



Subklinik Mastitisli İneklerde Adenozin Deaminaz Aktivitesi ve Somatik Hücre Sayısı Korelasyonu

İbrahim Mert POLAT^{1,*}, İlknur Pir YAĞCI¹, Mustafa KAYMAZ², Gül Fatma YARIM³, Buğrahan Bekir YAĞCI⁴

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

⁴Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Geliş Tarihi/Received
07.05.2019

Kabul Tarihi/Accepted
25.06.2019

Yayın Tarihi/Published
30.06.2019

Öz

Bu çalışmada yangısal süreçte önemli görevleri olan adenozin deaminazın, subklinik mastitisli ineklerde serum ve süt adenozin deaminaz (ADA) düzeylerinin belirlenmesi ve bu enzimin somatik hücre sayısı ile ilişkisinin ortaya konması amaçlandı. Çalışma grubunu oluşturan Holstein inekler; subklinik mastitisli (n=40) ve sağlıklı inekler (n=15) olarak iki gruba ayrıldı. Kaliforniya mastitis testi (CMT) sonucunda şüpheli sonuç veren ve herhangi bir klinik mastitis bulgusu bulunmayan inekler subklinik mastitis grubunu, CMT negatif olan inekler ise kontrol grubunu oluşturdu. Süt örneklerindeki somatik hücre sayıları flow sitometri ile belirlendi. Subklinik mastitis grubunda serum ve süt ADA değerleri sırasıyla 8,11 ve 3,38 IU/L ölçüldü. Somatik hücre sayıları subklinik mastitis ve kontrol grubunda sırasıyla 248x10³ ve 132x10³ bulundu (p<0.01). Süt ADA ile somatik hücre sayısı arasında da pozitif korelasyon bulundu (p<0.01, r=0.611). Sonuç olarak, adenozin deaminazın ineklerde subklinik mastitis olgularının tanısında bir belirteç olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Adenozin deaminaz, subklinik mastitis, inek, somatik hücre sayısı

Correlation of Adenosine Deaminase Activity and Somatic Cell Count in Dairy Cows with Subclinical Mastitis

Abstract

In this study, we aimed to determine the levels of adenosine deaminase (ADA), which plays important role in inflammatory process in sera and milk in cows with subclinical mastitis and state the relationship between this enzyme with somatic cell count. Holstein cows which was consisted the study group allocated into two groups subclinical mastitis (n = 40) and healthy cows (n = 15). After performing the California Mastitis Test (CMT), the cows resulted suspicious; included the study group, the cows which showed CMT as negative constitute the control group. Somatic cell counts were determined with flow cytometry assay. In subclinical mastitis group, serum and milk ADA values were 8.11 and 3.38 IU / L, respectively. Somatic cell counts were 248x10³ and 132x10³ in subclinical mastitis and control groups, respectively (p <0.01). There was a positive correlation between milk ADA and somatic cell count (p <0.01, r = 0.611). As a result, adenosine deaminase can be used as a marker in the diagnosis of subclinical mastitis in cows.

Key Words: Adenosine deaminase, subclinical mastitis, cow, somatic cell count

GİRİŞ

Adenozin deaminaz (ADA), adenozinin intra ve ekstra selüler seviyelerinin kontrolünde rol oynayan önemli bir enzimdir. ADA, tüm memelilerin lenfoid dokularında, lenfositlerin üretimi ve farklılaşmasına etki eder (1). Bu enzimin aktivitesi oluşan immun yanıtı bağlı olarak değişim göstermektedir. İmmun sistemin aktive olduğu durumlarda seviyesi artarken, baskılandığı durumlarda ise seviyesi azalmaktadır (1,2). Adenozin deaminaz enzimi insanlarda baskın olarak CD4⁺ hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır ki bu hücreler enfeksiyon durumlarında katil hücrelere dönüşürler ve/veya diğer antikorların oluşumunu hızlandırır (3). Adenozin deaminaz T lenfositlerde B lenfositlere oranla daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle T lenfositlerin farklılaşması sırasında ADA aktivitesi önemli düzeylerde artış göstermektedir ki, bu

durum hücresel bağışıklığın göstergesi olarak da kabul edilmektedir (2,3). Adenozin deaminaz ve izoenzimleri beşeri ve veteriner hekimlikte oldukça yaygın kullanım alanı bulabilmektedir. Genel anlamda, serum ADA aktivite düzeyinin immun fonksiyonun değerlendirilmesinde uygun bir parametre olduğu düşünülmektedir (4,5).

Meme dokusunun yangısı olarak tanımlanan mastitis, ineklerde sıklıkla klinik veya subklinik formlarda seyrederek (6). Klinik mastitislerde sütte gözle görülebilir değişiklikler olurken, subklinik olgular asemptomatik seyrederek ve süt kalitesini önemli ölçüde etkileyerek ekonomik kayıplara yol açar. Klinik mastitisler, sütteki makroskopik değişikliklerin görülmesiyle kolayca teşhis edilebilirken; subklinik mastitisler kaliforniya mastitis testi (CMT), whiteside testi, somatik hücre sayımı ve elektrik geçirgenlik testleri gibi yöntemlerle belirlenebilmektedir. Son yıllarda, subklinik mastitis olgula-

rında kolorimetrik ve florometrik yöntemlerle çalışan bazı enzimatik değişikliklerin belirlendiği çalışmalarda bulunmaktadır (8-10). Meme inflamasyonlarında süt somatik hücre miktarındaki artış, inflamasyonun derecesine ve hastalığa neden olan mikroorganizmanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Yangı ve enfeksiyon ne kadar şiddetliyse somatik hücre sayısı da doğru orantılı olarak artmaktadır (6).

Bu çalışmada subklinik mastitisli ineklerde kan serumu ve sütte adenozin deaminaz düzeylerinin belirlenmesi ve bu enzimin düzeyinin somatik hücre sayısı ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışma, Marmara Bölgesinde yer alan, otomatik sağım yapılan ticari bir süt ineği işletmesinde, orta laktasyon döneminde (ortalama 138 gün) yürütüldü. Yaşları 3-5 arasında değişen Holstein ırkı inekler, özdeş çevresel ve beslenme koşullarına sahipti. Günlük iki sağım yapılan işletmede ortalama süt verimi yıllık 6.500-8.000 arasında değişmekteydi. Örneklemeler sonrası çalışma ve kontrol gruplarının oluşturulmasından sonra her olguya ait bireysel süt verimleri değerlendirilmek üzere kaydedildi. Klinik muayeneler ve CMT sonuçlarına göre çalışma grupları; subklinik mastitisli inekler (n=40) ve kontrol grubu (n=15) şeklinde oluşturuldu. Süt ve kan örneklerinin toplanmasından önce palpasyonda meme dokunda fibrozis, şişkinlik, yangı bulguları olan ve sulu, pıhtılı, kanlı sütü olan inekler çalışmaya dahil edilmedi. Süt örnekleri sabah sağımı öncesi her bir meme lobundan alındı ve meme loblarının en az bir tanesinde şüpheli CMT skoru olan (hafif jel kıvamı oluşan) ve klinik olarak enfeksiyon bulguları göstermeyen inekler subklinik mastitis grubuna dahil edildi ve daha sonrasında yapılan somatik hücre sayımı ile subklinik mastitis olguları kesinleştirildi. Somatik hücre sayımları ve süt ADA ölçümleri sadece hasta meme loblarından alınan süt örneklerinde gerçekleştirildi. CMT skoru negatif olanlar ise kontrol grubunu oluşturdu.

Kan ve Süt Örneklerinin Hazırlanması

ADA analizleri için kullanılacak kan örnekleri kuyruk venasından antikoagülsüz vakumlu tüplere alındı. Kan örnekleri +4°C'de ve 1550 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serumlar analizler yapıncaya kadar -80°C'de saklandı. Süt örnekleri polietilen steril tüplere alındı, numunelerin korunması amacıyla azidiol eklendi ve soğuk zincirde bir gün içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. ADA analizleri için gerekli olan süt serumu eldesi için Alais tarafından belirlenen yöntem kullanıldı (11).

ADA Ölçüm Prosedürü

Serum ve süt ADA aktiviteleri Guisti ve Galantin (1984) yöntemine göre ölçüldü (12). Numuneler, adenozinle 60 dakika boyunca 37 °C'de inkube edildikten sonra fenol ve sodyum nitroprusid eklenmiş hipoklorid solüsyonua aktarıldı. Renklenen solüsyon 640 nm dalga boyunda uv-vis spektrofotometre ile ölçüldü (Shimadzu-3100). ADA aktivi-

teleri standart eğrinin optik dansiteleri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Süt Somatik Hücre Sayımı

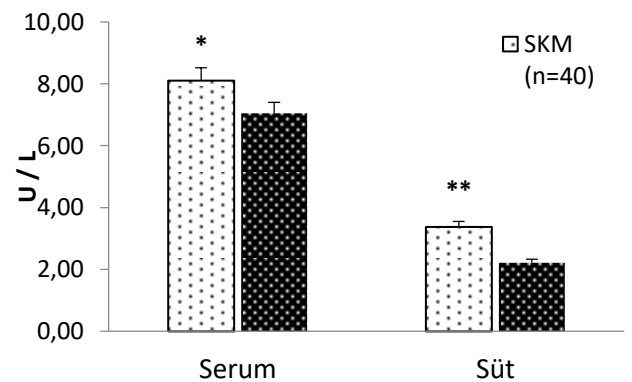
Süt somatik hücre sayıları flow sitometri ile belirlendi (Bentley Instruments, USA).

İstatistiksel Analiz

Verilerin normalite ve homojenite dağılımları Shapiro Wilk ve Levene testleri ile belirlendi. Gruplar arasında ADA ve SHS seviyelerinin istatistiksel değerlendirmesinde t-test, veriler arasındaki ilişkinin hesaplanmasında ise Pearson korelasyon testi kullanıldı. Bulgular, korelasyon kat sayısı (r) ve p değeri olarak gösterildi. Tüm bulgular ortalama ve standart hata (S.H) şeklinde sunuldu. İstatistiksel önemlilik P<0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Her iki çalışma gruplarına ait serum ve süt ADA değerleri Şekil 1'de sunuldu. Subklinik mastitisli ineklerin serum ADA seviyeleri kontrol grubuna oranla daha yüksek bulundu (p<0.01). Subklinik mastitis grubunda serum ve süt ADA değerleri sırasıyla 8,11±0,83 ve 3,38±0,42 IU/L ölçüldü. Kontrol grubunda ise bu değerler sırasıyla 7,05±0,62 ve 2,22±0,37 U/L belirlendi. Süt ADA değerleri kontrol grubunda, subklinik mastitisli ineklerin değerlerine oranla düşük bulundu (p<0.05). CMT skoru şüpheli olan subklinik mastitisli ineklerin somatik hücre sayıları ortalama 248x10³ hücre/mL (196 x10³ - 294 x10³) olarak belirlendi. CMT pozitif meme lobları ile somatik hücre sayısı arasında pozitif korelasyon bulundu. Kontrol grubunda ise somatik hücre sayısı 132x10³ bulundu. Kontrol grubunun serum ve süt ADA değerleri ile somatik hücre sayıları arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunmadı. Subklinik mastitisli ineklerin süt verimleri (6740 kg) ise kontrol grubuna (7112 kg) oranla daha düşüktü (p<0.05).



Şekil 1. Çalışma ve kontrol gruplarında serum ve süt ortalama ADA değerleri

SKM: Subklinik mastitis, K: Kontrol, * P < 0.01, ** P < 0.05

Subklinik mastitis grubunda serum ADA ile süt ADA (p<0.01, r=0.765) ve SHS arasında (p<0.05, r=0.498) pozitif korelasyon bulundu (Tablo 1). Ek olarak, süt ADA ile somatik hücre sayısı arasında da pozitif korelasyon bulundu (p<0.01, r=0.611).

Tablo 1. Subklinik mastitisli inekler serum ve süt ADA değerleri ve somatik hücre sayıları arasındaki korelasyon katsayıları

	Korelasyon Katsayısı (Pearson)	Serum ADA	Süt ADA	SHS
Serum ADA	r	1	0,765*	0,498**
Süt ADA	r	0,765*	1	0,611**
SHS	r	0,498*	0,611*	1

* P < 0.01, ** P < 0.05

TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme bezi yangılarında perivasküler aralıktan alveoler lümeneye bazı bileşenlerin geçişiyle sütün yapısında değişiklikler olur (8,13). Bu yangısal değişiklikler sonucu sütteki bazı hücreler, enzimler ve antioksidan aktivitesi etkilenir. Memenin doğal savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda makrofajlar ve lenfositlerin aktivasyonu sonucu immun yanıt şekillenir. Yangı sürecinde önemli rol oynayan ve başlıca lenfositler olmak üzere birçok immun sistem hücresinde bulunan ve immunitenin endojen regülatörü olan ADA enzimi, organizmayı doku hasarına karşı korur (14, 15). Bu çalışmada, ADA seviyelerindeki artışın çalışma grubunda yüksek bulunması subklinik mastitise bağlı gelişen lenfosit aktivasyonu ile ilişkilendirildi. Ayrıca, yüksek somatik hücre sayısının bulunması ve bu parametrenin hem serum hem de süt ADA seviyeleri ile pozitif korelasyona sahip olması, subklinik mastitis olgularının teşhisinde bu enzimin güvenle kullanılabileceği kanısına varıldı. Bir çalışmada, subklinik mastitisli ineklerde meme içi levamizol uygulamalarının memenin bağışıklık sistemi üzerine etkileri araştırılmış ve ilaç uygulama sonrası serum ve süt ADA düzeylerinde bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (16). Çalışmamızda ise her ne kadar herhangi ilaç uygulanmamasına rağmen subklinik mastitisli ineklerde, kontrol grubuna oranla elde edilen yüksek ADA seviyelerinin, bu enzimin doğrudan hücrel immunitenin ile ilişkili olduğu ve lenfositlerin doğal aktivasyonuna bağlı bir artış olduğu düşünüldü.

ADA aktivitesi, adenozinin degradasyonunu sağlayarak doku hasarını önler. ADA seviyelerindeki azalma ise enfeksiyona bağlı olarak dokulardaki hasarın önlenememesine sebep olur (15). Çalışmamızda, yüksek serum ve süt ADA aktivitesinin bulunması nedeniyle, ineklerin meme dokularında yıkılayıcı bir hasar olmadığı, yangısal yanıtın devam ettiği ve bu sürecin tedaviye destek olabileceği kanısına varıldı. Gerek beşeri gerekse veteriner hekimlik alanında adenozin deaminaz hakkında yapılan çalışmalar, bu enzimin metabolik, otoimmün, bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklar gibi birçok olguda erken tanı belirteci olarak kullanılan ADA aktivitesinin (1,3,4) çalışmamızın bulguları ışığında süt ineklerinde meme sağlığının ortaya konmasında diğer konvansiyonel parametrelerin yanında yerini alması gerektiği düşünüldü.

Sonuç olarak, elde edilen yüksek ADA seviyelerinin; bu enzimin subklinik mastitis olgularında önemli bir role sahip olduğu, somatik hücre sayısı ile pozitif korelasyon gösterdiği

ve ineklerde subklinik mastitis olgularının tanısında diğer parametrelere ek olarak güvenle kullanılabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Kumar V, Sharma A. (2009). Adenosine: An Endogenous Modulator of Innate Immune System with Therapeutic Potential. *Eur J Pharmacol.* 15: 7-15.
2. Fredholm BB, Johansson S, Wang YW. (2011). Adenosine and the Regulation of Metabolism and Body Temperature *Adv Pharmacol.* 61: 77-94.
3. Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. (2019). Adenosine Signaling and the Immune System: When a lot Could be too Much. *Immunol Lett.* 205:9-15.
4. Fávero JF, Da Silva AS, Bottari NB, et al. (2018). Physiological Changes in the Adenosine Deaminase Activity, Antioxidant and Inflammatory Parameters in Pregnant Cows and at Postpartum. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 102(4): 910-916.
5. Rodney EK, Yeung CY, Ingolia DE. (1985). Adenosine Deaminase Deficiency and Severe Combined Immunodeficiencies. *Trends Genet.* 1: 278-283.
6. Baştan A. (2013). İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları Genişletilmiş II. Baskı. Kardelen Ofset Matbaacılık Tanıtım Hiz. Ankara, Türkiye.
7. Kossabati MA, Esslemont RJ. (2007). The Costs of Production Diseases in Dairy Herds in England. *Vet J.* 154: 41-51.
8. Pyörälä S. (2003). Indicators of Inflammation in the Diagnosis of Mastitis. *Vet Res.* 34(5): 565-578.
9. Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australas J Anim Sci.* 24 (3): 429-438.
10. Antanaitis R, Žilaitis V, Juozaitienė V, et al. (2015). Efficient Diagnostics and Treatment of Bovine Mastitis According to Herd Management Parameters. *Veterinarija Ir Zootechnika.* 69 (91):3-10.
11. Alais C. (1974). *Science du Lait. Principes des Techniques Laitières.* Editeurs Boulevard, Paris.
12. Guisti G, Galanti B. (1984). Adenosine Deaminase: Colorimetric Method. *Methods of Enzymatic Analysis.* 5th edition. Bergmeyer HU (Ed). Pp. 315-323. Verlag Chemie Weinheim, Germany
13. Kehrlı ME, Harp JA. (2001). Immunity in the Mammary Gland. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17(3): 495-516.
14. Pilla R, Malvisi M, Snel GGM, et al. (2013). Differential Cell Count as an Alternative Method to Diagnose Dairy Cow Mastitis. *J Dairy Sci.* 96(3): 1653-1660.
15. Conlon BA, Law WR. (2004). Macrophages Are a Source of Extracellular Adenosine Deaminase 2 During Inflammatory Responses. *Clin Exp Immunol.* 138(1): 14-20.
16. Salmanoğlu B, Pamukçu T, Yarım G. (2002). Subklinik Mastitisli Süt İneklerinde Meme İçi Levamizol Uygulanmasında Süt ve Kanda Adenozin Deaminaz, Vitamin A, B-Karotin Düzeyleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 49: 17-21.

Yazışma Adresi:

*İbrahim Mert POLAT

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye
e-mail: vethekmert@gmail.com