

Süt İneklerinin Kan Plazmasında Eikozatrienoik Asit ve Arahidonik Asit Değerleri ile Trienoik Asit/ Tetraenoik Asit Oranlarının (C-20:3/C-20:4) Mevsimsel Değişiklikleri Üzerinde Araştırmalar

Hayati ÇAMAŞ*

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über die Eicosatriensäure - und Arachidonsäuregehalte und die jahreszeitliche Veränderungen des Trien - / Tetraensäure - Verhältnisses (C-20:3 / C-20:4) im Blutplasma von Milchkühen

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Eicosatriensäure - und Arachidonsäuregehalte und die jahreszeitliche Veränderungen des Trien - / Tetraensäure - Verhältnisses (C-20:3 / C-20:4) im Blutplasma von Milchkühen zu ermitteln.

Bei dieser Untersuchung wurde als Untersuchungsmaterial 25 Milchkühe von amerikanischen Holstein von "Atatürk Orman Çiftliği" in Ankara verwendet.

Die Bestimmung von Fettsäuren wurde mit der gaschromatographischen Methode durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung wurde die Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen Mittelwerten mit dem t-Test erfolgt.

Die Eicosatriensäuregehalte im Blutplasma waren im Frühling 3,44 mg / 100 ml., im Sommer 5,44 mg / 100 ml., im Herbst 3,95 mg / 100 ml. und im Winter 2,36 mg / 100 ml., Die Arachidonsäurewerte wurden im Frühling 7,49 mg / 100 ml., im Sommer 9,06 mg / 100 ml., im Herbst 8,49 mg / 100 ml. und im Winter 5,13 mg / 100 ml. gefunden.

Die jahreszeitliche Werte des Trien - / Tetraensäure - Verhältnisses (C-20:3 / C-20:4) der Blutplasma-Proben von Milchkühen wurden im Frühling 0,46, im Sommer 0,61, im Herbst 0,44 und im Winter 0,49 festgestellt.

* Doç. Dr.; A. Ü. Vet. Fak. Biyokimya Bilim Dalı, Ankara / TÜRKİYE

ÖZET

Bu araştırma sığırların kan plazmasındaki Eikozatrienoik asit ve Arahidonik asit konsantrasyonları ile Trienoik asit / Tetraenoik asit oranları (C-20:3 / C-20:4) ve bunların mevsimsel değişikliklerinin saptanması için yapılmıştır.

Araştırma materyali olarak Ankara Atatürk Orman Çiftliğinin 25 baş Holstein ırkı süt ineği kullanılmıştır.

Kan plazmasında yağ asitleri tayini için gaz kromatografisi tekniğinden yararlanılmıştır. İstatistik değerlendirmelerde ise eş yapma metodu kullanılmıştır.

Süt ineklerinin kan plazmasında, Eikozatrienoik asitin mevsimsel ortalama değerleri ilkbaharda 3,44 mg / 100 ml., yazın 5,44 mg / 100 ml., sonbaharda 3,95 mg / 100 ml. ve kışın 2,36 mg / 100 ml. olarak bulunmuştur. Arahidonik asit değerlerinin ise 100 ml. de mg olarak ilkbaharda 7,49, yazın 9,06, sonbaharda 8,49 ve kışın da 5,13 olduğu görülmüştür.

Eikozatrienoik asit / Arahidonik asit oranlarına (C-20:3 / C-20:4) gelince, bu ilkbaharda 0,46, yazın 0,61, sonbaharda 0,44 ve kışın ise 0,49 olarak saptanmıştır.

GİRİŞ

Hayvansal lipidlerde bulunan ve birden fazla çift bağ taşıyan doymamış yağ asitleri dört gruba ayrılır. Bu gruplandırma, yağ asidi zincirinin metil grublu ucundan başlayarak, ilk çift bağın bulunduğu karbon atomuna göre yapılır. Bu gruplara, aynı zamanda doymamış yağ asitlerinin tipi de denilmektedir^{6,25}. Palmitoleik asit (C-16:1) grubunda ilk çift bağ 7., oleik asit (C-18:1) grubundan yağ asidinde ise 9. karbon atomunda bulunur. Hayvansal organizma, bu iki gruba dahil olan yağ asitlerini yeniden sentez edebilir. Linoleik asit (C-18:2) ve linolenik asit (C-18:3) gruplarında ise ilk çift bağlar sıra ile 6. ve 3. karbon atomlarında yer alır. Hayvansal organizmadaki tüm polienik asitler, bu gruplardan birisine dahildir. Her grup içinde zincir uzaması ve desaturasyon reaksiyonları meydana geldiği halde, yağ asidi bir tipten diğerine dönüşemez. Yirmi ve daha fazla karbon atomlu ve çoğu kez hayvansal organizmada sentez edilemeyen, linoleik ve linolenik asit tipinden polienik asitlerin sentezi, linoleik (C-18:2) ve linolenik (C-18:3) asitlerden başlar. Linolenik asit (C-18:3) kısmen linoleik aside (C-18:2) benzer özellik gösterirse de onun yerini tutamaz⁶.

Esansiyel yağ asitlerinin biyokimyası hakkındaki gelişmeler, Van Dorp ve arkadaşları²⁹ ile Bergstroem ve arkadaşlarının⁵ araştırmaları sonucunda olmuştur. Bu araştırmalarda, prostaglandin PGE₂'nin arahidonik asitten oluştuğu kanıtlanmıştır. Daha sonra Bergstroem ve arkadaşları⁴ da prostaglandin PGE₁'in linoleik asitten (C-18:2) oluşan 8, 11, 14-Eikozatrienoik asitten (C-20:3) ve prostaglandin PGE₃'ün ise linolenik asitten (C-18:3) oluşan 5, 8, 11, 14, 17-Eikozapentaenoik asitten (C-20:5) meydana geldiğini gösterebilmişlerdir. Beerthuis ve arkadaşları³ ratlarda, çeşitli yağ asitlerinin esansiyel yağ asidi aktivitelerini ve enzimatik yolla, bunlardan sentez edilen prostaglandinlerin miktarını incelemişlerdir. Bu araştırmalar sonunda, biyolojik yönden aktif prostaglandinlerin, sadece esansiyel yağ asidi etkisine sahip yağ asitlerinden oluştuğu anlaşılmıştır.

İnsan ve hayvanlarda Holman'a¹⁴ göre, yeterli esansiyel yağ asidi termininin ölçüsü olarak; kalp, karaciğer, plazma ve eritrosit lipidlerindeki linoleik asitten oluş-

şan arahidonik asit (C-20:4) ile, esansiyel yağ asidinin yetersiz alınması halinde oleik asitten oluşan, eikozatrienoik asit (C-20:3) arasındaki orana başvurulur. Bu nice-lik, genellikle Trienoik asit / Tetraenoik asit oranı diye ifade edilir. Bu oranın 0,4'ün altında olması halinde, organizmanın yeterli esansiyel yağ asidi temin ettiği kabul edilmektedir. Fakat bu ifade sınırlıdır. Çünkü diyetle linoleik asit tipinden yağ asitlerinin mevcut olması durumunda, arahidonik asit sentezinin inhibe edildiği ve kalp lipidlerinin eikozatrienoik asit oranını düşürebildiği gösterilmiştir¹⁸.

Müller¹⁹ tarafından ratlarda yapılan araştırmalarda, çeşitli organlardaki trienoik asit / tetraenoik asit oranları (C-20:3 / C-20:4) araştırılmıştır. Diyetin 100 gramı 135 mg linoleik asit (C-18:2) içerdiği zaman kalpte, diyetin 100 gramında 215 mg linoleik asit bulunduğu zaman da kanda 0,4'lük trienoik asit / tetraenoik asit oranları bulunmuştur. Karaciğerde ise bu orana, ancak diyetin 100 gramı 285 mg linoleik asit (C-18:2) içerdiği zaman ulaşılabilmiştir.

Gerek ruminantların ve gerekse monogastrik hayvanların dokularındaki metabolizma benzer olarak cereyan ederse de, iki tür arasında önemli farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, gevişenlerde rumenin mevcut olması ve rumenin oluşumundan sonra karaciğerdeki ATP-Sitrat-Liyaz'ın aktivitesinin azalmasına ya da yok olmasına bağlanmaktadır. Bu enzim, mitokondrionlar içinde, glikozdan şekillenen sitrattan asetil-CoA'yı meydana getirmektedir^{2,12}.

Yeni doğan ruminantlarda henüz rumen şekillenmemiştir. Rumenin oluşumu ancak doğumdan sonraki 8. haftada tamamlanmaktadır⁸. Bunlardaki yağ ve karbonhidrat metabolizması monogastrik hayvanlardaki gibidir¹⁵. Bu nedenle besinlerdeki yağ asidi bileşimi, monogastrik hayvanlarda olduğu gibi, danalarda da depo yağlarına yansımaktadır²⁰. Halbuki yetişkin ruminantlarda, yemdeki yağ asitleri, rumen mikroorganizmaları tarafından, yoğun bir değişime uğratılmaktadır²⁴. Burada en çok değişime uğrayan doymamış yağ asitleridir. Bu nedenle yetişkin ruminantların depo yağları, diğer türlerden, ilk planda yüksek stearik asit, izo ve antaizo yağ asitleri ve doymamış yağ asitlerinin kompleks bir karışımı ile ayrılır.

Bu araştırmada, literatürde rastlanamayan, sığırların kan plazmasındaki eikozatrienoik asit (C-20:3) ve Arahidonik asit (C-20:4) konsantrasyonları ile trienoik asit / tetraenoik asit oranları (C-20:3 / C-20:4) ve bunların mevsimsel değişikliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Araştırma materyali olarak Ankara Atatürk Orman Çiftliğinde yaşları 3-5 arasında değişen, klinik yönden sağlam, laktasyon durumları aynı 25 baş Holstein ırkı süt ineği seçildi. Araştırmalarımız 1976-1977 yılları arasında bir yıl sürdü. Yıl boyunca her ay kan alınarak, kan plazmasında, eikozatrienoik asit ve Arahidonik asit yönünden toplam 300 analiz yapıldı.

Kan sağından önce, kuru ve steril iğnelerle V. Jugularis'ten heparinli tüplere alındı. Tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak buzlu termos içinde laboratuvara taşındı. Kanlar hemen santrifüje edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar analize kadar -15°C de saklandı^{23,28}.

Metod

Kan plazmasından yağların ekstraksiyonunda kloroform / metanol (2:1 V/V) karışımından yararlanıldı^{20,26,32}. Folch ve arkadaşlarının¹⁰, Story ve Rook²⁸ tarafından modifiye edilmiş olan metodu kullanıldı. Yağ asitlerinin mutlak değerlerinin (mg / 100 ml) saptanmasında, interne standart olarak, heptadekanoik asitten (C-17:0) yararlanıldı^{13,22}.

Ekstrakt % 0,88'lik potasyum klorür çözeltisi ile pürifiye edilerek 50°C de ve nitrojen gazı altında evaporatörde buharlaştırıldı. Bu şekilde elde edilen yağlar, % 15'lik metanolik potasyum hidroksit çözeltisi ile sabunlaştırıldı. Sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra, sabun çözeltisine hidroklorik asit eklenerek serbest yağ asitleri elde edildi²⁰. Serbest yağ asitleri % 1'lik metanolik sülfürik asitle esterleştirildi³¹. DEGS ve BDS kolonları kullanılarak, Beckman GC-65 gaz kromatografında, yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları elde edildi^{1,16,19,21,30}.

Yağ asitlerinin identifikasyonunda, standart yağ asitleri metil esterlerinin alkonma sürelerinden^{21,27} ve Miwa ve arkadaşları¹⁷ tarafından geliştirilen "Ekivalan Zincir Uzunluğu" "Equivalent Chain Lengths" (ECL) kuralından yararlanıldı.

Yağ asitlerinin kantitatif değerlendirilmesinde, standart yağ asitlerinin kromatogramlarından saptanan düzeltme faktörleri dikkate alındı^{7,11,20,21,26,27}.

Bu çalışmada incelenen değerlere ait istatistik hesaplamalar ve mevsimlere ilişkin ortalama değerler arasındaki farklılıkların önemliliği eş yapma metodu⁹ ile yapıldı. Bu metod gereğince saptanan t değerleri ile istatistik yönden önemlilik değerleri tesbit edildi.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Süt ineklerinin kan plazmasında bir yıl süre ile, incelenen yağ asitlerine ve Trienoik asit / Tetraenoik asit oranlarına (C-20:3 / C-20:4) ilişkin mevsimsel ferdi değerlerin ortalamaları çizelge 1 de; mevsimsel ortalama değerler arasındaki farklılığın istatistiksel önemini gösteren t değerleri de çizelge 2 de verilmiştir.

Çizelge 1 incelendiğinde; eikozatrienoik asitin (C-20:3) ilkbaharda 3,44 mg / 100 ml, yazın 5,44 mg / 100 ml., sonbaharda 3,95 mg / 100 ml ve kışın ise 2,36 mg / 100 mg. olduğu; en yüksek değere yaz mevsiminde ulaştığı, kışın ise en düşük düzeyde bulunduğu görülmektedir.

Aynı çizelgeden arahidonik asidin (C-20:4) ilkbaharda 7,49 mg / 100 ml, yazın 9,06 mg / 100 ml, sonbaharda 8,49 mg / 100 ml ve kışın ise 5,13 mg / 100 ml. düzeylerinde olduğu anlaşılmaktadır. Eikozatrienoik asit gibi bunun da en yüksek değere yaz mevsiminde ulaştığı, en düşük değere ise kışın sahip olduğu görülmektedir.

Diğer taraftan trienoik asit / tetraenoik asit oranlarına (C-20:3 / C-20:4) gelince, ilkbaharda 0,46, yazın 0,61, sonbaharda 0,44 ve kışın ise 0,49 olduğu yine çizelge 1 de gözlenmektedir. Bu değerlerin yaz mevsiminde en yüksek, diğer mevsimlerde ise yaklaşık olarak aynı düzeyde kaldığı fark edilmektedir.

Yağ asitleri yönünden yapılan mevsimler arası farklılıkların önemlilik kontrollerinde, çizelge 2'den de anlaşılacağı gibi, eikozatrienoik asidin (C-20:3) ilkbahar

Tablo: 1

Yılın Çeşitli Mevsimlerinde Holstein İneklerin Kan Plazmasında Eikozatrienoik Asit (C-20:3), Arahidonik asit (C-20:4) ile C-20:3/C-20:4 Oranının Ferdi Değerlerinin Ortalaması, Standart Hata ve Sınırlar

	MEVSİMLER				
	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	
Eikozatrienoik asit (C-20:3) (mg/100 ml)	3,44	5,44	3,95	2,36	X
	0,26	0,68	0,64	0,26	Sx
	1,32	1,58	0,08	0,26	Min.
	5,94	16,43	11,69	4,82	Max.
Arahidonik asit (C-20:4) (mg/100 ml)	7,49	9,06	8,49	5,13	X
	0,40	0,76	1,28	0,54	Sx
	4,31	4,36	2,08	1,79	Min.
	12,31	20,44	27,90	13,12	Max.
Eikozatrienoik asit (C-20:3)/ Arahidonik asit (C-20:4)	0,46	0,61	0,44	0,49	X
	0,03	0,06	0,04	0,04	Sx
	0,17	0,28	0,04	0,05	Min.
	0,73	1,35	0,85	1,01	Max.
n	25	25	25	25	

Tablo: 2

Holstein İneklerin Kan Plazmasında Eikozatrienoik Asit (C-20:3) Arahidonik Asit (C-20:4) ve C-20:3/C-20:4 Oranının Mevsimsel Ortalama Değerleri Arasındaki Farklılıkların İstatistiksel Önemini Gösteren t Değerleri

MEVSİMLER	C-20:3	C-20:4	C-20:3 / C-20:4
İlkbahar — Yaz	2,602*	1,978	2,176*
İlkbahar-Sonbahar	0,691	0,738	0,432
İlkbahar — Kış	3,752**	4,477**	0,549
Yaz — Sonbahar	1,646	0,363	2,813*
Yaz — Kış	3,946**	4,777**	1,757
Sonbahar — Kış	2,154*	2,200*	0,886

* = P < 0.05

** = P < 0.01

yaz ve sonbahar-kış mevsimleri arasındaki farklılıklar düşük düzeyde, ($P < 0.05$) ilkbahar-kış ile yaz-kış arasındaki farklılıklar ise yüksek düzeyde ($P < 0.01$) önemli bulunmuştur.

Aynı çizelgenin incelenmesinde, arahidonik asidin (C-20:4) mevsimler arasındaki farklılıkların da sonbahar-kış arasında düşük düzeyde ($P < 0.05$), ilkbahar-kış ve yaz-kış mevsimleri arasında ise yüksek düzeyde ($P < 0.01$) önemli olduğu görülmektedir.

Yine aynı çizelgenin incelenmesinden eikozatrienoik asit / arahidonik asit oranlarının (C-20:3 / C-20:4) sadece ilkbahar-yaz ve yaz-sonbahar mevsimleri arasında düşük düzeyde ($P < 0.05$) farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

İneklerin kan plazmasında incelenen eikozatrienoik asit (C-20:3) ve arahidonik asit (C-20:4) değerleri ile trienoik asit / tetraenoik asit oranına (C-20:3 / C-20:4) ilişkin literatür verilerine rastlanamamıştır.

KAYNAKLAR

1. ANONİM (1973): Beckman, GC-55 and GC-65 gas chromatographs operator's manual. Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA 92634, U.S.A.
2. BARS, H.L. (1974): Particularités métaboliques chez les ruminants. II. Métabolisme lipidique. *Ellenike Kteniatrike* 17 (4), 169-178.
3. BEERTHUIS, R.K., NUGTEREN, D.H., PABON, H.J.J. und VAN DORP, A. (1968): Biologically active prostaglandins from some new oddnumbered essential fatty acids. *Recueil* 87, 461-480.
4. BERGSTROEM, S., DANIELSSON, H., KLENBERG, D. and SAMUELSSON B. (1964): The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 239, PC 4006- PC 4008.
5. BERGSTROEM, S., DANIELSSON, H. and SAMUELSSON, B. (1964): The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid: Prostaglandins and related factors 32. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 207-210.
6. BIEDERMANN, R. (1970): Der Einfluss von Art und Menge des Futterfettes auf den Verlauf des Fettstoffwechsels bei der Legehénne und auf die Zusammensetzung des Eierfettes. Diss Nr. 4400, Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.
7. DEMAN, J.M. and BOWLAND, J.P. (1963): Fatty acid composition of sow's colostrum, milk and bady fat as determined by gas - liquid chromatography. *J. Dairy Res.* 30, 339-343.
8. DİLMEN, S. (1963): Ruminantların beslenmesinde yeni gelişme ve eğilimler. Türk Veteriner Hekimleri Odalar Birliği Merkez Konseyi Yayınları, No. 6, Ankara.
9. DÜZGÜNEŞ, O. (1963): Bilimsel Araştırmalarda İstatistik Prensipleri ve Metodlar. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 375.
10. FOLCH, J., JEES, M. and SALOANE-STANLEY G.H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

11. GUYOT, A.L. et PIRAUX, E.F. (1965): Etude par la chromatographie en phase gazeuse de la matière grasse du lait de Vaches. Variations de la composition en acides grass observées en Belgique. *Le Lait*, 45, 603-619.
12. HARDWICK, D.C. (1966): The fat of acetyl groups derived from glucose in the isolated perfused goat udder. *Biochem. J.* 99, 228-231.
13. HEMINGWAY, E.B., SMITH, G.H. and ROOK, J.A.F. (1970): The pattern of release of tree fatty acids from milk fat under the action of intrinsic and added lipases. *J. Dairy Res.* 37, 83-96.
14. HOLMAN, R.T. (1960): The ratio of trienoik: Tetraenoik acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement *J. Nutr.* 70, 405-410.
15. KOLB, E. (1975): Neuere Erkenntnisse zur Regulation des Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsels beim Wiederkäuer. *Monatsheft. Vet.Med.* 30, 739-745.
16. MELCHER, F. und RENNER, E. (1976): Untersuchungen über Minorfettsäuren des Milchfettes. 1. Zur gaschromatographischen Analyse von Minorfettsäuren. *Milchwissenschaft* 31 (2), 70-76.
17. MIWA, T.A., MIKOLAJCZAK, K.L. EARLE, F.R. and WOLFF, I.A. (1960): Gas chromatographic characterization of fatty acids identification constants for mono - and dicarboxylic methyl esters. *Analytic. Chem.* 32, 1739-1742.
18. MOHRHAUER, H. und HOLMAN, R.T. (1963): Effect of linolenic acid upon the metabolism of linoleic acid. *J. Nutr.* 81, 67-74.
19. MÜLLER, M.M. (1975): Untersuchungen über den Bedarf der Ratte an essentiellen Fettsäuren, *Diss. ETH* 56 36, Zürich.
20. NEUMANN, J. (1968): Das Fettsäuremuster in Organen von Rothirsche (*Cervus elaphus*) und Gemse (*Rupicapra rupicapra*). *Inaug. Diss., Ludwig - Max. Univ., München.*
21. NIESAR, K.H. (1965): Untersuchungen zum Einfluss von Futterfetten auf das Fettsäuremuster der Organlipide landwirtschaftlicher Nutztiere. *Zbl. Vet. Med., R.A.* 12, 589-652.
22. NOBLE, R.C., STEELE, W. and MOORE, J.H. (1971): The plasma lipids of the ewe during pregnancy and lactation. *Res. Vet. Sci.* 12 (1), 47-53.
23. PEHRSON, B. (1971): Studies of the blood lipid pattern in healthy dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 12, 230-242.
24. PERR, F.G. and MACLEOD, G.K. (1968): Effect of feeding raw Soybeans on rumen metabolism and milk composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 51, 1233-1238.
25. PRABUCKI, A.L. (1973): "Aufbau und chemische Zusammensetzung der Fettfraktion von Lebensmitteln, 11-25" In: (Herausgeber, Solms J. *Fette als funktionelle Bestandteile von Lebensmitteln*, Forster Verlag AG, CH-8033 Zürich.
26. SCHARRER, H. (1970): Über das Fettsäuremuster gebräuchlicher Futterfette. *Inaugural - Dissertation, tierärztliche Fakultät der Ludwig - Maxi - Milians - Univ., München.*
27. SEHER, A. und KÜHNAST, R. (1965): Die quantitative Auswertung von Gas-Chromatogrammen IV: Beziehungen zwischen Retentionszeit und Peakflaeche. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 67, 754-762.

28. STORRY, J.E. and ROOK, J.A.F. (1965): Effect in the cow of intraruminal infusions of volatile fatty acids and of lactic acid on the secretion of the component fatty acids of the milk fat and on the composition of blood. *Biochem. J.* 96, 210-217.
29. VAN DORP, D.A., BEERTUIS, R.K., NUGTEREN, D.H. und VONKEMAN, H. (1964): The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 204-207.
30. VOGTMANN, H. (1971): Der Einfluss von Art und Menge des Futterfettes auf die Verwertung von Canthaxanthin sowie der Vitamin A und E durch die Legehennen. Diss. Nr 4549. ETH - Zürich.
31. WEIK, H. (1970): Der Einfluss der Arbeit auf die einzelnen freien Fettsäuren im Plasma des Pferdes. *Zbl. Vet. Med. RA*, 17 (8), 712-718.
32. ZEMAN, I. und POKORNY, J. (1964): Bestimmung der Spurenfettsäuren des Milchfettes. *Die Nahrung* 8, 70-79.