

## Subklinik mastitisli süt ineklerinde meme içi levamisol uygulanmasında süt ve kanda glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, alkalen fosfataz ve immunoglobulin G Düzeyleri\*

Gül YARIM<sup>1</sup>, Berrin SALMANOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kırıkkale; <sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Bu çalışma subklinik mastitisli ineklere, immunomodulör etkisi olduğu bilinen levamisolün meme içi uygulanmasının, kan ve sütte glutasyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ve alkalen fosfataz (ALP) ve immunoglobulin G (IgG) düzeyleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Araştırmanın materyalini, 4-5 yaşlı 40 Holstein ırkı inek oluşturmuştur. Deneme ve kontrol grubunun belirlenmesi, sütte Kaliforniya mastitis test (California mastitis test-CMT) ve somatik hücre sayımı (somatic cell count-SCC) sonuçlarına göre yapılmıştır. CMT (-) ve SCC < 300.000 olan 20 inek kontrol grubunu, CMT (+) ve SCC > 300.000 olan 20 inek ise deneme grubunu oluşturmuştur. İneklerden levamisol uygulaması öncesi kan örnekleri vena jugularis'ten 10 ml, süt örnekleri ise her bir ineğin iki meme lobundan 20 ml alınmıştır. Kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve serumları ayrılmıştır. Sütlere 1ml %0.3'lük peynir mayası eklenip, 37°C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilerek pıhtı oluşumu sağlanmış ve 80 dakika sonra pıhtı çizilerek süt serumları ayrılmıştır. Kan ve süt serumlarında GSH-Px aktivitesi fotometrik SOD ile ALP aktivitesi spektrofotometrik, IgG düzeyi radial immunodiffüzyon yöntemiyle ölçülmüştür. İneklere 6 gün boyunca, sabah sağımdan sonra meme içi 20 ml %4'lük levamisol uygulanmıştır. Uygulama periyodu sonunda kan ve süt örnekleri toplanarak, uygulama öncesi yapılan analizler tekrarlanmıştır. Levamisol uygulaması öncesinde, subklinik mastitisli ineklerin kanında GSH-Px, SOD, ALP aktiviteleri ile IgG düzeyleri sırası ile 0,67 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot. 4,85 U/g-prot. 124,1 U/L ve 27g/L olarak tespit edilmiştir. Uygulamadan sonra ise sırası ile 0,60 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot. 3,87 U/g-prot. 124,4 U/L ve 27g/L olarak bulunmuştur. Süt serumunda ise bu parametrelere ait değerlerin, uygulama öncesinde sırasıyla 0,78 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot. 21,5 U/g-prot. 596 U/L, 0,38 g/L, uygulama periyodu sonunda ise sırası ile 0,22 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot. 10,4 U/g-prot. 596 U/L, 0,45g/L olduğu belirlenmiştir. Subklinik mastitisli ineklerde meme içi levamisol uygulamasının süt serumunda GSH-Px, bunun yanında kan ve süt serumunda SOD aktivitesini düşürdüğü (GSH-Px için p≤0,01; SOD için p≤0,001) anlaşılmıştır. ALP aktivitesi ve IgG düzeyleri mastitisli grupta kontrolden yüksek bulunmuştur ve levamisol uygulaması, her iki parametrenin değer artışına neden olmuştur.

Anahtar kelimeler: Alkalen fosfataz, glutasyon peroksidaz, immunoglobulin G, levamisol, subklinik mastitis, süperoksit dismutaz.

### Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, alkaline phosphatase and immunoglobuline G levels of blood and milk in cows administered intramammary levamisole with subclinical mastitis

**Summary:** This study was carried out in order to determine the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase and immunoglobuline G in blood and milk after administration of intramammary levamisole known as immunomodulatory substance. Forty Holstein cows, 4-5 years of constituted the material of study. Control and trial group were formed according to the results of California mastitis test (CMT) and somatic cell count (SCC). Twenty cows with CMT (-) and SCC < 300.000 defined as control group. CMT (+) and SCC > 300.000 were trial group. Ten ml of blood samples were collected from vena jugularis and 20 ml of milk samples from two mammary lobes were collected just before administration of levamisole. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and serum were separated. One ml 0.3% were added, curd was formed by incubating in water bath for 20 minutes and after 80 minutes by scratching the curd milk serum was obtained. Analysis of GSH-Px activity is done by photometric. SOD activity, ALP levels by spectrophotometric and IgG levels radial immunodiffusion method in blood and milk. Twenty ml 4% levamisole were administered to cows for 6 days on the mornings just after milking. After administration period same analysis were made to recollected blood and milk samples. Before levamisole administration, the activity of GSH-Px and SOD, alkaline phosphatase activities and immunoglobuline G levels of blood in cows with subclinical mastitis were 0,83 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/min/mg-prot. 4,85 U/g-prot. 124,1 U/L ve 27 g/L, respectively. After administration period is as follows 0,60 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/min/mg-prot. 3,87 U/g-prot. 124,4 U/L ve 27g/L. Values of these parameters in milk serum were 0,78 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/min/mg-prot. 21,5 U/g-prot. 591 U/L, 0,38 g/L, respectively before levamisole administration, 0,22 nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/min/mg-prot. 10,4 U/g-prot. 596 U/L, 0,45 g/L, respectively after administration period. Intramammary administration of levamisole decreases the GSH-Px activity of milk serum also SOD activity of blood and milk serum (p values for GSH-Px and SOD p≤0,01 and p≤0,001, respectively). In trial group ALP activity and IgG levels in blood and milk serum was higher than control group as p≤0,01 and increased after levamisole administration.

Key words: Alkaline phosphatase, glutathione peroxidase, immunoglobuline G, levamisole, subclinical mastitis, superoxide dismutase

\* Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Araştırma Fonu (99-09-01-03) tarafından desteklenen doktora tez özetidir.

## Giriş

Subklinik mastitis olgularında, genel olarak meme dokusu ve sütteki değişimler klinik olarak gözlenemez. Ancak, laboratuvar çalışmaları ile sütteki somatik hücre sayısının artışı ve sütte biyokimyasal parametrelerin değişimleri belirlenerek subklinik mastitisin teşhisine gidildiği ve patojenik etkenlerin izolasyonunun yapıldığı bildirilmektedir (11). Doğal çevrenin bozulması hem hayvan hem de insanlarda immunolojik fonksiyonlar üzerinde zararlı etkilere sahiptir. Bu etkinin en önemli bulgusu, insan ve hayvanların yaşadıkları çevrede yaygın olarak bulunan zayıf patojenik mikroorganizmalarla şekillenen enfeksiyonlara duyarlılığın artışıdır. Son yıllardaki yoğun çalışmalar, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde alternatif yöntemler ortaya koymuşlardır. Bu yöntemlerden biri, doğal veya sentetik bağışıklık güçlendiriciler ile spesifik olmayan immunoprofilaksidir (13,18). İnsanlarda kanser tedavisinde uzun zamandan beri kullanılan levamizol, son yıllarda mastitislerde profilaksi amacı ile kullanılmaktadır (4,12). Levamizolün immun sistem hücreleri üzerindeki etkileri, izole hücreler, deney hayvanları ve gönüllü sağlıklı insanlar üzerinde yaygın olarak araştırılmıştır (4,5,13,16). Yapılan çalışmalar sonunda levamizolün sığır mastitisinde yararlı etkiler gösterdiği anlaşılmıştır (8,17). Mastitis oluşumunun engellenmesinde antikorlar önemli bir role sahiptir. İlaç baskılayıcı T-hücrelerinin aktivitesini ve buna bağlı olarak antikor üretimini artırarak subklinik mastitisin ilerlemesini engellemektedir (2).

Levamizol şemotaksisi, antikor ve komplement reseptör aktivitesi, peroksidaz aktivitesi, polimorfonükleer hücreler, monositler ve makrofajlarla hücre içi ölümü artırarak, fagosit fonksiyonlarını güçlendirebilmektedir (16,22).

İneklerde meme içi patojenlere karşı en büyük savunma mekanizması, nötrofillerle bakterilerin fagositozudur (14). Fagositoz olduktan sonra lökosit hücre membranında yerleşmiş olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) sistemi, çevre dokulardaki moleküler oksijeni süperoksida dönüştürür. Daha sonra süperoksit, SOD ile hidrojen peroksit dönüştürülür. Fagolizozomda bulunan lizozomal bir enzim olan myeloperoksidaz (MPO) varlığında peroksit ve klorür iyonları, bakteriyi öldüren hipokloröz aside (HOCl) dönüştürülür. Fazla peroksit, GSH-Px ile nötralize edilir. Aktif nötrofiller, bu oksidanlardan korunmak için GSH-Px ve SOD enzimlerini kullanırlar (6).

Bu çalışmada, subklinik mastitisli ineklerde, meme içi levamizol uygulaması öncesinde ve sonrasında, GSH-

Px, SOD, ALP enzim aktiviteleri ile IgG düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmanın amacı, subklinik mastitisli ineklere meme içi levamizol uygulamasının süt ve kanda GSH-Px, SOD, ALP aktiviteleri ve IgG üzerindeki etkisinin belirlenmesidir.

## Materyal ve Metot

### Çalışma hayvanlarının seçimi

Çalışmanın materyali Kırıkkale ilindeki üç özel süt sığırcılığı işletmesinde bulunan 4-5 yaşlı 40 Holstein ırkı inekten sağlanmıştır. Kontrol ve deneme grubunun belirlenmesi Kaliforniya mastitis test (CMT) ve somatik hücre sayımı (SCC) sonuçlarına göre yapılmıştır. CMT (-) ve SCC < 300.000/ml süt olan 20 inek kontrol grubunu, CMT (+) ve SCC > 300.000/ml süt olan 20 inek ise deneme grubunu oluşturmuştur.

İneklerden levamizol uygulaması öncesi kan örnekleri vena jugularis'ten 10 ml normal tüplere, süt örnekleri ise her bir inekin iki meme lobundan ayrı ayrı olmak üzere 20 ml plastik şişelere alınmıştır. Bazı durumlarda aynı hayvanın dört meme lobundan yalnız biri mastitisli olması nedeniyle başka hayvanlardaki süt örnekleri ile çalışılmıştır. Dolayısıyla hayvan sayısından çok lob sayısı olarak düşünülmelidir. Bireysel metabolizma farklılığının etkisi, özellikle GSH-Px ve SOD ölçümünde kontrol değerlerlerde farklılık yaratabilir.

Kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan berrak serum kullanılmıştır. Süt serumlarının çıkarılmasında Alais (1) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Kan ve süt serumlarında aynı gün GSH Px, SOD enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Daha sonra kontrol ve deneme grubundaki ineklerin iki meme lobundan birine %4'lük 20 ml levamizol uygulanmış, diğer loba herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Uygulama günde bir kez sağım sonrasında yapılmış olup 6 gün sürdürülmüştür. Altıncı günün sonunda aynı ineklerden tekrar kan ve süt örnekleri alınmış ve uygulama öncesi yapılan testler yapılmıştır.

### Serum glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin ölçümü

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Paglia ve Valentine (16) tarafından geliştirilen yöntemle ölçülmüştür. Testte prensip olarak, GSH-Px tarafından redükte glutasyon (GSH), okside formuna (GSSG) dönüştürülür. Reaksiyonun geriye dönüşümü NADPH+H<sup>+</sup> varlığında glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla sağlanır ve NADPH+H<sup>+</sup> reaksiyon sonunda NADP'ye dönüşür. Reaksiyon sonunda GSH miktarı sabit kalır.

**Serum süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin ölçümü**

Kan ve süt serumunda SOD enzim aktivitesinin ölçümünde Sun ve ark. (20)'nin geliştirdiği bir yöntem kullanılmıştır. Test, ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile oluşan süperoksit radikallerinin, reaksiyon ortamında bulunan nitrobluetetrazolium'u (NBT) indirgemesinin, örnekte bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Renksiz olan NBT iyonu, süperoksit radikali tarafından indirgenildiğinde, maksimum absorbanansı 560 nm'de veren mavi renkli formazona dönüşür. Örnekte bulunan SOD aktivitesine bağlı olarak spektrofotometrede absorban düşmesi gözlenir.

**Serum alkaleen fosfataz ve immunoglobulin G ölçümü**

ALP. Bessey ve ark. (5)'nin bildirdiği yöntemle ve Sigma ALP test kitleri kullanılarak ölçülmüştür. IgG ise The Binding Site (Birmingham Research Park, Birmingham, UK B152SQ) firmasından temin edilen hazır IgG kitleri ile ölçülmüştür.

**İstatistik değerlendirmeler**

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi t-testi ve Wilcoxon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (21).

**Bulgular**

Holstein ırkı ineklerden, levamizol uygulaması öncesinde ve sonrasında alınan kan ve süt örneklerinde GSH-Px, SOD, ALP aktiviteleri ve IgG düzeylerine ait değerler Tablo 1, 2, 3 ve 4'te verilmiştir. Çalışmada kontrol grubu ineklerde, uygulamadan önce, kanda GSH-Px, SOD, ALP ve IgG düzeyleri sırası ile  $0.83 \pm 0.12$  nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot,  $8.35 \pm 0.53$  U/g-prot,  $56.55 \pm 2.23$  U/L,  $18 \pm 0.58$  g/L olarak bulunmuştur. Deneme grubu ineklerde ise bu değerlerin sırası ile  $0.67 \pm 0.08$  nmol/NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot,  $4.85 \pm 0.35$  U/g-prot,  $124.1 \pm 4.59$  U/L,  $27 \pm 0.83$  g/L olduğu hesaplanmıştır. Sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerin bu değerleri arasındaki farklılıklar istatistik olarak GSH-Px, SOD ve ALP için

Tablo 1. Kontrol ve deneme grubunun GSH-Px aktiviteleri (nmol NADPH+H<sup>+</sup>/dak/mg-prot).Table 1. GSH-Px activities of control and trial group (nmol NADPH+H<sup>+</sup>/min/mg-prot).

		Kontrol (Levam. önce)	Kontrol (Levam. sonra)	Deneme (Levam. önce)	Deneme (Levam. sonra)	Önemlilik
Kan değerleri	Min.	0.52	0.41	0.28	0.35	a-b:p≥0.05
	Maks.	1.49	1.03	1.01	0.84	c-d:p≥0.05
	X ± Sx	$0.83 \pm 0.12$	$0.63 \pm 0.08$	$0.67 \pm 0.08$	$0.60 \pm 0.05$	a-c:p≤0.001
	n	8 (a)	8 (b)	8 (c)	8 (d)	b-d:p≤0.001
Levamizol uygulanan meme lobu A	Min.	0.5	0.05	0.4	0.02	e-f:p≥0.05
	Maks.	2.3	1.6	1.1	0.5	g-h:p≤0.01
	X ± Sx	$1.28 \pm 0.20$	$0.67 \pm 0.21$	$0.78 \pm 0.08$	$0.22 \pm 0.07$	e-g:p≤0.001
	n	8 (c)	8 (f)	8 (g)	8 (h)	f-h:p≤0.001
Levamizol uygulanmayan meme lobu B	Min.	0.17	0.24	0.09	0.02	k-l:p≥0.05
	Maks.	2.7	1.8	0.74	0.64	m-n:p≤0.05
	X ± Sx	$0.71 \pm 0.29$	$0.95 \pm 0.19$	$0.27 \pm 0.08$	$0.19 \pm 0.07$	k-m:p≤0.001
	n	8 (k)	8 (l)	8 (m)	8 (n)	l-n:p≤0.001
Önemlilik		c-k:p≥0.05	f-l:p≥0.05	g-m:p≤0.001	h-n:p≥0.05	

Tablo 2. Kontrol ve deneme grubunun SOD aktiviteleri (U/g-prot).

Table 2. SOD activities of control and trial group (U/g-prot).

		Kontrol (Levam. önce)	Deneme (Levam. sonra)	Deneme (Levam. önce)	Deneme (Levam. sonra)	Önemlilik (Levam. sonra)
Kan değerleri	Min.	4	6	1	0.4	a-b:p≤0.01
	Maks.	15	11	7	6	c-d:p≤0.001
	X ± Sx	$8.35 \pm 0.53$	$7.70 \pm 0.33$	$4.85 \pm 0.35$	$3.87 \pm 0.33$	a-c:p≤0.001
	n	20 (a)	20 (b)	20 (c)	20 (d)	b-d:p≤0.001
Levamizol uygulanan meme lobu A	Min.	22	13	8	2	e-f:p0.001
	Maks.	59	58	34	26	g-h:p≤0.001
	X ± Sx	$36.7 \pm 2.38$	$33.6 \pm 2.65$	$21.5 \pm 1.55$	$10.4 \pm 1.42$	e-g:p≤0.001
	n	20 (e)	20 (f)	20 (g)	20 (h)	f-h:p≤0.001
Levamizol uygulanmayan meme lobu B	Min.	12	15	1	2	k-l:p≤0.001
	Maks.	70	73	16	24	m-n:p≤0.01
	X ± Sx	$33.0 \pm 3.03$	$34.3 \pm 3.08$	$7.85 \pm 1.11$	$9.30 \pm 1.32$	k-m:p≤0.001
	n	20 (k)	20 (l)	20 (m)	20 (n)	l-n:p≤0.001
Önemlilik		c-k:p≥0.05	f-l:p≥0.05	g-m:p≤0.001	h-n:p≥0.05	

Tablo 3. Kontrol ve deneme grubu ineklerde ALP aktiviteleri (U/L).  
Table 3. ALP activities in control and trial group of cows (U/L).

		Kontrol (Levam. önce)	Kontrol (Levam. sonra)	Deneme (Levam. önce)	Deneme (Levam. sonra)	Önemlilik
Kan değerleri	Min.	40	44	46	48	a-b:p≥0.05
	Maks.	78	78	146	148	c-d:p≥0.05
	X ± Sx	56,5 ±2,2	56,3 ±1,9	124,1 ±4,6	124,4 ±4,4	a-c:p≤0.001
	n	20 (a)	20 (b)	20 (c)	20 (d)	b-d:p≤0.001
Levamizol uygulanan meme lobu A	Min.	76	76	554	555	e-f:p≥0.05
	Maks.	119	117	663	681	g-h:p≤0.01
	X ± Sx	106,4±2,9	106,7±2,8	591,0±6,0	596,0±6,5	e-g:p≤0.001
	n	20 (e)	20 (f)	20 (g)	20 (h)	f-h:p≤0.001
Levamizol uygulanmayan meme lobu B	Min.	90	90	557	551	k-l:p≥0.05
	Maks.	123	121	627	618	m-n:p≤0.05
	X ± Sx	109,6±2,4	109,1±2,4	593,0±4,4	588,0±4,2	k-m:p≤0.001
	n	20 (k)	20 (l)	20 (m)	20 (n)	n:p≤0.001
Önemlilik		e-k:p≥0.05	f-l:p≥0.05	g-m:p≥0.05	h-n:p≥0.05	

Tablo 4. Kontrol ve deneme grubu ineklerde IgG düzeyleri (g/L).  
Table 4. IgG levels in control and trial group of cows (g/L).

		Kontrol (Levam. önce)	Kontrol (Levam. sonra)	Deneme (Levam. önce)	Deneme (Levam. sonra)	Önemlilik
Kan değerleri	Min.	13	11	19	20	a-b:p≥0.05
	Maks.	22	21	33	35	c-d:p≥0.05
	X ± Sx	18 ±0,58	18 ±0,55	27±0,83	27 ±0,97	a-c:p≤0.05
	n	8 (a)	8 (b)	8 (c)	8 (d)	b-d:p≤0.05
Levamizol uygulanan meme lobu A	Min.	0,11	0,13	0,31	0,36	e-f:p≤0.05
	Maks.	0,15	0,18	0,49	0,50	g-h:p≤0.05
	X ± Sx	0,13±0,005	0,15±0,006	0,38±0,02	0,45±0,02	e-g:p≤0.01
	n	8 (e)	8 (f)	8 (g)	8 (h)	f-h:p≤0.01
Levamizol uygulanmayan meme lobu B	Min.	0,13	0,13	0,31	0,30	k-l:p≥0.05
	Maks.	0,16	0,16	0,42	0,42	m-n:p≥0.05
	X ± Sx	0,15±0,005	0,15 ±0,003	0,35±0,01	0,36±0,01	k-m:p≤0.01
	n	8 (k)	8 (l)	8 (m)	8 (n)	l-n:p≤0.01
Önemlilik		e-k:p≥0.05	f-l:p≥0.05	g-m:p≥0.05	h-n:p≤0.05	

$p \leq 0.001$  düzeyinde anlamlı. IgG için ise ( $p < 0.05$ ) düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Uygulamadan sonra, kontrol grubu ineklerin kanında GSH-Px, SOD, ALP aktiviteleri ve IgG düzeyleri sırasıyla  $0,63 \pm 0,08$  nmol/NADPH+H+/dak/mg-prot,  $7,70 \pm 0,33$  U/g prot,  $56,35 \pm 1,99$  U/L,  $18 \pm 0,55$  g/L olarak, deneme grubunda ise sırası ile  $0,60 \pm 0,05$  nmol/NADPH+H+/dak/mg-prot,  $3,87 \pm 0,33$  U/g-prot,  $124,4 \pm 4,44$  U/L,  $27 \pm 0,97$  g/L olarak belirlenmiştir. İncelenen gruplar arasındaki istatistik farklılıklar, GSH-Px, SOD ve ALP bakımından  $p < 0.001$ , IgG bakımından ise  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Süt serumlarında yapılan analiz sonuçlarına göre, uygulama öncesinde, kontrol grubu ineklerde GSH-Px, SOD ve ALP aktiviteleri ile IgG düzeyleri sırası ile  $1,28 \pm 0,2$  nmol/NADPH+H+/dak/mg-prot,  $36,7 \pm 2,38$  U/g-prot,  $106,7 \pm 2,89$  U/L,  $0,13 \pm 0,0$  g/L, deneme grubu ineklerde ise  $0,78 \pm 0,08$  nmol/NADPH+H+/dak/mg-prot,  $21,5 \pm 1,55$  U/g-prot,  $591 \pm 5,97$  U/L,  $0,38 \pm 0,02$  g/L bulunmuştur. Kont-

rol ve deneme grubu ineklerde, incelenen bu parametreler arasındaki farklılıkların istatistikî yönden  $p < 0.001$  düzeyinde önemli olduğu anlaşılmıştır. Uygulamadan sonra, sağlıklı ineklerde süt serumu GSH-Px, SOD, ALP aktiviteleri ile IgG düzeyleri sırası ile  $0,67 \pm 0,2$  nmol/NADPH+H+/dak/mg-prot,  $33,6 \pm 2,6$  U/g-prot,  $106,7 \pm 2,8$  U/L,  $0,15 \pm 0,0$  g/L, subklinik mastitisli ineklerde ise sırası ile  $0,22 \pm 0,0$  nmol/NADPH+H+/dak/mg prot,  $10,4 \pm 1,4$  U/g-prot,  $596 \pm 6,5$  U/L,  $0,45 \pm 0,0$  g/L olarak tespit edilmiştir. Levamizol uygulamasından sonra, sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerde bulunan bu sonuçlar, istatistik olarak GSH-Px, SOD, ALP ve IgG için sırasıyla  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

### Tartışma ve Sonuç

Süt sığırcılığı yapılan yetiştirmelerde sık rastlanan mastitis, ülkemiz hayvancılığında büyük ekonomik kayıplara neden olur. Subklinik mastitislerin erken teşhis ve

tedavi edilmesi ile hastalığın ilerlemesi ve diğer hayvanlara bulaşması önlenir (10,19). İneklerde meme içi patojenlere karşı en önemli savunma mekanizması nörofillerin bakterileri fagosite etmesidir (15). Meme bezindeki bakteriler, süperoksit iyonları, hipokloröz asit ve hidrojen peroksit etkisiyle ölmektedirler (11). Levamizol, baskılayıcı T-hücrelerinin aktivitesini ve buna bağlı olarak fagositozu ve antikor üretimini artırarak mastitisin ilerlemesine engel olmaktadır (2). Bu çalışmada, subklinik mastitisli ineklerde süt serumu GSH-Px aktivitesi levamizol uygulanmadan önce 0,78 nmol/NADH+H/dak/mg-prot, uygulama sonrası 0,22 nmol/NADH+H/dak/mg-prot olarak belirlenmiştir. GSH-Px ölçümlerinde kullanılan NADH miktarı yetersizliği nedeniyle Tablo 1'de verilen n sayısı 32'dir. İstatistik anlamda bir sorun yaratmamıştır. Erskine ve ark. (8) bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde levamizol uygulamasından sonra kanda GSH-Px değerlerinde önemli azalmalar bildirmiştir ( $p<0,01$ ). Tablo 1'de A lobu levamizol uygulanmadan önce GSH-Px değeri 1,28 nmol/NADH+H/dak/mg-prot ve uygulanmayan B lobu 0,71 nmol/NADH+H/dak/mg-prot ölçülmüştür. Levamizol uygulanmadan önce ölçülen bu değerlerin önemli derecede birbirinden farklı olması, bireysel metabolizma farklılığı ile açıklanabilir. Çünkü, ölçüm yapılan süt örnekleri her zaman aynı hayvandan değil, mastitis olduğu belirlenen başka hayvanların farklı meme loblarından elde edilmiştir. Her bir hasta hayvan değil, anatomik olarak tamamen izole olan dört meme lobu enfeksiyonu birer kriter olarak kullanılmıştır. Aynı durum SOD ölçümleri için de geçerlidir. Atroshi ve ark. (3), yaptıkları benzer bir çalışmada mastitisli ineklerde serum GSH-Px aktivitesinin, sağlıklı ineklere göre istatistik anlamda düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu azalmaları lipid peroksidasyonundaki değişimlere ve konakçı savunma sisteminden kaynaklanan oksidatif strese bağlamışlardır. Subklinik mastitisli ineklerde kan serumu GSH-Px aktiviteleri, uygulama öncesinde ve sonrasında sırası ile 0,67 ve 0,60 nmol/NADH+H/dak/g-prot ölçülmüştür ve istatistik anlamda önemli değildir. Aynı ineklerde süt serumu GSH-Px aktivitesi levamizol öncesi 0,78 ve 0,22 nmol/NADH+H/dak/g-prot olarak belirlenmiştir ( $p<0,01$ ). Yangı durumunda fagositoz mekanizmasında nötrofillerin oluşturduğu oksijen metabolitleri, nötrofiller ve yangılı dokuya zarar verir. GSH-Px enzimi, oksijen metabolitlerinin sitotoksik etkilerine karşı koruyucu hücresele antioksidandır ve dokudaki oksidatif hasarın duyarlı bir indikatörüdür (16). Diğer antioksidatif enzim olan SOD, kontrol grubunda 36,7 ve mastitisli grupta 21,5 U/mg-prot olarak ölçülmüştür. Levamizol uygulamasından sonra sırasıyla 33,26 ve 10,4 U/mg-prot de-

ğerleri bulunmuştur. Bunların yanında mastitisli grupların levamizol uygulamasından önce değerleri 21,5 ve 7,85 U/mg-prot olarak bulunmuştur. Bu farklılık, değişik hayvanların meme lobundan alınan sütler olması dolayısıyla, bireysel metabolizma farklılığı ve mastitis nedeni ile ortaya çıkan oksidatif stresin enfeksiyon şiddetine bağlı olan değişimi ile açıklanabilir.

Subklinik mastitisli ineklerde, levamizol verilen meme lobu süt serumunda IgG düzeyi uygulama öncesine göre  $p<0,05$  oranında artmıştır. İlacın T-hücrelerini aktive ederek antikor üretimini artırmasının bir sonucu olduğu kanısına varılmıştır. Yangı dolayısıyla artan ALP aktivitesinin, levamizol uygulamasından sonra artması, medeki fagositoz artışına bağlı olarak nötrofillerden ALP salımının artması ile açıklanabilir. Levamizol, lenfosit fonksiyonunun spesifik olmayan uyarıcısıdır. İlaç kemotaksis, antikor ve komplement reseptör aktivitesi, peroksidaz aktivitesi, monositler, polimorf hücreler ve makrofajları uyarak immun fonksiyonları güçlendirmektedir (17). Yapılan çalışmalar sonucunda, levamizolün sıgır mastitisinin seyrinde immun sistemi uyarıcı etkisi olduğu söylenebilir. Ancak teorik tartışmalar, mastitisin patogenezinin anlaşılması ve levamizol kullanımında dikkatli olunması gerektiği bildirilmektedir (2,4).

Subklinik mastitisin geniş anlamda tamamen ortadan kalkması mümkün değildir. Fakat endemik seyirli olarak düşünülmesi gereken subklinik mastitislerin akılcı ve uygulanabilir yöntemlerle sürekli izlenen ve esnek bir mücadele programı ile ekonomik kayıplar en aza indirilebilir kanısındayız.

### Kaynaklar

1. **Alais C** (1974): *Science du Lait. Principes des Techniques Laitières*. Editeus Bolveard, Paris.
2. **Anderson J** (1984): *Levamisole and bovine mastitis*. Vet Rec. **11**, 138-140.
3. **Atroshi F, Rizzo A, Kangasniemi R, Sankari S, Työppönen T, Osterman T, Parantainen J** (1989): *Role of plasma fatty acids, prostaglandins and antioxidant balance in bovine mastitis*. J Vet Med A. **36**, 702-711.
4. **Baydan E, Salmanoğlu B, Vural R, Öge H, Çakmak N** (1996): *Subklinik mastitisli ineklerde levamizolün bazı kan değerlerine etkisi*. Türk Vet Hek Derg. **8**, 53-56.
5. **Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ** (1946): *A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum*. J Biol Chem. **164**, 321-325.
6. **Brunner CJ, Muscoplat C** (1980): *Immunomodulatory effects of levamisole*. J Am Vet Med Assoc. **176**, 1156-1162.
7. **Champe PC, Harvey RA** (1994): *Lippincott's Illustrated Review*. JB Lippincott Company, New York.
8. **Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Scholz RW** (1987): *Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts*. J Am Vet Med Assoc. **190**, 1417-1421.

9. **Flesh J, Harel W, Nelken D** (1982): *Immunopotentiating effect of levamisole in the prevention of bovine mastitis, fetal death and endometritis*. Vet Rec, **111**, 56-57.
10. **Graaf T, Dwinger RH** (1995): *Estimation of milk production losses due to subclinical mastitis in dairy cattle in Costa Rica*. 65-68 In: Proceedings of the third IDF International Mastitis Seminar, Book II, 28 May-1 June, Tel-Aviv, Israel.
11. **Huang LQ, Rongxiang-Cai MS** (1995): *Correlation between somatic cell counts, bacteria and enzymes in milk of subclinical mastitis*. 88-91 In: Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar Book I, 28 May-1 June, Tel-Aviv, Israel.
12. **IDF** (1987): *Bovine Mastitis: Definition and Guidelines for Diagnosis*. Bul Int Dairy Fed, **211**, Belgium.
13. **Istanbulluoğlu E** (1984): *Siğirlerde mastitis: direnç mekanizmaları ve bunların ıslah çalışmalarında önemi* s. 42-47. 1. Mastitis Semineri, 24 Kasım, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.
14. **Krakowski L, Krzyzanowski J, Wrona Z, Siwicki AK** (1999): *The effect of non-specific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrum, selected indices of nonspecific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period*. Vet Immun Immunopath, **68**, 1-11.
15. **Miller RH, Guidry AJ, Paape MJ, Dulin AM, Fulton LA** (1988): *Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils*. Am J Vet Res, **49**, 42-45.
16. **Paglia DE, Valentine WN** (1967): *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med, **70**, 158-169.
17. **Panigrahy LC, Grumbles LC, Millar D, Naqi SA, Hall CF** (1978): *Antibiotic-induced immunosuppression and levamisole-induced immunopotention*. Avian Dis, **23**, 401-409.
18. **Purswell BJ, Dawe DL, Brown J, Williams DJ** (1988): *Effect of levamisole on immune function and reproductive performance in first-litter girls*. Am J Vet Res, **49**, 856-859.
19. **Smith KL** (1983): *Mastitis control: A discussion*. J Dairy Sci, **66**, 1790-1794.
20. **Sun Y, Oberley LW, Li Y** (1988): *A simple method for clinical assay of superoxide dismutase*. Clin Chem, **34**, 497-500.
21. **Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V** (1993): *Biyostatistik*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
22. **Symoens J, Rosenthal M, Debrabander M, Goldstein G** (1979): *Immunoregulation with levamisole*. Immunopathology, **2**, 49-68.

Geliş tarihi: 28.5.2001 / Kabul tarihi: 31.10.2001

**Yazışma adresi:**

Doç.Dr. Berrin Salmanoğlu  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Dışkapı, Ankara