



## Relationships Between Hepsidin Levels in Some Hematological and Biochemical Parameters in Sheep With Natural Babesiosis

Özlem ORUNÇ KILINÇ<sup>1</sup> Yıldırım BAŞBUĞAN<sup>2</sup> Nazmi YÜKSEK<sup>2</sup> Türker ATCALI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Van Yuzuncu Yil University, Ozalp Vocational School, Van-Turkey

<sup>2</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Van, Turkey

<sup>3</sup> Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Burdur, Turkey

Received: 08.02.018

Accepted: 12.04.2018

### SUMMARY

This study was conducted to determine the relationship between hematocrit levels and some hematological and biochemical parameters after hemolysis of erythrocytes in natural babesiosis sheep. A total of 40 sheep were included in the study, 20 healthy (control group) and 20 natural babesiosis. Blood samples were taken from the vena jugular of 20 sheep with clinical findings in Biochemistry tube and blood tube with EDTA. DNA extraction was performed in accordance with the procedure with GeneJetViral DNA (Thermo Scientific, Catalog number: K0821) kit. PCR was performed using a pair of primers specific for the 18S ribosomal RNA gene region for the detection of Babesia agents. The amplified gene regions were stained with ethidium bromide on a 1% agarose gel and detected under UV light on a gel imager. According to the PCR result, 425 bp positivity was determined. Whole hemograms were performed from the blood taken from EDTA tubes. Serum was taken from the blood taken from the biochemistry tube and frozen at -20 until analysis day. Serum levels of heparin, serum iron and iron binding parameters were measured. In this study, it was observed that the values of RBC, HTC ( $p < 0,001$ ), HGB ( $p < 0,05$ ) values decreased in sheep with babesiosis compared to the control group. There was a decrease in neutrophil counts ( $p < 0,05$ ) compared to the control group, and an increase in lymphocyte, monocyte and basophil percentage ( $p < 0,05$ ). There was also a significant decrease in PLT numbers ( $p < 0,05$ ). Serum Fe levels were increased ( $p > 0,05$ ), although statistical significance was not significant compared to the control group. In this study, hepsidine levels in babesia group were statistically higher than control ( $p < 0,05$ ). As a result, in sheep with babesiosis, it was concluded that the decrease in erythrocyte parameters, the development of stress leukogram, the increase in iron parameters and hepsidine levels, and it was concluded that these results may be diagnostic.

**Key Words:** Babesia, Hepsidine, Iron, Sheep

### ÖZET

## Doğal Babesiosis'li Koyunlarda Hepsidin Düzeyleri ile Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Arasındaki İlişkiler

Bu çalışma doğal babesiosisli koyunlarda eritrositlerin hemolizi sonrası hepsidin düzeyleri ile hematolojik ve biyokimyasal bazı parametreler arasında nasıl bir ilişkinin olduğunu belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmaya 20 sağlıklı (Kontrol grubu), 20 doğal babesiosisli olmak üzere toplam 40 koyun dahil edildi. Klinik bulgulara sahip 20 koyunun vena jugularisinden biyokimya ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. DNA ekstraksiyonu GeneJETViral DNA (ThermoScientific, catalognumber: K0821) kiti ile prosedüre uygun olarak yapıldı. Babesia etkenlerinin tespiti için 18S ribozomal RNA gen bölgesine spesifik olan bir çift primer kullanılarak PCR yapıldı. Ampilifiye edilen gen bölgeleri %1'lik agaroz jelde ethidiumbromid ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışık altında belirlendi. Yapılan PCR sonucuna göre ise 425 bp pozitiflik belirlendi. EDTA'lı tüplere alınan kanlardan tam hemogram bakıldı. Biyokimya tüpüne alınan kanlardan serum elde edilerek analiz gününe kadar -20 de donduruldu. Analiz günü çözdürülen serumlardan hepsidin, serum demir seviyesi ve demir bağlama parametreleri ölçüldü. Bu çalışmada babesiosisli koyunlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında RBC, HTC ( $p < 0,001$ ), HGB ( $p < 0,05$ ) değerlerinin istatistiki azaldığı görüldü. Nötrofil değerlerinde kontrol grubuna göre azalma ( $p < 0,05$ ) meydana gelirken, lenfosit, monosit ve bazofil yüzdesinde ise artış ( $p < 0,05$ ) görüldü. Ayrıca PLT sayılarında önemli oranda ( $p < 0,05$ ) azalma belirlendi. Serum Fe seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiki önem olmamasına rağmen artış ( $p > 0,05$ ) görüldü. Bu çalışmada hepsidin seviyeleri babesia grubunda kontrole göre istatistiki olarak yüksek ( $p < 0,05$ ) olduğu belirlendi. Babesiosisli koyunlarda eritrosit parametrelerinde azalma, stres lökogramının geliştiği, demir parametrelerinde ve hepsidin seviyelerinde artmaların olduğu ve diagnostik öneminin olabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Babesia, Hepsidin, Demir, Koyun

### GİRİŞ

Babesia türleri ixodid keneler ile transtadial ve transovarial olarak nakledilen eritrositleri enfekte eden

protozoonlardır. Tüm dünyada en sık görülen türler *B. ovis* ve *B. motasi*'dir. (Çiçek ve ark., 2004, Kılınç ve ark., 2015, Sevinç ve ark., 2015). Babesia türleri tropical ve subtropical bölgelerde koyun ve keçilerde ölümlere sebep

olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açar. Babesiosis ülkemizde de tüm bölgelerde özellikle koyunlarda mevsimsel bir hastalık olarak görülür. Babesiosisin klasik belirtisi yüksek ateşle seyreden anemi ve hemoglobüridir. Tedavi edilmeyen hayvanlarda şok tablosu gelişir ve renal yetmezlik sonucu ölümler görülür. (Yur ve ark., 2010, Esmailnejad ve ark., 2012).

Babesiosis de aneminin gelişmesine çeşitli faktörler sebep olur. Bunlardan ilki etkenlerin eritrositleri istila ederek hemolizine yol açması ve bunun sonucunda anemi oluşmasıdır. Ayrıca hastalık sırasında artmış lipit peroksidasyonu ve oksidatif stres faktörleri nedeni ile hemolitik aneminin oluşabileceği öne sürülmektedir. Etkenlerin eritrositleri enfekte etmesi hematopoiesise zarar vererek kandaki eritrosit sayısını ve hemoglobin miktarında düşürdüğü bildirilmektedir. Azalmış eritrosit sayısı vücutta oksijen transportunu azaltarak hipoksiye ve hemodinamik ve nonhemodinamik olaylara sebep olur (Esmailnejad ve ark., 2012, Kılınc ve ark., 2015)

Hepsidin, demir metabolizmasında anahtar rol oynadığı tespit edilen, hepatositlerde üretilen, 25 aminoasitten oluşan, antibakteriyel bir peptiddir (Çelik 2005). Yüksek oranda disülfid bağıyla korunmuş bir hormondur (Badial ve ark., 2011).

Başol ve ark. (2007) göre hepsidin; barsaklardan demir emiliminin, makrofajlardaki demir döngüsünün ve hepatik depolardan demir salınımının hemostatik düzenleyicisi olarak tanımlanır. Hepsidin, transmembran yerleşimli bir protein olan ferroportin ile etkileşime geçerek hücrel demir salınımını düzenlemektedir. Demir depoları yeterli ve yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Böylece ince barsakta demirin enterositlerden plazmaya taşıyan yol bloke edilir. Hipoksi ve demir depolarının düşük olduğu anemide ise, hepsidin üretimi azalır (Rossi, 2005).

Yapılan çalışmalarda Babesiosisli hayvanlarda tam kanda eritrosit, hemoglobin, hematokrit değerlerinin azalmış olduğu anemi tablosunun şiddetli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca serum demir, bakır ve çinko düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla azalmış olduğu tespit edilmiştir (Chaudhuri ve ark., 2008, Furlanello ve ark., 2005)

Bu çalışma; doğal babesiosisli koyunlarda eritrositlerin hemolizi sonrası hepsidinin nasıl bir davranış sergileyeceği, hepsidin düzeyleri ile hematolojik ve biyokimyasal bazı parametreler arasında nasıl bir ilişkinin olduğunu belirlemek için yapıldı. Yapılan literatür taramalarında Babesiosisli koyunlarda hepsidin düzeyleri üzerine herhangi bir bilimsel veriye rastlanmaması bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvan Materyali:

Bu çalışmanın materyalini klinik ve laboratuvar bulgularıyla teşhis edilmiş doğal olarak infekte 20 adet babesiosisli koyun ile 20 adet sağlıklı koyun olmak üzere toplam 40 koyun oluşturdu. Hastalık şikayeti ile gelen hayvan sahiplerinin işletmelerine gidilerek tanı amacıyla her bir hayvanın Vena jugularisinden usulüne uygun olarak hematoloji ve 1 biyokimya tüpüne kan alındı. Yapılan froti sonucuna göre etken belirlenen hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Hastalık tespit edilen hayvanlara derhal tedavi prosedürü uygulandı. Pozitif olan hayvanların serumları ependorf tüplerine alınarak ve depfreezde (-20 °C) çalışma yapıncaya kadar muhafaza edildi.

## Laboratuvar muayeneleri

### Hematolojik Parametreler

Hematolojik muayeneler için alınan kan örneklerinde Red Blood Cell (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HTC), White Blood Cell (WBC), Lenfosit (Len), Monosit (Mon), Nötrofil (Nöt), Eozonofil (Eoz), Bazofil (Baz), Platelet (PLT), veteriner kan sayım cihazı (Abacus - Junior Vet5®) ile belirlendi.

### Biyokimyasal parametreler

Serum hepsidin seviyeleri hepsidin (Bovine Hepsidin 25® Cusabio®) kiti ile ELISA cihazında (ELISA reader® -DAS) ölçüldü. Demir (Fe), Demir bağlamama kapasitesi (DBK) ve Total demir bağlama kapasitesi (TDBK) seviyeleri biyokimya cihazı (Abbot C16200®) ile belirlendi.

### DNA ekstraksiyonu ve PCR

Kan örneklerinin DNA ekstraksiyonu GeneJET Viral DNA and RNA purification kiti (ThermoScientific, catalognumber: K0821) ile kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Elde edilen DNA'lardan nükleik asit amplifikasyonu için 18S rRNA gen bölgesine spesifik olan BJ1 5'-GTCTTGTAAATTGGAATGATGG-3' ve BN2 5'-TAGTTTATGGTTAGGACTACG-3' primerleri ile PCR analizi yapıldı (Schorn ve ark., 2011). Total 50 µl PCR reaksiyon mixi oluşturuldu ve bunun içindeki DNA miktarı 5 µl, 75 mM Tris-HCl (pH8.8), 20 mM NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, primerler 10 pmol, 0.2 mM of dNTP ve Taq DNA polymerase ise 0.5 U (MBI, Fermentas, Lithuania) olacak şekilde hazırlandı. Isı döngü cihazında 94 °C'de 5 dakika denatürasyon aşamasını takiben 94°C' de 30 saniye 55 °C'de 30 saniye ve 72°C'de 40 saniye ısı döngüleri uygulandı ve bu ısı programı 40 siklus tekrarlandı. 72°C'de 10 dakika süren final extensiyonundan sonra 425 baz çifti büyüklüğünde DNA ürünü elde edildi. Değerlendirme amacıyla 100 bp'lik standart kullanıldı ve amplifiye olan DNA ürünleri %1'lik agaroz jelde ethidiumbromid ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışık altında belirlendi.

### İstatistik Analizi

Çalışmada kontrol grubu ile babesiosisli gruptan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma değerler olarak ifade edildi. Gruplar arasında Student's t testi kullanıldı. Ayrıca babesiosisli grupta parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak değerlendirildi. Hesaplamalar için SPSS (20) istatistik paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

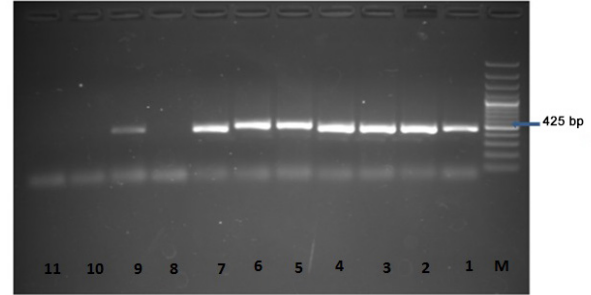
Çalışmaya dahil edilen koyunlarda klinik olarak yüksek ateş (40 °C), hemoglobüri, anemi ile birlikte kalp ve solunum frekansında artış tespit edildi. Hasta hayvanlardan alınan örneklerden yapılan PCR sonucuna göre ise 425 bp pozitiflik belirlendi (Şekil. 1).

Kontrol grubuna göre babesiosisli grupta RBC ve HTC istatistik olarak önemli oranda (P<0,001), HGB, Neutrofil, PLT ve Fe-DBK (P<0,05) azalırken, Hepsidin Lenfosit, Monosit, Bazofil değerlerinde de artış (P<0,05) belirlendi (Tablo1-2).

**Tablo 1.** Kontrol grubu ile babesiozisli grubun hematolojik ve biyokimyasal parametreleri**Table 1.** The haematological and biochemical parameters of the control group and the babesia group.

Parametreler	Kontrol (n=20)	Babesiozis (n=20)
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	4.94±0.24	3.06±0.15**
HGB (g/dl)	10.29±0.19	8.79±0.44*
HCT (%)	28.57±0.67	19.23±1.29**
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	7.50±0.76	11.05±1.53
Neutrofil (%)	35.77±3.05	11.35±2.50*
Lenfosit (%)	60.90±2.14	75.08±3.40*
Monosit (%)	1.65±0.34	3.98±0.88*
Eozinofil (%)	1.50±1.31	2.27±1.64
Bazofil (%)	0.18±0.13	7.52±5.00*
PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	415.20±14.16	242.08±90.16*
Fe (μg/dL)	125.00±13.48	174.95±24.46
TDBK (μg/dL)	312.72±19.47	320.83±24.59
DBK (μg/dL)	195.83±22.83	171.11±14.50*
Hepsidin (ng/ml)	32.22±8.94	74.16±16.07*

\*P<0.05, \*\*P<0.001 aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemi gösterir; TDBK (Total Demir Bağlama Kapasitesi), DBK (Demir Bağlamama Kapasitesi)

**Şekil 1.** PCR testi sonucunun agaroz jel görüntüsü**Figure 1.** Agarose gel image of result of PCR test

[M: DNA marker, 1,2,3,4,5,6,7,9: pozitif örnekler, 8,10,11: negatif örnekler]

**Tablo 2.** Hepsidin seviyeleri ile bazı parametreler arasındaki ilişkileri**Table 2.** Relations between hepcidin levels and some parameters

	Hepsidin (ng/ml)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dl)	HCT (%)	Fe (μg/dL)	Fe-TIBC (μg/dL)	Fe-UIBC (μg/dL)
Hepsidin (ng/ml)	1						
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	0.138	1					
HGB (g/dl)	0.096	0.751**	1				
HCT (%)	0.472	0.716*	1.000**	1			
Fe (μg/dL)	-0.347	-0.350	-0.447*	-0.369	1		
Fe-TIBC (μg/dL)	-0.319	-0.272	0.121	-0.130	0.667**	1	
Fe-UIBC (μg/dL)	-0.311	-0.015	0.258	-0.272	0.005	0.748**	1

\*P<0.05 \*\*P<0.01

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Babesiosis Ixodidae familyasına bağlı kenelerle taşınan bir kan hastalığıdır. Koyunlarda mevsimsel görülen önemli bir hastalıktır. Hastalığın teşhisi mikroskopik bakı, serolojik veya moleküler metodlarla yapılır (Esmailnejad ve ark 2012).

Babesia türleri intravasküler hemoliz yaparak anemiye, hemoglobinemiye ve hemoglobinüriye yol açmaktadır. Eritrositlerin parçalanmasında dolayı eritrosit sayısı, hematokrit ve hemoglobin seviyeleri azalmaktadır. Bu

çalışmada babesiozisli koyunlarda RBC, HCT ( $p<0,001$ ), HGB ( $p<0,05$ ) değerlerinin istatistiksel olarak azaldığı görüldü. Hemoglobin seviyelerindeki azalmanın istatistiki olarak daha az olmasının nedeni intravasküler hemolizden dolayı hemoglobinemi olması ve hemoglobinin tamamen dolaşımdan uzaklaştırılmamasından dolayı olabileceği kanısına varıldı. (Tablo 1) Bu çalışmada babesiozisli koyunlar için RBC, HCT, HGB değerleri birçok araştırmacının çalışma sonuçları ile (Çiçek ve ark 2004, Kılınç ve ark 2015) paralellik arz etmektedir.

Lökosit değerlerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu bu artışın stres lökogramı veya sekonder

enfeksiyona bağlı olabileceği kanısına varıldı. Formül lökosit değerlendirildiğinde nötrofil değerlerinde kontrol grubuna göre azalma ( $p<0,05$ ) meydana gelirken, lenfosit, monosit ve bazofil yüzdesinde ise artış ( $p<0,05$ ) görüldü. Ayrıca PLT sayılarında önemli oranda ( $p<0,05$ ) azalma belirlendi.

Demir organizmada özellikle hemoglobin ve myoglobin gibi hem bileşikleri ile ve hem olmayan transferrin, ferritin ve hemosiderin yapısında proteinlerle kompleks halde bulunur. Vücuttaki demirin %55-60'ı eritrosit hücresinin içinde hemoglobinde bulunmaktadır (Turgut, 2000, Uyanık, 2000). Serum Fe seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistikî önem olmamasına rağmen artış ( $p>0,05$ ) görüldü. Bu artış muhtemelen intravasküler hemoliz ve buna bağlı açığa çıkan Fe'e bağlı olmaktadır

Hepsidin, yangısal uyarılara ve yüksek demir seviyesine bir cevap olarak karaciğerde üretilen, düşük molekül ağırlıklı antibakteriyel bir peptid hormondur ve demir depoları ve kemik iliğindeki eritropoietik aktivite tarafından kontrol edilerek salınmakta ve demirin homeostazisinde rol almaktadır (Singh ve ark., 2011, Badial ve ark, 2011). Hipoksi ve demir depolarının düşük olduğu anemide ise, hepsidin üretimi azalır Bu çalışmada hepsidin seviyesinin babesia grubunda kontrole göre istatistikî olarak yüksek ( $p<0,05$ ) olduğu belirlendi. Bu durumun intravasküler hemolize bağlı olarak oluşan anemi sonucu serum demir seviyelerinin yüksek olmasına bir cevap olabileceği kanısına varıldı.

Hepsidin mRNA'sı vücudun Fe seviyesine paralel hareket etmektedir. Fe seviyesi artığında artma, azaldığında azalma meydana gelmektedir. Fe depoları yeterli veya yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Demirin barsaklardan emilimi, hepatik depolardaki Fe salınımı ve makrofajlardaki Fe döngüsünün kontrolü hepsidin tarafından düzenlenir (Singh ve ark., 2011, Ganz ve Nemeth, 2012). Bu çalışmada serum hepsidin ile Fe seviyeleri arasında negatif korelasyon olmasına rağmen istatistikî olarak önem ( $p>0,05$ ) belirlenmedi (Tablo 2).

Sonuç olarak, babesiosizli koyunlarda eritrosit parametrelerinde azalma, stres lökogramının geliştiği, demir parametrelerinde ve hepsidin seviyelerinde artmaların olduğu ve diagnostik öneminin olabileceği kanısına varıldı.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-HIZ-VF176 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Badial PR, Oliveira FJP, Cunha PHJ et al. (2011).** Influence of experimental inflammatory response on hepatic hepsidin gene expression and plasma iron concentration in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141, 157-161.
- Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE (2007).** Demir Hemostazının Yeni Düzenleyicisi Hepsidin. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5, 117-125.
- Çelik B (2005).** Yenidoğan döneminde serum prohepsidin düzeylerinin tam kan sayımı, demir parametreleri ve sepsis ile ilişkisi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
- Chaudhuri S, Varshey J.P, Patra RC (2008).** Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Research in Veterinary Science*, 85, 120-124.
- Çicek H, Düzgün A, Emre Z, Karaer Z (2004).** Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. *Turk J Vet Anim Sci*, 28:683-686
- Esmailnejad B, Tavassoli M, Rezaei SA (2012).** Investigation of haematological and biochemical parameters in small ruminants naturally infected with *Babesia ovis*. *Veterinary Research Forum*, 3 (1): 31-36.
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M et al. (2005).** Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134,1-2: 77-85
- Ganz T, Nemeth E (2012).** Hepsidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1823: 1434-1443.
- Kılınç Oruç Ö, Göz Y, Yüksek N et al. (2015).** Determination of serum cardiac biomarkers and plasma D-dimer levels in anemic sheep with babesiosis. *Turk J Vet Anim Sci*, 39, 606-610.
- Rossi E (2005).** Hepsidin-the iron regulatory hormone. *Clin Biochem Rev*, 26,3, 47-49.
- Schorn S, Pfister K, Reulen H et al. (2011).** Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors*, 4, 135.
- Sevinç F, Caob S, Zhou M et al. (2015).** A new immunoreactive recombinant protein designated as rBoSA2 from *Babesia ovis*: Its molecular characterization, subcellular localization and antibody recognition by infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 214, 213-218.
- Singh B, Arora S, Agrawal P et al. (2011).** Hepsidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta*, 412(11-12): 823-830.
- Turgut K (2000).** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis, 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ. Konya.
- Uyanık F (2000).** Bazı iz elementlerin organizmadaki başlıca fonksiyonları ve bağışıklık üzerine etkileri. *Erciyes Üniv. J Health Sci*, 9 (2). 49-58.
- Yur F, Yazar M, Değer Y, Dede S (2010).** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity in sheep with natural Babesiosis. *Acta Vet Brno*, 79: 233-236.