

Trikofitozisli ineklerde serum adenozin deaminaz aktivitesi (ADA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri

Sena ÇENESİZ¹, Cevat NİSBET¹, Gül Fatma YARIM¹, Handan Hilal ARSLAN², Alper ÇİFTÇİ³

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun; ²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun; ³Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Samsun.

Özet: Bu çalışmada trikofitozisli ineklerde serum adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinin ve nitrik oksit (NO) seviyesinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Çalışmada 1-3 yaşlarında, ortalama 250 kg canlı ağırlığında trikofitozisli olduğu belirlenen 30 adet yerli ırk sığır ile 10 adet sağlıklı yerli ırk sığır kullanıldı. Hayvanların vena jugularisinden kan alınarak serumları çıkartıldı. Serumda ADA aktivitesi ve NO düzeyi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Serum ADA aktivitesi kontrol ve trikofitozisli sığırlarda sırasıyla 12.70 U/L ve 24.49 U/L olarak tespit edildi. ADA aktivitesinde gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.001$). NO düzeyleri ise kontrol ve trikofitozisli sığırlarda sırasıyla 34.24 $\mu\text{mol/L}$ ve 36.17 $\mu\text{mol/L}$ ölçüldü. Kontrol ile hastalıklı grup arasında NO değerleri bakımından istatistiki anlamda bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Sonuç olarak serum ADA aktivitesinin *T.verricosum* tarafından hücre aracılı immun sistemin uyarılması sayesinde artmış olabileceği düşünüldü. Buna karşın araştırma grubunda kontrole göre serum NO seviyesinin ortalamasında relatif olmayan bir artış gözlemlendi. Bu artış, makrofajlardaki iNOS salınımının ve NO üretiminin yeni başlamış olabileceğini düşündürdü.

Anahtar sözcükler: Adenozin deaminaz, nitrik oksit, trikofitozis

Serum adenosine diaminase activity and nitric oxide level in cows with trichophytosis

Summary: Trichophytosis which caused by Trichophyton spp. is an enzootic skin disease. In this study, effects of trichophytosis on serum adenosine deaminase (ADA) and nitric oxide (NO) activities were investigated. Thirty cattles with trichophytosis and 10 healthy cattles were used in the study. Average ages of the cattle were 1-3 and average body weight was 250 kg. Blood samples were taken from vena jugularis of the animals. Serum ADA activities and NO levels were detected with spectrophotometric method. Serum ADA activities were detected 12.70 U/L and 24.49 U/L in research and control groups respectively. Statistically difference was important between two groups ($p<0.001$). NO levels were determined 34.24 $\mu\text{mol/L}$ and 36.17 $\mu\text{mol/L}$ in research and control groups respectively. However, no significant statistically change was determined in this parameter between two groups ($p>0.05$). Consequently, we thought that, serum ADA levels might be increased by cell mediated immune system which was stimulated by *T. verrucosum*. Although, NO levels were monitored slightly increase in research group. We thought that, this increase related to newly iNOS release and NO producing in macrophages.

Key words: Adenosine deaminase, nitric oxide, trichophytosis.

Giriş

Trikofitozis, sığırlarda, epitel tabakasının keratinize olarak kalınlaşması ve kılların enfekte olarak dökülmesiyle karakterize olan bulaşıcı bir dermatomikozistir (18). Dünyanın her yerinde yaygın olarak görülen dermatofitozisin gelişmesinde en önemli faktörler bireysel farklılık, ırk predispozisyonu ve çevresel koşullardır. İnfeksiyonun oluşumunda fungal sporların alınması, hayvanlar arası temas ve enfekte materyaller önemlidir. Hastalığın diğer hayvanlar, insanlar ve çevreye bulaştırılmasında ise klinik olarak hasta ve asemptomatik hayvanlar önemli rol oynamaktadır (12,26). Genç, zayıf ve immun sistemi baskılanmış hayvanlar hastalığa daha fazla yatkınlık göstermektedirler (4). Trikofitozis tespit edilen sığırlarda

gözlenen belirgin klinik lezyonlar yaygın alopesi, kalınlaşmış, kılsız deri bölgeleridir (28).

Adenozindeaminaz (ADA) pürin nükleotid katabolizmasında, inozin ve deoksiinozini irreversibl olarak adenozin ve deoksiadenozine çeviren bir enzimdir (ADA, EC 3.5.4.4). ADA bütün memeli hücrelerinde, özellikle de lenfoid hücrelerde lenfositlerin proliferasyonu ve differansiasyonunda rol oynamaktadır (7,14). ADA'nın eritrosit ve lenfositlerde yokluğu şiddetli kombine immun yetersizliğe (SCID) sebep olur. Bu enzimin inhibisyonu lenfositler ile diğer immun hücrelerin olgunlaşmasını ve fonksiyonunu zayıflatır, ayrıca monosit ve makrofajlar hücre içi parazitlerle enfekte olduğunda ADA aktivitesinde artış gösterir. (8). Bütün

hücrelerde bulunan ADA'nın yokluğunda immun sistem hasarı oluşur ve tekrarlayan kronik viral, fungal, protozoal, bakterial enfeksiyonlar ile lenfopeni görülür (13).

Makrofajlarda NO sentezlenmesi, bakteriyel enfeksiyonlara ilk yanıtıdır. Bakteri endotoksinleri, protozoa ve parazit antijenleri ile uyarılan makrofajlar NO üreterek bakteri, tümör ve virüs hücreleri üzerine öldürücü sitotoksik etki yapar, yani NO spesifik olmayan immunitede rol oynar (15,22).

Çalışmada *Tricophyton verricosum* ile infekte olan sığırlarda serum ADA aktivitesinin ve NO düzeyinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali

Samsun çevre köylerinde, klinik olarak deri lezyonu taşıyan ve mikrobiyolojik olarak trikofitozisli olduğu belirlenen 30 adet yerli ırk sığır ile 10 adet sağlıklı yerli ırk sığır çalışmanın hayvan materyalini oluşturdu. Aynı beslenme ve koşullarda barındırılan 1-3 yaşlarındaki hayvanlar ortalama 250 kg canlı ağırlığındaydı.

Mikrobiyolojik incelemeler

Numunelerin mikrobiyolojik incelemesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapıldı. Laboratuvar tanısı amacıyla hayvanlardan deri kazıntısı ve kıl örnekleri alındı. Lezyonlarda bulunan yabancı maddeler, kontaminant mantar sporları ve diğer etkenler lezyonların % 70'lik alkole batırılmış pamukla iyice silinmesiyle giderildi. Alkol kurutulduktan sonra steril makas, pens, bistüri veya küret yardımıyla lezyonların kenarındaki aktif bölgelerden yeterli miktarda deri kazıntısı ve kıl örnekleri direkt mikroskopik muayene, izalasyon ve identifikasyon yapılması amacıyla alındı.

Direkt Mikroskopik Muayene: Şüpheli materyallerden % 10'luk KOH'li preparatlar hazırlanarak, mikroskopta dermatofitlere ait hifa ve artrosporlar arandı.

İzolasyon: Örneklerden, bileşiminde kloramfenikol ve sikloheksimid bulunan SDA'ya besiyerinin yüzeyine yerleştirilen marazi maddelerin steril pens veya bistüri ile besiyerinin içine gömülmesiyle ekimler yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri aerobik koşullarda 25° C ve 37° C'de 3 hafta süreyle inkübe edildi.

İdentifikasyon: İnkübasyon süresince, her gün kolonilerin makroskopik özellikleri kaydedildi ve üreyen koloniler makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre tanımlandı. Makroskopik olarak besiyerinde şekillenen kolonilerin üreme durumu ve süresi, şekli, yapısı ve ön-arka yüzündeki pigmentasyon özellikleri dikkate alındı. Mikroskopik muayenede ise, kültürden hazırlanan preparatlar laktofenol pamuk mavisi ile

boyanarak kolonilere ait hifa, mikrokonidium, makrokonidium, klamidiospor, artrospor ve blastospor yapıları incelenerek, üreyen dermatofitler tanımlandı (2,21).

Biyokimyasal Analizler

Hayvanların *vena jugularis*'inden kan alınarak 3000 rpm'de +4C°'de serumları çıkartıldı ve analiz yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı. Serumların analizi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı. Serumlar analiz yapılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. ADA aktivitesi modifiye Bertholet reaksiyonuna dayanan Giusti yöntemi ile ölçüldü (10). NO düzeyinin ölçümü ise enzimatik Greiss yöntemine göre, total nitrit düzeylerinin endojen NO üretiminin indeksi olarak kabul edilmesi nedeniyle total nitrit olarak ölçüldü (6).

İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen veriler one-way Anova (Tukey's t testi) ile karşılaştırıldı. İstatistiksel hesaplamaları MINITAB istatistik paket programı ile yapıldı (19).

Bulgular

Klinik Bulgular

Klinik bakıda kontrol grubu hayvanlarda herhangi bir bozukluk gözlenmezken, deneme grubu olarak kullanılan hayvanların baş bölgelerinde yoğun olmak üzere boyun ve sırt bölgelerinde trikofiti lezyonları bulunmaktaydı. Bu lezyonların bulunduğu bölgeler kılsızdı ve derinin epidermis katı ortaya çıkmıştı, kaşıntı yoktu.

Mikrobiyolojik Bulgular

Hasta hayvanlardan alınan deri kazıntıları ve kıl örneklerinde yapılan mikrobiyolojik muayenede *Tricophyton verricosum* izole edildi.

Biyokimyasal Bulgular

Deneme ve kontrol grubundaki sığırların serum NO düzeyi ve ADA aktivitesi tablo 1'de sunulmuştur. ADA aktivitesi kontrol ve trikofitozisli sığırlarda sırasıyla 12.70 U/L ve 24.49 U/L olarak tespit edildi. ADA aktivitesinde gruplar arasındaki farklılık önemlidir (one-way Anova) (p<0.001). NO düzeyleri ise kontrol ve trikofitozisli sığırlarda sırasıyla 34.24 µmol/L ve 36.17 µmol/L ölçüldü. Kontrol ile hastalıklı grup arasında NO değerleri bakımından istatistiksel anlamda bir fark bulunamadı.

Tablo 1. Trikofitozisli sığırlarda serum ADA aktivitesi ve NO düzeyleri.

Table 1. Sera ADA activities and NO levels in Trichophytosis cattle.

	n	NO (µmol/L)	ADA (U/L)
Deneme	30	36.17±3.25	24.49±1.65*
Kontrol	10	34.24±4.36	12.70±2.23

* p<0.001

Tartışma ve Sonuç

Hızla artan dünya nüfusunun beslenme probleminin çözülebilmesi için hayvansal ürünlere olan ihtiyaçtan dolayı ekonomik yönden durumu ne olursa olsun hemen bütün ülkelerde hayvan beslemek bir zorunluluk halindedir. Türkiye’de de hayvansal protein üretiminin yarısı sığır yetiştiriciliğinden sağlanmaktadır ve bu oran nedeniyle Türkiye beslenmesinde sığır yetiştirici çok önemli bir paya sahiptir. Sığır yetiştiriciliğinde genetik faktörler, çevresel koşullar ve beslenme kadar salgın hastalıkların kontrolü ile söndürülmesi de önemlidir (1). *Trichophyton verrucosum* sığırlarda inatçı seyirli dermatomikozlara neden olmakta ve topikal antifungal ilaçlarla tedaviye cevap vermemektedir (28). Evcil hayvanlardaki trikofitozis enfeksiyonlarının yetiştiriciler, veteriner hekimler ve halk sağlığının korunabilmesi açısından önemli ve büyük bir problem olduğu da bildirilmektedir (20)

Dermatofitozlar, trikofiton gibi dermatofitlerin neden olduğu, deri, saç ve tırnak gibi keratinize dokulara yerleşen hastalıklardır. Dermatofit enfeksiyonlarına karşı savunmada, hem spesifik olmayan savunma mekanizmaları (derinin yapısı, keratinizasyon ve epidermal proliferasyon, antifungal maddeler, ansatüre transferrin) hem de immün mekanizmalar rol oynar ve bu mekanizmalar, mantarın derin dokulara invazyonunu engellerek atılmasını sağlar. Dermatofitozlu hastaların bazılarında dermatofitid adı verilen sekonder erüpsiyonlar ortaya çıkar. Bu erüpsiyonlar, kan akımıyla taşınan fungal antijenlerle, bunlara karşı oluşan antikorlar arasındaki reaksiyon sonucu gelişir. Erüpsiyon, enfeksiyon odağından uzak yerlerde, çok farklı klinik tablolar şeklinde görülür ve primer odağın tedavisinden sonra kendiliğinden kaybolur (23).

ADA, özellikle lenfositlerin proliferasyonu ve differansiyasyonunda rol oynamaktadır. ADA aktivitesi lenfositik hücrelerde eritrositlere oranla 10 kat daha fazla bulunmaktadır. T lenfositlerde B lenfositlere göre daha yüksek oranda bulunur ve T hücre farklılaşması sırasında belirgin olarak artış göstermektedir. Bu nedenle, ADA hücrel immünitinin bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir. Vücut sıvılarında ve serumda ADA aktivite düzeyleri hücrel bağışıklığın uyarıldığı birçok hastalıkta (tifo, enfeksiyöz mononükleoz, sarkoidozis, sistemik lupus eritematoz, karaciğer hastalıkları, akut lösemi, brusella, akut pnömoni, romatoid artrit, tüberküloz, salmonella, riketsioz, hepatit A, hepatit B, viseral leishmanioz, akut toksoplazmoz, tavuk çiçeği gibi çeşitli otoimmün ve yangısal hastalıklar) artış gösterir (7,9,24,25).

NO bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun (ubikinon redüktaz’ı), glikolizin (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz’ı), TCA siklusunun (Cis-akonitaz’ı) Fe

içeren bazı enzimlerini inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit, tümör hücrelerini öldürmektedir. NO hedef hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA’sının deaminasyonu ile bu hücrelerde stostatik etki meydana getirir (16,27,29).

Trikofiti sıklıkla görülen ve hücrel bağışıklıkla kontrol edilen bir hastalıktır. T-lenfositler trikofiti lezyonlarında dokuda ve hücrede bir seri biyolojik etkiler göstermekte (3) ve kronik trikofitoziste trikofiton antijenlerine karşı trichofitona özel IgE antikorları salgılanmaktadır (18). *T. verrucosum* enfeksiyonlarında T-lenfositlerle birlikte makrofajlar ve nötrofillerde savunmaya katılmakta, sitokinlerde artış göstermektedir (11,17). ADA aktivitesi de hücre aracılı immun yanıt olan hastalıklarda artış göstermektedir (5). Yapılan bu çalışmada da trikofiton demotofitozunda hücrel immünitadaki uyarıma bağlı olarak ADA aktivitesi istatistiki olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.001$). Trikofitoziste makrofajlar uyarılmaktaydı ve uyarılan makrofajlarda NO üreterek sitotoksik etki yapmaktaydı fakat bu çalışmada NO düzeyinde istatistiki olarak anlamlı bir artış göstermedi. Daha önce trikofitozis demotofitozunda ADA aktivitesi ve NO düzeyi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadığından dolayı benzer bir çalışma ile karşılaştırması yapılamadı.

Sonuç olarak serum ADA aktivitesinin *T.verrucosum* tarafından hücre aracılı immun sistemin uyarılması sayesinde artmış olabileceği düşünüldü. Buna karşın araştırma grubunda kontrole göre serum NO seviyesinin ortalamasında relatif olmayan bir artış gözlemlendi. Bu artış, makrofajlardaki iNOS salınımının ve NO üretiminin yeni başlamış olabileceğini düşündürdü

Kaynaklar

1. Akman N, Tuncel M, Yener S, Kumlu K, Özkütük N, Tüzemen M, Yanar A, Koç O, Şahin Ç, Kaya Y: *Türkiyede sığır yetiştiriciliği*. <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/033numanakman.pdf>
2. Arda M (2000): *Preperat ve kültür hazırlama yöntemleri*. Temel mikrobiyoloji. 2. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 356-357.
3. Billiau A (1996): *İnterferon- γ : biology and role in pathogenesis*. Advances in Immunology, **62**, 61-130.
4. Bourdzi-Hatzopoulou E (1978): *Zoonthronoses in Greece*. Epidemiology of dermatophytosis. Scientific Yearbook of the Faculty of Veterinary , **19**, 195-258.
5. Cales J (1999): Adenosine deaminase. <http://www.mssc.edu/biology/B305/enzyme.htm>
6. Cortas NK, Wakid NW (1990): *Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium reduction method*. Clin Chem, **36**, 1440-1448.
7. Fischer D, Martin B, Wayden V, Synderman R (1976): *A role of adenosine deaminase in human monocyte maturation*. J Clin Invest, **58**, 399-407.

8. **Galanti B, Nardiello S, Russo M, Fiorentino F** (1981): *Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever*. Scand J Infect Dis, **13**, 47-50.
9. **Giblett ER, Andeson JE, Cohen F, Polara B, Meuwissen HJ** (1972): *Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity*. Lancet, **2**, 1067-1069.
10. **Giusti G** (1974): *Adenosine deaminase*. In: HU Bergmeyer (Ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic pres. New York.
11. **Gudding R, Lung A** (1995): *Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis*. Can Vet J, **36**, 302-306.
12. **Haseqawa M, Lida Y, Yano T, Takaiwa F, Iwabuchi M** (1985): *Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA Sequences*. J Mol Evol, **22**, 32-38.
13. **Hersfield M.S, Arredondo-Vega F.X, Santsteban I** (1997): *Clinical expression, genetics and therapy of adenosine deaminase (ADA) deficiency*. J Inher Metab Dis, **20**, 1979-1985.
14. **Koehler LH, Benz EJ** (1962): *Serum adenosine deaminase methodology and clinical applications*. Clin Chem, **8**, 133-40.
15. **Komarov AM, Reddy MN** (1998): *Effect of septic shock on nitrate, free amino acids and urea in murine plasma and urine*. Clin Biochem, **31**, 107-11.
16. **Lepoivre M, Feischi F, Coves J, Thlander L, Fontecave M** (1991): *Unactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide*. Biochem Biophys Res Commun, **179**, 442-448.
17. **Lung A, Bratberg AM, Evensen Ø** (1998): *Cell recruitment in skin in the course of an experimental infection with trichophyton verrucosum in a vaccinated and a non-vaccinated calf*. Adv Vet Dermatol, **3**, 271-281.
18. **Lund A, Bratberg AM, Solbakk IT** (2001): *In vitro release of interferon-gamma by trichophytin-stimulated whole blood cell cultures from ringworm-vaccinated and control cattles experimentally inoculated with Trichophyton verrucosum*. Vet Derm, **12**, 75-80.
19. **Minitab Inc, Version 12.1, State Collage, Pennsylvania, USA, 1998.**
20. **Moretti A, Boncio L, Pasquali P, Fioretti DP** (1998): *Epidemiological aspects of dermatophyte infections horses and cattle*. Zent Vet B, **45**, 205-208.
21. **Moriello KA** (2001): *Diaconostic techniques for dermatophytes*. Clin Tech Small Anim Pract, **16**, 219-224.
22. **Munoz- Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M** (1992): *Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrofage activation for the killing of intracelluler Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism*. Eur J Immunol, **22**, 301-307.
23. **Pişkin S** (2005): *Dermofit enfeksiyonlarında savunma mekanizmaları ve alerjik reaksiyonlar*. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci, **1**, 12-15.
24. **Raj B, Chopra RK, Lal H, Saini AS, Singh V, Kumar P** (1985): *Adenosine deaminase activity in pleural fluids a diagnostic aid tuberculous pleural effusion*. Ind J Chest Dis Allied Sci, **27**, 76-80.
25. **Stancikova M, Lukac J, Istok R, Crisstilli G, Rovensky J** (1998): *Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with sistemik lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, **16**, 583-586.
26. **Takatori K, Takahashi A, Kawai S, Ichijo S, Hasegawa A** (1993): *Isolation of Trichophyton verrucosum from lesional and non-lesional skin in calves*. J Vet Med Sci, **55**, 343-344.
27. **Taylor AW, Severn A, Philips RS** (1996): *Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with Plasmodium chabaudi*. Parasite-Immunology, **18**, 425-430.
28. **Wabacha JK, Gitau GK, Bebora LC, Bwanga CO, Wamuri ZM, Mbithi PM** (1998): *Occurrence of dermatomycosis (ringworm) due to Trichophyton verrucosum in dairy calves and its spread to animal attendants*. J S Afr Vet Assoc, **69**, 172-173.
29. **Zhang J, Snyder SH** (1992): *Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphade dehydrogenase*. Proc Natl Acad Sci USA, **89**, 9382-9385.

Geliş tarihi: 19.07.2006 / Kabul tarihi: 11.12.2006

Yazışma adresi

Yrd.Doç.Dr. Sena Çenesiz
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Kurupelit, Samsun