



Determination of Oxidative Stress and Ceruloplasmin Levels in Sheep with Toxoplasmosis

Kadir BOZUKLUHAN¹ Oğuz MERHAN² Şemistan KIZILTEPE³
Ahmet HARMANKAYA⁴ Gürbüz GÖKÇE³

¹ Kafkas University, Kars School of Higher Vocational Education, Kars, Turkey

² Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Kars, Turkey

³ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kars, Turkey

⁴ Kafkas University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kars, Turkey

Received: 15.11.2019

Accepted: 11.03.2020

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the oxidative stress parameters as well as ceruloplasmin levels in sheep with toxoplasmosis. In order to investigate biochemical parameters, a total of 30 sheep were used in the study. According to ELISA test results, 20 sheep were infected with toxoplasmosis, while 10 healthy sheep sera had antibodies negative. Biochemical analysis included total oxidant capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC), oxidative stress index (OSI), nitric oxide (NO) and ceruloplasmin levels. TAC value was found to be statistically significantly lower, and TOC and OSI values were found to be higher in sheep with toxoplasmosis compared to those of the control group. NO and ceruloplasmin values were nonsignificantly. As a result, it was concluded from the data in the study that toxoplasmosis caused changes in oxidant and antioxidant capacity in sheep.

Keywords: Oxidative stress, Sheep, Toxoplasmosis

ÖZ

Toksoplazmozisli Koyunlarda Oksidatif Stres ve Seruloplazmin Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmanın amacı toksoplazmozisli koyunlarda oksidatif stres parametrelerinin yanı sıra seruloplazmin düzeylerinin belirlenmesidir. Çalışmada biyokimyasal parametreleri araştırmak için ELISA test sonuçlarına göre 20 tanesi toksoplazmozisle enfekte, 10 sağlıklı olmak üzere, toplamda 30 adet koyun kullanıldı. Biyokimyasal olarak total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), oksidatif stres indeksi (OSİ), nitrik oksit (NO) ve seruloplazmin düzeyleri belirlendi. Yapılan analizler sonucunda toksoplazmozisli koyunlarda TOK ve OSİ değerinin arttığı, TAK'ın azaldığı, NO ve seruloplazmin değerlerinin ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Sonuç olarak, çalışmadaki verilerden toksoplazmozisin koyunlarda oksidan ve antioksidan kapasitede değişikliklere neden olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, Koyun, Toksoplazmozis

GİRİŞ

Toksoplazmozis, hücre içi zorunlu bir protozoon (*Toxoplasma gondii*) tarafından oluşturulan zoonoz bir hastalıktır (Hökelek ve Açıcı 2009; Özcel 2013). Küçük ruminantlarda (üretim kaybı, tedavi gideri, kontrol harcamaları vb) ve insanlarda (tanı, tedavi, iş gücü vb) önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Özcel 2013; Varlı ve ark. 2016). Koyun ve keçilerde subklinik seyretmekle beraber, pnömni, enterit, nörolojik bozukluklar, ensefalit, canlı veya zayıf yavru doğumu, 3-4 gün içerisinde ölüm veya aborta neden olmaktadır (Hill ve ark. 2005; Özcel 2013; Özmütlu Çakmak ve Karatepe

2017). Organizmanın normal oksijen kullanımı sırasında mitokondri tarafından üretilen serbest radikaller lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişiklik oluşturarak oksidatif hasara neden olurlar (Tabakoğlu ve Durgut 2013; Karabulut ve Gülay 2016). Serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla görev yapan sistem antioksidan sistem olarak tanımlanmakta ve bu sistem radikal üretimini engelleyerek ve/veya oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak etki göstermektedir (Süleyman ve ark. 2018). Normalde organizmada oksidan ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusu iken, organizmada stres, kronik hastalık ve



enfeksiyonlar immun sistemi uyarmakta, bunun sonucu olarak da serbest radikal miktarının artması nedeniyle doku hasarı oluşur (Atmaca ve ark. 2015; Karabulut ve Gülay 2016). Yapılan çalışmalarda lokal ve/veya sistemik yangı ya da enfeksiyon durumlarında toplam oksidan/antioksidan kapasite (TOK, TAK) ve oksidatif stres indeksinin (OSİ) değişebileceğini ve non-invaziv belirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir (Celi ve Gabai 2015; Merhan ve ark. 2017b; Aydoğdu ve ark. 2018). Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentazlar vasıtasıyla L-arginininden L-sitrullin oluşturulması esnasında oluşan üründür. NO, bakteri, virus ve parazitlere karşı savunmada hem bu organizmalarla direk savaşta lökositler tarafından kullanılmakta hem de yangı doğurucu özelliğe sahip olan bir moleküldür (Atakişi ve Merhan 2017). Antioksidan sistemde yer alan seruloplazmin, hücreleri oksidatif hasara karşı koruma ve antimikrobiyal aktivite gibi fonksiyonlarının yanı sıra orta derecede önemli bir akut faz proteindir (Cerone ve ark. 2000). Yukarıdaki bilgiler ışığında çalışmadaki amacımız toksoplazmozis ile enfekte koyunlarda oksidatif stres parametreleri (TOK, TAK, OSİ ve NO) ile birlikte seruloplazmin düzeylerinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 2014/53 sayılı raporu uyarınca yürütüldü. Çalışmada ELISA test

sonuçlarına göre 20 adet toksoplazmozis ile enfekte ve 10 adet sağlıklı koyun kullanıldı. Hayvanların vena jugularis'inden antikoagülsüz tüplere kan örnekleri toplandı. TOK ve TAK düzeyi ticari test kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak yapıldı. OSİ ise [TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalan/L)/10 x TAK (mmol Troloks ekivalan/L)] formülü kullanılarak hesaplandı (Karababa ve ark. 2013). NO analizi, Miranda ve ark. (2001)'nin, seruloplazmin ise Colombo ve Ricerich'in (1964) bildirdikleri metotlara göre kolorimetrik olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. Analizlerde grupların normal dağılım gösterme durumu Kolmogorov-Smirnov testi yapılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösterme durumunda, grupların karşılaştırılmasında Student's T testi kullanıldı.

BULGULAR

Yapılan analiz sonucunda toksoplazmozisli koyunlar ile kontrol grubundaki hayvanlar karşılaştırıldığında TOK ($P<0.01$) ve OSİ ($P<0.05$) değerlerinin kontrol grubuna göre yükseldiği, TAK değerinin ($P<0.05$) ise kontrol grubuna göre düştüğü, NO ve seruloplazmin düzeyinin ise arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi (Tablo1).

Tablo 1. Toksoplazmozisli ve sağlıklı koyunlarda TAK, TOK, OSİ, NO ve seruloplazmin düzeyleri

Table 1. TAC, TOC, OSI, NO and ceruloplasmin levels in healthy and sheep with toxoplasmosis

	Kontrol	Enfekte	P
TAK (mmol Troloks Ekivalan/L)	1.35±0.15	0.81±0.09	*
TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekivalan/L)	6.22±0.49	9.45±0.64	**
OSİ (Arbitrary Birim)	0.50±0.06	1.35±0.24	*
NO ($\mu\text{mol/L}$)	33.14±2.18	39.71±3.69	NS
Seruloplazmin (mg/dL)	12.54±1.35	14.63±1.29	NS

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, NS: Önemsiz

TARTIŞMA ve SONUÇ

Toksoplazmozis, insanlar da dâhil olmak üzere sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında görülen, üretim kaybı, tedavi gideri ve kontrol harcamalarının yanı sıra insanlarda tanı, tedavi, iş gücü kaybı gibi önemli ekonomik kayıplara neden olan paraziter bir hastalıktır (Can 2010; Varlı ve ark. 2016). Hastalık ayrıca halk sağlığı yönünden de önemli bir yere sahip olup düşüklere, anomalilere veya ölü doğumlara neden olmaktadır (Dubey ve Jones 2008; Zhou ve ark. 2011; Varlı ve ark. 2016). Organizmada stres, kronik hastalık ya da toksoplazma gibi paraziter bir enfeksiyon durumunda immun sistemde görevli fagositöz yapan hücreler tarafından serbest radikal miktarı artmakta ve doku hasarları meydana gelmektedir (Aydoğdu ve ark. 2018). Birçok hastalığın ve yangısal durumun patogeneğinde rol oynayan oksidatif stresin belirlenmesinde birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler uzun zaman ve emek isteyen, karmaşık, pahalı yöntemlerdir ve oksidan/antioksidan moleküllerin tek tek ölçülmesi yalnızca ölçümü yapılan molekülün değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda oksidan/antioksidan dengenin

belirlenmesi için tek tek oksidanların ve antioksidanların ölçümünden ziyade, TAK ve TOK ölçümünün daha kolay olduğu bildirilmektedir (Erel 2004; Erel 2005). TOK düzeyinin TAK düzeyine oranı olarak tanımlanan OSİ ise oksidatif stres düzeyinin bir göstergesidir. Poxvirus ile enfekte koyunlarda (İsı ve ark. 2008; Bozukluhan ve ark. 2018), sığırlarda şap (Bozukluhan ve ark. 2013; Devci ve ark. 2018), omfalit (Bozukluhan ve ark. 2016), brusella (Merhan ve ark. 2017b), hipodermosis (Merhan ve ark. 2017a) ve askaridiosis (Bozukluhan ve ark. 2017) gibi viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklarda oksidatif stres geliştiği oksidan düzeyinin artarken antioksidan düzeyinin ise azaldığı bildirilmiştir. Yine Aydoğdu ve ark. (2018) köpeklerde yaptıkları bir çalışmada parvoviral enteritisli köpeklerde TOK ve OSİ'nin kontrol grubuna göre yükseldiğini bu nedenle oksidatif hasarın geliştiğini bildirmişlerdir. İlav olarak leishmaniasis (Gültekin ve ark. 2017), *Toxocara canis* ve *Toxascaris leonina* (Kozan ve ark. 2010) ile enfekte köpeklerde yapılan çalışmalarda da lipid peroksitlerin oluştuğu dolayısıyla da oksidatif stres geliştiği ve antioksidan miktarında azalma olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı parazit türünün yerleştikleri organ ve dokuda serbest radikal miktarını

artırdığı, bu artışa bağlı olarak hücre ve doku hasarlarının meydana geldiği bildirildi (Dede ve ark. 2000; Karsen ve ark. 2011). Oksidatif strese neden olarak hücre ve dokularda hasar oluşturan parazitlerden bir tanesi de *Toxoplasma gondii* olup yapılan bazı çalışmalarda, hayvanlarda (Al Kennany 2009) ve insanlarda (Karaman ve ark. 2008; Al Azzauy 2011) bu parazitin oluşturduğu oksidatif stresin hastalığın patogenezesinde rol oynadığı bildirildi. Yaptığımız çalışmada da toksoplazma ile enfekte koyunlarda TOK ve OSİ değerinin arttığı, TAK değerinin ise azaldığı belirlendi. Dolayısıyla da yukarıda bahsi geçen çalışmalarla elde ettiğimiz bulguların uyumlu olduğu görülmektedir. NO'in üretildiği yere göre farklı fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Bir nörotransmitter gibi davranma, kan basıncının düzenlenmesi gibi görevlerinin yanı sıra patojenlerle (virüs, bakteri, parazit) mücadelede de önemli bir moleküldür (Atakışı ve Merhan 2017). Chao ve ark. (1993) NO'in mikroglial hücrelerde *Toxoplasma gondii*'nin çoğalmasının baskılanmasında anahtar bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ise kontrol grubu ile toksoplazmozisli koyunlar arasında NO düzeyinin arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Seruloplazmin bakırın taşınması, organik aminlerin oksidasyonu, hücresel demir düzeyinin düzenlenmesi ve feroksidaz aktivitesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Healy ve Tipton 2007). Yapılan çalışmalarda oksijen radikallerinin etkilerini azaltarak hücreleri oksidatif zararlara karşı koruduğu ve antimikrobiyal gücü artırdığı bildirildi (Cerone ve ark. 2000, Bozukluhan ve ark. 2018). Çalışmada kontrol grubu ile toksoplazmozisli koyunlar arasında seruloplazmin düzeyinin arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, toksoplazmozisin koyunlarda oksidatif-antioksidatif kapasitede önemli değişikliklere neden olduğu belirlendi. Elde edilen bu bulgular özellikle hastalığıdaki yangı şiddetinin belirlenmesine ve tanısına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

III. Uluslararası Avrasya Tarım ve Doğa Bilimleri Kongresinde poster olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

KAYNAKLAR

- Al- Kennany ER (2009). Oxygen free radicals released in placenta of ewes naturally infected with *Toxoplasma gondii*. *Al-Anbar J Vet Sci*, 2, 1-6.
- Al-Azzaay AAM (2011). Evaluation of erythrocyte malondialdehyde, glutathione concentration and serum nitric oxide levels in patients with *Toxoplasma gondii*. *Ibn Al-Haitham J For Pure&Appl Sci*, 24, 1-6.
- Atakışı E, Merhan O (2017). Nitric oxide synthase and nitric oxide involvement in different toxicities In: Nitric Oxide Synthase Simple Enzyme-Complex Roles. Saravi SSS (Ed), 197-214, InTech, Croatia.
- Atmaca N, Çınar M, Güner B, Kabakçı R, Gazyağcı AN, Atmaca HT, Canpolat S (2015). Evaluation of oxidative stress, hematological and biochemical parameters during *Toxoplasma gondii* infection in gerbils. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 165-170.
- Aydoğdu U, Coşkun A, Başbuğ O, Ağaoğlu ZT (2018). Parvoviral enteritisli köpeklerde total oksidan-antioksidan durum ile oksidatif stres indeksinin değerlendirilmesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 32, 161-164.
- Bozukluhan K, Atakışı E, Atakışı O (2013). Nitric oxide levels, total antioxidant and oxidant and capacity in cattle with foot-and-mouth-disease. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 19, 179-181.
- Bozukluhan K, Merhan O, Gökçe Hİ, Ögün M, Atakışı E, Kızıltepe Ş, Gökçe G (2018). Determination of some acute phase proteins, biochemical parameters and oxidative stress in sheep with naturally infected sheepox virus. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 24 (3), 437-441.

- Bozukluhan K, Merhan O, Ögün M, Cihan M, Gökçe G (2016). Omfalitisi Buzağlarda Bazı Oksidatif Stres Parametre Düzeylerinin Belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 30 (2), 79-81.
- Bozukluhan K, Merhan O, Özcan A, Gökçe Hİ, Gökçe G (2017). *Toxocara vitulorum* ile doğal enfekte buzağlarda serum haptoglobin düzeyi, oksidatif belirteçler ve bazı biyokimyasal parametrelerin düzeyinin belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 75-79.
- Can MF (2010). Küçük ruminantlarda toksoplazmoz'un hayvan sağlığı ekonomisi yönünden değerlendirilmesi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 5, 167-174.
- Celi P, Gabai G (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Front Vet Sci*, 2, 1-13.
- Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ (2000). Cytochrome C oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res*, 73, 269-278.
- Chao CC, Anderson WR, Hu S, Gekker G, Martella A, Peterson PK (1993). Activated microglia inhibit multiplication of *toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clin Immunol Immunopath*, 67 (2), 178-183.
- Colombo JP, Richterich R, (1964). Zurbestimmung des caeruloplasmin im plasma [on the determination of ceruloplasmin in plasma]. *Schweiz Med Wochenschr*, 94, 715-720.
- Dede S, Değer Y, Değer S, Alkan M (2000). Bazı endoparazitlerle (*Fasciola sp. + Trichostrongylidae sp. + Eimeria sp.*) enfekte koyunlarda lipit peroksidasyonu ve antioksidan durumunun saptanması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 24(1), 190-193.
- Deveci HA, Kükürt A, Nur G, Alpaz M, Merhan O, Bozukluhan K, Yılmaz V, Karapehlivan M (2018). Serum paraoxonase activity and total sialic acid in sheep with foot and mouth disease. *Med Weter*, 74 (3), 199-202.
- Dubey JP, Jones JL (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 38, 1257-1278.
- Erel Ö (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
- Erel Ö (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38, 1103-1111.
- Gültekin M, Paşa S, Ural K, Balıkcı C, Ekren Aşıcı GS, Gültekin G (2017). Visseral leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde oksidatif durum ve lipid profili. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 41, 183-187.
- Healy J, Tipton K (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm*, 114, 777-781.
- Hill DE, Chirukandath S, Dubey JP (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*, 6, 41-61.
- Hökelek M, Açıcı M (2009). Toxoplasmosis In: Zoonozlar Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar. Doğanay M, Altıntaş N (Ed), 803, Bilimsel Tıp Yayınevi, Türkiye.
- İssi M, Gul Y, Yılmaz S (2008). Clinical haematological and antioxidant status in naturally poxvirus infected sheep. *Rev Med Vet*, 159, 54-58.
- Karababa F, Yesilova Y, Turan E, Selek S, Altun H, Selek S (2013). Impact of depressive symptoms on oxidative stress in patients with psoriasis. *Redox Rep*, 18, 51-55.
- Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sağ Bil Enst Derg*, 4(1), 50-59.
- Karaman U, Celik T, Kiran TR, Colak C, Daldal NU (2008). Malondialdehyde, glutathione, and nitric oxide levels in *Toxoplasma gondii* seropositive patients. *Korean J Parasitol*, 46, 293-295.
- Karsen H, Sünnecioglu M, Ceylan RM, Bayraktar M, Taşkın A, Aksoy N, Erten R (2011). Evaluation of oxidative status in patients with *Fasciola hepatica* infection. *African Health Sci*, 11, 14-18.
- Kozan E, Avcı G, Kırcalı SF, Birdane FM, Köse M (2010). Askaridiazisli ve tedavi edilmiş köpeklerde antioksidan düzeylerinin ve bazı biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57, 93-97.
- Merhan O, Bozukluhan K, Gokce HI (2017a). Acute phase proteins and biochemical and oxidative stress parameters in *Hypoderma spp.* infested cattle. *J Hellenic Vet Med Soc*, 68, 535-540.
- Merhan O, Bozukluhan K, Kuru M, Büyüf F, Özden Ö, Kükürt A (2017b). Investigation of oxidative stress index and lipid profile in cattle with Brucellosis. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 23 (6), 933-937.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62-71.
- Özel MA (2013). Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. 1. Baskı, Meta Basım, İzmir.
- Özmutlu Çakmak D, Karatepe B (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep from Nevşehir province in Turkey. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 41, 148-151.

Süleyman H, Gül V, Erhan E (2018). Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Derg.* 1(1), 1-4.

Tabakoğlu E, Durgut R (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg.* 3, 69-75.

Varlı C, Türköz İ, Aydemir S, Emre S, Şimşek F, Yıldırım MT (2016). Toksoplazmoz, *Okmeydanı Tıp Derg.* 32, 24-28.

Zhou P, Chen Z, Li HL, Zheng H, He S, Lin RQ, Zhu XQ (2011). Toxoplasma gondii infection in humans in China. *Parasites&Vectors.* 4, 165.