

Beyaz Kas Hastalıklı Kuzularda Hemoglobin Tipleri İle Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeylerinin Araştırılması

Ayşegül BİLDİK¹ Fatmagül YUR¹ Hayati ÇAMAŞ² Semiha DEDE¹ Servet SEKİN³

1. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE
2. Kafkas Üniversitesi, Fen Ed. Ebiyat Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE
3. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

Geliş tarihi: 03 Mart 1997

Investigation of Glutathione and Lipid Peroxidation Levels with Respect to Haemoglobin Types in Lambs with White Muscle Disease

Summary: In this study, haemoglobin types were researched in lambs with White Muscle Disease. Effect of disease to plasma lipid peroxidation and glutathione levels was investigated. The GSH levels by Beutler Methods and Lipid peroxidation were analysed by using colorimetric technique. Haemoglobin types were also determined by electrophoresis technique. In lambs with White Muscle Disease, MDA (Malondialdehid) levels were 2.245 ± 0.1 nmol/dl, GSH levels were 20.08 ± 3.6 mg/dl; in healthy lambs, these values were 2.25 ± 0.18 nmol/dl, 42.95 ± 4.4 mg/dl respectively. There was statistically significant difference between GSH ($p < 0.05$) levels two groups. Hb A gene was found high in all of lambs.

Key words: White Muscle Disease, Glutathione, Lipid peroxidation, Haemoglobine type

Özet: Bu çalışmada, Beyaz kas hastalıklı kuzularda hemoglobin tipleri araştırıldı. Hastalığın plazma lipid peroksidasyon düzeyi ve tüm kan glutasyon konsantrasyonu üzerine etkisi incelendi. Tüm kan glutasyon miktarı Beutler metodu ile, lipid peroksidasyonu ise MDA (Malondialdehid) miktarı tayin edilerek kolorimetrik olarak, hemoglobin tipleri de Helena marka elektroforezde tayin edildi. Beyaz kas hastalıklı kuzularda MDA miktarları 2.245 ± 0.1 nmol/dl, Glutasyon 20.08 ± 3.6 mg/dl; sağlıklı kuzularda ise bu değerler sırasıyla 2.25 ± 0.18 nmol/dl, 42.95 ± 4.4 mg/dl olarak bulundu. MDA miktarları arasında istatistiki açıdan bir önem yok iken ($p > 0.05$), glutasyon konsantrasyonları arasında $p < 0.05$ düzeyinde önem tesbit edildi. Hb A geni bütün kuzularda yüksek düzeyde bulundu.

Anahtar Kelimeler: Beyaz Kas Hastalığı, Lipid Peroksidasyonu, Glutasyon, Hemoglobin Tipleri

Giriş

Beyaz Kas Hastalığı, iskelet kasları, kalp kası ve diaframada hyalin dejenerasyonu meydana getiren bir noksanlık hastalığıdır. Bütün evcil hayvanlarda rastlanır. Özellikle Orta Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yaygın şekilde görülmektedir (1,2,3).

Beyaz Kas Hastalığının etiyolojisinde en önemli etken vitamin E ve selenyum noksanlığı olup, hastalık bunların antioksidatif etkilerindeki yetersizliğe bağlı olarak şekillenmektedir. Etiyolojide vitamin E ve selenyum noksanlığı dışında kükürt içeren amino asitlerin, doymamış yağ asitlerinin, diğer antioksidanların ve bazı iz elementlerin rolünden de bahsedilmektedir (1,4).

Vitamin E'nin biyolojik önemi, lipofilik bir antioksidan olmasından ileri gelmektedir. Vitamin E'nin en etkili formu olan α -tokoferol, fenolik hidroksil grubundaki hidrojen atomunu lipid türevli peroksit radikaline vererek lipid peroksidasyonunu önler ve membran lipidlerinin doymamış yağ asitlerini korur. Aksi halde doymamış yağ asitlerinin yıkımından kaynaklanan lipoperoksitler membran yapısını bozarlar ve membranlarda fonksiyon bozukluğu oluştururlar (5,6,7).

Selenyum, hidrojen peroksitin redüksiyonunda görevli olan Glutasyon peroksidaz'ın yapısında yer almaktadır. Selenyum bağlı Glutasyon peroksidaz'ın daha önce oluşmuş peroksit ve hidroperoksitleri azaltacak bir yeteneğe sahip olduğu, vitamin E'nin ise mitokondria, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarının fosfolipidlerinde lipid peroksidasyonunu önleyerek veya durdurarak peroksit radikallerinin oluşumunu önlediği bildirilmektedir (2).

Biyolojik numunelerdeki serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak en yaygın ve kolay uygulanan bir metod Tiobarbitürik asit (TBA) metodudur. Bu metod lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan Malondialdehid (MDA) ile TBA'nın reaksiyonu temeline dayanır. MDA ölçümü lipid peroksidasyonu ve dolayısı ile oksidan stresin göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (8).

Glutasyon, ihtiva ettiği sisteinden dolayı, yüksek reaktif organik maddeler grubu olan tiyollere dahildir. Nitekim sisteinin SH grubu, molekülün alışveriş yapan kısmı olup, elektron aktarma rolüne sahiptir. Glutasyon, protein ve DNA sentezi, hidroperoksitlerin transportu, proteinlerin sülfidril gruplarının devamının temini, hücrelerin ve eritrositlerin radyasyon ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunması, enzim aktivitesinin

modülasyonu, ksenobiotiklerin detoksifikasyonu gibi pek çok önemli biyolojik olayda rol alır (9,10,11,12).

Hemoglobinler karmaşık yapıda olan protein molekülleridir ve her molekül 4 polipeptid zincirinden oluşur. Her zincirde de bir hem grubu vardır. Alfa ve alfa olmayan bu zincirler, farklı amino asit dizilerine sahiptir ve allelik olmayan ayrı genlerle denetlenirler (13,14).

Elektroforetik incelemeler sonucunda koyunlarda en sık A ve B hemoglobin tipleri elde edilmiştir. Bunlardan başka koyunlarda C ve D tipleri de bulunmuştur. Hb C anemik hemoglobin olarak bilinmektedir (13,14,15,16).

Hb A tipli koyunlarda, Hb miktarı ile hematokrit değerler yüksek bulunmuş, ayrıca Hb A tipli koyunların hipoksiye daha dirençli oldukları saptanmıştır (15). Deniz seviyesine yakın bölgelerdeki koyunlarda HbA geninin frekansı düşük, dağlık ve yüksek bölgelerde en yüksek bulunmuş, HbA geninin çevreye uyabilmede önemli olabileceği vurgulanmıştır (16).

Bu çalışmada, Beyaz Kas Hastalığı ile hemoglobin tipleri, lipid peroksidasyonu ve glutatyon düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu araştırmanın materyalini 1996 yılı Şubat ve Mart aylarında doğan, yaşları 15 gün-1 ay arasında değişen, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç hastalıkları kliniklerinde Beyaz Kas Hastalığı teşhisi konulan 10 adet Akkaraman

kuzu ile, yine aynı dönemde doğan ve aynı yaşlarda 10 adet klinik olarak sağlıklı Akkaraman kuzu oluşturdu.

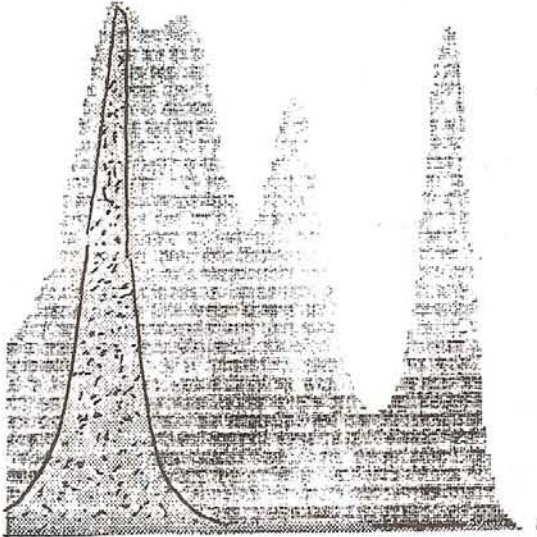
Kuzuların V.jugularislerinden usulüne uygun olarak EDTA'lı tüplere kanlar alındı. Glutatyon analizleri, tüm kanda Beutler metodu (17) ile, MDA tayini ise plazmada Tiobarbutirik asit metodu ile (5), Perkin Elmer Lambda 1A spektrofotometresinde kolorimetrik olarak yapıldı.

MDA tayini için 0.2 ml plazma üzerine 0.8ml fosfat tamponu, 0.025ml BHT ve 0.5ml %30'luk TCA eklendi. Tüpler vortekste karıştırıldı ve iki saat buzdaki bekletildi. Daha sonra 2000 devir/dk'de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak kısımdan 1 ml alınarak üzerine 0.075ml 0.1M EDTA ve 0.25ml %1'lik TBA eklendi, karıştırılarak kaynar su hamamında 15 dakika bekletildi. Oda ısısında soğutulduktan sonra 532 nm'de absorbanslar okundu. Standart olarak 1,1,3,3 tetra-ethoxypropane çözeltisi kullanıldı.

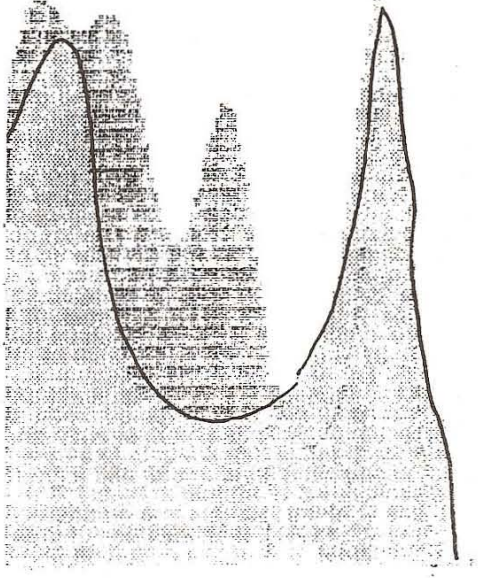
Hemoglobin tipleri ise Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fak. Araştırma Hastanesi, Biyokimya laboratuvarında Helena marka elektroforez cihazında selüloz asetat plaklarında (Titan III-H) tesbit edildi.

Bulgular

Beyaz kas hastalıklı ve sağlıklı kuzulara ait bulgular ile bunların istatistikî değerlendirilmesi ve Hemoglobin tiplerinin dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Hb C tipi yalnızca 1 tane beyaz kas hastalıklı kuzuda görüldü.



Şekil 1:Hb A tipinin elektroforetik piki



Şekil 2: Hb C tipinin elektroforetik piki

Tablo 1: Beyaz kas hastalıklı ve sağlıklı kuzulara ait verilerin istatistiki değerlendirilmesi

	Beyaz Kas Hastalıklı Kuzular	n	Sağlıklı Kuzular	n	p
Glutatyon(mg/dl)	20.08 ± 3.6	10	42.95 ± 4.4	10	p<0.05
MDA (nmol/dl)	2.245 ± 0.1	10	2.25 ± 0.18	10	p>0.05
Hb Tipleri	Hb A	9	Hb A	10	p>0.05
	Hb C	1	-	-	

Tartışma ve Sonuç

Beyaz Kas Hastalıklı kuzularda genel olarak başlangıçta hareket zorluğu gözlenmektedir. Daha sonra kaslardaki dejenerasyona bağlı olarak felç şekillenir. Semptomlar hyalin dejenerasyonunun kaslardaki şiddetine, yaygınlığına ve lokalize olduğu kaslara göre farklı olmaktadır (1,3,18).

Serbest radikallerin kas hastalıklarının da patogeneziinde rol oynadıklarına inanılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları birbirleriyle çok uyumlu olmamakla beraber, özellikle Duchenne tipi müsküler distrofi hastaların gerek kanlarında gerekse kaslarında, serbest radikal konsantrasyonları oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak antioksidan tedavisinde bir fayda sağlanamamıştır (5,19).

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çok sayıda doymamış bağ içeren yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit ve radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirir (4,5,7,19).

Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (5).

Vitamin E ve selenyum eksikliği sonucu görülen beyaz kas hastalığında, bu antioksidan miktarlarındaki yetersizliğe bağlı olarak lipid peroksidasyonunun artması ve dolayısı ile kan plazmasındaki MDA konsantrasyonlarının yükselmesi beklenmektedir.

Buna karşılık yaptığımız araştırmada Beyaz Kas Hastalıklı kuzular ile sağlıklı kuzuların plazmasındaki MDA konsantrasyonları arasında bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Stabil olmayan, şiddetli reaktifler olan serbest radikallerin, ksenobiotik ve oksidatif metabolizma, enzimatik ve nonenzimatik biyolojik reaksiyonlar sonucunda oluştuğu ve antioksidan enzimler tarafından substrat olarak kullanıldıkları bilinmektedir (7,20,21).Glutatyonu oksitlenmiş glutatyon (GSSG) dönüştüren glutatyon peroksidaz enziminin H₂O₂'nin indirgenmesinde ve lipid peroksidasyonunun sona ermesinde diğer enzimlerle

birlikte görev yapmakta olduğu yapılan araştırmalarda tesbit edilmiştir (2,11,12,20,21,22). Peroksidlerin veya oksitlenmiş sülfidril gruplarının indirgenmesi sırasında glutatyonun, GSSG ve karışık disülfidlere dönüştüğü, oksijen toksisitesine karşı korunma sırasında sellüler glutatyon konsantrasyonunun azaldığı, oksijen ihtiyacının artması ile oluşan oksidatif stres sonucu glutatyonun karaciğer ve diğer organlardaki konsantrasyonlarının azaldığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (12,13,23).

Novak ve ark. (24) alyuvarlarda H₂O₂'e cevap olarak, lipid peroksidasyonunun arttığını, glutatyon ve süperoksit dismutazın azalarak, hücrelerin membran lipidlerinin deforme olmasını önlediğini göstermişlerdir.

Kanatlı hayvanların Ascites hastalığında yaygın oksidatif stres meydana geldiği ve karaciğer ile akciğer glutatyon konsantrasyonunun azaldığı, plazmada lipid peroksidasyonu artarken, eritrosit glutatyon seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (22,23,25).

Tablo 1 incelendiğinde beyaz kas hastalıklı kuzuların tüm kanındaki glutatyon miktarları 20.08 ± 3.6 mg/dl iken sağlıklı kuzularda 42.95 ± 4.4 mg/dl olarak görülmektedir. Beyaz kas hastalıklı kuzuların tüm kanındaki glutatyon miktarları sağlıklı kuzulara göre önemli derecede (p<0.05) düşük bulunmuştur. Bu düşüşün vitamin E ve selenyum eksikliği sonucu oluşan süperoksit ve hidroksil radikalleri, lipid peroksidatif radikalleri ile glutatyonun reaksiyona girmesi neticesinde şekillendiği düşünülmektedir.

Araştırmada sağlıklı ve beyaz kas hastalıklı kuzuların hemoglobin tipleri Hb A geni taşımaktadır. Beyaz kas hastalıklı kuzuların yalnızca bir tanesinde Hb C geni tesbit edilmiştir. Hb C geninin koyunlarda anemik hemoglobin tipi olduğu bilinmektedir (13,14). Hb C geni tesbit edilen kuzuyu gen tesbitinden sonra takip etmek mümkün olmadığından, bu kuzunun anemik olup olmadığı anlaşılamamıştır. Dağlık ve yüksek bölgelerde Hb A geninin yüksek frekansa sahip olduğu bilinmektedir (14,15). Van yöresinin yüksek rakımı göz önüne alınırsa gerek sağlıklı gerekse hasta kuzularda Hb A geninin fazla bulunması literatürlere uyum göstermektedir.

Sonuç olarak beyaz kas hastalığında lipid peroksidasyonunun artmadığı ve Hb tipleri ile bir ilgisi olmadığı, buna karşılık tüm kan glutatyon miktarında önemli bir düşüş olduğu tesbit edilmiştir. Yapılan bu çalışmanın kas dejenerasyonu ile ilgili yapılacak daha geniş çaptaki araştırmalara ışık tutacağı ve çok sayıda hayvan materyali ile çalışıldığı takdirde daha kesin sonuçlar alınabileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Aytuğ C.N., Alaçam E., Özkaç Ü., Özkaç Ü., Yalçın C., Türker H., Gökçen H. (1990): Koyun Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği . tüm Vet Hayvancılık Hizmetleri Yayını, No:2, İstanbul.

2. Fidancı U.R.(1996): Beyaz Kas Hastalığı. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi, 8(2)43-45.

3. mren H.Y., Şahal M. (1990): Veteriner İç Hastalıkları, Ankara.

4. Horwitt M.K. (1965): Role of Vitamin E, Selenium and Polyunsaturated fatty Acids in Clinical and Experimental Muscle Disease. Fed.Proc.,24 68-72.

5. Akkuş, I. (1995): Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Konya.

6. Chow K. (1979): Nutritional Influence on Cellular Antioxidant Defense Systems. Am.J.Clin.Nutr. 32,1066-1081.

7. Frei B.(1994): reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanism of Action. Am.J.Med. 97, 5-12.

8. Alessio H.M. (1993): Exercise Induced Oxidative Stress. Med.Sci. Sports Exerc. 25:218-224.

9. Bakke E. (1990):Biochemical and Physiological Dispositions of GSH Conjugates. Drug.Met.rev.,22 (6-8),637-647.

10. Kretzschmer M. and Klinger W.(1990): The Hepatic Glutathione System: Influences of Xenobiotics. Exp.Pathol. 38,145-164.

11. Meister A. and Anderson M.E.(1983):Glutathione ann.Rev.Biochem., 52,711-760.

12. Meister A.(1984):New Aspects of Glutathione Biochemistry and Transport: Selective Alteration of Glutathione Metabolism. Nutr.Rev. 42(12), 357-410

13. Bluunt M.H., Evans j.V. (1963): Changes in The Concentration of Potassium in The Erythrocytes and in Haemoglobin ype in Merino sheep Under Severe Anaemic stress. Nature, lond. 200, 1215-1221.

14. Braend M., Efremov G., Helle O. (1964): Abnormal Haemoglobin in Sheep. Nature, lond. 204-700.

15. Dawson T.J., Evans J.V.(1965): Effect of Haemoglobin Type on The Cardiorespiratory System of Sheep. Am.J.Physi., 209, 593-597.

16. Evans J.V., Harris H., warren F.L. (1958): Distrubition of Haemoglobin and Blood potassium types in British Breeds of Sheep. Proc.R.Soc.Ser.B., 149, 249-262.

17. Beutler E., Duran O., Kelly B.M.(1963): Improved Method for The Determination of Blood Glutathione. J.Lab. & Clin.Med. 61(5) 882-888.

18. Özcan C. ve Aytuğ C.N.(1972): Gebe Koyunlarda ve Kuzularda Sodyum selenit ve Vitamin e Tatbikatlarının Beyaz Kas Hastalığı Üzerine Profilaktik Etkisi ile İlgili Saha Denemeleri. A.Ü. Vet.Fak.Derg. 19, 63-75.

19. Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993): Free Radicals in Medicine. British Medical Bulletin, 49(3) 630-641.

20. Dormandy T.L. (1980): Free Radical Reaction in Biological System. An.Roy.Col.Surg. Eng., 62,88-193.

21. Dormandy T.L. (1983):an Approach to Free Radicals.The Lancet, October 29, 1010-1014.

22. Spurlock M.E. and Savage J.E. (1992): Antioxidant Activity of Japanase Quail Liver Cytosol in The Absence and Presence of Reduced Glutathione. Poul., sci. 71,928-931.

23. Wilson J.X., Lui E.M.K. and Del Maestro M.F. (1992): Devalopmental Profiles of Antioxidant Enzymes and Trace Metals in Chick Emryo. Mech.Age. Develop. 65, 51-64.

24. Novak Z., Varga S.I., Pataki L. and Matkovic B. (1990): Simple Method for The Measurement of Antioxidants. Clin.Chim.Acta, 194,115-120.

25. Best E.E. (1966):Blood Glutathione of The Domestic fowl. Ph.D. Dissertation. University of Sydney, Australia .