

## Effects of Age on The Concentrations of Plasma Cytokines and Lipid Peroxidation in Sheep

Mehmet Naci SALİM<sup>1</sup>, İbrahim DURMUŞ<sup>2</sup>, Mehmet BAŞEĞMEZ<sup>3</sup>, İsmail KÜÇÜKKURT<sup>4</sup>,  
Abdullah ERYAVUZ<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Research and application farm, TR-03200 Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Şubut Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 03100, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>3</sup>Pamukkale University, Acıpayam Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 20100, Denizli, Turkey

<sup>4</sup>Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Department of Biochemistry, TR-03200 Afyonkarahisar, Turkey

<sup>5</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effects of age on blood cytokine levels and lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) levels and thyroid hormones levels in sheep of different ages. Female sheep of lamb (4-6 months), young (12-18 months) and adult (36-40 months) from a herd in same care and feeding conditions were used in the study. Blood samples were taken before morning feeding from 30 sheep in total, 10 heads from each age group. MDA, glutathione (GSH), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and T3 and T4 levels were determined in blood samples. Young animals have significantly higher MDA and lower IL-6 levels than lambs. There was no difference between age groups in terms of GSH, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , T3 and T4 levels. As a result, age has an effect on blood lipid peroxidation and IL-6 levels in sheep.

**Key words:** Age, sheep, cytokines, lipid peroxidation, thyroid hormones.

\*\*\*

### Koyunlarda Plazma Sitokin ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerine Yaşın Etkisi

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, değişik yaşlardaki koyunlarda kan sitokin düzeyleri ve lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) seviyesi ile tiroid hormonları düzeylerine yaşın etkilerinin belirlenmesidir. Çalışmada, aynı bakım ve besleme şartlarındaki bir sürüden kuzu (4-6 aylık, kuzu), genç (12-18 aylık) ve ergin (36-40 aylık) dişi koyun kullanıldı. Her bir yaş grubundan 10 baş olmak üzere toplam 30 koyundan sabah yemlemesinden önce kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde MDA, glutatyon (GSH), interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) ile T3 ve T4 düzeyleri belirlendi. Genç koyunların kuzularınkinden önemli oranda daha yüksek plazma MDA ve daha düşük IL-6 düzeylerine sahip oldukları bulundu. GSH, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , T3 ve T4 düzeyleri bakımından yaş grupları arasında farkın olmadığı saptandı. Sonuç olarak, koyunlarda kan lipid peroksidasyonu ve IL-6 düzeylerine yaşın etkisi olduğu söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Yaş, koyun, sitokinler, lipid peroksidasyonu, tiroid hormonları.

To cite this article: Salim M. N. Durmuş İ. Başeğmez M. Küçük Kurt İ. Eryavuz A. Effects of Age on The Concentrations of Plasma Cytokines and Lipid Peroxidation in Sheep. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):37-44.

Submission: 22.09.2020 Accepted: 05.01.2021 Published Online: 09.02.2021

ORCID ID; MINS: 0000-0002-4805-576X; İD: 0000-0003-1360-8843; MB: 0000-0002-9994-1251; İK: 0000-0003-0198-629X; AE: 0000-0001-8602-2400

\*Corresponding author e-mail: ervavuz@aku.edu.tr

## GİRİŞ

Yaşlanma, fiziksel özelliklerdeki değişiklikler ve birçok fizyolojik fonksiyonun azalmasıyla ilişkili olup, tüm organizmalarda genetik, hücre, doku ve sistem seviyelerinde de zararlı değişikliklere neden olmaktadır. Yaşlanmaya bağlı bu değişikliklerin temel mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bu farklı değişiklikleri açıklayabilecek temel fizyolojik mekanizmaları belirlemeye çalışmaktadır.

Sığır ve koyun gibi ruminant hayvanların verim kabiliyetleri (örn., et, süt, yavru vs.) ile yaş arasında sıkı bir ilişki bulunması nedeniyle, ekonomik değerleri de yaşa göre değişmektedir (Şeker ve ark., 2017, Kandemir ve ark., 2019). Koyunlarda yaş tayini, alt çenede bulunan süt kesici dişlerinin düşerek yerine daimi dişlerin gelmesine bakarak belirlenebilmekte ve dişlerin değişiminde ırk, beslenme ve hayvanın durumu da etkili olabilmektedir. Dişlerin değişimine göre; erken gelişen, geç gelişen ve normal gelişen olmak üzere üç bölümde koyunların ırk ayırımı yapılabilmektedir. Ortalama maksimum ömrün 12 yıl olduğu koyunların, 7 ve 8 yaşına geldiklerinde diş yapılarının iyice bozulduğu, dökülmeye başladığı ve koyunların yaşlandığı ifade edilmektedir (Akçapınar, 1994). Koyunlarda dişlerin durumu yaşa bağlı olarak değiştiği için, yaşları ilerledikçe diş yapıları bozulmakta ve merada yedikleri yemleri gereği gibi değerlendirememektedirler. Bu da verimlerinin azalmasına yol açmaktadır.

Koyunculukta doğumdan sonra 6 aylık olana kadar kuzu, 6-12 aylık olanlara toklu, 1 yaşından 2 yaşına kadar dişilere şişek ve 2 yaşından büyük olan dişilere ise koyun adı verilmektedir (Şeker ve ark., 2017). Koyunlar kuzu, şişek ve erişkin dönemlerinde yaşadıkları fizyolojik değişikliklere (puberta, gebelik, doğum, laktasyon gibi) bağlı olarak kan metabolitlerinde de değişimler meydana gelmektedir (Antunović ve ark., 2011). Bu değişiklikler bağışıklık sisteminde de kendini göstermekte ve hayvanların enfeksiyonlara karşı dirençlerini ortaya koymaktadır (Craig ve ark., 2014, Fernández ve ark., 2016). Nitekim, kuzuların bünyelerinde hastalıklara karşı koyacak bağışık maddeleri (IgG) yaklaşık 2 haftalık olduğunda üretmeye başladıkları ve 3-4 aylık yaşa kadar yeterli seviyede üretebilme kabiliyetine ulaştıkları bilinmektedir (Şeker ve ark., 2017). Bu nedenle kuzular doğar doğmaz alacakları kolostrumdan sağladıkları pasif bağışıklık sayesinde 3-4 aylık yaşa kadar hastalıklardan korunmaktadır (Foster ve Hileman, 2015). Genç kuzularda, gastrointestinal parazitlere karşı etkili ve koruyucu bağışıklık üretmedeki yetersizlik, 6 aylıktan küçük kuzuların helmintlere maruz kaldıktan sonra bağışıklık geliştiremediği, buna karşın, aynı maruz kalmanın yaşlı koyunlarda koruyucu bağışıklık tepkileri ile sonuçlandığı bir dizi çalışma ile gösterilmiştir (Dobson ve ark., 1990, Craig ve ark., 2014).

Organizmanın en önemli koruyucu fizyolojik sistemi olan bağışıklık sistemi, diğer sistemlerle birçok bağlantısı bulunmakta ve sinir sistemi-endokrin sistem-bağışıklık sistemi ekseninin bir parçası olarak kabul edilmektedir (Fulop ve ark., 2018). Vücuttaki homeostazın korunmasına karşı en belirgin zorluklardan birini enfeksiyon oluşturmaktadır. Bir enfeksiyon sırasında organizmalar, hayatta kalmak için kaynaklarını; üreme, büyüme ve metabolizma gibi faaliyetlerden çeşitli fizyolojik ve davranışsal tepkilere yönlendirmek zorunda kalmaktadır. Bu mücadelenin düzenleyicisi olan nöroendokrin sistem, üreme gibi faaliyetlerin askıya alınmasıyla ilgili vücudun bağışıklık stresine yanıtında önemli bir rol oynamakta ve enfeksiyonla mücadelenin güç kazanmasını sağlamaktadır (Pollak ve Yirmiye, 2002). Yaşa bağlı olarak çeşitli immünolojik parametrelerin değiştiği, bunun da bağışıklık yetmezliğine ve mikrobiyal enfeksiyon sonrası yaşlılarda morbidite ve mortalitede bir artışa yol açtığı ifade edilmektedir (Westendorp, 2004, Yalçın ve ark., 2011, Suchard, 2015, Pawalec, 2018). Yaşlanmayla birlikte meydana gelen bu değişikliklere; bağışıklık sistemi içinde ve çeşitli başka fizyolojik (bağışıklık olmayan) süreçlerde yer alan önemli moleküllerden sitokinlerin üretimindeki değişiklikler de katılmakta ve yaşa bağlı olarak kan sitokin düzeyleri yükselmektedir (Stowe ve ark. 2010, Huang ve ark., 2011, Suchard, 2015, Pawalec, 2018). Yaşa bağlı olarak bağışıklık sisteminin işlevini aşamalı olarak bozulması "İmmünoşenesans" olarak tanımlanmakta ve yaşın ilerlemesiyle birlikte bağışıklık sisteminde meydana gelen değişiklikleri ifade etmektedir (Yalçın ve ark., 2011, Pawalec, 2018). Bu nedenle, ruminant hayvanlarda yaşa bağlı sitokin biyolojisindeki değişikliklerin belirlenmesi, bu hayvanlarda yaşlanmanın hastalık direncini ve genel sağlığı etkileyen bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerine yönelik değerli veriler sağlayabilir. Nitekim, sitokinlerin ruminant hayvanların hastalıklarının teşhisinde kullanılmasının, etkili bir teşhis yöntemi sunabileceği (Scheerlinck ve Yen 2005), koyunlarda ise proenflamatuar sitokinlerin kan seviyelerindeki değişikliklerin izlenmesinin, enfeksiyon ve enflamasyon sırasında değerli teşhis ve prognostik bilgi sağlayabileceği ifade edilmektedir (Kumar ve ark., 2010). Memelilerde daha önce yapılan çalışmalarda sitokin üretimine yaşın etkisinin olduğu yönündeki bildirimler (Stowe ve /ark., 2010, Yalçın ve ark., 2011, Fulop ve ark., 2018, Pawalec, 2018) bulunmasına rağmen, ruminant hayvanlarda yapılan çalışmalar arasında yaşın sitokin üretimi ve düzenlenmesine etkileriyle ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ruminant hayvanlarda proenflamatuar sitokinlerin yaşa bağlı değişimlerine yönelik anlayışımızı geliştirmek için bu çalışmada; farklı yaşlardaki koyunların kanındaki proenflamatuar sitokin düzeyleri ile bu düzeylerde etkisi olabilecek oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada; Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKÜHADYEK – 112-18 referans nolu 49533702/163 sayılı araştırma) onay alındıktan sonra, Afyonkarahisar ili Bayat ilçesinde bulunan bir özel sektöre ait çiftlikteki farklı yaşlardaki Merinos ırkı koyun sürüsünde bulunan koyunlardan 30 baş koyun kullanılmıştır. Hayvanların aynı ortam ve barınma şartları ve sürüde bulunan hayvan sayısı göz önüne alınarak, 6 aylık (4-6 aylık, kuzu) 10 baş, 1 yaş üzeri (12-18 aylık, şişek) 10 baş ve 3 yaş üzeri (36-40 aylık, ergin koyun) 10 baş toplam 30 dişi koyunlardan (Şeker ve ark., 2017) sabah yemlemesinden önce antikoagulanlı tüplere kan alınmıştır. Alınan kanların 3000 rpm/dk devirde 10 dakika santrifüj işlemi yapıldıktan sonra elde edilen plazmalardan lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA ve hücre içi bir antioksidan olan GSH düzeyleri analiz edildikten sonraki kalan kısım diğer analizler yapılana kadar -20 °C de derin dondurucuda saklanmıştır.

Kan örneklerinde lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA düzeyleri Draper ve Hadley'in (1990) çift kaynatma yöntemi kullanılarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kan örneklerinde GSH düzeyleri; 5-5'-ditiyobis [2-nitrobenzoik asit] [DTNB:3-karboksi-4-nitrofenil disülfid: Elman Ayracı] sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girdiğinde bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks yapı oluşturur. Bu sarı bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tespit edildi (Beutler ve ark., 1963). Derin dondurucuda saklanan plazmaların çözdürülmesinden sonra IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6

düzeyleri ile T3 ve T4 düzeyleri ticari kitler (SUNRED, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd., Çin) kullanılarak, üretici firmanın katoloğunda önerdiği gibi, ELİSA cihazında belirlendi.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 22,0 istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulandı, veriler "ortalama  $\pm$  standart hata" olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  kabul edildi.

## BULGULAR

Değişik yaş grubuna sahip koyunların plazma GSH, lipid peroksidasyonu ve sitokin düzeylerine yönelik veriler Tablo 1'de verilmiştir. Genç (şişek) hayvanların, kuzularınkinden önemli oranda daha yüksek ( $p < 0.05$ ), lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA düzeylerine sahip olduğu, GSH düzeyleri bakımından ise yaş grupları arasında önemli bir farklılığın ( $p > 0.05$ ) olmadığı tespit edildi (Tablo 1). Farklı yaşlardaki koyunlardaki sitokinlere yönelik elde edilen veriler değerlendirildiğinde, şişek koyunların plazma IL-6 düzeylerinin kuzularınkinden göre önemli olmak üzere ( $p < 0.05$ ), diğer yaş grubu hayvanlardan düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 1). Plazma IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , T3 ve T4 düzeyleri bakımından incelenen yaş grupları arasında istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığı bulundu (Tablo 1).

**Tablo 1:** Koyunlarda plazma GSH, lipid peroksidasyonu ve sitokin düzeylerine yaşın etkisi (n=10, Ort $\pm$ SH).

**Table 1:** The affects of age on plasma GSH, lipid peroxidation and cytokines in sheep (n=10, mean $\pm$ SH).

Parametreler	Kuzu	Genç Koyun	Ergin Koyun
GSH (mg/dl)	0.085 $\pm$ 0.0064	0.099 $\pm$ 0.0068	0.085 $\pm$ 0.0089
MDA ( $\mu$ mol/L)	0.078 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.086 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.085 $\pm$ 0.002 <sup>ab</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	1.247 $\pm$ 0.074	1.572 $\pm$ 0.175	1.393 $\pm$ 0.242
IL-6 (pg/ml)	1.149 $\pm$ 0.172 <sup>a</sup>	0.652 $\pm$ 0.101 <sup>b</sup>	1.029 $\pm$ 0.195 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	1.118 $\pm$ 0.054	1.179 $\pm$ 0.140	1.053 $\pm$ 0.177
T3 ( $\mu$ g/L)	1.691 $\pm$ 0.070	2.066 $\pm$ 0.175	1.638 $\pm$ 0.259
T4 ( $\mu$ g/L)	0.892 $\pm$ 0.040	1.068 $\pm$ 0.098	0.883 $\pm$ 0.149

a,b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ). GSH: Glutasyon, MDA: Malondialdehit, IL-1 $\beta$ : Interleukin 1 Beta, IL-6: Interleukin 6, TNF-  $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör Alfa.

## TARTIŞMA

Koyunlarda yaşlanmanın biyolojik etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve ruminant hayvanlarda

bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi için alınacak tedbirlere yönelik yeni deliller sunmak için yapılan bu çalışmada; kuzu, genç (şişek) ve ergin olmak üzere farklı yaş grubu koyunlardan alınan kan örneklerinde proenflamatuvar sitokinler ile GSH, MDA ve tiroid

hormonlarının düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmada, farklı yaşlardaki koyunlarda bağışıklığın düzenlenmesinde önemli aracı moleküllerden olan proenflamatuar sitokin düzeylerindeki değişimleri incelemek için, aynı bakım ve besleme şartlarına sahip bir sürüdeki kuzu, şişek ve erişkin dönemdeki koyunlardan kan örnekleri alınmıştır. Koyunlarda ileri yaşın 7 ve 8. yaşlarda görüldüğü bildirimi (Akçapınar, 1994) dikkate alınır, çalışmada kullanılan koyunların yaşamın ilk evrelerinde oldukları ve immünoşenesansın görüleceği yaşlarda olmadıkları görülmektedir.

Oksidatif stres; lipitler, proteinler ve DNA gibi önemli hücresel bileşenlerin oksidasyonu nedeniyle, hücre hasarına ve ardından hücre ölümüne neden olabilmektedir (Gilgun-Sherki ve ark., 2001). Oksidatif stres, vücutta reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi, vücudun onları nötralize etme ve ortadan kaldırma yeteneğini aştığında ortaya çıkmaktadır. Vücut dokularının bu strese duyarlılığı, oksidatif stres derecesi ile antioksidan kapasite arasındaki genel dengenin bir fonksiyonudur. Moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen, oksidatif strese yol açan ROT'nin sitokin üretiminde önemli rol oynadığı bildirilmekte ve NF- $\kappa$ B ve aktivatör protein-1 gibi önemli redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  genlerinin ekspresyonunun koordinasyonuna yol açtıkları ileri sürülmektedir (Conner ve Grisham, 1996, Elmarakby ve Sullivan, 2012). Oksidatif ajanların fagositik hücreleri uyararak çok miktarda sitokin ve kemokinlerin salınmasına yol açtıkları, ekstrasellüler matriks ve hücre membranlarına doğrudan hasar vererek doku harabiyetine yol açtıkları bildirilirken, lizozomal membranları da bozarak nükleik asitlerin parçalanmasına neden oldukları belirtilmektedir (Zhao ve ark 2007). Oksidatif stresdeki artışlar, enflamatuar sitokinlerin üretimini artırabilmekte ve benzer şekilde, enflamatuar sitokinlerdeki bir artış da serbest radikallerin üretimini uyarabilmektedir (Elmarakby ve Sullivan, 2012).

Hücre membranında bulunan lipidlerin oksidatif bozulması uzun süredir bilinmekle birlikte, oksidatif stresin yol açtığı lipit peroksidasyonundaki kimyasal süreçlerin patoloji ve toksikolojideki önemine yönelik ilgi hala gündemdeki yerini korumaktadır. Vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda plazmada yükselen ilk lipit peroksidasyon biyobelirteçlerinden ve hücrelerde çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biri, lipit peroksidat yıkımının önemli bir metaboliti olan, MDA'dir (Eryavuz ve ark., 2015). Bu nedenle, vücutta serbest radikallerdeki bir artış, MDA'nın aşırı üretimine neden olmakta ve oksidatif stres durumunun bir belirteci olarak kullanılmaktadır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar; şişek koyunların kanında, kuzularda önemli olmak ( $P < 0.05$ ) üzere diğer hayvanlardakine göre MDA düzeylerinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 1). Bu bulgu, şişek

koyunlarda, oksidatif stresin önemli bir hücresel kaynağı olan ROT üretiminin arttığını göstermektedir. Canlıların temel fizyolojik özelliklerinden biri olan üreme özelliği, koyunların çoğalması ve neslinin devamlılığı için de gerekmektedir (Valasi ve ark., 2012, Takcı, 2019). Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik özellik gösteren hayvanlardır (Akçapınar, 1994). Çalışmada şişek koyunlarda gözlenen MDA düzeyindeki artış, bu yaş grubu hayvanlarda cinsel olgunluk döneminden (puberta) kaynaklanmış olabilir (Pérez-Navero ve ark., 2009, Thompson ve ark., 2019). Nitekim, ülkemizde koyunlara koç katımının 20 aylık yaştan sonra başladığı bildirilmektedir (Akçapınar, 1994, Sezenler ve Özder, 2007). Bu çalışmada elde edilen bulgu; hormonal değişiklikler, somatik büyümenin hızlanması ve hücresel metabolizmada bir artış gözlenen insanlarda olduğu (Pérez-Navero ve ark., 2009) gibi koyunlarda da lipit peroksidasyon seviyelerinin cinsel olgunluk döneminde (puberta) değişebileceğini düşündürmektedir. Nitekim, atlarda yapılan bir çalışmada da benzer bulgular bulunmuştur (Smarrsh ve Williams, 2016).

GSH, tüm memeli dokularında oksidatif strese karşı antioksidan savunmada yer alan önemli bir molekül olması nedeniyle, birçok stres formundan hücrelerin korunması için kritik bir savunma sistemini sağlamaktadır (Shelly ve Lu, 2013). Yaşlanmaya bağlı olarak, GSH seviyeleri bir takım dokularda düşmekte, böylece hücreleri strese yenik düşme riskine sokmaktadır (Maher, 2005). Bağışıklık sisteminin, lenfoid hücrelerin hassas bir şekilde dengelenmiş GSH seviyesine sahip olması durumunda en iyi sonucu verdiği ve hücre içi GSH seviyesindeki orta dereceli değişikliklerin bile lenfosit fonksiyonları üzerinde önemli etkileri bulunduğu bildirilmektedir (Dröge, ve Breitkreutz, 2000). Dokularda GSH tükenmesinin, oksidatif stresin artmasına ve sonuçta oksidatif stres aracılı proenflamatuar sitokinlerin kanda yükselmesine sebep olduğu bildirilmektedir (Shelly ve Lu, 2013). Nitekim, Pena ve ark. (1999), kan ve dokularda GSH düzeyini artıran ilaçlar kullanıldığında, proenflamatuar sitokin üretiminin engellenebileceğini göstermişler ve bu bulgunun, çoklu sitokin aracılı hastalık süreçleri için önemli terapötik etkilerinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, in vitro, endotoksinlere aralıklı olarak maruz kalan alveolar epitel hücrelerine bir GSH öncüsü olan N-asetil-l-sistein (NAC) uygulandığında, TNF- $\alpha$  salgılanmasının azaldığı ve GSH düzeyinin arttığı gözlenmiştir (John ve Haddad, 2011).

Çalışmada, proenflamatuar sitokinlerin üretiminde etkisi olduğu bildirilen (Pena ve ark., 1999, John ve Haddad, 2011) kan GSH düzeyleri bakımından, bu çalışmada incelenen yaşlardaki koyunlar arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. Bu bulgu, koyunların yaşamlarının ilk 3 yılına kadar GSH sentez ve düzenlenmesinde bir değişikliğin olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, daha ileri yaşlardaki koyunlarda GSH sentezindeki değişimlerin tespit

edilmesi gerekmektedir. Ruminant hayvanlarda GSH sentezinin yaşa bağlı olarak nasıl bir değişim gösterdiğinin belirlenmesi, bu hayvanlarda yaşa bağlı verim ve sağlığı etkileyen kronik hastalıkların patogenezinde oynadığı rolün daha iyi anlaşılmasına ve bu sayede söz konusu hastalıkların tedavi yöntemlerinde iyileşmeye katkı sağlayabilir. Nitekim, insanlarda GSH sentezinde meydana gelen düzensizliklerin; yaşlanma, diyabet, pulmoner ve hepatik fibroz, alkolik ve kolestatik karaciğer hasarları gibi birçok patolojik durumun patogenezinde katkıda bulunduğu dair kanıtların olduğu bildirilmektedir (Shelly ve Lu, 2013). Ruminant hayvanlarda yaşa bağlı GSH değişimlerine yönelik henüz çalışmalar çok yetersiz olmakla birlikte, farklı yaşlarda ve yaş ilerlemiş ruminant hayvanlarda yapılacak yeni çalışmalarla GSH sentezindeki düzensizlikler ve şayet varsa bu düzensizlikten sorumlu moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması, bu hayvanlarda görülen hastalıklara yeni terapötik yaklaşımlar sağlayabilir.

Enfeksiyon veya enflamasyona karşı doğal bağışıklık sisteminin yanıtını değerlendirmek için kan sitokin seviyeleri kullanılabilir (Burton ve ark., 2009). Çok düşük düzeylerde hücrelerin ve dokuların işlevini düzenleyebilen bir grup çözünebilir protein olan sitokinler arasında, bu çalışmada incelenen IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'nın plazma düzeyleri bakımından sadece şişek koyunlarda IL-6 düzeylerinde önemli bir azalmanın olduğu diğerlerinde ise anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edildi. Bağışıklık sisteminin sinyal molekülleri olan sitokinlerin, konakçı bağışıklık mekanizmalarında yer alan çeşitli hücrelerin yanıtlarını uyarabilme veya baskılayabilmelerinden dolayı, çalışmada elde edilen bu bulguların, koyunların uygun bağışıklık sistemi aktivitesi için yaşa bağlı değişimlerini göstermesi bakımından önemli olduğu söylenebilir.

Aktive edilmiş monositler tarafından salgılanan bir proenflamatuar sitokin olan IL-1 $\beta$ , ateş üreterek ve lökositlerin enfeksiyon bölgelerine akmasını teşvik ederek patojenlere karşı savunma tepkisine katkıda bulunur. Çalışmada, farklı yaşlardaki koyunların kan IL-1 $\beta$  düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olmaması, bu çalışmadaki 4-6 aylık kuzuların da erişkin koyunların sitokin üretim düzeylerine sahip olduklarını göstermektedir. Fernández ve ark. (2016), koyunlarda IL-1 $\beta$ 'nin enflamatuar hastalıkların erken tespiti ve seyri ile patolojik sürecin şiddetinin değerlendirilmesi için bir araç olarak kullanılabilirliğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında sağlıklı koyunlarda yaşamın ilk üç yılında kan IL-1 $\beta$  düzeylerinde önemli bir değişimin olmadığı söylenebilir.

Endotelial hücrelerin geçirgenliği ile anormal anjiyogenezi artırarak ve prostasiklin sentezini inhibe ederek vasküler fizyolojiyi derinden değiştirebilen (Lockwood ve ark., 2008) IL-6, insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak kanda düzeyi yükselmektedir (Maggio ve ark., 2006, Huang ve ark., 2011). Genç koyunlarda; yaşamlarının ilk yazının uzun günlerini ve

ardından sonbaharın kısa günlerini deneyimledikten sonra, steroid hormonların negatif geri bildirimdeki (feed back) azalmalara karşı nöroendokrin duyarlılıklarının ve yumurtalık döngülerini başlatmak için yüksek frekanslı GnRH salınımlarının başlaması gerekmektedir (Neito ve ark., 2013, Foster ve Hileman, 2015.). Geniş anlamda bakıldığında, yetişkinliğe geçişi zamanlayan iç ve dış sinyaller nöroendokrin cevabı oluşturmakta ve bu cevap esnasında gelişen metabolitler de yeterli büyümenin gerçekleştiğine işaret etmektedir (Antunović ve ark., 2011, Takcı, 2019, Thompson ve ark., 2019). Bu çalışmada, şişek koyunlarda insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak kan düzeyinde artışlar olduğu bildirilen (Yalçın ve ark., 2011, Huang ve ark., 2011) IL-6'daki azalma da koyunlardaki bu işaretlerden biri olabilir. Bu görüşü desteklemek için koyunlarda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. IL-6'nın, polimorf nükleer lökositlerin kemik iliğinden geçiş süresini kısalttığı ve dolaşıma salınımlarını hızlandırdığı bildirimi (Suwa ve ark., 2000) dikkate alındığında, bu çalışmadaki genç (şişek) koyunların dolaşımında IL-6 seviyesindeki azalmanın, dolaşımdaki polimorf nükleer lökosit sayısına da etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Bağışıklık sistemindeki sitokinlerin rolü, diğer bağışıklık sistemi hücrelerini olayın içine katarak ve aktive ederek konakçı yanıtını yükseltmektedir. Proenflamatuar sitokinlerden TNF- $\alpha$ , esas olarak makrofajlarda ve monositlerde üretilen ve sistemik enflamasyonda rol oynayan bir pleiotropik sitokindir (Dhama ve ark., 2008). TNF- $\alpha$ , kademeli bir şekilde sitokin süreçlerini başlatarak ve vasküler geçirgenliği artırarak lokal bir enflamatuar yanıtı neden olmakta, böylece makrofaj ve nötrofillerin bir enfeksiyon bölgesine toplanmasını sağlamaktadır (Pamir ve ark., 2009). Enflamatuar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olması nedeniyle, TNF- $\alpha$  sitokinlerinin aşırı üretimi, bir dizi otoimmün bozukluğun yanı sıra enflamatuar koşulların gelişimi ile de ilişkilendirilmekte ve bu nedenle birçok enflamatuar bozukluğun tedavisinde TNF- $\alpha$  blokerleri terapötik amaçla kullanılmaktadır (Dhama ve ark., 2008). Bu çalışmada incelenen yaşlardaki koyunlarda kan TNF- $\alpha$  düzeyleri bakımından farklılığın olmaması, koyunlarda yaşamın ilk 3 yılına kadar TNF- $\alpha$ 'nın aşırı üretiminin olmadığına işaret etmektedir. Koyunlarda proenflamatuar sitokinlerinin kan düzeylerine yaşın etkisi ile ilgili herhangi bir referans alınacak çalışma bulunamaması nedeniyle, bu çalışmada elde edilen değerler ilk verileri oluşturmaktadır. Bu bulgular, ruminant hayvanlarda yaşa bağlı kan sitokin düzeyindeki değişimlere yönelik çalışmalara katkı sağlaması yanında, hayvanların çeşitli hastalıklarının kontrol edilmesinde sitokin uygulamalarının potansiyeline yönelik gerçekleştirilecek yeni çalışmalara da veri sağlayabilir.

Ruminant hayvanlarda tiroid hormonlarının bağışıklık sistemi de dahil hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rolleri bulunması nedeniyle

(Huszenicza ve ark., 2002), tiroid hormonların plazma düzeylerindeki değişimler, bağışıklık sistemler üzerinde etkiler içerebilmektedir (Marchiori ve ark., 2015, Kandır ve Keskin, 2016). Nitekim, Tayde ve ark. (2017), hipotiroidili hastalarda TNF- $\alpha$ , IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerinin yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidizimli hastalarda, kontrollere kıyasla plazma proenflamatuar sitokinlerden IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$ , düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu ve antienflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğunun gözlemlendiği bildirilmektedir (Marchiori ve ark., 2015). Bu çalışmada, farklı yaşlardaki koyunlardan alınan kan örneklerinde tiroid hormonları bakımından anlamlı bir farkın oluşmaması, yaşamın ilk 3-4 yılına kadar tiroid hormon sentezi ve salınımında yaşın etkisinin olmadığını ve sitokinlerden IL-6'da görülen değişikliklere katkısının olmadığını göstermektedir. İmmunolojik etkilerin proenflamatuar sitokinlerin seviyesi ölçülerek değerlendirilmesinin mümkün olduğu yönündeki bildirim (Elsabahy ve Wooley, 2013) dikkate alınır, çalışmada farklı yaş koyunlarda elde edilen bu bulguların, yaşamın ilk 3 yılına kadar koyunların immünolojik durumlarının bozulmayacağına ve bağışıklık homeostazının etkilenmeyeceğine işaret etmektedir.

## SONUÇ

Farklı yaşlardaki koyunlarda proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'nın kan düzeyleri ve bu düzeylere etkisi olabilecek lipid peroksidasyonu ile tiroid hormonlarının incelendiği bu çalışmada elde edilen bulgular; koyunlarda 3 yaşına kadar yaşın bağışıklık homeostazını etkilemediğine ve bağışıklık sisteminin daha fazla aktivasyonuna etkisinin olmayabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, ruminant hayvanlarda yaşın sitokinlerin üretim ve düzenlenmesi üzerindeki etkileri ile bu etkilerin ruminant sağlık ve verime sağladığı katkıları yeni bir alandır. Bu alanda daha ileri yaşlardaki hayvanlarda yapılacak yeni araştırmalar, yaşın ruminant hayvanların bağışıklık sisteminde oynadığı rolünün ve hastalıklara direnç üzerindeki fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Çalışmada özellikle genç koyunlardan elde edilen bulgular; yaşın belirli dönemlerinde meydana gelen fizyolojik değişimlerin oksidatif stres ve proenflamatuar sitokin düzeylerinde değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir. Sitokinler arasında "geriatrik sitokin" olarak ifade edilen ve yaşlanmaya bağlı kanda düzeyi artan IL-6'nın genç (şişek) koyunlarda kan düzeylerinin azalması ve bu koyunlarda lipid peroksidasyon düzeyindeki artış, genç koyunların yetişkinliğe geçişi esnasında kanda meydana gelen değişimlerin izlenmesinde faydalı olabilir.

**Proje Destek Bilgileri :** Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 18 Kariyer 280).

**Etik Kurul Bilgileri :** Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKÜHADYEK) – 112-18 referans nolu 49533702/163 sayılı araştırma ile Etik Kurul Onayı alındı.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Akçapınar H.** Koyun Yetiştiriciliği. MEDİSAN Yayınevi. 1994.1.Baskı. Ankara.
- Antunović Z., Novoselec J., Sauerwein H., Speranda M., Vegara M., Pavić V.** Blood metabolic profile and some of hormones concentration in ewes during different physiological status. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 2011; 17: 687-695.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM.** Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 1963; 61: 882-888.
- Burton AB, Wagner B, Erb HN., Ainsworth DM.** Serum interleukin-6 and IL-10 concentrations in normal and septic foals. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009; 132: 122-128.
- Conner E.M., Grisham M.B.** 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition.*, 12(4):274-277.
- Craig N.M., Smith D.W., Pate J.A., Morrison I.W., Knight P.A.** Local cytokine transcription in naïve and previously infected sheep and lambs following challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *BMC Veterinary Research* 2014; 10:87.
- Dhama K., Mahendran M., Chauhan R.S., Tomar S.** Cytokines: their functional roles and prospective applications in veterinary practice: A review. *J. Immunol. Immunopathol.* 2008; 10:79-89.
- Dobson RJ, Waller PJ, Donald AD.** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of host age on the establishment of infective larvae. *Int J Parasitol*, 1990; 20:353-357.
- Draper HH., Hardley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1990; 186: 421-431.
- Dröge W., Breitkreutz R.** Glutathione and immune function. *Proc. Nutr. Soc.*, 2000; 59:595-600.
- Elmarakby A.A., Sullivan J.C.** Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*, 2012; 30: 49-59.
- Elsabahy M., Wooley K.L.** Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity, *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 5552-5576.
- Eryavuz A., Küçükkurt İ., İnce S., Fidan AF., Avcı G., Bülbül T.** Kuzularda Rasyona *Yucca Schidigera* Tozu Katılması ve Günlük Dozunun Rumen Fermentasyonu ile Verime Etkilerinin Araştırılması. *Kocatepe V.J.*, 2015;

- Fernández A., Marteles D., Ruiz de Arcaute M., Lacasta D., Conde T., Loste A.** Relationship between Pro-Inflammatory Cytokines, IL-10 Anti-Inflammatory Cytokine and Serum Proteins in Healthy Lambs and with Diarrhea. *Pakistan Vet.J.*, 2016; 36(1): 63-67.
- Foster D.L., Hileman S.L.** *Puberty in the sheep*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), 2015; pp, 1441-1485.
- Fulop T., Larbi A., Dupuis G., Le Page A., Frost E.H., Cohen A.A., Witkowski J.M., Franceschi C.** Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers Immunol.*, 2018; 8:1960.
- Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D.** Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001; 40: 959–975.
- Huang M.C., Greig N.H., Luo W., Tweedie D., Schwartz J.B., Longo D.L.** Preferential enhancement of older human T cell cytokine generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide. *Clin. Immunol.* 2011; 138 (2):201–211.
- Huszenicza GY., Kulcsar M., Rudas P.** Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet. Med. (Czech)*, . 2002; 47:199–210.
- John J., Haddad A.** Redox microenvironment is essential for MAPK-dependent secretion of pro-inflammatory cytokines: Modulation by glutathione (GSH/GSSG) biosynthesis and equilibrium in the alveolar epithelium, *Cellular Immunology*, 2011; 270: 53-61.
- Kandemir Ç., Adanacıoğlu H., Taşkın T., Koşum N.** Türkiye’de Koyun ve Koyun Eti Fiyatlarının Bölgelere Göre Çok Boyutlu Ölçekleme Analizi ile Karşılaştırılması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2019; 16(3): 315-327.
- Kandır S., Keskin E.** Serum IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  Levels in Thyroidectomized Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 2016; 22: 297-300.
- Kumar A.A., Tripathi B.N., Sharma B.** Cytokine Profile in Tissues and Blood of Sheep Experimentally Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J. Appl. Anim. Res.* 2010; 38: 185-189.
- Lockwood C.J., Yen C.F., Basar M., Kayisli U.A., Martel M.** Buhimschi IPreeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol.*, . 2008; 172(6): 1571–1579.
- Maggio M., Guralnik J.M., Longo D.L., Ferrucci L.** Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006; 61: 575–584.
- Maher P.** The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res.Rev.*, 2005; 4: 288-314.
- Marchiori R.C., Pereira L.A., Naujorks A.A., Rovaris D.L., Meinerz D.F., Duarte M.M., Rocha J.B.** Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment. *BMC Endocr. Disord.*, 2015; 15:32 DOI 10.1186/s12902-015-0032-3.
- Neito C.A.R., Ferguson M.B., Macleay C.A., Briegel J.R., Thompson A.N.** Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal*, 2013; 7(6): 990-997.
- Pamir N., McMillen T.S., Kaiyala K.J., Schwartz M.W., LeBoeuf R.C.** Receptors for tumor necrosis factor-alpha play a protective role against obesity and alter adipose tissue macrophage status. *Endocrinology*, 2009; 50: 4124–4134.
- Pawelec G.** Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Exp.Geront.*, 2018; 105: 4-9.
- Pena L.R., Hill D.B., McClain C.J.** Treatment with glutathione precursor decreases cytokine activity. *J.Parenter. Enteral.Nutr.*, 1999; 23: 1-6.
- Pérez-Navero J.L., Benitez-Sillero J.D., Gil-Campos M., Guillén-del Castillo M., Tasset I., Túnez I.** Changes in oxidative stress biomarkers induced by puberty. *An. Pediatr (Barc.)*, 2009; 70: 424-428.
- Pollak Y., Yirmiya R.** Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for “depression due to a general medical condition”, immunotherapy and antidepressive treatment. *Int.J.Neuropsychopharmacol.*, 2002; 5: 389-399.
- Scheerlinck J.P.Y., Yen H.H.** Veterinary applications of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005; 108: 17-22.
- Sezenler T., Özder M.** Türkgeldi Koyunlarında Erken Yaşta Kuzulmanın Çeşitli Verim Özelliklerine Etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fak.Derg.*, 2007; 4 (1): 91-97.
- Shelly C., Lu M.D.** Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta.*, 2013; 1830(5): 3143–3153.
- Smarsh D.N., Williams C.A.** Oxidative Stress and Antioxidant Status in Standardbred: Effect of Age and Acute Exercise Before and After Training. *J.Equine Vet.Sci.*, 2016; 47: 92-106.
- Stowe R.P., Peek M.K., Cutchin M.P., Goodwin J.S.** Plasma Cytokine Levels in a Population-Based Study: Relation to Age and Ethnicity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2010; 65A (4): 429-433.
- Suchard M.** Immunosenescence: ageing of the immune system. *S. Afr. Pharm. J.*, 2015; 82: 28-31.
- Suwa T., Hogg J.C., English D., van Eeden S.F.** Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2954–60.
- Şeker İ., Köseman A., Baykalır Y., Şeker P.** Koyun Karkaslarının Kalite Sınıflandırılmasında “EUROP” Sistemi ve Türkiye’deki Uygulamalar. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 2017; 7(3): 309-320.
- Takcı A.** Modifiye U-synch Protokolü ile Mevsim Dışı Senkronize Edilen Akkaraman Kangalır Irkı Prepubertal Kuzu ve Primipar Koyunlara GnRH ve hCG Uygulamalarının Fertilite Üzerine Etkisi. *Turk Vet J.*, . 2019; 1(2) : 60-68.
- Tayde P., Bhagwat N., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P.** Hypothyroidism and depression: are cytokines the link? *Indian J. Endocrinol. Metab.*, . 2017; 21: 886-892.
- Thompson A., Bairstow C., Ferguson M., Kearney G.,**

**Macleay C., Thompson H., Pagagoni B.** Growth pattern to the end of the mating period influences the reproductive performance of merino ewe lambs mated at 7 to 8 months of age. *Small Rum.Res.*, 2019; 179:1-6.

**Valasi I., Chadio S., Fthenakis GC., Amiridis GS.** Management of pre-pubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. *Anim Reprod Sci* 2012; 130(3-4): 126-134

**Westendorp R.G.J.** Are we becoming less disposable? *EMBO reports*, 2004; 5 (1): 2-6.

Yalçın A.D., Terzioğlu E., Gorczynski R.M. İmmün Yaşlanma. *Türk Geriatri Derg.*, 2011; 14: 276-280.

**Zhao W., Diz D.I., Robbins M.E.** Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *The British Journal of Radiology* 2007; 80(1) : 23-31.