

İneklerde Seksüel Siklusun Farklı Dönemlerinde Uterus Arginaz Seviyelerinin Araştırılması

Murat YÜKSEL¹ Fatih Mehmet KANDEMİR² Hüseyin DEVECİ³ Necmi ÖZDEMİR⁴

¹ Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Sivas, Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Erzurum, Türkiye

³ Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Elazığ, Türkiye

⁴ Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Elazığ, Türkiye

Geliş tarihi: 08.12.2011

Kabul Tarihi: 05.01.2012

ÖZET

Bu çalışma ineklerde seksüel siklusun farklı dönemlerinde uterus arginaz seviyelerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmanın materyalini yaşları 3-7 arasında değişen, farklı ırktan toplam 40 inek uterusu oluşturdu. Uterus örnekleri düzenli olarak kesim yapılan yerel bir mezbahadan temin edildi. Kesimden hemen sonra genital organlar inspeksiyonla muayene edilerek iç genital organlarında herhangi bir patolojik lezyon gözlenmeyen hayvanlara ait uterus örnekleri çalışmaya dahil edildi. Hayvanların seksüel siklus dönemi, ovaryumlar ve uterus muayene edilerek belirlendi. Uterus doku arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Uterus arginaz düzeyleri proöstrüs döneminde 0.56 ± 0.19 U/mg protein, östrüs döneminde 0.68 ± 0.23 U/mg protein, metöstrüs döneminde 0.59 ± 0.21 U/mg protein, diöstrüs döneminde ise 0.50 ± 0.12 U/mg protein olarak belirlendi. Elde edilen değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P > 0.05$), ancak değerlerin seksüel siklus dönemlerine göre sayısal farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Özellikle östrüs döneminde doku arginaz düzeyinin yükseldiği gözlemlendi. Sonuç olarak, ineklerde östrüs siklusunun farklı dönemlerinde uterus dokusu arginaz seviyeleri arasında bir farklılığın olmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler

İnek, Östrüs Siklusu, Uterus, Arginaz

Uterine Arginase Status in Different Sexual Stages in Cattle

SUMMARY

The aim of this study was to investigate arginase status in different sexual stages in cattle uterus. Forty, 3-7 years old, different breed cow's uterus were used in the study. Uterine samples were obtained from cows slaughtered routinely at the local abattoir. Immediately after slaughter, uterus and ovaries were visually examined to determine any pathologic lesions of the genital tract and uterine samples were dissected only from cows that were diagnosed to have a healthy genital tract. The sexual cycle of cows was diagnosed via examination of ovaria and uterus and divided four equal groups. The thiosemicarbazide-diacetylmonoxime urea (TDMU) method was used to measure uterus arginase activity. Uterus arginase levels (U/mg protein) in proestrous, estrous, metestrous and diestrous was 0.56 ± 0.19 , 0.68 ± 0.23 , 0.59 ± 0.21 , 0.50 ± 0.12 U/mg protein respectively. No statistically significant difference was observed uterus arginase levels in different sexual stages of cow's estrous cycle. As a result, cow uterine arginase levels were not changed different sexual stages in cows.

Key Words

Cow, Estrous cycle, Uterus, Arginase

GİRİŞ

Arginaz, üre siklusunun bir enzimidir ve L-argininin ornitin ve üreye hidrolizini katalize eder (Keskinege ve ark. 2001). Arginazın iki izoformundan biri olan arginaz I sitoplazmada lokalize olurken diğer izoform olan arginaz II mitokondriada bulunmaktadır (Kepka-Lenhart ve ark. 2008). Arginaz bakımından en zengin organ üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (Spector ve ark. 1983; Moreno-Vivian ve ark. 1992). Ancak böbrek, beyin, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, dalak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi üre döngüsünün görülmediği ekstrahepatik dokularda da arginaz enziminin olduğu belirtilmiştir (Kandemir ve Özdemir 2009). Arginazın üre döngüsünün olmadığı bu dokulardaki

görevinin prolin, glutamat, ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitinin kaynağını sağlamak olduğu bilinmektedir (Ash 2004). Poliamin biyosentezinde arginaz enzimi başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Poliaminler (putressin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (Thomas ve Thomas 2001; Igarashi ve Kashiwagi 2010). Poliaminlerin ayrıca androjenlerin faaliyetlerini düzenlediği de bildirilmektedir (Mendez ve ark. 2002). Sığırlarda, genital sistemin tamamında farklı aktivite oranlarıyla arginaz enziminin varlığı gösterilmiştir (Razmi ve ark. 2005).

İneklerde seksüel siklusun proöstrüs ve östrüs evrelerinde (folliküler, östrojenik, proliferatif evre) hakim hormon

östrojen iken; metöstrüs ve diöstrüs evrelerinde (luteal, progesteratif, sekretorik evre) ise progesterondur. Bu dönemlerde farklı hormonların etkisine maruz kalan ovarium, uterus, serviks uteri gibi organlarda kan akımında değişim; enzim ve reseptör düzeylerinde farklılaşmalar meydana gelmektedir (Bearden ve ark. 2004).

Ovaryumda folliküllerin olgunlaştığı ve hormonal aktivitenin arttığı proliferasyon döneminde endometriyumda kalınlaşma, lamina propriyanın genişlemesi ve uterus bezlerinin büyümesi gerçekleşir (Erdost 2008). Östrojenler, genital dokunun tamamında, su ve elektrolitlerin tutulması olayını sağlar. Östrojen; endometriyal hücrelerin büyüklüklerinde artış ve bu hücrelerde mitotik aktivitenin artmasını uyarır. Böylece, endometriyumdaki kapillar yatak ve uterusun genel damarlaşması ve uterusu gelen kan akımı artar. Kan akımındaki bu artış, hücre çoğalmasına ve ödem şekillenmesine yol açar. Sayılan bu olaylar sebebiyle endometrium kalınlaşır ve daha da büyür. Benzer değişiklikler ovidukt mukozası ve kas tabakasında da şekillenir (Pineda 2003).

Ovulasyon sonrası korpus luteum, progesteron salgılamaya başlayarak süperfişyal endometriyal hücrelerin büyüklüğü daha da artarak endometriyumun salgı yapan elemanlarını etkiler ve salgı yapmaya başlar. Sekretorik evre olarak da adlandırılan bu dönemde uterus bezleri, uterus sütü olarak adlandırılan yoğun bir materyali uterus lumenine salgırlar. Uterus sütü implantasyon öncesi evrede yavruyu besleme işlevi görür. Siklus ilerledikçe ve ödem azaldıkça, subepitelyal tabakaya, nötrofil ve eozinofiller infiltre olur. Siklus ortalarına kadar yüksek kolumnar hücreler epitelyum yüzeyinde hâkimdir ve eozinofilik lökositlerle yüzeysel invazyonu en üst seviyededir (Pineda 2003; Erdost 2008).

Dişilerde, hormon (östrojen, progesteron) düzeylerinde meydana gelen artış ve azalma, seksüel siklus dönemlerine göre farklılıklar göstermektedir. Sunulan çalışmayla folliküller fazda artan östrojen; eritrosit, trombosit gibi kan elemanlarının artışını sağladığı ve dolaylı olarak da arginaz miktarını arttırdığı varsayılarak, ineklerde seksüel siklusun folliküler ve luteal fazları arasında arginaz düzeylerindeki değişimin ortaya konulması amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramasında, ineklerde seksüel siklusun farklı evrelerinde uterus dokusunda arginaz enzim aktivitesinin araştırıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız bir ilk olma niteliğindedir.

Tablo 1. Östrus siklusunun farklı dönemlerinde uterus arginaz aktivite değerleri

Table 1. Uterine arginase status in different sexual stages

Seksüel Siklus Dönemi	Proöstrus (n=10)	Östrus (n=10)	Metöstrus (n=10)	Diöstrus (n=10)	P
Uterus Arginaz Aktivitesi (U/mg protein)	0.56±0.19	0.68±0.23	0.59±0.21	0.50±0.12	>0.05

TARTIŞMA ve SONUÇ

Memelilerde, karaciğer, üre döngüsünün tam olarak şekillendiği organdır (Greenberg 1960). Karaciğerdeki üre döngüsünde yüksek oranlarda arginin sentezi şekillenir. Bir substrat olan L-argininin, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından, penis ereksiyonu ve klitoris uyarımı için başlıca aracı olan nitrik okside (NO) (Bivalacqua 2001; Wilson 2003), arginaz tarafından ise üre ve ornitine hidrolize edildiği bildirilmiş ve bu iki yolun yarışma

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini yaşları 3-7 arasında değişen, farklı ırktan toplam 40 inek uterusu oluşturdu. Uteruslar seksüel siklus evrelerine göre her evrede 10 tane olacak şekilde 4 eşit gruba ayrıldı. Uterus örnekleri düzenli olarak kesim yapılan yerel bir mezbahadan temin edildi. Kesimden hemen sonra genital organlar inspeksiyonla muayene edilerek iç genital organlarında herhangi bir patolojik lezyon gözlenmeyen hayvanlara ait uterus örnekleri çalışmaya dahil edildi. Tüm örnekler soğuk zincirde, 25 dakika içerisinde laboratuvara getirildi ve doku örnekleri etrafındaki dokulardan temizlenerek birkaç kez %0.9'luk fizyolojik tuzlu su ile yıkandı. Dokular daha sonra 0.5 grama küçültülerek ölçümler yapıncaya kadar - 20 °C'de saklandı.

Hayvanların seksüel siklus dönemleri, Ireland ve ark. (1980) ve Hanzen ve ark. (2000)'nın bildirdiği muayene yöntemlerine göre belirlendi.

Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) metodu (Geyer ve Dabich 1971) ile spektrofotometrik olarak, protein miktarı da Lowry ve arkadaşlarının metodu ile ölçüldü (Lowry ve ark. 1951).

Çalışmada, 1 ünite enzim 1 saatte, 37 °C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite µmol üre / saat / mg protein olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılığın tespitinde Varyans Analizi testinden, ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde ise Duncan testinden yararlanıldı. Tüm değerler ortalama ± standart hata (±SEM) olarak verildi.

BULGULAR

Östrüs siklusunun farklı dönemlerinde ölçülen Uterus arginaz aktivite değerleri (U/mg protein) Tablo 1'de gösterilmiştir.

Uterus arginaz düzeyleri proöstrüs döneminde (n=10) 0.56±0.19 U/mg protein, östrüs döneminde (n=10) 0.68±0.23 U/mg protein, metöstrüs döneminde (n=10) 0.59±0.21 U/mg protein, diöstrüs döneminde (n=10) ise 0.50±0.12 U/mg protein olarak belirlendi. En yüksek aktivite östrüs döneminde, daha sonra sırasıyla metöstrüs, proöstrüs ve diöstrüs döneminde tespit edilmesine rağmen elde edilen değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlemlendi (P>0.05).

halinde olduğu belirtilmiştir (Ireland ve ark. 1980; Cook ve ark. 1994). Ornitin daha sonra spermidin, spermin ve putrescin gibi poliaminlerin sentezini destekler (Kocna ve ark. 1996). Bu poliaminler de hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması olaylarında önemli bir role sahiptir. Arginazın karaciğer dışındaki dokularda bulunmasının, bu dokuların arginazı üre sentezi dışında başka bir amaca yönelik olarak kullandığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada inek üreme sisteminin hemen hemen tamamında farklı aktivite oranlarıyla arginaz enzimi saptanmıştır (Razmi ve ark.

2005). Arginaz aktivitesi bulguları dişi tavşan genital organları (Wilson 2003) ve fare uterusunda (Yu ve ark. 2003) da tespit edilmiş ve düşük miktarlarda arginaz inhibitörü verilmesinin erkek ve dişi tavşanda genital organlara kan akımının artmasıyla sonuçlandığı tespit edilmiştir (Wilson 2003). NO rat uterusu tarafından da sentezlenir ve üretimi progesteron hormonu tarafından düzenlenir (Yallampalli ve Dongy 2000). NOS varlığı insan klitoral korpus kavernosumu (Burnett 1997) ve vaginasında (Hoyle ve ark. 1996) tespit edilmiştir. Arginaz da bu dokular içerisinde lokalize olmuştur ve dişilerde arginazın inhibisyonu düz kasların gevşemesini ve seksüel uyarımı artırır (Cama 2003). Arginaz enzim aktivitesi, inek üreme sisteminde, vestibulum vaginada en yüksek olarak tespit edilmiş ve nedeni olarak da bu bölgede hücre bölünmesi, proliferasyonu ve farklılaşmasının yüksek oranda şekillenmesine bağlanmıştır (Razmi ve ark. 2005).

Sunulan çalışmada ise arginaz enzim aktivitesi, uterusun östrojen etkisi altında olduğu ve buna bağlı olarak da hücre proliferasyon oranının diğer evrelere göre yüksek oranda şekillendiği östrüs döneminde (0.68 ± 0.23 U/mg protein) en yüksek oranda bulunmuştur. Ancak proöstrüs (0.56 ± 0.19 U/mg protein), metöstrüs (0.59 ± 0.21 U/mg protein) ve diöstrüs (0.50 ± 0.12 U/mg protein) evresi arginaz aktivitesi seviyelerinden yüksek olan bu değerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Proliferasyon oranının yüksek olduğu östrüs evresinde arginaz seviyesinin yüksek olmasının, poliaminlerin sentezindeki rolü sebebiyle olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, ineklerde uterus dokusu arginaz aktivitesinin östrüs siklusunun evreleri arasında istatistiksel olarak farklılığa sahip olmadığı ve konunun tam olarak açıklığa kavuşabilmesi için daha fazla sayıda hayvanda ve NO, poliaminler, östrojen ve progesteron düzeyleri ile ilişkilendirilen ilave çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- Ash DE (2004). Structure and function of arginase. *ASN*, 22, 2760-2764.
- Bearden JH, Fuquay JW, Willard ST (2004). The estrous cycle In: Applied Animal Reproduction, 61-73, Pearson Prentice Hall, USA.
- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC (2001). Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: In diabetic-associated erectile dysfunction. *Bioch Biophys Res Commun*, 283, 923-927.
- Burnett AL (1997). Nitric oxide in the penis: Physiology and pathology. *J Urol*, 157, 320-324.
- Cama E (2003). Human arginase II: Crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochem*, 42, 8445-8451.
- Cook HT, Jansen A, Lewis S, Largen P, O'Donnell M, Reaveley D, Cattel V (1994). Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: Interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 267, 646-653.
- Erdost H (2008). Dişi genital sistem In: Veteriner Özel Histoloji, Özer A (Ed), 234, Nobel Yayın Dağıtım Tic Ltd Şti, Ostim-ANKARA.
- Geyer JW, Dabich D (1971). Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 39, 412-417.
- Greenberg DM (1960). Enzymes of urea cycle. In: Enzymes, Boyer PD, Lardy H, Myrback K (Eds), Academic Press, New York.
- Hanzen CH, Pietrose M, Scenzi O, Drost M (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Vet J*, 159, 161-170.
- Holyle CHV, Stones RW, Robson T, Whitel YK, Burnstock G (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves. *J Anat*, 188, 633-644.
- Igarashi K, Kashiwagi K (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 39-51.
- Ireland JJ, Murphee RL, Coulson PB (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci*, 63, 155-160.
- Kandemir FM, Özdemir N (2009). Some kinetic properties of arginase in sheep spleen tissue. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(4), 553-559.
- Kepka-Lenhart D, Ash DE, Morris SM (2008). Determination of mammalian arginase activity. *Metho Enzymol*, 440, 221-230.
- Keskinege A, Elgun S, Yilmaz E (2001). Possible implications of arginase and diamine oxidase in prostatic carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 25, 76-79.
- Kocna P, Fric P, Zavoral M, Pelech T (1996). Arginase activity determination. A marker of large bowel mucosal proliferation. *Eur J Clin Biochem*, 34, 619-623.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Mendez JD, Sosa A, Palomar-Morales M (2002). Effect of L-arginine on arginase activity in male accessory sex glands of alloxan treated rats. *Reprod Toxicol*, 16, 809-813.
- Moreno-Vivian C, Soler G, Castillo F (1992). Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Eur J Biochem*, 204, 531-537.
- Pineda MH (2003). Female reproductive system. In: McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction, Pineda MH, Dooley MP (Eds.), 296-300, Iowa State Press, Iowa.
- Razmi N, Jelodar GA, Nazifi S, Dehghani A (2005). Arginase status in cattle reproductive system. *Vet Arhiv*, 75, 31-38.
- Spector EB, Rice SCH, Cederbaum SD (1983). Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. *Pediatr Res*, 17, 941-944.
- Thomas T, Thomas TJ (2001). Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 58, 244-258.
- Wilson L (2003). Arginase inhibitors touted as potential drug target for sexual dysfunction. *Biochem*, 81, 9.
- Yallampalli C, Dongy YL (2000). Estradiol-17 inhibits nitric oxide synthase (NOS)-II and stimulates NOS-III gene expression in the rat uterus. *Biol Reprod*, 63, 34-41.
- Yu H, Yoo PK, Aguirre CC, Tsoa RW, Kern RM, Grody WW (2003). Widespread expression of arginase I in mouse tissues: Biochemical and physiological implications. *J Histochem Cytochem*, 51, 1151-1160.