

## Investigation of TAS and TOS Levels in Sheep with Hydatid Cyst

Handan MERT<sup>1</sup>, Semih YAŞAR<sup>2</sup>, Nihat MERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Technics, Özalp Vocational High School, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

### ABSTRACT

*Echinococcus granulosus* is a larval form of the hydatid cyst is a parasitic zoonosis commonly seen in animals and humans. The disease is endemic in Turkey is still far leads to substantial economic losses. In this study, TAS and TOS levels will be determined in cyst hydatite sheep and the changes of these biochemical parameters in cystic echinococcosis were investigated. The material of the study was composed of 2-3 aged Morkaraman sheep which were slaughtered and slaughter house in the Özalp district of Van province. The general health status of the sheep before slaughtering was checked by physical examination and blood samples were taken. After slaughtered, cyst hydatid examination was performed in different organs of the animals. The experimental group (cystic group) of the 25 sheep study with a positive (fertile cyst) of protoscolex, and 15 sheep with no pathological lesion on organ examinations and healthy physical examination were the control group. Serum samples were taken from healthy and blood samples taken from animals infected with hydatid cyst. TAS and TOS levels in serum samples were determined by spectroscopic methods using commercial kits. In control group sheep had TAS  $1.67 \pm 0.04$  mmol trolox Equiv./L and in sheep infected with cystic echinococcosis was  $1.44 \pm 0.05$  mmol trolox Equiv./L ( $p < 0.01$ ), TOS levels were  $4.46 \pm 0.58$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L in the control group and  $6.94 \pm 0.59$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L in the cystic echinococcosis group ( $p < 0.001$ ). OSI values were  $0.27 \pm 0.08$  Arbitrary Unit in the control group and  $0.48 \pm 0.05$  Arbitrary Unit in sheep infected with cystic echinococcosis. As a result of the migration of phagocytic cells to the cystic region, lipid peroxidation occurs due to the use of more oxygen. As a result, TAS levels decreased and TOS levels increased in sheep with hydatid cysts.

**Key words:** Echinococcus, TAS, TOS, Sheep.

## Kist Hidatitli Koyunlarda TAS ve TOS Düzeylerinin İncelenmesi

### ÖZET

Etkeni *Echinococcus granulosus*'ün larval formu olan kist hidatik hayvanlarda ve insanlarda yaygın olarak görülen paraziter bir zoonozdur. Hastalık, Türkiye'de halen endemik olarak seyretmekte olup oldukça önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu çalışmada, kist hidatitli koyunlarda TAS ve TOS düzeyleri tespit edilerek, bu biyokimyasal parametrelerin kistik ekinokokozisteki değişimleri araştırıldı. Araştırmanın materyalini, Van ili Özalp ilçesinde mezbahaneye getirilen ve kesimi yapılan 2-3 yaşlı Morkaraman koyunlar oluşturdu. Kesim öncesi koyunların genel sağlık durumları fiziki muayene ile kontrol edilerek kan örnekleri alındı. Kesim sonrası hayvanların değişik organlarında kist hidatik muayenesi yapıldı. Protoskoleks yönünden pozitif (fertil kist) olan 25 adet koyun çalışmanın deneme grubunu (kistik grup), organ muayenelerinde herhangi bir patolojik lezyon bulunmayan ve fiziki muayenede sağlıklı görünen 15 adet koyun ise kontrol grubunu oluşturdu. Sağlıklı ve kist hidatik ile enfekte hayvanlardan alınan kan örneklerinin serumları ayrıldı. Serum örneklerinde TAS ve TOS düzeyleri Spektroskopik metodlar ile ticari kitler kullanılarak belirlendi. Kontrol grubu koyunlarda TAS  $1.67 \pm 0.04$  mmol trolox Equiv./L, kistik ekinokokozis ile enfekte koyunlarda  $1.44 \pm 0.05$  mmol trolox Equiv./L ( $p < 0.01$ ) olarak saptanırken TOS düzeyleri kontrol grubunda  $4.46 \pm 0.58$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L, kistik ekinokokozisli grupta  $6.94 \pm 0.59$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L olarak bulundu ( $p < 0.001$ ). OSI değeri ise kontrol grubunda  $0.27 \pm 0.08$  kistik ekinokokozis ile enfekte koyunlarda  $0.48 \pm 0.05$  Arbitrary Unit olarak hesaplandı. Fagositik hücrelerin kistik bölgeye göçü sonucu aktivitelerine bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Bunun sonucunda hidatik kistli koyunlarda TAS düzeylerinde azalma, TOS düzeylerinde ise artma gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Ekinokok, Koyun, TAS, TOS.

## GİRİŞ

Kistik ekinokokkozis, *Echinococcus granulosus* (*E. Granulosus*) larvalarının ara konaklara yerleşip gelişmesi sonucu oluşan, Türkiye’de ve dünyada hayvan ve insan sağlığını önemli derecede tehdit eden paraziter zoonoz bir hastalıktır. Ülkemizde bu hastalık, hayvan türlerinin bölgelere göre farklılık göstermesi, iklim koşulları, toplumun sosyal ve ekonomik açıdan gelişmişlik düzeyleri gibi sebeplere bağlı olarak geniş bir yayılma alanı göstermektedir (Güralp 1981).

Konaklar erişkin parazitleri bağırsaklarında bulundurur ve dışkı ile atılan *E. granulosus* yumurtaları insanlarda ve doğal ara konaklar olan sığır, keçi, koyun gibi değişik hayvanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Hastalık en fazla karaciğer olmak üzere; beyin, dalak, böbrek, kalp, kemik gibi organlarda etkiler göstermektedir (Mert ve Güler 1991; Ersayit 2009).

Bu hastalığın insan ve hayvanlara en önemli bulaşma kaynağı parazit ile enfekte olan köpeklerdir. Bir toplumdaki kist hidatik yaygınlığının toplum bünyesinde var olan köpeklerdeki parazit enfeksiyonları ile doğrudan bir ilişkisi bulunmaktadır. Şili, Yeni Zelanda, Kıbrıs, Avustralya gibi ülkeler, parazit ile verdikleri mücadele kapsamında enfekte olan köpeklere düzenli tedaviler uygulayarak, insanlarda kist hidatik vakalarında önemli düşüşler sağlamışlardır (Economides ve ark. 1998).

Kist hidatik insanlar için ekonomik ve sosyal kayıplara sebep olan bir hastalıktır. Bun kayıplar arasında, hastalığın tanı harcamaları, ameliyat giderleri, hastanede tedavi ve ilaç giderleri, ulaşım masrafları, verim ve iş gücü kayıpları, bireyin yaşamsal verimliliğin azalması sayılabilir (Altıntaş ve ark. 2004).

Organizmada oksidan ile antioksidan maddeler arasındaki dengenin oksidan maddeler lehine bozulması olayına oksidatif stres adı verilir. Bu durum canlı için patolojiktir. Bu dengesizlik sonucu oluşan oksidatif stresin toplamı, total oksidatif stres ya da total oksidan seviye/status (TOS) olarak gösterilir. Oksidatif stres durumu aşırı reaktif oksijen ya da nitrojen maddelerin vücutta üretimi ile veya antioksidan tampon sistemlerinin düzgün çalışmaması sonucu meydana gelir. Total antioksidan kapasitesi (TAS) vücutta mevcut olan antioksidan maddelerin hücrel membranları ve başka hücrel yapıları oksidanların hasarına karşı koruma ve oksidanların oluşumunu önleme kapasitesinin bir göstergesidir (Mac Kinnon ve ark. 1999).

Total antioksidan seviyesinin tesbiti, antioksidan maddelerin tek tek ölçülmesinden daha doğru bilgiler verebilir. Çünkü TAS, serumda bulunan antioksidan özellik gösteren tüm maddelerin toplam aktivitesini ortaya koyar (Erel 2004).

Eşlenmemiş elektron taşımakta olan atom ya da atom grupları serbest radikal olarak isimlendirilir. Konak savunmasının ve doku hasarının önemli mediyatörlerinden biri oksijen radikalleridir. Serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkilerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri korunma amaçlı hücrelerce kullanılır. Serbest oksijen radikalleri özellikle; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz gibi enzimatik olan ve  $\alpha$ -tokoferol, glutatyon, C-vitamini ve karotenoidler gibi nonenzimatik çeşitli antioksidanlar tarafından uzaklaştırılabilir. Serbest radikallerin üretiminin artması ve hazır bulunan antioksidan yapılar arasında oluşan dengesizlik oksidatif strese neden olmaktadır (Miller ve ark. 1993).

Serbest radikaller aracılığı ile oluşan hücre hasarında en önemli yollardan biri membranlarda bulunan lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Lipid peroksidasyonu sonucunda membran üzerinde yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı meydana gelir. (Grisotto ve ark. 2000; Marnett 2002).

Parazitin bulunduğu konak immün sisteminde savunma, hücreler vasıtası ile yapılır. Bu savunma sisteminde aktive olmuş fagositer hücreler tarafından üretilen farklı sitotoksik ajanlar; reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri bulunmaktadır. Oluşan bu ürünler serbest radikal yapısında oksidan moleküllerdir ve parazit viabilitesini kötü yönde etkilemektedir. Parazitik canlılar, oksidan ajanların temizlenmesi için enzimatik olan (glutatyon peroksidaz, superoksid dismutaz ve katalaz vb.) ve enzimatik olmayan (vitamin C, vitamin E, glutatyon, tiyoller vb.) antioksidan yapılardan en az bir veya birkaç tanesini içermektedir (Barret 1981). Bununla birlikte, hidatik kistler biyokimyasal açıdan birçok yönleriyle araştırılmış olmasına rağmen, hidatik kistlerin gelişimi ile oksidanların ve antioksidanların rolünü ortaya koyan bilgilerin yeterli düzeyde olmadığı görülmektedir (Gottstein 1992).

Bu çalışmada koyun serumlarında TAS ve TOS düzeyleri ölçülerek, ekinokok kistli hayvanlardaki biyokimyasal değişimlerin incelenmesi amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın materyalini Van ili Özalp ilçesinde mezbahaneye getirilen 2-3 yaşlı Morkaraman koyunlar oluşturdu. Kesim öncesi koyunların genel sağlık durumları fiziki muayene ile kontrol edilerek kan örnekleri alındı. Kesim sonrası hayvanların değişik organlarında kist hidatit muayenesi yapıldı. Protoskoleks yönünden pozitif (fertil kist) olan 25 adet koyun çalışmanın kistik grubunu, organ muayenelerinde herhangi bir patolojik lezyon bulunmayan ve fiziki muayenede sağlıklı görünen 15 adet koyun ise kontrol grubunu oluşturdu. Alınan kan örnekleri +4 °C'da laboratuvara taşındı ve 3000 rpm'de +4 °C'da 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Koyun kanlarına ait serum örneklerinde TAS (Erel 2004) ve TOS (Erel 2005) düzeyleri spektroskopik metotlar ile ticari kitler kullanılarak belirlendi.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 20.0 Windows programı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde bağımsız T testi kullanıldı ve sonuçlar ortalama  $\pm$  SE (standart hata) olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.01$  anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Araştırmanın tamamlanması ile ölçüm yapılan parametrelerin ortalamaları gruplar bazında tablollaştırıldı. Kontrol ve kistik grupların TAS ve TOS ortalamaları istatistiksel olarak yorumlandı. TAS değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) önemli bulunurken, TOS düzeyleri farklılığı ( $p < 0.001$ ) önemli bulundu. OSI (Oksidatif stres indeksi) de ( $p < 0.001$ ) önemli bulundu.

**Tablo 1.** Ekinokok kistli ve sağlıklı koyunların serum TAS, TOS ve OSI düzeyleri

Parametreler	Kontrol Grubu ( $\bar{X} \pm SE$ ) (n=15)	Kistik Grubu ( $\bar{X} \pm SE$ ) (n=25)	
TAS (mmol trolox Equiv./L)	1.67 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.05	$p < 0.01$
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L)	4.46 $\pm$ 0.58	6.94 $\pm$ 0.59	$p < 0.001$
OSI (Arbitrary Unit)	0.27 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.05	$p < 0.001$

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlılığını devam ettiren aktif kistler, konak canlıda yangıya sebep olacağı için konakta bulunan nonspesifik immun koruma sisteminden çıkan reaktif oksijen türlerinin oluşturacağı toksik etkilerine karşı enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanları yapılarında bulundurabilirler. Hidatik kist sıvısında yaşamlarını devam ettiren paraziter canlılar büyüme ve gelişimleri için konak canlıya ait pek çok metaboliti kullanabildiği bildirilmektedir (Jansen ve ark. 1991; Frayha ve Haddat 1980).

Pek çok hastalığın patogenezinde oksidatif stres rol almaktadır (Miller ve ark. 1993). Parazit enfeksiyonlarında konakçı organizma, oksidatif strese neden olan serbest radikaller vasıtasıyla parazitlere karşı tepki mekanizması oluşturur (Woodbury ve ark. 1984). Parazitin bulaştığı hayvanlarda oksidatif stres oluştuğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır (Sanchez-Campos ve ark. 1999; Derda ve ark. 2004; Şimşek ve ark. 2006; Saleh 2008; Saleh ve ark. 2009). Serbest radikallerden biri olan NO, konakçı savunmada ekinokok kökenli enfeksiyonlara karşı önemli olarak kullanılırken fazla miktarda üretildiğinde oksidatif hasara sebep olabilmektedir (Zeghir-Bouteldja ve ark. 2009). Oksidatif stresin oluştuğu, kist hidatik teşhisi bırakılan insanlarda ve çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Koltas ve ark. 2006; Ersayit ve ark. 2009; Kılıç ve ark. 2010; Heidarpour ve ark. 2012; Hanedan ve ark. 2015).

Fagositik hücrelerin kistik bölgeye göçü sonucu aktivitelerine bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Çalışmamızda belirlediğimiz TAS ve TOS düzeyleri yapılmış diğer çalışmalarla paralel olarak hidatik kistli koyunlarda TAS düzeylerinde azalma, TOS düzeylerinde ise artma şeklinde gözlenmiştir.

Sonuç olarak kist hidatitli koyunlarda saptanan oksidan durumdaki artış yarattığı oksidatif stresle organizmalarda birçok biyokimyasal hasarın oluşmasına neden olur. Böylece hayvanların genel sağlık durumu bozulur, her türlü bakteriyel, fungal ve viral invazyonlara predispose hale gelir. Üreticilerin ve klinisyenlerin hayvanlarda verimi düşürerek ekonomik zararlara neden olan bu hastalığa karşı profilaktif çalışmalara, toplum sağlığı için büyük risk olan hidatik kistin yayılmasının durdurulmasına önem vermesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. (2004). Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, Ege Üniversitesi matbaası, Bornova, İzmir.
- Barret J. (1981). Biochemistry of parasitic helminth's. Macmillan Publishers Ltd; p.65-250. London.
- Derda M, Wandurska-Nowak E, Hadas E. (2004). Changes in the level of antioxidants in the blood from mice infected with *Trichinella spiralis*. Parasitol. Res., 93: 207-210.
- Economides P, Christofia G, Gemmell MA. (1998). Control of *Echinococcus granulosus* in Cyprus and comparison with other island models. Vet Parasitol, 79: 151-163.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 37(4): 277-85.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem, 38(12): 1103-11.
- Ersayit D, Kilic E, Yazar S, Artis T. (2009). Oxidative stress in patients with cystic echinococcosis: relationship between oxidant and antioxidant parameters. Sağlık Bil. Dergisi, 18: 159-166.
- Ersayit D. (2009). Kistik Ekinokokkozisli Hastalarda Oksidatif Stres: Oksidan Ve Antioksidan Parametreler Arasındaki İlişki. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Frayha GJ, Haddat R. (1980). Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *E. granulosus*. Int J Parasitol, 10: 359-64
- Gottstein B. (1992). Molecular and immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin Microbiol Rev, 5: 248-261.
- Grisotto PC, Dos Santos AC, Continho-Netto J, Cherri J, Piccinato C. (2000). Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. J Surg Res, 92: 1-6.
- Güralp N. (1981). Helmintoloji (2 baskı). Ankara Üniv Vet Fak Yayınları, Ankara.
- Hanedan B, Kirbas A, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kilic K, Benzer F. (2015). Arginase activity and total oxidant/antioxidant capacity in cows with lung cystic echinococcosis. Med Weter, 71(3): 167-170.
- Heidarpour M, Mohri M, Borji H, Moghdass E. (2012). Oxidative stress and trace elements in camel (*Camelus dromedarius*) with liver cystic echinococcosis. Vet Parasitol, 187: 459-463.
- Jansen D, Rueda M, De Rycke PH, Osuna A. (1991). Host parasite relationship in hydatidosis: Comparative analysis of hydatid cyst fluid and sheep serum. Belgium J Zool, 121(2): 179-91.
- Kılıç E, Yazar S, Başkol G, Artış T, Ersayit D. (2010). Antioxidant and nitric oxide status in patients diagnosed with *Echinococcus granulosus*. Afr J Microbiol Res, 4:2439-2443.
- Koltas IS, Yucebilgic G, Biligin R, Parsak CK, Sakman G. (2006). Serum malondialdehyde level in patients with cystic echinococcosis. Saudi Med J, 27: 1703-1705.
- Mac Kinnon KL, Molnar Z, Lowe D, Watson ID, Shearer E. (1999). Measures of total free radical activity in critically ill patients. Clin Biochem, 32(4):263-8.
- Marnett L. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, 181(2): 219-222.
- Mert N, Güler AH. (1991). Kist hidatid sıvılarının biyokimyasal içeriği III. Elektrolitler, Ulu Vet Fak Derg, 10: 29-32.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. J Dairy Sci, 76: 2812-2823.
- Saleh MA, Al-Salahy MB, Sanousi SA. (2009). Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. Vet Parasitol, 162: 192-199.
- Saleh MA. (2008). Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol, 154: 262-269.
- Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzales P, Gonzales-Gallego J. (1999). Oxidative stress and changes in liver antioxidant enzymes induced by experimental dicrocoeliosis in hamsters. Parasitol Res, 85: 468-474.
- Şimşek S, Yuce A, Utuk AE. (2006). Determination of serum malondialdehyde levels in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. F U Sağlık Bil Dergisi, 20, 217-220.
- Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC, Wakelin D. (1984). Mucosal mast cells are functionally

active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature*, 312: 450-452.

Zeghir-Bouteldja R, Amri M, Aitaissa S, Bouaziz S, Mezioug D, Touil-Boukoffa C. (2009). In vitro study of nitric oxide metabolites effects on human hydatid of *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol Res*, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/624919>.