

B₁ VİTAMİNİNİN YÜKSEK DOZLARI TATBİK EDİLMİŞ, NORMAL BESLENEN ATLARIN İDRARINDA BU VİTAMİNİN SAPTANMASI.

Ayman ÖNAL (*), Sebhattin KALAYCI (**), Metin KERMAN (***)

GİRİŞ

Hayvansal organizmanın fonksiyonları için, az miktarda da olsa gerekli olan vitaminler; etki mekanizmalarına göre :

- 1 — Koenzim fonksiyonuna sahip olan vitaminler,
- 2 — Koenzim fonksiyonuna sahip olmayan vitaminler,
- 3 — Vitamin benzeri etki yapan maddeler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (3).

B₁ Vitamini (Thiamin), bütün B kompleksi vitaminleri gibi, koenzim fonksiyonuna sahiptir.

Thiamin barsaklardan emildikten sonra, özellikle karaciğerde, iki molekül fosforik asitle birleşir ve thiamin pirofosfat (tiamin difosfat) haline geçer.

Tiamin pirofosfat, karboksilaz denilen tiaminoproteininin koenzimidir ve piruvik asit gibi α -keto asitlerin dekarboksilasyonunda görev yapar (8, 4). Dolayısıyla glikoz metabolizmasında rol oynar.

(*) Doping Laboratuvarı Uzmanı

(**) Doping Laboratuvarı Şefi

(***) Doping Laboratuvarı Uzmanı

Normalde çok az miktarda idrarda tiamin bulunur. Ekstra tiamin alınması halinde idrardaki miktarında artış olur. 1 mg. doz tiamin alındığı zaman idrarla atılan miktar 60 γ kadardır. Çünkü tiaminin önemli bir kısmı dokularda absorbe olur (8). Kas dokusu tiamin miktarı bakımından fakirdir. Fakat organizmada çok yaygın olduğundan, besinlerle alınan tiaminin büyük bölümünü kaslar sarfeder.

Tiamin pirofosfat yıkılma sırasında defosforile olarak, kısmen serbest vitamin kısmen de konjuge sülfat esteri şeklinde idrarla atılır (4, 10).

Koşu atlarının idrarlarında yapılan çalışmada ortalama 101, 4150 µg/100 ml. tiamin bulunmuştur.

Mevsimplere göre yapılan mukayesede, sonbahar ve kış aylarındaki ortalama değerlerin, ilkbahar ve yaz aylarına oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (9).

Normal beslemeye tabi tutulan atlara intramuskuler olarak tiamin verildiği zaman idrardaki miktar yönünden değişikliği incelemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

MATERYAL :

Çalışmalarımıza önce üç deneme atıyla başladık. Daha sonra atın bir tanesi öldüğünden, iki at üzerinde devam ettik. İlk dört ay, normal beslenmeye tabi tuttuğumuz kısıraklardan sonda ile aldığımız idrarlarda tiamin miktarlarını saptadık. Mayıs ayından itibaren, kısıraklara 60 mg, 200 mg, 500 mg, tiamini intramuskuler olarak verip, 2 saat, 10 saat ve 24 saat sonra sonda ile alınan idrarlardaki miktarı inceledik.

METOT :

İdrarda tiamin tayini, fluoremetrik tiocrome metodu ile yapıldı (2, 5, 11).

Prensip : Bu metod; tiaminin alkali solusyonda mavifloresans veren tiokroma okside olması esasına dayanır.

Ayraçlar :

- 1 — % 25 Potasyum klorür solusyonu
500 gr. Potasyum klorür, ısıtılarak 1500 ml. 0,1 N. Hidroklorik asitte eritildi ve süzüldü.
- 2 — Dekalso (zeolit) : 80 meşlik dekalso üç defa % 3'lük asetik asit ile, bir defa % 25'lik potasyum klorür ile yıkandı, tekrar, % 3'lük asetik asit, sonra birkaç defa distile su ile yıkandı ve çökmeğe bırakıldı, yıkama suyu döktüldü, 100°C'de kurutuldu.
- 3 — N/Sodyum Hidroksit : 40 gr. sodyum hidroksit, distile suda eritildi, 1 lt.'ye distile su ile tamamlandı.
- 4 — Anhidr sodyum sülfat.
- 5 — Redistile Isobutil Alkol : Isobutil alkol distile edildikten sonra kullanıldı.
- 6 — Potasyum ferri siyanürün suda % 1'lik solusyonu (Bu solusyon buzdolabında 6 ay dayanıklıdır).
- 7 — Suda % 15 sodyum hidroksit solusyonu.
- 8 — Oksidan ayraç : 29 cc. % 15 NaOH, 1 cc. % 1 Potasyum ferri siyanür solusyonları karıştırıldı. Her seferinde taze olarak hazırlandı.
- 9 — Kinin sülfat standardı :
 - a) Stok standart : 0,0108 gr. kinin sülfat, N/10 sülfürik asit içinde eritildi ve N/10 sülfürik asitle 1000 cc.'ye tamamlandı. (Karanlıkta ve renkli şişede saklandı.)
 - b) Çalışma standardı : 1 cc. stok standartdan alındı, 39 cc. N/10 sülfürik asit ilâve edildi. Kuvvetle çalkalandı. Her seferinde taze olarak hazırlandı. (Bu solusyon aşağı yukarı 1 µg tiamin hidrokloridin verdiği floresansı verir.)
- 10 — Tiamin Standardı :
 - a) Stok tiamin solusyonu : 100 mg. kuru tiamin hidroklorid, % 20 etanol içinde eritildi ve % 20 etanol ile

1000 cc.'ye tamamlandı. pH : 3.5 — 4,3'e, N/10 hidroklorid asit ile ayarlandı.

b) Tiamin ara solusyonu : 10 cc. stok solusyon distile su ile 100 cc.'ye tamamlandı. pH : 4—4,5 (1 cc: 10 µg tiamin hidroklorid)

c) Tiamin çalışma solusyonu : 25 cc. ara solusyondan alındı. Distile su ile 250 cc.'ye tamamlandı. pH : 4—4,5 (1 cc. 1 µg tiamin hidroklorid).

Aletler :

- 1 — Fluorometre, Carl-Zeiss Jena
- 2 — Adsorbsiyon tüpleri
- 3 — Ayırma hunileri

İşlem :

- 1 — Tiamin idrardan aktif dekalso ile alındı. Bunun için adsorbsiyon kolonuna bir parça cam pamuğu yerleştirildi. Kolon, distile su ile dolduruldu, üzerinde 2-5 gr. aktif dekalso konulup çökmeğe bırakıldı. Sonra kolon % 0,5'lik asetik asit ile doldurulup drene edildi.
- 2 — Bir erlenmayere 10 ml. idrar alındı. (tiamin enjeksiyonundan sonra alınan idrarlar 1 ml. alındı, distile su ile 10 ml.'ye tamamlandı.) pH, yaklaşık olarak 4'e ayarlandıktan sonra kolondan geçirildi ve bu kısım atıldı.
- 3 — Daha önce idrarın konulduğu erlenmayer, 10 ar ml.'lik sıcak distile sular ile üç defa çalkalanarak, kolon bu sularla yıkandı, yıkama suları atıldı.
- 4 — Kolonun altına dereceli bir kap konuldu ve önce 10 ml. sonra 10 ml. ve daha sonra 5 ml. olmak üzere üç defada % 25'lik asidik KCl ile elüe edildi. Toplanan elüat 25 ml. den az ise % 25'lik asidik KCl ile 25 ml.'ye tamamlandı.
- 5 — Tiokrom reaksiyonu için bu elüattan ayırma hunisine 5 ml. alındı, üzerine 3 ml. oksidan ayıraç eklenip karıştırıldı ve bir dakika içinde 13 ml. redistile izobutil alkol

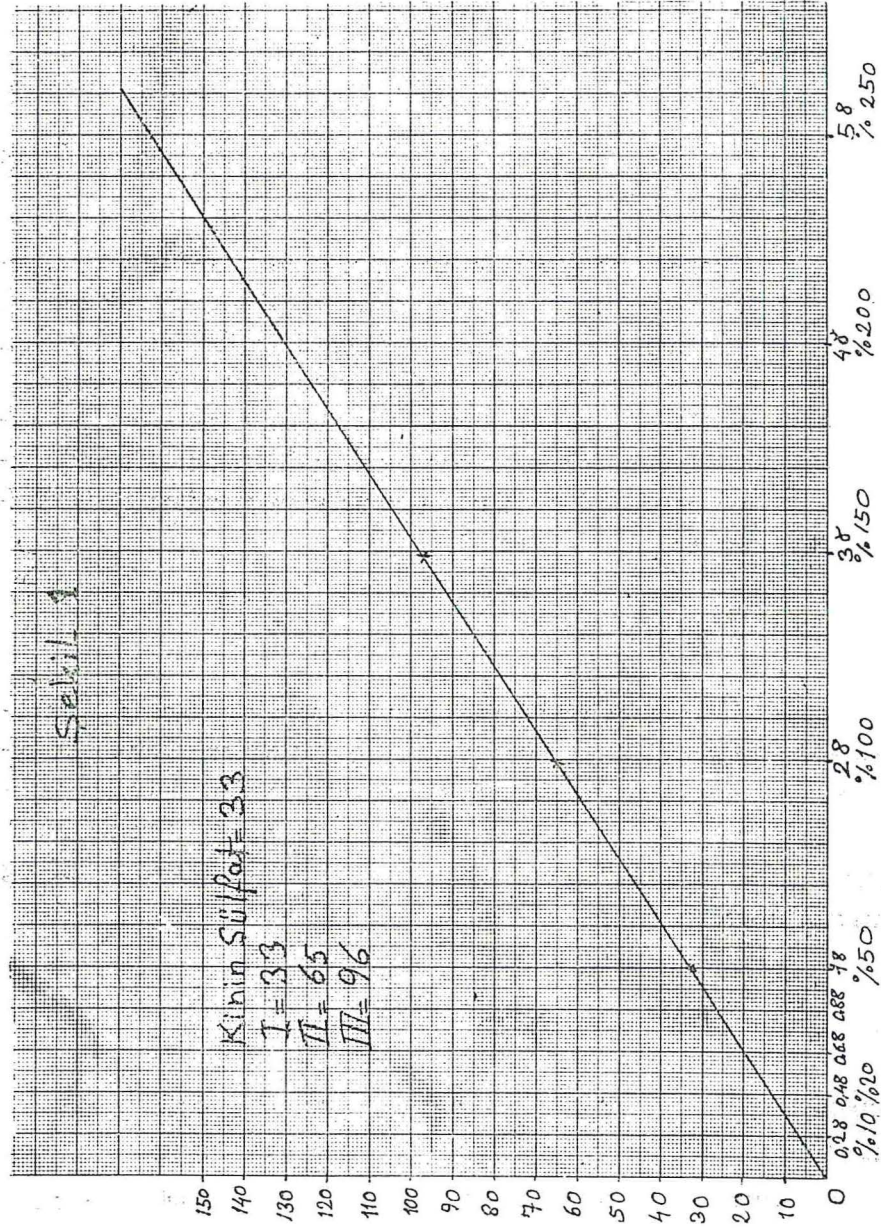
ile 1,5 dakika şiddetle çalkalandı. İki tabakanın ayrılması beklendi.

- 6 — Alttaki tabaka atıldı, üstteki tabaka sodyum sülfattan süzüldü.
- 7 — Aynı işlemler, 5 ml. distile su ile aynı zamanda yapılarak blank hazırlandı.
- 8 — Fluorometre distile su ve kinin sülfat standardı ile ayarlandıktan sonra, (Kuvvetlendirici 200 de) blank'e karşı numunenin verdiği floresans 365 dalga boyunda okundu. (Yüksek konsantrasyondaki tiamin değerleri, fluorometrenin kuvvetlendiricisi düşürülmek suretiyle okundu. Değerlendirmeler daha önce tiamin hidroklorid standardının çeşitli dilüsyonlarıyla hazırlanan standart eğrisi üzerinden yapıldı (Şekil 1).

Kalibrasyon :

50 ml.'lik dört ayırma hunisi alındı. Aşağıda gösterildiği şekilde ayraçlar konuldu ve karıştırıldı. Diğer işlemler, numunede olduğu gibi uygulandı ve fluorometrede elde edilen değerler milimetrik kâğıt kullanılarak kalibrasyon hattı çizildi. Ayırma hunilerinden her birisi sıra ile idrarda % 0, % 50, % 100 ve % 150 µg tiamin konsantrasyonuna tekabül etti.

Ayraçlar	1	2	3	4
Distile su	5 ml	4 ml.	3 ml.	2 ml.
Tiamin st	0	1 ml.	2 ml.	3 ml.
Oksidan ayraç	3 ml.	3 ml.	3 ml.	3 ml.
Isobutil alkol	13 ml.	13 ml.	13 ml.	13 ml.



BULGULAR

Denemelerimizden elde ettiğimiz bulgular, 1, 2, 3 ve 4 numaralı tablolarda gösterilmiştir.

Tablo : 1 (sonuçlar % μ g)

NORMAL BESLEME SONUCU BULUNAN DEĞERLER

Kısraklar	1. Kısrak	2. Kısrak	3. Kısrak
	92 μ g	150 μ g	130 μ g
	95 »	145 »	132 »
	80 »	130 »	115 »
	90 »	155 »	120 »
	80 »	132 »	124 »
	78 »	155 »	—
	62 »	70 »	—
	62 »	147 »	—
	152 »	163 »	150 »
	196 »	202 »	175 »
	163 »	195 »	182 »
	170 »	140 »	209 »
	144 »	126 »	155 »
	131 »	117 »	147 »
	95 »	89 »	100 »
	123 »	110 »	126 »
	115 »	109 »	117 »
Ortalama Değerler	113,40 \pm 9,73	137,35 \pm 5,47	141,57 \pm 8,07

Tablo : 2
60 mg TIAMİN ENJEKTE EDİLDİKTEN SONRA
BULUNAN DEĞERLER % mg OLARAK

Kısraklar	2 saat sonra	10 saat sonra	24 saat sonra
1. Kısrak	1,3	0,28	0,14
	0,96	0,19	0,09
	1,2	0,25	0,15
	1,05	0,22	0,09
	1,4	0,25	0,13
	1,8	0,29	0,01
	1,9	0,31	0,12
	1,75	0,22	0,13
	1,8	0,27	0,15
Ortalama Değ.	1,46 ± 0,11	0,25 ± 0,011	0,112 ± 0,0141
2. Kısrak	2,4	0,31	0,17
	2,05	0,25	0,11
	2,07	0,19	0,092
	2,38	0,22	0,15
	2,42	0,29	0,095
	2,25	0,3	0,012
	2,3	0,32	0,082
	2,4	0,29	0,019
	2,09	0,19	0,07
Ortalama Değ.	2,26 ± 0,048	0,26 ± 0,017	0,08 ± 0,050
3. Kısrak	2,12	0,26	0,15
	2,44	0,33	0,11
	2,3	0,28	0,13
	2,1	0,25	0,14
	2,24	0,34	0,13
	2,5	0,3	0,15
Ortalama Değ.			

Tablo : 3
200 mg. TIAMİN ENJEKTE EDİLDİKTEN SONRA
BULUNAN DEĞERLER % mg. OLARAK

Kısraklar	2 saat sonra	10 saat sonra	24 saat sonra
1. Kısrak	10	0,63	0,25
	8,7	0,70	0,17
	8,5	0,58	0,13
	9,2	0,72	0,18
	9,6	0,65	0,11
Ortalama Değ.	9,2 ± 0,27	0,656 ± 0,025	0,158 ± 0,079
2. Kısrak	9,6	0,60	0,19
	6,5	0,45	0,095
	8,3	0,47	0,187
	9,5	0,65	0,164
	7,2	0,52	0,13
Ortalama Değ.	8,22 ± 0,61	0,538 ± 0,03	0,153 ± 0,013

Tablo : 4
500 mg. TIAMİN ENJEKTE EDİLDİKTEN SONRA
BULUNAN DEĞERLER % mg. OLARAK

Kısraklar	2 saat sonra	10 saat sonra	24 saat sonra
1. Kısrak	28	1,7	0,3
	32	2,1	0,22
	25	1,13	0,2
	22	1,19	0,25
	20	2	0,19
Ortalama Değ.	25,4 ± 2,14	1,624 ± 1,81	0,232 ± 0,018
2. Kısrak	23	1,5	0,22
	27	1,3	0,35
	20	1,8	0,15
	30	2	0,11
	18	1,6	0,18
Ortalama Değ.	23,6 ± 2,20	1,64 ± 0,12	0,222 ± 0,10

Ölçümler sonunda elde edilen sayısal verilerin ortalamaları aritmetik ortalama olarak bulunmuş, standart hataları istatistik formüllerle ortaya konmuştur (6).

Değerlendirmelerde Varyans analizi tekniği uygulanmıştır. Zaman doz ve atlar bir arada değerlendirilmiştir. (Atın biri öldüğünden değerlendirilmeler iki at üzerinden yapılmıştır.)

Tablo : 5

VARYANS ANALİZ TABLOSU

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Zaman	2833,843338	2	1416,921669	F	P
Doz	1179,327532	2	589,663766	640,907	.000
At	0,644716	1	0,644716	263,719	.000
Doz x Zaman	1957,922517	4	489,480629	.292	.590
Hata	212,237616	96	2,210809	221,403	.000

Sonuçta, saatler arası, dozlar arası farklılıklar önemli bulunmuştur.

Ayrıca, zaman doz interaksyonu da önemli bulunmuştur. Bunun anlamı, 2, 10 ve 24 saat sonra alınan örneklerdeki tiamin değerleri arasındaki fark, kullanılan doza bağlı olarak değişmektedir.

Tablo : 6
ORTALAMA DEĞERLER (% mg. olarak)

60 mg. eng.	1. Kısak	2. Kısak	200 mg. eng.	1. Kısak	2. Kısak	500 mg. eng.	1. Kısak	2. Kısak
2 saat sonra	1,46 ± 0,11	2,26 ± 0,048		9,2 ± 0,27	8,22 ± 0,61		25,4 ± 2,14	23,6 ± 2,20
10 saat sonra	0,25 ± 0,011	0,26 ± 0,017		0,656 ± 0,025	0,538 ± 0,03		1,624 ± 1,81	1,64 ± 0,12
24 saat sonra	0,112 ± 0,014	0,08 ± 0,05		0,158 ± 0,079	0,153 ± 0,013		0,232 ± 0,018	0,202 ± 0,10

T A R T I Ş M A

Deneme kısıraklarında yapmış olduğumuz bu çalışmada, enjekte edilen tiamin miktarına bağlı olarak idrardan elde edilen değerlerde değişme olduğunu gözledik. Özellikle enjeksiyondan iki saat sonra alınan idrarda en yüksek seviyede tiamin bulduk.

Addi Smith (1), atlarda idrarda 100 ml.'de 50 mg. ve daha çok miktarlarda tiamin bulunmasının, atın idrara çıkışından önce en az 500 mg. tiaminin enjekte edilmiş olması gerektiğini söylemiştir.

Biz 500 mg. tiamin enjekte ettikten iki saat sonra, sonda ile almış olduğumuz idrarlarda ortalama, % 25,4 \mp 2,14 mg ve % 23,6 \mp 2,2 mg. tiamin bulduk.

Bir başka araştırmacı (7), tiaminin, intravenöz veya intramuskuler verilmesinden sonra, ilk idrarla % 33'ünün, 2. idrarla % 3'ünün atıldığını, 3. idrarda ise normale döndüğünü söylemiştir.

Bizim iki saat sonra alınan idrarlarda bulduğumuz değerler, verilen miktarın % 33'ünü geçmektedir.

Ö Z E T

Extra tiamin enjeksiyonu sonucu, idrardaki tiamin düzeylerini incelemek amacıyla bu araştırmayı yaptık.

Çalışmalarımızda fluorometrik tiokrom metodunu uyguladık.

İki deneme atından, belli saatlerde aldığımız idrarlarla çalıştık.

Toplam 180 adet idrar örneği analiz ettik.

Sonuçta, saatlar arası ve dozlar arasında önemli farklılıklar bulduk.

Thiamin enjeksiyonundan sonra ilk iki saat içinde, bu vitaminin önemli bir kısmının idrarla atıldığı kanısına vardık.

S U M M A R Y

We studied on the determination of thiamine levels in the urine as a result of extra thiamine injection to the horses.

In these studies we have used fluorometric thiochrome technique.

We have taken urines from two horses at limited hours.

We analyzed 180 samples of urines totally as a result of this study we have found that there were great differences among thiamine doses and hours.

According to our opinion, after thiamine injection, the majority of the thiamine was excreted during the first two hours.

T E Ő E K K Ő R

Çalışmalarımızın değerlendirilmeside bizden yardımlarını esirgemeyen Ziraat Fakóltesi Yardımcı Doçentlerinden Sayın Numan Akman'a teşekkürü borç biliriz.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — ADDIS SMITH, L.F. (1961) : The Changing pattern of doping in Horse Racing and its Control. Reprinted from the New Zeland Veterinary Journal No: 9, pp:121-128.
- 2 — ARAS, K. (1964) : «Klinik Biyokimya» (Methot, Teşhis ve Klinik Anlam) III, A.Ü. Tıp Fakültesi Yayınlarından Sayı: 126 Ye Desen Matbaası 940-942, 1072-1079 Ankara XII , 1228.
- 3 — BAYŞU, N. (1979) : «Temel Biyokimya» Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınlarından. Sayı: 18, 295-327. A.Ü. Basımevi 527.
- 4 — ERSOY, E., BAYŞU., ERTÜRK, K., ÜSTDAL, M. (1979) : «Biyokimya» A.Ü. Vet. Fak. Yayınlarından Sayı: 458, 277-320. A.Ü. Basımvi XX + 613.
- 5 — GRADWOHL, M.D. (1948) : «Clinical Laboratory Methods and Diagnosis» Fourth Edition Vol: 1 The C.V. Mosby Company pag. 1243-1254 XIV + 1295.
- 6 — KUTSAL, A., MULUK, Z. (1972) : «Uygulamalı Temel İstatistik» Hacettepe Üniversitesi Yayınları, AZ, 118-122. Ankara VIII + 160.
- 7 — MACKAY, A. (1961) : Some Effects of Drug in the «Doping» of Race Horses. The New Zeland Veterinary Journal Vol, 9 Page 134 V 75 F 40/26-7.
- 8 — MITCHELL, Philip H. (1948) : «A Text book of General Physiology» Mc Graw Hill Book Company, Inc. New-York, Toronto London Page: 807-846, IX + 927.
- 9 — ÖNAL, A., KALAYCI, S., KERMAN, M. (1985) : «Koşu Atlarının İdrarlarında B₁ vitaminin Fluorometrik Metodla Nicel Analizi» Etlik Vet. Mikrob. Enst. Dergisi Cilt: 5. Sayı: 8-9.
- 10 — STARY, Z. (1952) : «Biyokimya Dersleri II Sayfa 165-168 İstanbul Maat. 33.
- 11 — STROBECKER, R., HENNING, H.M. (1965) : «Vitamin Assay Tested Methods» pp. 65-77. Verlag Chemie G.M.B.H. WEINHEIM/BERGSTR. 360.