

Holstein Irkı Gebe İneklerin Plazma ve Ovaryum Vitamin C, Progesteron ve 17β-Östradiol Düzeyleri Arasındaki İlişkiler

Seyfullah HALILOĞLU, Behiç SERPEK, Nuri BAŞPINAR

S.Ü., Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 42031, Konya - TÜRKİYE

Hüseyin ERDEM

S.Ü., Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 42031, Konya - TÜRKİYE

Zafer BULUT

S.Ü., Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 42031, Konya - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 04.03.2001

Özet: Çalışma, kesim için mezbahaya getirilen ve kesim sonrası gebe oldukları belirlenen Holstein ırkı ineklerin plazma, korpus luteum ve follikül sıvısı vitamin C, progesteron ve 17β-östradiol düzeylerinin belirlenmesi ve bu düzeylerle korpus luteum ağırlığı, çapı ve follikül çapı arasındaki ilişkilerin incelenmesi amacıyla yapıldı.

Progesteron ve 17β-östradiol düzeyleri mikrotitrasyon EIA yöntemiyle, vitamin C düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Follikül sıvısı 17β-östradiol düzeyleri ile follikül çapı arasında pozitif ilişki belirlenmesine karşın, 17β-östradiol düzeylerinin aksine, küçük folliküllerin büyüklere oranla daha fazla progesteron içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Bu negatif ilişki progesteronun 17β-östradiol'ün ön maddesi olmasının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

Plazma progesteron düzeyleri ile korpus luteum ağırlığı ve çapı arasında herhangi bir ilişki bulunamamış ancak korpus luteum progesteron düzeyleri ile korpus luteum ağırlığı ve çapı arasında pozitif ilişki gözlenmiştir. Bu durumun gebelikteki plasenta kaynaklı progesteron sentezi sonucu oluştuğu düşünülmüştür. Ayrıca korpus luteum vitamin C düzeyleri oldukça yüksek bulunmuş ve bu yüksekliğin vitamin C'nin steroid ve kollajen biyosentezi üzerine etkisinden kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Ancak korpus luteum vitamin C düzeyleriyle korpus luteum ağırlığı ve çapı arasında negatif ilişkiler gözlenmiş ve vitamin C'nin PGF_{2α} sentezini inhibe edici etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Gebelik, vitamin C, steroid hormonlar, ovaryum, inek

The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol 17β and Progesterone in Plasma and Ovaries in Pregnant Holstein Cows

Abstract: This study was performed to determine the relationship between the corpus luteum weight/diameter, follicular diameter and the levels of vitamin C, progesterone and oestradiol 17-β of the plasma, corpus luteum and follicular fluid of pregnant Holstein cows in a slaughterhouse.

Progesterone and oestradiol 17-β concentrations were determined by the microtitration plate EIA method. Vitamin C levels were determined by spectrophotometer.

Although there was a positive correlation between follicular fluid oestradiol 17-β levels and the follicle diameter in the follicular fluid, in contrast to oestradiol 17-β levels, small follicles have higher progesterone content than large follicles. This negative correlation was due to the fact that progesterone is the precursor of oestradiol 17-β.

There was no correlation between corpus luteum progesterone levels and corpus luteum weight/diameter. However, a positive correlation between corpus luteum progesterone levels and the corpus luteum weight/diameter was observed; therefore, we suggest that this situation resulted from placenta-originated progesterone synthesis in pregnancy. Furthermore, levels of corpus luteum vitamin C were found to be higher and we concluded that this increase resulted from the effect of vitamin C on steroid and collagen biosynthesis. Nevertheless, negative correlations between corpus luteum vitamin C concentrations and corpus luteum weight/diameter were seen, and hence we suggest that this may be the result of the inhibitory effect of vitamin C on PGF_{2α} synthesis.

Key Words: Pregnancy, vitamin C, steroid hormones, ovary, cow

Giriş

Askorbik asit organizmada önemli rolü olan multifonksiyonel bir antioksidandır. Hayvanlarda folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde, korpus luteumun luteal hücrelerinde ve oositlerin sitoplazmalarında yoğunlaşan askorbik asitin (1) korpus luteum düzeylerinin plazma düzeylerinden en az 100 kat daha fazla oranda bulunduğu bildirilmektedir (2). Askorbik asitin plazma ya da doku düzeyleri, biyosentezin kapasitesi yanı sıra tüketimin hızına da bağlıdır (3,4). Bazı memeli türlerinde olduğu gibi ruminantlarda da vitamin C glikozdan sentezlendiğinden, kan glikoz düzeyindeki düşmelerde (Ketozis, hipoglisemi) ve biyosentezin yeterli olmadığı ya da kullanımının arttığı (stres ve hastalıklar) durumlarda askorbik asit yetmezlikleri ortaya çıkabilmektedir (5).

Aktif korpus luteum dokusundaki vitamin C düzeylerinin çok yüksek olması birçok araştırmacıyı luteal fonksiyonlarda vitamin C'nin rolünün araştırılmasına yönlendirmiştir. Kollajen sentezinde kofaktör olarak görev yaptığı bilinen askorbik asitin (6-8), progesteron gibi steroidler yanısıra bazı peptid hormonların üretiminde de görev yaptığı (6) ve luteal fonksiyonların artırılmasında doğrudan etkili olduğu bildirilmektedir (9-12). Ayrıca, vitamin C, hücre solunum ve steroid biyosentezi sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerinin nötralizasyonunda vitamin E ile birlikte hareket eden bir antioksidandır (13). Vitamin C'nin bu fonksiyonlarının engellenmesi, reaktif oksijen radikallerinin artışıyla luteal doku büyümesinin gerilemesine bağlı olarak, progesteron üretiminin azalmasına yol açmaktadır (14).

Plazma progesteron ve luteal doku progesteron düzeyleri, korpus luteum ağırlığı ve çapı ile sıkı bir ilişki içerisindedir (15-17). Korpus luteum dokusu progesteron içeriği büyük ölçüde dokunun ağırlığı ve büyüklüğüne bağlı olmasına karşın, özellikle plazma progesteron düzeylerinin regülasyonunda korpus luteumda progesteron üretimini gerçekleştiren hücrelerin üretim kapasiteleri önem kazanmaktadır (15). Korpus luteum gravidatis'in lutein hücrelerindeki progesteron üretiminin korpus luteum periodikumdan fazla olması sonucu (18) gebe hayvanlardaki plazma progesteron düzeylerinin gebe olmayanlardan daha yüksek olduğu bildirilmesine karşın (19,20) düzeylerin yaşla ilişkili olmadığı ve gebe ineklerle düvelerin plazma progesteron düzeyleri arasında bir farklılığın bulunmadığı gözlenmiştir (8). Keza folliküllerde de follikülün çapı ile plazma 17β-östradiol düzeyleri

yanısıra progesteron düzeyleri arasında da sıkı bir ilişki olduğu bildirilmektedir (21,22).

Bu çalışmada, Holstein ırkı gebe ineklerde plazma, korpus luteum, follikül sıvısında progesteron, 17β-östradiol ve askorbik asit düzeylerinin araştırılması amaçlanmış ve bu düzeylerle korpus luteum çapı ve ağırlığı ile follikül çapı arasındaki ilişkiler incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali ve Örneklerin Toplanması: Yaz aylarında (Haziran – Temmuz) gerçekleştirilen çalışmada, Konya'da özel bir mezbahaya kesim amacıyla getirilen sağlıklı Holstein ırkı ineklerden kesim sırasında kan örneği alınarak plazmaları ayrıldı. Kesim sonrası fötusun büyüklüğüne göre 5-6 aylık gebe olduğu belirlenen (23) 24 ineğin ovaryumları toplandı ve örnekler analizlerde kullanılmak üzere buz içerisine yerleştirilerek süratle laboratuvara ulaştırıldılar.

Toplanan ovaryumların ultrasonografik muayeneleri B-model, linear-array, 5-7.5 MHz'lik rektal probu bulunan real-time ultrason (Scanner 480 Vet, Pie Data Medical, Maastrich, Netherlands) ile Pierson ve Ginther (24)'in bildirdikleri şekilde, serum fizyolojik doldurulmuş şeffaf plastik bir kap yardımıyla su banyosunda yapılarak korpus luteumun ve en büyük follikülün çapları belirlendi.

Ovaryum dokusundan ayrıldıktan sonra ağırlıkları saptanan korpus luteumlar, ışıktan etkilenmemeleri amacıyla, alüminyum folyeden hazırlanmış küçük poşetler içerisine yerleştirildi ve analize kadar -20°C'de saklandılar. Ovaryum folliküllerinin yırtılmasını önlemek ve sıvı kaybını en aza indirmek amacıyla follikül sıvılarının toplanmasında, ince ve kısa uçlu insülin iğnelerinden faydalanıldı ve alınan follikül sıvıları vitamin C ve hormon analizlerinde kullanılmak üzere ikiye ayrıldılar ve vitamin C analizi hemen yapılırken, diğer kısım progesteron ve 17β-östradiol analizleri yapmak üzere analize kadar -20°C'de saklandılar.

Dokuların Homojenizasyonu ve Ekstraksiyonu: Çapları ve ağırlıkları belirlenen korpus luteumlar Braun marka soğutuculu homojenizatörde 1500 devirde 10 dakika homojenize edildiler (25). Bu amaçla, 1 g korpus luteum dokusu üzerine 5 ml progesteron – 17β-östradiol analiz tamponu [$7.12 \text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck-6580) 8.5 g/L NaCl (Merck- 6404), 1 N HCl ile pH 7.2'ye ayarlanır, üzerine 1 g/L sığır serum albumini, BSA (Serva-

11930) ilave edilir] ilave edildi. Oluşan 1 ml homojenizat üzerine, progesteron ekstraksiyonu (26) için 5 ml hekzan, 17 β -östradiol ekstraksiyonu (27) için 5 ml tersiyer butyl methyleter-petrol eter karışımı (TBME-PE, 30 / 70, w / w) eklendi. Karışımlar 2 dakika vorteks mikserde yüksek devirde karıştırıldıktan sonra 20 dakika süreyle çalkalandı ve 2 saat -20°C'de tutularak karışım içindeki proteinlerin donmasıyla hekzan ve TBME-PE fazlarının ayrılması sağlandı. Daha sonra tüplere aktarılan hekzan ve TBME-PE süpernatantlarının çözücü fazları 50°C'deki su banyosunda uçuruldu. Ekstraksiyon tüplerine 1'er ml analiz tamponu ilavesinden sonra metabolik çalkalayıcıda 30 dakika süreyle çalkalanarak progesteron ya da 17 β -östradiol'ün çözeltiye geçmesi sağlandı.

Plazma 17 β -östradiol ekstraksiyonları da korpus luteum dokusu için yapılan ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilirken, plazma progesteron düzeyleri direkt olarak belirlendi.

Plazma, Follikül Sıvısı ve Korpus Luteum Vitamin C Analizi: Plazma, follikül sıvısı ve korpus luteum vitamin C analizleri Haag (28)'in bildirdiği şekilde spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Follikül sıvısı ve korpus luteumdaki vitamin C düzeyleri plazma düzeylerinden çok yüksek olduğundan follikül sıvılarında 10, korpus luteum sıvılarında 50 kat sulandırılmalar yapıldı.

Progesteron ve 17 β -Östradiol Analizi: Progesteron analizleri Prakash ve ark (29)'nın, 17 β -östradiol analizleri ise Meyer ve ark (27)'nin mikrotitrasyon EIA yöntemlerinin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi (30). Progesteron analizlerinde plazma ve korpus luteum örnekleri 1:20, follikül sıvıları 1:100 oranında, 17 β -östradiol analizlerinde plazma ve korpus luteum örneklerinin ekstraktları direkt olarak, follikül sıvıları 1:100 oranında sulandırılarak kullanıldılar.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS paket programında (SPSS, 9.0, SPSS.Inc.) gerçekleştirildi.

Bulgular

Holstein ırkı gebe ineklerde incelenen parametrelerin ortalama değerleri ($x \pm Sx$) Tablo 1'de, parametreler arasındaki ilişkiler ise Tablo 2'de sunulmuştur.

Araştırmada, plazma vitamin C düzeylerinin plazma progesteron ve 17 β -östradiol düzeyleriyle negatif ilişkiye

Tablo 1. Holstein ırkı gebe ineklerde incelenen parametrelerin ortalama düzeyleri ($x \pm Sx$)

Parametre	$x \pm Sx$	Parametre	$x \pm Sx$
Plazma Progesteron, ng/ml	6.47 \pm 0.57	Follikül Progesteron, ng/ml	53.50 \pm 13.19
Plazma 17 β -Östradiol, pg/ml	11.05 \pm 1.55	Follikül 17 β -Östradiol, pg/ml	6480 \pm 99
Plazma Vitamin C, μ g/ml	5.03 \pm 0.28	Follikül Vitamin C, μ g/ml	21.34 \pm 1.47
K. Luteum Progesteron, ng/g	213.53 \pm 26.43	K. Luteum Ağırlığı, g	5.47 \pm 0.37
K. Luteum 17 β -Östradiol, pg/g	169.66 \pm 26.18	K. Luteum Çapı, cm	2.33 \pm 0.08
K. Luteum Vitamin C, μ g/g	1190 \pm 70	Follikül Çapı, cm	0.93 \pm 0.04

Tablo 2. Holstein ırkı gebe ineklerde incelenen parametreler arasındaki ilişkiler (n = 24)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Pl Prog	1.000											
2. Pl Östrad	-0.021	1.000										
3. Pl Vit C	-0.415*	-0.440*	1.000									
4. Kl Çap	0.235	0.015	-0.293	1.000								
5. Kl Ağırlığı	0.322	-0.106	-0.100	0.829**	1.000							
6. Kl Prog	0.325	0.158	0.323	0.409*	0.431*	1.000						
7. Kl Östrad	0.241	0.202	-0.373	-0.406*	-0.447*	-0.132	1.000					
8. Kl Vit C	-0.110	0.220	-0.253	-0.466*	-0.541**	-0.247	0.365	1.000				
9. Foll Çapı	-0.013	0.273	-0.157	0.138	0.302	0.267	-0.121	-0.246	1.000			
10. Foll Prog.	-0.144	0.163	0.297	0.017	-0.058	0.040	-0.035	0.168	-0.510*	1.000		
11. Foll. Östrad	0.110	-0.125	0.523*	-0.230	0.163	0.588**	-0.301	-0.277	0.488*	-0.261	1.000	
12. Foll. Vit. C	-0.318	-0.076	0.213	-0.236	-0.282	-0.239	-0.004	0.162	-0.374	0.150	-0.283	1.000

Not : * = p \leq 0.05; ** = p \leq 0.01; *** = p \leq 0.001

sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, korpus luteum ağırlığı ve çapı ile korpus luteum progesteron düzeyleri arasında pozitif ilişki gözlenirken, korpus luteum 17β-östradiol ve vitamin C düzeyleri arasında negatif ilişki bulunmuştur. Follikül çapı ile follikül sıvısı 17β-östradiol düzeyleri arasında pozitif ($p \leq 0.05$) progesteron düzeyleri arasında ise negatif ($p \leq 0.05$) ilişki belirlenmiştir.

Tartışma

İneklerin cinsel döngülerinde luteal doku büyüklüğü ile plazma progesteron düzeyleri arasında büyük bir benzerlik bulunduğu yapılan birçok araştırma ile kanıtlanmıştır (15,16, 22, 31). Ancak, gebelikte progesteron sentezine plasentanın da katıldığı hatta ineklerde gebeliğin 150-250. günleri arasında progesteron üretiminin büyük oranda plasentada yapıldığı bildirilmektedir (32). Bu bilgiler ışığında, plasental kökenli progesteron sentezinin, cinsel döngüler sırasında gözlenen plazma progesteron düzeyleriyle korpus luteum arasındaki pozitif ilişkinin kaybolmasına yol açabileceği düşünülebilir. Yürütülen çalışmada da, korpus luteum ağırlığı ve çapı ile plazma progesteron düzeyleri arasında bir ilişki bulunamamış olmasına karşın, korpus luteum ağırlığı ve çapı ile korpus luteum progesteron düzeyleri arasında pozitif ilişkinin ($p \leq 0.05$) saptanması Thomas (32)'nin bulgularına uyumlu olarak plasenta progesteron biyosentezinin başladığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Korpus luteum progesteron düzeyleriyle follikül sıvısı 17β-östradiol düzeyleri arasında gözlenen pozitif ilişki ($p \leq 0.01$), korpus luteum oluşumu ile follikül oluşumunun ve hormon sentezine başlamalarının eş zamanlı olarak seyrettiğini göstermektedir. Keza Ruckebusch ve ark (33)'nin bulgularına uyumlu olarak korpus luteum oluşumunun başlangıcında var olan 17β-östradiol biyosentezinin gerilemeye başladığı ve korpus luteum ağırlığı ve çapı ile korpus luteum 17β-östradiol düzeyleri arasında negatif ilişkilerin ($p \leq 0.05$) geliştiği saptanmıştır.

Follikül sıvısı 17β-östradiol düzeyleri ile follikül çapı arasında pozitif ilişkilerin bulunduğu (21, 22, 34, 35) bildirilmesine karşın, follikül sıvısı progesteron düzeyleriyle follikül çapı arasındaki ilişkiler konusunda kesin bir yargıya varılamamıştır. Bir kısım araştırmacılar (21, 22, 34) progesteron düzeyleriyle follikül çapı arasında negatif ilişkinin varlığından söz ederken, bir kısmı (35, 36) böyle bir ilişkinin belirlenemediğini bildirmektedirler. Bu çalışmada literatür verilere (21, 22,

34, 35) uygun olarak, follikül sıvısı 17β-östradiol düzeyleri ile follikül çapı arasında pozitif ilişki ($p \leq 0.05$) belirlenmesinin yanı sıra, follikül sıvısı progesteron düzeyleriyle follikül çapı arasında negatif ilişki ($p \leq 0.05$) gözlenmiş ve bu olgunun follikülde 17β-östradiol ön maddesi olarak kullanıldığı bildirilen progesteronun (37) follikülün büyümesiyle artan ölçülerde 17β-östradiol biyosentezinde tüketildiğinden kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

İneklerde luteal dönemde en yüksek düzeylerine ulaşan korpus luteum vitamin C düzeylerinin, gebelikte daha da arttığı (38), doku büyümesiyle askorbik asit konsantrasyonları arasında da çok sıkı bir ilişkinin bulunduğu gözlenmiştir (7, 8, 39). Luck ve Zhao (40) korpus luteum vitamin C düzeyleri ile korpus luteum ağırlığı ve çapı arasında pozitif ilişki ($p \leq 0.001$) gözlenmesinin vitamin C'nin kollajen biyosentezi sırasında tüketilmesinin bir göstergesi olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada plazma düzeylerinden yaklaşık 200 kat daha yüksek bulunan korpus luteum vitamin C düzeylerinin aynı tür hayvanlar için Serpek ve ark (41) 'nın diöstrusta bildirdiği $860 \pm 100 \mu\text{g/g}$ 'lık düzeylerden yüksek ($1190 \pm 70 \mu\text{g/g}$) olduğu gözlenmiştir.

Rosenkrans ve ark (42) domuzlarda endometriyumdan $\text{PGF}_{2\alpha}$ sentezinin vitamin C tarafından inhibe edildiğini ve gebeliğin oluşumu süresince endometriyal $\text{PGF}_{2\alpha}$ sentezinin kontrol eden en önemli bileşiklerden birinin vitamin C olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada da, cinsel döngüler sırasında korpus luteum vitamin C düzeyleriyle korpus luteum çap ve ağırlığı arasında bulunan ileri derecede önemli pozitif ilişkilerin bu çalışmanın yürütüldüğü gebelik döneminde, cinsel döngü dönemlerinin tersine negatif olarak bulunması (sırasıyla $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$), gebelik döneminde vitamin C'nin artan miktarlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ biyosentezinin inhibe edilmesinde kullanılarak tüketildiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak cinsel döngüler sırasında korpus luteum vitamin C düzeyleriyle korpus luteum çapı ve ağırlığı arasında görülen ileri dereceli pozitif ilişkilerin, bu çalışmanın yürütüldüğü gebelik dönemlerinde negatif olarak bulunması, gebelikteki korpus luteum aktivitesinin cinsel döngü dönemlerinden farklılığının bir göstergesini oluşturduğunu ve gebelik dönemlerinde vitamin C'nin, daha çok gebeliğin sürdürülmesini tehdit eden $\text{PGF}_{2\alpha}$ biyosentezinin inhibisyonunda kullanıldığını düşündürmektedir.

Kaynaklar

1. Zreik, T.G., Kodaman, P.H., Jones, E.E., Olive, D.L., Behrman, H.: Identification and Characterisation of an Ascorbic Acid Transporter in Human Granulosa-Lutein Cells. *J. Reprod. Fertil.*, 1998; 112, (2): 243-247.
2. Petroff, B.K., Dabrowski, K., Ciereszko, R.E., Ottobre, J.S.: Ascorbate and Dehydroascorbate Concentrations in Porcine Corpora Lutea, Follicles, and Ovarian Stroma Throughout the Estrous Cycle and Pregnancy. *Biol. Reprod.*, 1995; 52 (Suppl. 1): 84.
3. Wegger, I., Tagwerker, F.J., Moustgaard, J.: Ascorbic Acid in Domestic Animals. Workshop, Roy. Danish Agrig. Soc., Copenhagen, 1984.
4. Wenk, C., Fenster, R., Völker, L.: Ascorbic Acid in Domestic Animals. *Proceed 2nd Symp.*, 527, Ittingen, 1992.
5. Kolb, E.: Die Bedeutung der Vitamine für die Fortpflanzung. Roche, Leipzig, 1997.
6. Luck, M.R., Jeyaseelan, E., Scholes, R.A.: Ascorbic Acid and Fertility. *Biol. Reprod.*, 1995; 52: 262-266.
7. Meur, S.K., Sanwal, P.C., Yadav, M.C.: Ascorbic Acid in Buffalo Ovary in Relation to Oestrous Cycle. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1999; 36(2): 134-135
8. Miszkiel, G., Skarzynski, D., Bogacki, M., Kotwica, J.: Concentrations of Catecholamines, Ascorbic Acid, Progesterone and Oxytocin in The Corpora Lutea of Cyclic and Pregnant Cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1999; 39(4): 509-516
9. Biswas, N.M., Deb, C.: In Vitro Studies on the Effect of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid on 3-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Toad Testis. *Endocrinology*, 1970; 87: 170-173.
10. Byrd, J.A., Pardue, S.L., Hargis, B.M.: Effect of Ascorbate on Luteinizing Hormone Stimulated Progesterone Biosynthesis in Chicken Granulosa Cells In Vitro. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993; 104A: 279-281.
11. Luck, M.R., Jungclas, B.: Catecholamines and Ascorbic Acid as Stimulators of Bovine Ovarian Oxytocin Secretion. *J. Endocrinol.*, 1987; 114: 3: 423-430.
12. Luck, M.R., Jungclas, B.: The Time-Course of Oxytocin Secretion from Cultured Bovine Granulosa Cells Stimulated by Ascorbate and Catecholamines. *J. Endocrinol.*, 1988; 116: 2: 247-258.
13. Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L.: Direct Observation of a Free Radical Interaction Between Vitamin E and Vitamin C. *Nature*, 1979; 278: 737-740.
14. Petroff, B.K., Ciereszko, R.E., Dabrowski, K., Ottobre, A.C., Pope, W.F., Ottobre J.S.: Depletion of Vitamin C from Pig Corpora Lutea by Prostaglandin F₂ Alpha-Induced Secretion of the Vitamin. *J. Reprod. Fertil.*, 1998; 112 (2): 243-247.
15. Aslan, S., Dobretsberger, M., Arbeiter, K.: Changes of the Bovine Corpus Luteum Size and its Progesterone Content in the Peripheral Blood in the time of Early Pregnancy, *Reprod. Dom. Anim.*, 1992; 27 (4): 195-196.
16. Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginter, O.J.: Relationship Between Ultrasonic Assessment of Corpus Luteum and Progesterone Concentration in Heifers. *Theriogenology*, 1990; 33 (6): 1269-1277.
17. Wiltbank, M.C., Shiao, T.F., Bergfelt, D.R., Ginter, O.J.: Prostaglandin F₂α Receptors in the Early Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.*, 1995; 52: 74-78.
18. Okuda, K.: Morphologische Und Endokrinologische Untersuchungen Am Corpus Luteum Periodikum Und Graviditatis Des Rindes. *Vet. Med. Diss.*, München, 1982.
19. Lamming, G.E., Darwash, A.O., Back, H.L.: Corpus Luteum Function in Dairy Cows and Embryo Mortality. *J. Reprod. Fert. (Suppl)*, 1989; 37: 245-252.
20. Lukaszewska, J., Hansel, W.: Corpus Luteum Maintenance During Early Pregnancy in The Cow. *J. Reprod. Fert.*, 1980; 59: 485-493.
21. Brandmeier, S.A., Bellin, M.E., Boehm, S.K., Bushmeyer, S.M., Grummer, R.R., Ax, R.L.: Influence of Stage of Cycle, Corpus Luteum Location, Follicle Size and Number of Large Follicles on Estradiol 17-β Concentrations in Bovine Follicles. *J. Dairy Sci.*, 1987; 70: 2138-2144.
22. Wise, T., Vernon, M.W., Maurer, R.R.: Oxytocin, Prostaglandins E And F, Estradiol, Progesterone, Sodium and Potassium in Preovulatory Bovine Follicles Either Developed Normally or Stimulated by Follicle Stimulating Hormone. *Theriogenology*, 1986; 26 (6): 757-778.
23. Youngquist, R.S.: Pregnancy Diagnosis. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* Ed. Robert S. Youngquist, WB Saunders Co., Philadelphia, 1997.
24. Pierson, R., Ginther, O.J.: Reliability of Diagnostic Ultrasonography for Identification and Measurement of Follicles and Detecting the Corpus Luteum. *Theriogenology*, 1987; 28: 929-936.
25. Kolb, E., Wahren, M., Dobelett, G., Gründel, G.: Untersuchungen über den Gehalt an Ascorbinsäure in Verschiedenen Geweben von Rindern, Normal Entwickelten Ferkeln, Gratschferkeln, Adulten Schweinen Sowie von Hunden. *Arch. Exper. Vet. Med.* 1989 ; 43 (3): 327-334.
26. Arnstadt K.I., Grunert, E., Prokopp, S., Schulte, B.: Weiterentwicklung und Anwendung des Enzym-Immuntests (EIA) für Progesteron. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 1982; 29: 387-394.
27. Meyer, H.H.D., Sauerwein, H., Mutayoba, B.M.: Immunoaffinity Chromatography and a Biotin-Streptavidin Amplified Enzyme Immunoassay for Sensitive and Specific Estimation of Estradiol-17β. *J. Steroid. Biochem.* 1990; 35 (2): 263-269.
28. Haag, W.: Zur Methodik Und Praktischen Bedeutung Der Vitamin C-Bestimmung Beim Rind in Vergangenheit und Gegenwart. *Inaugural Dissertation, Justus Liebig Universitaet, Giessen.* 1985.

29. Prakash, B., S., Meyer, H.H.D., Schallenberger, E., Van de Wiel D.F.M.: Development of a Sensitive Enzyme Immunoassay (EIA) for Progesterone Determination in Unextracted Bovine Plasma Using the Second Antibody Technique. *J. Steroid Biochem.* 1987; 28 (6): 623-627.
30. Halilođlu, S.: Vitamin C'nin Koyunlarda Reprodüksiyon Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bil. Enst., Konya, 1998.
31. Ribadu, A.Y., Ward, W.R., Dobson, H.: Comparative Evaluation of Ovarian Structures in Cattle by Palpation Per Rectum, Ultrasonography and Plasma Progesterone Concentration. *Vet. Rec.*, 1994; 135: 452-457.
32. Thomas, P.G.A.: Induced Abortion. In "Current Therapy in Large Animal Theriogenology" Ed. Robert S. Youngquist, WB Saunders Co., Philadelphia, 1997.
33. Ruckebusch, D.V.M., Phaneuf, L.P., Dunlop, R.: Ovarian Hormones. In "Physiology of Small and Large Animals", BC Decker, Philadelphia, 1991.
34. Eiler, H., Nalbandov, A.V.: Sex Steroids In Follicular Fluid and Blood Plasma During the Estrous Cycle of Pigs. *Endocrinology*, 1977; 100: 331-338.
35. Wise, T.: Biochemical Analysis of Bovine Follicular Fluid: Albumin, Total Protein, Lysosomal Enzymes, Ions, Steroids and Ascorbic Acid Content in Relation to Follicular Size, Rank, Atresis Classification and Day of Oestrous Cycle. *J. Anim. Sci.*, 1987; 64 (4): 1153-1169.
36. Mc Natty, K.P., Gibb, M., Dobson, C., Thurley, D.C., Findley, J.K.: Changes in the Concentration of Gonadotrophins and Steroidal Hormones in the Antral Fluid of Ovarian Follicles Throughout the Oestrous Cycle of Ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1981; 34: 67-80.
37. Bondy P.K.: Disorders of Adrenal Cortex. In: JD Wilson (Ed.), *Williams Textbook of Endocrinology*. pp. 816-891, WBS Comp, Philadelphia, 1985.
38. Kanekiyo, T.: Clinical Studies on Vitamin C in Ruminants. *Bull. Azabu. Vet. Coll. Japan*. 1968; 17: 71-112.
39. Endo, T., Aten, R.F., Wang, F., Behrman, H.R.: Co-ordinate Induction and Activation of Metalloproteinase and Ascorbate Depletion in Structural Luteolysis. *Endocrinology*, 1993; 133 (2): 690-698.
40. Luck, M.R., Zhao, Y.: Identification and Measurement of Collagen in the Bovine Corpus Luteum and its Relationship with Ascorbic Acid and Tissue Development. *J. Reprod. Fertil.*, 1993; 99: 647-652.
41. Serpek, B., Başpınar, N., Halilođlu, S., Erdem, H.: The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol 17- β and Progesterone in Cattle Plasma and Ovaries, and Changes that Occur Along the Sexual Cycle. *Rev. Med. Vet.*, 2001; 152 (3): 253-260.
42. Rosenkrans, C.F., Paria, B.C., Davis, D.L., Milliken, G.: In Vitro Synthesis of Prostaglandin E and F₂alpha by Pig Endometrium in the Presence of Estradiol, Catechol Estrogen and Ascorbic Acid. *J. Anim. Sci.*, 1990; 68 (2): 435-443.