

ATATÜRK ORMAN ÇİFTLİĞİ İNEKLERİNDE GÖRÜLEN RETENTIO SECUN-
DINARUM'UN SELENYUM NOKSANLIĞI İLE İLGİSİ ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR

Leyla Kalaycıoğlu*

**Investigations on the relationship between selenium deficiency and retained
placenta of cows belonging Atatürk Forest Farm.**

Summary: *Whole blood GSH-Px (E.C.I.II.I.9) activities of 10 cows with normal parturition and 10 cows with retained placenta were measured. The mean values were $31,03 \pm 1,89$ mU/mg Hb and $27,92 \pm 2,67$ mU/mg Hb respectively. There was no statistically significant difference between the blood GSH-Px values of these two groups of animals and it is concluded that these animals have normal blood GSH-Px activities and consequently normal selenium levels.*

Özet: *Normal doğum yapan 10 inek ile retentio secundinarum görülen 10 inekte total kanda GSH-Px (E.C.I.II.I.9) enzimi tayinleri yapıldı. Bulunan değerler sırasıyla $31,03 \pm 1,89$ mU/mg Hb. ve $27,92 \pm 2,67$ mU/mg Hb. idi. İki gruptaki hayvanlara ait kan GSH-Px değerleri arasında istatistik önem taşıyan bir fark bulunmadı ve hayvanların normal kan GSH-Px aktivite-lerine ve dolayısıyla normal kan selenyum seviyesine sahip oldukları tespit edildi.*

Giriş

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px: glutasyon: H₂O₂ oksidoredük-taz, E.C.I.II.I.9) hayvansal dokulardan izole edilen ilk seleno enzimdir. Molekül ağırlığı 88.000 dir (14). Bir molekül enzimde 4 gram atom Se bulunur (9). Koyun at, rat, domuz ve piliçlerde olduğu gibi sığırlarda da kan GSH-Px enzimi miktarı ile kan selenyum miktarı arasında direk bir ilgi olduğu tesbit edilmiştir. (1,7,13). Bu ilgiye dayanılarak hayvanların selenyum durumlarının belirlenmesinde son yıllarda GSH-Px enzimi tayinlerinden faydalanılmaktadır. Bu enzimin tayininin selenyum tayinine tercih edilmesinin, sebepleri şu

*Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Birimi. Ankara-Turkey.

şekilde bildirilmektedir: Enzimin tayini ile numune kontaminasyonu önlemiş olmakta, subklinik selenyum yetmezliği hallerinde daha hassas netice alınabilmekte, selenyum tayini için lüzumlu olan komplike laboratuvar aletleri gerekmemekte ve daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir (3,10,21).

Selenyumun beslenmedeki etkisi GSH-Px enziminin yapısında yer almasıyla izah edilebilmektedir (15). Şöyle ki GSH-Px enzimi hücrelerde peroksitlerin parçalanmasını kolaylaştırarak doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu önlemede rol oynamakta böylece membran lipidlerinin ve dolayısıyla membran bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır. Peroksitlerin parçalanmasındaki bozukluk dokuların tahribatına sebep olmakta ve eğer antioksidan rolü ile peroksit teşekkülünü önleyen vitamin E nin de yetersizliği mevcutsa bu tahribat daha fazla olmaktadır (5).

Doğumdan veya yavru atmadan sonra yavru zarlarının tamamının veya bir kısmının düşmemesi olarak tanımlanabilen retentio secundinarum'un etyolojisinde beslenme faktörlerinden A vitaminin yetmezliği, iyot yetersizliği, Ca ve P dengesizliği üzerinde durulmuştur. Hastalığın insidansının kuzularda beyaz kas hastalığının görüldüğü bölgelerde fazla olması araştırmacıların bu bozukluk ile de selenyum ve vitamin E nin ilişkisini incelemelerine yol açmıştır. Yapılan çalışmalar uterus sağlığı ile kanda selenyum ve (veya) vitamin E seviyeleri arasında korelasyon bulunduğunu göstermiştir (11,20).

İneklerde GSP-Px enzimi ile kan selenyum seviyesi arasındaki ilişki çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmişse de, sebepleri arasında selenyum yetmezliğinin de bulunduğu retentio secundinarum'da GSH-Px enzimi tayinlerinin yapıldığına ait herhangi bir literatüre rastlanamamıştır. Bu çalışmanın amacı Atatürk Orman Çiftliği süt ineklerinde görülen retentio secundinarum'un etyolojisinde selenyum yetmezliğinin etkisi olup olmadığını incelemek ve bunu da kanda GSH-Px enzimi tayinleri ile yapmaktır.

Materyal ve Metot

Denemelerimizde Atatürk Orman Çiftliğine ait 2-5 yaş arası 20 Holştayn-Montafon Melezi inek kullanıldı. Normal doğum yapan ve retentio secundinarum görülen ineklerden doğumu takip eden ilk 12 saat içinde kan alındı. Antikuagulant olarak EDTA kullanıldı. Scholz ve Hutchinson (16), -20°C da dondurulmuş kanda GSH-Px enziminin 7 gün sonunda ilk gündeki aktivitesinin

% 93,3 ünü, 5°C da saklanan kanın ise aynı süre sonunda % 99,2 sini muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. Langlands ve arkadaşları (12), tüm kanın 3 gün 3°C da veya -28°C de bekletilmesinin GSH-Px aktivitesini önemli miktarda etkilemediğini bildirmişlerse de biz numuneleri kanın alındığı gün işledik. Sığırlarda kan GSH-Px aktivitesinin çeşitli kan hücrelerindeki dağılımı incelendiğinde periferel kandaki GSH-Px aktivitesinin % 98 inin eritrositlerde bulunduğu tesbit edilmiştir (16).

Plazmada ihmal edilebilir miktarda enzim bulunduğundan (19), analizler tüm kanda Scholz ve Hutchinson (16) nın uyguladığı metoda göre spektrofotometrik olarak yapıldı ve miligram hemoglobinde enzim aktivitesi olarak değerlendirildi.

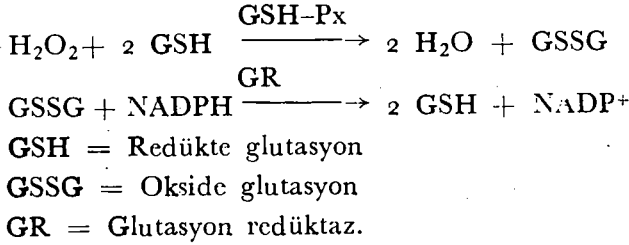
Deneyin Yapılışı :

1 volüm tüm kan 2 volüm distile su ile karıştırılıp 1 kere dondurup çözmekle hemolizat hazırlandı. Bu hemolizat eşit miktarda 2 kuvvetindeki Drabkin ayıracı (0,0016 M KCN; 0,0012 M K₃ Fe (CN)₆; 0,0238 M NaHCO₃) ile karıştırıldı. 15 dakikalık inkubasyondan sonra bu karışımdan aşığıda kompozisyonu yazılan ortama 0,1 ml. iláve edildi.

Reaksiyon ortamı; 100 mM fosfat bafır pH 7;2 mM EDTA; 1 mM NaN₃; 1 mM indingenmiş glutasyon; 0,2 mM NADPH; 3 ünite glutasyon redüktaz. Bu karışım 5 dakika 25°C lık su hamamında bekletilir ve üzerine 0,25 mM H₂O₂ iláve edilir, 366 mμ dalga boyunda 3 dakika süre ile optik dansite düşmesi okunur böylece NADPH nin dakikadaki oksidasyonu tesbit edilir. 0,1 ml. numune yerine distile su kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımına ait değer numune için bulunan değerden çıkarılır.

1 mili enzim ünitesi 1 nmol NADPH nin bir dakikada 25°C da oksidasyonunu katalize eden GSH-Px aktivitesidir. Bu da cyanmet-hemoglobin metodu (8), ile tayin edilen kandaki hemoglobin miktarına bölünerek enzim miktarı miligram hemoglobinde mili ünite (mU/mgHb) olarak ifade edildi.

Bu metodun prensibi; Redükte glutasyonun hidrojen peroksit tarafından GSH-Px katalizörlüğünde oksitlenmesi ve bunun da glutasyon redüktaz muvacehesinde NADPH yi oksitlemesidir. NADPH konsantrasyonundaki değişiklik optik dansite düşmesi ile ölçülür. Bu reaksiyonları formüle edersek;



Sonuçlar

Denemelerimizden elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Normal ve hasta hayvanlara ait değerler istatistik yönden karşılaştırılmış (4), iki grup arasında istatistik önem taşıyan bir fark bulunmamıştır.

Tablo: Normal doğum yapan ve retentio secundinarum görülen hayvanlara ait kan glutasyon peroksidaz değerleri.

Normal doğum yapan Hayvanlar		Retentio secundinarum görülen Hayvanlar	
Hayvan No:	GSH-Px mU/mg Hb	Hayvan No:	GSH-Px mU/mg Hb
1	35.25	1	24.67
2	42.83	2	39.69
3	32.83	3	30.32
4	27.53	4	26.91
5	29.75	5	20.26
6	31.62	6	27.46
7	36.42	7	44.80
8	24.35	8	20.53
9	25.06	9	18.88
10	24.67	10	25.63
Ortalama değer.	31.03 ± 1.89		27.92 ± 2.67
Hudutlar.	24.35-42.83		18.88-44.80

Not: 1 mU ; 1 nmol NADPH'yi 25 °C da 1 dakikada okside eden enzim aktivitesini göstermektedir.

Tartışma

Kan selenyum seviyesi ile glutasyon peroksidaz enzimi miktarı arasında bulunan korelasyona dayanılarak GSH-Px enzimi tayinleri bir çok çalışmada selenyum tayini yerine kullanılmıştır. Carlström ve arkadaşları (6), İsvç'in selenyum yetersizliğine bağlı olan kas dejenerasyonu için risk teşkil eden bölgelerini, sığırlarda kan GSH-Px enzimi tayinleri ile tesbit etmişlerdir. GSH-Px enziminin semikantitatif tayinine yarayan ve damla şeklinde uygulanan test de danelerin selenyum enjeksiyonuna cevabını ölçmede kullanılmıştır (17).

Bostedt ve Schramel (5), maternal-fötal bölgede selenyumun mühim rol oynadığını ve organizmada en fazla selenyum GSH-Px enziminde bulunduğu için de bu enzimin plasentada önemi olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırıcılar selenyum miktarını kotiladonlarda $0,44 \pm 0,04$; karunkulalarda $0,47 \pm 0,03$; myometriumda $0,26 \pm 0,03$ ve kan serumunda $0,27 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{gram}$ kuru ağırlık olarak bulmuşlardır. Ancak retentio secundinarum görölen ineklerle fötal membranlarını normal atan inekler arasında gerek kan serumunun gerekse kotiladon ve karunkulaların selenyum miktarlarının farklı madığını tesbit etmişlerdir.

Trinder ve arkadaşları (20), ise retentio secundinarum görölen sürülerde diğer sürülere nazaran kan selenyum seviyesinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Günde $0,92$ mg selenyumun, sodyum selenit halinde kuru periyodun son 60 günü verilmesi ile retentio secundinarum kontrol altına alınabilmektedir (11).

Segerson ve arkadaşları (18), selenyumun vitamin E ile birlikte veya tek başına verilmesinin retentio secundinarum'u azaltıcı etkisinin, uterusun muskuler fonksiyonunu artırmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Scholz ve Hutchinson (16), laktasyonun çeşitli dönemlerindeki Holstein-Friesian ırkı ineklerde tüm kan GSH-Px aktivitesini $30,5 \pm 2,2$ mU/mg Hb olarak bulmuşlardır. Bizim normal doğum yapan ineklerde bulduğumuz $31,03 \pm 1,89$ mU/mg Hb ve retentio secundinarum görölen ineklerde bulunan $27,92 \pm 2,67$ mU/mg Hb değerleri de bu değere yakınlık göstermektedir. İncelediğimiz her iki gruptaki hayvanlara ait değerlerin karşılaştırılmasında istatistik bakımdan önemli bir fark bulunmaması bu hayvanlarda görölen retentio secundinarum'un selenyum yetmezliğine bağlı olmayıp bu bozukluğun sebepleri arasındaki diğer faktörlerden ileri gelmiş olabileceğini göstermiştir.

Diğer taraftan bu araştırma sonunda, incelediğimiz hayvanların normal kan selenyum seviyesine sahip olduklarını söyleyebiliriz.

Zira Backall ve Scholz (3), sığırlarda kan GSH-Px aktiviteleri ve Se seviyelerini karşılaştırmışlar ve $26,9 \pm 2$ mU/mg Hb GSH-Px aktivitesine karşılık $0,89 \pm 0,006$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ Se ve $32,4 \pm 2,8$ mU/mg Hb GSH-Px aktivitesine karşılık da $0,106 \pm 0,005$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ Se değerleri bulmuşlardır. Sığırlarda kan Se seviyesi $0,05$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ normal kabul

edildiğine göre (2), bizim bulduğumuz $31,03 \pm 1,89$ ve $27,92 \pm 2,67$ mU/mg GSH-Px değerleri de normal kan Se seviyelerine te-
kabül etmektedir.

Literatür

- 1- **Anderson, P.H.; Berrett, S.; Patterson, D.S.P.** (1978): *Glutathione peroxidase activity in erythrocytes and muscle of cattle and sheep and its relationship to selenium.* J. Comp. Path. 88, 181-189.
- 2- **Arthur, J.R.; Price, J.; Mills, C.F.** (1979): *Observations on the selenium status of cattle in the north-east of Scotland.* Vet. Rec. 104, 340-341 (Alınmıştır; Vet. Bull. 49, 707).
- 3- **Backall, K.A.; Scholz, R.W.** (1979): *Reference values for a field test to estimate inadequate glutathione peroxidase activity and selenium status in the blood of cattle.* Am. J. Vet. Res. 40, 733-738.
- 4- **Batu, S.; Arıtürk, E.; Kutsal, A.** (1957): *Biometrik (Variation Statistique).* A.Ü. Vet. Fak. Yayınları No: 92. Ankara.
- 5- **Bostedt, H.; Schramel, P.** (1980): *Investigations to the influence of selenium in veterinarian medicin by example of nutritive muscle dystrophy in lambs and retained placenta in dairy cows. In trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology.* Ed. Peter Bratter and Peter Schramel. Walter de gruyter. Co., Berlin. New York. 83-94.
- 6- **Carlström, G.; Jönsson, G.; Pehrson, B.** (1979): *An evaluation of selenium status of cattle in Sweden by means of glutathione peroxidase.* Swedish J. Agric. Res. 9, 43-46.
- 7- **Chauvaux, G.; Lomba, F.; Fumiere, I.; Bienfet, V.** (1977): *Appréciation du niveau du sélénium sanguin par le dosage de la glutathion-peroxydase.* Ann. Méd. Vét. 121, 111-115.
- 8- **Coles, H.E.** (1974): *Veterinary clinical pathology.* 2 nd. Ed. W. B. Saunders company Philadelphia, London, Toronto.
- 9- **Flohe, L.; Günzler, W.A.; Schock, H.H.** (1973): *Glutathione peroksidase: A Selenoenzyme* FEBS Lett. 32, 132-134.
- 10- **Hakkarainen, J.; Lindberg, P.; Bengtsson, G.; Jönsson, L.** (1978): *Serum glutathione peroxidase activity and blood selenium in pigs.* Acta. Vet. Scand. 19, 269-284.
- 11- **Julien, H.E.; Conrad, H. R.; Moxon, A.L.** (1976): *Selenium and vitamin E and incidence of retained placenta in parturient cows.* J. Dairy. Sci. 59, 1954-1958.
- 12- **Langlands, J.P.; Donald, G.E.; Bowles, J.E.; Smith, A.J.** (1980): *Rapid spot test for glutathione peroxidase activity: Comparison with a-spectrophotometric procedure and assessment of the test as a measure of selenium in the blood of grazing ruminants.* Aust. J. Agric. Res. 31, 357-367.
- 13- **Mc Murray, C.H.; Blanchlower, W.J.** (1976): *The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs.* Res. Vet. Sci. 20, 229-231.
- 14- **Oh, S.H.; Ganther, H.E.; Hoekstra, W.G.** (1974): *Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from onine erythrocytes.* Biochemistry. 13, 1825-1829.
- 15- **Rotruck, J.T.; et al,** (1973): *Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase.* Science. 179, 588-590.

- 16- **Scholz, R. W. ; Hutchinson, L.J.** (1979): *Distribution of glutathione peroxidase activity and selenium in the blood of dairy cows.* Am. J. Vet. Res. 40, 245-249.
- 17- **Segall, H. J. ; Siegel, D.M. ; Norman, B.B., Oliver, M.N.** (1977): *A rapid screening blood spot test for selenium-responsive disease in cattle.* Calif. vet. 31, 10-11.
- 18- **Segerson, E.C. ; et al,** (1977): *Selenium/Vitamin E; Role in fertilization of bovine ova.* J. Dairy. Sci. 60, 1001-1005.
- 19- **Thompson, R. H. ; Mc Murray, C.H. ; Blanchflower, W. J.** (1976): *The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs.* Res. vet. Sci. 20, 229-231.
- 20- **Trinder, N. ; Hall, R.J. ; Renton, C.P.** (1973): *The relationship between the intake of selenium and vitamin E on the incidence of retained placentae in dairy cows.* Vet. Rec. 93, 641-644.
- 21- **Whanger, P. D. ; Neswing, P.H. ; Schmitz, J.A. Oldfield, J.E.** (1978): *Effects of various methods of selenium administration on white muscle disease, glutathione peroxidase and lactic acid dehydrogenase activities in sheep.* J. Anim. Sci. 47, 1157-1166.