

A. Ü. Veteriner Fakültesi Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme
Kürsüsü

Prof. Dr. Sabri Dilmèn

**KOYUNLARDA GEBELİK ÖNCESİ, GEBELİK VE
LAKTASYON DÖNEMLERİNDE İDRAR, KAN VE
SÜTTE OROTİK ASİT, ÜRE VE AMONYAK
MİKTARLARININ BELİRTİLMESİ
ÜZERİNDE ARAŞTIRMA***

Şendoğan Gülen**

Hümeyra Özgen***

**A study on the determination of the amount of
ammonia, urea and orotic acid in milk, blood
and urine before pregnancy and during lactation
and pregnancy periods of sheep**

Summary: *The research was carried out using 10 Karacabey merinos sheep. Before pregnancy (twice), during pregnancy (6 times) and, during the lactation period (6 times), blood and urine samples were taken and their ammonia, urea and orotic acid contents determined.*

In these periods, the determined values were found to be;

In urine	Periods		
	Before Pregnancy	Pregnancy	Lactation
Ammonia (mg/100 ml)	7.037	8.763	15.401
Urea (mg/100 ml)	122.28	172.20	45.05
Orotic acid (ug/ml)	16.62	8.41	5.44
In Blood Serum			
Ammonia (ug/100 ml)	194.74	222.48	301.60
Urea (ug/100 ml)	1.28	2.499	1.716

The Orotic acid of blood serum was not within the limits of detection.

* TBTAK, Veterinerlik ve Hayvancılık araştırma grubu proje NO: VHAC - 237.

** Dr. Vet. Med. ODTÜ., Hayat Bilimleri Bölümü. Ankara - Türkiye.

*** Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Kürsüsü Ankara - Türkiye.

Although the orotic acid content of milk ($\mu\text{g}/\text{ml}$) increased linearly, the total daily orotic acid excreted in milk showed no-change and stayed almost constant, as the level of milk production decreases.

The orotic acid content of urine was found to be higher before pregnancy, and started decreasing at the beginning of lactation, reaching its lowest level during this period. During lactation orotic acid also began to be excreted in milk.

Calculations showed that, the amount of orotic acid, daily excreted in the urine before pregnancy is almost equal to the amount of orotic acid excreted in milk and urine during the lactation period.

It may be concluded that the orotic acid excreted by sheep in the urine before pregnancy is approximately equal to the total secreted during lactation in both the urine and the milk. The physiological state, therefore changes the route excretion quantitatively. The biochemical and physiological aspects of this shifting mechanism are important and challenging problems.

Özet: Araştırma 10 adet Karacabey merinos koyunu ile yürütülmüştür. Gebelikten önce (2 defa), gebelik süresince (6 defa) ve laktasyon süresince (6 defa) kan ve idrar numuneleri alınmış ve amonyak üre, orotik asit miktarları saptanmıştır.

Bu sürelerde saptanan değerler

İdrarda	Gebelik öncesi	Süreler Gebelik	Laktasyon
Amonyak ($\text{mg}/100 \text{ ml}$)	7.037	8.763	15.401
Üre ($\text{mg}/100 \text{ ml}$)	122.28	172.20	45.05
Orotik asit ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	16.62	8.41	5.44
Kan Serumunda			
Amonyak ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	194.74	222.48	301.60
Üre ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	1.28	2.499	1.716

Kan serumunda orotik asit ölçülebilecek (saptanacak) sınırlar içinde bulunamadı.

Her ne kadar sütle orotik asit miktarı ($\mu\text{g}/\text{ml}$) lineer olarak artmış ise de, süt veriminin laktasyon sonuna doğru azalması üzerine, günlük sütle atılan tüm orotik asit miktarında bir değişme olmamış ve sabit kalmıştır.

İdrarda orotik asit miktarı gebelikten önce yüksek olarak bulundu ve gebelikle beraber başlayan azalma laktasyonda en düşük düzeye erişti. Bu esnada sütle orotik asit atılmasında başlamıştır.

Koyunların gebelik öncesinde idrarla attıkları günlük orotik asit miktarının laktasyon döneminde idrarla ve sütle atılan orotik asit miktarına eşit

olduğu sonucuna varılabilir. İçinde bulunan fizyolojik durum orotik asitin atılış yolunu değiştirmektedir.

Bu değişim mekanizmasının fizyolojik ve biyokimyasal yönleri önemli ve incelenmeğe değer sorunlardır.

Giriş

Canlı bir hücre devamlı olarak dinamik durumunu muhafaza eder ve kimyasal dengeye erişmez. Bu dinamik durum daima yeni moleküllerin yapımı ve eskiden yapılanların belirli bir süre sonunda yıkımı olarak tanımlanır. Anabolizma ve katabolizma olarak bilinen bu iki sistemin kontrollü, yakın ilişkileri sonucu hücresel fonksiyonların sağlıklı bir şekilde devamlılığı sağlanır.

Besinlerle alınan proteinlerin parçalanması sonucu sindirim kanalından emilen amino asitlerin bir kısmı canlının ihtiyacına göre, protein sentezinde, bir kısmı ise amino gruplarını kaybederek enerji üretiminde kullanılır. Enerjiye gerçeksime duyulmadığı hallerde bu bileşikler yağlara ve şekerlere dönüşürler. Amino asitlerin amino gruplarını kaybetmeleri sonucu meydana çıkan amonyak çok zehirli olduğundan hızla canlının sisteminden uzaklaştırılır. Uzaklaştırılması gerekli olan amonyak, canlının yaşadığı ortamdaki su durumuna göre çeşitli son ürünlere çevrilerek atılır:

a) Çok zehirli bir ürün olan amonyak suda kolayca crimesi nedeniyle canlının sisteminden atılırken fazla miktarda su gerektirir. Suda yaşayan canlılardan memeliler dışındakilerde (aquatic) amonyak bir değişime uğramadan, sistemden uzaklaştırılır.

b) Karada yaşayan (Terrestrial) ve yaşadığı ortamda yeterli düzeyde su bulunan canlılarda amonyak, klasik Krebs-Henschleit siklusu ile üreye dönüştürülür. Üre amonyağa nazaran suda az çözüldüğünden ve daha az toksik olduğundan atılması fazla su gereksindirmez. Karada ve suda yaşayan memelilerle birçok omurgasızlar (Urcotelic) bu fruba dahildirler. Özellikle kurbağaların gelişimi sırasında bu durum çok daha belirgindir. Bu hayvanlarda sudaki gelişme döneminde son ürün amonyak olduğu halde gelişmenin karada sürdürüldüğü dönemde üre sentezi başlar.

c) Ürik asit suda çok daha az çözünür ve zehirliliği de üreye nazaran azdır. Suyun yeterli miktarda olmadığı ortamda yaşayan canlılar amonyağı pürin biosentetik yolu ile ürik asite çevirirler. Örneğin sürüngenler ve kanatlılarda amino asit metabolizmasının son ürünü ürik asittir. Örümcekler ise amonyağı guanin halinde vücutlarından uzaklaştırılır (1).

Organizmada pirimidin biosentezi ve üre biosentezi aynı maddelerle başlamakta ve ilk ürün olan karbamoil fosfat her iki metabolik yola da girebilmektedir. Karbamoil fosfatın sentezi hücre içinde iki ayrı bölümde meydana gelir (Şekil 1). Mitokandriondaki sentezden sorumlu olan karbamoil fosfat sentetaz I, N-Asetil glutamik asit tarafından aktive edilmekte ve amonyak kullanmaktadır. Mitokandriyon içinde sentezlenen karbamoil fosfat üre sentezi için kullanılır. Bu enzim üre sentezinin aktif olduğu karaciğerde bulunmaktadır (2). Diğer dokularda karbamoil fosfat sentetaz bulunmamasına rağmen pirimidin sentezinde rol oynayan öteki enzimlerin bulunuşu bu alanda çalışanlar için uzun bir süre sorun olmuştur. Daha sonraki araştırmalar ikinci bir tip enzimin varlığını ortaya koymuştur. Birinci tipin aksine bu enzim sitoplazmada bulunmakta ve öncelikle amonyak yerine glutamin kullanmak ve N-Asetilglutamik asite gereksinme göstermemektedir (3, 4). Bazı omurgasızlarda ise ilk iki enzimden farklı olan üçüncü bir enzim tipine rastlanmıştır. Mitokandrionda bulunan bu enzim glutamin kullanmakta ve N-Asetilglutamik asit gerektirmektedir (5).

Hücre içi bölgeleşme (compertementisation) nedeniyle karbamoil fosfat sentetaz I ve II birbirinden ayrılmakta, meydana gelen ürünler birbirine karışmadan iki ayrı metabolik yola kanalize olmaktadır. Böylece gerek pirimidin ve gerekse üre sentezleri arasında bir metabolik düzensizlik görülmemektedir.

Pirimidin biosentezinin ara ürünü olan orotik asidin *Lactobacillus* grubu bakteriler için bir büyüme faktörü olduğu eskiden beri bilinmektedir (6). Bunun yanısıra fazla miktarda alınan orotik asidin karaciğerde yağ asitlerinin birikmesine (fatty acid infiltration) neden olduğu ve bozukluklara yol açtığı saptanmıştır (7, 8). Orotik asit normal olarak insanların ve hayvanların idrarlarında düşük bir düzeyde bulunmaktadır. İnsanlarda günde 1 mg orotik asit idrarla dışarı atılmaktadır. Orotik asitüria denilen kalıtsal hastalıkta ise idrarla atılan günlük orotik asit miktarı büyük bir artış göstererek yaklaşık 1 grama ulaşmaktadır. (9). Çocuklarda görülen ve anemik bir klinik tablo ile belirlenen ayrıca nöro-fizyolojik ve patolojik değişikliklere sebep olan bu hastalık orotik asit kullanan iki enzimin genetik olarak organizmada bulunmasından meydana gelmekte, orotidin 5-monofosfat ve uridin 5-monofosfata dönüşemeyen orotik asit idrarla dışarı atılmaktadır (10, 11).

Ayrıca hiper-ammonia hallerinde de idrarla atılan orotik asit miktarı normalin çok üstünde bir düzeye ulaşmaktadır.

İnsanlarda tesbit edilen birkaç klinik vakada üre sentezinin ikinci enzimi olan Ornitin transkarbamilaz'ın yokluğu sonucu meydana gelen hiper-ammonia'da idrardaki orotik asit miktarı yükselmiştir (12). Farelerde damar içi üreaz enzimi verildiği zaman görülen hiper-ammonia'da da orotik asitin idrarda normal düzeyi aştığı saptanmıştır (13). Mitokandrionda sentezlenen karbamoil fosfatın kolaylıkla mitokandrion'u geçerek sitoplazmaya geldiği ve burada orotik asit sentezinde kullanılabildiği ortaya konulmuştur (14, 15).

Memelilerin sütünde genel olarak bir miktar orotik asit bulunmaktadır. Tablo 1'de de görüldüğü üzere sütteki orotik asit miktarı ruminant olmayanlarda çok düşük olduğu halde ruminantlarda bu miktar yaklaşık 10-20 kat daha yüksektir.

TABLO 1. Bazı canlıların sütlerinde bulunan orotik asit miktarı

Sütün cinsi	Orotik asit miktarı mg/100 ml	Referans Nq:
İnek	0.55-6.0	1.8
"	0.85	17
"	6.61 (Yaz) 5.64 (Kış)	18
"	6.13	19
"	8.0	20
"	2.35	21
Koyun	1.35	21
"	0.25-0.8	16
Keçi	1.22	21
Domuz	0.12	21
Kısrak	0.25	16
Tavşan	0.25	16
Fare	0.3-0.5	20
İnsan	0.16	21

Ruminant olmayanların aksine ruminant sütlerinde saptanan fazla miktardaki orotik asitin biyokimyasal mekanizması henüz bir açıklığa kavuşturulmamıştır. Orotik asitürüada görülen enzim yokluğunun nedeni araştırılmış fakat bulgular orotik asiti kullanan enzimlerin mevcudiyetlerini göstermiştir (19). Bu bulgu sorunu daha da güçleştirmiştir. Gerek farelerde, gerekse ineklerde meme dokusunun orotik asit sentezlediği ve aynı zamanda II. tip karbamoil fosfat-sentetaz ihtiva ettiği bilinmektedir (19, 20, 22, 23). Bunun yanısıra birçok toksik ürünlerin sütle atıldığı da bilinmektedir. Bu duruma göre sütte bulunan orotik asitin memde sentezlendiği ya da diğer dokularda sentezlenen ihtiyaç fazlası orotik asitin sütle atıldığı düşünülebilir.

Amonyak metabolizması ile yakın ilişkisi olan iki biyokimyasal sentez yolunun ilişkileri bu bakımdan incelenmelidir.

Araştırmamız bu ilişkileri saptamak için düzenlenmiştir. Araştırma süresince koyunların kan, idrar ve sütlerinde amonyak, üre ve orotik asit miktarları periyodik olarak ölçülmüştür. Ölçülen metabolitlerin gebelik öncesi, gebelik süresi ve laktasyon döneminde gösterdiği değişiklikler saptanmış, elde edilen değerlerin istatistik analizleri bilgisayar yardımıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Deneme hayvanları

Araştırmada 10 adet bir yaşlı (30-35 kg canlı ağırlıkta) Karacabey merinos koyunu kullanılmıştır. Araştırmanın ilk dönemi Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü Deneme Çiftliğinde yürütülmüş, hayvanlar daha sonra A.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme Kürsüsüne ait barınaklara getirilmiştir. Deneme 9 ay sürmüştür.

Koyunlara kaba yem olarak ad libitum kuru ot ve yonca kuvvetli yem olarak da koyunlar için hazırlanmış kesif yem verilmiştir. Doğumdan sonra kuzular analarının sütü ile beslenmişlerdir.

Suni tohumlama uygulanan 10 dişi koyundan 5 i normal doğum yapmış, bunlardan 3 ü ikiz, 2si tek yavru vermiştir. İkiz doğan yavruardan birisi doğumdan sonra ölmüştür. Gebelikleri beklenen öteki 5 koyundan biri abort yapmış, 2 si ölü yavru doğurmuş, 2 si ise yapılan suni tohumlamada gebe kalmamıştır. Bu bakımdan laktasyon dönemine ait analizler yalnız 5 baş koyun üzerinde yürütülmüştür.

İdrar ve kan numunelerinin alınması

Hayvanlardan gebelik öncesi döneminde 2, gebelikte 6 ve laktasyon döneminde 6 olmak üzere toplam 14 kez idrar ve kan numunesi alınmıştır.

Hayvanlardan idrar numunelerinin alınması büyük sorun yaratmıştır. Sonda ile mesaneden idrar alma yöntemi pratik ve başarılı olmadığından uygulanamamıştır. Bu nedenle daha basit bir yöntemle başvurulmuş, hayvanların ağız ve burunları hava almayacak şekilde kapatılmak suretiyle hayvanlar idrar yapmaya zorlanmıştır. Koyunlar genellikle 25-45 saniye içerisinde idrarlarını bırakmışlardır. Bu yöntemin en sakıncalı yönü ileri gebelik döneminde uygulandığı takdirde koyunların yavru atma olasılığıdır. Alınan idrar numunelerine bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacı ile 3-5 damla % 10 luk thymol eriyiği ilâve edilmiştir. Kan, Vena jugularisten alınmış ve deney yöntemine göre işlem yapılmıştır.

a) *İdrarda ve kan serumunda amonyak tayini*

Santrifüje edilen idrar numuneleri 1/50 oranında sulandırılmıştır. Kan serumunda bulunan tranzaminazların serumdaki amino asitleri parçalayıp yanıtıcı sonuçlar vermelerini önlemek amacı ile vena jugularisten alınan taze kandan 2 ml temiz bir pipet ile bir başka tüpe aktarılmış ve üzerine 2 ml % 10 luk trikolarasetik asit eriyiği ilâve edilmiştir. Proteinleri denatüre olan serum santrifüj edilmiş ve üstte kalan kısım amonyak ölçümü için kullanılmıştır. İdrarda ve serumda amonyak "Merck, Clinical Laboratory" de belirtilen yönteme göre yapılmıştır (24).

b) *İdrar ve kanda üre tayini*

Gerek idrar, gerekse kanda üre tayininde Frezer'in Neslerizasyon metodundan yararlanılmıştır (25). Üre tayini için idrar 10 misli sulandırıldıktan sonra kullanılmıştır.

c) *İdrarda orotik asit tayini*

Rogers ve Porter'in metodu (26) küçük bir değişiklikle uygulanmıştır. Meydana gelen kromajen p-aminobenzaldehit ile ekstrakte edilmiş ve santrafujden sonra, üstte kalan berrak renkli fraksiyon 1 cm genişliğindeki kuvetlerde 458 um de okunmuştur.

d) *Kanda orotik asit tayini*

Kan serumundaki proteinler üranil asetatle çöktürüldükten sonra orotik asit Stayner ve arkadaşlarının uyguladığı metoda göre ölçülmüştür (27).

e) *Sütte orotik asit tayini*

Sütte orotik asit tayini için literatürde çeşitli metodlar önerilmektedir. (17, 18, 21). Araştırmada Tsugo ve arkadaşlarının (28) metodu ile Okonkwo ve arkadaşlarının (29) kullandığı metottan faydalanılarak sütte orotik asit tayini için aşağıda tarif edilen yöntem uygulanmıştır.

Ayırıcılar:

-0.2 M Sitrik asit-potasyum sitrat tamponu, pH 2.5

-% 5 Askorbik asit

-% 2.5 p-dimetilaminonenzaldehit (n-proponal içinde)

- Standart orotik asit, 20 mg/lt.
- Doymuş bromlu su
- n-Bütil asetat

Yöntem:

1 ml süt 9 ml sitrik asit-potasyum sitrat tamponu ile karıştırılır ve proteinlerin çökmesi için bir gece buzdolabında bekletilir. Santrifüje edilen numuneden 1 ml alınır ve 30 mililitrelik tüplere konur. Standard olarak kullanılacak tüpe 1 ml standard orotik asit ve blank tüpe yalnız 1 ml tampon konur. Tüplerin üzerlerine sırası ile 2 ml tampon ilâve edilip karıştırılır ve 0.5 ml doymuş bromlu su ilâve edilir, karıştırdıktan sonra 1 dakika bekletilir. Üzerine 1 ml % 5 lik askorbik asit konduktan sonra iyice çalkalanan tüpler 40°C lik su banyosuna yerleştirilir ve 5 dakika bekletilir. Bu esnada tüplerdeki renk değişir. Su banyosundan çıkarılan tüplere 2 ml p-dimetilaminobenzaldehyt ilâve edilir, tüpler çok iyi karıştırılarak tekrar 40°C lik su banyosunda 10 dakika tutulur. Tüpler soğutulur, üzerlerine 4 ml n-bütil asetat ilâve edilip iyice karıştırılır. Bu esnada p-dimetilaminobenzaldehyt ilâvesi ile oluşan renk, n-bütil asetat tarafından ekstrakte edilir ve tüplerin üst kısmında renkli bir tabaka olarak görülür. Genellikle üstte kalan bu renkli tabaka berrak olmadığından hatalı ölçmelere yol açmaktadır. Lipoprotein özelliğindeki maddelerden gelen bu bulanıklık kolayca giderilebilir. Eğer renk ektrasyonundan sonra muhtevalar santrifüj tüplerine boşaltılır ve 10 dakika santrifüje edilirse bulanıklık kaybolur. Berrak olan n-bütil asetat tabakasından alınan numuneler 458 um de okunur.

Bulgular ve Tartışma

Araştırmada 9 aylık bir sürede gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemleri olmak üzere 3 dönemde çeşitli aralıklarla koyunlardan idrar, kan ve süt alınarak amonyak, üre ve orotik asit miktarları ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucu elde edilen veriler iki faktörlü repelikasyonsuz varyans analizine tabi tutulmuşlardır (35). Analizlerdeki faktörlerden birisi zaman (A), diğeri de tesadüfi bloklar olarak nitelendirebileceğimiz numunelerin kaynağı olan koyunlardır (B). İki faktörün bu düzeydeki kombinasyonları için sadece bir ölçme yapılmış olmasından dolayı AxB, etkileşiminin, hatanın yerini aldığı varsayılmıştır. Varyans analizinin ikinci bir aşamasında hayvanların fizyolojik durumlarına göre zaman boyutu gebelik öncesi, gebelik süresi ve laktasyon dönemlerine bölünmüş ve bu dönemler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır (36).

İdrarda amonyak düzeyi gerek gebelik öncesinde ve gerekse gebelik süresinde belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Laktasyon süresinde her ne kadar idrarda amonyak miktarı yükselmiş ise de varyans analizi sonucunda bu yükselmelerin istatistiki bir önem taşımadığı görülmüştür (Tablo 2 ve Şekil 2). Genel olarak amonyakın idrardaki miktarı geniş hudutlar içinde değişmekte ve ortalama bir değer vermek güçleşmektedir. Ayrıca metodların henüz tam istenilen sağlıklı düzeye ulaşamaması da buna neden olmaktadır.

Tablo 4 de de görüldüğü üzere idrarda amonyak miktarı 7.037-15.401 mg/100 ml arasında değişmekte ve literatürde verilen değerlere uymaktadır (30).

İdrarda üre miktarı ise en belirgin farklılığı (Tablo 2 ve Şekil 2) laktasyon süresinde gösterilmiştir. Bu dönemde üre düzeyi gebelik öncesi ve gebelik dönemi değerlerinden çok düşüktür. Varyans analizleri de istatistiki olarak sonucu desteklemektedir. Gebelik ve gebelik öncesi dönemlerinde bulunan 172.20 ve 122.28 mg/100 ml üre, laktasyon süresinde yaklaşık % 70 bir düşüş göstererek 45.05 mg/100 ml'a kadar inmiştir (Tablo 4).

TABLO 2. İdrarda amonyak, üre, orotik asit miktarlarının fizyolojik dönemlere göre dağılımı

GÜNLER	ÜRE (mg/100 ml)	AMONYAK (mg/100 ml)	OROTİK ASİT (ug/ml)
A 0	75.610 ± 34.150	3.362 ± 0.035	17.46 ± 0.83
31	168.950 ± 22.020	10.712 ± 3.968	15.38 ± 2.03
48	111.620 ± 49.21	4.388 ± 0.771	3.53 ± 1.01
65	24.520 ± 69.14	7.098 ± 1.236	13.45 ± 2.70
99	216.160 ± 23.56	12.288 ± 2.433	9.34 ± 0.65
B 114	164.080 ± 50.28	8.102 ± 3.520	11.55 ±
135	199.780 ± 56.73	9.976 ± 4.696	12.55 ± 1.88
148	77.470 ± 10.55	10.626 ± 6.033	6.75 ± 1.19
167	90.690 ± 13.38	9.455 ± 1.315	5.43 ± 0.81
195	68.020 ± 14.22	10.756 ± 2.417	7.55 ± 2.45
209	28.570 ± 7.43	18.612 ± 4.951	5.41 ± 1.53
C 223	30.220 ± 3.34	19.980 ± 7.960	4.88 ± 1.38
249	30.550 ± 4.55	27.652 ± 16.923	3.91 ± 2.91
261	31.380 ± 2.51	5.987 ± 3.174	3.77 ± 0.61

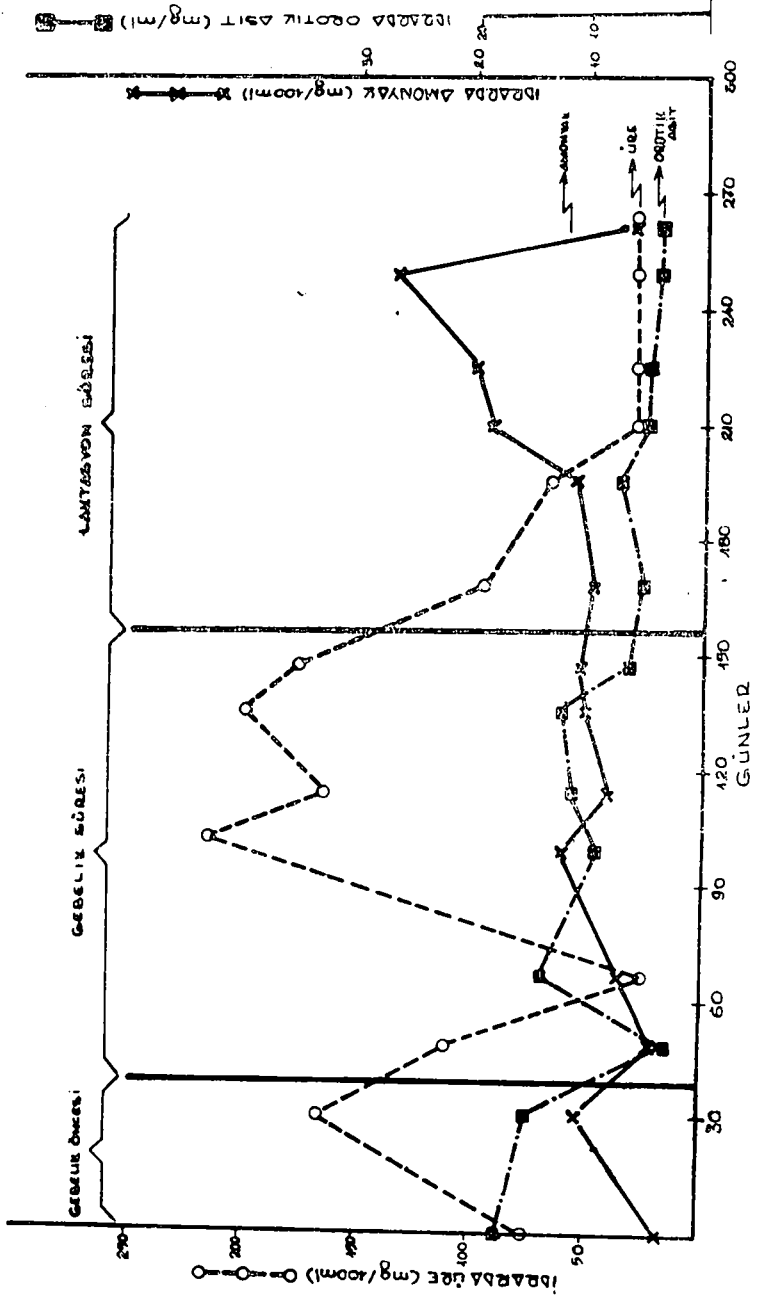
A = Gebelik öncesi

B = Gebelik dönemi

C = Laktasyon dönemi

Bunların yanısıra idrarda orotik asit miktarı gebelik süresinde azalmış (Tablo 2 ve Şekil 2) ve laktasyonda en düşük düzeye ulaşmıştır. Gebelik öncesinde ortalama 16.52 ug/ml olan orotik asit miktarı gebelikte % 5 oranında bir azalma ile ortalama 8.41 ug/ml'a

Şekil:2 İDRARDA ÜRE, AMONYAK VE OBEKTRİK ASİT NİRTARININ DEĞİŞİMİ



düşmüştür (Tablo 4). İdrarda orotik asit miktarında azalma gebelikten sonra da devam etmiş ve bu azalma % 75 e yaklaşarak 5.44 ug/ml ortalama değere kadar düşmüştür. Koyunlarda idrarda orotik asit miktarları hakkında bir bilgiye rastlanmamış, fakat ineklerde idrarda orotik asit miktarının 2.4 ug/g olduğu bildirilmiştir (19). Varyans analizlerine göre fizyolojik dönemler arasında görülen bu farklılık istatistik bakımdan önem taşımaktadır.

Serumda amonyak miktarı ancak gebelikten sonraki, laktasyon süresinde artmıştır (Tablo 3 ve Şekil 3). Tablo 4 de gösterilen, dönemlere ait ortalama değerlere göre gebelik öncesinde 194.74 ug/100 ml ve gebelik süresinde 222.48 ug/100 ml olan amonyak miktarı gebelikten sonraki dönemde % 50 bir artış göstererek 301.60 ug/100 ml'a ulaşmıştır. Bulunan değerler literatürde bildirilen değerler içindedir (30). Farklılıkların geçerliliği varyans analizleri ile saptanmıştır.

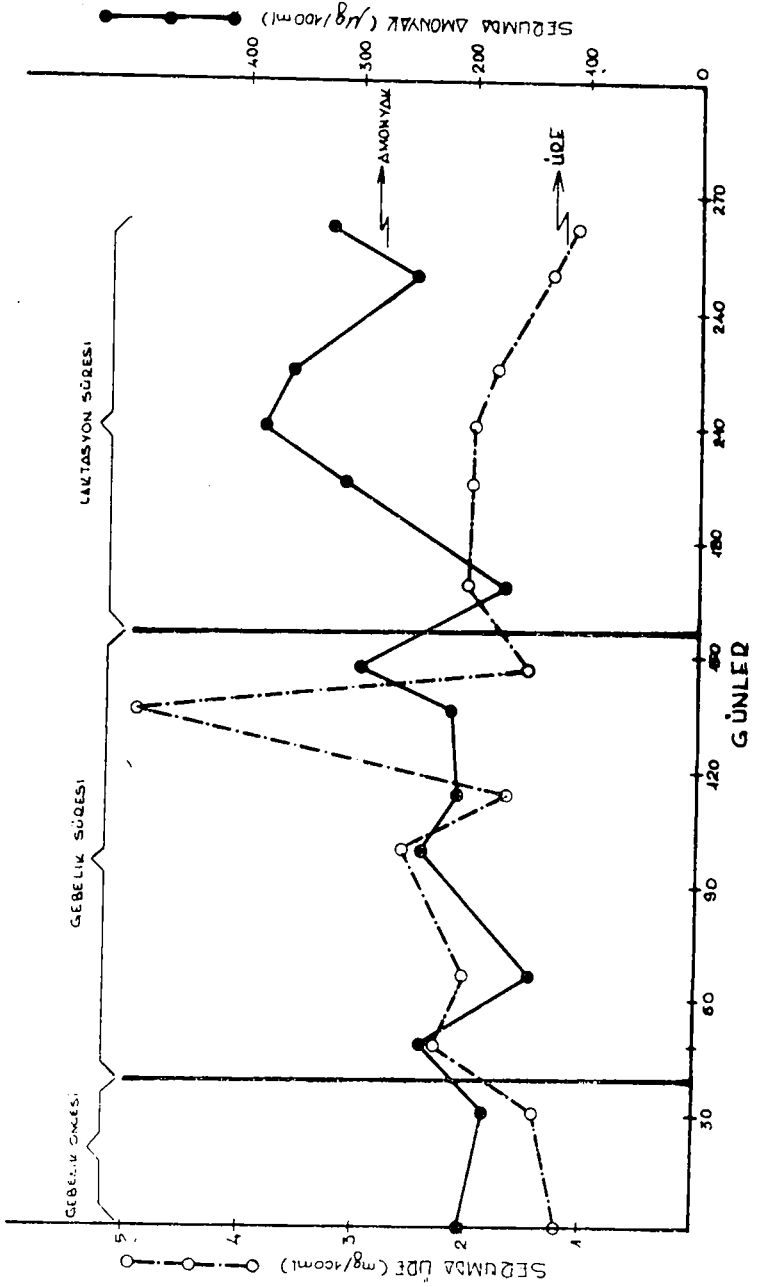
TABLO 3. Serumda amonyak, üre ve orotik asit miktarlarının fizyolojik dönemlere göre dağılımı

GÜNLER	AMONYAK (ug/100 ml)	ÜRE (mg/100 ml)	OROTİK ASİT
0	206.29 ± 10.90	1.19 ± 0.24	
A 31	183.03 ± 9.71	1.40 ± 0.16	
48	230.16 ± 72.40	2.29 ± 0.19	Tesbit Edilemedi
65	141.37 ± 9.94	2.04 ± 0.23	
99	238.54 ± 30.17	2.60 ± 0.18	
B 114	212.91 ± 23.38	1.67 ± 0.04	
135	219.93 ± 26.33	4.96 ± 0.40	
148	292.01 ± 46.35	1.48 ± 0.43	
167	172.10 ± 17.03	2.00 ± 0.46	
195	313.85 ± 24.47	2.04 ± 0.26	
209	386.66 ± 74.03	1.99 ± 0.44	
C 223	359.93 ± 56.17	1.81 ± 0.27	
249	250.00 ± 17.81	1.33 ± 0.10	
261	326.65 ± 46.91	1.13 ± 0.08	

- A = Gebelik öncesi
B = Gebelik dönemi
C = Laktasyon dönemi

Serumda üre gebelik döneminde belirgin bir farklılık göstermiştir (Tablo 3 ve Şekil 3). Gebelik öncesi ve laktasyon dönemindeki değerlerdeki bu farklılık varyans analizleri sonucu istatistiki anlamlık düzeyinde bulunmamıştır. Tablo 4 de gösterilen değerler incelendiğinde gebelikten önce 1.28 mg/100 ml olan ortalama miktar gebelik döneminde 2.499 mg/100 ml'a ulaşmış, fakat laktasyon döneminde bu miktar 1.716 mg/100 ml'a düşmüştür. Daha öncede bil-

Şekil:3 SERUMDA ÜDE VE AMONYAK MİKTARININ DEĞİŞİMİ



dirildiği gibi varyans analizlerine göre yalnız gebelikteki farklılık önemlidir.

TABLO 4. İdrar ve serumda bulunan metabolitlere ilişkin ortalama değerler

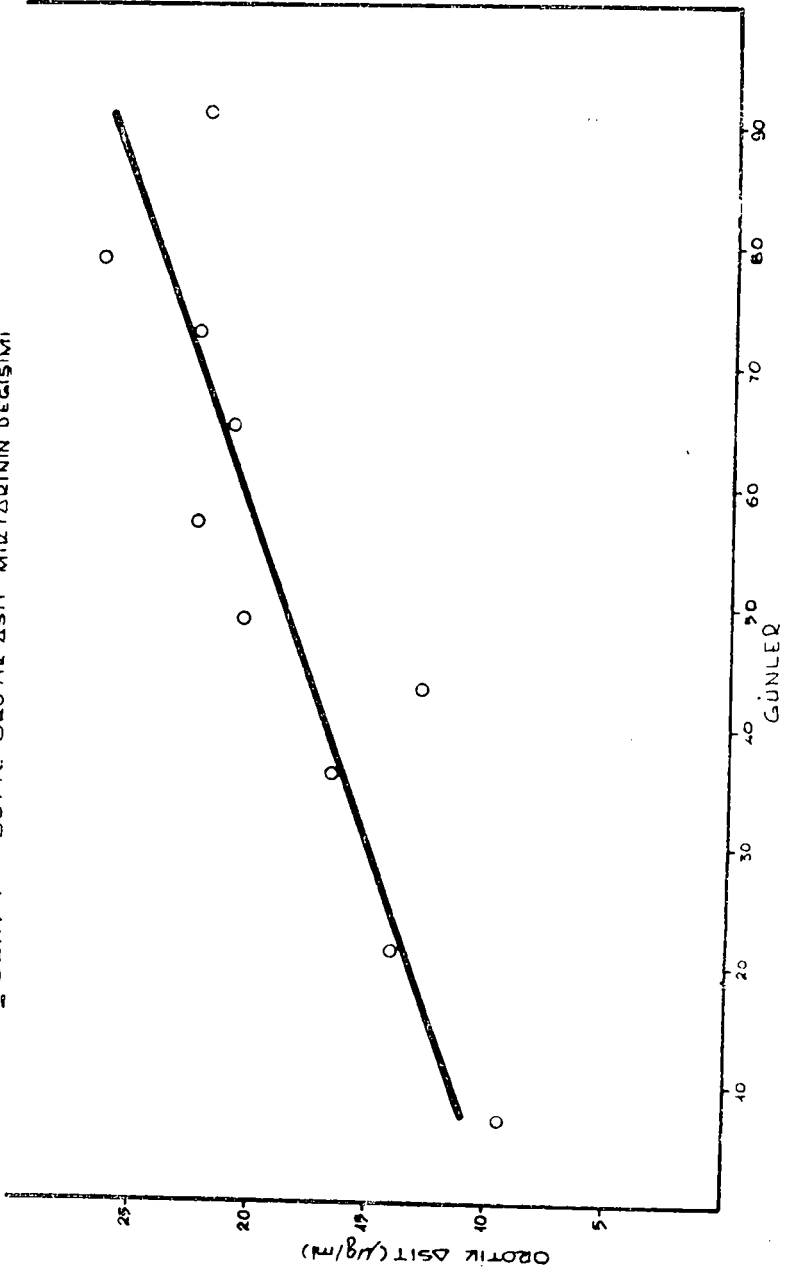
MİKTARI ÖLÇÜLEN METABOLİT	GEBELİK ÖNCESİ	GEBELİK DÖNEMİ	LAKTASYON DÖNEMİ
İdrarda amonyak (mg/100 ml)	7.037 ± 4.24	8.763 ± 7.46	15.401 ± 15.36
İdrarda üre (mg/100 ml)	122.28 ± 39.72	172.20 ± 107.74	45.05 ± 18.85
İdrarda orotik asit (ug/ml)	16.52 ± 2.02	8.41 ± 3.95	5.44 ± 3.99
Serumda amonyak (ug/100 ml)	194.74 ± 14.58	222.48 ± 85.27	301.60 ± 96.65
Serumda üre (mg/100 ml)	1.28 ± 0.28	2.499 ± 0.61	1.716 ± 0.66

Deneme süresince koyunların kanlarında orotik asit araştırılmış ise de kanda ölçülebilecek düzeyde orotik asit saptanamamıştır. Chen ve Larson ineklerin kanlarında bulunan orotik asitin 1 ug/ml olduğunu bildirmektedir (19). Araştırmada analarının sütü ile beslenen kuzuların kanlarında da önemsenecek miktarda orotik asit bulunamamıştır.

Koyunların kolostrumunda orotik asit tayini elde olmayan bazı nedenlerle sağlıklı olarak yapılamamıştır. Muayene edilen iki kolostrum numunesinde orotik asit miktarının 2-6 ug/ml olduğu saptanmıştır. Kolostrum süte nazaran çok yoğun olduğundan tamponla güvenli bir şekilde sulandırılmamaktadır. Verilen rakamları ihtiyatla karşılamak gerektiğinden kesin bir kaniya varabilmek için daha çok numuneye gerek vardır. İneklerde kolostrumda orotik asitin 21 ug/ml olarak bulunduğu bildirilmektedir (29).

Şekil 4 ve tablo 5 te görüldüğü üzere koyun sütünde de orotik asit miktarı inek sütünde olduğu gibi (29) laktasyon süresince linear bir artış göstermektedir. Ortalama değer olarak koyun sütlerinde orotik asit miktarının 9.51 ug/ml ile 26.53 ug/ml arasında değiştiği görülmüştür. Literatürde kaydedilen değerler 2.5 ug/ml ile 13.5 ug/ml arasındadır (16, 21). Tablo 1 de belirtildiği üzere gerek koyun ve gerekse inek sütlerinde bulunan orotik asit miktarları arasında farklılıklar mevcuttur. Aynı araştırmacılar laktasyon, beslenme ve mevsimlere göre sütte orotik asit düzeylerinin değişebileceğine işaret etmektedirler.

Şekil:4 SÜTTE OROTİK ASİT MİKTARININ DEĞİŞİMİ



TABLO 5. Laktasyon süresince sütte orotik asit miktarında görülen değişimler

GÜNLER		OROTİK ASIT (ug/ml)
7	(1. ay)	9.51 ± 2.58
21	"	14.08 ± 2.98
35	(2. ay)	16.73 ± 1.11
43	"	12.78 ± 0.85
49	"	20.41 ± 2.58
57	"	22.43 ± 2.61
65	(3. ay)	21.08 ± 1.68
73	"	22.51 ± 1.39
79	"	26.53 ± 1.90
91	"	22.39 ± 1.031

İdrar ve serumdaki metabolitlerin miktarları tablo 4 de özetlendiği gibi birbirlerinden çok farklıdır. İdrarda bulunan metabolitlerin miktarı serumdaki miktarlardan 50-100 misli fazla olarak tesbit edilmiştir. Aynı durum diğer canlılar içinde geçerlidir. Özellikle amonyak ve üre gibi toksik ürünlerin kanda düşük düzeyde tutulmaları büyük fizyolojik önem taşır. Kana geçen ürünlerin en kısa zamanda atılması sonucu bunların zararlı fizyolojik etkileri önlenmiş olur. Bundan dolayı idrardaki üre ve amonyak yoğunluğu serumdaki yoğunluğun çok üstünde bir düzeyde bulunmaktadır.

Kan ve idrarda bulunan metabolitler arasındaki ilişki korrelasyon katsayıları ile saptanmaya çalışılmış ve sonuçlar tablo 6 da gösterilmiştir.

İdrardaki üre ve orotik asit miktarları gebelik öncesi ve gebelik dönemlerinde yüksek düzeyde bulunurken bu miktarlar laktasyonda en düşük düzeydedir. Böylece idrardaki bu iki metabolit arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğu görülmüştür. İdrarda üre ve orotik asit düşmesine karşılık gebelik öncesi ve gebelikte düşük düzeyde bulunan serum amonyağının laktasyon döneminde maksimale ulaştığı saptanmıştır. Bu duruma göre idrardaki üre ve orotik asit ile serum amonyağı arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır.

İdrar ve serumda üre miktarları arasında şekil 3 ve 4 de gösterildiği gibi pozitif bir ilişki vardır.

Farelerde yapılan deneyler ise değişik sonuçlar vermiştir. Karaciğerde sentez edilen üre ve amonyak miktarları gebe olan ve olmayan farelerde farklı bulunmuştur. Gebe fareler gebe olmayan farelere nazaran karaciğerlerinden daha az üre fakat daha fazla amonyak çıkartmaktadırlar. Aynı zamanda amino asitlerden sentez edilen glukoz (glukoneogenezis) miktarı da gebe farelerde daha yüksektir (31).

TABLO 6. Korrelasyon katsayıları

	Şerumda Amonyak	Serumda Üre	İdrarda Amonyak	İdrarda Üre	İdrarda Orotik Asit
Serumda Amonyak					
Serumda Üre	$r = 0.1056$				
İdrarda Amonyak	$r = 0.1224$	$r = -0.04$			
İdrarda Üre	$r = -0.3435 \times$ $(-0.5553 - -0.0878)$	$r = 0.3679 \times$ $(0.1135 - 0.5770)$	$r = 0.2175$		
İdrarda Orotik Asit	$r = -0.1586$	$r = 0.1528$	$r = -0.2821 \times$ $(-0.5198 - -0.007)$	$r = 0.5328 \times$ $(0.3140 - 0.6978)$	

Sonuç

Ruminantlarda amino asit metabolizmasının son ürünlerinin çeşitli fizyolojik dönemlerde gösterdiği farklılıklar ve bunlar arasındaki ilişkiler henüz ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Araştırmalardan elde edilen sonuçların çoğu zaman ruminant olmayan hayvanlardan alınan sonuçların ışığı altında değerlendirildiği görülmektedir. Ruminantlarda sentez edilen ürenin büyük bir bölümü gene kan yolu ile rumene gelmekte ve bakterilerin salgıladıkları üreaz veya besin maddelerinde bulunan üreaz etkisiyle parçalanıp tekrar amonyağa dönüşmekte ve amonyak da amino asitlerin sentezinde kullanılabilir (32).

Korrelasyon katsayılarında görüldüğü gibi (Tablo 6) üre ile amonyak arasındaki ilişkiyi ancak bu şekilde açıklamak mümkün olabilmektedir. Bunun yanı sıra gebelik süresindeki amonyak üre ilişkisini izah edebilmek güçtür. Klasik görüşlere göre üre sentezi yavru doğumdan sonra başlar. Gebelik süresince yavrunun çıkardığı amonyak ana tarafından üreye çevrilir. Gebelik esnasında üre düzeyinde meydana gelen artış için bu geçerli bir neden olabilir. Fakat sentez edilen ürenin tekrar üreaz enzimi ile amonyağa dönüşme olasılığı mevcuttur ve izah edilemeyip karanlıkta kalan sorun budur.

Gebe kadınların gebelik sonrasına nazaran idrarları ile daha fazla orotik asit atıkları bilinmektedir (33). Hyper ammonia hallerinde idrarda orotik asit miktarının yükseldiğine raporun giriş bölümünde geniş olarak değinilmiştir. Hyper ammonia hallerinde orotik asit miktarının yükselmesine karşılık üridin 5-monofosfat düzeyindeki artış aynı oranda olmamaktadır. Eksperimental olarak hyper ammonia meydana getirilen farelerde radioaktif orotik asitin üridin 5-monofosfata çevrilme hızında bir düşüş görülmektedir (31). Burada bir kontrol mekanizmasının varlığı düşünülebilir. Bazı araştırmacılara göre bunun nedeni fazla sentez edilen orotik asidin üridin 5-monofosfata dönmesi için yeterli 5-fosforibozil 1-pirofosfazın bulunmaması ve fazla gelen orotik asidin idrarla atılmasıdır (31). Böyle bir mekanizmanın ruminant sütlerinde bulunan yüksek düzeydeki orotik asidi izaha yeterli olup olmadığı tartışma konusudur.

İdrarla atılan orotik asit laktasyon döneminde en düşük düzeydedir. Fakat bu esnada sütle orotik asit atılması başlamaktadır. Koyunlarda süt verimi hayvanın ırkı, laktasyonun seyri ve beslenme koşulları gibi çeşitli faktörlere göre geniş ölçüde değişir. Araştırmada kullanılan Karacabey merinos ırkı koyunlarda yıllık süt verimi yak-

laşık 60 kg olarak bildirilmektedir (37). Genellikle koyunlarda laktasyon süresi 16 haftadır ve 1. ayda sütün % 40 1, 2. ayda % 30 u, 3. ayda % 20 si ve 4. ayda sütün % 10 u salgılanır. Bu duruma göre laktasyonun 1. ayında 24 kg, 2. ayında 18 kg, 3. ayında 12 kg ve 4. ayında 6 kg süt salgılandığı kabul edilirse günlük ortalama süt verimi aylara göre sırasıyla 0.800, 0.600, 0.400 ve 0.200 kg kadardır. Böylece koyunlar sütle günde 1. ayda 7.6-11.3 mg, 2. ayda 7.6-13.4 mg, 3. ayda 8.4-10.6 mg orotik asit çıkarmışlardır. Laktasyon dönemi sürecince sütle günde atılan ortalama orotik asit miktarı 4.75-13.26 miligramdır. Bu dönemde idrarla atılan total orotik asit miktarı ise 5-7.5 mg kadardır (Tablo 2 ve 5). Bu koşullar altında bir koyun laktasyon döneminde idrar ve sütle ortalama 9.75-20.76 mg orotik asiti vücudundan uzaklaştırmaktadır.

Gebelik öncesinde ise idrarla atılan günlük orotik asit miktarının (günlük idrar 1.5 lt) ortalama 24-26 mg kadar olduğu tahmin edilmektedir. Bu değerler bir koyunun belli bir düzeyde orotik asit sentez edebileceği ve bunu değişik yollarla atabileceği varsayımını ortaya koymaktadır. Bu varsayımın ışığı altında konuya yaklaşım yapılırsa:

a) Sütle atılan orotik asidin tümü meme dokusunda mı sentez ediliyor yoksa, orotik asit sentezinde başlıca kaynak karaciğermidir? Kanda orotik asit tesbit edilememesi sorunun geçerliliğini yitirmesine neden olmaz. Zira birçok metabolitler kanda düşük düzeyde oldukları halde idrar, süt ve gaitada yüksek düzeyde bulunabilirler.

b) Ruminantlarda sütle yüksek miktarda orotik asit atılmasının nedeni açıklık bekleyen önemli bir sorundur. Vücutta sentezlenen orotik asit ya üre gibi ana için zararlı bir maddedir ve vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir ya da ruminantlarda yavru için sütle alınması gerekli bir madde olduğundan sütle orotik asit atılmaktadır. İkinci olasılık daha sağlıklı görülmektedir. Vücutta sentezlenen orotik asidin ruminantlarda laktasyon döneminde idrar yerine sütle atılması muhtemelen yavrunun yararına çalışan fizyolojik bir olaydır. Ruminantlarda doğumu izleyen günlerde yavrularda ön mideler gelişmemiştir ve hayvanlar nonruminant özelliği taşırlar. Ön mideler gerek mekanik bakımdan gerekse fonksiyon bakımından yavaş yavaş gelişirler ve böylece süttten kesilinceye kadar yavrular ruminant özelliği kazanmış olurlar. Rumen fonksiyonları rumende mikroorganizmaların gelişmesinden sonra görülebilir. Rumen mikroorganizmaları içerisinde Laktobacillus grubu büyük önem taşır (38). Orotik asitin Laktobacillus grubu mikroorganizmalar için bir büyüme faktörü olduğu bilinmektedir (6). Bu duruma göre ruminant-

larda sütle atılan orotik asitin rumen mikroflorasının gelişmesi üzerinden etkili olduğu düşünülebilir. Yapılan bu araştırmanın amacı henüz aydınlatılmamış olan bu konunun çözümlenebilmesi için gerekli deneysel bilgileri toplamaktır. Elde edilen değerlerin ışığı altında konuyla ilgili görüşleri ve varılan sonuçları şöyle özetlemek mümkün görülmektedir.

Koyunlar amino asit metabolizmasının son ürünü olarak belirli oranda orotik asiti vücutlarından uzaklaştırmaktadırlar. Laktasyon dışındaki dönemlerde orotik asit idrarla atıldığı halde laktasyonda orotik asit daha çok sütle atılmaktadır. Yavru tarafından alınan orotik asitin özellikle rumen mikroflorasının gelişmesi üzerine etkili olduğu sanılmaktadır. Sorunun bu yönünün aydınlatılması ilginç bir araştırma konusu olabilir.

Teşekkür

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde büyük emekleri geçen O.D.T.Ü. Hayat Bilimleri Bölümü Öğretim Üyelerinden Dr. Aykut Kence'ye teşekkür etmeyi bir borç biliriz.

Literatür

- 1- **Baldwin, E.** (1967): *Excretory metabolism of proteins and Amino-acids* 13-263. *Dynamic Aspects of Biochemistry*. Fifth Edition Cambridge at the University Press London.
- 2- **Brown, G.W. and Cohen, P.P., M. Florkin and H.S. Mason** (1960): *Comparative Biochemistry Vol: II*. Academic Press, Inc. New York, 227.
- 3- **Hager, S.E. and Jones, M.E.** (1967): *Initial steps, in pyrimidine biosynthesis in Ehrlich ascites carcinoma in vitro-II. The glutamine dependent carbamylphosphate synthetase*. J. Biol. Chem. 242, 5667.
- 4- **Hager, S.E. and Jones, M.E.** (1967): *A glutamine-dependent enzyme for the synthesis of carbamylphate for pyrimidine biosynthesis in fetal rat liver*. J. Biol. Chem. 242, 5674.
- 5- **Tramoll, P. and Campbell, J.W.** (1970): *Carbamylphosphate synthesis in a land snail Strophocheilus oblongus*. J. Biol. Chem. 245, 6634.
- 6- **O'Donovan, G.A. and Neuhard, J.** (1970): *Pyrimidine metabolism in microorganisms*. Bacteriol Rev. 34, 278.

- 7- **Klain, G.J., Sullivan, F.J. and Meikle, A.W.** (1970): *Dietary Orotic Acid and Lipogenesis in the Rat.* J. Nutrition 100, 1431.
- 8- **Witting, L.A.** (1972): *Fatty Liver induction in orotic acid fed rats.* J. Lipid Res. 13, 27.
- 9- **Smith, L.H.** (1966): *Metabolic Basis of Inherited Disease. Second Edition* J.B. Stonbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson Editors. p. 739 Mc Graw-Hill New York.
- 10- **Wuu, K.D. and Krooth, R.S.** (1968): *Dihydroortic acid Dehydrogenase Activity of Human Diploid Cell Strains.* Science 160, 539.
- 11- **Fox, R.M., Smith, R.D. and O'Sullivan, W.J.** (1970): *Orotidinuria induced by Allopurinol* Science 168, 861.
- 12- **Matsuda, I., Arashima, S., Nambu, H., Takekoshi, Y., and Anakura, M.** (1971): *Hyper-ammonia due to a mutant enzyme of ornithine transcarbamylase.* Pediatrics 48, 595.
- 13- **Prior, R.L., Zimber, A. and Vissek, W.J.** (1975): *Citric, orotic and other organic acids in rats injected with active or inactive urease.* American J. Physiol. 228. 828.
- 14- **Natale, P.J. and Tremblay, G.C.** (1969): *On the availability of intramitochondrial carbamylphosphate for the extramitochondrial biosynthesis of pyrimidines.* Biochem. Biophys. Res. Com. 37, 512.
- 15- **Natale, P.J. and Tremblay, G.C.** (1974): *Studies on the availability of intramitochondrial Carbamylphosphate for utilization in Extramitochondrial Reactions in rat liver.* Arch. Biochem. Biophys. 162, 357.
- 16- **Gajos, E., Krezlewicz, H.** (1974): *Estimation of Orotic Acid in milk and milk products.* Przegląd Mleczarski 23, 7.
- 17- **Kiermier, F. and Buckl, A.** (1968): *Determination of orotic acid in milk.* Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch. 138, 159-163.
- 18- **Kiermier, F. and Buckl, A.** (1968): *Factors influencing the orotic acid content of cow's milk.* Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch. 138, 284-294.
- 19- **Chen, M.H. and Larson, B.L.** (1971): *Pyrimidine Synthesis Pathway Enzymes and orotic acid in bovine mammary tissue* J. Dairy Science 54, 1.
- 20- **Chen, M.H. and Larson, B.L.** (1968): *Possible explanation for the high orotic acid content of bovine milk.* J. Dairy Science 51, 944.
- 21- **Münchberg, F., Tsompanidou, G. and Leskova, R.** (1971): *Studies on the presence of orotic acid in milk.* Milchwissenschaft 26, 210.

- 22- **Gülen, Ş., Smith, P.C. and Tremblay, G.C.** (1974): *Evidence for the control of pyrimidine biosynthesis in tissue mincer by purines.* Biochem. Biophys. Res. Com. 56, 934.
- 23- **Smith, P.C., Knott, C.F. and Tremblay, G.C.** (1973): *Detection of the fee-back control of pyrimidine biosynthesis in slices of several rat tissues.* Biochem. Biophys. Res. Com. 54, 1141.
- 24- **Clinical Laboratory** (1974): 11 th *Edition of Medicochemical Investigation methods.* Published by E. Merck. Darmstad. 98, 360.
- 25- **Henry, R.J. Clinical chemistry** (1965): *Harper and Row.* New York 267.
- 26- **Rogers, L.E. and Porter, F.S.** (1968): *Hereditary orotic aciduria II. A urinary screening Test.* Pediatrics 42, 423.
- 27- **Stayner, A., Suva, J. and Musil, F.** (1967): *The determination of orotic acid in the blood serum by means of the spectrophotometric method.* Expereintia. 24, 116.
- 28- **Tsugo, T., Iwaida, M. and Saito, Y.** (1966): *A simple and rapid metod for the determination of orotic acid content in liquid milk.* Intern. Dairy Congr. Proc. XVIII th. p. 245.
- 29- **Okonkwo, P.O. and Kinsella, J.E.** (1969): *Orotic acid in milk powders.* The Amer. J. Clin. Nut. 22, 532.
- 30- **Long, C.** (1961): *Biochemist's Handbook* E. and F.N. Spoon Ltd. London 839 and 926.
- 31- **Metzger, B.E., Agnoli, F.S. and Freinkel, N.** (1970): *Effect of sex and pregnancy on formation of urea and ammonia during gluconeogenesis in the perfused rat liver.* Hormone and Metabolic Research 2, 367.
- 32- **Wisek, W.J.** (1972): *Effect of urea hydrolysis on cell-life span and Metabolism.* Fed. Proc. 31, 1178.
- 33- **Wood, M.H. and O'Sullivan, W.J.** (1973): *The orotic acid uria of pregnancy.* Amer. J. Obsted. Gynecol, 116, 57.
- 34- **Statter, M., Russell, A., Horowitzh, S.A. and Pinson, A.** (1974): *Abnormal orotic acid metabolism associated with acute hyper ammonia in the rat.* Biochemical Medicine 9, 1.
- 35- **Sokal, R.S. and Rohlf** (1969): *Biometry.* W.H. Freeman Company San Francisco, 320.
- 36- **Sokal, R.S. and Rohlf** (1969): *Biometry.* W.H. Freeman Company San Francisco, 309.

- 37- **rkiz, M.** (1972): *Karacabey ve Konya merinos koyunlarının Lalahan Őartlarında bazı verim zellikleri.* Lalahan Zootekni Araştırma Enstits Dergisi, 12 (1-2), 32:42.
- 38- **Stangel, H.J.** (1963): *Urea and Non-protein Nitrogen in Ruminant Nutrition.* 2 nd edition. 489. Published by nitrogen Division, Allied Chemical Corporation. U.S.A.

Yazı 23.1.1978 gn alınmıştır.

Received on January 23.1978.