

Sığır tüberkülozunda malondialdehit ve superoksit dismutaz'ın immunohisto-kimyasal olarak değerlendirilmesi

Muhammed Mustafa SEZGİNER¹, Zafer ÖZYILDIZ²

¹Tarım ve Orman Bakanlığı Sandıklı Tarım İl Müdürlüğü, Sandıklı, Afyon /TÜRKİYE

²Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Burdur/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

immunohistokimya
malondialdehit
reaktif oksijen türevleri
sığır tüberkülozu
superoksit dismutaz

Key Words:

immunohistochemistry
malondialdehyde
reactive oxygen species
bovine tuberculosis
superoxide dismutase

Geliş Tarihi: 08.11.2019
Kabul Tarihi: 16.12.2019
Yayın Tarihi: 31.12.2019
Makale Kodu: 644406

Sorumlu Yazar:
Z. ÖZYILDIZ
(zozyildiz@mehmetakif.edu.tr)

ORCID:

MM. SEZGİNER: 0000-0001-9812-7605
Z. ÖZYILDIZ: 0000-0002-6009-9191

** Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0261-YL-15 proje numarası ile desteklenmiştir. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalı 415111 no'lu Yüksek Lisans tezinin özetidir.

ÖZ

Sığır tüberkülozu, mücadelenin yetersiz olduğu ülkelerde, önemini koruyan kronik ve zoonoz bir hastalıktır. Çok eski yıllardan beri tanınan bir hastalık olmasına rağmen, klinik tanısı kolaylıkla yapılamamaktadır ve patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır. Bu çalışmada, sığır tüberkülozunda, lezyonlu dokularda malondialdehit (MDA) ve superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ve bunların hastalığın patogenezi ile ilişkileri incelenmiştir. Bu amaçla, kesimi yapılan, PPD pozitif 25 sığırın lezyonlu iç organlarında SOD ve MDA aktiviteleri immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda, tüberküloz lezyonundaki MDA ve SOD aktivitelerinin özellikle yangısal hücrelerde ve ardından da parankimal hücrelerde arttığı saptanmış ve patogenezi rol oynadıkları kanısına varılmıştır.

Immunohistochemical evaluation of malondialdehyde and superoxide dismutase in bovine tuberculosis

ABSTRACT

Cattle tuberculosis is an important chronic and zoonotic disease that maintains its importance in countries where struggle is inadequate. Although it has been recognized for many years, its clinical diagnosis cannot be made easily and its pathogenesis is not fully understood. In this study, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activities in lesioned tissues in bovine tuberculosis and their relationship with the pathogenesis of the disease was investigated. For this purpose, SOD and MDA activities were evaluated immunohistochemically in the internal organs of 25 slaughtered PPD positive cattle. As a result of our study, MDA and SOD activities in tuberculosis lesion increased especially in inflammatory cells and then in parenchymal cells and it was concluded that they play a role in pathogenesis.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), yüzyıllar boyunca insan ve hayvanları etkileyen, kronik seyirli, bulaşıcı bir enfeksiyondür. Hastalık lezyonları, paleolitik ve neolitik dönemlere ait kemikler ile eski Mısır mumyalarında bulunmuştur (1,2). Sığır tüberkülozunun etkeni olan *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), aside dirençli, aerobik, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteridir (3). İnsan ve hayvanlarda tüberküloza sebep olan mikobakteriler *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) adı altında toplanmıştır (10). *Mycobacterium bovis*, Karlson ve Lessel tarafından bu grubun bir üyesi olarak kabul edilmiştir (11). Bakteri ayrıca kendine özgü mikolik asit adı verilen bir madde salgılar ve mikolik asit hücre yapısı ile hücre duvarının fonksiyonunda kritik bir rol oynar (12). Duyarlı konakçının vücuduna giren *M. bovis* etkenleri girdikleri dokuda yerleşerek yabancı cisim etkisi yapar ve üremeye başlar (13). Daha sonra basile ilk olarak nötrofiller müdahale eder ve etrafında kümeleşirler. Bu olaydan kısa bir süre sonra nötrofiller degranüle olup karyoreksise uğrar ve yerlerini makrofajlara bırakırlar. Etkenler makrofajlar tarafın-

dan fagosite edilerek fagozomlara alınırlar. Fagozomlar lizozomal işlemlerini yapmak için fosfotidylinositol 3-phosphate (PI3P) adı verilen bir lipid komplemente ihtiyaç duyarlar. Bu yapı, fagozomların olgunlaşması için gerekli olan bazı proteinlerin oluşmasında rol oynar. Basilden salınan Secreted Acid Phosphatase (SapM) isimli proteinin, PI3P'in defosforilasyonuna sebep olarak fagozomun olgunlaşmasını engellediği belirtilmektedir. Yapılan in vitro bir çalışmada, mikobakterilerden ekstrakte edilmiş SapM proteinin PI3P'yi hidrolize ederek fagozom sonrası endozomal birleşmeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (14). Makrofaj içindeki kontrol edilemeyen çoğalmadan dolayı mikroorganizma lenfatik dolaşım yoluyla bölgesel lenf düğümlerine ve diğer organlara göç edebilir. Basilin açığa çıkardığı bazı yapılar sebebiyle makrofajlar şekil değiştirerek sitoplazmaları eozinofilik yapıda olan ve dizilimleri epitel hücrelerine benzeyen epitelooid tipte makrofajlara dönüşürler. Bu hücreler birbirleri ile birleşerek çok çekirdekli ve boyutları 50 mikrona ulaşan dev hücreleri oluştururlar. Bu dev hücreler genellikle Langhans tipi dev hücre olup çekirdek-

leri hilal şeklindedir ve hücre çeperinin etrafına dizilmişlerdir (13,15). Etkenin ilk girdiği yerde oluşan lezyona primer effekt adı verilir. Etkenler aynı organın lenf düğümlerinde de lezyon oluşturduklarında bu iki lezyona birlikte primer kompleks denir. Her vakada primer effekt olmasına karşın primer kompleks olmayabilir (13). Tüberküloz için karakteristik lezyonlar granülomlardır ve tüberkül olarak adlandırılır. Bu tüberküllerin yapısı fibroblastların arasına gelişigüzel dağılmış lenfositler ve bu yapıyı çevreleyen epitelooid hücreler ile karakterizedir. Tüberkülin yapısı büyüdükçe ortada kalan hücreler kazeifikasyon nekrozuna uğrarlar ve daha sonra bu alanlarda distrofik kalsifikasyon meydana gelir. Lezyon yaşlandıkça etrafını bağ dokusu çevreler ve olgunlaşır. Lezyonlar büyüdükçe etkilenen organlarda kavernler oluşabilir (15).

Sığır tüberkülozunun en önemli bulaşma yolu olarak, solunum yolu sekreterlerinin bir başka hayvan tarafından aerojen yolla alınması şeklinde olduğu düşünülmektedir (1,16). Akciğer tüberkülozunda, akciğer, primer lezyonun en çok görüldüğü yerdir. Özellikle de dorso-kaudal bölgelerde, tek veya multiple odaklar şeklinde görülür ve daima bölge lenf düğümlerine yayılır. Enfeksiyon, bronkopnömonide olduğu gibi bronşio-alveoler bölgelerden başlar ve lobüler yerleşimli, yonca yaprağı görünümünde, multiple odaklar şekillenir. Bazen lezyon akciğerin içerisinde hava yolları veya peribronşial lenfatiklerle yayılabilir. Bu durumda trake ve bronşlarda ülserler ve bronşiektazik kavernler gelişir. Tüberküloz lezyonları bazen de birbirleriyle birleşerek geniş kazeifikasyon nekroz alanları oluştururlar ki bunlara konglomere lezyonlar denir. Bu lezyonlar dıştan bağ dokusuyla veya atelektatik pulmoner parankimle çevrelenmişlerdir. Ayrıca, etkenlerin sayısı ve virülensinin yüksek, konakçı direncinin de düşük olduğu durumlarda tüberküloz eksudatif tabiatta düzensiz kazeöz bronkopnömoni veya daha geniş kazeöz lobar pnömoni şeklinde görülür (15).

Önemli serbest oksijen radikallerinden olan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonlarının (OH^-) fosfolipidler ve yağ asitleri ile birleşmeleri sonucu aldehitleri de içine alan çok sayıda peroksidasyon ürünü oluşmaktadır. Bu ürünlerin başlıcalarından olan Malondialdehit (MDA) oksidatif hasar düzeyini göstermede kullanılır (19,20). Lipid peroksidasyonu, normal fizyolojik olaylarda gerçekleşmekle birlikte, viral veya bakteriyel enfeksiyon, ksenobiyotikler, yangı ve radyasyona maruz kalma gibi durumlarda da dikkati çekmektedir (21,22). Reaktif oksijen türevleri (ROS) sayesinde oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membranında hasar meydana getirerek, hücrenin geçirgenliğini etkiler ve hücre içine aşırı Ca^{+2} birikmesine neden olarak, hücre membranı disfonksiyonu sonucu hücre şişmesi ve hücre ölümü ile son bulur (23). Kontrol edilemeyen peroksidasyon, membran geçirgenliğini ve permeabilitesini değiştirir. Bu nedenle lipid peroksitler ve MDA gibi ikincil metabolitler dolaşım yoluyla diğer dokularda hasara sebep olabilirler (24).

Doku içinde diğer moleküllerin oksidasyona uğramasını engelleyen moleküllere antioksidanlar adı verilmektedir (28). Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olmak üzere ikiye ayrılırlar (29). Enzimatik antioksidanlar içinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon s-transferaz (GST) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz enzim-

leri yer almaktadır. SOD antioksidan savunma sistemi için primer enzim olup süperoksit radikalini dismutasyonla katalize eden ve iki süperoksit anyonunu moleküler oksijen ile H_2O_2 'e dönüştüren bir metalloproteindir (25,26). Kendi kendine de gerçekleşebilen bu reaksiyon, SOD katalizörlüğünde 4000 kat daha hızlı da gerçekleşebilir (27). Organizma için zararlı olan H_2O_2 , katalaz ve GPx tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir. SOD'un konakçıyı intrasellüler patojenlerden korunmada önemli katkıları olduğu gösterilmiştir (30,31). SOD'un tüm türevlerinin aktivite gösterebilmek için mutlaka bir metal iyonu içermesi gerekmektedir. SOD içerdiği metal iyonu ve aminoasit dizilimleri bakımından iki önemli gruba ayrılmaktadır. Birinci grup bakır ve çinkonun proteinle (CuZn-SOD) tamamlanmasından oluşur. İkinci grupta ise aktif bölgede mangan (MnSOD), demir (FeSODS) ve nadir olarak nikel (NiSOD) bulunur. İkinci grubun birinci grup SOD'dan farkı içerdiği metal iyonu ile aminoasit dizilimindeki farklılıktan kaynaklanır (32). Ekstrasellüler matrikste ve intersitisyumda, bakır ile çinko elementi içeren ve ekstrasellüler SOD olarak adlandırılan bir süperoksit bulunduğu, bu SOD'un nitrik oksit düzeyini düzenlediği bildirilmiştir (33).

Edinilen literatür bilgilerine göre daha önce *M. Bovis* ile enfekte sığırların lezyonlu dokularında immunohistokimyasal olarak MDA ve SOD reaksiyonları incelenmemiştir. Bu çalışmanın amacı lezyonlu dokulardaki MDA ve SOD immuno-reaksiyonlarının incelenerek sığır tüberkülozundaki rollerinin detaylı olarak araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin toplanması

Çalışmamızın materyalini oluşturan doku örnekleri Afyonkarahisar ili Sandıklı ilçesinde bulunan ve tüberkülin uygulamasına pozitif reaksiyon vermiş olan 4-12 yaş arasındaki 97 baş sığırın şartlı kesimi sırasında toplandı. Hayvanların post-mortem muayenesinde, makroskobik olarak organlarda tüberküloz lezyonu bulunan veya genaralize tüberküloz olgusuna rastlanan 49 hayvanın 25 tanesinden mediastinal ve bronşiyal lenf yumruları, akciğer, karaciğer ve kalp doku örnekleri alındı. Lezyon görülen hayvanların yaşlarının çoğunlukla 2 yaş altı ya da 6 yaş ve üstü olduğu belirlendi. Bu hayvanların 31 tanesi dişi, 18 tanesi ise erkek olup; lezyon görülen hayvanlardan 27 tanesi Holstein, 11 tanesi Montafon ve 11 tanesi Simental ırkı idi. Tüberküloza özgü lezyon bulunan dokular %10'luk taponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Kontrol amacıyla hiçbir makroskobik lezyon göstermeyen 5 sığırın doku örnekleride toplandı. Her bir hayvandan alınan lezyonlu doku örnekleri ayrı kavanozlar içerisine konuldu ve üzerine numune numaraları yazılarak Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na getirildi.

Histopatolojik yöntem

Toplanan dokular rutin doku takibinin ardından parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan rotary mikrotomla, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alınarak hematoksilin eozin (HE), ve Ziehl Neelsen (ZN) boyama yöntemleri ile boyarak ışık mikroskopunda incelendi.

İmmünohistokimyasal yöntem

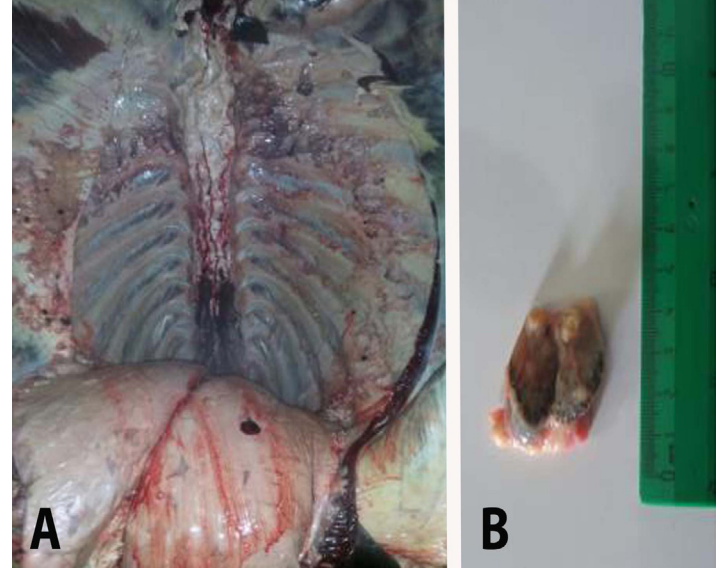
Parafin bloklardan Poly-L-lizin ile kaplanmış adeziv lamalara kesitler alındı. Streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi (ABC-P) ile yapılan immunhistokimyasal boyamada, SOD [Anti-SOD2 antibody (ab13533), Abcam, 1/100 dilüsyon] ve MDA [Anti-Malondialdehyde antibody (ab6463)], Abcam, 1/100 dilüsyon] markırlarının reaksiyonu ticari immüno-peroksidaz kiti (Invitrogen) ile ortaya kondu. Kromojen olarak DAB (3,3 diaminobenzidine) kullanıldı ve zemin boyama Harris hematoksilen ile yapılarak preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

BULGULAR

Makroskobik bulgular

Hayvanların mezbahada şartlı kesimi sonrasında yapılan postmortem muayenede tüberküloz lezyonlarının en sık olarak mediastinal lenf yumruları ve akciğerlerde lokalize olduğu gözlemlendi. Makroskobik lezyonlar sert kıvamlı olup yapılan kesitler sırasında kalsifikasyondan dolayı çıtırtı sesi duyuldu. Yapılan postmortem muayene sonucu 25 hayvanın 3 tanesinde generalize tüberküloz olgusuna rastlandı. Generalize tüberküloz olgularından birinde kalp dokusunda da tüberküloz lezyonu saptandı. Diğer generalize tüberküloz olgularda ise periton, plöra, akciğer, karaciğer ve toraksın iç yüzlerinde tüberküller belirlendi (Şekil 1.A).

Bazı hayvanlarda tek tük odaklar halinde olan tüberküllerin bazı hayvanlarda yaygın şekilde olduğu, hatta birleşerek konglomere tüberkülleri oluşturdukları dikkati çekti. Şekillenen lezyonların büyüklüğü genellikle birbirine yakın olmakla birlikte

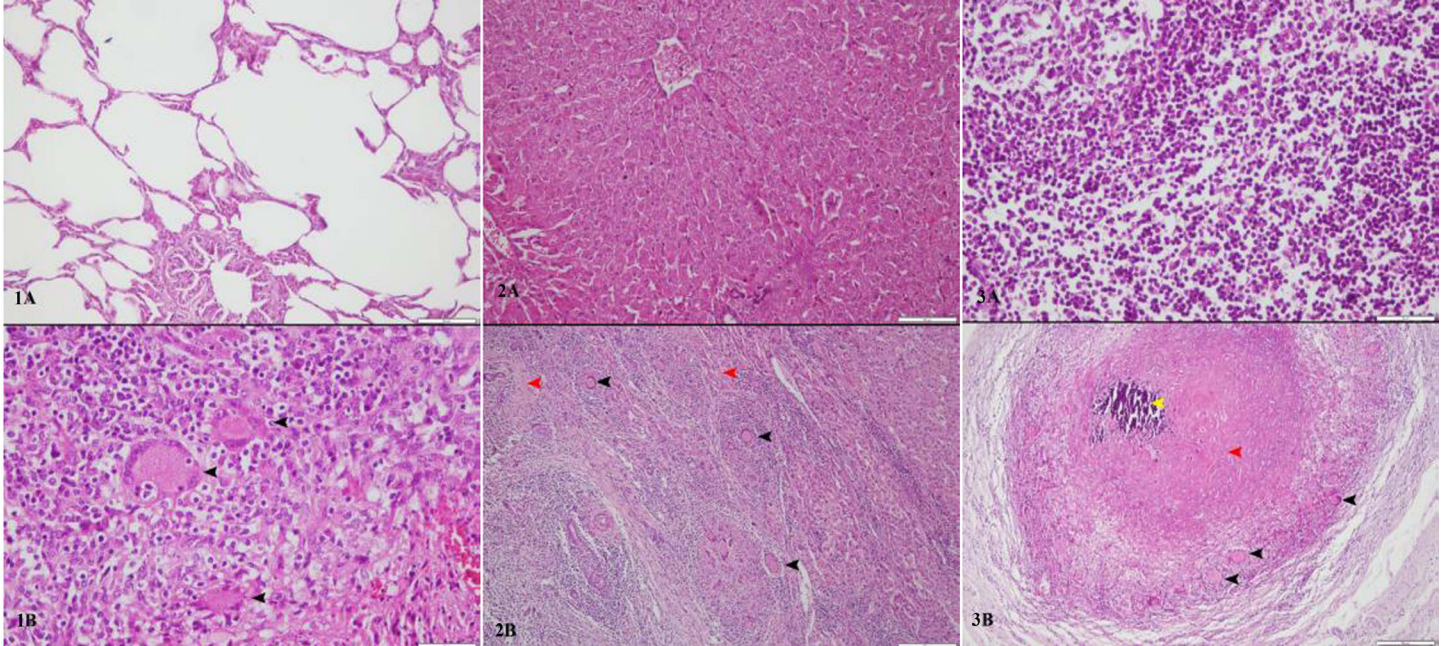


Şekil 1 A. Sığır, generalize tüberküloz, kostaların iç yüzü ve peritonda yaygın ve multiple tüberküller, B. Sığır, mediastinal lenf yumrusu, tipik tüberküller

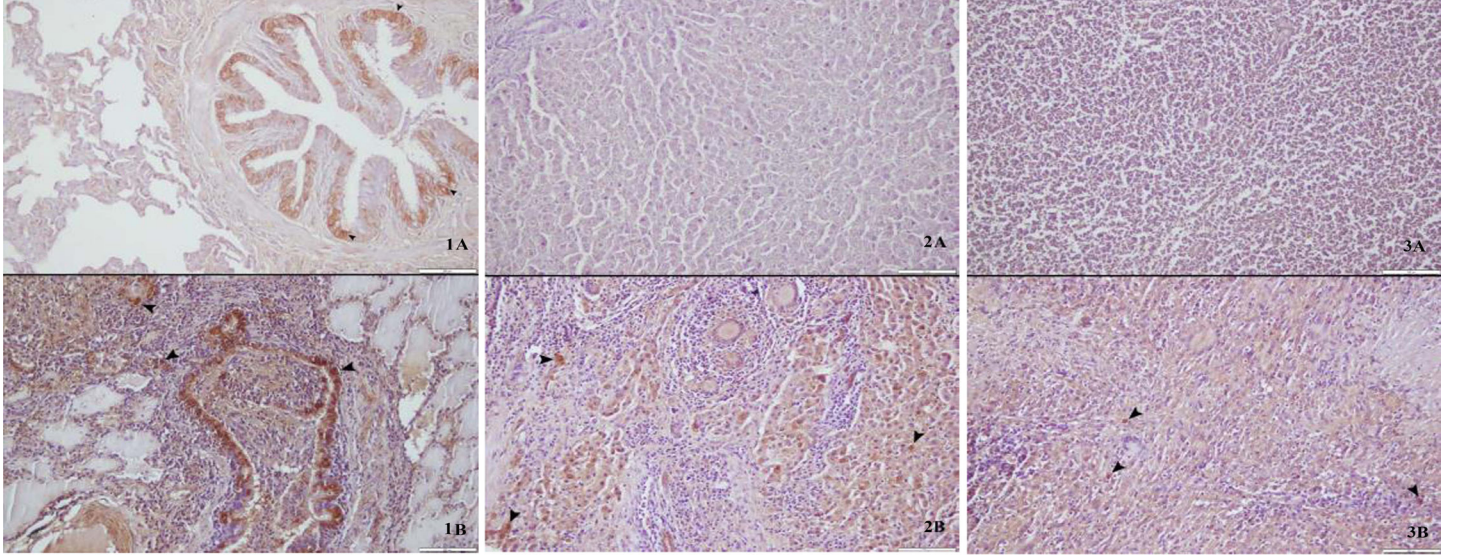
bazı hayvanlarda değişik büyüklükte tüberküllerin olduğu saptandı. Generalize tüberküloz dışındaki olguların tamamına yakın kısmında akciğer ve mediastinal lenf yumrularında tüberküloz lezyonları hakimdi (Şekil 1.B). Sadece 4 olguda karaciğerde tüberküller saptandı.

Mikroskobik bulgular

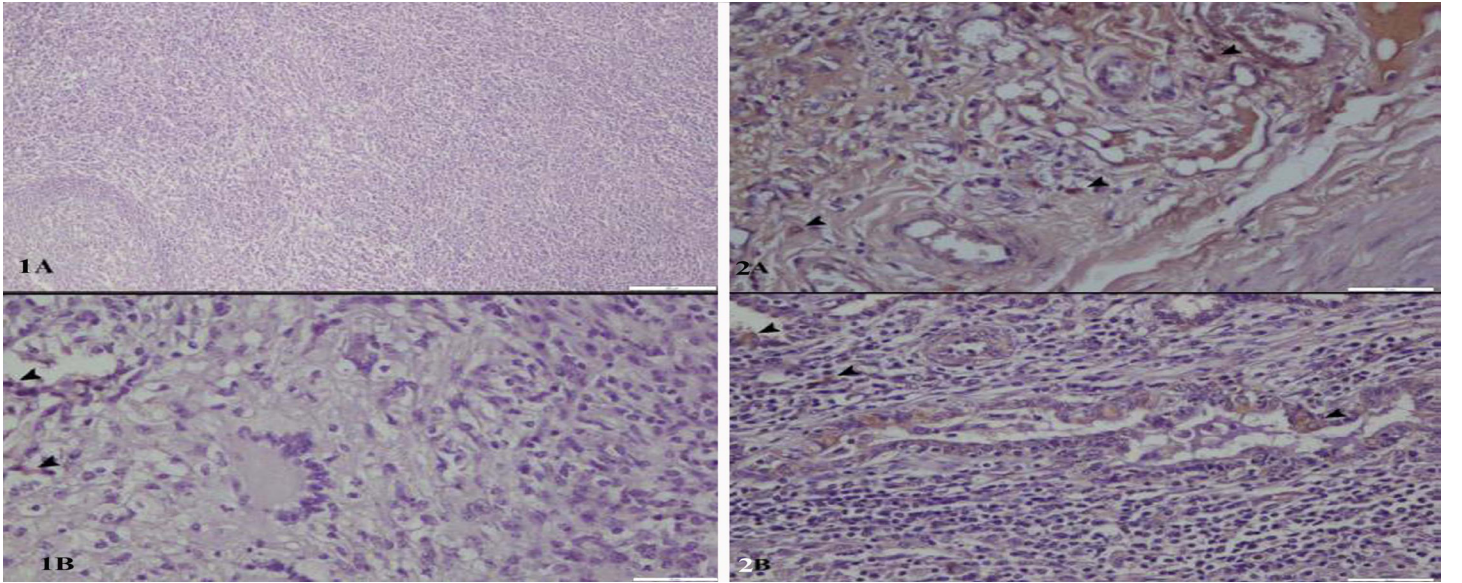
Mikroskobik incelemelerde, kontrol olarak alınan dokularda herhangi bir lezyona rastlanmadı (Şekil 2. 1A, 2A, 3A). Tüberkülozlu akciğer (Şekil 2.1B), karaciğer (Şekil 2.2B) ve lenf düğümlerinde (Şekil 2.3B) ise tipik granülom yapılarına rastlandı.



Şekil 2 1A) Sığır, kontrol grubu, akciğer, normal histolojik görünüm, HE, Bar= 200 µm 1B) Sığır, akciğer, plöra üzerinde şekillenmiş tipik bir tüberkülün yakından görünümü, Langhans tipi dev hücreler (ok başları), HE, Bar=100 µm, 2A) Sığır, kontrol grubu, karaciğer, normal histolojik görünüm, HE, Bar= 100 µm. 2B) Sığır, karaciğer, tüberküllerin görünümü (kırmızı ok başları), Langhans tipi dev hücreler (siyah ok başları), HE, Bar=200 µm. 3A) Sığır, kontrol grubu, mediastinal lenf düğümü, normal histolojik görünüm, HE, Bar= 50 µm, 3B) Sığır, mediastinal lenf düğümü, lenf düğümündeki bir granülomun görünümü, Langhans tipi dev hücreler (siyah ok başları), kazeifikasyon nekrozu (kırmızı ok başı) ve kalsifikasyon alanı (sarı ok başı), HE, Bar=200 µm.



Şekil 3 Farklı organlarda SOD immunoreaktivitesi, ABC-P yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen zemin boyama. 1A) Sığır, kontrol grubu, akciğer, bronşiyoler epitelde hafif pozitif reaksiyon (ok başları), Bar= 200 µm. 1B) Sığır, akciğer, tüberküloz, bronşiyoler epitelde artmış immunoreaktivite (okbaşları), Bar=100 µm. 2A) Sığır, kontrol grubu, karaciğer, normal karaciğer dokusunda negatif immunoreaksiyon, Bar=100 µm. 2B) Sığır, karaciğer, tüberküloz, hepatositlerde artmış pozitif reaksiyon (ok başları), Bar=100 µm. 3A) Sığır, kontrol grubu, mediastinal lenf düğümü, normal lenf düğümünde negatif immunoreaksiyon, Bar=100 µm. 3B) Sığır, mediastinal lenf düğümü, tüberküloz, makrofajlarda (ok başları) ve Langhans tipi dev hücrelerde artmış immunoreaksiyon, Bar=100 µm.



Şekil 4 Farklı organlarda MDA immunoreaktivitesi, ABC-P yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen zemin boyama. 1A) Sığır, kontrol grubu, mediastinal lenf düğümü, normal lenf düğümünde negatif immunoreaksiyon, Bar=200µm. 1B) Sığır, mediastinal lenf düğümü, tüberküloz, lenf düğümündeki lezyonlu bölgede pozitif immunoreaksiyon (ok başları), Bar=50 µm. 2A) Sığır, plöra, tüberküloz, makrofajlarda pozitif immunoreaksiyon (ok başları), Bar=50µm. 2B) Sığır, akciğer, tüberküloz, bronşiyoler epitelde ve yangı hücrelerinde pozitif immunoreaksiyon (ok başları), Bar=50 µm.

Dokularda görülen granülom yapılarının merkezlerinde kalsifikasyon, etrafındaki hücrelerde kazeifikasyon nekrozu ile bunları çevreleyen alanlarda lenfosit, makrofaj, epiteloid hücreler ve Langhans tipi dev hücreleri ve bazı alanlarda fibroblast ve fibrositler gözlemlendi (Şekil 2. 1B, 2B, 3B).

Mikobakterilerin saptanması için lezyonlu alanlardan alınan kesitlerin Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanması ile tüberküloz basilleri mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görüldü.

İmmunohistokimyasal bulgular

SOD immunoreaktivitesi

Sunulan çalışmada, SOD markırı ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin incelenmesinde kontrol grubunda bulunan hayvanlara ait akciğer dokularının sadece bronşiyol epitelinde hafif pozitiflik görüldü (Şekil 3.1A) Kontrol grubunun diğer doku ve organlarında ise SOD markırı ile immunopozitif reaksiyon gözlenmedi (Şekil 3.2A, 3A). SOD immunoreaktivitesinin tüberküloz lezyonu bulunan dokularda

belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Akciğer, karaciğer ve lenf yumrusunda özellikle makrofajlar, epiteloid hücreler ve Langhans tipi dev hücrelerde immunopozitiflik belirgindi (Şekil 3.1B, 2B, 3B). Ayrıca tüberküloz lezyonu bulunan akciğer dokuları, kontrol grubu akciğer dokularıyla karşılaştırıldığında bronşiyollerin epitel hücrelerinde bulunan pozitifliğin belirgin şekilde arttığı dikkati çekti (Şekil 3.1B). Normal karaciğerde saptanmayan SOD aktivitesi tüberkülozlu karaciğerlerde yoğun şekilde gözlemlendi. Karaciğerde granülomlara yakın bölgelerde bulunan hepatositlerde SOD aktivitesinin daha yüksek olduğu, granülomlardan uzak bölgelerindeki hepatositlerde ise SOD aktivitesinin azaldığı saptandı.

MDA immonoreaktivitesi

Kontrol grubundan alınan doku örneklerinde negatif MDA aktivitesi görüldü (Şekil 4.1A). Bununla birlikte, MDA aktivitesinin tüberküloz lezyonlarında arttığı saptandı. Ancak bu artışın hafiften orta şiddette kadar değişen derecelerde olduğu dikkati çekti. Tüberküloz lezyonlarının bulunduğu dokulardaki yangısal hücrelerde, özellikle makrofajlarda immunopozitiflik belirlendi (Şekil 4. 1B, 2A, 2B). Akciğerde lezyonlu bölgedeki bronşiyol epitellerinde de MDA aktivitesinin bulunduğu saptandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüberküloz enfeksiyonda bulaşma ve immun sistem yetersizliği lezyonların şiddeti ve görülme sıklığında önemli kriterlerdendir. İmmun sistemi yeterince gelişmeyen veya ileri yaşlarla beraber immun sistemi zayıflayan hayvanlarda oldukça fazla görülür. Genellikle aerogen ya da alimenter bulaşma gözlenmesine rağmen, süt ve transplasental yolla da bulaşabilmektedir (3,10). Sunulan çalışmada tüberkülin pozitif 97 hayvandan 49 tanesinde makroskopik ve mikroskopik lezyonlara rastlanmıştır. Lezyonlara rastlanan hayvanların genellikle çok genç ya da çok yaşlı hayvanlarda görülmesi hastalığın immun sistem yetersizliği durumlarında şiddetli lezyonlar görülmesini doğrular nitelikteydi. Bununla birlikte 2 yaşın altındaki hayvanlarda sıklıkla görülmesi bulaşmanın transplasental ya da süt yoluyla oldukça etkin bir biçimde olduğunu, enfekte hayvan sütlerinin ciddi bir bulaşma yolu olduğunu ön plana çıkarmakta ve insan sağlığı için ne kadar büyük bir tehlike olduğunu vurgulamaktadır. Holstein ırkı sığırlarda daha fazla görülmesinin nedeninin ise Türkiye’de süt sığırnı yetiştiriciliğinde çoğunlukla holstein ırkı sığırların tercih edilmesine bağlanmıştır.

Sığır tüberkülozunun teşhisinin doğru yapılması ve kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi için patogenezin tam olarak anlaşılması önemli bir noktadır (35). Günümüzde sığır tüberkülozunun antemortem teşhisi amacıyla PPD ve IFN- γ testleri kullanılmakta olup (18), bu testlerin duyarlılık ve spesifitelerinin kesin tanıya götürmediği bildirilmektedir (36). Ülkemizde ve birçok ülkede intradermal tüberkülin testi ile reaktif hayvanların kesilmesi suretiyle başarılı bir sığır tüberkülozu kontrolü sağlanmaktadır. Buna karşın bazı araştırmacılar bu kontrol yönteminin yetersiz kaldığını ve yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini düşünmektedirler (35). Sunulan çalışmada sığır tüberkülozunun patogenezinin anlaşılması amacıyla SOD ve MDA aktiviteleri tüberküloz lezyonlarında immunohistokimyasal olarak incelenmiş ve sığır

tüberkülozunun patogenezinde bu markırların etkisi araştırılmıştır.

Yapılan çalışmaların birçoğunda sığır tüberkülozunun en fazla akciğer dokusunu ve onu drene eden mediastinal lenf yumrularını etkilediği bildirilmiş olup (1,37,38), sunulan çalışmada da materyal olarak kullanılan tüm hayvanların akciğer ve mediastinal lenf yumrularında tüberküloz lezyonları saptanmıştır. Bu bulgu önceki çalışmalar ile uyumlu bulunmuş ve solunum yolu ile şekillenen hastalığın en sık akciğerleri etkilediğini göstermiştir. Çalışmada ayrıca karaciğer ve dalakta da lezyonlara rastlanmıştır. Bir olgumuzda ise kalp dokusunda tüberküloz lezyonu görülmüştür. Bu da hastalığın kronikleştikçe birçok doku ve organda lezyon oluşturma kapasitesini ortaya koymuştur.

Sığır tüberkülozunda serum veya doku MDA seviyelerinin biyokimyasal seviyeleri hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Palanisamy ve ark. (39), *Mycobacterium tuberculosis* ile deneysel enfekte kobayların akciğer dokularında MDA varlığını immunohistokimyasal olarak incelemişler ve sağlıklı hayvanlardaki çok zayıf veya negatif sonuçlara karşın, MDA varlığının en fazla granülomların olduğu bölgelerdeki makrofajlar, damar endotel hücreleri ve granüositlerde görüldüğünü bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, kontrol grubu sağlıklı hayvanların dokularında herhangi bir MDA aktivitesi görülmesine rağmen, lezyonlu dokularda, granülom yapısında bulunan makrofajlarda ve yangısal hücrelerde belirgin şekilde artmış immunopozitiflik görülmüş ve yapılan önceki çalışma ile paralellik saptanmıştır. MDA seviyesinin enfekte hayvanların dokularında artışının konakçının immun sisteminin etkeni yok etmek amacıyla immun hücrelerinin üretmiş oldukları ROS’lar sebebiyle olduğu düşünülmektedir. MDA’nın özellikle tüberküloz tespit edilen sürülerde diğer hayvanların da enfekte olup olmadıklarının tespitinde bir kriter olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konunun kesinleştirilmesi için tüberkülozlu sığırlarda serum ve doku MDA aktivitesinin birlikte inceleneceği çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Sunulan çalışmada, MDA’nın sığır tüberkülozunun patogenezinde etkili olduğunu gösteren öncü bir çalışma olarak değerlendirilmektedir.

Pek çok aerobik organizma normal metabolizma ve stres durumlarında süperoksit, H₂O₂ ve hidroksil radikalleri gibi ROS’lara maruz kalmaktadır. Canlıların ROS’lara karşı kompleks savunma ve tamir sistemleri bulunmaktadır. SOD, süperoksit anyonunu aktif bölgesinde içerdiği metal iyonu ile katalize ederek oksijen ve H₂O₂’ye çeviren, oksidatif savunma sisteminin önemli bir enzimidir (40,41,42). Lakari ve ark. (33), normal akciğer dokusunda bulunan bronşiyollerde CuZn-SOD’a karşı immunopozitiflik saptandığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da normal akciğer dokularında bronşiyol epitellerinde hafiften orta şiddette SOD immunopozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Kontrol grubuna ait sağlıklı karaciğer ve lenf dokularında ise SOD negatif immunoreaksiyonlar mevcuttu. Bununla birlikte tüberküloz lezyonlu dokularda SOD aktivitesinin artmış olduğu ve bu aktivitenin Langhans tipi dev hücreler, epiteloid hücreler ve makrofajların bulunduğu alanlarda yoğunlaştığı tespit edildi. Böylece sağlıklı akciğer dokusundaki bronşiyollerde gözlenen immunopozitifliğin, tüberkülozlu akciğer dokusundaki bronşiyollerde belirgin şekilde arttığı da

gözlendi. Yine bu çalışmada granülomlarda yoğun immunopozitifliğin varlığı dikkati çekmiştir. Dokularda oluşan lezyonlara yakın bölgelerdeki parankim hücrelerinde immunopozitifliğin daha fazla olduğu ve sağlam doku ve hücrelerin lezyondan uzaklaştıkça aktivitelerinin azaldığı gözlendi. Bu çalışma sonucu dokularda gözlenen artmış SOD aktivitesinin immun sistem hücreleri tarafından salgılanan ROS'ların zararlı etkilerini kompanze etmek amacıyla şekillendiği düşünülmüştür. Bu çalışma sığır tüberkülozunun patogeneğinde SOD'ın önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Hastalığın klinik tanısında SOD'ın kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yapılan literatür taramaları ışığında günümüze kadar sığır tüberkülozunun patogeneğinin tam olarak anlaşılmadığı görülmektedir. Bu çalışma ile SOD ve MDA aktivitelerinin tüberküloz lezyonu bulunan dokuların parankiminde ve yangı hücrelerinde immunohistokimyasal olarak arttığı görülmüş ve sığır tüberkülozunun patogeneğinde ROT'nin önemli bir rolü olduğu ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Francis J. Tuberculosis in Animals and Man: A study in Comparative Pathology. 13th ed. London: Cassel and Co.; 1958. p. 357.
2. Steele JH, Ranney AF. Animal tuberculosis. Am Rev Tuberc. 1958; 77:908-922.
3. Özbey Ö, Kalender H, Muz A. Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. FÜ Sağ Bil Derg. 2008; 22:307-314.
4. Feng Z, Hu W, Marnett LJ, Tang M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. Mutat Res. 2006; 601:125-136.
5. Gök M, Yapıcı İ, Uzun K, Erdem S, Ünlü A, Büyükbaş S. Aktif tüberküloz hastalarında total antioksidan kapasitesi ve malondialdehit (MDA) seviyeleri. TAD. 2006; 4:22-24.
6. Kaklıkkaya İ, Menteşe Ü, Koramaz İ, Altun G, Menteşe A, Çakıroğlu Y et al. Deneysel iskemi reperfüzyon modelinde, etil pirüvat uygulamasının sonuçları. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 18:310-314.
7. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Anal Biochem. 1971; 44:276-287.
8. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). Free Radic Biol Med. 1988; 5:363-369.
9. Lavelle F, McAdam ME, Fielden EM, Roberts PB. A pulse-radiolysis study of the catalytic mechanism of the iron-containing superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi*. Biochem J. 1977; 161:3-11.
10. Milli ÜH, Hazıroğlu R. Tüberküloz. Veteriner Patoloji, 2. baskı. Medipres, Malatya. 2001; 87-97.
11. Karlson AG, Lessel EF. Mycobacterium bovis nom. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 1970; 20:273-282.
12. Barry CE III, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Prog Lipid Res. 1998; 37:143-179.
13. Gürel A. Tüberkülozis. <http://www.vetder.org/tuberculosis.html>. 2014. Erişim tarihi: 07.12.2014.
14. Puri RV, Reddy PV, Tyagi AK. Secreted Acid Phosphatase (SapM) of Mycobacterium tuberculosis Is Indispensable for Arresting Phagosomal Maturation and Growth of the Pathogen in Guinea Pig Tissues. Plos one. 2013; 8: 1-12.
15. Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary Pathology. 6th ed. Maryland: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p: 490-497.
16. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol. 1994; 40: 153-177.
17. Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M. Sığırlarda Tüberküloz ve Diğer Granüloamatöz Pnömoniler Üzerine Patolojik İncelemeler. Vet Bil Derg. 1998; 14: 139-150.
18. Sayın Z, Erganiş O. Sığır Tüberkülozunun Teşhisinde Kullanılan Metotlar. Kocatepe Vet Derg. 2010; 3: 77-82.
19. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem. 1997; 43: 1209-1214.
20. Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2004; 3: 519-522.
21. Bartsch H. Keynote address: exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. IARC Sci Publ. 1999; 150: 1-16.
22. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med. 1991; 11: 81-128.
23. Kaçmaz A, Polat A, User Y, Tilki M, Özkan S, Şener G. Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. J Gastrointest Surg. 2004; 8: 113-119.
24. Suhail M, Suhail S, Gupta BK, Bharat V. Malondialdehyde and Antioxidant Enzymes in Maternal and Cord Blood, and their Correlation in Normotensive and Preeclamptic Women. J Clin Med Res. 2009; 1: 150-157.
25. Fridovich I. Superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1975; 44: 147-159.
26. Mann T, Keilin D. Haemocuprein and Hepatocuprein, Copper-Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals. Proc Roy Soc. 1938; 126: 303-315.
27. Akkuş I (1995): Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza yayınları; 1995. p. 38.
28. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997; 82: 291-295.
29. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. J of Bot. 2012; 1-26.
30. Özel GSK, Birdane YO (2014): Antioksidanlar. Kocatepe Vet J. 2014; 7: 41-52.
31. Beaman, L. Beaman, BL. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within intact host. Infect Immunol. 1990; 58: 3122-3128.
32. Gutteridge, J. M. C. (1977). The protective action of superoxide dismutase on metal-ion catalysed peroxidation of phospholipids. Biochemical and Biophysical Research Com-

- munications, 77(1), 379–386.
33. Lakari E. Expression of oxidant and antioxidant enzymes in human lung and interstitial lung diseases. Oulu Uni Press, 2002; 1-86.
34. Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry: The Red, Brown, and Blue Technique. Vet Pathol. 2014; 5: 42-87.
35. Andersen, P., Munk, M., Pollock, J., & Doherty, T. (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. The Lancet, 356(9235), 1099–1104.
36. Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, Lopez L, Rueda P, Dominguez L. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014; 97: 544-552.
37. Beytut E. Kars İli ve Yöresinde Sığırlarda Tüberküloz İnsidensi ve Lezyonların Lokalizasyonu Üzerine Patolojik İncelemeler. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2001; 7: 15-25.
38. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol. 1994; 40: 153-177.
39. Palanisamy GS, Kirk NM, Ackart DF, Shanley CA, Orme IM, Basaraba RJ. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. PLoS One. 2011; 6: e26254.
40. Kanth BK, Oh T, Sohng JK. Identification of two superoxide dismutases (FeSOD and NiSOD) from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. Biotech and Bioproc E. 2010;15: 785-792.
41. Gassó D, Vicente J, Mentaberre G, Soriguer R, Rodriguez RJ, Navarro-González N, Tvarijonaviciute A, Lavín S, Fernández-Llario P, Segalés J, Serrano E. Oxidative stress in wild boars naturally and experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *PloS one*, 2016; 11(9), e0163971.
42. Wu T, Bai H, Zhao Z, Wang M, Hu X, Jiao L, Wu Q, Liu T, Zhang C, Chen H, Zhang J, Song J, Wu L, Zhou W, Tong C, Ying B. A prospective study on associations between superoxide dismutase gene polymorphisms and antituberculosis drug-induced liver injury in a Chinese Han population. The Journal of Gene Medicine, 2019; 21(10), e3121.