

## Keçilerde Gebelik Sürecinde Retinol, $\alpha$ -Tokoferol ve Vitamin D<sub>3</sub> Konsantrasyonlarının Araştırılması

İbrahim TAŞAL<sup>1</sup> İbrahim H. YÖRÜK<sup>2</sup> Yunus ÇETİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Van

<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Van

Makale Geliş ve Kabul Tarihi: 10.05.2007-03.07.2007, Sorumlu Araştırmacı: e-mail: ibrahimtasal@hotmail.com

**Özet:** Bu çalışmada tiftik keçilerinde retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) konsantrasyonlarının gebelik dönemi olası değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada sağlıklı, östrüsleri PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ile senkronize edilmiş, yaşları 2-4 arasında değişen 12 adet renkli Tiftik keçisi kullanıldı. Çalışmada 150 günlük bir süreçte toplam 10 defa kan alındı. Gebelik boyunca retinol ve  $\alpha$ -tokoferol arasında önemli korelasyon bulunurken, vitamin D<sub>3</sub> seviyelerinin küçük dalgalanmalar dışında istikrarlı bir seyir izlediği görüldü.

Sunulan araştırma ile keçilerde gebelik boyunca  $\alpha$ -tokoferol, retinol ve vitamin D<sub>3</sub> düzeyleri ortaya konuldu. Keçilerde konunun yeterince araştırılmadığı, anılan vitaminlerin mevsimsel değişimi, beslemede kullanılan rasyonun ve laktasyon döneminin bu vitaminlere etkileri üzerine araştırmalar yapılması gerektiği kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:**  $\alpha$ -tokoferol, gebelik, keçi, retinol, vitamin D<sub>3</sub>

### Determination of Retinol, $\alpha$ -Tocopherol and Vitamin D<sub>3</sub> Levels During Pregnancy in Goats.

**Summary:** The purpose of the present study was to determine whether significant changes in sera levels of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and vitamin D<sub>3</sub> during pregnancy in goats.

The animal material of the study consisted of 12 healthy Mohair goats, between 2 and 4 years old. Oestrus was synchronized using dual dose PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  at 11 days interval. A significant correlation was found between retinol and  $\alpha$ -tocopherol throughout the pregnancy. No significant fluctuations were observed at vitamin D<sub>3</sub> levels during pregnancy.

In conclusion, the results of this study are shows sera levels of  $\alpha$ -tocopherol, retinol and vitamin D<sub>3</sub> in pregnant goats. There is little information regarding the effects of seasonal changes, pregnancy, ration and lactation on these vitamins in goats and new studies should be performed by researchers.

**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol, goat, pregnancy, retinol, vitamin D<sub>3</sub>

## GİRİŞ

Retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve vitamin D<sub>3</sub>'ün evcil hayvanlardaki üreme faaliyetlerinde görevleri olduğu bilinmektedir. Anılan vitaminler sadece üremede değil genel sağlık durumunun korunmasında da gereklidirler. Retinol ve  $\alpha$ -tokoferol savunma sisteminde vitamin D ise mineral metabolizmasında önemli roller üstlenmektedir (2, 11).

Retinol bütün omurgalılarda hayatın devamı için gerekli bir vitamindir. Görme, epitel yüzeylerin korunması, immun sistem, üreme, embriyonik gelişim ve büyümede önemli görevleri bulunmaktadır (2, 20). Biyolojik aktiviteye sahip bütün retinollere genel olarak Vitamin A ismi verilmektedir. Retinol, retinal, retinoik asit ve retinil esterleri olmak üzere hayvanlarda vitamin A'nın farklı formları bulunmaktadır. Gebelik sırasında Vitamin A fötüse plasenta yoluyla geçmektedir. Bu geçiş fötüste gelişim ve hücresel farklılaşma için gereklidir. Kolostrum, çok miktarda vitamin A ve E içermektedir (19). Buna bağlı olarak plazma vitamin A ve E düzeyinin buzağılama zamanında azaldığı bildirilmiştir (5).

Vitamin E sekiz farklı formu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferoller ve -tokotrienoller) bulunan, yağda eriyen bileşiklerin genel ismidir. Alfa-tokoferol formundaki vitamin E'nin yağda eriyebilen, biyolojik olarak en aktif antioksidan olduğu bildirilmektedir (13). Hayvan dokularında en fazla bulunan vitamin E formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Vitamin E antioksidan özelliği ile hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyondan korunmasında görevlidir (13).

Memelilerde gebelik ve laktasyon sırasında, muhtemelen fötüsün ve süt üretiminin kalsiyum ihtiyacına bağlı olarak, vitamin D metabolizmasında değişiklikler meydana gelmektedir (15). En önemli vitamin D metabolitleri olarak 25-hidroksi vitamin D, 24,25-dihidroksi vitamin D ve 1,25 dihidroksi vitamin D (vitamin D<sub>3</sub>) gösterilmektedir. Bu metabolitlerin hepsi plasentayı geçebilmektedir. Fötal böbrek ve plasenta da 25-hidroksi vitamin D ve 24-hidroksilaz aktivitesine sahip olmakla birlikte, dokuların vitamin D metabolizmasındaki önemi bilinmemektedir (15).

Yağda eriyen bu üç vitamin konsantrasyonlarının gebelikteki seyri, gebe kadınlardaki preeklampsi ile ilişkisinden dolayı yoğun olarak araştırılmıştır. Ancak evcil hayvanlarda özellikle de keçilerde gebelik boyunca  $\alpha$ -

tokoferol, retinol ve vitamin D<sub>3</sub> düzeyleri ve bunların muhtemel değişimleri hakkında yeterli literatür bilgisine rastlanılamamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada; keçilerde bu vitamin konsantrasyonlarının gebelik sırasındaki olası değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

#### MATERYAL ve METOT

Araştırmada hayvan materyali olarak, sağlıklı, östrüleri senkronize edilmiş, yaşları 2-4 arasında değişen 12 adet renkli Tiftik keçisi kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlar arpa, mısır silajı ve kuru ottan oluşan bir rasyonla beslenirken uygun hava koşullarında meraya da çıkarıldı. Araştırma Ekim - Mart ayları arasında sürdürüldü. Keçilere östrüs senkronizasyonunu sağlamak amacıyla 11 gün arayla çift doz PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  uygulandı. Son PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  uygulamasında 24 saat sonra sürüye teke katılarak aşılın keçiler kayıt edildi. Çiftleştirilen keçilerden gebe kalanlar bilinmediğinden başlangıçta toplam 18 keçiden kan alındı. Ancak gebelikleri ultrasonografi ile tespit edildikten sonra gebe olan 12 keçiden östrüsten itibaren doğum zamanına kadar 17 gün aralıklarla kan alındı. Alınan kan örneklerinden serum çıkartılarak retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve vitamin D<sub>3</sub> ölçümleri yapıncaya kadar -20°C de saklandı.

Serum ekstraksiyonları ve sıvı kromatografisi şu şekilde yapıldı. Retinol, vitamin D<sub>3</sub> ve  $\alpha$ -tokoferol analizleri için 200  $\mu$ l serum plastik tüplere alındı. Üzerlerine 200  $\mu$ l etanol eklenip 1 dakika vorteksle karıştırıldı. Bunların üzerlerine 600  $\mu$ l n-hekzan ilave edilip tekrar 1 dakika daha vorteksle konuldu ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan hekzan fazından 500  $\mu$ l alınarak azot gazı altında kurutuldu.

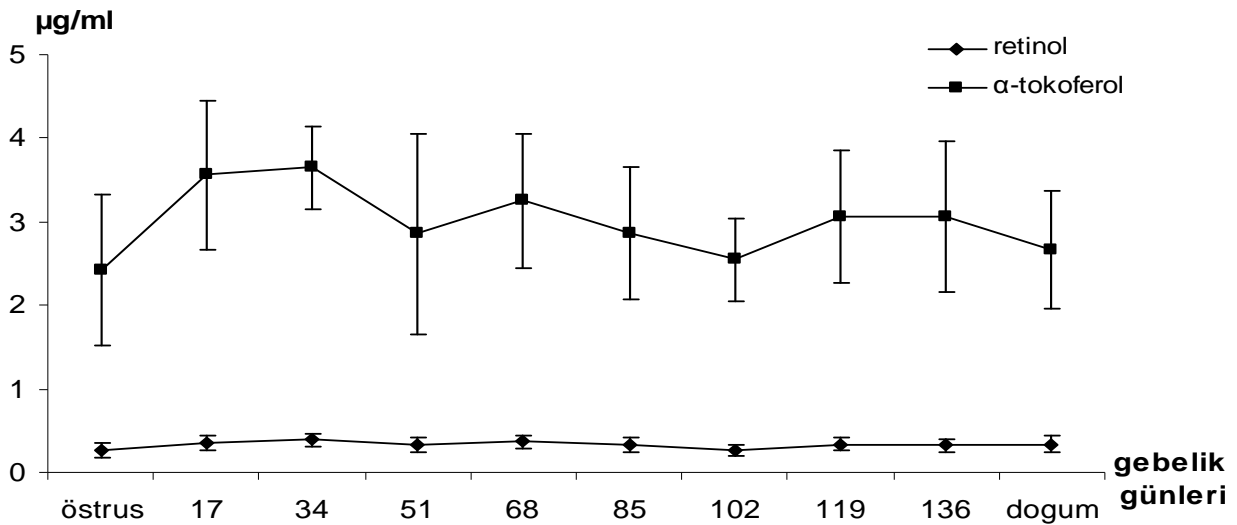
Kalıntı 100  $\mu$ l metanolde çözündürüldü ve HPLC (high-performance liquid chromatography) kolonuna enjekte edildi (6,16). Örneklerin okunmasında ise; önce Retinol, vitamin D<sub>3</sub> ve  $\alpha$ -tokoferol standartları kullanılarak düzenek analizler için hazır hale getirildi. Daha sonra, hazırlanan ekstraktardan 100  $\mu$ l alınarak sıvı kromatografisi kolonuna enjekte edildi. Retinol, vitamin D<sub>3</sub> ve  $\alpha$ -tokoferol tanıları diode-array dedektörü kullanılarak 325, 265 ve 290 nm dalga boylarında yapıldı. Mobil faz olarak metanol-su (98:2) 1.5 ml/dak akış hızında kullanıldı (10,16). Vitaminlerin ayrılmasında C18 kolonundan (4.6 mm x 25 cm) faydalandı. Analizler Agilent 1100 serisi HPLC cihazı ile gerçekleştirildi.

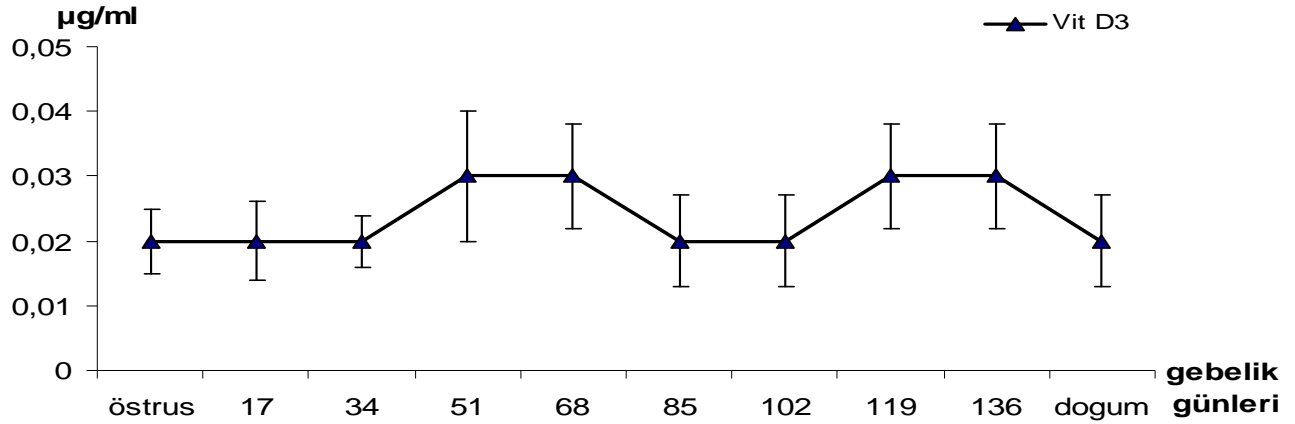
*İstatistiksel analiz:* Alınan örneklerde ölçülen değerlerin kendi aralarında değişimleri student's-t testi ile değerlendirildi. Korelasyon değerlendirmelerinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Analizler SPSS 12.0 for Windows yazılımı ile bilgisayar ortamında gerçekleştirildi.

#### BULGULAR

Gebelik boyunca keçilerin serum ortalama retinol ve  $\alpha$ -tokoferol düzeyleri Grafik 1'de vitamin D<sub>3</sub> seviyeleri ise Grafik 2' de verildi. Çalışma süresince en yüksek (0.39 $\pm$ 0.08  $\mu$ g/ml) ve en düşük (0.26 $\pm$ 0.06  $\mu$ g/ml) retinol değerleri sırasıyla gebeliğin 31 ve 102. günlerinde bulundu (p<0.001). Gebeliğin 31. gününde tokoferol 3.65 $\pm$ 0.56  $\mu$ g/ml ile en yüksek seviyesine ulaşırken östrüste 2.42 $\pm$ 0.90  $\mu$ g/ml ile en düşük seviyede idi (p<0.01). Vitamin D<sub>3</sub> seviyeleri tüm gebelik boyunca küçük dalgalanmalar dışında istikrarlı bir seyir izlediği görüldü (p>0.05). Gebelik süresi boyunca retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve D<sub>3</sub> seviyelerinin birbirleriyle olan ilişkileri incelendiğinde, retinol ve  $\alpha$ -tokoferol arasında önemli korelasyon bulundu (r=0.840).

Grafik 1 Östrüs, gebelik ve doğum zamanında serum ortalama retinol ve  $\alpha$ -tokoferol seviyeleri.





**Grafik 2** Östrüs, gebelik ve doğum zamanında serum ortalama vitamin D<sub>3</sub> seviyeleri.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Vitaminler üreme fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde devamı için gereklidir. Vitamin A ve E güçlü antioksidanlar olarak vitamin D ise mineral metabolizmasında önemli görevler yapmaktadır. Buna karşın keçilerde bu vitaminlerin üzerine yeterli araştırma bulunmamaktadır.

Dede ve ark. (4) sağlıklı kıl keçilerinde  $\alpha$ -tokoferol ve retinol seviyesini 4.2  $\mu\text{g/ml}$  ve 2.3  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada ise gebe keçilerde sırasıyla  $\alpha$ -tokoferol ve retinol değerleri  $2.42 \pm 0.90 - 3.65 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$  ve  $0.26 \pm 0.06 - 0.39 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$  arasında değişiklik göstermektedir. Bulgularımızdaki düşük  $\alpha$ -tokoferol ve retinol değerleri gebelikten, beslenmeden veya çalışmaların yapıldığı mevsim farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Aynı çalışmada (4) hayvan materyalinin cinsiyeti, beslemede kullanılan rasyon ve araştırmanın yapıldığı mevsim bilgileri verilmediğinden farkın tam olarak nedeni anlaşılamamıştır. Yur ve ark. (18) koyunlarda gebelik sırasında vitamin E ve retinol seviyelerini 2.9 ve 1.2  $\mu\text{g/ml}$  olarak ölçmüşlerdir. Bu vitaminlerin koyunlarda gebelik ve laktasyon sırasında önemli değişiklikler göstermediği bildirilmektedir (18). Koyunlarda gebelik sırasındaki vitamin E seviyeleri keçilerden elde ettiğimiz değerlere benzerlik göstermektedir. Oysa retinol düzeylerinin keçilerden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Katsoulos ve ark. (9) sütçü ineklerde gebelik süresince Vitamin A ve E düzeyleri arasında önemli korelasyon olduğunu bildirmektedirler. Le Blanc ve ark. (11) da gebe ineklerde serum  $\alpha$ -tokoferol ve retinol seviyeleri arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada ise ineklerdekine benzer şekilde keçilerde de gebelik sırasında  $\alpha$ -tokoferol ve retinol arasında pozitif korelasyon bulundu.

İneklerde doğum zamanı yaklaştıkça vitamin A ve E seviyelerinde düşmelerin olduğu bildirilmiştir

(8,11,13). Aksakal ve ark. (1) gebeliğin başlarında vitamin E düzeylerini 4.31  $\mu\text{g/ml}$  iken, gebeliğin son dönemi olan aralık ayında 1.64  $\mu\text{g/ml}$  seviyesi ile en düşük düzeyde olduğunu bildirmektedirler. Koyunlarda da ileri gebelikte vitamin A ve vitamin E seviyelerinin erken gebelik dönemlerine göre düştüğü görülmüştür (17). Yem almındaki azalma, fetal gelişim ve vitaminlerin kolostruma kanalize olmasının bu düşüşe sebep olduğu ileri sürülmektedir (8). Bir mililitre kolostrum, yaklaşık olarak 4300 ng retinol, 200 ng beta-karoten ve 1900 ng  $\alpha$ -tokoferol içermektedir. Gebelik süresince vücutta artan enerji ihtiyacı ile birlikte vücutta reaktif oksijen bileşiklerinin de üretimi artmaktadır. Bu bileşikler antioksidan olduklarından doğum zamanında artan oksidasyon faaliyetlerinin de bu düşüş de etkili olabileceği bildirilmektedir (5). Bu çalışmada, gebe keçilerde de ineklerdekine benzer şekilde doğum zamanına doğru,  $\alpha$ -tokoferol ve retinol düzeylerinde düşme olduğu saptandı. Ancak bu düşüşte kış mevsiminin gelmesiyle hayvanların kapalı ahırlara alınması ve meraya çıkamamaların da etkisini göz önüne almak gerekir. Zira Çetinkaya ve ark. (3) Ankara keçilerinde beta-karoten seviyelerinin özellikle keçilerin kapalı ahıra alındığı aylarda önemli ölçüde düştüğünü bildirmişlerdir.

Gebe hayvanlarda 1,25-dihidroksi vitamin D seviyelerinin daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir (7,15). Çoğu hayvan türünde fötüsün mineral madde ihtiyaçları, annenin kan plazmasındaki 25-(OH)D düzeylerinin azalması ve 1,25-(OH)<sub>2</sub>D seviyelerinin artmasıyla karşılanmaktadır. Ancak koyunlarda gebelik sırasında söz konusu metaboliterin dolaşımdaki düzeylerinin değişmediği bildirilmektedir. Bu nedenle gebe koyunlar diğer türlerden farklı bir özellik göstermektedir (14). Ancak Liesegang ve ark. (12) doğum zamanında 1,25-(OH)<sub>2</sub>D düzeylerinin koyunlarda 40 pg/ml ve keçilerde ise 60 pg/ml düzeylerine yükseldiğini bildirmektedirler. Bu çalışmada keçilerde 1,25 dihidroksi vitamin D seviyelerinde östrüsten doğuma kadar istatistiksel olarak önemli bir değişim bulunamadı. Bu vitaminin keçilerde tüm gebelik boyunca durumu ile ilgili

literatür bilgisine rastlanmadığından, karşılaştırma imkanı olmamıştır.

Sonuç olarak sunulan araştırma ile gebe keçilerde  $\alpha$ -tokoferol, retinol ve vitamin D<sub>3</sub> düzeyleri ortaya konulurken,  $\alpha$ -tokoferol ve retinol arasında

yüksek korelasyon olduğu belirlendi. Keçilerde konunun yeterince araştırılmadığı, anılan vitaminlerin mevsimsel değişimi, beslemede kullanılan rasyonun ve laktasyon döneminin bu vitaminlere etkileri üzerine araştırmalar yapılması gerektiği kanısına varıldı.

## KAYNAKLAR

- Aksakal M, Karakılıç AZ, Kalkan C, Çay M, Nazıroğlu M (1995):** İneklerde üremenin çeşitli dönemlerinde  $\beta$ karoten ve E vitamini düzeyleri. Doğa Tr. J. Vet. Anim. Sci. 19: 59–64.
- Blomhoff R, Blomhoff HK (2006):** Overview of retinoid metabolism and function. J. Neurobiol. 66: 606–630.
- Çetinkaya N, Ulutürk S, Öztürk A (1996):** Ankara keçilerinde serum retinol ve beta-karoten seviyelerinin mevsimsel değişimleri. Lalahan Hay. Arş. Ens. Der., 36: 88–94.
- Dede S, Değer Y, Kahraman T, Değer S, Alkan M, Cemek M (2002):** Oxidation Products of Nitric Oxide and the Concentrations of Antioxidant Vitamins in Parasitized Goats. Acta Vet. Brno. 71: 341–345.
- Goff JP, Kimura K, Horst RL (2002):** Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and  $\beta$ -Carotene status at parturition. J. Dairy Sci. 85: 1427–1436.
- Fechner H, Schlamet M, Guthmann F, Stevens PA and Rüstow B (1998):**  $\alpha$ - and  $\delta$ - Tocopherol Induce Expression of Hepatic  $\alpha$ -Tocopherol Transfer-Protein mRNA. Biochem.J., 331, 577–581.
- Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA (1994):** Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. J. Dairy Sci. 77: 1936–1951.
- Kara H, Karataş F, Servi K, Akar Y, Konar V (2001):** Holştayn sığırlarda gebeliğin farklı dönemlerindeki plazma adrenalın, noradrenalin ile vitamin A ve E düzeylerinin araştırılması. F.Ü. Sađ. Bil. Derg. 15: 171–174.
- Katsoulos PD, Roubies N, Panousis N, Karatzanos P, Karatzias H (2005):** Long-term fluctuations and effect of age on serum concentrations of certain fat-soluble vitamins in dairy cows. Vet. Clin. Pathol. 34: 362–367.
- Miller KW and Yang CS (1985):** An Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analysis of Plasma Retinol,  $\alpha$ -tocopherol and Various Carotenoids. Analytical Biochemistry 145: 21–26
- LeBlanc, S.J., Herdt, T.H., Seymour, W.M., Duffield, T.F., Leslie, K.E. (2004):** Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. J. Dairy Sci., 87: 609–619.
- Liesegang A, Risteli J, Wannner M (2006):** The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. Bone 38: 794–802.
- Meglia EG, Jensen SK, Lauridsen C, Waller P (2006):**  $\alpha$ -Tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. J. Dairy Res. 73: 227–234.
- Paulson SK, Langman CB (1990):** Plasma vitamin D metabolite levels in pregnant and nonpregnant ewes. Comp. Biochem. Physiol. A: Physiology 96: 347–349.
- Paulson SK, Deluca HF (1986):** Review article: Vitamin D metabolism during pregnancy. Bone 7: 331–336.
- Reynolds SL and Judd HJ (1984):** Rapid Procedure for the Determination of Vitamins A and D in Fortified Skimmed Milk Powder Using High-Performance Liquid Chromatography. Analyst 109: 489–492
- Yokus B, Cakır DU, Kanay Z, Gulden T, Uysal E (2006):** Effects of seasonal and physiological variations on the serum chemistry, vitamins and thyroid hormone concentrations in sheep. J. Vet. Med. A 53: 271–276.
- Yur F, Dede S, Değer Y, Mert N (2003):** Effects of gestation and lactation on lipid peroxidation and antioxidant system in sheep. Indian Vet. J. 80: 997–998.
- Zanker IA, Hammon HM, Blum JW (2000):** Beta-carotene, retinol and alpha-tocopherol status in calves fed the first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 or 24-25 hours after birth. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 70: 305–310.
- Zile MH (2001):** Function of vitamin A vertebrate embryonic development. J. Nutr. 131: 705–708.