

## ÖSTRUS DÖNEMİNDEKİ SIĞIRLARDA PLAZMA ADRENALİN, NORADRENALİN İLE VİTAMİN A VE E DÜZEYLERİ

Fikret KARATAŞ<sup>1</sup>, Haki KARA<sup>2</sup>, Kadir SERVİ<sup>3</sup>, Yaşar AKAR<sup>3</sup>, Vahit KONAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Elazığ Sağlık Yüksekokulu, Elazığ-TÜRKİYE

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.03.2001

**Investigation of plasma adrenaline, noradrenalin with vitamin A and E at oestrus cycle in cows**

### SUMMARY

In this study the level of adrenaline, noradrenalin, and vitamin A and E in plasma were investigated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) during the oestrus cycle in cows. At the beginning of oestrus cycle, adrenaline and noradrenalin levels of plasma were determined to be 19,4 ng/ml and 37,0 ng/ml ( $P<0.05$ ), respectively. In the 13 th days of cycle, the levels of adrenaline 11,4 ng/ml and noradrenalin 26,2 ng/ml were found to be at minimum, then increased afterwards. The level of vitamin E was increased during the first ten days of cycle and then gradually decreased again. On the other hand, there was not any significant change in level of vitamin A content in plasma during the cycle.

*Key Words : Oestrus cycle, adrenaline, noradrenalin, vitamins, HPLC*

### ÖZET

Bu çalışmada Montofon ırkı ineklerde östrus siklusu süresince plazma adrenalin, noradrenalin ile A ve E vitamini miktarları yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi ile (YBSK) ile tespit edildi. Siklus başlangıcında plazma adrenalin ve noradrenalin düzeyleri 19,4 ng/ml ve 37,0 ng/ml ile maksimum düzeyde iken, siklusun 13. günü bu düzeylerin 11,4 ng/ml ve 26,2 ng/ml ( $P<0.05$ ) ile minimum değere indiği, E vitamininde ise siklusun başlangıcında 2.05 µg/ml iken 10. günde 2.67 µg/ml ( $P<0.05$ ) değeri ile en yüksek seviyede olduğu, siklusun sonuna doğru da azalma olduğu belirlendi. Fakat A vitamini düzeyinde ise pek fazla bir değişimin olmadığı gözlemlendi.

*Anahtar Kelimeler : Östrus siklusu, adrenalin, noradrenalin, vitaminler, YBSK.*

### GİRİŞ

Kateşolaminler grubunda yer alan adrenalin (epinefrin) ve noradrenalin (norepinefrin) otonom sinir sistemindeki fonksiyonlarının yanı sıra birçok metabolik etkilere sahip olduğu, salgılanmalarında değişik faktörlere ilaveten vücudun hormonal durumu, gebelik dönemleri ve östrus siklusunun farklı dönemlerinin de etkili olabileceği belirtilmektedir (12, 14, 15).

Noradrenalin, adrenerjik sinir uçlarından L-tirozinden bir dizi enzimatik olaylarla, adrenal medulla ve diğer yerlerdeki kromafin hücrelerden de sentez edildiği bildirilmektedir. İnsan ve hayvanlarda adrenerjik sinir uçlarından adrenalin sentezlenmediği, bunun yanı sıra adrenal medulladan sentez edildiği, etkilerini  $\alpha$  ve  $\beta$  reseptörleri aracılığı ile gösterdikleri, ayrıca stres faktörlerine bağlı olarak da adrenalin salgılandığı rapor edilmektedir (12).

Birçok türde in vitro ve in vivo çalışmalarda adrenerjik innervasyonun corpus luteumu etkilediği ileri sürülmektedir (4, 8, 16, 17). Domuzlar üzerinde yapılan bir çalışmada (2), periferik plazma

noradrenalin ve adrenalin seviyelerinin östrus siklusunun dönemlerinde belirgin bir değişikliğe uğramadığı bildirilmektedir. İnsanlarda ise siklusun luteal faz dönemindeki kateşolamin seviyelerinin foliküler fazdan daha yüksek seviyede olduğu ileri sürülmüştür (3). Ratlarla yapılan bir çalışmada, seksüel olgunluk döneminde noradrenaline olan cevabın 2-10 kat artmakta olduğu, gonadotropinlere duyarlılığın ise direkt nörojenik etkilenmeye bağlı olduğu belirtilmiştir (7).

Miszkiel ve ark. (18) östrus siklusu dönemlerinde sığırların corpus luteumlarındaki noradrenalin düzeyinin östrus siklusunun 1-4. günlerinde diğer günlere göre daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmalarda (5, 14, 15) sığırlarda noradrenalinin etkisinin progesteron salgılanmasıyla birlikte, luteal hücrelerde  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  adrenoceptörler aracılığıyla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca luteal faz süresince periferik progesteron konsantrasyonu ile luteal  $\beta$  adrenoceptörleri arasında ilişki olduğunu ve siklusun ortalarına doğru ovarian  $\beta$  adrenoceptörlerinde farmakolojik blokaj meydana geldiği ve progesteron sekresyonunun %20-40 oranında azaldığı bildirilmiştir (5, 15).

A ve E vitaminleri ise yağda eriyen vitaminler olup, antioksidan etkiye sahip oldukları bilinmektedir (13). A vitaminin; görme, büyüme, epitel dokuların farklılaşması, üreme, embriyo gelişimi ve kemik gelişimi için gerekli olduğu, E vitaminin ise araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerinin yükseltgenmesini engelleyici ve serbest oksijen gruplarını etkisizleştirici özelliğine ilaveten üreme üzerinde de önemli fonksiyonları olduğu belirtilmektedir (6, 20).

Nazıroğlu ve ark. (19) Prostaglandin  $F_2\alpha$  ile senkronize edilen İsviçre esmeri ineklerin plazma vitamin E düzeyinin siklus boyunca önemli bir değişiklik göstermediğini, başka bir çalışmada (1) ise ineklerin östrus döneminde plazma vitamin E ve  $\beta$  karoten düzeylerinin haziran ayında sırasıyla 4.31  $\mu\text{g/ml}$  ve 8.39  $\mu\text{g/ml}$  olurken aralık ayında bu değerlerin 1.12  $\mu\text{g/ml}$  ve 1.02  $\mu\text{g/ml}$  olduğu rapor edilmiştir.

İneklerde östrus siklusu ortalama 21 gün olup, proöstrus (2-3 gün), östrus (12-18 saat), diöstrus (12-15 gün) ve metöstrus (2-5 gün) şeklinde dört döneme ayrıldığı belirtilmektedir (11).

Bu çalışma, montofon ırkı ineklerin östrus siklusu döneminde plazma adrenalin, noradrenalin, vitamin A ve E miktarlarında olabilecek muhtemel değişikliklerin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden yaşları 3-4 arası olan 15 adet Montofon ırkı sığır kullanıldı. Sığırlara estrumate (2 ml, 526  $\mu\text{g/ml}$  Cloprostenol, DİF A.Ş.) enjeksiyonu yapılarak östrus sinkronizasyonu gerçekleştirildi.

Sinkronize edilen sığırlardan 3'er gün ara ile günün aynı saatlerinde, siklusun sonuna kadar kan alındı. Heparinli polietilen tüplere alınan kanlardan plazmalar ayrıldı. Plazmalara gerekli analizler aynı gün içinde yapıldı. Plazmadaki adrenalin ve noradrenalin düzeyi Halbrügge ve ark. (9, 10)'nın belirtmiş oldukları metotlar esas alınarak, 1.5 ml plazma örneklerine 2M tris HCl katılarak (pH=8.7) 5 dk karıştırıldı. Örneklere 20 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$  katıldı ve  $4^\circ\text{C}$ 'da 1000 devirde 3 dk santrifüjlendi. Daha sonra yıkanarak ayrılan  $\text{Al}_2\text{O}_3$  üzerine 2 kez 75  $\mu\text{L}$  0.1M  $\text{HClO}_4$  katılıp adrenalin ile noradrenalin asit fazına ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen asit fazları ayrılarak birleştirildi. Mobil faz olarak asetonitril : 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 5.4 mM heptanosülfonik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  ile pH =2) (5/95, v/v)'in kullanıldığı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)'ne enjekte edilerek 270 nm'de adrenalin ve noradrenalin tayin edildi. Plazmalar üzerine etil alkol ilave edilerek Çetinkaya ve Özcan (6)'ın belirtmiş olduğu metoda göre ekstrakte edildi. Ekstraktaki A ve E vitamini düzeyleri Catıgnan (4) ile Miller ve ark. (17) tarafından belirtilen metot esas alınarak belirlendi. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)'nde mobil faz olarak metanol, asetonitril ve kloroform (47:42:11, v/v) karışımında 296 nm'de E vitamini, 326 nm'de ise A vitamini ile belirlendi.

Analiz işlemlerinde analitik saflıkta olan ve Merck firmasından temin edilen kimyasal maddeler ile deiyonize su kullanıldı.

Analizlerde CECIL 1100 serisi HPLC cihazı (A ve E vitamini için ODS 2 kolonu, adrenalin ve noradrenalin için LC-ABZ kolon) ile UV dedektörü kullanıldı. Elde edilen bulgular SPSS (Anova) istatistik programında değerlendirildi.

## BULGULAR

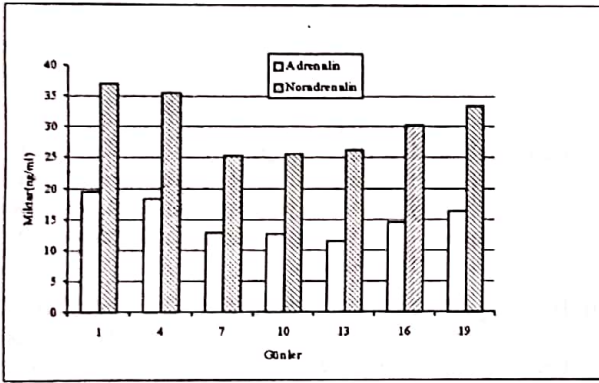
Örneklerdeki adrenalin, noradrenalin ile A ve E vitamini düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. Geri kazanım (recovery) oranları adrenalin için %75.4, noradrenalin için %77.2, A vitamini için %98.2, E vitamini için %99.4 olarak belirlendi.



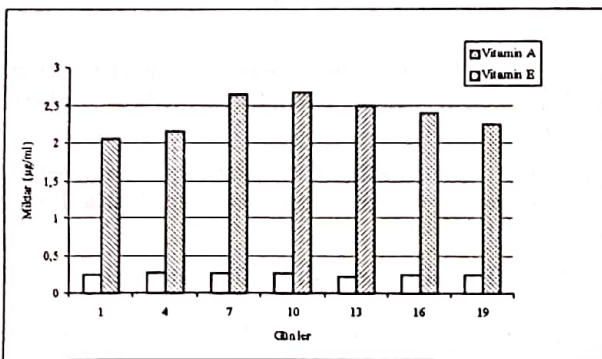
**Tablo 1.** Sığırların östrus dönemlerinde plazma adrenalin, noradrenalin ile A ve E vitaminlerinin düzeyleri.

Siklus günleri	Adrenalin (ng/ml)	Noradrenalin (ng/ml)	Vitamin A (µg/ml)	Vitamin E (µg/ml)
1	19.4±2.61	37.0±3.34	0.24±0.06	2.05±0.56
4	18.2±1.64	35.6±2.52	0.27±0.08	2.15±0.71
7	12.8±3.11*	25.2±3.52*	0.26±0.09	2.64±0.64
10	12.6±2.88*	25.6±3.34*	0.26±0.07	2.67±0.66
13	11.4±1.51*	26.2±1.20*	0.22±0.08	2.49±0.59
16	14.4±2.41*	30.2±2.12*	0.24±0.07	2.40±0.56
19	16.2± 2.15*	33.4±1.80*	0.25±0.08	2.25±0.60

\*Gruplar arası farklılık (P<0.05).



**Şekil 1.** Sığırlarda östrus siklusu boyunca adrenalin ve noradrenalin düzeyleri.



**Şekil 2.** Sığırlarda östrus siklusu boyunca vitamin A ve E düzeyleri.

## TARTIŞMA

İneklerin östrus döneminde plazma adrenalin, noradrenalin ile vitamin A ve E düzeyleri ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmış olup, değişik türlerde in vitro ve in vivo çalışmalarda adrenerjik innervasyonun corpus luteumu etkilediği belirtilmiştir (2, 3, 8, 16, 17). Bahr ve Ben-Jonathan (2), domuzların periferik plazma noradrenalin ve adrenalin miktarlarının östrus siklusunun dönemlerinde belirgin bir değişikliğe uğramadığını bildirmişlerdir. Tablo 1 ve Şekil 1 incelendiğinde plazma adrenalin ve noradrenalin seviyelerinin siklusun 1. gününde sırasıyla 19.4 ng/ml ve 37.0 ng/ml olduğu, siklusun ilerleyen günlerinde azalarak 10. günde bu değerlerin 12.6 ng/ml ve 25.6 ng/ml (P<0.05) seviyelerine düştüğü daha sonraki günlerde yeniden artış göstererek siklusun 19. gününde 16.2 ng/ml ve 33.4 ng/ml düzeyine yükseldiği görülmektedir. Çalışmada elde edilen bu sonuçların Bahr ve Ben-Jonathan (2)'ın belirttikleri sonuçlara zıt olduğu ve bunun da tür farkından kaynaklanmış olabileceği görüşündeyiz. İnsanlarda plazma noradrenalin seviyesinin siklusun luteal faz döneminde foliküler faz döneminden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. (15, 18). Miszkiel ve ark.(18) sığırlar üzerinde yaptıkları bir araştırmada östrus siklusunun 1-4. günleri ile 18-21. günlerinde kateşol aminlerden dopamin ve noradrenalin düzeylerinin diğer günlerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla bulgularımız karşılaştırıldığında aralarında bir benzerlik olduğu görülmektedir.

Sığırlarda noradrenalinin etkisinin progesteron salgılanmasıyla birlikte olduğu, sitokrom p-450 ve 3-β hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesinin artışıyla noradrenalin sentezinin arttığı belirtilmektedir (5, 15). İneklerde östrus siklusu boyunca adrenalin ve noradrenalin seviyelerindeki bu değişikliklerin progesteron hormonundaki değişikliklere bağlı olarak şekillenebileceği görüşündeyiz.

Sığırların östrus siklusu süresince A ve E vitamini ile ilgili araştırmalarda Prostaglandin F<sub>2α</sub> ile senkronize edilen İsviçre esmeri ineklerin plazma vitamin E düzeyinin siklus boyunca önemli bir değişiklik göstermediği belirtilmiştir (19). Başka bir çalışmada ise (1) ineklerin östrus döneminde plazma vitamin E ve β karoten düzeylerinin haziran ayında sırasıyla 4.31 µg/ml ve 8.39 µg/ml olurken aralık ayında bu değerlerin 1.12 µg/ml ve 1.02 µg/ml olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda plazma A ve E vitamini düzeyleri ile ilgili değerler Tablo 1 ve Şekil 2'de

gösterilmiştir. Tablo 1 ve Şekil 2 incelendiğinde siklusun 1. gününde A vitamini düzeyinin 0.24 µg/ml, E vitaminin de 2.05 µg/ml olduğu, siklusun ilerleyen günlerinde her iki vitaminin plazma düzeylerinde dalgalanmalar olduğu ancak istatistiksel yönden önemli değişikliklerin olmadığı ve siklusun 19. gününde plazma A ve E vitamini seviyesinin 0.25 µg/ml ve 2.25 µg/ml düzeylerinde olduğu görülmektedir. Bu bulguların Nazıroğlu ve ark. (19) ile Aksakal ve ark.(1)'nin belirttikleri sonuçlarla paralel olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak montofon ırkı ineklerin östrus siklusu boyunca plazma A ve E vitamini düzeylerinde değişimin olmadığı, ancak bu dönemde plazma adrenalin ve noradrenalin düzeylerinin günlere göre değişim gösterdiği ve bu değişikliklerin ise progesteron salınımına bağlı olabileceği ve konunun tam açıklanabilmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Aksakal M, Karakılçık AZ, Kalkan C, Çay M ve Nazıroğlu M. İneklerde üremenin çeşitli dönemlerinde β karoten ve E vitamini düzeyleri. Doğa Tr J of Vet Anim Sci 1995, 19: 59-64.
2. Bahr JM and Ben-Jonathan N. Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. Endocrinology, 1985, 117: 620-623.
3. Battista PJ, Rexroad CE, Poff JP and Condon WA. Support for a physiological rol of endogenous catecholamines in the stimulation of bovine luteal progesterone production. Biol Reprod 1989, 115: 807-812.
4. Catıgnanı GL. Simultaneous determination of retinol and α-tocopherol in serum of plasma by liquid chromatography. Clin Chem 1983, 2914: 708-712.
5. Condon WA, Blcak DL. Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the bovine CL. in vitro. Biol. Reprod. 1976, 15: 573-578.
6. Çetinkaya N, Özcan H. Investigation of seasonal variations in cow serum retinol and β-carotene by high performance liquid chromatographic method. Comp Biochem Physiol. 1991, 100 ( 4): 1003-1008.
7. Ferrante F, Bronzetti E, Cavalloti C, Ricci A, and Amenta F. The noradrenergic innervation of the ovary in old rats. Mech Ageing Dev. 1990, 54: 55-62.
8. Friedman R, Lais T, Weber DW, Stormshak F. Response of the bovine infundibulum to noradrenaline during oestrus cycle. J Reprod Fertil, 1994, 101(2): 311-315.
9. Halbrügge T, Gerhardt T, Ludwig J, Heidbreder E, Graefe KH. Assay of catecholamines and dihydroxyphenylethyleneglycol in human plasma and its application in orthostasis and mental stress. Life Sci., 1988, 43(1): 19-26.
10. Halbrügge T, Lutsch K, Thyen A, Graefe KH. Role of nitric oxide formation in the regulation of haemodynamics and the release of noradrenaline and adrenaline. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1991, 344: 720-727.
11. Kalkan C ve Horoz H. Pubertus ve seksuel sikluslar. Ed. Erol Alaçam, Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, İkinci baskı, Ankara, Medisan Yayınevi, 1999;25-42.
12. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yöntünden Tıbbi Farmakoloji, 3. cilt, 6. baskı, Feryal Matbaası, Ankara, 1993.
13. Kılınç K. Oksijen radikalleri; Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri, Biyokimya Derg., 1985, 10: 60-89.
14. Kotwica J and Bogacki M. Physiological importance of dopamine as a noradrenaline precursor in the corpus luteum. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 1999, 26: 29-35.
15. Kotwica J, Skarzynski D, Bogacki M, Miszkziel G. Influence of dopamine as noradrenaline precursor on the secretory function of bovine corpus luteum using in vitro model. Br J Pharmacol, 1996, 118: 1669-1674.

16. Luck MR, Jungclas B. Catecholamines and ascorbic acid as stimulators of bovine ovarian oxytocin secretion. *J Endocrinol*, 1987, 114: 423-430.
17. Miller KW, Lott NA, Yang CS. Simultaneous determination of plasma retinol  $\alpha$ -tocoferol, lycopers,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochem*. 1984, 138: 340-345.
18. Miszkial G, Skarzynski D, Bogacki M, Kotwica J. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and pregnant cattle. *Reprod Nutr Dev* 1999, 39: 509-516.
19. Nazıroğlu M, ay M, Aksakal M, etin H, Kaygusuzođlu E, Kalkan C. Siklusları prostaglandin F<sub>2</sub> alfa ile sinkronize edilen ineklerde tohumlama ile birlikte HCG ve GnRH uygulamalarının kan serumu E vitamini ve progesteron düzeylerine etkileri. *Tr J of Veterinary and Anim Sci*, 1997, 21: 393-398.
20. Özer N. Vitamin ve Mineraller, Editörler, Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, 1996, Cilt 2, 796-801.