

Leptospirozlu Sığırlarda Plazma Nitrik Oksit (NO) ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Düzeyleri ile Adenozin Deaminaz (ADA), Gama Glutamil Transferaz (GGT) Aktiviteleri ve Perifer Kan Lökositlerinde Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Yöntemiyle Lenfosit Oranlarının Belirlenmesi ^[1]

Emine ATAĞİŞİ ¹  Ali Haydar KIRMIZIGÜL ² Onur ATAĞİŞİ ³ Ebru KARADAĞ SARI ⁴
Metin ÖĞÜN ¹ Şaban MARAŞLI ¹ Ayla ÖZCAN ¹ Mahmut KARAPEHLİVAN ¹
Fatih BÜYÜK ⁵ Özgür ÇELEBİ ⁵

^[1] This study was supported by Kafkas University Scientific Research Projects Commission (Project No: 2008-VF-20)

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, TR-36100 Kars - TURKEY

² Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University TR-36100 Kars - TURKEY

³ Department of Biochemistry, Faculty of Arts and Sciences, Kafkas University, TR-36100 Kars - TURKEY

⁴ Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, TR-36100 Kars - TURKEY

⁵ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, TR-36100 Kars - TURKEY

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-10427

Özet

Yapılan bu çalışmada plazmada nitrik oksit (NO), Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) düzeyleri, adenozin deaminaz (ADA), gama glutamil transferaz (GGT) aktiviteleri ve alfa naftil asetate esteraz (ANAE) yöntemi ile lenfosit oranları belirlenerek, sığır leptospirozunun immunpatogenezinin ve biyokimyasal mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Kars civarındaki köylerde yetiştirilen 20 baş leptospirozlu ve 20 baş sağlıklı danaların vena jugularislerinden heparinli tüplere kan örnekleri alındı ve histolojik analizler için frotiler alındıktan sonra, 3.000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Plazmada NO düzeyi ile ADA aktivitesi kimyasal yöntemle, TNF- α düzeyi ile GGT aktivitesi ticari test kitleri kullanılarak kolorimetrik yöntemle analiz edildi. T/B lenfosit oranları ise perifer kan lökositlerinde ANAE yöntemiyle belirlendi. Leptospirozlu hayvanların plazma TNF- α ve NO düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla $P<0.001$ ve $P<0.05$, ADA ve GGT aktiviteleri $P<0.05$ düzeyinde yüksek tespit edildi. ANAE pozitif (T) lenfosit oranı ise %43 olarak belirlendi. Sonuç olarak enfeksiyonun erken aşamasında saptanabilen bir sitokin olan TNF- α ve buna bağlı olarak NO düzeylerinin belirgin bir şekilde yükselmesi, ADA ve GGT aktivitelerinin artması ile B lenfosit yüzdesinin fazla olduğunun tespitinden yola çıkılarak, leptospirozun patogenezinde bu parametrelerden yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca doğal enfekte sığırlarda leptospirozun biyokimyasal mekanizmaları üzerine daha fazla çalışmaların yapılması gerektiği söylenebilir.

Anahtar sözcükler: Leptospiroz, Dana, TNF- α , ADA, GGT, NO

Plasma Nitric Oxide (NO) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Levels, Adenosine Deaminase (ADA), Gamma Glutamyl Transferase (GGT) Activities and to Determine the Rate of Lymphocytes in the Peripheral Blood Leukocytes Alpha Naphthyl Acetate Esterase (ANAE) in Cattle with Leptospirosis

Summary

In this study, by determining in plasma the nitric oxide (NO), tumour necrosis factor- α (TNF- α) levels, adenosine deaminase (ADA), gamma glutamyl transferase (GGT) activities and percentage of T lymphocytes with alpha naphthyl acetate esterase method (ANAE), it was aimed to investigate the immunopathogenesis and biochemical mechanism of bovine leptospirosis. Blood samples of twenty healthy calves and twenty calves with leptospirosis which grown in the villages around Kars were collected into heparinised tubes from jugular vein. After taking the blood smear, blood samples were centrifuged at 3.000 rpm for 15 min. Plasma NO levels and ADA activities were determined with chemical method. TNF- α levels and GGT activities were determined with commercial kits. T/B lymphocyte ratios were determined at peripheral blood leukocytes with ANAE method. Plasma TNF- α and NO levels, ADA and GGT activities in animals with leptospirosis were found to be high $P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$ respectively compared to healthy animals. ANAE positive T lymphocytes ratio were determined as 43%. As a result, TNF- α as a cytokine can be determined in early stage of infection and, accordingly, significantly increased levels of NO, ADA and GGT activities and, on the basis of the increased in the percentage of B lymphocytes, it is proposed to these parameters could be used for determining in explain the pathogenesis of the disease. It is thought that, it must be done more studies on biochemical mechanism of leptospirosis besides native infected cattle.

Keywords: Leptospirosis, Calf, TNF- α , ADA, GGT, NO



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426800/5144



et_tasci@hotmail.com

GİRİŞ

Leptospiroz, *Leptospira* cinsi spiroketlerin sebep olduğu dünyaca yaygın bir zoonozdur. Hem endüstriyel ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde rastlanmaktadır. Enfekte hayvanların idrarıyla direkt temasla ya da kontamine suyla indirekt temasla bulaşır [1]. *Leptospira* vücuda girdiği zaman konakçının hedef organlarına ulaşır ve proksimal renal tubul gibi immun sistemin çok daha az etkili olduğu bölgelerde çoğalır. Avirulent leptospiralar vücuda girdikten birkaç saniye sonra retikuloendotelyal sistem hücreleri tarafından hızla fagosit edilerek ortadan kaldırılır. Virulent olanlar ise, fagositozisten kurtularak yaşamaya devam ederler ve hastalığın ilk haftalarında kandan izole edilebilirler [2]. Adenozin Deaminaz (ADA)'nın en önemli fizyolojik rolü lenfositlerin farklılaşması ve çoğalmasıyla ilgilidir. ADA aktivitesi lenfositlerde eritrositlere oranla 10 kat daha fazla, T lenfositlerde ise B lenfositlere göre daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. T hücrelerinin farklılaşması esnasında özellikle olgunlaşmamış ve farklılaşmamış hücrelerde belirgin artış olmaktadır [3]. Leptospiroz olgularında ADA aktivitesinin belirlendiği çalışma sayısı çok azdır. Ancak özellikle kan hücrelerinin ve damar duvarının hasarına, dolayısıyla hemolize sebep olan leptospirozda ADA aktivitesinde değişim olması beklenmektedir. Plazma gama glutamil transpeptidaz (GGT; EC 2.3.2.2) aktivitesi safra kesesi tıkanıklığına bağlı karaciğer hasarının olduğu kadar hücre immunitesinin de belirteçlerinden biridir [4].

Nitrik oksit (NO) renksiz, küçük molekülü, yağda çözünen, yarı ömrü oldukça kısa olan ve hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen reaksiyon yeteneği oldukça yüksek olan toksik etkili nörotransmitter bir maddedir [5]. İmmun sistemde sitokinler (IL-1, TNF, IFN- γ) ve endotoksinler tarafından oluşturulan uyarılar sonucu birkaç saat içerisinde başlayan ve günler boyu süren nanomol düzeyde NO sentezi gerçekleştirilmektedir [6]. Tümör nekrosis faktör-alfa (TNF- α), yangı, hücre yaşamının devamı ve hücre ölümü süreçlerinde yer alan önemli bir sitokindir. Bu molekül makrofajların farklılaşmasını ve uyarılabilir nitrik oksit sentetazı (iNOS) aktive ederek NO üretimini arttırabilmektedir [7]. iNOS normalde hücre içinde yapısal olarak sentezlenmez, uygun bir immun uyarı aracılığı ile sentezi başlar. Diğer NO sentetaz izoformlarından farklı olarak ortamda bulunduğu sürece NO sentezler. Sitotoksik ve zararlı etkilere karşı iNOS tarafından sentezlenen NO miktarı yüksektir. Özellikle bakteri, interferon-g veya yüksek miktarda lipopolisakkarit uyarıları ile makrofajlar tarafından aşırı miktarda üretilen NO'un, bakteri, parazit ve tümör gibi yabancı hücrelerde sitostatik veya sitotoksik etki meydana getirdiği gösterilmiştir [6]. Sığır babesiozisinde yapılan bir çalışmada parazit tarafından uyarılan makrofajların TNF- α düzeylerini ve bu molekülün de NO salınımını arttırdığı, NO' in sitotoksik etkisi nedeniyle bu mekanizmaların konakçı organizmanın parazite karşı geliştirdiği savunma mekanizması sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir [8].

Biyokimyasal parametrelerin histolojik olarak destelenmesi amacıyla incelenecek olan alfa naftil asetat esterase (ANAE) lizozomal bir enzimdir [9]. Pratikte, gerek dokularda ve gerekse de perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirinden ayırt edilmesinde yararlanılan bu enzimin T-lenfosit olgunlaşmasının ilk aşamalarında kazanıldığı bildirilmiştir [10]. Nonspesifik esterazlardan olan ANAE'nin T lenfositlerde bulunduğu, B lenfositlerde bulunmadığı belirtilmektedir [9].

Yapılan bu çalışmada plazmada NO, TNF- α düzeyleri, ADA, GGT aktiviteleri ve ANAE yöntemi ile lenfosit oranları belirlenerek, sığır leptospirozunun immunpatogenezinin ve biyokimyasal mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali ve Numunelerin Toplanması

Kars civarındaki köylerde yetiştirilen ve klinik belirtilerden yola çıkılarak toplanan idrar numunelerinde karanlık saha taramasıyla belirlenen leptospirozlu (20 baş) ve klinik olarak sağlıklı (20 baş) dana hayvan materyali olarak kullanıldı. Danaların vena jugularislerinden heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Histolojik analizler için frotiler alındıktan sonra, 3.000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek elde edilen plazmalar biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20°C'de (derin dondurucu) saklandı.

Biyokimyasal Analizler

Plazmada ADA aktivitesi Giusti ve Galanti'nin [11] bildirdiği yöntemle göre yapıldı. Bu yöntemde substrat olarak kullanılan adenozin, numune ile 37°C'de 1 saat inkübe edildiğinde amonyak meydana gelmekte, oluşan amonyak da alkali ortamda sodyum hipoklorit ve fenol ile kuvvetli olarak mavi renkli indofenol oluşturmaktadır. Amonyak derişimi indofenolün absorbanı ile doğru orantılı olup, sodyum nitroprussid katalizör etkisi göstermektedir.

Nitrik oksit düzeyleri, Miranda ve ark.'nın [12] bildirdikleri yöntemle tayin edildi. Bu yöntemde nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazoniyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleksin absorbanı 540 nm'de ölçüldü. Standart grafiğinden yararlanılarak NO düzeyleri tespit edildi.

TNF- α (R&D Systems; Bovine TNF-alpha DuoSet, 15 Plate) ve GGT (DDS; Diasis Diagnostic System, Holzheim, Germany) düzeyleri ticari test kitleri kullanılarak tayin edildi. TNF- α test kiti antikor kaplanmamış olarak alındı ve mikro-plaklar ölçümden önce antikorla kaplandı.

ANAE Yöntemi ile T/B Lenfosit Oranlarının Bulunması

Leptospirozlu ve sağlıklı sığırlardan alınan heparinize

kan örneklerinden frotiler hazırlanarak oda ısısında kurutuldu. Gluteraldehid-aseton tespit sıvısında -10°C'de 3 dak. tespit edilip, distile suda yıkandıktan sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı. ANAE enzim aktivitesinin belirlenmesi için, 0.067 M fosfat tamponunun (pH 5.0) 40 ml'sine 2.4 ml hekzazotize edilen pararozanilin (Sigma P3750) çözeltisi ve 0.4 ml asetonda çözülen 10 mg alpha naphthyl acetate (Sigma N8505) eklenerek hazırlanan inkübasyon çözeltisi kullanıldı [10]. Inkübasyon çözeltisi 2N NaOH ile pH 5.8'e ayarlandı. Üç saatlik inkübasyonu takiben metilen mavisi ile 10 dak. çekirdek boyası yapıldı. Işık mikroskopta (Olympus BX51, JAPAN) her frotide 3 değişik alanda toplam 300 lenfosit sayılarak ANAE pozitif lenfosit oranı belirlendi (10x40 büyütme).

İstatistik Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Windows 16.0 paket programı ile yapıldı. Gruplar arası (sağlıklı Grup I ile leptospirozlu hayvanlardan oluşan Grup II) önemliliğin belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı [13]. Tüm veriler ortalama±standart hata ($\bar{x} \pm S_x$) olarak gösterildi ve $P < 0.05$ değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Klinik Bulgular

Yüksek vücut sıcaklığına sahip leptospirozlu olgularda anoreksi, eksitasyon, ishal, anemi, ikterohemoglobinüri, konjunktiva ve mukoza membranlarda sarılık ve koyu kırmızı idrar görüldü. Klinik belirtiler leptospiroz enfeksiyonu için belirleyiciydi.

Mikrobiyolojik Bulgular

Klinik olarak şüpheli olguların idrarlarında karanlık

saha mikroskopisi ile incelenerek spiroketlerin varlığı tespit edildi.

Biyokimyasal Bulgular

Klinik olarak sağlıklı ve leptospirozlu danaların plazma TNF- α ve NO düzeyleri ile GGT ve ADA aktiviteleri *Tablo 1*'de verildi.

Leptospirozlu danaların plazma TNF- α düzeyleri sağlıklılara göre $P < 0.001$, diğer parametreler ise $P < 0.05$ düzeyinde yüksek bulundu.

Histolojik Bulgular

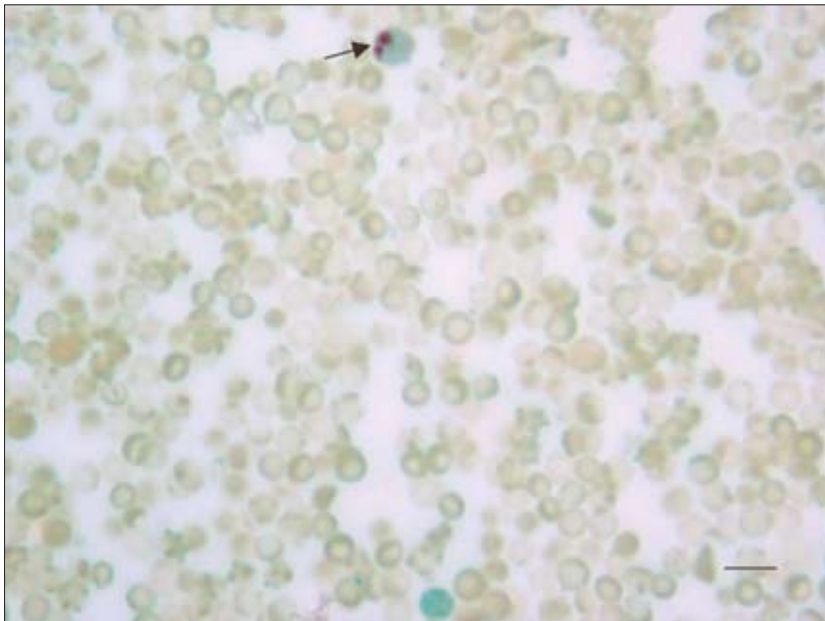
ANAE pozitif lenfositlerin çoğunda 1-2 adet kırmızı-kahverengi granüller görüldü (*Şekil 1* ve *Şekil 2*). Granüllerin görüldüğü hücreler T, granüllerin görülmediği hücreler B lenfosit olarak belirlendi. Sağlıklı sığırların perifer kanında ANAE pozitif (T) lenfosit oranı %61, leptospirozlu sığırların ANAE pozitif (T) lenfosit oranı ise %43 olarak belirlendi.

Tablo 1. Klinik olarak sağlıklı ve Leptospirozlu hayvanlarda biyokimyasal parametrelerin ortalama ve standart hataları ($\bar{X} \pm SEM$)

Table 1. Mean and standart errors of biochemical parameters in clinically healthy and animals with Leptospirosis

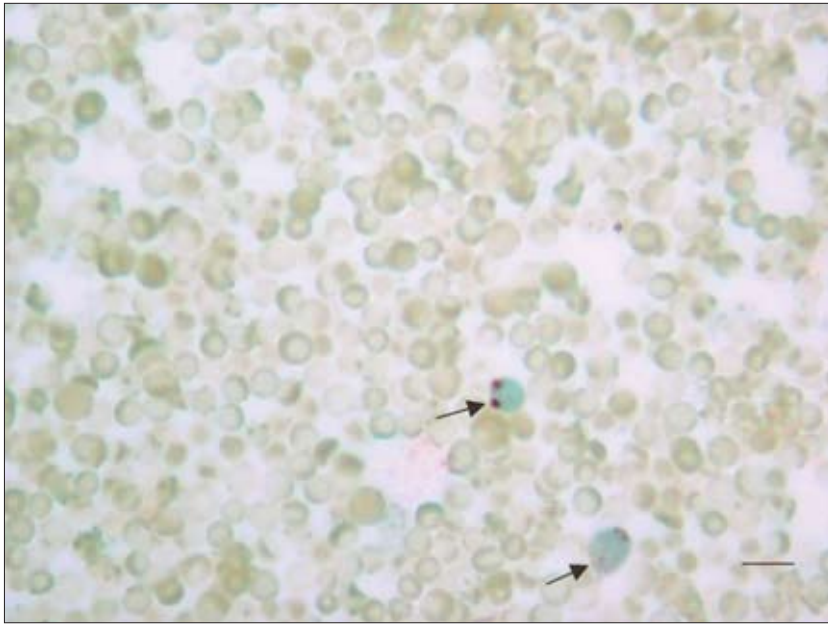
Parametre	Sağlıklı Danalar	Leptospirozlu Danalar	P
TNF- α (pg/ml)	408.72 $\pm$ 53.08	3098.66 $\pm$ 300.92*	0.001
NO (nmol/L)	8.15 $\pm$ 0.72	12.85 $\pm$ 1.32*	0.05
GGT (U/L)	12.10 $\pm$ 0.64	25.48 $\pm$ 4.08*	0.05
ADA (U/L)	5.94 $\pm$ 0.80	17.99 $\pm$ 5.4*	0.05

*Aynı satırdaki değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0.001$ ve $P < 0.05$)



Şekil 1. Leptospirozlu sığır. Ok: ANAE pozitif (T) lenfosit, ANAE, (bar: 20 μ m)

Fig 1. Bovine with leptospirosis. Arrow: ANAE Positive (T) lymphocyte, ANAE, (bar: 20 μ m)



Şekil 2. Leptospirozlu sığır. Oklar: ANAE pozitif (T) lenfosit, ANAE, (bar: 20 µm)

Fig 2. Bovine with leptospirosis. Arrow: ANAE positive (T) lymphocyte, ANAE, (bar: 20 µm)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Leptospiroz ateş, böbrek ve karaciğer yetmezliği ile pulmoner belirtiler ve reproduktif başarısızlıkla karakterize, insan ve başlıca köpek, sığır, domuz gibi evcil hayvanların sistemik bir hastalığıdır. Klinik belirtiler hayvan türleri arasında oldukça çeşitlilik gösterir. Sığır ve domuzlarda hastalığın belirtileri reproduktif yetmezlik, abort, ölü doğum, fetal mumyalaşma, zayıf buzağı doğumu ve laktasyonun kesilmesidir [14]. Bu çalışmada leptospirozlu sığırlarda tespit edilen klinik bulgular diğer çalışmalardakiyle [15,16] benzerlik göstermektedir. Çalışmadaki klinik belirtiler, mikrobiyolojik olarak idrarda spiroketlerin karanlık saha taramasıyla [17] desteklendi.

Leptospira sitoplazmik membran ve peptidoglikan hücre duvarından oluşan tipik çift membranlı yapıya sahip bir bakteridir. Dış membranda yer alan lipopolisakkaritler bakterinin temel antijenik etkisinden sorumludur [16]. Bu bakteriyel lipopolisakkaritler lökositleri aktive eder ve böylece TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımına sebep olur [18]. TNF- α , makrofajlar ve diğer proinflamatuar hücrelerin aktivasyonunu takiben kanda en erken saptanan sitokinlerden birisidir [19]. Yapılan bu çalışmada TNF- α düzeyleri sağlıklı gruba göre doğal olarak enfekte leptospirozlu hayvanlarda önemli derecede yüksek tespit edildi. Birçok çalışmada [20,21] TNF- α 'nın laboratuvar hayvanlarında deneysel oluşturulan leptospirozda arttığının ortaya konulmasına rağmen, doğal olarak enfekte sığır leptospirozunda TNF- α ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadı. Leptospirozun türlere göre çeşitliliği ve belirtilerinin her türde farklı seyretmesi nedeniyle sunulan bu çalışmada ilk defa bu sitokin düzeylerinin belirlenmesi önemlidir.

Sitokinler iNOS'u uyarak NO üretimine sebep olur. Bu çalışmada leptospirozlu grupta tespit edilen yük-

sek NO düzeyleri diğer çalışmalarla [16,22] benzerlik göstermektedir. Proinflamatuar veya antiinflamatuar etkiyle akut ve kronik yangıda önemli bir role sahip olan NO oldukça reaktif bir moleküldür ve peroksinitrit oluşumu yoluyla oksidan etki gösterir. Bu oksidan özelliği nedeniyle bakterilere karşı sitotoksiktir ve savunma sisteminin bir parçası olarak görev yapar [22]. Yangısal hastalıklarda savunma sisteminin normal kapasitenin üstüne çıkması hastalığın seyrinin kötüleşmesine de yol açabilmektedir. Örneğin, artritli hastalarda yapılan çalışmalarda [23,24] iNOS inhibitörlerinin sürekli bir şekilde verilmesi hastalığın klinik belirtilerini azaltmış veya durdurmuştur. Bu nedenle hastalığın tedavisinde Non steroidal antiinflamatuar ilaçların yanında iNOS inhibitörlerinin de verilmesi iyileşmeyi hızlandırabilir.

Nonspesifik esterazlardan olan ANAE enziminin T lenfositlerde bulunduğu fakat B lenfositlerde bulunmadığı bildirilmektedir [10]. T lenfositler ve B lenfositler sağlıklı canlıların perifer kanında belirli oranlarda bulunurken, bazı proliferatif hastalıklarda bu oranlarda önemli değişiklikler görülmektedir [25]. Lenfosit sistemine ait düzensizliklerde [26], sistemik lupus eritamatozis gibi bağ doku hastalıklarında ve aynı zamanda lenfositik ve monositik lösemiler gibi bazı proliferatif hastalıklarda da [27] basit sitomorfolojik bir metot olan "ANAE demonstrasyonu" metodundan yararlanılmaktadır. Leptospirozun patogeneğinde erken ve ilerlemiş olmak üzere 2 safha vardır. Erken safhada humoral immunité söz konusu iken, ilerlemiş safhada ise hücresel immunité söz konusudur [28]. Yapılan bu çalışmada, sağlıklı hayvanların T lenfosit oranları %61 iken, leptospirozlu hayvanların %43 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar, leptospirozda T lenfosit oranı azalırken, B lenfosit oranının arttığını yani humoral immunitenin baskın olduğunu göstermektedir. Lökositlerin farklı tiplerinin miktarlarının flow sitometri yöntemiyle sayıldığı başka bir çalışmada [28] da bulgularımıza

benzer olarak toplam T lenfosit, T-helper, T baskılayıcı ve T-helper/T baskılayıcı indeksi sayısında azalma tespit edildiği, bunun yanında aktif T lenfosit sayısında, doğal öldürücü (NK) hücrelerinin alt türlerinde ve B lenfosit sayısında ise artış olduğu bildirilmiştir. İmmün sistemle ilgili biyokimyasal parametreler olan ADA ve GGT aktivitesi de leptospirozlu hayvanlarda sağlıklılara göre yüksek tespit edildi. ADA aktivitesi tüm hücre tiplerinde bulunmakla birlikte, lenfoid dokular, timus ve periferik lenfositlerde daha fazladır. Bu enzim, lenfosit fonksiyonu ve T lenfositlerinin normal büyüme, farklılaşma ve çoğalması için esansiyeldir [3]. GGT özellikle bellek T hücreleri olmak üzere T hücrelerinin aktivasyonunda artmaktadır [4]. Çalışmamızda ADA aktivitesi leptospirozlu hayvanlarda yüksek düzeyde tespit edilirken, Tonin ve ark.'nın [29] ratlarda oluşturdukları deneysel leptospiroz modelinde ise hem erken hem de geç dönemde düşük tespit edilmiştir. Doğal enfekte sığırlarda ise ADA ve GGT aktivitesinin ölçüldüğü herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Sonuç olarak, enfeksiyonun erken aşamasında saptanabilen bir sitokin olan TNF- α ve buna bağlı olarak NO düzeylerinin belirgin bir şekilde yükselmesi, ADA ve GGT aktivitelerinin artması ile B lenfosit yüzdesinin fazla olduğunun tespitinden yola çıkılarak, leptospiroz patogenezi bu parametrelerden yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca özellikle doğal enfekte sığırlarda biyokimyasal mekanizmalar üzerine daha fazla çalışmaların yapılması gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Lowanitchapat A, Payungporn S, Sereemasun A, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y, Chirathaworn C: Expression of TNF- α , TGF- β , IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 423-434, 2010.
- Merien F, Baranton G, Perolat P: Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun*, 65 (2): 729-738, 1997.
- Baganha MF, Pego A, Lima MA, Gaspar EU, Pharma B: Serum and pleural adenosine deaminase correlation with lymphocytic populations. *Chest*, 97 (3): 605-610, 1990.
- Henson SE, Nichols TC, Holers VM, Karp DR: The ectoenzyme γ -glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. *J Immunol*, 163, 1845-1852, 1999.
- Garthwaite J: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*, 14 (2): 60-67, 1991.
- Stuehr DJ: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 217-230, 1999.
- Tangpong J, Sompol P, Vore M, St Clair W, Butterfield DA, St Clair DK: Tumor necrosis factor α -mediated nitric oxide production enhances manganese superoxide dismutase nitration and mitochondrial dysfunction in primary neurons: An insight into the role of glial cells. *Neuroscience*, 151, 622-629, 2008.
- Kontas T, Salmanoglu B: Tumour necrosis factor- α , adenosine deaminase and nitric oxide levels in cattle babesiosis before and after treatment. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50 (4): 485-488, 2006.
- Knowles DM, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG: The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker. *Cell Immun*, 35, 112-123, 1978.
- Mueller J, Brun del Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H: Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol*, 5, 270-274, 1975.
- Giusti G, Galanti B: Methods of Enzymatic Analysis, s. 315-323, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5 (1): 62-71, 2001.
- SPSS: SPSS for windows release 16.0.2, SPSS Inc., Chicago, April, 2008.
- Adler B, Moctezuma AP: *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-296, 2010.
- Rodostits OM, Blood DC, Gay CC: Veterinary Medicine: A Text Book of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 8th ed., 884-908, Bailliere Tindall, London, 1994.
- Erdogan HM, Karapehlivan M, Citil M, Atakisi O, Uzu E, Unver A: Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. *Vet Res Com*, 32, 333-339, 2008.
- Quin PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR: Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed., 292-298, Wolfe Publishing, London, 1994.
- Urbanik-Sypniewska T, Choma A, Kutkowska J, Kaminska T, Kandefer-Szerszen M, Russa R, Dolecka J: Cytokine inducing activities of rhizobial and mesorhizobial lipopolysaccharides of different lethal toxicity. *Immunobiology*, 202, 408-420, 2000.
- Ergün E, Ergün L, Özen A, Aşti RN: Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes of ostrich (*Struthio camelus massaicus*). *Revue Med Vet*, 81, 147-150, 2004.
- Marinho M, Silva C, Lima VMF, Machado GF, Peiro JR, Perri SHV: Production of TNF- α and IL-6, antibody response, and bacterial recovery, during leptospirosis infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 211-347, 2009.
- Marinho M, Silva C, Lima VMF, Peiro JR, Perri SHV: Cytokine and antibody production during murine Leptospirosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 12 (4): 595-603, 2006.
- Elves AP Maciel, Daniel A Athanazio, Eliana AG Reis, Fernando Q Cunha, Adriano Queiroz, Deusdelia Almeida, Alan JA McBride, Albert I Ko, Mitermayer G Reis: High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Tropica*, 100, 256-260, 2006.
- Lalenti A, Moncada S, Di-Rosa M: Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 110, 701-706, 1993.
- Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH: N-Monomethyl arginine. An inhibitor of nitric oxide synthase. Suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Reum*, 37 (7): 1062-1069, 1994.
- Kajikawa DVM, Koyama H, Yushikawa T, Tsubaki S: Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 44, 1549-1552, 1983.
- Fehr J, Scherer O: Nonspecific esterase as a marker for human T-lymphocytes sequential studies during states of transient blood lymphocyte redistributions. *Ann Hematol*, 44, 201-209, 1981.
- Kulenkampff J, Janossy G, Greaves JR: Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: A marker for T lymphocytes. *Br J Haematol*, 36, 231-240, 1977.
- Gancheva G, Atanasova M, Lukanov T, Ilieva P: Flow cytometry in leptospirosis. *JIMAB*, 1, 3-97, 2008.
- Tonin AA, Pimentel VC, Da Silva AS, De Azevedo MI, Souza VC, Wolkmer P, Rezer JF, Badke MR, Leal DB, Schetinger MR, Monteiro SG, Lopes ST: Adenosine deaminase activity in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Res Vet Sci*, 92 (2): 197-201, 2012.