

**BEYAZ KAS HASTALIKLI KUZULARDA KALP KASI HASARININ TEŞHİSİNDE
KARDİYAK TROPONİN KİT ANALİZLERİ VE SERUM ENZİM
AKTİVİTELERİNİN ÖNEMİ***

**The Importance of Cardiac Troponin Kit Analyses and Serum Enzyme Activities in
the Diagnosis of Heart Muscle Degeneration in Lambs with White Muscle Disease**

Bayram SUGEN¹, Vehbi GÜNEŞ²

Özet : Bu çalışmada; kuzuların beyaz kas hastalığı sonucunda oluşan myokard dejenerasyonlarının teşhisinde, beşeri kardiyak troponin I (cTn-I) ve kardiyak troponin T (cTn-T) ve serum enzim aktivitelerinin önemlerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 20 adet beyaz kas hastalıklı, 10 adet sağlıklı kuzu kullanıldı. Kardiyak Tn-I ve cTn-T testleri 5 beyaz kas hastalıklı kuzuda pozitif belirlenirken, sağlıklı kuzuların tamamında negatif sonuçlar elde edildi. Beyaz kas hastalıklı kuzularda nekropsi bulgularında kalp ve iskelet kaslarının yer yer tebeşir beyazı görünümünde olduğu belirlendi. Yine bu kuzularda ortalama kreatin kinaz MB mass (CK-MB), laktat dehidrogenaz (LDH) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzim serum aktiviteleri sırasıyla 216,2±33,8 U/L, 717,7±657,5 U/L ve 126,4±83,3 U/L olarak bulundu. Aynı parametreler sağlıklı kuzularda sırasıyla 171,2±60,6 U/L, 513,2±210,6 U/L ve 59,2±21,1 U/L idi. Ayrıca bu parametreler cTn pozitif vakalarda (n=5) 490,5±167,7 U/L, 3804,1±2700,3 U/L ve 734,5±226,2 U/L idi. Bu grupta enzim aktiviteleri istatistiki olarak daha yüksekti. Beyaz kas hastalıklı kuzularda makroskopik bulgular, serum enzim aktiviteleri ve cTn bulguları biribiri ile uyumluydu. Sonuçta küçük ruminantların myokardiyal hasarlarının teşhisinde cTn analiz sonuçlarının duyarlı ve özgün bir gösterge olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Beyaz kas hastalığı, kardiyak troponin-I, kardiyak troponin-T, kuzu

Summary: The aim of this study was to investigate the value of human cardiac troponin-I (cTn-I), cardiac troponin-T (cTn-T) kits and serum enzymes activities in the diagnosis of myocardial degeneration in lambs with White Muscle Disease (WMD). For this purpose, 20 lambs with acute WMD and 10 clinically healthy lambs were used. Cardiac Tn-I and cTn-T tests were determined as positive in the only 5 lambs with WMD, but these tests were negative in blood samples collected from healthy lambs. In necropsy findings, the cardiac and skeletal muscles were observed to be affected by chalky white lesions. Mean Creatine Kinase-MB mass (CK-MB), Lactate Dehydrogenase (LDH) and Aspartate Aminotransferase (AST) enzyme activities were found as 216,2±33,8 U/L, 717,7±657,5 U/L and 126,4±83,3 U/L respectively in lambs with WMD. Same parameters were mean 171,2±60,6 U/L, 513,2±210,6 U/L and 59,2±21,1 U/L in healthy lambs, respectively. Additionally these parameters were determined as 490,5±167,7 U/L, 3804,1±2700,3 U/L and 734,5±226,2 U/L in cTn positive cases (n=5) respectively. In this group mean enzyme activities were statistically higher than in the other groups. Macroscopic findings of heart muscle, serum enzymes activities and positive cTn results were correlated in cases with WMD. In conclusion, cTn assays may be a sensitive and specific marker for small ruminants with myocardial injury.

Key words: White muscle disease, cardiac troponin-I, cardiac troponin-T, lamb

¹ Bil.Uz.Erciyes Ün. Sağlık Bil. Ens, Vet.İç Hast. AD, Kayseri

² Doç.Dr.Erciyes Ün. Veteriner Fak. İç Hast., Kayseri

Geliş Tarihi : 03.11.2008 Kabul Tarihi : 15. 12. 2008

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBT.07.10 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kuzularda beyaz kas hastalığı; E vitamini ve selenyum eksikliği sonucu oluşan, iskelet ve kalp kaslarında dejeneratif değişikliklerle karakterize bir hastalıktır (1-2). Yeni doğmuş (konjenital form) veya 3-4 aylık olan kuzularda (edinsel form) görülebilmektedir. Kuzuların ana sütü veya yem maddeleri yoluyla vitamin E'nin ve selenyumun eksik alınmasına veya displazenter transportunun blokajına bağlı gelişir (1-3). Doğuştan hasta olan hayvanlar ayağa kalkıp annelerini ememezler, başlarını düzgün tutamazlar, solunum gücünü çekerler ve dolayısıyla kolostrom alamayıp akut kalp yetmezliğinden birkaç saat içinde ölürlür (1, 2, 4). Hastalığın edinsel formu ise doğum sonrası sıklıkla 2-12 hafta içinde şekillenir (5). Etkilenen kuzular 1-2 hafta içinde iyileşebileceği gibi, konjestif kalp yetmezliği veya asfeksiden ölebilirler (1, 3). Hastalık başlangıç dönemlerinde E vitamini-selenyum kombinasyonları ile tedavi edilebilir. Enjeksiyonlar en erken 3-4 hafta ara ile tekrar edilebilir (1, 2, 5).

Troponinler vücutta çizgili kaslar üzerinde yer alan globüler yapıdaki proteinlerdir. Üç temel üniteden oluşurlar. Bunlar; Troponin-I (Tn-I), Troponin-T (Tn-T) ve Troponin-C (Tn-C) olarak isimlendirilirler (6, 7). Bu üç protein, troponin kompleksini oluşturur. Troponin kompleksi aktin filamentini oluşturan başlıca yapılardan birisidir. Bu kompleks zayıf aktin filamentini boyunca düzenli aralıklarla yerleşmiştir. Troponin-T, tropomyozine troponin kompleksini bağlayan ve tropomyozin için güçlü bir affiniteye sahip olan proteindir. Troponin-I ise aktin filamentini için güçlü bir affiniteye sahiptir ve aktomyozin ATPaz aktivitesinin bir inhibitörü olarak rol oynayarak aktin ve myozin arasındaki ilişkiyi düzenler (8). Troponin-C'de troponin kompleksinin kalsiyumu bağlayan bir ünitesidir (9). Kalsiyum iyonları kalp kasının kontraksiyonlarını takiben troponin kompleksine bağlandığı takdirde aktin ve tropomyozin arasında uyumlu bir değişiklik meydana gelir. Her üç troponin proteini de myofibrillerin gerilme ve gevşeme süreci içerisinde tamamlayıcı olarak yer alırlar (10). Kalp kası hücre hasarını belirlemek amacıyla hem cTn-T hem de cTn-I analiz sonuçlarının faydalı birer biyokimyasal gösterge olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir. Akut miyokardiyal sendrom ve nekrozis sonucunda cTn-T ve cTn-I dolaşıma salınmaktadır (6, 9, 11). Miyokardiyal hasarın teşhisi ve/

veya seyri açısından ayrı ayrı cTn analizlerinin veya her ikisinin (cTn-I ve cTn-T) birlikte belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu göstergelerin insan, köpek ve sığırlarda kardiyak hücre ölümlerinin veya nekrozun belirleyicileri olduğu belirlenmiştir (6-8, 11). Ancak bu parametrelerin kardiyak hasarlı hayvanların teşhisi için kullanılabilirliği yeterince araştırılmamıştır. Beşeri ve veteriner hekimlikte serum kreatin kinaz MB mass (CK-MB), laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat amino transferaz (AST) analizleri kalp kası hasarlarının teşhisinde kullanılmaktadır. Fakat CK-MB ve LDH'nin kısa yarılanma zamanı ile AST'nin sadece kalbe özgü olmaması gibi dezavantajları nedeniyle cTn'ler son yıllarda özellikle küçük hayvan hekimliğinde önemli birer teşhis aracı haline gelmiştir. Hayvanlarda troponin kompleks proteinlerinin belirlenmesine rağmen, özellikle çiftlik hayvanlarında klinik kullanımları hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır (8). Bu nedenle sunulan bu çalışmada, kuzuların beyaz kas hastalığında kalp kasında ki sarkoplazmik hyalin dejenerasyonlarının belirlenmesinde cTn-I ve cTn-T analizleri ile birlikte serumda yükselebildiği bildirilen enzimlerin aktivitelerinin klinik öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneme grubunu Kayseri yöresinde bulunan iki koyunculuk işletmesinde bulunan 2-8 haftalık (ortalama $3,1 \pm 1,7$ hafta), konjenital ve edinsel beyaz kas hastalıklı toplam 20 adet kangal ırkı kuzu oluşturdu. Kontrol grubunu ise yine aynı yöredeki, aynı ırk ve yetiştirme şartları altındaki, 2-8 haftalık (ortalama $3,6 \pm 1,8$ hafta) 10 adet sağlıklı kuzu oluşturdu. Hayvan sahipleri ve veteriner hekimlerden koyunculuk işletmelerinde bulunan hayvanlar hakkında bilgiler alınarak çalışma grubundaki hayvanların genel klinik muayeneleri yapıldı. Hayvanların Vena jugularis'inden serum CK-MB, LDH, AST ve cTn-I analizleri için vakumlu antikoagülsüz cam tüplere 5 ml, cTn-T analizleri için de vakumlu heparinli cam tüplere 2 ml kan örnekleri alındı. Antikoagülsüz tüplere alınan kan örnekleri 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 6000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve ayrılan serumlar ilk yarım saat

içinde cTn-I testine tabi tutuldu. Daha sonra örnekler enzim analizleri yapılana kadar -20°C ' de derin dondurucuda saklandı. Heparinli kan örnekleri ise alınır alınmaz cTn-T analizlerine tabi tutuldu. Kalp kökenli Troponin-I için ticari Veda. Lab. Troponin I - Check-1 (Fransa) test kitlerinden yararlanıldı. Troponin-T'nin belirlenmesi amacıyla yine piyasadan ticari olarak temin edilen Tromp-T test kiti (Almanya) kullanıldı. Testler prospektüslerinde belirtilen açıklamalar doğrultusunda uygulandı. CK-MB, LDH ve AST enzim analizleri ise ticari kitler (Biolabo-Fransa) ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Elde edilen tüm veriler SPSS 16.0 programında bilgisayara yüklenerek gruplar arasındaki verilerin istatistiksel önemleri için "tek yönlü ANOVA testi" ve "post hoc" testleri uygulandı. Beyaz kas hastalığı olan ve cTn sonuçları pozitif belirlenen gruplar ile kontrol grubu verilerinin karşılaştırılması için "Dunnett testi" her iki hasta grubunu karşılaştırmak için "Tukey testi" uygulandı. Veriler tablolarda ortalama \pm standart sapma şeklinde verildi.

BULGULAR

Hasta kuzuların ayağa kalkıp annelerini ememedikleri, başlarını düzgün tutamadıkları, solunum güçlüğü çektikleri ve kolostrum alamadıkları belirlendi. Ayrıca zayıflık, kaslarda güçsüzlük, ayakta duramama, köpek oturuşu pozisyonu alma, lateral pozis-

yonda yatma, abdominal solunum, yutma güçlüğü, düzensiz kalp atımları ve santral sinir sistemi belirtileri gibi atipik semptomlar da dikkati çekti. Bunun yanı sıra taşipne ve taşikardi gözlemlendi. Bazı kuzuların kalp oskültasyonunda aritmi ve üfürüm belirlendi.

Ortalama CK-MB, LDH ve AST aktivitelerinin her üçü de beyaz kas hastalığı olan 20 kuzudan yalnız 5 tanesinde hem sağlıklılara hem de aynı gruptaki diğer kuzulara kıyasla daha yüksekti. Bu yüksek düzeylerin istatistiksel açıdan da önemli ($p<0,01$) olduğu belirlendi. Beyaz kaslı kuzularda CK-MB aktivitesi 154,7–687 IU/L arasında geniş bir aralıkta bulundu. Aynı hayvanlardaki, LDH aktivitesi 161,9–7204,5 IU/L ve AST aktiviteleri de 48,8–956,1 IU/L arasında belirlendi. Beyaz kas hastalıklı 15 adet kuzudan ve sağlıklı kuzulardan elde edilen yukarıdaki ortalama enzim aktiviteleri arasında farklılık belirlenmedi (Tablo I).

Beş beyaz kas hastalıklı olguda anılan süreler içinde cTn testleri pozitif bulunurken, diğer olgularda hem cTn-I hem de cTn-T'nin testinin de negatif olduğu belirlendi. Sağlıklı kuzularda sonuçlar myokarditis yönünden negatif olarak değerlendirildi. Kardiyak troponin testlerine ait sonuçlar Şekil 1, 2 ve 3' de gösterilmiştir.

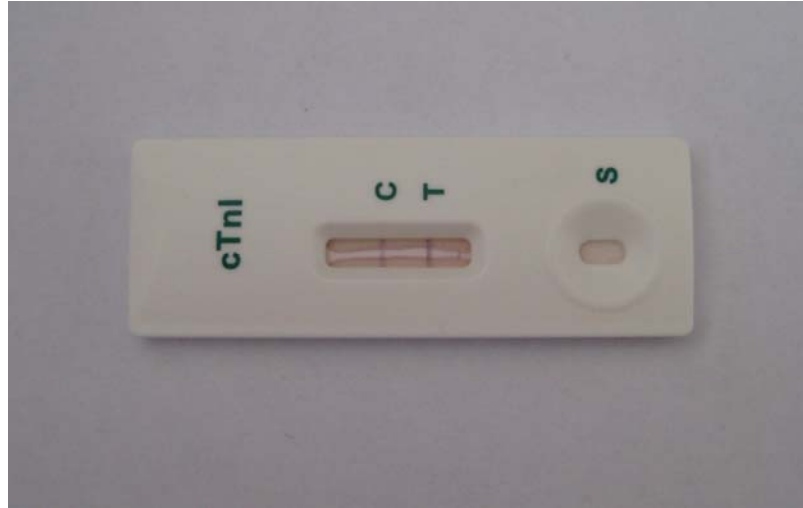
Tablo I. Beyaz kas hastalıklı, cTn pozitif ve sağlıklı kuzuların serum ortalama CK-MB, LDH ve AST aktiviteleri

Çalışma Grupları	n	Parametreler		
		CK-MB (IU/L) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	LDH (U/L) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	AST (U/L) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)
Beyaz Kas Hastalıklı Kuzular	15	216,2 \pm 33,8 ^a	717,7 \pm 657,5 ^a	126,4 \pm 83,3 ^a
cTn Pozitif Vakalar	5	490,5 \pm 167,7 ^b	3804,1 \pm 2700,3 ^b	734,5 \pm 226,2 ^b
Sağlıklı Kuzular	10	171,2 \pm 60,6 ^a	513,2 \pm 210,6 ^a	59,2 \pm 21,1 ^a

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel önemi göstermektedir. İstatistiksel önem $p<0,01$ düzeyinde belirlenmiştir.



Şekil 1. Beyaz kas hastalıklı kuzulara ait negatif (yukarıda) ve pozitif (aşağıda) cTn-T bulguları



Şekil 2. Belirgin çizgi, yüksek cTn-I düzeyine bir örnek



Şekil 3. Sağlıklı kuzulardan elde edilen cTn-I ve cTn-T testlerine bir örnek, okuma pencerelerinde tek çizgi negatif.

TARTIŞMA

Son yıllarda cTn-I ve cTn-T analiz sonuçları özellikle kardiyak nekrozisin tanımlanmasında özgün ve duyarlı parametreler olarak başarıyla kullanılmıştır (8). Önceki çalışmalar laboratuvar hayvanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (12–14). Günümüzde veteriner sahada yapılan çalışmalarla kalp kökenli troponinler daha iyi tanımlanmış ve günümüzde küçük hayvan kliniklerinde rutin kullanım alanına girmiştir (15). Ancak kalp kökenli troponinlerin besine bağlı veya diğer nedenli kardiyomyopatili küçük ruminantlarda kullanımı konusunda sınırlı yayın vardır (16, 17). Deneysel olarak oluşturulmuş myokardiyal enfarktüsli koyunlarda yapılan bir çalışmada kreatin kinaz (CK) enzim aktivitesi ve Tn-T düzeylerinde önemli artışlar olduğu kaydedilmiştir (16).

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada, beyaz kas hastalıklı kuzuların serumlarında cTn-I konsantrasyonlarının $10,49 \pm 0,25$ ng/ml'ye ulaştığı ve aynı kuzuların myositlerinde de cTn-I kaybının olduğu

belirlenmiştir (17). Çalışmamızda da bu çalışmalarla (16, 17) uyumlu olarak beyaz kas hastalıklı kuzularda kalp kası hasarının göstergesi olan cTn-T ve cTn-I kitlerinin pozitif sonuçları belirlenmiştir. Bu bulgular aynı zamanda myokard hasarlı bir buzağıdan elde edilen sonuçlarla da (18) paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada beyaz kas hastalıklı kuzularda kalp kası hasarını gösteren enzimlerdeki yükselmelere paralel olarak cTn-I ve cTn-T sonuçlarının pozitif olması, troponin markerlarının kuzuların kalp kası hasarı için özgün birer teşhis aracı olduğunu belirlemiştir. Ayrıca elde edilen cTn sonuçları fiziksel muayene bulguları ve biyokimyasal bulgular ile de aynı yöndedir.

Sonuçta elde edilen bulgular literatür bilgileri (16-19) ışığında değerlendirildiğinde veteriner sahada cTn (cTn-T ve cTn-I) analizlerinin küçük ruminantlar için de gelecekte kalp kası hasarlarının tanısında duyarlı ve özgün bir gösterge olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aytuğ CN. *Metabolizma ve Noksanlık Hastalıkları. Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Teknografik Matbaası, İstanbul 1990, ss 289.*
2. Bilal T. *Metabolizma ve eksiklik hastalıkları. Koyun-Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul 2005, ss 251–257.*
3. Ergün A, Tuncer Ş. *Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Medipres, Ankara 2001, ss 85–91.*
4. Sarı M, Çerçi İH. *Yemler. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Elazığ 1993, ss 31–36.*
5. Ergün A. *Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti, Malatya 2004, ss 388–389.*
6. Azzazy HME, Christenson RH. *Cardiac markers of acute coronary syndrome: Is there a case for point-of-care testing. Clin Biochem 2002, 35: 13–27.*
7. O'brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, et al. *Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. Lab Anim 2006, 40(2): 153-71.*
8. Gunes V, Atalan G, Cital M, Erdogan HM. *Use of cardiac troponin kits for the qualitative determination of myocardial cell damage due to traumatic reticuloperitonitis in cattle. Vet Rec 2008, 19:514-7.*
9. M-Bardorff M, Hallermayer K, Schro A, Ebert C. *Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation. Clin Chem 1999, 43(3): 458–466.*
10. Rice MS. *Appropriate roles of cardiac troponins in evaluating patients with chest pain. J Am Board Fam Pract 1999, 12(3):214–218.*
11. Bertsch T, Bleuel H, Aufenanger J, et al. *Comparison of cardiac troponin-T and cardiac troponin-I concentrations in peripheral blood during orciprenaline induced tachycardia in rats. Exp Toxicol Pathol 1997, 49: 467–468.*
12. Christenson RH, Apple FS, Morgan DL, et al. *Cardiac troponin-I measurement with the Access immunoassay system: analytical and clinical performance characteristics. Clin Chem 1998, 44: 52–60.*
13. McAuliffe JJ, Robbins J. *Troponin T expression in normal and pressure-loaded fetal sheep. Heart Pediatr Res 1991, 29: 580–585.*
14. Fredericks S, Merton GK, Lerena MJ, et al. *Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. Clin Chim Acta 2001, 304: 65–74.*
15. Braun JP, Diquelou A, Trumel C. et al. *Biochemical markers of cardiac damage and dysfunction in dogs and cats; 1st TSAVA "Anadolum" Continuing Education Congress, İstanbul, 10–11 November 2006, pp 23-27.*
16. Charles CJ, Elliott JM, Nicholls MG, Rademaker MT, Richards M. *Myocardial infarction with and without reperfusion in sheep: early cardiac and neurohumoral changes. Clin Sci 2000, 98: 703–711.*
17. Tunca, R., Erdoğan, H.M., Sözmen, M., Çitil, M., Devrim, A. K., Erginsoy, S., Uzlu, E. *Evaluation of Cardiac Troponin I and Inducible Nitric Oxide Synthase Expressions in Lambs with White Muscle Disease. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 2009 (Baskıda). <http://journals.tubitak.gov.tr/havuz/vet-0710-6.pdf>. adresinden temin edilebilir.*
18. Gunes V, Erdogan HM, Cital M, Ozcan K. *Assay of cardiac troponins in the diagnosis of myocardial degeneration due to foot-and-mouth disease in a calf. Vet Rec 2005, 156: 714-715.*
19. Kokuuslu C, Drommer W, Özkul IA, Çamaş H. *Kuzuların beyaz kas hastalığında oluşan histolojik ve elektron mikroskopik bulguların incelenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1986, 33: 97–112.*