

## RUMİNANTLARIN ERİTROSİT ANTİOKSİDAN ENZİM VE PLAZMA LİPİD PEROKSİDASYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE TÜR VE CİNSİYETİN ETKİLERİ\*

Sema YARALIOĞLU

Necmi ÖZDEMİR

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 06.04.2001

**The Effects of Species and Sexes on Erythrocytes Antioxidants Enzymes and Plasma Lipid Peroxidation Levels of Ruminants**

### Summary

This study was performed to determine the effects of species and sexes on antioxidant enzymes of erythrocyte and lipid peroxidation of plasma in ruminants. In the present study, the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) that play role in the free radical metabolism in erythrocytes, and plasma MDA levels of clinically and postmortem healthy ruminants being bred in Elazığ province were measured.

Compared between species and inside species, it was found that species and sexes of animals have effect on these parameters in different degrees. Cattle had the greatest CAT ( $96.22 \pm 2.16 \times 10^4$  U/g Hb) activity, whereas goats had the greatest MDA ( $3.54 \pm 0.12$  nmol/plasma) plasma concentration.

In comparison of male and female, erythrocyte activity in cattle was higher in males, whereas erythrocyte CAT activity was found to be greater in females. Female goats had significantly higher GSH-Px and CAT activities. Erythrocyte CAT activity of rams was greater than other sex.

Discrepancy of antioxidant levels between species and sexes may depend on to the differentiation in oxidant damage mechanism of cattles, sheep and goats or existence other endogen antioxidant in these animals.

**Key Words:** Ruminant, species, sex, glutathione peroxidase, catalase, lipid peroxidation, erythrocyte.

### Özet

Bu araştırma, tür ile cinsiyet faktörlerinin ruminantların eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri ve plazma lipid peroksidasyon düzeyi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Araştırmada Elazığ ili ve çevresinde yetiştirilen, klinik ve postmortem muayene sonrası sağlıklı olduğu anlaşılan ruminantların eritrositlerinde serbest radikal metabolizmasında rol alan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile plazma malondialdehid (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Türler arasında ve tür içinde yapılan karşılaştırmalarda söz konusu parametrelere bağlı olarak değişmekle birlikte, tür ve cinsiyetin farklı derecelerde etkili olduğu anlaşıldı. En yüksek eritrosit CAT aktivitesi ( $96.22 \pm 2.16 \times 10^4$  U/gHb) sığırlarda, en yüksek plazma MDA düzeyi ise ( $3.54 \pm 0,12$  nmol/ml plazma) keçilerde saptandı.

Erkek ve dişiler arasında yapılan karşılaştırmalarda, erkek sığırlarda, eritrosit GSH-Px aktivitesi ( $54.81 \pm 2.93$  U/g Hb), dişi sığırlarda ise eritrosit CAT ( $102.82 \pm 2.96 \times 10^4$  U/g Hb) aktivitesi daha yüksek bulundu. Özellikle keçi türünün dişilerinde, hem GSH-Px ( $58.5 \pm 2.27$  U/g Hb) hem de CAT ( $78.69 \pm 3.98 \times 10^4$  U/g Hb) aktivitelerinin erkeklere göre istatistik olarak önemli derecede yüksek olduğu saptandı. Eritrosit CAT ( $68.71 \pm 1.83 \times 10^4$  U/g Hb) aktivitesi dişilere göre erkek koyunlarda daha yüksek bulundu.

Türler ve cinsiyetler arasında, antioksidan enzim düzeylerinde meydana gelen farklılığın sorumlusunun, sığır, koyun ve keçilerdeki farklı oksidan hasar mekanizmaları ya da bunlardaki diğer endojen antioksidanların olabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Ruminant, tür, cinsiyet, glutatyon peroksidaz, katalaz, lipid peroksidasyon, eritrosit.

\* Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜNAP (Proje No: 259) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

Memeli hücreleri, enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleriyle serbest radikallere karşı korunmaktadır (4,5,13). Birincil antioksidan enzimler,  $H_2O_2$ 'in,  $H_2O$ 'ya ve  $O_2$ 'e parçalanmasını katalize eden katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9)'dır (6,8,12,14,18).

Membran lipidleri, serbest oksijen radikalleri ile oluşturulan hücre hasarı için en çekici hedeflerdir. Serbest oksijen radikallerinin, hücre membranlarındaki poliansature yağ asitlerine saldırması, lipid peroksidlerinin üretimine yol açan lipid radikallerinin oluşumuna sebep olmaktadır (9,11,16).

Lipit peroksidasyonundaki artış, serbest radikallerin dolaylı bir göstergesidir (11,16).

Yapılan literatür taramalarında klinik olarak sağlıklı ruminantlarda eritrosit antioksidan enzimlerine ve lipid peroksidasyonuna ilişkin fazlaca yayına rastlanılmamıştır. Bu noktadan hareketle çalışmada, sağlıklı ruminantlarda eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ile plazma malondialdehid (MDA) düzeylerinin belirlenmesi ve tür ile cinsiyet faktörlerinin söz konusu parametrelere olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırma materyali Elazığ ELET Tesislerine kesim için getirilen, klinik ve postmortem muayene sonrası sağlıklı oldukları anlaşılan sığır, koyun ve keçilerin erkek ve dişilerinden (her enzime göre farklı sayıda hayvanlar) oluştu. V. jugularisden

alınan kan örnekleri GSH-Px tayini için EDTA'lı tüplerde, CAT tayini için heparinli tüplerde toplandı ve en kısa zamanda laboratuvara getirilip analizler için hazırlandı. Kanların santrifüj edilmesiyle elde edilen heparinli plazmalarda en geç 3 gün içerisinde MDA düzeylerine bakıldı. Eritrosit GSH-Px ve CAT aktivite ölçümleri Beutler (2) yöntemiyle, plazma MDA düzeyinin ölçümü Satoh (22) ve Yagi (24)'den modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak yapıldı.

Bu çalışmadaki bütün istatistik analizler, SPSS istatistik programı ile yapıldı. Araştırmada öngörülen parametreler bakımından yapılan karşılaştırmalarda Varyans Analizi kullanıldı. Analiz sonrası önemli çıkan parametreler için, gruplar arasındaki farklılıklar Duncan Testi ile ortaya konmaya çalışıldı. Söz konusu parametreler için, türlerin ayrı ayrı cinsiyete göre karşılaştırılmalarında Student-t Testi'nden yararlanıldı (7).

## Bulgular

Elde edilen bulgular türler arasındaki ve tür içindeki ilişkiler olmak üzere iki bölümde verilmiştir. Sığır, koyun ve keçilerin eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ile plazma MDA düzeyleri bakımından türler arası karşılaştırmalar Tablo 1-3'de, aynı parametreler bakımından tür içi erkek ve dişiler arasındaki karşılaştırmaları ise Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Tablo 7'de de aynı hayvanlardaki bu parametrelerin minimum ve maksimum sınırları verilmiştir.

Tablo 1 : Erkek sığır, koyun ve keçilerde eritrosit GSH-Px(U/gHb) ve CAT ( $1 \times 10^4$ U/gHb) aktiviteleri ve plazma ve MDA (nmol/ml plazma) düzeyleri ile üç grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	GSH-Px(U/gHb)			CAT ( $1 \times 10^4$ U/g Hb )			MDA(nmol/ml)		
	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$
Sığır	30	54.81	2.93 <sup>a</sup>	30	89.72	2.69 <sup>a</sup>	30	3.01	0.10 <sup>b</sup>
Koyun	38	48.09	3.94 <sup>a</sup>	41	68.71	1.83 <sup>b</sup>	39	2.57	0.07 <sup>c</sup>
Keçi	40	35.84	3.23 <sup>b</sup>	30	53.47	4.10 <sup>c</sup>	33	3.46	0.17 <sup>a</sup>
F		7.588			36.947			15.275	
P		***			***			***	

\*\*\* : p<0.001

a, b, c : Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Dişi sığır, koyun ve keçilerde eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyleri ile üç grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	GSH-Px(U/gHb)			CAT(1x10 <sup>4</sup> U/gHb)			MDA(nmol/ml)		
	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$
Sığır	30	43.10	1.96 <sup>b</sup>	30	102.82	2.96 <sup>a</sup>	30	2.91	0.14 <sup>b</sup>
Koyun	36	42.49	2.57 <sup>b</sup>	47	42.47	2.48 <sup>c</sup>	43	2.44	0.14 <sup>c</sup>
Keçi	30	58.50	2.27 <sup>a</sup>	59	78.69	3.98 <sup>b</sup>	43	3.61	0.16 <sup>a</sup>
F		14.732			63.553			16.503	
P		***			***			***	

\*\*\* : p&lt;0.001

a, b, c : Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 3. Sığır, koyun ve keçilerde eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyleri ile üç grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	GSH-Px (U/gHb)			CAT(1x10 <sup>4</sup> U/gHb)			MDA(nmol/ml)		
	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$
Sığır	60	48.96	1.91	60	96.22	2.16	60	2.96	0.09
Koyun	74	45.37	2.38	88	54.70	2.10	82	2.50	0.08
Keçi	70	45.56	2.47	89	70.19	3.23	76	3.54	0.12
F		0.713			54.656			31.04	
P		-			***			***	

- : Önemli değil \*\*\* : p&lt;0.001

a, b, c : Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 4. Erkek ve dişi sığırlarda, eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyleri ile iki grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	Cinsiyet						t	P
	Erkek			Dişi				
	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$		
GSH-Px (U/gHb)	30	54.81	2.93	30	43.1	1.96	3.33	***
CAT (1x10 <sup>4</sup> U/gHb)	30	89.72	2.69	30	102.82	2.96	-3.24	***
MDA (nmol/ml)	30	3.01	0.1	30	2.91	0.14	0.61	-

- : Önemli değil \*\*\* : p&lt;0.001

Tablo 5. Erkek ve dişi koyunlarda, eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyleri ile iki grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	Cinsiyet						t	P
	Erkek			Dişi				
	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$		
GSH-Px (U/gHb)	38	48.09	3.94	36	42.49	2.57	1.19	-
CAT (1x10 <sup>4</sup> U/gHb)	41	68.71	1.83	47	42.47	2.48	8.5	***
MDA (nmol/ml)	39	2.57	0.07	43	2.44	0.14	0.84	-

- : Önemli Değil \*\*\* : p&lt;0.001

Tablo 6. Erkek ve dişi keçilerde, eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyleri ile iki grup arasındaki farkın istatistik önem kontrolü

	Cinsiyet						t	P
	Erkek			Dişi				
	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$		
GSH-Px (U/gHb)	40	35.84	3.23	30	58.5	2.27	-5.74	***
CAT ( $1 \times 10^4$ U/gHb)	30	53.47	4.1	59	78.69	3.98	-4.42	***
MDA (nmol/ml)	33	3.47	0.17	43	3.61	0.16	-0.61	-

- : Önemli değil \*\*\* :  $p < 0.001$

Tablo 7. Sığır, koyun ve keçilerin eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri ve plazma MDA düzeyinin cinsiyetlere göre sınırları

	Sığır				Koyun				Keçi			
	Erkek		Dişi		Erkek		Dişi		Erkek		Dişi	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
GSH-Px (U/gHb)	21.7	88.3	26.9	69.3	16	105	20.1	81.5	14	81.1	33	74.5
CAT ( $1 \times 10^4$ U/gHb)	57.9	119	53.9	139	48.6	107	10.9	86.5	24.9	150	20	128
MDA (nmol/ml)	1.99	3.98	1.4	4.06	1.92	3.39	1.4	4.5	1.03	4.94	1.99	5.84

### Tartışma

Antioksidan durumun belirlenmesi, hastalıkların etiyolojisinin araştırılmasında ve koruyucu hekimlikte önem taşımaktadır.

Samson ve ark. (21) Ram ve Allan dağı yabani koyunlarında, veteriner laboratuvarındaki ve hayvanat bahçesindeki evcil koyunlarda, Alberta bölgesi keçilerinde, evcil ve yabani dağ keçilerinde ve evcil ineklerde GSH-Px enzim aktivitelerini rapor etmişler ve GSH-Px aktivitesinin minimum ve maksimum değerlerini yabani Ram dağı koyunlarında 6.03-31.84 U/g Hb, Allan dağı koyunlarında 18.66-54.43 U/g Hb, Veteriner laboratuvarı evcil koyunlarında 47.10-56.76 U/g Hb, hayvanat bahçesi koyunlarında 15.14-37.27 U/g Hb, Alberta bölgesi keçilerinde 18.00-51.00 U/g Hb, yabani keçilerde 12.40-124.30 U/g Hb, evcil keçilerde 165-220.00 U/g Hb ve evcil ineklerde 9.00-66.00 U/g Hb olarak bildirmişlerdir.

Çeşitli yazarlarca (1,17,23) eritrosit GSH-Px aktivitesi buzağılarda 20-50 U/g Hb, koyunlarda 48-68 U/g Hb, sığırlarda  $75.62 \pm 4.62$  U/g Hb düzeyinde rapor edilmiştir.

Sunulan çalışmada, sığır, koyun ve keçilerin erkek ve dişilerinde ortalama eritrosit GSH-Px aktiviteleri sırasıyla  $54.81 \pm 2.93$  (21.73-88.27) U/g Hb,  $43.10 \pm 1.96$  (26.89-69.25) U/g Hb ve  $48.09 \pm 3.94$  (16-104.5) U/g Hb,  $42.49 \pm 2.57$  (20.1-81.5) U/g Hb ve  $35.84 \pm 3.23$  (13.97-81.13) U/g Hb,  $58.50 \pm 2.27$  (32.95-74.49) U/g Hb bulunmuştur (Tablo 1,2,3). Elde edilen verilerin yukarıdaki sonuçlarla

uyumlu olduğu görülmektedir. Düşük düzeylerdeki farklılıkların nedeni ise, büyük ihtimalle her laboratuvar tarafından farklı bir ölçüm metodunun kullanılması ile ilişkilidir.

Araştırmada, eritrosit GSH-Px aktivitesinin tür ve cinsiyet faktöründen etkilendiği ve en yüksek eritrosit GSH-Px düzeylerinin dişi keçilerde bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Gaal ve ark. (10) Merinos koyunlarında, CAT bazal değerini  $68.15 \pm 4.09$  U/gHb olarak bildirmişlerdir. Tablo 5 incelendiğinde koyun için bulunan eritrosit CAT aktivitelerinin, Merinos koyunlarındaki bazal CAT değeri ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Eritrosit CAT aktivitesi, sığırların erkek ve dişilerinde sırasıyla  $89.72 \pm 2.69$  (57.89-119.1) U/gHb ve  $102.82 \pm 2.96$  (53.89-138.5) U/gHb, keçilerin erkek ve dişilerinde sırasıyla  $53.47 \pm 4.10$  (24.85-149.9) U/gHb ve  $78.69 \pm 3.98$  (20.03-128) U/gHb saptanmıştır (Tablo 5). Ancak sığır ve keçi türleri için normal değerlerle ilgili literatürlere rastlanamamış ve bu nedenle saptanan verileri karşılaştırma olanağı bulunamamıştır.

Sunulan çalışmada eritrosit CAT aktivitesinin tür ve cinsiyet faktöründen etkilendiği ve en yüksek aktivitenin dişi sığırlarda bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 7).

Yüksek plazma MDA düzeyinin, membran lipid peroksidasyonundaki artışla veya antioksidan savunma sisteminin zayıflamasıyla ilgili olduğu kaydedilmiştir (11,19). Tavşanlar üzerinde yapılan

bir çalışmada (3), ortalama MDA düzeyi  $3.29 \pm 0.39$  nmol/ml, kontrol grubu ratlarda (15) eritrosit MDA düzeyi  $1.71 \pm 0.37$  nmol MDA/g Hb, Merinos koyunlarında yapılan diğer bir çalışmada (10) ortalama bazal plazma MDA değerleri  $1.49 \pm 0.11$  nmol/ml bildirilmiştir.

Çalışmada sığır, koyun ve keçilerin erkek ve dişilerinde plazma MDA düzeyleri sırasıyla  $3.01 \pm 0.1$  (1.99-3.98) nmol/ml,  $2.91 \pm 0.14$  (1.4-4.06) nmol/ml ve  $2.57 \pm 0.07$  (1.92-3.39) nmol/ml,  $2.44 \pm 0.14$  (1.4-4.5) nmol/ml ve  $3.46 \pm 0.17$  (1.03-4.94) nmol/ml. Koyunlarda elde edilen bulgu literatür (10) bildirimini desteklemiştir. Ama sığır ve keçi türleri için normal değerlerle ilgili literatür verilerine rastlanamadığı için elde edilen verileri karşılaştırma imkanı bulunamamıştır.

Sunulan çalışmada, plazma MDA düzeylerinin tür faktöründen etkilenirken cinsiyet faktöründen etkilenmediği ve en yüksek plazma MDA düzeylerinin dişi keçilerde bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Antioksidan sistemlerin tür, organ ve cinsiyet faktörlerinden etkilendiği bilinmektedir (20).

#### Kaynaklar

1. Allen JG, Steele P, Masters HG. et al. A Study of Nutritional Myopathy in Weaner Sheep. Australian Veterinary Journal 1986; 63 (1) January.
2. Beutler E. A manual of Biochemical Methods. 2<sup>nd</sup> Ed. Grunef Strottan. New York, 1975.
3. Bildik A, Ertekin E, Yur F ve ark. Karbon tetraklorür toksikasyonunun lipid peroksidasyonu, glutatyon ve vitamin C üzerine etkileri. YYÜ Vet Fak Derg 1997; 8, 1-2: 6-8.
4. Bors W, Saran M, Czapski G. In: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. NY Elsevier/ North Holland 1980.
5. Buchanan JD, Armstrong DA. The radiolysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Int J Radiat Biol 1978; 33: 409.
6. Demple B and Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annu Rev Biochem 1994; 63: 915-948.
7. Düzgüneş O, Kesici T ve Gürbüz F. İstatistik Metotları I AÜ Ziraat Fak Yayınları No: 861 Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara, 1983.
8. Flohe L, Günzler WA and Schock HH. Glutathione Peroxidase: A Selenoenzyme. FEBS Letter 1973; 32: 132-134.
9. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 9748-9752.
10. Gaal T, Mezes M and Miskuczka O. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep. Research in Veterinary Science 1993; 55:104-107.
11. Gutteridge JMC and Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990; 15: 129-135.
12. Halliwell B and Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Clarendon Press. Oxford, 1989.
13. Holovska K, Lenortova V, Pedrejas JR et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in sheep organs. Comp Biochem Physiol 1996; 115 (4): 451-456.
14. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri 1989; 9 (1): 1-8.

15. Köse K, Doğan P ve Saraymen R. Lipid peroxidation in erythrocyte membranes of whole blood stored for transfusional use. *Tr J Medical Science* 1994; 20: 119-120.
16. Mansuy D, Dansette MP and Plat M. A new potent inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. the hepatoprotective drug anisylidithiolthione. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1986; 135 (3): 1015-1021.
17. Ozan ST, Yaralıoğlu S, Yılmaz S ve ark. *Theileria annulata* ile enfekte sığırlarda GSH-Px, G6PD, arginaz aktiviteleri ile bazı biyokimyasal parametreler. *Tr J Vet Anim Sci* 1999; 23 Ek Sayı 3: 553-557.
18. Pehrson B. Selenium-dependent and non-selenium dependent glutathione peroxidase activity in tissues from young bulls. *Zbl Vet Med A* 1985; 32: 488-491.
19. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105: 273-282.
20. Prohaska JR, Sunde RA. Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mna in female and male mice and rats. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105: 111-116.
21. Samson J, Jargenson JT and Wishard WD. Glutathione peroxidase activity and selenium levels in rocky mountain bighorn sheep and mountain goats. *Can J Zool* 1988; 67: 2493-2496.
22. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
23. Scholz RW, Todhunter DA, Cook LS. Selenium content and glutathione peroxidase activity in tissues of young cattle fed supplemented whole milk diets. *American Journal of Veterinary Research* 1981; 42 (10): 1718-1723.
24. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymol* 1984; 105: 328-31.