olan 35 örnek ise 3. grubu oluşturmuştur. Süt örneklerinde Griess reaksiyonu temeline dayanan spektrofotometrik yöntem kullanılarak nitrik oksit ve nitrit düzeyleri belirlenmiştir. Nitrik oksit düzeyi sağlıklı grupta ortalama $21,27 \pm 2,86 \mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilirken mastitis şüpheli grupta $22,55 \pm 3,09 \mu\text{mol/L}$, 1, 2 ve 3 grupta sırasıyla $27,42 \pm 2,54 \mu\text{mol/L}$, $30,75 \pm 2,62 \mu\text{mol/L}$, $37,42 \pm 6,27 \mu\text{mol/L}$, nitrit düzeyleri ise sağlıklı sütlerde $0,52 \pm 0,35 \mu\text{mol/L}$ olarak belirlenirken mastitis şüpheli sütlerde $0,52 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$, mastitisin derecesi arttıkça (sırasıyla 1,2 ve 3.grup) $0,99 \pm 0,54 \mu\text{mol/L}$, $1,13 \pm 0,27 \mu\text{mol/L}$, $1,34 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Sağlıklı ve mastitisli sütler arasında nitrik oksit miktarı bakımından bir farklılık bulunmazken, mastitisin derecesi ile birlikte anlamlı düzeyde arttığı ve bu üç grubun nitrik oksit düzeylerinin sağlıklı ve mastitis şüpheli sütlerden yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Nitrit düzeyleri ise kan nitrit düzeyleri bakımından sağlıklı ve şüpheli grup arasında anlamlı bir fark bulunmazken bahsi geçen bu gruplar ile mastitisli sütler arasında fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Elde edilen bulgular sonucunda mastitisli inek sütlerinde nitrik oksit ile parçalanma ürünlerinden nitrit düzeyinde bir artış ve süt somatik hücre sayısı ile süt nitrik oksit miktarı arasında anlamlı pozitif bir ilişkinin olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler : Nitrit, Nitrik Oksit, Mastitis, Somatik Hücre, Süt

Summary: In this study the relationship between the level of nitric oxide and somatic cell count in the cow milk with mastitis in the milks of animals with mastitis determined according to the results of somatic cell count. In the study, 256 milk samples received from each breast lobe of Brown Swiss 64 milk cows of 4 - 5 age and in the middle of their lactation period. During the survey qualitative cell counting method has been used and according to results of somatic cell count (SCC) some groups have been established. 93 samples with 0-200.000 have established the control group, 46 samples with 200.000-400.000 have established the trace group, 49 samples with 400.000-1.200.000 have established the 1st group, 33 samples with 1.200.000- 2.200.000 have established the 2nd group and 35 samples with more than 2.200.000 somatic cell count in 1 ml have established the 3rd group. In the milk samples received from these groups nitric oxide and nitrite levels of milk have been determined through the spectrophotometric method based on Griess reaction. The average levels of nitric oxide were established in healthy group; $21,27 \pm 2,86 \mu\text{mol/L}$, in trace group $22,55 \pm 3,09 \mu\text{mol/L}$, the degree of mastitis was getting increase they were established as (respectively 1st, 2nd and 3rd group) $27,42 \pm 2,54 \mu\text{mol/L}$ $30,75 \pm 2,62 \mu\text{mol/L}$ and $37,42 \pm 6,27 \mu\text{mol/L}$. While the average nitrite levels were dedected in healthy milk $0,52 \pm 0,35 \mu\text{mol/L}$, in trace group $0,52 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$, the degree of mastitis was getting increase they were respectively established as (1st, 2nd and 3rd group) $0,99 \pm 0,54 \mu\text{mol/L}$ $1,13 \pm 0,27 \mu\text{mol/L}$ and $1,32 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$. Regarding the nitrite levels in blood there was not any difference between control and trace groups. On the other hand there have been some differences observed between these and remaining 1st, 2nd and 3rd groups ($P < 0,05$). There was not any difference between the control and trace group with respect to the amount of nitric oxide, it has been seen that other groups have showed significant increases between each other and with respect to control and trace groups ($P < 0,05$).

Key Words: Nitrite, Nitric Oxide, Mastitis, Milk, Somatic Cell

Giriş

Nitrik oksit, parakrin etki gösteren ve enzimatik olarak L-arjininden sentezlenen bir moleküldür (Braam, 1999). Nitrik oksit oluşumunda yer alan enzim

grubunun ismi nitrik oksit sentazın (NOS) düzenleme ve etkinlik yönünden yapısal veya uyarılabilir olarak ifade edilen iki tipi bulunmakla birlikte bunlara bağımlı üç izoformu vardır (Förstermann ve ark., 1991; För-

Geliş Tarihi : 04.04.2003 @: abulbul@aku.edu.tr

* Bu çalışma aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

1. Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, AFYON

2. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

termann ve ark., 1998; Alderton ve ark., 2001).

Bir çok fizyolojik ve fizyopatolojik olayda yer alan nitrik oksit aynı zamanda mikroorganizmaların hücre solunumunda görev yapan bazı enzimlerine bağlanarak bunların işlevlerini durdurmasıyla toksik etkisinin oluştuğu belirlenmiştir (Rodeberg, 1995). Bu etki özellikle *tripanasomadan şistozomaya* kadar değişen enfeksiyonlarda kendini göstermektedir (Munoz-Fernandez ve ark., 1992). Bazı mikroorganizmaların (*Mikobakteriyum avium*) hastalık oluşturabilme yeteneği nitrik oksite olan dayanıklılıklarından ileri geldiği bildirilmektedir (McCall ve ark., 1991).

Mastitis, süt veren hayvanların nedenine bakılmaksızın meme bezinin yangılanması, sütün yapısındaki fiziksel, kimyasal ve genellikle bakteriyolojik değişmelerin olması sonucunda süt veriminin azalmasıyla karakterize, ekonomik kaybı yüksek olan bir hastalıktır. (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979). Yapılan araştırmalarda, meme salgısında bulunan somatik hücrelerle hayvanın sağlık durumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmektedir (Kalogridou-Vassiliadou ve ark., 1992; Droke ve ark., 1993; Schukken ve ark., 1993). Somatik hücre sayısı, sütün kalitesi ve mastitisin bir göstergesi olarak süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Meme bezlerinde somatik hücre sayısının artmasına etkiyen en önemli etmen mastitistir. Mastitisi oluşturan organizmalar memeye girdiğinde, savunma mekanizması çok büyük miktarda parçalı çekirdekli akyuvarları süt içerisine göndererek bu organizmaları yok etmeye çalışmaktadır. Eğer enfeksiyon önlenirse hücre sayısı hemen normal seviyesine dönmekte (Manlongat ve ark., 1998), buna karşın, eğer parçalı çekirdekli akyuvarlar mastitis etmenleri ile mücadelede başarılı olamazsa o zaman subklinik enfeksiyon gelişmekte ve böylece parçalı çekirdekli akyuvarlar süte sürekli olarak salınarak hücre sayısını yükseltmektedirler (Gruet ve ark., 2001).

Meme bezinde nitrik oksit ile ilgili araştırmalarda, nitrik oksit oluşumuna katılan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi üzerinde durulmuş ve ilk olarak insan meme bezi kanser hücrelerinde (Thomson ve ark., 1995) daha sonra ise sağlıklı keçi ve siğir meme bezlerinde (Lacasse ve ark., 1996) belirlenmiştir. Prosser ve ark. (1996) ise nitrik oksitin damar genişletici özelliğini ifade ederek siğir ve keçi sütünde oluşan nitrik oksitin meme bezinde mikrovasküler kan dolaşımını düzenleyen en önemli araçlardan birisi olabileceğini bildirmişlerdir. Iizuka ve ark. (1997), meme bezinde sentezlenen nitrik oksitin laktasyonu tetiklediğini ifade ederken yaptıkları diğer bir çalışmada (Iizuka ve ark. (1998), rat meme bezinin ektoderm, süt kanallarının endotel ve epidermis katlarında cNOS etkinliğini belirlemişler ve süt salınımında nitrik oksit ile oksitosinin birlikte önemli gö-

revler üstlenebileceğini ifade etmişlerdir. Bu konuda yapılan diğer araştırmalar sonucunda da akut mastitisli sütlerde nitrik oksit miktarının arttığı kan nitrik oksit düzeyinde herhangi bir değişikliğin görülmediği belirlenmiştir (Blum ve ark. 1999 Bouchard ve ark. 1999 Boulanger ve ark. 2001).

Mastitisli inek sütlerinde, nitrik oksit düzeyindeki değişimler hakkında yeterli araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu konuda yapılan kimi çalışmalarda deneysel akut yangılı meme sütleri kullanılmıştır (Bouchard ve ark., 1999; Blum ve ark., 2000; Boulanger ve ark., 2001). Bu araştırma ile mastitisin varlığı somatik hücre sayımı ile belirlenmiş inek sütlerinde nitrik oksit düzeyindeki değişikliklerin incelenmesi ve süt somatik hücre sayısı ile nitrik oksit arasındaki olası ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada hayvan materyali olarak, Konya Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunan laktasyon ortasında, aynı beslenme ve barındırma koşullarındaki 4-5 yaşlı, 64 İsviçre Esmeri süt ineği kullanıldı

Genel durumları sağlıklı olan hayvanlardan alınan sütlerde Kaliforniya Mastitis Test (CMT) kullanılarak ve somatik hücre sayıları (SHS) belirlenerek gruplar oluşturuldu. CMT negatif (-) ve SHS ml'sinde 0 - 200000 adet olan 93 örnek kontrol grubu (sağlıklı), CMT şüpheli ve SHS ml'sinde 200000 - 400000 adet olan 46 örnek mastitis şüpheli grup, CMT (+) ve SHS ml'sinde 400000 - 1200000 adet olan 49 örnek 1. grubu, CMT (++) ve SHS ml'sinde 1200000 - 2200000 adet olan 33 örnek 2. grubu, CMT (+++) ve SHS ml'sinde 2200000'den fazla olan 35 örnek ise 3. grubu (Miles ve ark., 1993) oluşturdu.

Kan örnekleri hayvanların vena jugularislerinden heparinli ve normal tüplere, süt örnekleri ise hayvanların her bir meme lobundan ayrı ayrı alındı. Örneklerin alındığı gün akyuvar sayımı yapılarak kan ve süt frotileri hazırlandı. Normal tüplere alınan kan örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Kan serumunda ve sütte nitrik oksit ölçümleri yapılmak üzere toplanan tüm örnekler -20 °C'de saklandı.

Kan Değerlerinin Belirlenmesi

Akyuvar sayımı, Türk eriyiği kullanılarak akyuvar formülü (yüzde oranları) ise Pappanheim'in panoptik boyama yöntemi kullanılarak yapıldı (Schalm, 1975).

Süt Örneklerinde Somatik Hücre Sayımı

Meme lobundan alınan süt örneklerinde somatik hücre sayımı İçcan'ın (1993) belirttiği kalitatif sayım yöntemine göre yapıldı.

Cam tüplere 10'ar ml süt örnekleri alınarak, 60°C'de 30 dakika sıcak su banyosuna tabi tutularak homojenize edildi. Daha sonra bu süt örneklerinden 10 µl alınarak 1 sm²'lik lam yüzeyine yayıldı. 52 ml absolut alkol, 44 ml ksilol, 4 ml glacial asetik asit karıştırılarak elde edilen A-X-G çözeltisinde yayma frotiler 7 dakika tutulduktan sonra havada kurutuldu. Sonra % 0.1'lik nötral kırmızı boyası ile 5 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkanıp kurutuldu.

Mikroskopla sayıma geçmeden önce mikroskop objektifine göre sayım yapılacak alan sayısı hesaplandı. Hesaplama objektif mikrometre ile mikroskopun 40'luk objektifinin çapı belirlendi. Bulunan objektif çapı ile mikroskop alanı hesaplandı. Daha sonra 1 sm²'lik alan bulunan mikroskop alanına bölündü (1 sm²/πr²). Çıkan sayı kadar mikroskop alanı sayıldı ve çıkan sonuç 10000 ile çarpıldı.

Kan ve Süt Serumunda Nitrik Oksit ve Nitrit Miktarının Belirlenmesi

Süt ve kan serumları Calapai ve ark (2000) tarafından önerilen yöntemle göre proteinlerinden ayrıldı. Deproteinize örneklerden alınan 100 µl üzerine, 50 ml hidroklorik asitte 400 mg Vanadium klorür çözülmesiyle elde edilen çözeltiden 100 µl eklendi. Bunun üzerine seri halde % 2'lik hidroklorik asit ile 100 ml'ye tamamlanmış 2 g sülfanilamit çözeltisinden 50 µl ve distile suda hazırlanmış % 0.1'lik NEDD çözeltisinden 50 µl ilave edildi ve kültür plağı okuyucusuna yerleştirilerek 550 nm'de okundu. Örneklerdeki nitrik oksit miktarları daha önce hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorban değerlerine (0.5-200 µmol/L) göre hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi (Miranda ve ark, 2001).

Nitrit miktarlarının belirlenmesi amacıyla deproteinize örneklerden 100 µl alındıktan sonra üzerine 50 µl sülfanilamit ve NEDD eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kültür plağı okuyucusuna yerleştirilerek 550 nm'de okundu. Sonuçlar değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitritin absorban değerlerine (0.25-40 µmol/L) göre hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirildi (Miranda ve ark, 2001).

Gruplar arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını ortaya koymak için ise Duncan testi yapıldı. Nitrik oksit ile somatik hücre sayısı arasında korelasyon testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmeler MS Windows SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı (Daniel, 1991).

Bulgular

Hayvanlardan elde edilen kanlarda belirlenen ortalama akyuvar sayısı ve akyuvar yüzde oranları Tablo 1'de, serum nitrik oksit ve nitrit düzeyleri ise Tablo 2'de verildi.

Tablo 1. Ortalama akyuvar sayısı ve akyuvar yüzde oranları (n= 64)

	x±Sx	En düşük	En yüksek
Akyuvar Sayısı (mm ³) (10 ³)	7,22±1,94	40,00	112,00
Lenfosit (%)	60,77±8,51	48,00	76,00
Nötrofil (%)	30,28±9,17	17,00	48,00
Monosit (%)	4,00±1,60	1,00	7,00
Eozinofil (%)	4,57±2,62	1,00	10,00
Bazofil (%)	0,26±0,49	0,00	2,00

Tablo 2. Ortalama serum nitrik oksit ve nitrit düzeyleri (n= 64)

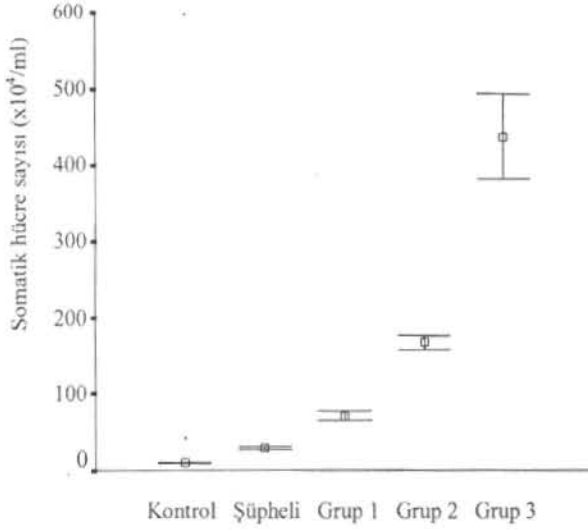
	X±Sx	En düşük	En yüksek
Serum Nitrik Oksit (µmol/L)	24,50±2,89	19,30	36,40
Serum Nitrit (µmol/L)	5,81±1,05	2,90	8,60

Sağlıklı, şüpheli ve mastitisli ineklerden elde edilen süt somatik hücre sayısı değerleri Tablo 3 ve Şekil 1'de bildirildi.

Tablo 3. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerde somatik hücre sayıları (SHS)

Grup	n	SHS (x 10 ⁴) X±Sx	En düşük (x 10 ⁴)	En yüksek (x 10 ⁴)
Kontrol	93	9,50±4,71 ^a	2	19
Şüpheli	46	28,82±5,16 ^a	21	38
1	49	71,20±21,17 ^b	42	119
2	33	168,00±27,40 ^c	123	218
3	35	526,85±313,51 ^d	237	720

Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 1. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerdeki somatik hücre sayıları

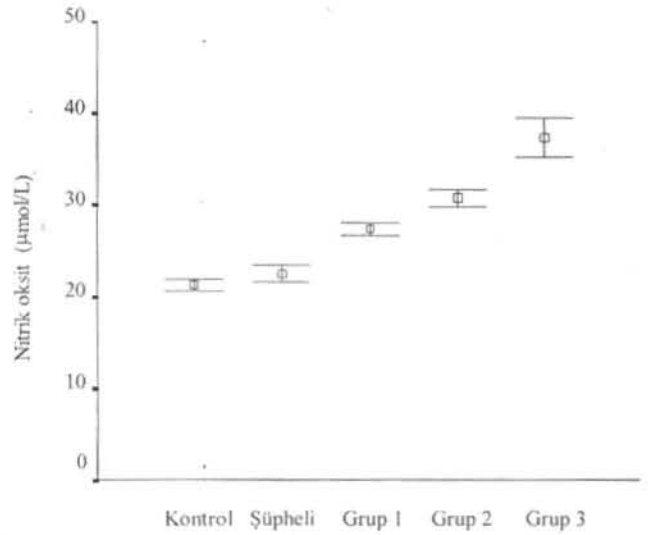
Sütte somatik hücre sayıları bakımından kontrol ve şüpheli gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı, diğer yandan mastitisin derecesi arttıkça (1, 2 ve 3. grup) somatik hücre sayılarının anlamlı düzeyde arttığı ($p<0.05$) ve bu üç grubun somatik hücre sayılarının kontrol ve şüpheli gruplardakinden yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi.

Kontrol, şüpheli ve mastitisli ineklerin sütlerinde belirlenen nitrik oksit düzeyleri Tablo 4 ve Şekil 2'de gösterildi.

Tablo 4. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerde nitrik oksit düzeyleri

Grup	N	$X \pm Sx$ ($\mu\text{mol/L}$)	En düşük ($\mu\text{mol/L}$)	En yüksek ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol	93	21,27 \pm 2,86 ^a	12,80	27,80
Şüpheli	46	22,55 \pm 3,09 ^a	14,70	28,60
1	49	27,42 \pm 2,54 ^b	22,20	37,00
2	33	30,75 \pm 2,62 ^c	26,50	37,30
3	35	37,42 \pm 6,27 ^d	26,40	54,80

Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 2. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerde nitrik oksit düzeyleri

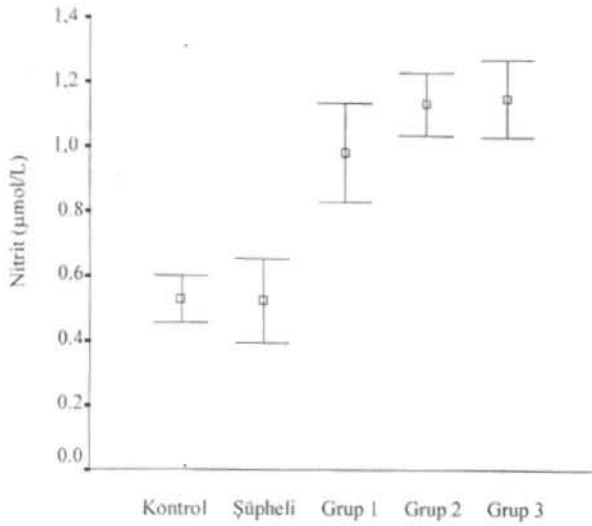
Bulgular sonucunda, kontrol grubu ile mastitis şüpheli grup arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmazken, mastitisin derecesi arttıkça nitrik oksit miktarının anlamlı düzeyde arttığı ve bu üç grubun nitrik oksit düzeylerinin kontrol ve şüpheli gruplardakinden yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Kontrol, şüpheli ve mastitisli ineklerin sütlerinde belirlenen nitrit düzeyleri Tablo 5 ve Şekil 3'de gösterildi.

Tablo 5. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerde nitrit düzeyleri.

Grup	N	$X \pm Sx$ ($\mu\text{mol/L}$)	En düşük ($\mu\text{mol/L}$)	En yüksek ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol	93	0,52 \pm 0,35 ^a	0	1,60
Şüpheli	46	0,52 \pm 0,43 ^a	0	2,02
1	49	0,99 \pm 0,54 ^b	0	2,50
2	33	1,13 \pm 0,27 ^b	0,63	1,96
3	35	1,32 \pm 0,46 ^b	0,40	2,30

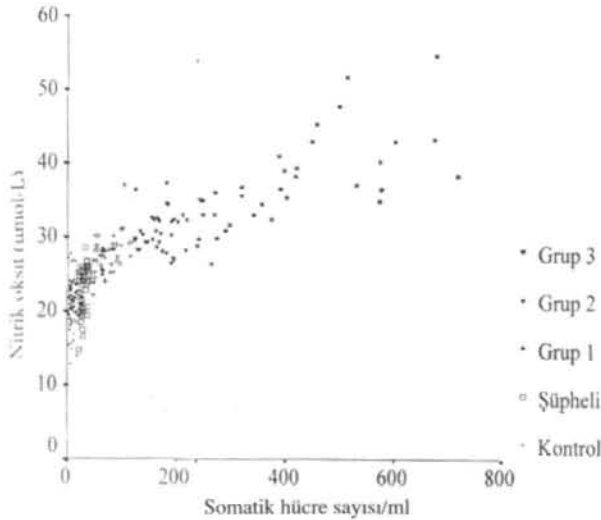
Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0,05$).



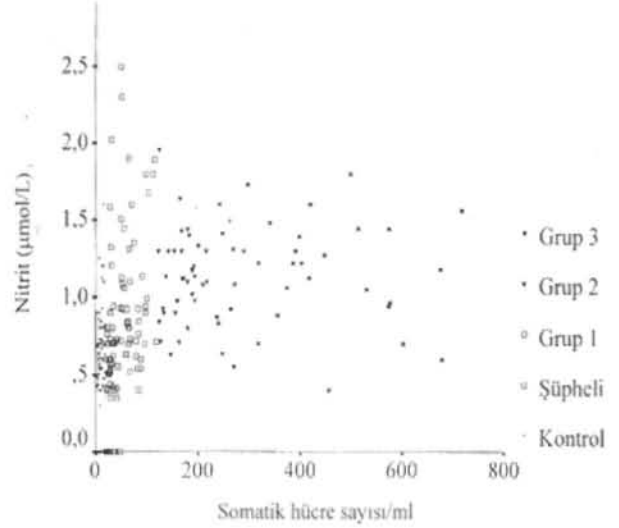
Şekil 3. Kontrol, şüpheli ve mastitisli gruplara ait sütlerde nitrit düzeyleri

Sağlıklı ($0,52 \pm 0,35 \mu\text{mol/L}$) ve mastitis şüpheli ($0,52 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$) inek sütlerinde ortalama nitrit düzeylerinin birbirinden farklı olmadığı, ayrıca 1. ($0,99 \pm 0,54 \mu\text{mol/L}$), 2. ($1,13 \pm 0,27 \mu\text{mol/L}$) ve 3. ($1,32 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$) gruplardaki mastitisli hayvanların sütlerinde de nitrit düzeyinin anlamlı olarak değişmediği belirlenmiştir. Ancak, mastitisli inek sütlerindeki nitrit miktarının kontrol ve mastitis şüpheli sütlerdekinden yüksek olduğu tespit edildi.

Somatik hücre sayısına göre nitrik oksit dağılımı Şekil 4'de, somatik hücre sayısına göre nitrit dağılımı ise Şekil 5'de verilmektedir.



Şekil 4. Somatik hücre sayısına göre nitrik oksit dağılımı



Şekil 5. Somatik hücre sayısına göre nitrit dağılımı

Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada, bir yangı aracı olarak bilinen nitrik oksit ile mastitis sırasında artan somatik hücre sayısı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amacıyla, süt ineklerinde süt nitrik oksit miktarı ve somatik hücre sayısı belirlenmiştir.

Anafaksi, sistemik ve paraziter hastalıklarda değişen akyuvar sayısı ve akyuvar yüzde oranları (Schalm ve ark., 1975; Feldman ve ark., 2000) ile yine aynı hastalıklarda artan nitrik oksit düzeyi bildirimlerinin (Munoz-Fernandez ve ark., 1992; Sato ve ark., 1996; Champion ve Kadowitz, 1998) yanı sıra sütün katımına kanın da etki ettiği göz önünde bulundurularak araştırma öncesi klinik muayeneleri desteklemek amacıyla hayvanların kanlarında akyuvar sayısı, akyuvar yüzde oranları ile kan nitrik oksit ve nitrit düzeyleri belirlendi.

Genel klinik ve meme muayenesini doğrulayan normal sınırlar içerisindeki akyuvar sayısı ve yüzde oranları, hayvanlarda genel bir enfeksiyonun yanı sıra akut bir mastitisin bulunmadığı klinik tablosunu destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra deneysel akut mastitisi izleyen 12. saatte akyuvar sayısında görülen belirgin azalmanın zamanla daha da düşerek 144. saatte normale döndüğü (Monfardini ve ark., 1999) ve etken taramasıyla belirlenen mastitis olgusunda akyuvar sayısı ve akyuvar yüzde oranlarında anlamlı bir farkın bulunmadığı, akut mastitiste değişen değerlerin subklinik ve klinik enfeksiyonlarda değişmediği (Soltys ve Quinn, 1997) bildirim bulgumuz ile uyum sağlamaktadır.

Kanda belirlenen nitrik oksit düzeyinin sağlıklı hayvanlar için bildirilen normal değerler içerisinde bulunması nitrik oksit miktarında artışa yol açacak sistemik bir enfeksiyon olmadığı düşüncesini destekler nitelikte bulunmakla birlikte mastitis hakkında bilgi vermemektedir. Çünkü, araştırmacılar mastitis esnasında kan nitrik oksit miktarının değişmediğini bildirmektedirler (Hirvonen ve ark., 1999; Blum ve ark., 2000).

Akut ve perakut mastitiste meme ve meme salgısında oluşan değişikliklerin çoğu kez dışarıdan gözlemlenerek belirlenebileceği, ancak kronik mastitiste dış gözlemlerle tanının nadiren konulabileceği, subklinik mastitiste ise dış bakıyla teşhisin mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle subklinik ve kronik mastitis tanısı için süt somatik hücre sayısının belirlenmesi veya patojen etkenin ayırt edilmesi (İşcan, 1993) yada sütün bileşiminde oluşan değişikliklerin ortaya çıkarılması vurgulanmaktadır (Sandholm ve Mattila 1986). Nitelik, meme salgısında bulunan somatik hücre sayısı ile mastitis arasında doğrudan bir ilişki (korelasyon) olduğu belirtilmekte ve yangı durumunda somatik hücre sayısının önemli miktarda arttığı ileri sürülmektedir (Kalogridou-Vassiliadou ve ark., 1992; Droke ve ark., 1993; Schukken ve ark., 1993; Manlongat ve ark., 1998). Bu bildirimlerden yola çıkarak sütle somatik hücre sayımı yapılarak mastitis tespit edilmiştir. Somatik hücre sayımı sonucunda, sağlıklı ve mastitis şüpheli gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, değişik derecedeki mastitisli sütler ve bu sütler ile sağlıklı ve şüpheliler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı ve mastitis şüpheli sütler arasında anlamlı bir farkın bulunmaması ise somatik hücre sayılarının homojen bir dağılım göstermemesi ile açıklanabilir.

Mastitisin derecesi ile birlikte süt nitrik oksit miktarında görülen artışın nedeninin, somatik hücrelerin %98'inden fazlasını oluşturan parçalı çekirdekli nötrofil ve makrofajların (Manlongat ve ark., 1998) mikroorganizmalar tarafından uyarılması sonucunda etkinleşen iNOS kaynaklı nitrik oksite bağlı olduğunu düşündürmektedir. Sağlıklı ve mastitis şüpheli sütlerde nitrik oksit miktarı ve somatik hücre sayısında anlamlı bir farkın bulunmaması ve yapılan bir in vitro çalışmada (Boulanger ve ark., 2001) sığırlardan elde edilmiş parçalı çekirdekli nötrofillerin ve makrofajlara dönüşen monositlerden iNOS kaynaklı nitrik oksit oluştuğunun belirlenmiş olması bu yorumu güçlendirmektedir.

Somatik hücre sayısı ile nitrik oksit miktarı arasında bulunan yüksek korelasyon ($r=0,831$), nitrik oksit miktarındaki artışın bu hücrelere bağlı olduğu düşüncesini desteklemektedir. Sağlıklı ve mastitis şüpheli sütlerdeki hem somatik hücre sayıları hem de nitrik

oksit miktarları için anlamlı bir farklılığın bulunmamış olmasına karşın birbirleri arasında yüksek korelasyon belirlenmesi somatik hücrelerle nitrik oksit arasındaki ilişkiyi ortaya koyan diğer kanıt olarak düşünülmektedir.

Mastitis yönünden sağlıklı hayvanlardan elde edilen sütlerde nitrik oksit düzeylerinin diğer araştırmalardaki (Bouchard ve ark., 1999; Blum ve ark., 2000) değerlere göre yüksek bulunması, beslenme farklılığından kaynaklanan eksojen nitrik oksit oluşumunun yanı sıra laktasyon dönemi ve hormonal etkiler gibi bireysel farklılıklara bağlanabilir.

Nitrit düzeyi bakımından sağlıklı ve mastitis şüpheli sütler arasında da anlamlı bir farkın olmaması ve mastitisli sütlerin, sağlıklı ve şüphelilere göre farklılık göstermesi mastitis sırasında artan nitrik oksit miktarı ile açıklanabilir.

Mastitisli sütlerde nitrik oksit miktarının yükselmesine paralel olarak nitrit miktarının da nitrik oksite bağımlı şekilde artması beklenirken, değişik derecelerdeki mastitisli hayvanların nitrit miktarında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Ayrıca, araştırmada kullanılan hayvanların kanlarındaki nitrit düzeylerine göre süt nitrit miktarlarının bazal düzeyde kalması sütle varlığı bildirilen (Stevens ve ark., 2000; Harrison, 2002) ksantin oksiredüktaz enzimi tarafından hipoksik koşullarda nitritin peroksinitrite dönüştürüldüğü bildirimleri ile (Godber ve ark., 2000; Ledbetter ve ark., 2001) açıklanabilmektedir.

Sonuç olarak mastitis esnasında artan süt somatik hücre sayısı ile nitrik oksit arasında pozitif ilişki olduğu, mastitisin süt nitrik oksit seviyesinde artış oluşturduğu, ancak nitrik oksit metabolitlerinden nitrit miktarında ise aynı oranda yükselmeye neden olmadığı kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric Oxide Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biochem.J.*, 357, 593-615.
- Arda, M., İstanbulluoğlu, E. (1979). Mastitislere Neden Olan Aerob, Anaerob, Mikroplazma ve Mantarların İzolasyonu, İdentifikasyonu. Bunlara Karşı Etkili Olan Antibiyotik ve Fungusitlerin Saptanması. *Ank.Üniv.Vet.Fak.Derg.*, 26(3-4), 14-29.
- Blum, J.W., Dosogne, H., Hocben, D., Vangrocnwcghe, F., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Burvenich, C. (2000). Tumor Necrosis Factor- α and Nitrite/Nitrate Responses Du-

- ring Acute Mastitis Induced by Escherichia Coli Infection and Endotoxin in Dairy Cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 19, 223-235.
- Bouchard, L., Blais, S., Desrosiers, C., Zhao, X., Lacasse, P. (1999). Nitric Oxide Production During Endotoxin-Induced Mastitis in the Cow. *J.Dairy S*, 82: 2574-2581.
- Boulanger, V., Bouchard, L., Zhao, X., Lacasse, P. (2001). Induction of Nitric Oxide Production by Bovine Mammary Epithelial Cells and Blood Leukocytes. *J.Dairy Sci.*, 84, 1430-1437.
- Braam, B. (1999). Renal Endothelial and Macula Densa Nos: Integrated Response to Changes in Extracellular Fluid Volume. *Am. J. Physiol.*, 276, R1551-R1561
- Calapai, G., Marciano, M.C., Corica, F., Allegra, A., Parisi, A., Frisina, N., Caputi, A.P., Buemi, M. (2000). Erythropoietin Protects Against Brain Ischemic Injury By Inhibition of Nitric Oxide Formation *Eur.J.Pharmacol.*, 401(3), 349-56
- Champion, H.C., Kadowitz, P.J. (1998) R(-)-Alpha-Methyl-Histamine has Nitric Oxide-Mediated Vasodilator Activity in the Mesenteric Vascular Bed of the Cat. *Eur.J.Pharmacol.*, 343, 209-216.
- Daniel, W.W. (1991). "Biostatistics: A Foundation for Analysis in The Health Sciences". 5th Ed. John Wiley & Sons Inc., Canada.
- Droke, E. A., Paape, M.J., Di Carlo, A.L. (1993). Prevalence of High Somatic Cell Counts in Bulk Tank Goat Milk. *J.Dairy Sci.*, 76, 1035-1039.
- Feldman, B.F., Zink, J.G., Jain, N. (2000). "Schalm'S Veterinary Hematology". 5th Ed., Williams & Wilkins. Philadelphia, Usa.
- Förstermann, U., Boissel, J.P., Kleinert, H. (1998). Expressional Control Of The "Constitutive" Isoforms of Nitric Oxide Synthase (Nos I And Nos Iii). *Faseb J.*, 12, 773-790.
- Förstermann, U., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M., Murad, F. (1991). Isoforms of Nitric Oxide Synthase Characterization and Purification From Different Cell Types. *Bioc.Pharmacol.*, 42(10), 1849-1857.
- Godber, B.L.J., Doel, J.J., Durgan, J., Eisenthal, R., Harrison, R. (2000). A New Route To Peroxynitrite: A Role Xanthine Oxidoreductase. *Febs Letters*, 475, 93-96.
- Gruet, P., Maincent, P., Bertholet, X., Kaltsatos, V. (2001). Bovine Mastitis and Intramammary Drug Delivery: Review and Perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 245-259.
- Harrison, R. (2002). Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where Are We Now? *Free Radical Biology & Medicine*, 33(6), 774-797.
- Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. (1999). Acute Phase Response in Dairy Cows With Experimentally Induced Escherichia Coli Mastitis. *Acta Vet. Scand.*, 40, 35-46.
- Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S., Koike, M. (1998). The Presence of Nitric Oxide Synthase in the Mammary Glands of Lactating Rats. *Pediatrics Research*, 44(2), 197-200.
- Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S., Koike, M., Minatogawa, Y. (1997). Nitric Oxide May Trigger Lactation in Humans. *The Journal of Pediatrics*, 131(6), 839-843.
- İşcan, D. (1993). Mastitiste Somatik Hücre Sayımı Yöntemleri ve Somatik Hücre Sayısının Önemi. *Veterinarium*, 4 (2), 47-56.
- Kalogridou-Vassiliadou, D., Manolkidis, K., Tsigoida, A. (1992). Somatic Cell Counts in Relation To Infection Status of The Goat Udder. *J.Dairy Res.*, 59, 21-28.
- Lacasse, P., Farr, V.C., Davis, S.R., Prosser, C.G. (1996). Local Secretion of Nitric Oxide and the Control of Mammary Blood Flow. *J.Dairy Sci.*, 79, 1369-1374.
- Ledbetter, T.K., Paape, M.J., Douglass, L.W. (2001). Cytotoxic Effects of Peroxynitrite, Polymorphonuclear Neutrophils, Free-Radical Scavengers, Inhibitors of Myeloperoxidase, and Inhibitors of Nitric Oxide Synthase on Bovine Mammary Secretory Epithelial Cells. *AJVR.*, 62(3), 286-292.
- Manlongat, N., Yang, T.J., Hinckley, L.S., Bendel, R.B., Krieger, H.M. (1998). Physiologic-Chemoattractant-Induced Migration of Polymorphonuclear Leukocytes in Milk. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(3), 375-381.
- Mccall, T.B., Feelisch, M., Palmer, R.M.J., Moncada, S. (1991). Identification of N-Iminoethyl-L-Ornithine As An Irreversible Inhibitor of Nitric Oxide Synthase In Phagocytic Cells. *Br.J.Pharmacol.*, 102, 234-238.
- Miles, H., Lesser, W., Sears, P. (1993). The Economic Implications of Bioengineered Mastitis Control. *J.Dairy Sci.*, 75, 596-605.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, A.D. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method For Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
- Monfardini, E., Burvenich, C., Massart-Leen, A.M., Smits, E., Paape, M.J. (1999). Effect of Antibiotic Induced Bacterial Clearance in the Udder on L-Selection Shedding of Blood Neutrophils in Cows With Escherichia Coli Mastitis.

Vet.Immun.Immunopath., 67, 373-384.

Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A., Fresno, M. (1992). Synergism Between Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interferon-Gamma on Macrophage Activation For The Killing of Intracellular Trypanosoma Cruzi Through A Nitric Oxide-Dependent Mechanism. Eur.J.Immunol., 22, 301-307

Prosser, C.G., Davis, S.R., Farr, V.C., Lacasse, P. (1996). Regulation of Blood Flow in the Mammary Microvasculature. J.Dairy Sci., 79, 1184-1197.

Rodeberg, D.A., Chaet, M.S, Bass, R.C, Arkovitz, M.S, Garcia, V.F. (1995). Nitric Oxide: An Overview. The American Journal of Surgery, 170, 292-303.

Sandholm, M., Mattila, T. (1986). Biochemical Aspects of Bovine Mastitis. Isr.J.Vet.Med., 42(4), 405-415.

Sato, E.F., Utsumi, K., Inoue, M. (1996). Human Oral Neutrophils: Isolation and Characterization. Method Enzymol., 268, 503-509

Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J. (1975). "Veterinary Hematology". 3rd Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

Schukken, Y., A. Leslie, W.K., Martin, S.W. (1993). Dynamics and Regulation of Bulk Milk Somatic Cell Counts. Can.J.Vet.Res., 57, 131-135.

Soltys, J., Quinn, T.M. (1999). Selective Recruitment Of T-Cell Subsets to the Udder During Staphylococcal and Streptococcal Mastitis: Analysis of Lymphocyte Subsets and Adhesion Molecule Expression. Infection And Immunity, 67(12), 6293-6302.

Stevens, C.R., Millar, T.M., Clinch, J.G., Kanczler, J.M., Bodamyali, T., Blake, D.R. (2000). Antibacterial Properties of Xanthine Oxidase in Human Milk. Lancet, 356, 829-830.

Thomsen, L.L., Miles, D.W., Happerfield, L., Bobrow, L.G., Knowles, R.G., Moncada, S. (1995). Nitric Oxide Synthase Activity in Human Breast Cancer. Br.J.Cancer, 72, 41-44.