

**70676**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**VİTAMİN C'NİN KOYUNLarda  
REPRODÜKSİYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Seyfullah Haliloğlu

**Danışman**

Prof.Dr. Behiç Serpek

**KONYA-1998**

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİ.....</b>	<b>3</b>
2.1. Koyunlarda Üreme Fizyolojisi.....	3
2.1.1 Koyunlarda seksüel siklus.....	3
2.1.2. Koyunlarda sekstiel siklusun hormonal mekanizması.....	4
2.1.3. Progesteron ve östradiol 17 $\beta$ .....	5
2.1.3.1. Biyosentezleri ve salgılanmaları.....	5
2.1.3.2. Sekstiel siklusta ve gebelikte progesteron ve östradiol 17 $\beta$ .....	10
2.2. Koyunlarda Dölverimini Etkileyen Faktörler.....	13
2.3. Vitamin C (Askorbik Asit).....	15
2.3.1. Yapısı ve biyosentezi.....	15
2.3.2. Metabolizması ve fonksiyonları.....	16
2.3.3. Vitamin C'nin döl verimi üzerine etkileri.....	19
2.4. Seruloplazmin.....	25
2.4.1. Yapısı ve biyosentezi.....	25
2.4.2. Metabolizması ve fonksiyonları.....	25
2.4.3. Seruloplazminin döl verimi üzerine etkileri.....	27
<b>3. MATERİYAL VE METOT.....</b>	<b>29</b>
3.1. Materyal.....	29
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Plazma vitamin C analizi.....	30
3.2.1.1. İlke.....	30
3.2.1.2. Ayıraçlar.....	31

<b>3.2.1.3. Teknik.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1.4. Hesabı.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2. Plazma seruloplazmin analizi.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2.1. İlke.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2.2. Ayıraçlar.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2.3. Teknik.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2.4. Hesabı.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3. Plazma progesteron hormonu analizi.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3.1. İlke.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3.2. Ayıraçlar.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3.3. Enzimimmunoassay prosedürü.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3.3.A. EIA plaklarının ilk kaplanması.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3.3.B. EIA plaklarının ikinci kaplanması.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3.3.C. EIA plaklarının assay öncesi yıklanması.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3.4. Assay protokolü.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3.5. Substrat reaksiyonu.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4. Plazma östradiol 17<math>\beta</math> hormonu analizi.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4.1 İlke.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4.2. Ayıraçlar.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4.3. Enzimimmunoassay prosedürü.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.3.A. EIA plaklarının ilk kaplanması.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.3.B. EIA plaklarının ikinci kaplanması.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.3.C. EIA plaklarının assay öncesi yıklanması.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.4. Assay protokolü.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4.5. Substrat reaksiyonu.....</b>	<b>38</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Progesteron hormonu EIA'nın bulguları.....</b>	<b>39</b>

4.1.1. Assayın doğruluğu.....	39
4.1.2. Assayın hassasiyeti.....	39
4.1.3. İnter ve intraassay varyasyon.....	40
4.2. Östradiol 17 $\beta$ hormonu EIA'nın bulguları.....	40
4.2.1. Assayın doğruluğu.....	40
4.2.2. Assayın hassasiyeti.....	40
4.2.3. İnter ve intraassay varyasyon.....	41
4.3. Araştırma Bulguları.....	41
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>54</b>
5.1. Progesteron ve Östradiol EIA Yöntemleri.....	54
5.2. Araştırmamanın Tartışması.....	57
<b>6. ÖZET.....</b>	<b>65</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>67</b>
<b>8. LİTERATÜR LİSTESİ .....</b>	<b>69</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>87</b>
<b>10. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>88</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı hayvan türlerinde karaciğerin askorbik asit sentez kapasiteleri .....	16
Tablo 4.1. Plazmaya farklı konsantrasyonlarda ilave edilen progesteron'un tekrar bulunma oranları .....	39
Tablo 4.2. Plazma örneklerine ilave edilen farklı konsantrasyonlarda östradiol $17\beta$ 'nın tekrar bulunma oranları .....	41
Tablo 4.3. Grupların seksüel siklus boyunca, tohumlamanın 16-17. günü ve folliküler dönemde gözlenen en yüksek plazma progesteron düzeyleri, $x \pm Sx$ . ....	42
Tablo 4.4. I. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri düşük ve parenteral vitamin C verilen koyunlar) tohumlamanın 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları.....	45
Tablo 4.5. II. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri düşük) tohumlamanın 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları .....	46
Tablo 4.6. III. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri yüksek ve parenteral vitamin C verilen koyunlar) tohumlamanın 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik	

muayeneleri ve doğum sonuçları .....	47
<b>Tablo 4.7. IV. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri yüksek) tohumlamadan 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları .....</b>	<b>48</b>
<b>Tablo 4.8. Deneme gruplarında vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17<math>\beta</math> .....</b>	<b>49</b>
<b>Tablo 4.9. Plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve Östradiol 17 <math>\beta</math> düzeylerinin gruplarda dönemlere göre değişimleri .....</b>	<b>49</b>
<b>Tablo 4.10. Denemeye alınan tüm koyunlarda döl verimi ile plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17<math>\beta</math> düzeyleri arasındaki ilişkiler .....</b>	<b>50</b>
<b>Tablo 4.11. Deneme gruplarında döl verimi ile plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17<math>\beta</math> düzeyleri arasındaki ilişkiler .....</b>	<b>51</b>
<b>Tablo 4.12. Denemeye alınan tüm koyunlarda plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17<math>\beta</math> düzeyleri arasındaki korrelasyonlar .....</b>	<b>52</b>
<b>Tablo 4.13 Deneme gruplarında plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17<math>\beta</math> düzeyleri arasındaki korrelasyonlar .....</b>	<b>52</b>
<b>Tablo 4.14 Koyunlarda plazma askorbik asit (AA) seruloplazmin (SP), progesteron (PG) ve östradiol 17<math>\beta</math> (ES) düzeylerinin 1., 2., 3. dönem ortalamaları ile ilk ve son canlı ağırlık (CA-1 ve CA-2), yaş ve kuzu doğum ağırlığı (KDA) arasındaki korrelasyonlar.....</b>	<b>53</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Steroid hormonların biyosentezlerinde önemli metabolik yollar ..... 6-7

Şekil 2.2. L-askorbik asit ve dehidro L askorbik asitin yapıları ..... 17



## **1.GİRİŞ**

Hayvan ıslahı ve yetiştircilikte kullanılan parametrelerden en önemlisini oluşturan döl verimi yaş, ırk, beslenme durumu, barınma olanakları, mevsim ve bazı paraziter ve enfeksiyöz hastalıklar gibi faktörlerce etkilenir (Eliçin 1985, Aytuğ ve ark 1990). Bu faktörlerin döl verimi tizerine etkilerinin incelenmesi ve kontrolü hayvanlarda döl verimi ve döl verimi fizyolojisinin iyi bir şekilde bilinmesiyle gerçekleştirilebilir. Gelişmiş ülkelerde hayvancılıkta yürütülen bilimsel çalışmaların büyük bir kısmının döl verimi ile ilgili olması da bu olguyu desteklemektedir.

Ülkemizde diğer hayvan türlerine göre çiftçinin sigortası olarak kabul edilen koyunculuk konusunda çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle ülkemiz koyunlarında döl verimi ve döl verimi fizyolojisiyle, bunları etkileyen faktörler konusundaki bilgiler çok azdır.

Mevsimsel östrus siklusunu gösteren koyunlar, günlerin kısalmasına başladığı ve ülkemiz meralarında kaliteli ve taze ot bulma olanaklarının azaldığı güz mevsimi başlangıcında siklus gösteren hayvanlardır. Bu dönemde bir yandan kaliteli ot bulunamaması, diğer yandan seksüel sikluslarla steroid hormon üretiminin başlaması ve stresin artmasına bağlı olarak hayvanların bazı vitaminlere olan gereksinimlerinin yükselmesine yol açar (Kolb 1997).

Özellikle steroid hormon sentezinde doğrudan kullanılan ve stres hallerinde tüketimi artan en önemli vitamin C vitaminidir. Genellikle insanlar ve deney hayvanları üzerinde sürdürülün çalışmalarda vitamin C'nin döl verimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla endokrin organ ve dokularla ve ovaryum follikül sıvısı steroid hormon ve vitamin C düzeyleri incelenmiştir (Lange 1973, Wise 1987, Kolb 1992, Kolb ve ark 1993). Bu çalışmalarda ilk olarak kadınların ovulasyon döneminde artan vitamin C'nin fertilitiyi önemli derecede yükseltmesi yanısıra gebelikle birlikte vitamin C'ye olan gereksinimin artışı ve bu artışın artan bağ doku üretimiyle fötusun ihtiyacından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Lange 1973). Daha sonra domuzlar üzerinde yürütülen çalışmalarda eksojen vitamin C uygulamalarının, bir yandan göbek kordonu kanamalarını önlerken, diğer yandan sütten kesilme dönemine kadar olan canlı ağırlık artışını maksimum düzeylere yükselttiğini ve bu

etkilerin günlük 1 g vitamin C enjeksiyonu ile gerçekleştirilebildiği bildirilmiştir (Sandholm ve ark 1979). Keza sezona bağlı olarak infertil domuzlara vitamin C uygulamasının çiftleşme yüzdeleriyle, döl verimi kriterlerini iyileştirmesine karşın, bu iyileşmenin istatistik açıdan anlamlı bulunamadığı saptanmıştır (Greer ve ark 1987). Aynı şekilde vücutlarında vitamin C sentezi olan fakat gıda ile alınan eksojen vitaminin rumenlerinde yıkımındığı sığırlarda da plazma vitamin C düzeylerinin seksüel siklus dönemlerine göre değişim göstermesi yanısıra (Başpinar ve Serpek 1993), gebelikte yükseldiği de ortaya çıkarılmıştır (Chattopadhyay ve ark 1972).

Bu çalışmada da ülkemiz koşullarında meraya bağımlı olarak yapılan koyunculukta seksüel siklusların oluşumunu başlatan steroid hormonların sentezine, siklusun oluşumu sırasında dölverimini olumsuz yönde etkileyen stresin önlenecek dölveriminin iyileştirilmesine vitamin C'nin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## **2. LİTERATÜR BİLGİ**

### **2.1. Koyunlarda Üreme Fizyolojisi**

#### **2.1.1 Koyunlarda seksüel siklus**

Yaklaşık 6-9 aylık yaşlarda pubertaya ulaşan koyunlar, mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. İrk ve coğrafi bölgeye göre değişen 4-7 aylık bir anöstrus gösterirler. Ülkemizde yaz sonu ve sonbahar başlangıcında günlerin kısalmasıyla birlikte aşım sezonuna giren koyunlar, Ağustos-Aralık ayları arasında seksüel aktiviteye sahiptirler ve en uygun tohumlama zamanı Ekim-Kasım ayları olarak belirlenmiştir (Aytuğ ve ark 1990). Aşım sezonunun başlamasında etken faktörler arasında güneş ışınları, çevre ısısının düşmesi, koç katımı, ırk ve beslenme sayılabilir (Chemineau ve ark 1982, Gordon 1983, Arthur ve ark 1989, Lindsay 1991, Coyan 1994).

Aşım sezonunda, koyunların belirgin östruslar sayesinde saptanan seksüel siklusları, genelde 16-17 gün sürmekle birlikte, bu süreler ırka bağımlı olarak 14-18 gün arasında değişmektedir (Hare ve Bryant 1982).

Koyunlarda seksüel sikluslar, folliküler (proöstrus, östrus) ve luteal (metaöstrus ve diöstrus) evrelere ayrılır. Proöstrus, yaklaşık 2 gün kadar devam eder ve hipofiz ön lobundan salgılanan FSH etkisi ile ovaryumlarda folliküler gelişimin olduğu dönemi kapsar. Proöstrus sonunda başlayan östrus, follikül gelişimiyle birlikte artan östradiol  $17\beta$ 'nın etkisiyle ortaya çıkan kızgınlığın psişik belirtileriyle karakterizedir. Fakat koyunlarda bu belirtiler atlarda ya da ineklerde olduğu gibi çok belirgin değildir, sadece huzursuzluk ve koça yaklaşma eğilimi gibi belirtiler gösterirler (McDonald 1983).

Ovulasyonun ardından yaklaşık 2 gün süren metaöstrus başlar ve ovaryumlarda gelişen corpus luteumdan (CL) progesteron salgısı hızlı bir yükseliş gösterir. Corpus luteum'un aktif olduğu dönem diöstrustur ve dolaşım kanında yükselen progesteron endometrium'u gebeliğe hazırlar. Corpus luteum yaklaşık 12-13 gün aktif kalır ve bu süre sonunda, bir döllenme olmamışsa gebe olmayan uterus'un endometriyumundan PGF $2\alpha$

salgılanır ve ovaryumda CL'un regrese olması sağlanır. Böylece kan progesteron düzeyinde meydana gelen düşüş FSH salınımını artırır ve yeni bir folliküler evre gelişmeye başlar (McDonald 1983, Çoyan 1994).

### **2.1.2. Koyunlarda seksüel siklusun hormonal mekanizması**

Koyunlarda seksüel siklusun hormonal mekanizması aşım ve anöstrus dönemlerinde farklılıklar gösterir. Anöstrus döneminde östradiol, LH üzerinde negatif feedback etki gösterirken, bu etki aşım sezonunda ortadan kalkar ve ovaryum aktivitesinin mevsimsel kontrolü östradiol tarafından yönlendirilir (Webster ve Haresing 1983).

Aşım sezonunda çevre faktörleri ve mevsimsel değişimin etkisiyle hipotalamus'tan salgılanan GnRH, hipofiz ön lobundan FSH ve LH salımını uyarır ve folliküler gelişme kontrol edilir (Ward 1986).

FSH'nın hipofiz ön lobundan salınması ovaryumlarda folliküler gelişimi artırır ve folliküllerden artan miktarlarda östrojen salgılanır, östrus belirtileri ve östrus davranışları ortaya çıkar. Kan östrojen düzeyinin yüksek olması hipotalamus-hipofiz sistemi üzerine pozitif feedback etkiyle LH'nin 2-10 ng/ml bazal düzeylerden 100-200 ng/ml'ye yükselmesine yol açar ve LH pikinden 18-24 saat sonra da ovulasyon şekillenir. Merinoslarda ovulasyon, östrusun başlamasından 25-30 saat sonra spontan olarak şekillenir. Koyunlarda ovulasyonun keçilerin aksine, östrus göstermeden spontan olarak meydana gelmesi ve östrus belirtilerinin çok belirgin olmaması nedeniyle östrus aramalarının daha dikkatli ve sık yapılması gerektiği bildirilmektedir (Shetton 1980, Arthur ve ark 1989).

Ovulasyondan sonra LH ve östradiol düzeyleri hızla düşer. Kandaki düşük östrojen düzeyleri hipofiz bezine negatif feedback etki ederek gonadotropin salımını baskular ve ovaryumlardan yeni follikül gelişimini engeller (McDonald 1983).

LH'nın etkisiyle patlayan follikülün yerinde C. luteum hemorajikum, ardından da C. luteum periodikum gelişir ve luteal faz başlar. Bu fazda C. luteumdan salınan yüksek düzeydeki progesteron gonadotropinler üzerine inhibitör etkisi gösterir ve folliküler gelişim

baskılanır. Gebelik oluştugu hallerde C. luteum, C. luteum gravidatis'e dönüşürken, gebelik olmadığı hallerde, siklusun 11-12. günlerinden başlayarak endometriyumdan salınan PGF2 $\alpha$  etkisiyle C. luteum küçülür ve hipofiz bezi üzerindeki baskının ortadan kalkmasına yeni bir siklusun oluşumuna yol açar (Ward 1986).

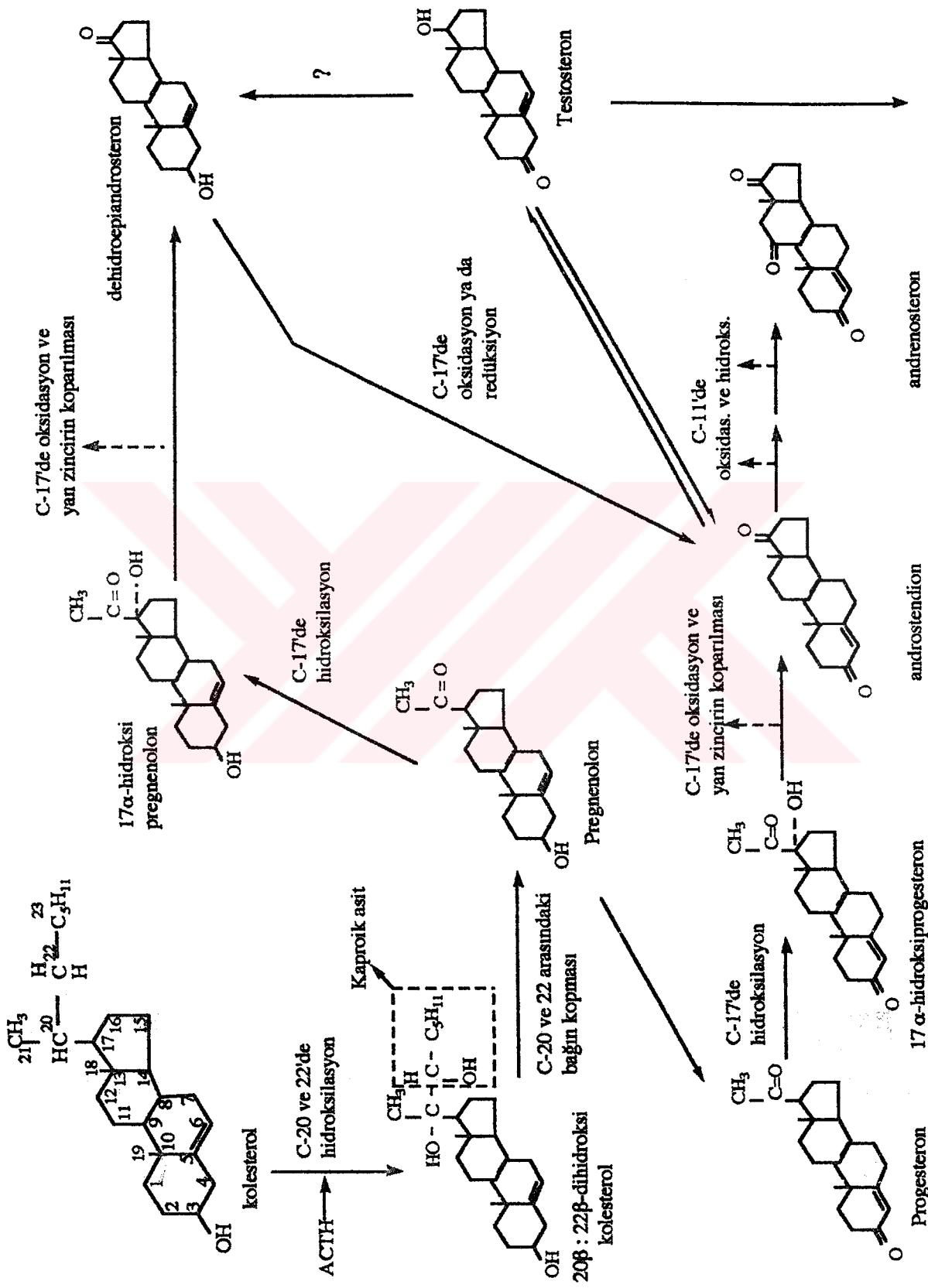
### **2.1.3. Progesteron ve östradiol 17 $\beta$**

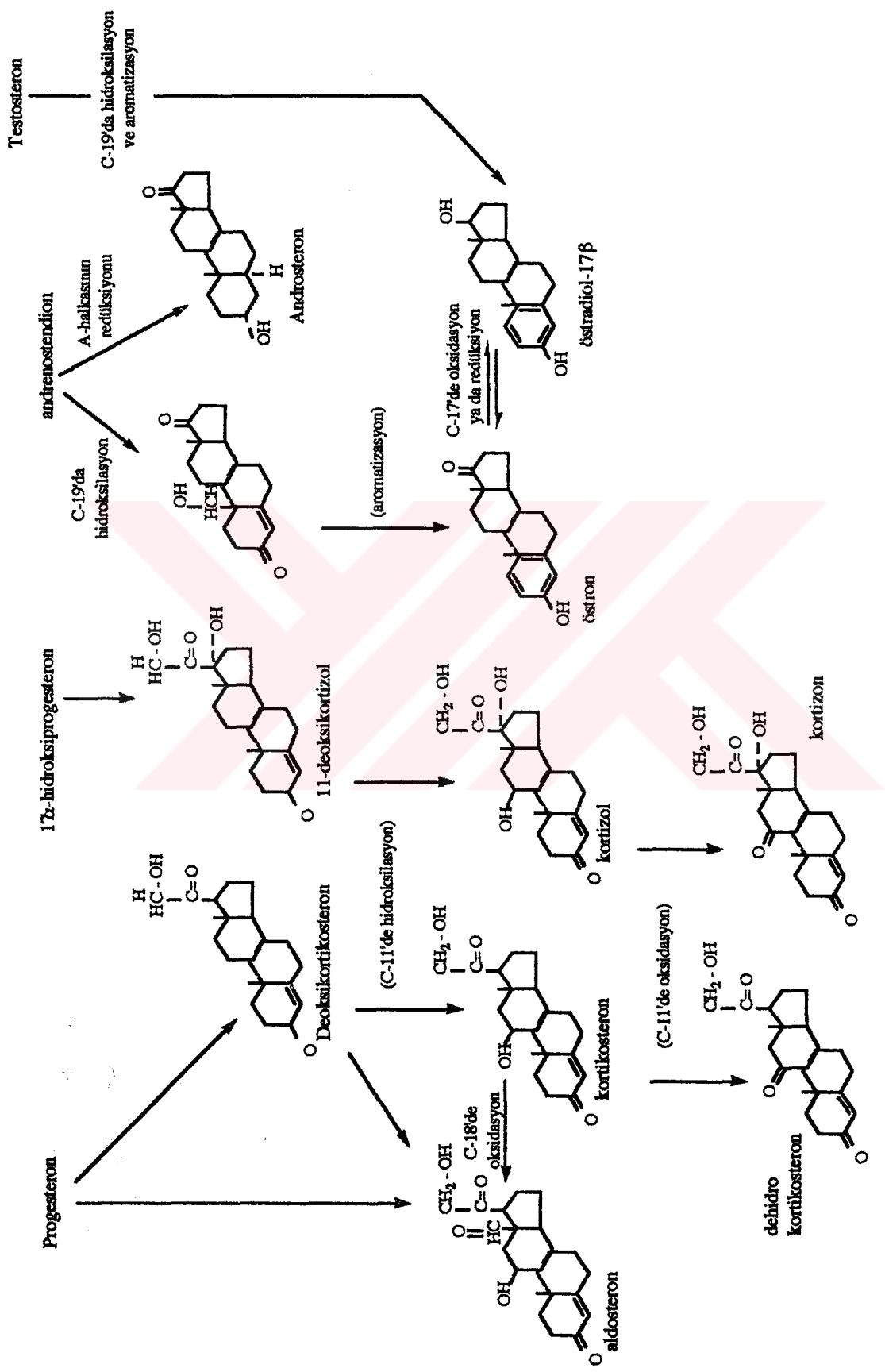
#### **2.1.3.1. Biyosentezleri ve salgılanmaları**

Siklopentano perhidro fenantren (steran) halkasına sahip olan steroid hormonların tamamı 27 C'lu kolesterolden sentezlenir. Dışarıdan gıdalarla alınabileceği gibi, asetil CoA'dan da sentezlenebilenコレステロールの合成は、サイトゾルで進行する。したがって、 steroid hormonların ilk sentez yeri mitokondriumdur. Genellikle ester formunda bulunanコレsterol mitokondriumda hidrolize edilerek ilk steroid hormon olan pregnenolon'a dönüştürülür。Pregnenolon'un sentezi hipofiz ön lobundan salgılanan Adrenokortikotropik hormon (ACTH) tarafından stİMÜLE edilir (McDonald 1983, Bondy 1985) ve gebe koyunlarda hipofektomi sonucu abortusların gözlenmesi pregnenolon ve dolayısıyla progesteron sentezi üzerine ACTH'in etkisini ortaya koymaktadır (Küplüllü 1990)。

Pregnenolon sentezinde öncelikleコレステロールのD環の20番と22番の炭素原子が水酸化され、その後の脱水反応によってデズモラーゼ酵素によってコルチコステロンが生成される。その後、このコルチコステロンがprogesteronの前駆体となる。

Pregnenolondan 2 basamakta sentezlenen progesteron'un sentez yeri endoplazmik retikulum (ER) 'dur. Öncelikle pregnenolon'un 3. C'undaki OH grubu NAD $^{+}$ 'ye bağımlı pregnenolon 3 $\beta$ -dehidrogenaz酶 etkisiyle keto grubuna okside edilir. Ardından,  $\Delta^5$  çift bağlı  $\Delta^4$  çift bağına izomerize edilerek progesteron sentezi tamamlanır (Bondy 1985).





Şekil 2.1. Steroid hormonların biyosentezindeki önemli metabolik yollar.

Mineralokortikoid, glikokortikoid, androjen ve östrojenlerin sentezi bu aşamadan sonra gerçekleşir ve ER'da bulunan  $17\alpha$ -hidroksilaz enzimi progesteronun hangi yönde metabolize edileceğinin belirlenmesinde anahtar rol oynar ve progesteron bu enzimin etkisiyle sentezlenen  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron üzerinden değişik organ ve dokularda glikokortikoid, androjen ve östrojenlerin sentezinde kullanılır (McDonald 1983).

$17\alpha$ -hidroksiprogesteron'un C-20 ve 21'in bulunduğu yan zinciri koparılır ve bir androjen olan androstendion oluşur. Bir diğer androjen olan testosterone androstendion'un 17 numaralı C atomundaki okso grubunun reduksiyonuyla meydana gelir. Androjenler 19 C içerirler. Östrojenler ise 19 numaralı karbon atomunun metil grubunun koparılması ve aromatik bir A halkasının oluşumuyla androjenlerden sentezlenirler. Androstendiondan sentezlenen östrojen östron, testosterondan sentezlenen östrojen ise östradiol  $17\beta$ 'dır. Her ikisinin de metabolizma ürünü östriol'dür (Bondy 1985) (Şekil 2.1).

Östrojenlerin üretim yeri çoğunlukla ovarium ve plasentadır. Küçük miktarlarda böbrek üstü bezlerinde ve testislerde de üretilir. Östrojenler ovarumlarda FSH ve LH'nin sinerjik kontrollü ile ovarium follikülüne granuloza ve teka interna hücrelerinde üretilirler. Teka ve granuloza hücreleri arasındaki etkileşim folliküler steroidojenez için gereklidir. LH, teka hücrelerinde kolesterolden androjenlerin biyosentezini stimüle eder. Bu androjenler daha sonra follikül duvarı bazal membranından diffuze olur ve bir kısım androjenler antruma geçerler. Granuloza hücreleri androjenlerin hem bazal membrandan geçişini, hem de FSH'nin etkisiyle androjenlerin östrogene dönüşümünü artırırlar. Folliküler sıvıda biriken östrojenlerin bir kısmı antruma dolarken, çoğunluğu sistemik dolaşma gönderilmek üzere tekal hücrelerin kapillarlarına diffuze olurlar. Östrojenlerin ikincil sentez yerleri arasında ise corpus luteum, adrenal korteks ve gebe hayvanların plasentası sayılabilir (Ruckebusch ve ark 1991).

Dolaşım kanındaki östradiol'un yarılanma ömrü yaklaşık 50 dakikadır ve çoğunlukla karaciğerde metabolize edilirler. Radyoaktif östradiol'un verilmesi sonucu aktivitenin % 65'i idrarda, % 15'i safra da görülmüştür. İdrarla glukronik asit ya da sülfat esterleri halinde atılır.

Safra ile atılan östron ve östradiolin büyük bir kısmı ise barsaklardan tekrar absorbe edilir ve idrarla atılır (Zerobin 1985).

Adrenokortikal hormonların, testosteronun ve dolaylı olarak östradiol  $17\beta$ 'nın sentezlerinde ara ürün olması nedeniyle böbrek üstü bezi, ovaryum, testis ve plasentada sentezlenebilen progesteronun, gebeliğin devamını sağlaması açısından en önemli sentez yeri ovaryumların corpus luteum'u ve plasentadır. Endometriyumun proliferasyonuyla uterusu implantasyona hazır hale getiren progesteron gebelik süresince bir yandan folikül gelişimini ve ovulasyonu önleyerek fizyolojik ve psikolojik kızgınlığın ortaya çıkışını engellerken, diğer yandan meme bezlerinin büyümeyesini stimüle eder (Tepperman and Tepperman 1987). Gebelikte progesteronun büyük kısmının plasental kaynaklı olduğu gözlenmiş (Tsang 1978) ve Novoa (1986), koyunlarda corpus luteum ve plasentanın progesteron üretimine katkısının sırasıyla % 32 ve % 44 olduğu belirlenmiştir. Jenkin ve Thorborn (1985)'un bildirdiğine göre, koyunlarda gebeliğin 50. gününden sonra progesteron üretimi büyük oranda plasentada yapılmakta ve bu günden sonra Corpus luteum tarafından progesteron sentezi ya da gebeliğin sürdürülmesindeki önemi tartışılmaktadır (Sarda ve ark 1973, Fylling 1979).

Sığır, koyun ve domuzların Cluteumları büyük ve küçük lutein hücreleri olmak üzere iki hücre tipinden oluşur. Küçük lutein hücreleri kolesteroli alma ve depo etme yeteneğindedirler ve LH ile stimülasyonun yükselmesi progesteron sentezinin artmasına yol açar. Büyüük lutein hücreleri ise LH stimülasyonuna daha az duyarlıdır. Küçük lutein hücrelerinden büyük lutein hücrelerine kolesterol geçiş yavaş olduğundan uzun süreli periyotlarda daha fazla progesteron sentezlenebilmektedir (örneğin, gebelik). Bu durumda LH'nin fonksiyonu, küçük lutein hücrede depolanan kolesterolin büyük lutein hücrelerine serbest bırakılmasının sağlanması şeklindedir (McDonald 1983).

Kandaki yarılanma ömrü yaklaşık 15 dakika olan progesteronun en iyi bilinen metabolizma türüni pregnandiöl ve alopregnandiöl'dür. Bu metabolitlerin büyük bir kısmı glukronik asitle konjuge edilir ve idrarla atılır. Bir kısmı metabolitler ise safra ile barsaklara atılır ve gaitada görülür (McDonald 1983).

Salgılanan steroid hormonlar kanda serbest halde dolaşmazlar. Plazmada steroid hormonlara özgü transkortin adı verilen taşıyıcı proteinler vardır. Bu proteinler adrenokortikosteroidleri ve progesteronu bağlayabilen, kortikosteroid bağlayan globulin (CBG) ve östradiol ve testosteronu bağlama yeteneğine sahip Sex hormonu bağlayan globulin (SHBG)'dir. Hormonun plazma proteinlerine bağlanması ile hem dokulara diffüzyonu sınırlanır hem de bu bağlanma sayesinde hormon bozulma ve eliminasyona karşı daha dirençli hale gelir ve etki süresi de artar. Taşıyıcı proteinlere bağlanan hormon biyolojik olarak inaktif formdadır ve hilece içine serbest formda girdikten sonra aktivite kazanır (Ruckebusch ve ark 1991).

### **2.1.3.2. Seksüel siklusta ve gebelikte progesteron ve östradiol 17 $\beta$**

Fizyolojik olaylardaki siklik değişimler hormonlarca kontrol edilir. Folliküler evrede bazal düzeylerde seyreden progesteron düzeyleri luteal dönemde yükselir ve progesteron etkisi bu evrede belirginleşir. Koyunlarda seksüel siklusun 15. gününde corpus luteum regrese olur ve plazma progesteron düzeyleri 16. gündə bazal düzeylere ( $< 0.2 \text{ ng/ml}$ ) geriler. Progesteron düzeyindeki bu düşme östradiol sekresyonunu stiçmle ettiğinden progesteron'un östradiolca oluşturulan östrus davranışlarının ortaya çıkmasında prekürsör olarak görev yaptığı kabul edilmektedir (Ward 1986).

Pathiraja ve ark (1991) keçilerde östrusun başlangıcında belirlenemeyecek düzeyde düşük olan progesteron düzeylerinin siklusun ortalarında maksimum düzeylere ( $5.2 \pm 0.28 \text{ ng/ml}$ ) ulaşlığını ve 12 gün boyunca sürekli olarak  $2 \text{ ng / ml}$ 'nin üzerinde seyrettiğini bildirirlerken, Chemineau ve ark (1982) aynı hayvanlarda plazma progesteron düzeylerinin, luteal fazda sürekli olarak  $1 \text{ ng/ml}$ 'den daha yüksek olduğunu, en yüksek düzeyin de  $4.53 \text{ ng/ml}$  olarak gözlediğini bildirmiştir. Sakız koyunlarında da östrus siklusunda, tohumlamadan 16-17 gün sonra ve folliküler evrede en yüksek progesteron düzeyleri sırasıyla  $2.45 \pm 0.99$ ,  $3.74 \pm 0.95$  ve  $0.23 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$  olarak belirlenmiştir (Sulu ve ark 1993).

Plazma progesteron düzeyleri ırklar arasında ve seksüel siklusun süresine bağlı olarak da farklılıklar gösterebilir (Quirke ve ark 1979, Nephew ve ark 1991). Nephew ve ark (1991)'nca koyunlarda seksüel siklus süresinin hormon düzeyleri üzerine etkisini araştırılmış ve kısa siklusa sahip gruptaki ( $15.9 \pm 0.1$  gün) plazma progesteron düzeyinin siklusun 2-4. günlerinde, uzun sikluslu koyunlardan ( $18.6 \pm 0.4$  gün) daha yüksek olduğu belirlenmiş, 5. günden sonra herhangi bir farklılık saptanamamıştır. Kısa süreli siklusa sahip grupta en yüksek düzey  $2.9$  ng/ml iken, uzun süreli siklusa sahip grupta  $3.1$  ng/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca luteal fazı uzun olan koyunlarda ardarda iki plazma progesteron düzeyinin  $2$  ng/ml'den yüksek olduğu da bildirilmektedir (Ward and Williams 1993)

Östradiol düzeyleri koyunlarda östrustan 1 gün önce ortalama  $10$  pg/ml'den  $20$  pg/ml'ye yükselir (Ward 1986). Chemineau ve ark (1982) keçilerde östrus öncesinde  $9.4$  pg/ml olarak belirlenen östradiol  $17\beta$  düzeylerinin daha sonra yavaş yavaş artmaya başladığını ve LH pikinde maksimum düzeye ( $32.3$  pg/ml) ulaştıktan sonra 12 saat içerisinde tekrar eski düzeylerine gerilediğini ( $8$  pg/ml) bildirmektedirler. Moore ve ark (1969), koyunların ovarium veninden alınan kan örneklerinde progesteron düzeylerinin östrus siklusunun 4. gününden itibaren hızla yükseldiğini ve 8-14. gün arasında  $10$  ng/ml'den yüksek bulunan düzeylerin östrusun 48 saat öncesinde düşmeye başladığını ve en düşük progesteron düzeylerine (progesteron  $< 0.1$  ng/ml) östrusun 24 saat öncesinde ya da 8-16 saat sonrası kapsayan aralıkta saptandığını, östradiol'un de siklusun 14. gününden itibaren belirlenebilecek düzeylerde bulunduğu ve proöstrusta yükselmeye başlayan östradiol düzeylerinin östrusun 20-30 saat öncesinde  $10$  pg/ml'ye yükseldiğini ve östrusun 24 saat sonrasında hala belirlenebilecek düzeyleri koruduğunu bildirmektedirler.

Progesteron hormonu düzeylerinin gebelikte sürekli yüksek seyretmesi nedeniyle sit ya da plazma progesteron düzeyleri gebeliğin tanısında kullanılabilir. Evcil hayvanlarda kullanılan gebelik tanı yöntemleri arasında rektal palpasyon, laparatomı,超声波圖像和 hormonal analiz yöntemleri sayılabilir. Koyunlarda rektal palpasyonun olaksız oluşu, laparatomı için anestezi ve cerrahi müdahale gereksinimi, komplikasyon ve mortalite riskinden dolayı, gebelik tanısında genellikle ultrasonografi ya da hormonal analiz yöntemleri

kullanılır. Ultrasonografi risksiz bir yöntemdir, ancak koyunlarda son 3 ayda doğru sonuç elde edilebilmektedir (Brundige ve ark 1988).

Tohumlamadan sonraki olası ilk siklus günlerinde plazma ya da süt progesteron düzeylerinin belirlenmesiyle gebelik teşhisini yapılmaktadır. Brundige ve ark (1988) bu yöntemle yapılan gebelik teşhislerinde başarı oranının % 85 olmasına karşın, gebe olmayan hayvanların teşhisinde % 100 başarı sağlamışlardır. Tohumlamadan sonraki olası ilk siklus gününde bulunan 1-1.5 ng/ml'nin üzerindeki plazma progesteron düzeyleri gebeliğin işaretini olarak kabul edilebilir, fakat bu eşik değerler ırklara ya da çevre şartlarına göre değişebilmektedir (Gadsby ve ark 1972, Weigl ve ark 1975, Rhinds ve ark 1978, McPhee ve Tiberghien 1987, Brundige ve ark 1988)

Gebelikte corpus luteum yanısıra plasentadan da progesteron sentezlenmesi, yavru sayısı ile progesteron düzeyleri arasında bir ilişkinin olabileceğini düşündürmüştür ve Gadsby ve ark (1972) yavru sayıları ile progesteron düzeyleri arasındaki ilişkinin gebeliğin 80.gününden sonra gelişğini bildirmelerine karşın, Bedford ve ark (1972) koyunlarda plazma progesteron düzeyleri farklılığının yavru ağırlığı ile ilişkili olduğunu ve yavru ağırlığı 4kg'dan fazla olan koyunların plazma progesteron düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Daha sonra yürütülen çalışmalarla Van de Wiel ve ark (1976) yavru sayısı ile progesteron düzeyleri arasında istatistik açıdan anlamsız bir ilişkinin bulunduğuunu bildirirlerken, McPhee ve Tiberghien (1987) bu ilişkinin gebeliğin erken dönemlerinde (tohumlamadan 16-17. günlerinde) gözlenemediğini yazmaktadır. Tamanini ve ark (1986) da tek ve ikiz gebelikte total östrojen miktarları arasında bir ilişki bulunamadığını bildirmektedirler.

Gebelikte plazma progesteron düzeyinin sürekli yüksek oluşu gebeliğin devamlılığı açısından büyük önem taşır. Gebe koyunlarda plazma progesteron düzeylerindeki düşüş, doğumun başlatılmasını sağlayan PGF<sub>2α</sub> konsantrasyonunun yükselmesini başlatır (Jenkin and Thorborn 1985). Koyun embriyosunun çoğleşmeden yalnız 11-12 gün sonraki düşük plazma progesteron düzeylerine duyarlı olduğu belirlenmiş, çoğleşmenin 8-14. günleri arasında exogen progesteron uygulanan koyunlarda gebelik oranının arttığı gözlenmiştir

(Parr 1992). Gebe inek ve koyunlarda abort meydana gelmesi halinde ise aborttan 4-6 gün önce düşmeye başlayan progesteron düzeyleri abort anında aniden 0'a yakın değerlere ulaşmıştır (Mohamed ve ark 1987).

Hamon ve Heap (1990) gebe koyunlarda gebeliğin 10-20. günlerinde 5 ng/ml olarak belirlenen progesteron düzeylerinin 40-50. günlerde 2.8 ng/ml'ye düştüğünü, östradiol düzeylerinin gebeliğin büyük bir kısmında sabit bir şekilde seyrettiğini ve gebeliğin 40-150. günler arasında 27.2 - 81.66 pg/ml arasında olduğunu bildirmektedirler.

## 2.2. Koyunlarda Dölverimini Etkileyen Faktörler

Hayvanlarda döl verimini etkileyen en önemli faktörler arasında; hayvanın yaşı, ırkı, bakım, besleme, tohumlama ve kuzulama mevsimi gibi faktörler sayılabilir.

Karacabey merinosu koyunlarda gebelik, doğum oranları ile doğum başına düşen kuzu sayısı sırası ile % 81.5 - 91.2, 79.5 - 87.7, 1.04 - 1.56 arasında (Örkiz 1972, Ogan 1988), Konya merinosunda % 91.11 , 91.11 ve 1.46 bulunurken, ikizlik oranı, doğum başına düşen kuzu sayısı ve doğum ağırlığını sırasıyla % 46.34, 1.33 ve  $4.552 \pm 0.119$  kg olarak belirlenmiştir (Akınaz 1989).

Hayvanlarda aşırı beslenme sıcaklık stresine neden olurken, az beslenme ise asenkroniye, uterus sıvısındaki amino asit kompozisyonu dağılımının bozulmasına, kısmi embriyo kaybı ile bir batında doğacak yavru sayısının azalmasına ve yavru ağırlığının düşmesine yol açar (Ley 1985). Koyunların tohumlamadan 3-4 hafta önce, ilave yemleme ile canlı ağırlık artışı kazandırılması ve iyi bir kondisyonla ulaştırılması olarak tanımlanabilen flushing, ovulasyon ve ikizlik oranına bağlı olarak doğum oranının da artışına neden olmaktadır (Eliçin 1985, Sönmez ve Kaymakçı 1987, Aytuğ ve ark 1990). Koyunların tohumlama öncesi beslenme düzeyleri ve canlı ağırlıkları flushing'in sonuçlarını etkiler ve tohumlama öncesi aşırı yağlanmış koyunlarda superovulasyon etkisi engellenebilir ve buna bağlı olarak da doğum oranında düşüşler gözlenebilir (Örkiz 1972).

Beslenmenin embriyo gelişimine ve embriyonik ölüme nasıl bir etkisinin olduğu henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir. Genelde endokrin dengeyi olumsuz yönde etkilediği, uterus ve embriyo arasındaki asenkroninin progesteron düzeylerini değiştirdiği yönündedir. Bütün bunların yanında östrojenik bitkiler içeren meralarda otlayan koyunlarda da fertilitenin düştüğü bildirilmektedir (Ley 1985).

Çiftleşme sezonunda yüksek ısı da fertilizasyon ve embriyonun yaşamı üzerinde etkilidir. Vücut ısısındaki 2 °C'nin üzerindeki artışların fertiliteyi olumsuz yönde etkilediği ve erken embriyo ölümlerine yol açtığı, ancak sıcak ortama adapte olan koyunlarda ısı etkisinin azaldığı bildirilmektedir (Evsikov ve Belyaev 1978).

Dölverimini etkileyen faktörler arasında yaşın da çok önemli bir kriter olduğu kesin olarak ortaya konulmuş (Örkiz 1975, Eliçin 1985) ve genel olarak genç yaşlarda düşük olan döl veriminin, yaş ilerledikçe arttığı 4-5 yaşlı koyunlarda en yüksek düzeye ulaşlığı ve yaşın ilerlemesiyle tekrar düşmeye başladığı gözlenmiştir (Sönmez ve Kaymakçı 1987, Ogan 1988). Langford (1986) progesteron uygulamasıyla östrusu uyarılan toklularda fertilité, çoklu doğum, doğurganlık ve embriyonik ölüm oranlarını sırasıyla % 33, 1.7, 0.6 ve 24, koyunlarda sırasıyla % 68, 2.4, 1.6 ve 9 olarak belirlemiş, koyun ve tokluların canlı ağırlıkları ile kuzulama ve çoklu doğum oranları arasında da yüksek derecede pozitif korrelasyon olduğunu bildirmiştir.

Kuzu doğum ağırlığında ise ana yaşıının yanısıra, tohumlama mevsimi, tohumlama öncesi besleme, canlı ağırlık, kuzu doğum tipi ve cinsiyeti de etkili olmaktadır (İmeryüz 1979, Baş ve ark 1986, Akmaz 1989, Ogan ve ark 1994). Ogan ve ark (1994) Karacabey Merinoslarında ana yaşıyla birlikte kuzu doğum ağırlıklarının artma gösterdiğini, 3.5-4 yaşlı koyunların kuzularında maksimuma ulaşan doğum ağırlığının yaşın ilerlemesiyle birlikte düşüşünü saptamışlar, koyunun yaşı, canlı ağırlık, doğum tipi ve kuzu cinsiyetinin kuzu doğum ağırlığını belirleme derecesini sırasıyla % 2.0, 1.0, 15.0 ve 3.0 olarak bulmuşlardır.

## **2.3. Vitamin C (Askorbik Asit)**

### **2.3.1. Yapısı ve biyosentezi**

Suda çözünen vitaminler içerisinde önemli bir yeri olan vitamin C (askorbik asit) ekşi lezzetli, kokusuz, renksiz bir maddedir. Çok çabuk parçalanabilen ve stabilitesi en düşük vitamin olan askorbik asit, suda (1:3) ve alkolde (1:30) çözülmesine karşın diğer organik çözülcülerde çözünmez (Yenson 1984).

Vitamin C,  $C_6H_8O_6$  kapalı formülüne sahip, erime noktası  $172^{\circ}\text{C}$ , molekül ağırlığı 176.1 ketolakton yapısında bir monosakkarit türevidir (Lewin 1976). Limon, portakal, greyfurt, tilizüm, muz, çilek, kavun, karpuz gibi meyvalarda ve domates, yeşil biber, lahana ile tüm yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunmasına karşın, hayvansal gıdalar vitamin C yönünden yetersizdir (McDowell 1989).

Başta ruminantlar olmak üzere bir kısım memelilerin karaciğerinde, sürüngenlerin ve evcil kanatlılarının böbreklerinde glikozdan sentezlenebilen askorbik asit, insanlar ve diğer primatlar, kobay, yarasa ve çeşitli balıklar, çoğu kuşlar ve bazı böceklerde L-glono- $\gamma$ -lakton'u askorbik asite dönüştüren L-glono- $\gamma$ -lakton oksidaz (E.C. 1.1.3.8.) enziminin yokluğu sonucu sentezlenemez. Hayvan türleri arasında askorbik asit sentezinin düzeyi büyük farklılıklar görülebileceği gibi (Chatterjee 1973, Kolb ve ark 1989), karaciğerin sentez kapasitesine bağlı olarak hayvanlar arası bireysel farklılıkların da olduğu bildirilmektedir (Chatterjee ve ark 1975).

Vitamin C'nin sentez düzeyi yaşı, beslenme, mevsim ve genetik faktörlerden etkilenir. Fötal hayatı başlayan sentez doğuma doğru gittikçe yükselir (Horio ve ark 1986, Malinowska 1986). Malinowska (1986) domuz fótusundaki vitamin C sentezinin yaklaşık 36. günde başladığını bildirmektedir. Wegger ve Palludan (1984) de genetik farklılıklar sonucu Vitamin C sentez kapasitesinde değişiklikler gözlemiştir. Sığırarda kan plazmasında bulunan 12-18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik askorbik asit düzeylerinin yaz aylarındaki 6-12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik düzeylerden yüksek olduğu görülmüştür (Kolb ve ark 1991). Aşağıdaki tabloda bazı hayvan türlerinin karaciğer askorbik asit sentez miktarları verilmektedir

**Tablo 2.1.** Bazı hayvan türlerinde karaciğerin askorbik asit sentez kapasiteleri  
(Levine 1986).

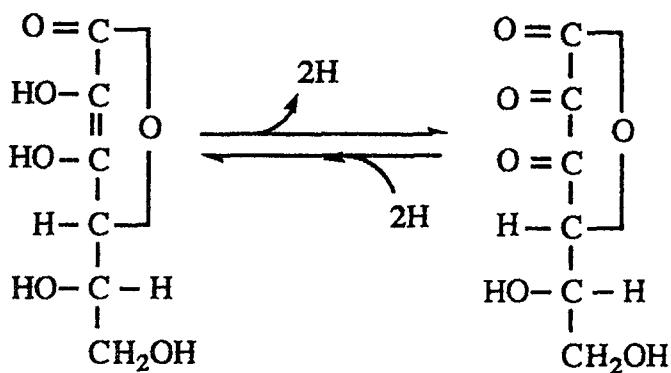
<b>Hayvan Türü</b>	<b>mg/kg/gün</b>	<b>Hayvan Türü</b>	<b>mg/kg/gün</b>
Koyun	24.8	Domuz	8.1
Keçi	32.6-190.0	Tavşan	22.1-226.0
İnek	15.7- 18.3	Rat	39.1-198.6
Kedi	4.8-40.0	Fare	33.6-275.0
Köpek	5.0-40.8	Sincap	28.8

Ruminantlar, karaciğerde sentezin yeterli olmadığı durumlarda oral yolla alınan vitaminin rumenin alkali pH'sında mikrofloranın da etkisiyle parçalanmasından dolayı vitamin C eksikliklerine daha duyarlıdır (Itze 1983). Sentez için başlangıç maddesi glikozdur. Kan plazmasındaki glukoz düzeyinin düşmesinde (hipoglisemi) sentez kapasitesi düşer. Vitamin B12 yetmezliklerinde ruminantlarda propiyonatın glikoneogenezde değerlendirilmesi ve buna bağlı olarak kan plazma glikoz içeriği düşer. Kobalt yetmezliklerinde ön midede vitamin B12 sentezi aksadığından, koyunlarda yetersiz kobalt alınmanın (sadece 44 µg /gün/hayvan) başlangıçta 50-70 mg/dl olan plazma glikoz düzeyini, 36 hafta sonunda, 20 mg/dl'ye kadar düşürdüğü, sentez ön maddesi glikoz olan plazma askorbik asit içeriğinin de 4 - 8 µg/ml'den, 0.5 - 0.1 µg/ml'ye gerilediği bildirilmektedir (McPherson 1984).

### **2.3.2. Metabolizması ve fonksiyonları**

Sadece L-izomeri aktif olan askorbik asitin redukte L-askorbik asit ve okside dehidro-L-askorbik asit olmak üzere iki formu vardır. Her iki form da aktif olmakla birlikte, dehidro-L-askorbik asit, L-askorbik asitin ancak % 80'i oranında aktivite gösterebilir (Yenson 1984, McDowell 1989). Askorbik asit, hücre içinde büyük oranda serbest formda, daha az oranda proteine bağlı ve indirgenme özelliğini yitirmiş askorbinojen halinde bulunur. Askorbik asitin en göze çarpan özelliği C-3'deki enolik hidrojenden ileri gelen asitliği ve kolaylıkla dehidroaskorbik asite oksitlenebilmesidir. Sulu ortamlarda askorbik asitin 3. karbondaki enol

grubunun hidrojen atomu iyonize olur ve monobazik bir asit gibi davranır. Bu iyonizasyon  $pK$  4.17'de gerçekleşir.  $pK$  11.57'de ise alkali ortamda ikinci karbon atomundaki enol grubunun hidrojeni iyonlaşır (Levine and Morita 1985, Moser 1990).



L-Ascorbic asit

Dehidro L-askorbik asit

Şekil 2.2. L-askorbik asit ve dehidro L-askorbik asit'in yapıları

Gıdalarda L-askorbik asit reversibl olarak okside form olan dehidroaskorbik asite oksitlenebilir. Dehidro L-askorbik asit de nötral ya da hafif asit ortamlarda yavaş, alkali ortamda hızlı bir şekilde inaktif form olan diketogulonik asite irreversibl bir şekilde oksitlenebilir. Çok süratli seyreden bu reaksiyonlara vitamin C'nin oksidatif parçalanması, ısı ve ışık etkisiyle daha da hızlanır. Vitamin C asit ortamlarda alkali ortamlara göre daha stabildir. Kristal formdaki askorbik asit rutubetsiz ortamda oldukça stabilken, düşük düzeylerdeki metal iyonları askorbik asit'in parçalanmasını hızlandırır (Lewin 1976, McDowell 1989).

Dehidroaskorbik asit'in oksidasyonuyla oluşan diketogulonik asit daha ileri safhada okzalik asit ve L-treonik asite oksitlenir. Diğer bileşikler oksidasyona karşı korunabildiği halde askorbik asit, oldukça hızlı bir şekilde dehidroaskorbik asite okside olur. Askorbik asitin dehidroaskorbik asit'le reversibl oksido-redüksiyonu, vitamin C'nin kimyasal özellikleri, bilinen fizyolojik aktiviteleri ve stabiliteleri hakkında bilgi vermesinden çok önemlidir (Levine 1986, Padh 1991). Askorbik asit'in dehidroaskorbik asit'e oksidasyonunda askorbat serbest radikalı ya da semidehidroaskorbik asit adı verilen serbest radikal ara ürün olarak oluşur (McDowell 1989).

Vitamin C sentezi yapılamayan hayvanlarda intestinal absorbsiyon Na-bağımlı aktif transportla gerçekleştirilir. Gıdalarla alınan vitamin C'nin absorbsiyonu karbonhidratlara (monosakkartiler) benzer şekildedir ve kobaylarda absorbsiyon duodenal ve proksimal ince barsaklarda gerçekleşirken, ratlarda absorbsiyonun büyük bir kısmı ileum'da oluşur (Horio ve ark 1986).

Absorbe edilen vitamin C, idrar, ter ve dışkıyla dışarı atılır. Atılımda en önemli yolu idrar oluştururken, fekal kayıp daha azdır ve insanlarda 6-10 mg/gün kadardır, terle kayıp ise çok düşüktür. Kobay, rat ve tavşanlarda vitamin C için önemli bir atılım mekanizması vitaminin CO<sub>2</sub>'e kadar metabolize edilmesidir. Primatlar normalde bu yolu kullanmazlar, temel atılım yolu idrardır ve atılımın düzeyi vucut vitamin C deposuna, eksojen vitamin C alımına ve renal fonksiyonlara bağlıdır. Askorbik asitin eliminasyon şekli ve mekanizması glomerular ve renal fonksiyonlara, filtrasyon oranına ve plazma askorbik asit konsantrasyonuna bağlıdır ve idrarda dehidro askorbik asit, diketogulonik asit, askorbat 2-sülfat, okzalat, metil askorbat ve 2-keto askorbitol gibi askorbik asit metabolitleri görülür. Çok fazla miktarda almında vitamin C metabolize edilmeksızın idrar ve gaitada görülebilir (McDowell 1989).

Askorbik asit kan plazması, ekstraselüler sıvı ve hücrenin sulu kısımlarındaki en önemli antioksidandır ve süperoksit anyonları, hidroksiradikalleri, hidrojen peroksit ile peroksit radikallerini yok eder. Yağ asitleri peroksit radikalleri ile tokoferollerin reaksiyonlarından oluşan tokoferol radikallerinin reduksiyonu sayesinde hücrelerin tokoferol depolarının korunmasında da önem taşır (Kolb 1997).

Askorbik asit, biyosentez yollarının çoğunda hidroksilasyon reaksiyonlarını hızlandırır. Bu etkisini doğrudan ya da dolaylı olarak enzimlere elektron sağlamasıyla gerçekleştirir (Levine 1986). Vitamin C'nin bilinen diğer önemli fonksiyonları kısaca :

- Adrenalin ve noradrenalin oluşumu, melanin stimüle edici hormon (MSH) ve oksitosin gibi hormon sentezlerinde enzim kofaktörü (Kolb 1997),
- Kollagen sentezinin stımulasyonu (Barnes and Kodicek 1972, Padh 1991),

- Kolesterol'ün safra asitlerine dönüşümünün stimülasyonu (Hanck 1977),
- Metal iyonları metabolizmasında redükleseyici ve şelat yapıcı etki (Mc Dowell 1989),
- Hücre bölünmesi ve çoğalmasının stimülasyonu (Liso ve ark 1984),
- Karnitin sentezinin stimülasyonu (Thoma and Henderson 1984),
- Strese karşı koruyucu etki (Kortikosteroidlerin sentez ve salınımındaki rolü) (Kolb 1992),
  - Antikor oluşumu ve T-lenfositlerin aktivasyonunun uyarılması (Mc Dowell 1989),
  - Lökositlerin fagositik aktivitelerinin artırılması (Evans ve ark 1982),
  - Spermin zararlı oksidasyonlardan korunması ve fertilitenin iyileştirilmesi (Dawson ve ark 1990),
    - Nitrozamin gibi karsinojen maddelerin inhibisyonu ve tümör insidensinin düşürülmesi (Liehr 1991) şeklinde özetlenebilir.

### 2.3.3. Vitamin C'nin döl verimi üzerine etkileri

Yeterli vitamin C sentezi sağlık, verim ve üreme yeteneğinin sürdürülmesi açısından önem taşır (Wegger ve ark 1984, Wenk ve ark 1992). Kan düzeylerindeki ileri dereceli bir düşme hücreye girişin azalmasına ve değişik biyosentezlerde gerilemeye yol açar. Kan plazmasının askorbik asit içeriği dokuların bu bileşikle doyasının bir göstergesidir ve düzeyler biyosentezin büyüklüğüne ve kullanımın yüksekliğine bağlıdır. Kan plazmasındaki 3 µg/ml'den düşük değerler, dokulardaki yetersiz doymanın işaretidir ve çoğunlukla sentezin yeterli düzeyde artırılamadığı fakat kullanımın yükseldiği (örneğin stres ve hastalıklar) hallerde ortaya çıkar (Kolb 1997).

Askorbik asit sentezi olan ve olmayan hayvanlarda yeterli düzeylerde alındığında dokulara tam olarak yayılır. Dalak, karaciğer, beyin ve pankreasta oldukça yüksek düzeyde vitamin C bulunmasına karşın, en yüksek düzeye hipofiz ve adrenal bezlerde rastlanmıştır (Chinoy 1972, Kolb 1992, Kolb ve ark 1993). Bu dokulardaki vitamin C konsantrasyonunun kan konsantrasyonundan yaklaşık 200 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (Metzler 1977).

Askorbik asit, ovaryum fonksiyonları, tersiyer follikülün olgunlaşması ve CL'un fonksiyonlarının sürekliliği için gereklidir. Oksitosin prohormonunun aktif hormona dönüşümünde gerekli olan peptidilglisin  $\alpha$ -amid monooksijenaz (PGAM) enziminin yapı taşıdır. Askorbik asit,  $\beta$ -karotin, vitamin E ve antioksidatif etkili enzimler (Süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz) yanısıra granüloza ve C.luteum hücrelerinde özellikle reaksiyon yeteneği yüksek süperoksit radikallerinin yıkımlanmasında önem taşır. Kobaylarda tersiyer folliküllerin olgunlaşmasında ovaryumdaki askorbik asit içeriği analizleri ilginç sonuçlar vermiştir. Proöstrusta içerik oldukça önemli derecede düşer ve prostaglandinler ( $F_{2\alpha}$  ve  $E_2$ ) ileri derecede artar. Prostaglandinlerin oluşumunda peroksitler ve diğer yüksek reaksiyon yeteneğindeki radikal bileşiklerin oluşumu görülür ve bunların yıkımlanmasında askorbik asit kullanılır (Kolb 1997). Ayrıca askorbit asitin gebelik süresince domuz endometriyumunda prostaglandin  $F_{2\alpha}$  salınımını düşürdüğü ( $p<0.01$ ) bildirilmiştir (Rosenkrans ve ark 1990).

26-27 günlük ratlarda korion gonadotropin verilmesiyle süperovulasyon başlatılmasında vitamin C, A ve E içeriğinin analizleri dikkat çekici bulgular ortaya koymuştur. Plazma progesteron içeriği C.luteum'un oluşumunu izleyerek yükselirken, özellikle ovaryumlardaki vitamin A içeriğinin başlangıçta yükselmesi ve sonra düşmesi ilginçtir. Bu değişim granüloza hücrelerinin oluşumu ya da bunu izleyerek C.luteum hücrelerinin oluşumu (progesteron sentezinin sürdürülmesi) için gereklidir. Askorbik asit ve vitamin E'nin ovaryumlardaki içerikleri tertier follikül oluşumu sırasında değişmezken, C.luteum'un regresyonu sırasında ovaryumdaki vitamin E içeriği önemli derecede yükselir. Ovulasyon sonrası 8. günde LH'nın verilmesinden ( $20\mu\text{g}/\text{rat}$ ) sonraki ilk 4 saat içerisinde rat ovaryumu askorbik asit içeriği kuvvetli bir şekilde düşer ve daha sonra tekrar yükselirken, PGF $2\alpha$  verilmesinden 2 saat sonra ovaryumlardaki askorbik asit içeriğinin 880'den 222 ng/mg'a gerilediği görülmüştür (Aten ve ark 1992).

Adrenal bezlerde ve gonadlarda steroidlerin sentezinde regülatör olarak rol oynayan askorbik asit (Tolbert 1979), sığır adrenal mikrozomlarında elektron transport sistemi üzerine etkilidir ve ACTH tarafından adrenal bezlerin stimülasyonunda askorbat

konsantrasyonlarında görülen düşme steroidogenez için vitamin C'nin gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Kitachi ve West 1975). Tsuji ve ark (1989) skorbütlü ve skorbütlü olmayan ratlarda progesterondan testosterone üretiminde bir farklılığın gözlenemedegini bildirirken, Dabrowski ve ark (1995) alabalıklara farklı dozlarda askorbik asit verilmesinin plazma testosterone düzeyini yükselttiğini belirlemişler ve alabalıklarda askorbik asitin steroid üretimi üzerine etkili olabileceği sonucuna varmışlardır. Mathews ve Devi (1993) de anne rat ve yavrularında östradiol 17- $\beta$ 'nın askorbik asit düzeylerini düşürdüğünü, progesteron'un askorbik asit düzeyleri üzerine herhangi bir etkisine rastlanmadığını bildirmektedirler.

Steroidogenezde askorbik asitin lipid pro-oksidantı olarak etkili olabileceği düşünülmüş, bu etki, metal iyonları varlığında rat karaciğer mitokondrial ve mikrozomal fraksiyonlarında vitamin C'nin enzimatik olmayan yoldan poliansatüre lipidlerle okside olarak lipid peroksitleri oluşturmaya kanıtlanmıştır (Shimada ve Yasuda 1979). Pintauro ve Bergan (1982) kobaylarda vitamin C'nin steroidojeneze etkisini *in vitro* olarak incelemiştir ve 0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2 mM askorbik asit inkubasyonlarından 1.5 ve 2 mM'lük yüksek askorbik asit inkubasyonlarının kolesterol'ün pregnenolon'a dönüşümünü düşürerek testosterone ve progesteron üretiminde düşmelere yol açtığını, 0.5 mM askorbik asitin pregnenolon'un  $\Delta 4$  steroidlere dönüşümünü artırırken,  $\Delta 5$  steroidlere dönüşümünü düşürdüğünü belirlemiştir ve böylece yüksek düzeyde askorbik asitin steroid hidroksilasyonlarında genel inhibitör etkili olduğu ve pregnenolon'un  $\Delta 4$  ve  $\Delta 5$  steroidlere dönüşümünde askorbik asitin regülatör role sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Askorbik asit ile kolesteroldeki yan zinciri koparan enzim sistemi arasında bir ilişkinin kesin olarak bulunması yanısıra, pregnenolon'un progesterona dönüşümünü katalizleyen  $3\beta$ -hidroksi steroid dehidrogenaz ile de ilişkili olduğunu bildirmektedirler. Byrd ve ark (1993) da *in vitro* olarak tavukların granuloza hücrelerinde progesteron sentezini stimiile eden LH üzerine Na-askorbatın etkisini araştırmışlar ve memelilerde olduğu gibi kanathılarda da askorbatın steroidojeneze ilgili olduğunu ve 0.4 ve 0.8 mM Na-askorbatın progesteron sentezini artırdığı bulmuşlardır.

Koyun ve sığırlarda C.luteumdaki askorbik asit içerikleri seksüel siklus boyunca da incelenmiştir. Sığırlarda ovaryum içeriği 0.20 ve 0.52 mg/g düzeyindedir. C.luteum askorbik asit içeriği, C.luteum oluşumunun başlangıcında 1.29 (0.58-2.0), çok büyük miktarlarda progesteron sentezinin yapıldığı dönemde 1.99 (1.44 - 2.84) ve CL'un regresyonundan sonra 0.41 (0.21 -0.82) mg/g düzeyine gerilerken, gebelik sırasında içerik yüksektir ve 1.97 (1.83 - 2.11) mg/g dolayındadır. Keza lutein kistlerinde 1.97 (0.99 - 2.6) mg/g 'lik yüksek düzey belirlenmiştir (Kanakiyo 1968). Koyunlarda yapılan çalışmalar C.luteum askorbik asit içeriğinin ovulasyondan sonra 4. güne kadar 0.83 mg/g taze ağırlık düzeylerine yükseldiğini göstermiştir. CL'un gelişimi döneminde yüksek seyreden düzeylerin CL'un regresyonu ile düşmeye başladığı ve 15. siklus gününde 0.37 mg/g taze ağırlık düzeylerine gerilediği saptanmıştır (Kolb 1997). Başpinar ve Serpek (1993) sığırlarda plazma askorbik asit düzeylerinin seksüel siklus günlerine bağlı olarak değiştigini ( $p < 0.01$ ), siklusun başlangıcından itibaren yükselen düzeylerin 12. günden sonra düşmeye başladığını ve 18. günde görülen en düşük konsantrasyonun daha sonra tekrar yükselmeye başladığını saptamışlar ve östrus sırasında saptanan yüksek plazma vitamin C düzeylerinin bu fazda oluşan stress'ten kaynaklanabileceğini ileri sürmüştür. Wise (1987) benzer sonucu follikül sıvısında gözlemiş ve siklusun başlangıcında yüksek olan vitamin C düzeylerinin, 12. günden itibaren düşmeye başladığını bildirmiştir. Keza güvercinlerde yumurtlama dönemlerinde kan ve doku vitamin C düzeylerinde gözlenen düşmelerin bu vitaminin steroidogenez'de kullanıldığına kanıt olduğu bildirilmiş (Kotak ve Ambadkar 1985) ve aynı şekilde balıklarda da vitamin C'nin büyümeye ve oogenetik ile ilişkisi belirlenmiştir (Sandnes ve Breakkan 1981, Dabrowski ve ark 1995). Das ve ark (1993) da dişi ratlarda plazma, karaciğer, pankreas, troid, ovaryum, adrenal ve hipofiz dokusunda seksüel siklusun 4 farklı evresinde askorbik asit konsantrasyonlarını incelemiştir ve kontraseptif steroid uygulamaları, ovariektomi ve östrus fazlarında askorbik asit konsantrasyonlarında istatistikî olarak önemli farklılıklar belirlemiştir.

Pascu ve ark (1970) sığırlarda follikül askorbik asit düzeylerinin kan askorbik asit düzeylerinden yüksek olmasına karşın, aralarında sıkı bir ilişki bulduğunu ve daima yüksek seyreden follikül askorbik asit düzeylerinin ovulumun olgunlaşmasında önemli

olabileceğini ileri sürmüşler, luteal kist içerisindeki vitamin C konsantrasyonunun kan ve folliküler kist düzeylerinden daha yüksek olmasının da, vitamin C'nin progesteron sentezinde rol alabileceğini düşündürdüğünü bildirmiştir.

Gebeliğin farklı dönemlerinde 24-38 gün süreyle askorbik asitin yeterli miktarda verilmemesinde fötusta ödemler, subkutan ya da subperiostal kanama olur ve iskelet gelişimi ileri şekilde engellenir. Askorbik asit yetersizliğinde dokulardaki kanamalar kapillarlardaki interselüler madde sentezindeki bozukluğa bağlı olarak permeabilitenin bozulmasından ileri gelmektedir (Wegger ve Palludan 1994).

Endo ve ark (1993) ratlarda luteolizide askorbik asitin hızlı ve sürekli bir kaybını askorbik asitin kollagen biyosentezinde kullanılmasından ileri gelebileceğini öne sürmüşler, Luck ve Zhao (1993) da sığırarda genel olarak luteal fazın tüm dönemlerinde vitamin C düzeylerinin yüksek bulunmasına karşın, luteal fazın ortalarında (sıklusun 11-17. günleri) ulaşılan en yüksek düzeylerin, CL'un regresyonuyla birlikte düşmeye başladığını, doku büyümesi ve askorbik asit konsantrasyonları arasında çok sıkı bir ilişkinin bulunduğu belirlemiştir.

Canlılarda gebelik olmadığı hallerde endometriyumda sentezlenen PGF<sub>2α</sub>'nın salınımıyla CL'un regresyonu başlatılır (Sheldrick ve Flint 1989). CL'un regresyonu PGF<sub>2α</sub> tarafından yönlendirilen bir dizi reaksiyonlarca gerçekleştirilir. PGF<sub>2α</sub> verilmesinden hemen sonra (yaklaşık 10 dakika) CL hücre zarlarının akışkanlığının artmasıyla başlayan hareketlilik ve süperoksit anyon radikalleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunun yükselmesini fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin aktivasyonu izler. Bu aktivasyon zarların yapısını değiştiren arahidonik asit ve lizofosfolipidlerin salınımını artırır. Bu şekilde hücreler yıkımlanırken, hücre zarlarına bağlanan PGF<sub>2α</sub> düzeylerinin yükselmesinden 20 dakika kadar sonra progesteron sentezi düşürtülür. Bu sırada süperoksit anyon radikallerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ve hidroksi radikalleri gibi diğer reaktif O<sub>2</sub> moleküllerinin yıkımlanmasında artan miktarlarda askorbik asit kullanılması askorbik asit içeriğinin düşmesine yol açar (Sawada ve Carlson 1991).

Kadınlarda da ovulasyon dönemlerinde askorbik asit tüketiminin arttığı ve fertiliten sorunu olan kadınlara vitamin C verilmesinin fertiliteyi olumlu yönde etkilediği bildirilirken (Lange 1973), aynı olgunun domuzlarda da gözlentiği ve vitamin C uygulamalarının istatistik açıdan önemli olmamakla birlikte gebe kalma oranını artırdığı saptanmıştır (Greer ve ark 1987).

İnsanlarda gebelikle birlikte vitamin C ihtiyacında görülen yükselmenin büyük ölçüde fötüsteki bağ doku üretiminin artmasından kaynaklandığı ve gebeliğin ilerlemesiyle birlikte gereksinimin de yükseldiği bildirilmektedir (Lange 1973). Aynı olgu vitamin C gereksinimlerini kendi vücutlarındaki biyosentezle karşılamaya çalışan sıırlarda da gözlenmiş ve gebelikte saptanan yüksek düzeylerin gebeliğin sürdürülmesinde önem taşıdığı ileri sürülmürken (Chattopadhyay ve ark 1972), gebeliğin ilk çeyreği ile 8. ayı içerisinde 14.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bulunan plazma vitamin C düzeylerinin, gebeliğin sonlarına doğru (270. gün) 8.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'ye kadar gerilediği, doğum sırasında ve postpartum 14-16. günlere kadar devam eden düşmenin (7.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), daha sonra sona erdiği ve postpartum 25-30. günlerde normal düzeylerine ulaşığı (10.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bildirilmektedir (Cheremisinow ve ark 1981).

Domuzlarda maksimum canlı ağırlık artışı için eksojen vitamin C uygulamalarına gereksinim duyulduğu (Yen ve Pond 1981), yeni doğan domuzlarda göbek kordonu kanamalarının önlenmesi ve süitten kesilme dönemine kadar maksimum canlı ağırlığa ulaşılabilmesi için günlük 1 g vitamin C uygulamalarının yararlı olduğu bildirilmiştir (Sandholm ve ark 1979).

Aşırı stres ve yorgunluklar vitamin C kullanımını yükselterek plazma vitamin C düzeylerini düşürürler. Sıırlarda da gebeliğin sonrasında görülen plazma vitamin C ve A düzeylerindeki düşmenin doğum sonrası retensio sekundinarum görülen hayvanlarda çok daha belirgin olarak gözlenirken, doğuma yakın dönemde plazma östrojen düzeylerindeki yükselmenin sağlıklı hayvanlardan daha düşük bulunduğu, keza sağlıklı sıırlarda  $10.3 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{ml}$  ölçülen plazma askorbik asit düzeylerinin, endometritisli sıırlarda  $2.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 'ye gerilediği saptanmıştır (Kolb 1997).

## **2.4. Seruloplazmin**

### **2.4.1. Yapısı ve biyosentezi**

Oksidaz aktivitesine sahip seruloplazmin,  $\alpha$ -globulin yapısında bir enzimdir. Plazmadaki bakırın %90'ını taşıyan seruloplazminin her moleküldünde biyolojik aktivitesini sağlayan 8 Cu atomu bulunur. İsmi mavi renginden alan bu enzim, ilk kez domuz ve insan plazmasından izole edilmiş ve 151.000 molekül ağırlığıyla birçok hayvan türünde benzer yapıya sahip olduğu saptanmıştır (Bingley and Dick 1969).

Gıdalarla alınan ve ince barsakların proksimalinde emilen bakır, albumin ve amino asitlerle kompleksler oluşturarak karaciğere taşınır ve karaciğer paransim hücrelerinde seruloplazmin ve bakırı enzimlerin sentezine katılır (Amer ve ark 1975, Chang ve ark 1975). Bu sentez insan fötusunda döllenmenin 32. gününden itibaren başlamasına karşın, domuzlarda enzimin protein kısmı olan aposeruloplazminin doğumdan sonra sentezlenmeye başlaması nedeniyle seruloplazmin ancak doğumdan 10-15 saat sonra kanda görülmektedir (Chang ve ark 1975).

### **2.4.2. Metabolizması ve fonksiyonları**

Serum bakırının önemli bir bölümünün seruloplazmin yapısında bulunması özellikle hayvancılıkta önemli bir sorun olan hipokuprozis'in tanısında serum seruloplazmin konsantrasyonlarından yararlanabileceğini akla getirmiştir. Bu konuda yapılan birçok çalışmada Cu ile seruloplazmin konsantrasyonları arasında yüksek oranda pozitif korrelasyon sağlanmış, Cu ve seruloplazmin konsantrasyonlarının belirlenmesinde birbirlerinin konsantrasyonlarından geçişler yapılmıştır (Agiannidis ve ark 1976, Serpek 1983, Blakley ve Hamilton 1985, Chacornac ve ark 1986). Blakley ve Hamilton (1985) sığır ve koyun serum seruloplazmin düzeyleri ile Cu düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemiştir ve özellikle koyunlarda çok daha yüksek bir korrelasyon (+0.92) tesbit etmişlerdir. Genel olarak plazma bakırının büyük bir kısmı, karaciğerde sentezlenen ve kana bırakılan seruloplazmine sıkıca bağlıdır ve insanlarda plazmada bakırın %90-98'i seruloplazmin yapısında yer alırken, koyunlarda bu oran % 80 civarındadır (Frieden 1978).

Seruloplazmin bakırın dokulara transportu dışında depo organlardan demirin mobilize edilip transferrine bağlanması ve  $\text{Fe}^{++}$ 'nin  $\text{Fe}^{+++}$ 'e oksidasyonunu stimüle ederken, fosfolipid lipozomlarının ferritine bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Samokyszyn ve ark 1989), serbest radikalleri ve süperoksit iyonları yakalayan bir serum antioksidanı olarak görev yapar (Goldstein ve ark 1982).

Türler arasında seruloplazmin konsantrasyonu açısından büyük farklılıklar görülür ve domuzlarda gözlenen en yüksek seruloplazmin konsantrasyonları daha sonra sırasıyla insan, sıçan, koyun, sığır, köpek ve kanatlılarda görülür. Evans ve Wiederanders (1967) koyunlarda ortalama seruloplazmin düzeylerinin 26.5 mg/dl olduğunu bildirirlerken, Serpek (1983) Dağlıç, İmroz, Kivircik ve Merinos ırkı koyunların serum seruloplazmin konsantrasyonlarını sırasıyla 11.52, 23.45, 21.64, 19.22 mg/dl olarak belirlemiştir.

İnsan hekimliğinde seruloplazmin düzeylerinin hastalıkların tanısında klinik kullanımı çok daha yaygınmasına karşın, son yillarda kadar veteriner hekimlikte ancak bakır eksikliğinin belirlenmesiyle sınırlı kalmıştır. İnsanlarda romatoid artritis, karaciğer hastalıkları, kronik enfeksiyonlar, Wilson hastalığı, Cu eksikliği ve Hodgkin's Hastalığı gibi bozuklukların tanısında seruloplazmin konsantrasyonları belirlenmektedir. Cunningham ve ark (1995) diabetli hastalarda da plazma seruloplazmin düzeylerinde önemli derecede artış olduğunu gözlemişlerdir. Akut faz proteinlerinden olan seruloplazmin, akut enfeksiyonlarda yaklaşık % 50 oranında artar ve diğer akut faz proteinlerle birlikte akut enfeksiyonların habercisi olarak kullanılabilir. Akut faz proteinleri plazma düzeylerinin belirlenmesiyle hastalığın sağıtımının seyri hakkında bilgi edinilebileceği gibi, seruloplazminin de içerisinde bulunduğu bu proteinler yardımıyla, mezbahalarda enfeksiyonlu karkasların ortaya çıkarılabilmesi de sözkonusudur (Koshner 1982).

Osaki ve ark (1964)'nın seruloplazminin askorbat oksidaz aktivitesine sahip olduğunu belirlemesiyle birlikte askorbik asitle seruloplazmin arasındaki ilişkilerin incelendiği araştırmalar hız kazanmıştır ve Finley ve Cerklewski (1983) insanlarda diyeten askorbik asit ilavesiyle serum seruloplazmin aktivitesinin önemli derecede düşürüldüğünü,

Johnson ve Murphy (1988) de askorbik asitle birlikte yüksek düzeyde Fe'in ratlarda şiddetli anemiye yol açtığını ve plazma seruloplazmin düzeylerini %44 oranında düşürdüğünü bildirmektedirler. Askorbik asitin insanlarda seruloplazminin oksidaz aktivitesini düşürdüğünün ancak intestinal Cu吸收yonunu etkilemediğinin (Jacop ve ark 1987) bildirilmesine karşın, Pekiner ve Nebioğlu (1994) askorbik asitin kobaylarda Cu metabolizması üzerine antagonistik etkiye sahip olduğunu bildirmektedirler. Powers ve ark (1995) prematüre bebeklerde yüksek düzeyde belirlenen vitamin C'nin seruloplazminin ferroksidaz aktivitesini inhibe ettiğini ve inhibisyon derecesinin askorbik asit : seruloplazmin oranına bağlı olduğunu belirlemiştir. Aynı şekilde Gutteridge (1991) de askorbat : seruloplazmin oranının 200'den fazla olduğu durumlarda ferroksidazın antioksidan aktivitesinin ortadan kaybolduğunu belirlemiştir, askorbat ve demir tuzlarının karışımıyla membran lipidlerinin hasarının stimüle edildiğini, askorbat : seruloplazmin oranının düşük olduğu durumlarda bu hasarın seruloplazmin tarafından inhibe edildiğini ve oral yolla alınan vitamin C'den kaynaklanan artışların seruloplazmin aktivitesini inhibe etmediğini gözlemiştir.

#### **2.4.3. Seruloplazminin döl verimi üzerine etkileri**

Seruloplazmin'in bir akut faz proteini oluşu, plazma düzeylerinin bazı hastalıkların prognozunda kullanılabileceğini ve reproduksiyonda da akut enfeksiyonlar sonucu meydana gelebilen abort ve embriyonik ölümlerde değerlendirilebilecek bir kriter olabileceğini akla getirmektedir.

Seruloplazminin döl verimi üzerine etkisinin araştırılması askorbik asitle olan ilişkisinin dışına pek çıkmamıştır ve gebeliğin çeşitli dönemlerinde seruloplazmin düzeylerinin dalgalanmalar gösterdiği ortaya konulmuştur. Butler (1963) koyunlarda kan ve plazma bakır düzeyleri ile seruloplazmin düzeylerinin gebeliğin başlaması ile birlikte düşüğünü ve özellikle gebeliğin son ayında seruloplazminin minimuma indiğini, doğumdan sonra ise tekrar yükselmeye başladığını belirlerken, Başpinar (1989) koyunlarda gebelik ve postpartum ilk ayda seruloplazmin düzeylerinin yüksek seyrettiğini bildirmektedir. Aynı

şekilde Burrows ve Pekala (1971) da insanlarda gebeliğin başlamasıyla seruloplazmin düzeylerinin yükseldiğini, gebeliğin 22. haftasında pik yapan düzeylerin daha sonra hafifçe düşme göstererek doğumaya yakın dönemde tekrar yükseldiğini bildirmektedir.

Basu (1986) oral kontraseptif uygulamalarında seruloplazmin düzeylerinin düştüğünü bildirirken, Sissan ve ark (1995), östrojenlerin ratlarda Cu ve seruloplazmin düzeylerini yükselttiğini, progestin uygulamalarının ise önemli derecede ( $p < 0.05$ ) düşürdüğünü belirlemiştir.

### **3. MATERİYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

Çalışma, Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen 2-7 yaş arası Merinos (Alman Siyah Baş X Merinos ASBXM; Hampshire X Merinos HXM) ırkı damızlık koyunlarda gerçekleştirildi.

Araştırmaya başlamadan önce sağlıklı 100 koyundan birer hafta ara ile iki kez kan örnekleri alınarak plazmaları ayrıldı ve her iki örnekte vitamin C analizleri yapıldı. Vitamin C düzeylerinin ortalamaları alınarak,  $x \pm 2Sx$ 'in altındaki ve üstündeki koyunlardan vitamin C düzeyleri düşük ve yüksek olan 30'ar koyun seçilerek iki grup oluşturuldu. Daha sonra bu gruplar ağırlıkları ve ırkları dengeli olacak şekilde aşağıda verilen, herbiri 15'er koyun kapsayan 4 alt gruba ayrıldı. Hayvan materyalinin yetersiz oluşu yaşı açısından gruplandırma yapılmasını engelledi.

1. Grup: Plazma vitamin C düzeyi düşük + intramuskuler vitamin C enjeksiyonu
2. Grup: Plazma vitamin C düzeyi düşük
3. Grup: Plazma vitamin C düzeyi yüksek + intramuskuler vitamin C enjeksiyonu
4. Grup: Plazma vitamin C düzeyi yüksek

Yukarıdaki şekilde oluşturulan gruplarda hormon düzeylerinin etkilenmemesi açısından seksüel siklus senkronizasyonu yapılmadı ve tedavi gruplarına (grup 1 ve 3) kan örneği alındığı sürece intramuskuler olarak haftada iki kez 500 mg dozda vitamin C enjeksiyonları (Injacom-C - Roche) yapıldı. Hergün üç adet arama koçu ile koyunların östrus tarihleri belirlendi ve koyunlar ikinci östruslarında bire-bir tohumlama yöntemi ile tohumlandılar. Tohumlamaların ardından bir siklus boyunca sürüye tekrar arama koçu katılarak gebe kalmayan hayvanlar belirlendi ve tekrar tohumlamaları yapıldı. Koyunlardan deneme başlangıcından gebelikleri belirleninceye kadar haftada 3 kez, daha sonra embriyonal döneminin sonuna kadar (yaklaşık 40 gün) haftada iki kez kan örnekleri alındı, plazmaları kazanıldı ve kazanılan plazmalar 2'ser pool halinde plazma saklama tüplerine alındı. Plazma

pool derin dondurucuda (- 20 °C' de) saklanarak plazma östradiol 17- $\beta$  ve plazma progesteron analizlerinde kullanıldı.

Plazma vitamin C analizleri kolorimetrik (Haag 1985), plazma seruloplazmin analizleri PPD (p-fenilendiamin diklorid)'in kullanıldığı spektrofotometrik (Colombo ve Richerich, 1964) metotlarla, plazma östradiol 17- $\beta$  ve plazma progesteron analizleri ise enzim immunoassay (EIA) yöntemi ile yürütüldü.

Denemeye alınan koyunlarda embriyonal dönem boyunca 2 kez rekto-abdominal olarak, deneme sonlandırıldıktan sonra (gебeliğin yaklaşık 2-2.5 aylık döneminde) bir kez trans-abdominal olarak ultrasonla (B-Mode Linear Array, 5-7.5 MHz frekanslı olan Real Time Ultrason. 480 Pie Med., Maastrich. Netherland) gebelik muayeneleri yapıldı ve sonuçlar plazma progesteron analiziyle yapılan gebelik tanılarını kontrol amacıyla kullanıldı.

Ayrıca deneme sırasında koyunların sikluslarının düzeni, siklusun hormonal seyri, fötus sayısı, canlı ağırlıkları, hastalanma oranları ve kuzu doğum ağırlıkları gibi kriterler saptandı, incelenen parametreler arası farklılıklar istatistikي yöntemlerle Windows 95 paket programına uyumlu SPSS 6.0 istatistik programı uygulanarak belirlendi.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Plazma vitamin C analizi**

#### **3.2.1.1. İlke**

Askorbik asit, hafif okside edici ajanlarla dehidroaskorbik asite okside olur. Dehidroaskorbik asit hafif asit solusyonlarda yavaş bir şekilde diketogulonik asite dönüşür. Dehidroaskorbik asit ve diketogulonik asit, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)'le reaksiyona sokulduğunda, 2 ve 3 nolu C atomlarına DNPH'in bağlanmasıyla, DNPH'in bir türevi olan bis-2,4-dinitrofenilhidrazon meydana gelir. Dehidroaskorbik asit ya da diketogulonik asit'in bis-2,4-dinitrofenilhidrazon türevi de 12 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamele edildiğinde, kırmızımsı-

kahverengi renkli, oldukça stabil ve 500 -550 nm'de absorbsiyon maksimumuna sahip moleküller forma dönüşür (Haag 1985).

### **3.2.1.2. Ayıraçlar**

**Triklorasetik asit (TCA) Çözeltisi, % 6 :** 100 ml'lik balon pojede 6 g TCA (Merck 810) bir miktar distile su ile çözündürüldü ve karışım distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

#### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çözeltileri :**

a) 4.5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 75 ml distile su alınan 100 ml'lik bir balon joje, çeşme suyu ile soğutularak yoğun H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck 1830) ile 100 ml'ye tamamlandı.

b) 12 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 33 ml distile su alınan 100 ml'lik bir balon joje, çeşme suyu ile soğutularak yoğun H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck 1830) ile 100 ml'ye tamamlandı.

**Tioüre Çözeltisi, % 5:** 100 ml'lik balon pojeye 5 g Tioüre (Merck 7978) alındı ve bir miktar distile su ile çözündürüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**CuSO<sub>4</sub> Çözeltisi, % 0.6:** 100 ml'lik balon pojeye alınan 0.94 g CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O (Merck, 2787) bir miktar distile su ile çözündürüldü ve çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**Temel Çözelti :** 2 g 2,4-Dinitrofenilhidrazin, DNPH (Merck 803080) 100 ml 4.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde çözeltildi, 4 °C'de 1 gece bekletildikten sonra filtre edildi ve filtre çözelti, temel çözelti olarak kullanıldı

**Renk reaktifi :** Renk reaktifi olarak temel Çözelti, % 5 Tiotire ve % 0.6 CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O çözeltilerinin karışımı kullanıldı, (100 / 5 / 5, v / v / v).

### **3.2.1.3. Teknik**

Örnek sayısında hazırlanan santrifij tüplerine alınan 1'er ml'lik plazma örneklerinin üzerine 2'ser ml % 6'luk TCA çözeltisi ilave edildi. Vortex mikserde karıştırılan tüpler 4

°C'de 3000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 1'er ml alınarak test tüplerine aktarıldılar. Standart tüplerine % 6'lık TCA çözeltisi içerisinde hazırlanan % 10 µg/ml'lik askorbik asit çözeltisinden 1 ml, kör tüپüne ise % 6'lık TCA çözeltisinden 1 ml alındı.

Test, standart ve kör tüplerinin üzerlerine 0.4'er ml renk reaktifi ilave edildi ve özenle ağızları kapatılan tüpler 38 °C'de 4 saat su banyosunda inkubasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra tüplere 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den 2'şer ml ilave edildi. Tüm tüpler vortex mikserde karıştırıldı ve test ve standartların absorbansları 520 nm'de köre karşı okundu.

### 3.2.1.4. Hesabı

$$\mu\text{g/ml askorbik asit} = \text{Testin absorbansı} / \text{Standardın absorbansı X 3}$$

## 3.2.2 Plazma seruloplazmin analizi

### 3.2.2.1. İlke

Optimum pH ve ısı koşullarında asetat tamponunda hazırlanan p-fenilen diamin diklorid (PPD) plazma örnekleri ile inkube edildiğinde oluşan renkli ürüniin absonbansı spektrofotometrede 546 nm'de okunur ve okunan absorbanstan seruloplazmin konsantrasyonları Colombo ve Richerich (1964)'in formülüne göre hesaplanır.

### 3.2.2.2. Ayıraçlar

**Substrat Çözeltisi :** 144 mg p-fenilen diamin diklorid, PPD (Merck 7247) 100 ml asetat tamponunda çözeltildi (7.95 mM), çözeltinin pH'sı 0.1 N sodyum hidroksit ile 5.6'ya ayarlandı. Işığa karşı duyarlı olan çözelti her seride taze olarak hazırlandı ve kullanıldı.

**Asetat Tamponu , 0.43 M, pH 5.6 :** 1.34 ml glasiyel asetik asit (Merck 2789) ve 26.49 g sodyum asetat (Merck 6267) 1 litrelilik balon jojeye alınarak bir miktar distile suda çözeltildi, balon içeriği distile su ile litreye tamamlandı.

**Sodyum Azid Çözeltisi :** 3 g Sodyum azid (Merck 6688) 100 ml'lik balon jojeye alındı, bir miktar distile su ile çözeltildi, balon içeriği distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

### **3.2.2.3. Teknik**

Analizler 10 örneklik seriler halinde yapıldı. Alınan plazma örneklerinden hemoliz ve bulanıklık göstermeyenler seçilerek seruloplazmin analizlerinde kullanıldı.

Bir tüp sporuna 10 adet test tüpü ve karşısına aynı sayıda kör olarak kullanmak amacıyla tüpler yerleştirildi. Tüm test ve kör tüplerine taze olarak hazırlanmış substrat çözeltisinden 5'er ml konuldu. Kör tüplerine 1'er ml sodyum azid çözeltisi ilave edilerek tüpler iyice karıştırıldı.

Her plazma örneğinden kendisine ait test ve kör tüplerine 100'er  $\mu$ l eklendi ve iyice karıştırılan tüpler kapakları kapatılarak 37 °C'deki su banyosunda 15 dakika inkubasyona bırakıldılar.

İnkubasyon sonunda test tüplerine sıra ile 1'er ml sodyum azid çözeltisi eklendi ve tüpler iyice karıştırıldı. Test ve kör tüplerindeki karışımların absorbansları sıra ile spektrofotometrede distile suya karşı 546 nm'de ölçüldü.

### **3.2.2.4. Hesabı**

$$\text{Seruloplazmin (mg/dl)} = 237 (\text{Testin Absorbansı} - \text{Körün Absorbansı})$$

### **3.2.3. Plazma progesteron hormonu analizi**

Koyun plazma progesteron hormonu analizi laboratuvarımızda geliştirilen EIA yöntemiyle gerçekleştirildi.

#### **3.2.3.1. İlke**

Monoklonal antiprogesteron rat IgG'lerle progesteronun antijen antikor etkileşiminden köken almaktadır.

### **3.3.3.2. Ayıraçlar**

**Progesteron Antiserumu :** Monoklonal antiprogesteron (Rat IgG, Sigma P-1922, Clone 2H4) 1:10 oranında assay tamponunda [7.12 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>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] sulandırıldı. Daha sonra bu stok antiserumdan 5'er ml'lik poller halinde 1:1000'lik stoklar hazırlanarak kullanıma kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandılar.

Çalışma sırasında buzdolabında çözündürülen stok antiserumun 1:60.000'lik dilusyonları assaylerde kullanıldı.

**Tracer Çözeltisi :** 0.5 mg'luk Progesteron-Peroxidase labelled (Sigma P-3659, lot.44H8250) 2 ml assay tamponunda çözülmerek 1:4.000 'lik stok çözelti I elde edildi. Assay tamponunda stok çözelti I'den hazırlanan 1:100.000'lik stok çözelti II poolleri assaylerde kullanılmak amacıyla -20 °C'de derin dondurucuda saklandılar.

Assayler sırasında stok çözelti II buzdolabında çözeltildi ve assay tamponunda seyreltilerek 1:3.200.000 oranında kullanıldı.

**Keçi IgG-anti rat IgG :** Keçi IgG-anti rat IgG'si Dr. Bülent Güven (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu - Lalahan)'den temin edilmiştir.

### **3.2.3.3. Enzimimmunoassay prosedürü**

#### **3.2.3.3.A. EIA plaklarının ilk kaplanması**

Keçi IgG-anti rat IgG'si doymuş amonyum sülfat çözeltisi içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda çözeltilerek denatüre edildi. İlk kaplamada mikrotitre plaklarının (Greiner, No.655180) her yuvasına 100 µl kaplama tamponu (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, Merck 6329, pH 9.6) içinde çözeltilmiş 1 µg keçi IgG-anti rat IgG 'si verildi ve plaklar ya 2 saat oda ısısında ya da 1 gece 0 °C'de çalkalanarak inkübe edildiler ve inkübasyon sonunda plakların içerikleri döküldü.

### **3.2.3.3.B. EIA plaklarının ikinci kaplanması**

EIA plaklarının yuvalarının duvarlarında kaplanmamış bölgelerin doyurulması ve hormona spesifik antikorların spesifik olmayan bağlanmalarının önlenmesi amacıyla % 0.1 oranında sığır serum albumini (BSA) içeren assay tamponundan plağın her yuvasına 300 µl verildi ve 40 dakika +4 °C'de inkubasyondan sonra içerikleri boşaltılan plaklar kullanıma kadar (6 ay kadar) -20 °C'de derin dondurucuda saklandılar.

Plakların nonspesifik bağlanmalarının (NSB) optik dansiteleri 0.076 - 0.098 arasında bulundu.

### **3.2.3.3.C. EIA plaklarının assay öncesi yıklanması**

Assaya başlamadan önce EIA plakları yıkama cihazı (Bioteck EL 403) ile 1 kez 300 µl % 0.05'lik Tween-80 ile yıkandı.

### **3.2.3.4. Assay protokolü**

Progesteron standarı (Sigma P-0130) 1 mg/ml konsantrasyonda metanol içerisinde stok standart olarak hazırlandı. Bu stok standart 1:100'lük iki seri dilusyon ile assay tamponu içerisinde 100 ng/ml konsantrasyona düşürüldü. Hazırlanan stok standartlar kullanıma kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandılar.

Çalışma sırasında buzdolabında çözünmesi sağlanan 100 ng/ml'lik stok standart 1:2'lik seri dilusyonlarla 0.196-50 ng/ml arasında seri standartlara seyreltildi.

10'ar µl standart ve örnekler bir diluatör dispensor (Hamilton Microlab 1000) yardımıyla alınarak plakların yuvalarına 100 µl assay tamponunda çözeltilmiş antiserum çözeltisi (1:60.000) ile dilue edilerek verildi.

Standart ve örneklerin yuvalara verilmesinden hemen sonra plağın bütün yuvalarına assay tamponunda çözeltilmiş tracer çözeltisinden ( 1 : 3.200.000) 100 µl ilave edildi ve plaklar 24 saat +4 °C'de inkubasyona bırakıldılar.

### **3.2.3.5. Substrat reaksiyonu**

Plaklar 5 kez 300  $\mu$ l'lik %0.05 Tween-80 ile yıkandıktan sonra, her yuvaya 150  $\mu$ l substrat çözeltisi ilave edildi [Substrat Çözeltisi: Substrat A+B, 1:1 (Substrat A, 1 g  $l^{-1}$ , hydrogen peroxydurea, 18 g  $l^{-1}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10.3 g  $l^{-1}$  citric acid monohydrate, 0.1 ml  $l^{-1}$  kathon, pH 5.0; Substrat B, 500 mg  $l^{-1}$  Tetramethylbenzidine, 40 ml  $l^{-1}$  dimethylsülfoxide, 10.3 g  $l^{-1}$  citric acid monohydrate, pH 2.4)]. Plaklar çalkalamalı su banyosunda +26-28 °C'de 40 dakika inkübe edildiler ve 50  $\mu$ l 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve plakların ekstinksyonları 450 nm'de EIA mikrotitrasyon plakları fotometresi (Biotek EL 311) ile okundu .Deltasoft II programında sonuçlar değerlendirildi.

### **3.2.4. Plazma östradiol 17 $\beta$ hormonu analizi**

Plazma östradiol 17 $\beta$  hormonu analizi laboratuvarımızda geliştirilen EIA yöntemiyle gerçekleştirildi.

#### **3.2.4.1 İlke**

Monoklonal anti östradiol tavşan IgG'lerle östradiolin antijen-antikor etkileşiminden köken almaktadır.

#### **3.2.4.2.Ayıraçlar**

**Östradiol 6-CMO HRP Tracer Çözeltisi :** Tracer çözeltisi Dr. H.H.D. Meyer (Institüt für Physiologie Technische Universität München, Fereising, Germany)'den temin edilmiştir. Assaylerde kullanılmak üzere 10 g/L BSA içeren doymuş amonyum sülfat içerisinde 1: 1.000 oranında diltie edilmiş stok tracer çözeltileri hazırlandı ve assayda 100 kat assay tamponu (7.12 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O, Merck-6580; 8.5 g/L NaCl, Merck- 6404; HCl yardımıyla pH 7.2'ye ayarlanır, üzerine 1 g/L BSA, Serva-11930 ilave edilir) ile sulandırılarak kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.

**Östradiol antiserumu :** Antiserum Dr. H.H.D. Meyer (Institüt für Physiologie Technische Universität München, Fereising, Germany)'den temin edilmiştir. 10 g/L BSA içeren doymuş amonyum sülfat içerisinde 1: 2.000 oranında stok antiserum çözeltisi olarak

hazırlandı ve 4 °C'de saklanan stok, assay'de assay tamponu ile 100 kat sulandırılarak kullanıldı.

**Keçi IgG-anti tavşan IgG :** Keçi IgG-anti tavşan IgG'si Dr. Klobosa (Institüt für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee)'dan temin edilmiştir.

### **3.2.4.3. Enzimimmunoassay prosedürü**

#### **3.2.4.3.A. EIA plaklarının ilk kaplanması**

İlk kaplamada mikrotitre plaklarının (Greiner, No. 655180) her yuvasına 100 µl kaplama tamponunda (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) çözeltilmiş 1 µg keçi-IgG anti-tavşan IgG'si verildi ve plaklar ya 2 saat oda ısısında ya da 1 gece 0 °C'de çalkalanarak inkube edildiler ve inkubasyon sonunda plakların içerikleri döküldü.

#### **3.2.4.3.B. EIA plaklarının ikinci kaplanması**

EIA plaklarının yuvalarının duvarlarında kaplanmamış bölgelerin doyurulması ve hormona spesifik antikorların spesifik olmayan bağlanmalarının önlenmesi amacıyla % 0.1 oranında sığır serum albumini (BSA) içeren 350 µl assay tamponu her yuvaya verildi ve plakların nonspesifik bağlanmalarının (NSB) optik dansiteleri 0.068 - 0.098 arasında bulundu. Kaplanmış plakların içeriği döküldü ve 20 °C'de derin dondurucuda saklanan plaklar 6 ay bozulmadan kullanılabilirliğe sahipti.

#### **3.2.4.3.C. EIA plaklarının assay öncesi yıklanması**

Assaya başlamadan önce plaklar yıkama cihazı (Bioteck EL 403) ile 2 kez 375 µl % 0.05 lik Tween-80 ile yıkandı.

### **3.2.4.4. Assay protokolü**

Östradiol 17 $\beta$  standarı (Merck 8964) 1 mg/ml konsantrasyonda etanol içerisinde stok standart olarak hazırlandı. Bu stok standarttan assay tamponunda 1:100'lük seri

dilüsyonlarla 10 µg/ml, 100 ng/ml ve 1 ng/ml'lik stok standartlar hazırlandı. Hazırlanan stok standartlar kullanıma kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Çalışma sırasında buzdolabında çözünmesi sağlanan 1 ng/ml'lik stok standart yardımıyla önce 1:10 daha sonra 1:2 lik seri dilüsyonlarla 0.39 - 100 pg/ml arasında seri standartlar hazırlandı.

Standart ve örneklerden 50'ser µl bir diluatör dispensor (Hamilton Microlab 1000) yardımıyla plakların yuvalarına 100 µl assay tamponundaki antiserum çözeltisi ile dilüe edilerek verildi.

Standart ve örneklerin yuvalara verilmesinden hemen sonra plaqın bütün yuvalarına assay tamponunda çözeltilmiş tracer çözeltisinden (1:100.000) 50 µl ilave edildi ve plaklar 24 saat +4 °C'de inkubasyona bırakıldılar.

### **3.2.4.5. Substrat reaksiyonu**

Plaklar 5 kez 300 µl'lik %0.05 Tween-80 ile yıkandı ve her yuvaya 150 µl substrat çözeltisi ilave edildi (Substrat Çözeltisi: Substrat A+B, 1:1 (Substrat A, 1 g l<sup>-1</sup>, hydrogen peroxydurea, 18 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10.3 g l<sup>-1</sup> citric acid monohydrate, 0.1 ml l<sup>-1</sup> kathon, pH 5.0; Substrat B, 500 mg l<sup>-1</sup> Tetramethylbenzidine, 40 ml l<sup>-1</sup> dimethylstilfoxide, 10.3 g l<sup>-1</sup> citric acid monohydrate, pH 2.4)). Plaklar çalkalamalı su banyosunda 40 dakika +26-28 °C'de inkübe edildiler ve 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve plakların ekstinksyonları 450 nm'de EIA mikrotitrasyon plakları fotometresi (Biotek EL 311) ile okundu .Deltasoft II programında sonuçlar değerlendirildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Progesteron Hormonu EIA'nın Bulguları**

Progesterone peroksidase labelled (tracer) ve monoklonal anti-progesteron antiserum'unun optimal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla 2 dimensiyonlu titre tayini yapıldı. Titre tayinde 1: 60.000 - 1: 320.000 dilusyonlu antiserum ve 1: 800.000 - 1: 6.400.000 dilusyonlu tracer konsantrasyonları kullanıldı. Yaklaşık 1000 optik dansite veren ( $OD_{450}$ ) optimal antiserum ve tracer konsantrasyonları sırasıyla 1: 60.000 ve 1: 3.200.000 dilusyon olarak bulundu.

#### **4.1.1. Assayın doğruluğu**

Assay Kinetiğine İnkubasyon İsisinin Etkisi: Optimal inkubasyon süresi ve ısisinin saptanması amacıyla mikrotitre plakları 4 ve 24 h 22 °C'de ya da 24-48 h 4 °C'de inkubasyona bırakıldılar. En iyi relativ bağlanma 24 h 4 °C'deki inkubasyonda elde edildi.

#### **4.1.2. Assayın hassasiyeti**

Assayın hassasiyeti için en uygun örnek miktarının 10  $\mu$ l/yuva olduğu gözlendi. Ayrıca assayın hassasiyeti progesteron içeriği belirlenmiş bir plazma örneği üzerine farklı düzeylerde progesteron ilavesi ve tekrar progesteron analizlerinde bulunan düzeylerin değerlendirilmesi ile incelendi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1. Plazmaya farklı konsantrasyonlarda ilave edilen progesteron'un tekrar bulunma oranları**

Plazma Progesteron ng/ml	İlage edilen Progesteron ng/ml	Bulunması gereken Progesteron, ng/ml	Bulunan Progesteron, ng/ml	Tekrar bulunma, %	Varyasyon, %
4.21	5	9.21	8.22	89.25	8.26
4.21	10	14.21	13.07	91.98	9.27
4.21	20	24.21	23.67	97.78	7.67

Assayın en düşük ölçüm sınırı 0.125 ng/ml progesteron, %50 relativ bağlanma 1.25 ng/ml progesteron olarak bulundu.

#### **4.1.3. Inter ve intraassay varyasyon**

Farklı düzeylerde progesteron içeren plazmalar kullanılarak inter ve intraassay varyasyonlar hesaplandı.  $1.472 \pm 0.171$  ( $n= 14$ ) ve  $2.601 \pm 0.233$  ( $n= 14$ ) ng/ml progesteron içeren plazma örneklerinde hesaplanan intraassay varyasyon sırasıyla, % 11.58 ve % 8.97 olarak bulunurken, aynı plazma örneklerinin interassay varyasyonları sırasıyla, % 6.04 ve % 7.74 olarak belirlendi.

#### **4.2. Östradiol 17 $\beta$ Hormonu EIA'nın Bulguları**

Östradiol-6-CMO-HRP (tracer) ve anti-östradiol antiserum'unun optimal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla 2 dimensiyonlu titre tayini yapıldı. Titre tayinde 1: 80.000 - 1: 300.000 antiserum ve 1: 40.000 - 1: 240.000 tracer dilusyonları kullanıldı. Yaklaşık 1000 optik dansite veren (OD<sub>450</sub>) optimal tracer ve antiserum dilusyonları sırasıyla 1: 200.000 ve 1: 200.000 olarak bulundu.

##### **4.2.1. Assayın doğruluğu**

Assay Kinetiğine İnkubasyon İsisinin Etkisi: Optimal inkubasyon süresi ve ısisinin belirlenmesi amacıyla mikrotitre plakları 24-48 h +4 °C'de ve 22 °C'de inkube edildiler ve en uygun olarak +4 °C'de 24 saatlik inkubasyon kullanıldı.

##### **4.2.2. Assayın hassasiyeti**

Assayın hassasiyeti farklı düzeyde östradiol 17 $\beta$  içeren 3 ayrı plazma örneğine 3.906 ve 15.630 pg/ml konsantrasyonda östradiol ilave edilerek ( $n= 9$ ) incelenmiş ve sonuçlar Tablo. 4.2'de gösterilmiştir.

50  $\mu$ l/yuva hacimde standart kullanılmasında assayın en düşük ölçüm sınırı 2 pg/ml ve % 50 relatif bağlanması 20 pg/ml olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** Plazma örneklerine ilave edilen farklı konsantrasyonlarda östradiol  $17\beta$ 'nın tekrar bulunma oranları.

Plazma	X	X+ 3.906					X+ 15.630				
		Bulunm. gerekken	Bulunan %	Bulunm. %	% Varyasy	Bulunm. gerekken	Bulunan %	Bulunm. %	% Varyasy		
Kuzu Pl	0	3.906	3.145	80.52	12.51	15.630	14.060	89.96	6.70		
K1	0.153	4.059	4.854	119.59	11.07	15.783	16.959	107.45	5.12		
K2	6.696	10.602	11.932	112.55	9.54	22.326	23.986	107.44	7.54		

#### 4.2.3. İnter ve intraassay varyasyon

Farklı düzeylerde östradiol içeren plazma örnekleri kullanılarak interassay ve intraassay varyasyonlar saptandı.  $8.13 \pm 1.04$  (n= 10) ve  $84.49 \pm 5.95$  (n=10) pg/ml östradiol içeren plazma örneklerinde hesaplanan interassay varyasyon sırasıyla % 12.82 ve % 7.21 bulunurken,  $13.84 \pm 1.19$  pg/ml (n= 14) östradiol içeren plazma örneğinin kullanıldığı assayın intraassay varyasyonu % 8.63 olarak belirlendi.

#### 4.3. Araştırma Bulguları

Çalışmaya başlamadan önce, Merinos ırkı 100 koyunun birer hafta arayla iki kez plazma vitamin C düzeyleri belirlendi. Ortalama vitamin C düzeyleri  $6.44 \pm 0.13$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlendi. Paired t testi uygulanarak iki plazma vitamin C konsantrasyonları arasında farklılık olmadığı ( $p = 0.21$ ) saptandıktan sonra  $X \pm 2S_x$ 'in altındaki ve üstündeki 30'ar koyun vitamin C düzeyi yüksek ve düşük olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Canlı ağırlık ve ırkları dikkate alınarak yüksek ve düşük plazma vitamin C düzeylerine sahip 60 adet Merinos ırkı koyundan tedavi ve kontrol grupları oluşturulduktan sonra, hergün üç arama koçu kullanılarak östrus tarihleri belirlendi ve ikinci östruslarında 'bire-bir tohumlama' yöntemi ile tohumlanan koyunlara, tohumlamaların ardından bir siklus süresince tekrar arama koçu katıldı ve gebe kalmayan hayvanlar belirlenerek ikinci tohumlamaları yapıldı. Koyunlardan plazma progesteron düzeyleriyle gebelikleri belirleninceye kadar haftada üç kez, embriyonal dönem sonuna kadar haftada iki kez kan örnekleri alındı. Koyunların ilk östrusları

belirleninceye kadar alınan kan örnekleri 1. dönem (siklus öncesi), ilk östrustan tohumlama gününe (ikinci östrus) kadar alınan kan örnekleri 2. dönem (seksüel siklus) ve gebelik embriyonal dönemi süresince alınan kan örnekleri 3. dönem olarak değerlendirmeye alındı.

Denemeye alınan koyunlarda doğum sonuçları alınarak da tek ve ikiz doğum, embriyonik ölüm, abort ve gebe kalmayan koyunlar olmak üzere sınıflandırılmışlardır. Denemeye alınan 2. grup koyunlardan biri doğuma yaklaşık 15 gün kala ölmüş, bu nedenle doğumla ilgili bilgileri verilememiştir. Ayrıca 4. grup koyunlardan birinin 2 siklus süresince hergün yapılan arama koçu ile taramalarda cevap vermediği belirlenmiş ve fertilité sorunu olduğu saptanan bu koyun çalışmadan çıkarılmıştır. Tohumlamanın ardından koyunların plazma progesteron düzeylerini belirleyerek gebelik tanılarının yapılmasıının yanında embriyonal dönemde boyunca 2 kez rekto-abdominal ve gebeliğin yaklaşık 2-2.5 aylık döneminde bir kez trans-abdominal olmak üzere toplam 3 kez ultrasonografik gebelik muayeneleri (USG) yapılarak sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Buna göre bütün grupların tohumlamanın 16-17. günü plazma progesteron düzeyleri ile USG ve doğum sonuçları ve kuzu doğum canlı ağırlıkları Tablo 4.4, 4.5, 4.6 ve 11.7'de verilmiş, progesteron EIA ile gebeliğin doğru belirlenme oranının % 89.29 olduğu belirlenmiştir. Bu tablolar incelendiğinde görülebileceği gibi toplam 8 ikiz doğumun 7'sinin yüksek plazma vitamin C düzeyine sahip grplarda (grup 3 ve 4), kalan bir ikizliğin ise 2. grupta ikiz ölü doğum şeklinde olduğu gözlenmiştir.

Tüm grupların seksüel siklus boyunca, tohumlamadan 16-17 gün sonra ve folliküler dönemde plazma progesteron düzeyleri belirlenerek Tablo 4.3'de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Grupların seksüel siklus boyunca, tohumlamanın 16-17. günü ve folliküler dönemde gözlenen en yüksek plazma progesteron düzeyleri,  $x \pm Sx$ .

Plazma Progesteron (ng/ml)	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
Siklus boyunca	$2.15 \pm 0.67$	$2.35 \pm 0.78$	$2.63 \pm 0.56$	$2.35 \pm 0.98$
Tohumlamanın 16-17.günü	$2.03 \pm 0.54$	$2.30 \pm 0.65$	$2.59 \pm 0.58$	$2.43 \pm 0.47$
Folliküler dönem	$0.054 \pm 0.040$	$0.108 \pm 0.052$	$0.151 \pm 0.044$	$0.144 \pm 0.058$

Anne yaşı ile reproduksiyon arasındaki ilişkiler de incelenerek 6 embriyonik ölümün tamamının 2-3 yaşlı koyunlarda meydana geldiği, toplam 8 ikiz doğumdan 6'sının ise 4 yaş ve üzerindeki koyunlarda olduğu belirlenmiştir. Yavru alınamayan koyunlarda yaş ortalaması 2.8 iken, tek doğumlarda 4.08, ikiz doğumlarda ise 5.0 olarak bulunmuştur.

Plazma vitamin C düzeyi yüksek olan gruplarda (3. ve 4. grup) plazma progesteron ve östradiol düzeylerinin de yüksek, seruloplazmin düzeylerinin ise düzensiz olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.8).

Ayrıca tüm grupların dönemler arası plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve Östradiol 17 $\beta$  düzeylerinin incelenmesinde tüm gruplarda vitamin C düzeyinin 3. dönemde (gebelik) diğer dönemlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.9).

Seruloplazmin düzeyleri ise 1. grupta, gebelik döneminde (3.dönem) siklus döneminden ( $p<0.005$ ), 4. grupta, hem 1. ve hem de 2. dönemden ( $p<0.00001$ ), 3. grupta ise, 1. ve 3. dönemlerin seruloplazmin düzeyinin 2. dönemden daha yüksek olduğu ( $p<0.0001$ ) belirlenirken, 2. grupta dönemler arası farklılığı rastlanmamıştır (Tablo 4.9).

Döl verimine göre vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve Östradiol 17 $\beta$  düzeyleri arasındaki ilişkiler dikkate alındığında, en yüksek plazma vitamin C düzeyinin ikiz gebeliklerde ( $7.69 \pm 0.14$ ) olduğu, embriyonik ölüm görülen koyunlarda plazma vitamin C düzeyinin ( $6.71 \pm 0.16$ ) diğerlerinden anlamlı derecede ( $p<0.00001$ ) dişlik, seruloplazmin düzeylerinin ise tek ve ikiz doğumlara göre anlamlı derecede ( $p<0.001$ ) yüksek olduğu görüldü. İkiz doğumlarda plazma progesteron düzeyi yüksek ( $p<0.0005$ ), östradiol düzeyleri ise gebe kalmayan koyunlarda yüksek, embriyonik ölüm ve abortlarda çok düşük ortalamaya sahipti (Tablo 4.10). Döl verimine göre koyunların plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol konsantrasyonlarının gruplardaki düzeyleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tüm gruplar bir arada değerlendirildiğinde vitamin C ile östradiol arasında ( $p<0.05$ ) ve vitamin C ile progesteron arasında ( $p<0.05$ ) pozitif, progesteron ile östradiol arasında negatif ( $p<0.0001$ ) bir korrelasyon belirlenmiştir (Tablo 4.12).

1. grupta progesteron ile östradiol arasında negatif korrelasyon ( $p<0.005$ ) dışında herhangi bir ilişki saptanamazken, 2. grupta progesteron ile östradiol ( $p<0.005$ ), vitamin C ile seruloplazmin arasında ( $p<0.005$ ) negatif, seruloplazmin ile östradiol ( $p<0.0001$ ) ve progesteron ( $p>0.05$ ) arasında pozitif bir korrelasyon gözlenmiştir. 3. grup koyunlarda, vitamin C ile östradiol arasında pozitif ( $p<0.01$ ), vitamin C ile seruloplazmin arasında ise negatif ( $p<0.05$ ), 4. grupta ise sadece vitamin C ile seruloplazmin arasında pozitif korrelasyon ( $p<0.0001$ ) belirlenmiştir (Tablo 4.13).

Denemeye alınan tüm koyunlarda plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol  $17\beta$  düzeylerinin ortalamaları ile anne yaşı, canlı ağırlığı ve kuzu doğum ağırlıkları arasındaki ilişkiler Tablo 4.14'de gösterilmiştir. Yavru doğum ağırlığı ile anne canlı ağırlığı arasında yüksek bir pozitif korrelasyon ( $p<0.0001$ ) tespit edilirken, yavru doğum ağırlığının gebelik dönemi vitamin C ( $p<0.05$ ) ve progesteron ( $p<0.05$ ) düzeyleriyle de pozitif korrelasyona sahip olduğu görülmüştür. Anne canlı ağırlığının 3 dönem vitamin C ve östradiol düzeyleri ve gebelik dönemi progesteron düzeyleriyle, aynı dönemde annenin yaşı ile plazma vitamin C ve östradiol düzeyleri arasında pozitif bir korrelasyon saptanmıştır. Ayrıca koyunlarda 2. ve 3. dönem askorbik asit ortalamaları ile seruloplazmin ortalamaları arasında negatif bir korrelasyon bulunmuştur (Tablo 4.14).

**Tablo 4.4. I. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri düşük ve parenteral vitamin C verilen koyunlar) tohumlamann 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları**

Hayvan No	progesteron (16-17.gün)	1. USG Gün Sonuç	2. USG Gün Sonuç	3. USG Gün Sonuç	Doğum Sonucu	Doğum Ağırlığı (kg)	Düştünceler
1	2.582	26 +	31 +	61 +	+ (D)	4.1	
2	1.419	30 +	35 +	73 +	+ (D)	4.2	
3	2.312	27 +	32 +	70 -	-		Emбриyonik ölüm
4	1.307	27 +	32 +	70 +	+ (E)	4.7	
5	1.455	28 +	33 +	71 +	+ (D)	5.0	
6	1.781	27 +	32 +	70 +	+ (E)	4.8	
7	3.222	26 +	33 +	64 +	Abort		
8	1.871	27 +	32 +	70 +	+ (D)	3.1	
9	1.480	24 +	29 +	67 +	+ (E)	3.3	
10	2.846	27 +	34 +	65 +	+ (E)	3.7	
11	2.137	27 +	34 +	50 -	-		Emбриyonik ölüm
12	1.002	24 +	29 +	67 +	+ (D)	5.7	
13	0.307	28 -	32 -	71 -	-		
14	2.286	25 -	32 +	56 +	+ (E)	4.4	
15	2.208	23 +	30 +	61 +	+ (E)	5.7	

Not : USG, Ultrasonografi

**Tablo 4.5. II. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri düşük) tohumlamanın 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları**

Hayvan No	progesteron (16-17.gün)	1. USG			2. USG			3. USG			Doğum Sonucu	Doğum Ağırlığı (kg)	Düşünceler
		Gün	Sonuç	Gün	Sonuç	Gün	Sonuç	Gün	Sonuç	Gün			
16	1.955	29	+	36	+	52	+	+ (D)		+ (D)	5.0		
17	2.765	28	+	34	+	59	+	+ (D)		+ (D)	5.5		
18	1.662	27	-	32	+	70	+	+ (E)		+ (E)	5.4		
19	3.229	31	+	36	+	74	+	+ (E)		+ (E)	5.9		
20	1.810	27	+	32	+	70	+	+ (D)		+ (D)	3.7		
21	2.530	23	+	30	+	61	+	+ (D)		+ (D)	3.5		
22	1.429	26	+	32	+	69	-	-		-		Embriyonik ölüm	
23	1.547	26	+	31	+	69	+	-		-		Abort	
24	1.528	29	+	34	+	72	+	+ (E)		+ (E)	4.5		
25	2.527	26	+	33	+	64	+	+ (E)		+ (E)	5.3		
26	2.736	29	+	34	+	72	+	+ (E)		+ (E)	5.5		
27	1.902	29	+	34	+	72	+					Koyun doğuma 15 gün kala ölüdü	
28	2.822	26	+	33	+	64	-	-		-		Embriyonik ölüm	
29	2.234	26	-	31	-	69	-	-		-		Embriyonik ölüm	
30	3.881	29	+	30	+	72	+	+ ikiz (ölü)		+ ikiz (ölü)			

Not : USG, Ultrasonografi

**Tablo 4.6. III. Grup koyunlarda (plazma vitamin C verilen koyunlar) tohumlamaın 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeligin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları**

Hayvan No	progesteron (16-17.gün)	1. USG Gün Sonuç	2. USG Gün Sonuç	3. USG Gün Sonuç	Doğum Sonucu	Ağırlığı (kg)	Düştünceler
31 2.448	32 +	37 +	74 +	+ (E)			
32 1.769	24 +	29 +	67 +		Abort		
33 2.890	24 +	31 +	63 +	+ (E)		4.6	
34 1.306	24 +	29 +	67 +		Abort		
35 2.703	26 +	31 +	69 +	+ (D)		4.9	
36 2.579	26 +	31 +	69 +	+ (D - D)		3.5 - 4.2	
37 2.929	27 +	34 +	65 -	-			Embriyonik ölüm
38 2.881	24 +	31 +	55 +	+ (E)		4.5	
39 2.041	32 +	37 +	74 +	+ (E - E)		4.0 - 4.2	
40 1.255	28 +	35 +	66 +	+ (E)		6.0	
41 2.909	23 +	30 +	62 +	+ (D)		4.0	
42 2.900	23 +	28 +	66 +	+ (D)		4.0	
43 4.133	28 -	33 +	71 +	+ (D)		5.3	
44 3.150	27 +	34 +	65 +	+ (D)		5.5	
45 0.020	25 -	32 -	56 -	-			

Not : USG, Ultrasonografi

**Tablo 4.7. IV. Grup koyunlarda (plazma vitamin C düzeyleri yükselti) tohumlamann 16-17. günlerindeki plazma progesteron düzeyleri (ng/ml) ile gebeliğin farklı günlerinde ultrasonla yapılan gebelik muayeneleri ve doğum sonuçları**

Hayvan No	progesteron (16-17.gün)	1. USG Gün	Sonuç	Gün	Sonuç	Gün	Sonuç	USG	Doğum	Doğum Ağırlığı (kg)	Düşünceler
46	2.242	25	+	30	+	67	+	+ (E - E)	3.6 - 3.2		
47	2.828	32	+	37	+	74	+	+ (D)	4.5		
48	2.589	24	-	29	+	67	+	+ (D - D)	4.0 - 4.6		
49	2.135	32	+	37	+	74	+	+ (E)	4.6		
50	1.483	25	+	30	+	68	+	+ (E)	3.8		
51	1.176	27	+	32	+	70	+	+		Kuzu doğduğu gün öldü !	
52	4.041	33	+	38	+	75	+	+ (D - E)	5.2 - 5.1		
53											Asılık (Tohumlanmadı)
54	2.521	33	+	38	+	75	+	+ (D)	5.2		
55	3.995	27	-	34	+	65	+	+ (D - E)	3.4 - 4.0		
56	1.744	27	+	32	+	70	+	+ (D - E)	3.5 - 2.9		
57	2.291	27	+	34	+	50	+	+ (D)	5.0		
58	3.348	29	+	34	+	65	+	+ (D)	4.1		
59	1.881	26	-	31	+	69	+	+ (D)	6.1		
60	1.197	24	+	31	+	57	+	+ (D)	5.0		

Not : USG, Ultrasonografi

**Tablo 4.8.** Deneme gruplarında vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17 $\beta$ 

Gruplar	Vitamin C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Seruloplazmin ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	Progesteron ( $\text{ng}/\text{ml}$ )	Oestradiol,17- $\beta$ ( $\text{pg}/\text{ml}$ )
1. grup (düş.+vitc)	7.13 $\pm$ 0.08 b	15.12 $\pm$ 0.13 a	1.26 $\pm$ 0.05 b	19.30 $\pm$ 1.33 bc
2. grup (düşük)	6.70 $\pm$ 0.09 b	15.14 $\pm$ 0.15 a	1.36 $\pm$ 0.05 ab	17.05 $\pm$ 1.02 c
3.grup (yük.+vitc)	7.96 $\pm$ 0.08 a	15.13 $\pm$ 0.18 a	1.51 $\pm$ 0.06 a	25.25 $\pm$ 1.58 a
4. grup (yüksek)	7.91 $\pm$ 0.09 ab	13.46 $\pm$ 0.14 b	1.46 $\pm$ 0.06 a	21.09 $\pm$ 1.40 b
p	p<0.00001	p<0.00001	p<0.01	p<0.0001

Not : Aynı sütundaki farklı harfler birbirinden istatistikî açıdan farklıdır.

**Tablo 4.9.** Plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve Östradiol 17  $\beta$  düzeylerinin gruplarda dönemlere göre değişimleri

1. Grup	Vitamin C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Seruloplazmin ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	Progesteron ( $\text{ng}/\text{ml}$ )	Oestradiol,17- $\beta$ ( $\text{pg}/\text{ml}$ )
1.Dönem	6.99 $\pm$ 0.19 b	15.11 $\pm$ 0.26 ab	0.69 $\pm$ 0.07 c	24.45 $\pm$ 2.61 a
2.dönem	6.61 $\pm$ 0.12 b	14.48 $\pm$ 0.26 b	0.95 $\pm$ 0.08 b	16.35 $\pm$ 1.78 b
3.dönem	7.58 $\pm$ 0.11 a	15.57 $\pm$ 0.16 a	1.83 $\pm$ 0.07 a	18.79 $\pm$ 2.28 ab
p	p<0.00001	p<0.005	p<0.00001	p<0.05
2. Grup				
1.Dönem	6.55 $\pm$ 0.19 b	14.69 $\pm$ 0.29	0.65 $\pm$ 0.06 c	22.78 $\pm$ 2.04 a
2.dönem	6.10 $\pm$ 0.15 b	15.13 $\pm$ 0.32	1.13 $\pm$ 0.10 b	17.25 $\pm$ 1.70 b
3.dönem	7.19 $\pm$ 0.13 a	15.38 $\pm$ 0.18	1.86 $\pm$ 0.07 a	11.97 $\pm$ 1.40 c
p	p < 0.00001		p < 0.00001	p < 0.0005
3. Grup				
1.Dönem	7.59 $\pm$ 0.18 b	15.09 $\pm$ 0.41 a	0.83 $\pm$ 0.07 c	40.36 $\pm$ 4.22 a
2.dönem	7.72 $\pm$ 0.14 b	14.11 $\pm$ 0.35 b	1.32 $\pm$ 0.10 b	19.20 $\pm$ 1.52 b
3.dönem	8.33 $\pm$ 0.12 a	15.86 $\pm$ 0.21 a	2.00 $\pm$ 0.07 a	20.78 $\pm$ 2.18 b
p	p < 0.0005	p < 0.0001	p < 0.00001	p < 0.00001
4. Grup				
1.Dönem	7.48 $\pm$ 0.13 b	12.95 $\pm$ 0.29 b	0.85 $\pm$ 0.07 b	30.92 $\pm$ 2.91 a
2.dönem	7.40 $\pm$ 0.16 b	12.23 $\pm$ 0.30 b	1.06 $\pm$ 0.09 b	15.95 $\pm$ 1.79 b
3.dönem	8.45 $\pm$ 0.13 a	14.48 $\pm$ 0.16 a	2.00 $\pm$ 0.08 a	17.96 $\pm$ 2.24 b
p	p < 0.00001	p < 0.00001	p < 0.00001	p < 0.00001

Not : Aynı sütundaki farklı harfler birbirinden istatistikî açıdan farklıdır.

**Tablo 4.10.** Denemeye alınan tüm koyunlarda döl verimi ile plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17 $\beta$  düzeyleri ( $x \pm Sx$ ) arasındaki ilişkiler

	N	Vitamin C ( $\mu\text{g/ml}$ )	Seruloplazmin (mg/dl)	Progesteron (ng/ml)	Ostradiol,17- $\beta$ (pg/ml)
Tekiz Doğum	38	$7.50 \pm 0.05$ ab	$14.56 \pm 0.09$ c	$1.35 \pm 0.03$ b	$20.61 \pm 0.83$ c
İkiz Doğum	8	$7.69 \pm 0.14$ a	$14.60 \pm 0.25$ bc	$1.70 \pm 0.09$ a	$21.96 \pm 2.06$ b
Embriy. Ölüm	6	$6.71 \pm 0.16$ c	$15.45 \pm 0.27$ a	$1.37 \pm 0.08$ b	$13.25 \pm 1.14$ d
Abort	5	$7.26 \pm 0.14$ bc	$15.20 \pm 0.24$ ab	$1.36 \pm 0.08$ b	$15.42 \pm 1.60$ d
Negatif	2	$7.27 \pm 0.22$ abc	$15.44 \pm 0.37$ ab	$1.24 \pm 0.12$ b	$40.84 \pm 4.27$ a
p		p< 0.00001	p< 0.001	p< 0.0005	p< 0.00001

Not : Aynı sütundaki farklı harfler birbirinden istatistikî açıdan farklıdır.

**Tablo 4.11.** Deneme gruplarında döl verimi ile plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17 $\beta$  düzeyleri arasındaki ilişkiler

<b>1. Grup</b>	N	Vitamin C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Seruloplazmin (mg/dl)	Progesteron (ng/ml)	Oestradiol, 17- $\beta$ (pg/ml)
Tekiz Doğum	11	7.35 $\pm$ 0.09 a	14.81 $\pm$ 0.14 b	1.20 $\pm$ 0.06 ab	18.32 $\pm$ 1.55 b
İkiz Doğum	-				
Embriy. Ölüm	2	6.44 $\pm$ 0.18 b	16.94 $\pm$ 0.35 a	1.45 $\pm$ 0.15 ab	18.72 $\pm$ 2.74 b
Abort	1	6.51 $\pm$ 1.15 b	14.63 $\pm$ 0.43 b	1.63 $\pm$ 0.23 a	7.47 $\pm$ 0.80 c
Negatif	1	6.71 $\pm$ 1.31 b	15.44 $\pm$ 0.49 b	1.15 $\pm$ 0.19 b	40.83 $\pm$ 4.24 a
p		p<0.00001	p<0.00001	p<0.1	p<0.00001
<b>2. Grup</b>					
Tekiz Doğum	9	7.09 $\pm$ 0.10 a	14.62 $\pm$ 0.14 c	1.36 $\pm$ 0.07 b	16.86 $\pm$ 1.20 b
İkiz Doğum	1	4.56 $\pm$ 0.22 c	20.41 $\pm$ 0.68 a	2.15 $\pm$ 0.30 a	42.00 $\pm$ 7.17 a
Embriy. Ölüm	3	6.16 $\pm$ 0.23 b	15.67 $\pm$ 0.38 b	1.22 $\pm$ 0.10 b	9.34 $\pm$ 0.82 c
Abort	1	6.79 $\pm$ 0.23 a	14.28 $\pm$ 0.33 c	1.19 $\pm$ 0.13 b	22.07 $\pm$ 3.43 b
Negatif	-				
p		p<0.00001	p<0.00001	p<0.001	p<0.00001
<b>3. Grup</b>					
Tekiz Doğum	9	7.78 $\pm$ 0.11 b	15.06 $\pm$ 0.25 b	1.48 $\pm$ 0.07	25.88 $\pm$ 1.95 b
İkiz Doğum	2	8.20 $\pm$ 0.25 ab	15.56 $\pm$ 0.35 ab	1.77 $\pm$ 0.19	38.73 $\pm$ 5.58 a
Embriy. Ölüm	1	8.82 $\pm$ 0.33 a	12.04 $\pm$ 0.42 c	1.72 $\pm$ 0.23	12.93 $\pm$ 1.84 c
Abort	2	8.14 $\pm$ 0.18 ab	16.38 $\pm$ 0.41 a	1.38 $\pm$ 0.12	17.19 $\pm$ 2.47 bc
Negatif	1	7.90 $\pm$ 0.32 ab	15.43 $\pm$ 0.56 ab	1.33 $\pm$ 0.17	
p		p<0.05	p<0.00001		p<0.0005
<b>4. Grup</b>					
Tekiz Doğum	9	7.81 $\pm$ 0.11	13.64 $\pm$ 0.17	1.39 $\pm$ 0.06	24.25 $\pm$ 2.14 a
İkiz Doğum	5	8.09 $\pm$ 0.14	13.17 $\pm$ 0.26	1.59 $\pm$ 0.29	17.46 $\pm$ 1.66 b
Embriy. Ölüm	-				
Abort	-				
Negatif	-				
p					p<0.05

Not : Aynı sütundaki farklı harfler birbirinden istatistikî açıdan farklıdır.

**Tablo 4.12.** Denemeye alınan tüm koyunlarda plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17 $\beta$  düzeyleri arasındaki korrelasyonlar

	östradiol	progesteron	seruloplazmin
Vitamin C	0.0620 <sup>x</sup>	0.0490 <sup>x</sup>	-0.0366
Seruloplazmin	0.0378	0.0592 <sup>x</sup>	
Progesteron	-0.1849***		

x : p< 0.05

\*\*\* : p< 0.0001

**Tablo 4.13.** Deneme gruplarında plazma vitamin C, seruloplazmin, progesteron ve östradiol 17 $\beta$  düzeyleri arasındaki korrelasyonlar

<b>1.GRUP</b>	östradiol	progesteron	seruloplazmin
Vitamin C	0.027	0.0645	0.0710
Seruloplazmin	-0.0261	-0.0100	
Progesteron	-0.1770**		
<b>2. GRUP</b>			
Vitamin C	-0.0591	-0.0429	-0.1238**
Seruloplazmin	0.2024***	0.0873 <sup>x</sup>	
Progesteron	-0.1646**		
<b>3. GRUP</b>			
Vitamin C	0.1811*	0.0804	-0.1111 <sup>x</sup>
Seruloplazmin	-0.0807	0.0860 <sup>x</sup>	
Progesteron	-0.1871**		
<b>4.GRUP</b>			
Vitamin C	-0.0773	0.0285	0.2653***
Seruloplazmin	0.1187	0.0979 <sup>x</sup>	
Progesteron	-0.3229***		

x : p< 0.05

\*\* : p< 0.005

\* : p< 0.01

\*\*\* : p< 0.0001

**Tablo 4.14.** Koyunlarda plazma askorbik asit (AA) seruloplazmin (SP), progesteron (PG) ve östradiol  $17\beta$  (ES) düzeylerinin 1., 2., 3. dönem ortalamaları ile ilk ve son canlılığı (CA-1 ve CA-2), yaş ve kuzu doğum ağırlığı (KDA) arasındaki korrelasyonlar

	AA-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2-AA-2		0.66**													
3-AA-3		0.68**	0.75**												
4-CA-1		0.38++	0.44**	0.39*											
5-CA-2		0.36++	0.43**	0.39*	0.85**										
6-ES-1		0.22	0.04	0.22	0.36+	0.21	0.23								
7-ES-2		-0.18	-0.14	-0.08	0.35+	0.21	0.78**								
8-ES-3		-0.04	-0.02	0.07	0.34+	0.27x	0.69**	0.89**							
9-PG-1		0.22x	0.05	-0.04	0.21	0.13	0.06	0.09	-0.10						
10-PG-2		0.10	0.02	-0.04	0.10	0.12	-0.15	-0.15	-0.04	0.40*					
11-PG-3		0.06	-0.04	-0.20	0.28x	0.26x	-0.07	0.01	-0.17	0.34++	0.30x				
12-SP-1		-0.00	-0.31+	-0.29x	-0.08	-0.09	0.13	0.11	-0.06	0.23x	0.12	0.03			
13-SP-2		-0.38++	-0.36++	-0.47**	-0.30+	-0.24x	-0.12	-0.02	-0.15	0.04	0.08	-0.03	0.60**		
14-SP-3		-0.28x	-0.31+	-0.39*	-0.16	-0.23x	-0.01	0.01	-0.02	0.12	0.20	0.04	0.57**	0.79**	
15-YAS		0.21	0.23x	0.33++	0.65**	0.54**	0.30x	0.37+	0.26x	0.11	-0.19	0.13	-0.07	-0.12	-0.10
16-KDA		0.24	0.29x	0.26x	0.58**	0.62**	0.19	0.11	0.26	0.23	0.17	0.28x	-0.04	-0.25x	-0.07

Not : 1., 2. ve 3. dönemler sırasıyla siklus öncesi, siklus ve gebelik dönemlerini tanımlamaktadır.  
(x : p<0.05, + : p<0.01, ++ : p<0.005, \* : p<0.001, \*\* : p<0.0001)

## **5. TARTIŞMA VE SONUÇ**

### **5.1. Progesteron ve Östradiol EIA Yöntemleri**

Hormonal analiz yöntemlerinden en yaygın kullanım alanı bulan yöntemler immunolojik test yöntemleridir. Bu testler antijen verildikten sonra antijene karşı oluşturulan antikorların bağlantı proteini olarak kullanılmasından köken alır ve yeterli düzeyde işaretleme yapılabılırse, endokrinolojik soruların çözümlenebilmesi için gerekli hassasiyete sahip analiz yöntemleri kurulabilir. Immunolojik test yöntemlerinden ise en yaygınları Radyoimmuno assay (RIA) ve Enzim immuno assay (EIA)'dır. RIA radyonüklidlerinin stabil olmaması, sizintilasyon sıvısından ileri gelen hayatı tehlike ve radyoaktivite, radyoaktif artıkların yaptığı çevre kirliliği, yasalar çerçevesinde çalışma zorunluluğu, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin pahalı olması, ölçümler için çok pahalı cihaz ve uzun zamana gereksinim duyulması gibi dezavantajlarından dolayı son yıllarda yerini EIA'e bırakmıştır. Çok farklı EIA yöntemleri olmasına karşın, ihtiyaç duyulan reaktiflerin laboratuvar koşullarında üretilmesi ve gerekli cihazların çok daha az ve ucuz olmasından dolayı en çok tercih edileni mikrotitre plak EIA yöntemidir (Tijssen 1992).

Son 20 yılda geliştirilen EIA yöntemleri, RIA'de karşılaşılan problemlerden arınmış olması ve özellikle son 10 yılda geliştirilen mikrotitre plak EIA yöntemleriyle santrifüje gereksinim duymadan serbest ve bağlı hormonların ayırmaması bu yöntemlerin yoğun şekilde kullanımını sağlamıştır. Ayrıca EIA'erde plakların kaplanması ikinci antikorların kullanımıyla assay varyasyonunun iyileştirildiği, gereksinim duyulan hormona spesifik antikor miktarının RIA yöntemlerinden 10 kat, sandwich ELISA yönteminden 1000 kat daha azaltılabilıldığı bildirilmektedir (Meyer 1986).

Yukarıda sayılan avantajları nedeniyle bu çalışmada da östradiol ve progesteron analizlerinde kullanılabilecek EIA yöntemleri geliştirilmiştir. Hamon ve Heap (1990)'in progesteron ve Burgess ve ark (1990)'nın östradiol için uyguladıkları RIA yöntemlerinde optimal antisерum dilusyonları sırasıyla 1 : 5.000 ve 1 : 50.000 olarak bulunurken, süt ve plazma için geliştirilen progesteron EIA yöntemlerinde sırasıyla 1 : 80.000 (Prakash ve ark

1988) ve 1 : 50.000 (Prakash ve ark 1987), östradiol EIA yönteminde ise 1:120.000 (England ve ark 1974) 1: 300.000 (Meyer ve ark 1990) ve 1: 500.000 (Jones ve Madej 1988) antiserum dilusyonları kullanılmıştır. Bu çalışmada da Meyer (1986)'in bildirdiği gibi, 1 : 60.000 olarak kullanılan progesteron antiserum dilusyonunun ve 1:200.000 'lik östradiol antiserum dilusyonunun RIA yöntemlerinden oldukça düşük olduğu ve yukarıdaki EIA yöntemleriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Her iki assayde de kullanılan 24 saatlik inkubasyon süreleri ve plazmaların ekstrakte edilmeksizin direkt kullanımını assayların klinik olarak kullanımını kolaylaştırmıştır. Ayrıca assaylarda kullanılan düşük plazma konsantrasyonları assayın hassasiyetini düşürmemiştir.

Flores ve ark (1992) koyunlarda gebelik tanısında kullanılmak üzere geliştirdikleri progesteron-RIA metodunda hassasiyeti 0.1 ng/ml, mikrotitre EIA metodunda ise 0.075 ng/ml olarak belirlemiştir. Prakash ve ark (1987) progesteron-RIA'da 0.4 ng/ml olan en düşük ölçüm sınırının, EIA yönteminde 0.04 ng/ml'ye düşüğünü bildirmektedirler. Chemineau ve ark (1982) da progesteron için kullandıkları RIA yöntemlerinde en düşük ölçüm sınırı 0.2 ng/ml olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmayla geliştirilen progesteron EIA yönteminde en düşük ölçüm 0.125 ng/ml olarak belirlenmiş ve yukarıdaki assaylere uyumlu olarak yöntemin oldukça hassas olduğu görülmüştür.

RIA yöntemiyle geliştirilen östradiol yöntemlerinde en düşük ölçüm sınırını Chemineau ve ark (1982) 2 pg/ml, Mori ve Kano (1984) ise 3 pg/ml olarak bulmuşlardır. EIA yöntemlerinde ise bu düzey 1.2 pg /ml (Meyer ve ark 1990) ve 0.3 pg/ml (Jones and Madej 1988)'ye kadar dişitürilebilmektedir. Bu çalışmada elde edilen 2 pg/ml 'lik en düşük ölçüm sınırı ise Chemineau ve ark (1982)'nın bulgularıyla uyumlu, Meyer ve ark (1990)'nın bulgularına yakın bulunmuştur.

Bir assayın sürekliliğini sağlayan interassay varyasyonlar progesteron EIA'lerde Prakash ve ark (1987) tarafından % 5.3, Flores ve ark (1992) tarafından ise 10.6 olarak bulunurken, bu oran % 17'lere kadar yükselebilmektedir (Van de Wiel ve Koops 1986). İntraassay varyasyonlar ise %7 ile 26 arasında verilmektedir (Van de Wiel ve Koops 1986,

Prakash ve ark 1987, Flores ve ark 1992). Bu çalışmada farklı düzeylerde progesteron ( $1.47 \pm 0.17$  ve  $2.60 \pm 0.23$  ng/ml) içeren plazmaların kullanımında interassay varyasyonlar sırasıyla % 11.58 ve % 8.97, aynı plazma örneklerinin intraassay varyasyonları sırasıyla % 6.04 ve 7.74 olarak bulunmuştur. Ayrıca bulunan bu intra- ve interassay varyasyonların RIA yöntemleriyle de uyumlu olduğu gözlenmiştir (Chamineau ve ark 1982, Jenkin and Thorborn 1985, Burgess ve ark 1990, Hamon and Heap 1990, Pathiraja ve ark 1991).

Plazma östradiol düzeylerinin belirlendiği RIA yöntemlerinde intra- ve interassay varyasyonların sırasıyla % 7 ile 14 ve % 10 ile 25 arasında değişmektedir (England ve ark 1974, Chamineau ve ark 1982, Yu ve ark 1983, Burgess ve ark 1990). Jones ve Madej (1988) ise plazma östradiol için geliştirdikleri mikrotitre plak EIA yönteminde iki farklı korsantrasyondaki plazmanın interassay varyasyonunu % 6.2 ve % 7.2, düşük, orta ve yüksek düzeydeki üç ayrı plazmanın intraassay varyasyonlarını ise sırasıyla % 27.1, 12.9 ve 5.9 olarak belirlemiştir. Çalışmada geliştirilen mikrotitre plak EIA yönteminde ise iki farklı konsantrasyonda ( $8.13 \pm 1.04$  ve  $84.49 \pm 5.95$  pg/ml) östradiol içeren plazmaların kullanıldığı assaylerde interassay varyasyonlar sırasıyla % 12.82 ve % 7.21 olarak bulunurken,  $13.84 \pm 1.19$  pg/ml östradiol içeren plazmanın kullanıldığı intraassay varyasyonun % 8.63 olduğu gözlenmiştir.

Assayların doğruluğunun belirlenebilmesi amacıyla plazma örneklerine belirli düzeylerde progesteron ve östradiol verilerek yeniden bulma düzeyleri belirlenerek, en yüksek % varyasyonun (%CV) östradiol-EIA'de 12.51, progesteron EIA'de ise 9.27 olduğu gözlenmiş, her iki assayde de elde edilen yeniden bulmaların assayın güvenilirliğini ortaya koyduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1 ve 4.2).

Assayların hassasiyeti, doğruluğu ve optimal inkubasyon şartlarının belirlenmesi amacıyla yapılan bu incelemeler sonucu, plazma progesteron EIA ve plazma östradiol  $17\beta$  EIA yöntemlerinin her ikisinin de güvenle kullanılabileceği ortaya konmuş ve araştırmadaki plazma örneklerinin progesteron ve östradiol  $17\beta$  analizlerinde, geliştirilen yöntemler kullanılmıştır.

## **5.2. Araştırmaların Tartışması**

Stres altındaki hayvanlarda adrenal korteksteki vitamin C konsantrasyonunun hızla düşmesi ve düşüşün kortikosteroidlerin sentez ve salınımında vitamin C'nin kullanıldığından kaynaklandığının bildirilmesinden sonra vitamin C'nin steroidogenez üzerine etkileri araştırılmaya başlanmıştır (Milewich ve ark 1981, Leveille ve Schwarts 1982, Pintauro ve Bergan 1982, Byrd ve ark 1993).

Karaciğerlerinde glukozu L-askorbik asite dönüştürebilen hayvanların, diyet kaynaklı vitamin C'ye gereksinim duymadıkları kabul edilir. Ancak bazı durumlarda karaciğerin sentez kapasitesine bağlı olarak gıda kökenli vitamin C'ye gereksinim duyulabilir (Chatterjee 1973). Özellikle sığır ve koyunlar rumenin alkali pH'sına bağlı olarak diyetle almış oldukları vitamin C'den yararlanamadıkları için askorbik asit noksantalıklarına daha duyarlı hayvanlardır (Itze 1983). Literatür taramalarında farklı hayvan türleri ve insanlar üzerinde vitamin C'nin etkileri konusunda birçok araştırma yapılmasına karşın (Sandnes and Braekkan 1981, Bates ve ark 1982, Greer ve ark 1987, Byrd ve ark 1993, Das ve ark 1993), koyunlarda vitamin C'nin reproduksiyon üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Vitamin C'nin klinik kullanımı henüz tam yaygınlaşmamış olsa da, sığırlarda infertilite tedavisinde (1-2 g intravenöz ya da tohumlamadan önce 2 g subkutan veya 6 hafta süre ile haftada 1 ya da 2 kez 2 g subkutan) kullanılmaktadır (Brander ve ark 1991).

Rivers ve Devine (1975) hayvanlarda dışarıdan vitamin C verilmesinin plazma vitamin C düzeylerini etkilemesinin güclüğünden bahsederken, deneme sonunda vitamin C uygulaması yapılan grplarda (grup 1 ve 3) plazma askorbik asit konsantrasyonlarında istatistikî açıdan anlamlı olmamakla birlikte rakamsal olarak artışlar gözlenmiştir (Tablo 4.8). Ayrıca grup oluşturulurken  $6.44 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ 'lik ortalama askorbik asit düzeyi dikkate alınarak grplandırma yapılmış, deneme sonunda kontrol grpları dahil, tüm grplarda plazma vitamin C düzeylerinin ortalamaya göre yükseldiği gözlenmiştir. Bu yükselmenin koyunlara aşım sezonu öncesi uygulanan flushing'den kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Ortalama serum vitamin C düzeylerinin koyunlarda  $9.1 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ , keçilerde  $10.1 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ , sığırlarda  $13.2 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$  (Haag 1985), Merinos ve Akkaraman ırkı kuzularda sırasıyla  $8.71$ ,  $7.78 \mu\text{g/ml}$  (Çamaş ve Ergun 1985) bulunduğu, bu düzeylerin gebelik ve gebelik dönemine göre değiştiği bildirilmektedir. Başpinar (1989) Merinos ırkı koyunlarda gebeliğin 1. ayındaki serum vitamin C düzeylerini  $6.9 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlemiştir ve gebelik süresince ve postpartum ilk ayda vitamin C düzeylerinin anlamlı derecede ( $p<0.01$ ) dalgalanmalar gösterdiğini bildirmiştir. Bu araştırmada grup oluşturulmadan önce belirlenen  $6.44 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ 'lik ortalama askorbik asit düzeylerinin Başpinar (1989)'ın aynı ırk koyunlar için bildirdiği gebelik dönemi birinci ay serum askorbik asit ortalamalarına yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Malinowska (1986) domuzlarda serum askorbik asit düzeylerinin gebelik ve gebeliğin evrelerine göre değiştiğini, gebeliğin başlangıcında  $12.8 \mu\text{g/ml}$  olan düzeylerin, son haftada  $9.6 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlendiğini bildirmektedir.

Çalışmada ortalama vitamin C düzeyleri düşük grplarda (grup 1 ve 2) sırasıyla  $7.13 \pm 0.08$  ve  $6.70 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ . yüksek grplarda ise  $7.96 \pm 0.08$  ve  $7.91 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiş ve Çamaş ve Ergun (1985)'un Merinos ırkı kuzular için bildirdikleri vitamin C düzeylerinden düşük bulunurken. Akkaraman ırkı kuzular için bildirilen düzeylerle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Tüm grplarda gebelik dönemi (birinci ay) vitamin C düzeylerinin yüksek olduğu, sadece yüksek grupların (3. ve 4) sırasıyla  $8.33 \pm 0.12$  ve  $8.45 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$  olarak bulunan gebelik dönemleri vitamin C düzeylerinin Çamaş ve Ergun (1985)'un Merinos ırkı kuzular için bildirdiği düzeylerle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tüm grplarda gebelik 1. ay vitamin C düzeylerinin aynı ırk koyunlarda Başpinar (1989)'ın bildirdiği gebelik birinci ay vitamin C ortalamalarından yüksek olduğu bulunmuştur.

Itze (1983) buzağılarda serum askorbik asit düzeylerinin yaşa bağlı olarak değiştiğini doğumdan sonra 1. giünde en yüksek düzeylere ulaşan askorbik asitin 2. günden itibaren düşüşünü ve 7. giünde en düşük düzeylere ulaştığını, ayrıca mevsime bağlı olarak da ineklerde plazma vitamin C düzeylerinin farklı olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada

seksüel siklus ve gebelik dönemi vitamin C düzeyleriyle anne yaşı arasında pozitif korrelasyon (sırasıyla  $p<0.05$  ve  $p<0.005$ ) belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen plazma seruloplazmin düzeyleri tüm grplarda Evans ve Wiederanders (1967)'in koyunlar için genel olarak bildirdiği (26.5 mg/dl) ve Serpek ve ark (1989b) ile Başpinar (1989)'in Merinos ırkı koyunlar için bildirdikleri (sırasıyla  $19.3 \pm 0.67$  ve  $16.11 \pm 1.22$ ) düzeylerden oldukça düşük bulunmasına karşın, Bildik ve ark (1997)'nin fenotip olarak Akkaraman koyunlarına benzeyen Hamdani koyunları için bildirdikleri  $12.68 \pm 0.87$  mg/dl'lik düzeyden yüksektir. Serpek ve ark (1989b) ve Başpinar (1989)'in aynı işletmede ve aynı ırk koyunlarda bildirdikleri seruloplazmin düzeylerinden çok daha düşük değerlerin elde edilmesinin yemlerdeki Cu içeriklerinin farklılığından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca Mazumder ve Mazumder (1985) domuzlarda hava şartlarına bağlı olarak sezonlar arasında seruloplazmin düzeylerinin farklılık gösterdiğini ve Serpek ve ark (1989a) da buzağılarda serum seruloplazmin düzeylerinin sezona bağlı olarak değiştiğini ( $p<0.05$ ) bildirmektedirler. Bu çalışmada bulunan düşük düzeylerin koyunların beslenmesinde toprağında Cu yetmezliğinin varlığı bilinen işletmede yetiştirilen yem maddelerinin kullanımından ileri geleceği düşünülmüştür.

Butler (1963) gebelikle birlikte seruloplazmin düzeylerinin düştüğünü bildirmesine karşın, Başpinar (1989) koyunlarda gebeliğin ilk ayı ve postpartum ilk ayda seruloplazmin düzeylerinin yüksek seyrettiğini saptamıştır ve bu olgu insanlar üzerinde yapılan çalışmayla (Burrows ve Pekala 1971) da doğrulanmıştır. Bu çalışmada da seksüel siklus ve gebelik dönemleri arasında seruloplazmin düzeylerinde 2. grupta herhangi bir farklılık gözlenmezken, 1, 3 ve 4. grplarda gebelik dönemi seruloplazmin düzeylerinin önemli derecede (sırasıyla  $p<0.005$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.0001$ ) yüksek olduğu gözlenmiş ve sonuçlar Başpinar (1989) ile Burrows ve Pekala (1971)'nın bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

Yapılan literatür taramalarında Merinos ırkı koyunlarda progesteron ve östradiol  $17\beta$  düzeylerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanamamış ve bu nedenle tartışma ancak farklı ırktaki koyunların progesteron ve östradiol  $17\beta$  düzeyleri dikkate alınarak yapılmıştır.

Denemeye alınan hayvanlarda yüksek ve düşük gruplar arasında plazma progesteron düzeylerinin farklı olduğu ( $p<0.01$ ) ve Pintauro ve Bergan (1982) in vitro vitamin C uygulamasının kobaylarda progesteron düzeylerini düşürdüğüünü bildirmesine karşın, istatistik açıdan önemli olmamakla birlikte plazma vitamin C düzeylerini yükseltten eksojen vitamin C uygulamalarının plazma progesteron düzeylerini etkilemediğini gözlemiştir. McPhee ve Tiberghien (1987) tohumlamanın 16-17. günlerinde yavru sayısı ve plazma progesteron konsantrasyonu arasında bir ilişki saptanamadığını bildirirlerken, Gadsby ve ark (1972) koyunlarda gebeliğin 80. gününden sonra yavru sayısı ile plazma progesteron düzeyleri arasındaki ilişki olduğunu belirlemiştir. Bedford ve ark (1972) koyunlarda aynı türün bireyleri arasında plazma progesteron düzeyleri arasındaki farklılığın nedenini yavruların kilosuna bağlamakta ve 4 kg'dan yüksek yavru ağırlığına sahip koyunlarda plazma progesteron düzeylerinin daha yüksek. Van de Wiel ve ark (1976) da birden fazla yavru taşıyan hayvanlarda bireysel olarak plazma progesteron düzeyinin yüksek olduğunu bildirmektedirler. Bu bilgiler ışığında plazma vitamin C düzeyleri yüksek gruptarda (3. ve 4. grup) görülen yüksek plazma progesteron düzeyinin, ikizlik ve doğum oranının bu gruptarda daha fazla görülmesinden kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Her ne kadar gebelik dönemi kan örnekleri sadece embriyonal dönemde alınmış olsa da, doğum sonuçlarıyla karşılaştırıldığında ikiz doğum yapan koyunlarda plazma progesteron düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.10). Ancak embriyonal dönemde plasental kaynaklı progesteron salınınının olmayacağı olasılığı düşürmektedir ve Tablo 4.9 incelediğinde özellikle vitamin C uygulaması yapılan grup (3) olmak üzere plazma vitamin C düzeyi yüksek gruptarda seksüel siklus boyunca plazma progesteron ortalamalarının daha yüksek oluşu, artışın ikizlikten değil vitamin ile hormon arasındaki ilişkiden kaynaklanabileceği olasılığını güçlendirmektedir.

Koyunlarda tohumlamanın 16-17. günlerinde alınan kan örneklerinde plazma progesteron düzeyleri belirlenerek gebelik tanıları yapılmıştır. Genellikle 1-1.5 ng/ml'nin üzerindeki progesteron düzeyleri tohumlamanın 16-17. günlerinde gebelik için pozitif kabul edilse de ırk ve çevre şartlarına bağlı olarak farklı progesteron düzeylerini alt sınır olarak

kabul eden araştırcılar da vardır. Flores ve ark (1992) koyunlarda tohumlamanın 16-17. günlerinde 1 ng/ml'nin üzerindeki plazma progesteron düzeylerini pozitif olarak kabul ederken, Weigl ve ark (1975) 1.48 ng/ml, Brundige ve ark (1988) 2 ng/ml ve Gadsby ve ark (1972) 2.44 ng/ml'yi almışlardır. McPhee ve Tieberghien (1987) da tohumlamanın 16-17. gününde koyunlarda plazma progesteron düzeyinin 1.5-2.8 ng/ml arasında değiştiğini bildirmektedir. Bu çalışmada tohumlamanın 16-17. gününde plazma progesteron düzeyi 1.0 ng/ml'nin üzerindeki koyunlar gebe olarak kabul edilmiş ve bu dönemdeki plazma progesteron düzeylerinin 1.002-4.133 ng/ml arasında değiştiği saptanmıştır.

Plazma progesteron düzeyi belirlenerek gebelik tanısının yapılmasında negatif sonuçları doğru bulma oranı %100 olmasına karşın, doğru sonuçların yüzdesi çeşitli reproduktif bozukluklara bağlı olarak (luteal kist gibi) farklılıklar gösterebilmektedir. Flores ve ark (1992) mikrotitre EIA metodu ile koyunlarda gebelerde ve gebe olmayanlarda doğruluk oranını sırasıyla % 91.6 ve 64.3 olarak belirlerken aynı koyunlarda RIA metodu ile yapılan progesteron analizlerinde bu oranlar sırasıyla % 89.9 ve % 90.4 olarak bulunmuştur. Brundige ve ark (1988) ise gebelikte doğruluk oranını % 85 olarak bildirilmektedirler. Denemeye alınan koyunlarda gebelik tanısının doğruluk oranı % 89.29 olarak bulunmuş, bu bulgunun yukarıdaki araştırmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Gebe olmayan hayvan sayısı az olduğundan bu konuda doğruluk testi yapılamamış ancak gebe olmayan iki koyunda da plazma progesteron düzeylerinin bazal düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Plazma progesteron düzeyleri ile yapılan gebelik kontrollerinin doğruluğu embriyonal dönemde 2 kez rektoabdominal ve gebeliğin ileri dönemlerinde 1 kez trans-abdominal olarak yapılan ultrasonik muayenelerle kontrol edilmiştir. Bu kontroller sırasında bazı hayvanlarda tohumlamanın 16-17. gününde belirlenen plazma progesteron düzeyi ile ilk iki ultrasonik muayenede gebelik saptanmasına karşın, ileri gebelikte (2-2.5 aylık) yapılan ultrasonik muayenede gebe olmadıkları anlaşılmış ve doğum sonuçlarının da negatif olduğu görülmüştür (Tablo 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Gebelik saptanmasındaki bu yanlışının embriyonik ölümlerden kaynaklanabileceği söylenebilir.

Plazma östradiol  $17\beta$  düzeyleri östrusta maksimal düzeye ulaşıp, LH salınımını stimüle ederek LH pikinin oluşumunu sağladıktan sonraki 12 saat içerisinde tekrar basal düzeylerine geriler (Chemineau ve ark 1982). Bu çalışmada kan örneklerinin alınma aralıkları çok sık olmadığından kısa sürede plazma östradiol  $17\beta$  piklerinin oluşumu yakalanamamıştır. Buna rağmen 3 ve 4. grupta deneme boyunca östradiol  $17\beta$  düzeylerinin 1. ve 2. grplardan daha yüksek ( $p<0.0001$ ) olduğu, eksojen vitamin C verilen grplardan 3. grupta plazma östradiol  $17\beta$  düzeylerinin kontrol grubundan (4. grup) anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür (Tablo 4.8). Bu bulgu östrojen konsantrasyonunun maksimuma ulaştığı östrusta plazma vitamin C konsantrasyonlarının yüksek bulunduğuunu bildiren çalışmaları (Pascu ve ark 1970, Wise 1987, Başpinar ve Serpek 1993) desteklemektedir ve eksojen vitamin C uygulamalarının plazma östradiol düzeylerini yükseltmesi vitaminin seksüel steroidlerin biyosentezindeki önemini göstermektedir.

Plazma vitamin C düzeyleriyle seksüel steroidler arasındaki ilişki yukarıda verilen plazma östradiol  $17\beta$  düzeyleri arasındaki ilişki ile sınırlı değildir ve çalışmada kullanılan tüm koyunlar ele alındığında, plazma vitamin C düzeyleriyle plazma östradiol  $17\beta$  ve plazma progesteron düzeyleri arasında da pozitif korrelasyonlar bulunması (Tablo 4.14) Chattopadhyay ve ark (1972) ile Malinowska (1985)'nin gebelikte yüksek plazma progesteron düzeylerini plazma vitamin C düzeylerinin yüksekliğinin izlediği bulgularıyla uyumludur ve seksüel steroid biyosentezinde vitamin C'nin önemini göstermektedir.

Greer ve ark (1987) sezonal infertil domuzlarda vitamin C uygulamasının istatistikî olarak anlam ifade etmese de çiftleşmedeki başarı yüzdesini artırdığını fakat doğum ve yavru üzerine herhangi bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada da ırk ve canlı ağırlıkları dengelenerek oluşturulan grplarda 8 ikiz doğumun 7'sinin yüksek grplarda gözleendiği düşük kontrol grubunda (2. grup) gerçekleşen bir ikiz doğumun da ölü doğum şeklinde gerçekleştiği görülmüştür. Hatta ikiz doğum yapan koyunların deneme süresince plazma askorbik asit düzeylerinin de abort ve embriyonik ölüm gerçekleşen koyunlara göre daha yüksek ( $p<0.0001$ ) olduğu saptanmıştır. Ayrıca embriyonik ölüm ve abortun büyük bir kısmının düşük grplarda gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu bulgular düşük askorbik asit

düzeyine sahip hayvanlarda fotal embriyonik ölümlerin artığının ve gebe kalma oranının düşüğünün bildirildiği Rivers ve Devine (1975)'in ifadelerini doğrulamaktadır.

Hayvanlarda herhangi bir enfeksiyon sonucu akut faz yanıtta akut faz proteinlerinin (C-reaktif protein, haptoglobulin, serum amyloid A, fibrinojen ve seruloplazmin) plazma düzeylerini aniden artığı, bunlardan seruloplazminin % 50 oranında artışlar gösterdiği ve hastalığın sağıtımının tam olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesinde de bu proteinlerin düzeylerinden yararlanılabileceği bildirilmektedir (Koshner 1982, Nakajima ve ark 1993). Bu bilgilere paralel olarak Serpek ve ark (1989a) ishalli buzağılarda. Çetin ve ark (1995) gastrointestinal nematodlarla enfekte köpeklerde plazma seruloplazmin düzeylerinin sağlıklılara göre daha yüksek olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada tek ve ikiz doğum yapan koyunlara göre embriyonik ölüm görülen koyunların plazma seruloplazmin düzeylerindeki yükselmenin ( $p<0.001$ ) (Tablo 4.10), herhangi bir metabolik bozukluğa bağlı olarak şekillenebileceğini ve embriyonik ölümün sebebi olabileceğini düştürmektedir.

Denemeye alınan tüm koyunlarda incelenen parametrelerin aralarındaki korrelasyonların incelenmesinde, hem seksüel siklus hem de gebelik dönemi askorbik asit düzeyleri ile seruloplazmin düzeyleri arasında sırasıyla  $p<0.005$  ve  $p<0.001$  önem derecesinde negatif korrelasyonlar belirlenmiş ve bu olgunun askorbat oksidaz aktivitesine sahip olan seruloplazminin askorbik asitle negatif bir korrelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalarla (Osaki 1964, Basu 1986) uyumlu olduğu görülmüştür.

Yen ve Pond (1981) domuzlarda maksimum canlı ağırlığa ulaşılabilmesi için eksojen vitamin C uygulamalarının zorunlu olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada da benzer şekilde plazma vitamin C düzeyleriyle hem anne ( $p<0.001$ ) hem de kuzuların ( $p<0.05$ ) canlı ağırlıkları arasında pozitif korrelasyon bulunmuş ve vitamin C'nin canlı ağırlık artışını pozitif yönde etkilediği gözlenmiştir (Tablo 4.14). Vitamin C düzeylerinin domuzlarda yaşla birlikte değiştiği ve yaşıın artmasıyla birlikte düşüğü bildirilmektedir (Yen and Pond 1983). Bu çalışmada seksüel sikluslar başlamadan önce plazma vitamin C düzeyleri ve yaş arasında bir ilişki bulunmamasına karşın, seksüel siklusların başlamasıyla birlikte ortaya çıkan ilişki gebelikte de devam etmektedir (Tablo 4.14). Aynı dönemlerde yaşla östradiol  $17\beta$  düzeyleri

arasında gözlenen pozitif anlamlı korrelasyonun, koyunlarda ilk yaşlarda düşük olan döл veriminin yaşın ilerlemesiyle yükseldiği ve 4-5 yaşlarda maksimale ulaştığına ilişkin bulgulara (Sönmez ve Kaymakçı 1987, Ogan 1988) uyumlu olarak ileriki yaşlardaki ikizlik oranlarının yükselmesinden kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Koyunlarda gebelik dönemi vitamin C düzeyleri ile koyunların canlı ağırlığı arasındaki pozitif korrelasyon vitamin C'nin anne hayvan yanısıra kuzunun doğum ağırlığı üzerindeki önemini de ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak koyunlarda bir yandan plazma vitamin C düzeyleri ile seksüel steroidlerden östradiol  $17\beta$  ve progesteron düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunması, diğer yandan eksojen vitamin C uygulamalarının seksüel steroidlerin düzeylerini istatistik açıdan önemli derecede yükseltmesi, koyunlarda vitamin C'nin üremedeki önemini göstermektedir ve döл veriminin iyileştirilmesi amacıyla üreme mevsiminde eksojen vitamin C uygulamalarının yararlı olacağı söylenebilir.

## **6. ÖZET**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ /KONYA 1998

Seyfullah Haliloglu

### **Vitamin C'nin Koyunlarda Reproduksiyon Üzerine Etkileri**

Bu çalışmada Merinos ırkı (Hampshire X Merinos, Alman Siyah Baş X Merinos) koyunlarda vitamin C'nin progesteron ve östradiol  $17\beta$  sentezi ile döl verimi üzerine etkileri araştırıldı.

Araştırmada Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde bulunan 30 adet plazma vitamin C düzeyi düşük, 30 adet plazma vitamin C düzeyi yüksek olmak üzere 60 adet 2-7 yaşlı koyun kullanıldı. Plazma vitamin C düzeyi yüksek ve düşük gruplar eşit sayıda koyun içeren 2'ser alt gruba ayrıldılar ve düşük gruplar 1, 2, yüksek gruplar 3 ve 4. grup olarak isimlendirildiler. Oluşturulan gruplardan birisi kontrol grubu olarak kullanılırken (2 ve 4. grup) diğer gruplarda (1 ve 3. grup) yer alan koyunlara haftada 2 kez 500 mg vitamin C i/m olarak enjekte edildi.

Arama koçu ile östrusta olduğu saptanan koyunların ilk östruslarında tohumlama yapılmadı ve ikinci kez östrusu saptanan koyunlar doğal koşullarda koçlarla tohumlandılar. Siklusların başlangıcından gebelik oluşumu belirleninceye kadar haftada 3 kez, gebeliğin belirlenmesinden 40. güne kadar haftada 2 kez kan örnekleri alındı. Plazmalar kazanıldı ve plazma progesteron, östradiol  $17\beta$ , vitamin C ve seruloplazmin düzeyleri belirlendi.

Plazma progesteron ve östradiol  $17\beta$  düzeyleri mikrotitrasyon plak EIA yöntemiyle gerçekleştirildi. Progesteron EIA yönteminde en düşük belirlenme sınırı, % 50 relatif bağlanma, inter- ve intra assay varyasyonlar sırasıyla 0.125 ng/ml, 1.25 ng/ml, % 6.04, % 8.97, östradiol  $17\beta$ -EIA yönteminde ise sırasıyla 2 pg/ml, 20 pg/ml, % 7.21 ve % 8.63 olarak belirlendi. Araşturmada ayrıca plazma progesteron düzeyleriyle gebelik tanılarının kontrolü amacıyla gebeliğin farklı zamanlarında 3 kez ultrasonla gebelik muayeneleri yapıldı ve plazma progesteron düzeyleriyle gebeliğin doğru belirlenme oranı % 89.29 olarak bulundu.

Çalışmada plazma vitamin C düzeylerinin tüm grplarda seksüel sikluslar sırasında düşük olmasına karşın, gebeliğin oluşumu ile yükseldiği gözlenirken, plazma seruloplazmin düzeylerinde düzenli bir değişim gözlenmemiştir. Plazma vitamin C düzeyleri düşük olan grplarda özellikle östradiol  $17\beta$  düzeylerinin düşük, yüksek olan grplarda yüksek bulunması vitamin C'nin steroid hormon sentezinde önemli olduğunu göstermiştir.<sup>1, 2, 3 ve 4.</sup> grplarda sırasıyla 15.12, 15.14, 15.13 ve 13.46 mg/dl olarak bulunan plazma seruloplazmin düzeylerinin normal düzeylerin altında olduğu görülmüştür. Plazma vitamin C düzeyleriyle annenin ve yavrunun canlı ağırlıkları arasında pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Koyunlarda ikiz gebelikte plazma vitamin C ve progesteron düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak vitamin C'nin hem döl verimini, hem de anne ve kuzunun canlı ağırlık kazancını olumlu yönde etkilediği ve eksojen vitamin C uygulamasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

## **7.SUMMARY**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ /KONYA 1998

### **The Effects of Vitamin C on Reproduction in Sheep**

The effects of vitamin C on progesterone and oestradiol 17 $\beta$  synthesis, and fertility rate were studied in Hampshire X Merino, German Black Mutton X Merino.

Total of 60 sheep, aging between 2 and 7 years, of which 30 with low, and the other 30 with high plasma vitamin C level were used in the Animal Research Institute of Konya. Each low and high vitamin C groups were divided into 2 subgroups. Each subgroups had equal numbers of sheep. Subgroups 2 and 4 served as a control in the low and high vitamin C groups, respectively. On the other hand, 500 mg of vitamin C was injected intramuscularly in the subgroups of 1 and 3 in the low and high vitamin C level group, respectively.

The sheep not in the first, but in the second oestrus detected with teaser rams were allowed mating natural conditions. Blood samples were collected 3 and 2 times from the beginning of the first oestrus cycle, until the detection of pregnancy and thereafter the 40<sup>th</sup> day of mating, respectively. Plasma progesteron, oestradiol 17 $\beta$ , vitamin C, ceruloplasmin levels were determined.

The progesteron and oestradiol 17 $\beta$  levels were determined using microtitration plate EIA technique. Sensitivity, 50% relative binding, inter- and intraassay variations were 0.125 ng/ml, 1.25 ng/ml, 6.04% and 8.97% in the progesterone, respectively. This was 2 pg/ml, 20 pg/ml, 7.21% and 8.63% in the same order, above, for the oestradiol 17 $\beta$ . The pregnancy of animals were determined in 3 different intervals with diagnosis ultrasound in

order to confirm the pregnancy through the progesterone levels. Diagnostic ultrasound confirmed the pregnancy 82.29% through the progesterone levels.

Although vitamin C levels were low during the sexual cycles in all groups, there was an increase with the start of pregnancy. On the other hand, the changes of the plasma ceruloplasmin levels were irregular. The low and high oestradiol  $17\beta$  levels of the low and high vitamin C groups showed the importance of vitamin C on steroid hormone synthesis. Ceruloplasmin levels of 15.12, 15.14, 15.13 and 13.46 mg/dl in groups 1, 2, 3 and 4 were below the normal levels, respectively. There was a positive correlation between ascorbic acid levels and body weight of the mother sheep and newborn. The vitamin C and progesterone increase were observed in the pregnant sheep with twins.

It was concluded that exogen vitamin C increase the fertility rate along with body weight of pregnant sheep and newborn.

## **8. LİTERATÜR LİSTESİ**

- Agiannidis A, Yiantzis N and Spais AG (1976)** *Correlation between plasma caeruloplasmin activity and blood copper in ruminants*, Proceeding of World Veterinary Congrees, 443-447, Thessaloniki.
- Akmaz A (1989)** *Koç Katımı Öncesi ve Gebeliğin Son Döneminde Farklı Dizeylerde Beslemenin Konya Merinos Koyunlarında Döl Verimi, Kuzularda Büyüme ve Yaşama Gücüne Etkileri*, Doktora Tezi, AÜ Sağ Bil Enst, Ankara.
- Amer MA, Laurent ST and Brisson GJ (1975)** *Supplemental copper and selenium for calves : Effects upon ceruloplasmin activity and liver copper concentration*, Canad J Physiol, 51, 649-653.
- Arthur GH, Noakes DE and Paerson H (1989)** *Veterinary Reproduction and Obstetrics (Theriogenology)*, 6th Ed, ELBS, London.
- Aten RF, Duarte KM, Behrman HR (1992)** *Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathion and lipid peroxidation by LH and prostaglandin F2 alpha*, Biol Reprod, 46, 401-407.
- Aytuğ CN, Yalçın BC, Türker H, Özkoç H ve Gökçen H (1990)** *Koyun ve Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği*, Tüm-Vet Hay Hiz Yayımları, No : 2 , İstanbul.
- Barnes MJ and Kodicek E (1972)** *Biological hydroxilations and ascorbic acid with special regard to collagen metabolism*, Vitam Horm, 30, 1-43.
- Basu TK (1986)** *Effects of estrogen and progesteron on ascorbic acid status of female guinea pigs*, J Nutr, 110 (4), 570-579.
- Baş S, Özsoy MK ve Vanlı Y (1986)** *Koç katımı öncesi farklı sürelerde yemlemenin koyunlarda dölverimi, kuzularda bilyülme ve yaşama gücüne etkileri*, Tr J Vet Anim Sci, 10 (3), 221-234.

**Başpınar N (1989)** *Gebe Koyunlarda Vitamin C, Seruloplasmin, Glikoz ve Hemoglobin Değerlerinin Postpartum İlk Aya Kadar Değişimleri ve Bu Parametreler Arasındaki İlişkiler*, Doktora Tezi, SÜ Sağ Bil Enst, Konya.

**Başpınar N ve Serpek B (1993)** *İneklerde östrus siklusunu boyunca vitamin C ve kolesterol değerlerindeki değişimler*, Hay Araşt Derg, 3 (1), 39-42.

**Bates CJ, Prentice AM, Prentice AM, Paul AM and Whittehead RG (1982)** *Seasonal variations in ascorbic acid status and breast milk ascorbic acid levels in rural Gambian women in relation to dietary intake*, Trans R Soc Trop Hyg, 76 (3), 341-347.

**Bedford CA, Challis JRG, Harrison FA and Heap RB (1972)** *The role of estrogens and progesterone in the onset of parturition in various species*, J Reprod Fertil Suppl. 1, 1-23.

**Bildik A, Yur F, Belge F, Değer Y ve Dede S (1997)** *Hamdani koyunlarında bazı kan parametrelerinin belirlenmesi*, SÜ Vet Bil Derg, 13 (1), 17-21.

**Bingley JB, Dick AT (1969)** *The pH optimum for ceruloplasmin oxidase activity in the plasma of several species of animals*, Chem Clin Acta. 25, 480-482.

**Blakley BR and Hamilton DL (1985)** *Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep*, Can J Comp Med, 49 (4), 405-408.

**Bondy PK (1985)** *Disorders of adrenal cortex*, In "Williams Textbook of Endocrinology", 816-891, Eds by JD Wilson, DW Foster, WBS Comp, Philadelphia.

**Brander GC, Pugh DM, Bywater RJ and Jenkins WL (1991)** *The Vitamins*, In "Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics", Fifth Ed, ELBS, London.

**Brundige GC, Layne LJ and McCabe TR (1988)** *Early pregnancy determination using serum progesterone concentration in bighorn sheep*, J Wildlife Manag, 52 (4), 610-612.

**Burgess KM, Ralph MM, Jenkin G and Thorburn GD (1990)** *Effect of oxytocin and estradiol on uterine prostaglandin release in nonpregnant and early pregnant ewes*. Biol Reprod, 42, 822-833.

**Burrows S and Pekala B (1971)** *Serum copper and ceruloplasmin in pregnancy*, Am J Obstet Gynec, 109, 907-909.

**Butler EJ (1963)** *The influence of pregnancy on the blood plasma and caeruloplasmin copper levels of sheep*, Comp Biochem Physiol, 9, 1-12.

**Byrd JA, Pardue SL and Hargis BM (1993)** *Effect of ascorbate on luteinizing hormone stimulated progesterone biosynthesis in chicken granulosa cells in vitro*. Comp Biochem Physiol A, 104 (2), 279-281.

**Chacornac JP, Barnouin J and Raboisson T (1986)** *An autometed micro-method for the determination of ceruloplasmin in bovine and ovine plasma by measurement of oxidase activity*, Reprod Nutr Develop, 26 (2A), 417-427.

**Chang IC, Lee TP and Matrone G (1975)** *Development of ceruloplasmin in pigs during the neonatal growth period*, J Nutr, 105, 624-630.

**Chatterjee IB (1973)** *Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid*, Science, 182, 1271-1272.

**Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK and Subramanian N (1975)** *Synthesis and some major functions of vitamin C in animals*, Ann NY Acad Sci, 258, 24-47.

**Chattopadhyay R, Choudhury G and Sinra R (1972)** *Studies on the ascorbic acid content of blood plasma during different stages of oestrus cycle and early pregnancy in cross bred cows (Jersey x Haryana cross)*, Proc Session Indian Cong, 59 (4), 26-27.

**Chemineau P, Gauthier D, Poirier JC, Saumande J and Baril G (1982)** *Plasma levels of LH, FSH, Prolactin, Oestradiol-17- $\beta$  and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat*, Theriogenology, 17 (3), 313-321.

**Cheremisinow GA, Nezhdanov AG and Vlasov SA (1981)** *Biochemical values of blood in relation to reproduction function in cows*, Veterinariya, 4, 53-55.

**Chinoy NJ (1972)** *Ascorbic acid levels in mammalian tissues and its metabolic significance*, Comp Biochem Physiol, 42A, 945-952.

**Colombo JP Richterich R (1964)** *Zur bestimmung des caeruloplasmin im plasma*, Schweiz Med Wschr, 94, 715-720.

**Cunningham J, Leffell M, Mearkle P and Harmatz P (1995)** *Elevated plasma ceruloplasmin in insulin dependent diabetes mellitus : evidence for increased oxidative stress a variable complication..* Metabolism, 44 (8), 996-999.

**Çamaş H ve Ergun H (1985)** *Kuzuların kanında methemoglobin ve vitamin C değerleri ile glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine araştırmalar*, UÜ Vet Fak Derg, 4 (1-2-3), 35-41.

**Çetin M, Güneş N, Aydın L (1995)** *Gastrointestinal nematodlarla enfekte köpeklerin plazma vitamin C, seruloplazmin, total protein düzeylerindeki değişimler*, Veterinarium, 6 (1-2), 76-78.

**Çoyan K (1994)** *Evcil Hayvanlarda Seksüel Sikluslar*, In " Reproduksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite " Ed by E Alaçam, 25-36, Dizgivi Matbaacılık, Konya.

**Dabrowski K, Ciereszko RE, Blom JH, Ottebie JS (1995)** *Relationship between vitamin C and plasma concentrations of testosterone in female rainbow trout, oncorhynchus mykiss*, Fish Physiol and Biochem, 14 (5), 409-415.

**Das PC, Das KP, Bagchi K and Dey CD (1993)** *Evaluation of tissue ascorbic acid status in different hormonal states of female rat*, Life Sci, 52 (18), 1493-1498.

**Dawson EB, Harris WA and Powel LC ((1990) *Relationship between ascorbic acid and male fertility*, In " Aspects of Some Vitamins, Minerals and Enzymes in Health and Disease", Ed by GH Bourne, World Rev Nutr Diet, 62, 1-26. Karger Basel.**

**Eliçin A (1985) *Alman yerli merinosları ile siyah başlı etçi koyunlarda döl verimi ve bunu etkileyen faktörler üzerine araştırmalar*, AÜ Zir Fak Yayın No. 932, Ankara.**

**Endo T, Aten RF, Wang F and Behrman HR (1993) *Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in structural luteolysis.*, Endocrinology, 133 (2), 690-698.**

**England BG, Niswender GD and Midgley AR (1974) *Radioimmunoassay of estradiol 17 $\beta$  without chromatography*, J Clin Endoc Metab, 38 (1), 42-50.**

**Evans RM and Wiederanders G (1967) *Blood copper variations among species*, Amer J Physiol, 213, 1183-1185.**

**Evans RM, Currie L and Campbell A (1982) *Distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood in normal individuals and its relation to the plasma concentrations*, Br J Nutr, 47, 473-482.**

**Evsikov VI ve Belyaev DK (1978) *The role of embryonic and early fetal mortality in the control of the actual fertility in mammals*, Proc 7th Int Cong Anim Reprod A.I., 1, 595-598.**

**Finley EB, Cerklewski FL (1983) *Influence of ascorbic acid supplementation on copper status in young adult men*, Amer J Clin Nutr, 37 (4), 553-556.**

**Flores G, Amezcua R, Zarco L, Duccing L and Quispe T (1992) *Pregnancy diagnosis by progesteron determination on day 18 post service in the ewe. Comparison of radioimmunoassay and enzymeimmunoassay*, 12th Int Cong Anim Reprod, August 23-27, 45-47, The Hague, The Netherlands.**

**Frieden E (1978)** *Caeruloplasmin, a multifunctional metalloprotein*, In "Proceedings of the 3rd International Symposium on Trace Element metabolism in Man and Animals", 8-13, Ed by M Kirschgessner, Arbetskreis für Tierernaehrungsforschung Weihenstephen.

**Fylling P (1979)** *The effect of pregnancy, ovariectomy and parturition on plasma progesterone level in sheep*, Acta Endocrinol (Copenhagen), 65, 273-283.

**Gadsby JE, Heaf RB, Powell DG and Walters DE (1972)** *Diagnosis of pregnancy and of the number of foetuses in sheep from plasma progesterone concentrations*, Vet Res, 90, 339-342.

**Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS and Weissman G (1982)** *Ceruloplasmin an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals*, Ann NY Acad Sci, 389, 368-379.

**Gordon I (1983)** *The Control and Manipulation of Reproduction in Sheep*, In "Controlled Breeding in Farm Animals", 1. Ed, 155-217, Permagon Press, Oxford.

**Greer EB, Gardner IA and Wright GL (1987)** *Failure of dietary vitamin C supplementation to prevent seasonal infertility in pigs*, Aust J Exp Agric, 27, 343-347.

**Gutteridge JMC (1991)** *Plasma ascorbate levels and inhibition of the antioxidant activity of caeruloplasmin*, Clin Sci, 81 (3), 413-417.

**Haag W (1985)** *Zur Methodik und Praktischen Bedeutung der Vitamin C-Bestimmung beim Rind in Vergangenheit und Gegenwart*, Inaugural Dissertation, Justus Liebig Universitaet, Giessen.

**Hamon MH and Heap RB (1990)** *Progesterone and oestrogen concentrations in plasma of Barbary sheep (aoudad, Ammotragus lervia) compared with those of domestic sheep and goats during pregnancy*, J Reprod Fert, 90, 207-211.

**Hanck AB (1977)** *Vitamin C and lipid metabolism*, In "Re-evaluation of Vitamin C" Ed by A Hanck and G Ritzel, 287-288, Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien.

**Hare L and Bryant MJ (1982)** *Characteristics of estrus cycles and plasma progesterone profiles of young female sheep during their first breeding season*, Anim Prod, 35, 1-7.

**Horio F, Ozaki K, Kahmura M, Yoshida A, Makino S and Hayashi Y (1986)**  
*Ascorbic acid requirement for the induction of microsomal drug metabolizing enzymes in a rat mutant unable to synthesis ascorbic acid*, J Nutr, 116, 2278-2289.

**İmeryüz F (1979)** *Texel ve Türk merinosu Koyunlarının Önemli Verim Özellikleri Bakımından Kombinasyon İmkânları Üzerine Araştırmalar*, Lalahan Zoot Araşt Enst, Yayın No : 60, Ankara.

**Itze L (1983)** *Ascorbic acid metabolism in ruminants*, In "Ascorbic Acid in Domestic Animals", Ed by I Wegger, F Tagwerker, J Moustgaard, 120-130, The Royal Danish Agri Soc, Copenhagen.

**Jacop RA, Skala JH, Omaye ST, Tuinlung JR (1987)** *Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men*, J Nutr, 117, (12), 2109-2115.

**Jenkin G and Thorborn GD (1985)** *Inhibition of progesterone secretion by a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor in late pregnant sheep*, Can J Physiol Pharmacol, 63, 136-142.

**Johnson MH and Murphy CL (1988)** *Adverse effects of high dietary iron and ascorbic acid on copper status in copper deficient and copper adequate rats*, J Clin Nutr, 47 (1), 96-101.

**Jones I and Madej A (1988)** *A sensitive microtitre plate enzyme immunoassay of estradiol-17 $\beta$  in the cow and mare*, J Immunoassay, 9 (3-4), 349-365.

**Kanakiyo T (1968)** *Clinical studies on vitamin C in ruminants*, Bull Azabu Vet Coll Japan, 17, 71-112.

**Kitachi AE and West WH (1975)** *Effect of steroidogenesis on ascorbic acid content and uptake in isolated adrenal cells*. Ann NY Acad Sci, 258, 422-431.

**Kolb E, Wahren M, Dobelet G and Gründel G (1989)** *Untersuchungen über den Gehalt an Askorbinsäure in verschiedenen Geweben von Rindern, normal entwickelten Ferkeln, Graetschferkeln, adulten Schweinen sowie von Hunden*, Arch Exper Vet Med, Leipzig, 43 (3), 327-334.

**Kolb E, Dittrich G, Dobelet R, Schmalfuss T (1991)** *Untersuchungen über den Gehalt an β-Carotin, Vitamin E und Askorbinsäure im Blutplasma von weiblichen Kaelbern, Kühen, Bullen, Muchsen und Ochsen im Jahresverlauf*, Berl Münch Tierarztl Wschr, 104, 387-391.

**Kolb E (1992)** *Neuere Erkenntnisse zur Bedeutung der Askorbinsäure für Haustiere und zu ihrer Anwendung in der Veterinärmedizin*. Tierarztl Umschau, 47, 163-175.

**Kolb E, Lippmann R, Schwabe H, Kirbach H, Kricke A, Wahren M and Vallentin G (1993)** *Die Konzentration an Askorbinsäure, Gesamtprotein, alpha-Amino-N-Glucose, 3-Hydroxybutyrat und Cholesterol sowie die Aktivität der Adenosin-Desaminase im Plasma von Schafen in fünf verschiedenen Abschnitten der Trächtigkeit und der Gehalt an Askorbinsäure in 14 Geweben*, Berl Münch Tierarztl Wschr, 106, 10-14.

**Kolb E (1997)** *Die Bedeutung der Vitamine für die Fortpflanzung*, Roche, Leipzig.

**Koshner I (1982)** *The phenomenon of the acute phase response*, Ann NY Acad Sci, 389, 39-45.

**Kotak VC, Ambadkar PM (1985)** *Variations in ascorbic acid concentrations in liver, gonads, kidney and blood serum of Feral Blue Rock Pigeon (Columba Livia Gmelin) during the breeding and nonbreeding seasons*, Poultry Sci, 64 (3), 542-544.

**Küplülü Ş (1990)** *Plasentasyon ve Gebelik Süreci*, In "Theriogenology", Ed. E.Alacam, 97-109, Nurol Matbaacılık, Ankara.

**Lange MJ (1973)** *Vitamin C and fertility*, Lancet, 2, 860.

**Langford GA (1986)** *Influence of body weight and number of inseminations on fertility of progesterone-treated ewe lambs raised in controlled environments*. J Anim Sci, 62, 1058-1062.

**Leveille CR and Schwartz ER (1982)** *Effects of ascorbate on lysosomal enzyme activities in guinea pigs cartilage and adrenals*, Int J Vit Nutr Res, 52, 436.

**Lewin S (1976)** *Vitamin C*, In "Vitamin C: It's Molecular Biology and Medical Potential" 1-25, Academic Press, New York.

**Levine M (1986)** *New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid*, N Engl J Med, 314 (14), 892-902.

**Levine M and Morita K (1985)** *Ascorbic acid and endocrine systems*, In " Vitamins and Hormones" 42, 1-52.

**Ley WB (1985)** *Influence of the sire in early embryonic loss in Domestic Large Animals*, Cont Edu Art, 7 (4), 5277-5283.

**Liehr JG (1991)** *Vitamin C reduces the incidence and severity of renal tumors induced by estradiol or diethylstilbestrol*, Am J Clin Nutr, 54, 6 Suppl, 1256S-1260S.

**Lindsay DR (1991)** *Reproduction in the Sheep and Goats*, In "Reproduction in Domestic Animals", Ed by P.T. Cups, 491-515, Fourth Ed, Academic Press, California.

**Liso R, Calabrese G, Bitonti MB and Arrigoni O (1984)** *Relationship between ascorbic acid and cell division*, Exp Cell Res, 150, 314-320.

**Luck MR and Zhao Y (1993)** *Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development.*, J Reprod Fertil, 99, 647-652.

**Malinowska A (1986)** *Distribution of vitamin C in biological fluids and tissues of pregnant sows and their foetuses during pregnancy*, Medycyna Wet, 42 (4), 244-247.

**Mathews MS and Devi KS (1993)** *Effect of malathion, estradiol 17-beta and progesterone on ascorbic acid metabolism in prenatal rats and their pups*, Vet Hum Toxicol, 35 (1), 6-10.

**Mazumder A and Mazumder NK (1985)** *Serum PPD oxidase activity and some factor influencing the enzyme in crossbreed cattle (*Bos taurus x Bos indicus*)*, Ind J Anim Sci, 55 (8), 639-641.

**McDonald LE (1983)** *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Third Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.

**McDowell LR (1989)** *Vitamins in animal nutrition*. In " Animal Feeding and Nutrition" Ed by TJ Cunha, 365-387, Academic Press, San Diago.

**McPhee JM and Tiberghien MP (1987)** *Assesment of pregnancy in sheep by analysis of plasma progesterone using an amplified EIA technique*, Vet Rec, 121 (3), 63-65.

**Mc Pherson A (1984)** *Plasma ascorbic acid in sheep as affected by Co status*, In "Ascorbic Acid in Domestic Animals" Eds by Wegger I, FJ Tagwerke and J Mousgaard 148-151, Copenhagen.

**Metzler DE (1977)** *The chemical reactions of living cells*, In "Biochemistry", International Edition, Acad Press, New York-San Francisco-London.

**Meyer HHD (1986)** *Possible ways of improving enzymeimmunoassay (EIA) techniques and their application in animal production*, In "Proceedings of International Symposium

on the Use of Nuclear Techniques in Studies of Animal Production and Health in Different Environments", 293 (3), 255-262, IAEA, Vienna.

**Meyer HHD, Sauberwein H and Mutayoba BM (1990)** *Immunoaffinity chromatography and a biotin streptavidin amplified enzyme immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol 17 $\beta$* , J Steroid Biochem, 35 (2), 263-269,

**Milewich L, Chen GT, McDonald PC and Peterson JA (1981)** *Ascorbic acid inhibition of aromatase activity in human placental tissue*, J Steroid Biochem, 14, 185.

**Mohamed AR, Noakes DE, Booth JM and Chaplin V (1987)** *Plasma oestrone sulphate and progesterone concentrations in cows and ewes associated with fetal death and abortion.*, Br Vet J, 143, 238-245.

**Moore NW, Barrett S, Brown JB, Schindler I, Smith MA and Smith B (1969)** *Oestrogen and progesterone content of ovarian vein blood of the ewe during the oestrous cycle*, J Endocrinol, 44, 55-62.

**Mori Y and Kano Y (1984)** *Changes in plasma concentrations of LH progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*)*, J Reprod Fertil, 72, 223-230.

**Moser UK (1990)** *Physiology and metabolism of ascorbic acid, 3-16, In "Ascorbic Acid in Domestic Animals"*, Proceed 2nd Symp, Kartausse Ittingen, Switzerland.

**Nakajima Y, Momotani E, Murakami T, Ishikawa Y, Morimatsu M, Saito M, Suzuki H, Yasukawa K (1993)** *Induction of acute phase protein by recombinant human interleukin-6 (IL-6) in calves*, Vet Immunol Immunopathol, 35 (3-4), 385-391.

**Nephew KP, McClure KE, Ott TL, Dubois DH, Bazer FW and Pope, WF (1991)** *Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes*, Biol Reprod, 44, 536-539.

**Novoa C (1986)** *Interrelationships between source and level of progesterone and number of fetuses at different stages during pregnancy in sheep*, Dissert Abst Int B (Science and Engineering), 46, 2548-2553.

**Ogan MM (1988)** *Türk Merinosu Koyunlarının Büyüme, Döl ve Yapağı Verim Özelliklerine Ait Parametrelerin Tayini Üzerine Bir Araştırma*, Doktora Tezi, İÜ Vet Fak. İstanbul.

**Ogan MM, Deligözoglu F, Yavuz HM, Başpinar H, Akgündüz V ve Çelik İ (1994)** *Karacabey Merinosu koyunlarında tohumlama mevsimi ve sıfat öncesi farklı dizeylerde beslemenin döl verimine ve kuzu doğum ağırlığına etkileri*, Hayv Araşt Derg, 4 (2), 85-89.

**Osaki S, McDermott JA and Frieden E (1964)** *Proof for the ascorbat oxidase activity of ceruloplasmin*, J Biol Chem, 239, 3570-3575.

**Örkiz M (1972)** *Karacabey ve Konya Merinosu Koyunlarının Lalahan şartlarında adaptasyon durumları*, Lalahan Zoot Arşt Enst Derg, 15 (3-4), 56-72

**Örkiz M (1975).** *Karacabey ve Konya Merinosu Koyunlarının Orta Anadolu şartlarında adaptasyon durumları*, Lalahan Zoot Arşt Enst Derg, 15 (3-4), 56-72

**Padh H (1991)** *Vitamin C : Newer Insights into its biochemical functions*, Nutr Rev, 49 (3), 65-70.

**Parr RA (1992)** *Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep*, Reprod Fertil Dev, 4, 297-300.

**Pascu T, Suteanu MU and Lunca H (1970)** *Concentration de la vitamine C dans le liquide folliculaire normal, pendant les différentes phases du cycle oestral et dans le liquide des kystes ovariens (folliculaire et luteiniques), ainsi que dans le sang des mêmes vaches*, Rec Med Vet, 146, 1021-1029.

**Pathiraja N, Oyedipe EO, Gyang EO and Obasi A (1991)** *Plasma progesterone levels during oestrous cycle and their relationship with the ovulation rate in Red Sokoto (Maradi) Goats*, Br Vet J, 147 (1), 57-62.

**Pekiner B and Nebioğlu S (1994)** *Effect of vitamin C on copper and iron status in men and guinea pigs*, J Nutr Sci and Vitaminol, 40 (5), 401-410.

**Pintauro SJ and Bergan JG (1982)** *Effects of ascorbic acid on in vitro steroidogenesis in guinea pigs*, J Nutr, 112 (3), 584-591.

**Powers HJ, Loban A, Silvers K and Gibson AT (1995)** *Vitamin C concentrations observed in premature babies inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin*, Free Radic Res, 22 (1), 57-65.

**Prakash BS, Meyer HHD, Schallenberger E and Van de Wiel DFM (1987)** *Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique*, J Steroid Biochem, 28 (6), 623-627.

**Prakash BS, Meyer HHD and Van de Wiel DFM (1988)** *Sensitive enzymeimmuno assay (EIA) of progesterone in skim milk using second antibody technique*, Anim Reprod Sci, 16, 225-235.

**Quirke JF, Hanrahan JP and Gosling JP (1979)** *Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates*, J Reprod Fertil, 55, 37-44.

**Rhinds M, Chesworth JM and Robinson J (1978)** *A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in the relationship between two hormones*, J Reprod Fertil, 52, 79-81.

**Rivers JM and Devine MM (1975)** *Relationships of ascorbic acid to pregnancy and oral contraceptive steroids*, Ann NY Acad Sci, 258, 465-482.

**Rosenkrans CP, Parda BC, Davis DL, Millikon G (1990)** *In vitro synthesis of prostaglandin E and F<sub>2</sub>α by pig endometrium in the presence of estradiol, catechol, estrogen and ascorbic acid*, J Anim Sci, 62 (2), 435-443.

**Ruckebusch DVM, Phaneuf LP, Dunlop R (1991)** *Ovarian hormones. In "Physiology of Small and Large Animals"*, BC Decker, Philadelphia.

**Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW and Aust SD (1989)** *Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin*, J Biol Chem, 264 (1), 21-26.

**Sandholm MT, Honkanen-Bzalski and Rasi V (1979)** *Prevention of navel bleeding in piglets by preparturient administration of ascorbic acid*. Vet Rec, 104, 337-340.

**Sandnes K and Braekkan OK (1981)** *Ascorbic acid and the reproductive cycle of ovaries in Cod (Gadus Morrhua)*. Exp Biochem J , 44, 545-546.

**Sarda IR, Robertson HA and Smearton TC (1973)** *Sequential changes in plasma progesterone levels in the estrous cycle and during pregnancy in intact and ovariectomized sheep*, Can J Anim Sci, 53, 25-34.

**Sawada M and Carlson JC (1991)** *Rapid plasma membrane changes in superoxide radical formation, fluidity and phospholipase A<sub>2</sub> activity in the corpus luteum of the rat during induction of luteolysis*, Endocrinol, 128, 2992-2998.

**Serpek B (1983)** *Koyun kan serumlarında bakır ve seruloplazmin konsantrasyonları üzerine çalışmalar*, İÜ Vet Fak Derg, 9 (1), 47-64.

**Serpek B, Aslan V, Tuncer ŞD, Ateş M (1989a)** *İshalli buzağılarda serum vitamin C ve seruloplazmin düzeyleri ile vitaminin tedaviye etkisi*, LHAED, 29 (1-4), 37-52.

**Serpek B, Başpinar N, Soysal S (1989b)** *Konya ili ve çevresinde yetişirilen koyunlarda hipokuprozis tanısı ve tedavisi amacıyla serum seruloplazmin konsantrasyonlarının saptanması*, İÜ Vet Fak Derg, 15 (2), 1-7.

**Sheldrich EL and Flint AP (1989)** *Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum*, J Endocrinol, 122, 313-322.

**Sheton M (1980)** *Goats : Influence of various exteroceptive factors on initiation of oestrus and ovulation*. Int Goat and Sheep, 1, 156-162.

**Shimada O and Yasuda H (1979)** *Lipid peroxidation and its inhibition by tinoridine. I. Lipid peroxidation-induced disintegration of microsomal membrane and cytochrome P-450 in rat liver*, Biochem Biophys Acta, 489, 163-172.

**Sissan MA, Menon VP and Leelamma S (1995)** *Effects of low-dose oral contraceptive oestrogen and progestin on lipid peroxidation in rats*, J Int Med Res, 23 (4), 272-278.

**Sönmez R ve Kaymakçı M (1987)** *Koyunlarda Dölverimi*, Ege Ü Zir Fak Yayımları, No: 404. İzmir.

**Sulu N, Özsar S, Güven B ve Bağcı C (1993)** *Sakız koyunlarında progesteron ve östron sülfat diizeyleri*, Doğa-Tr J Vet Anim Sci, 17, 9-17.

**Tamanini C, Chiesa F, Prandi A and Galeati G (1986)** *Estrone and estrone conjugate plasma levels throughout pregnancy in the goats. Their determination as a pregnancy diagnosis test*, Anim Reprod Sci, 11, 35-42.

**Tepperman J and Tepperman HM (1987)** *Reproductive endocrinology*, In "Metabolic and Endocrine Physiology", 127-156, Year Book Medical Publishers, London.

**Thoma WJ and Henderson LM (1984)** *Effect of vitamin C deficiency on hydroxylation of trimethylaminobutyrate to carnitine in the guinea pig*, Biochim Biophys Acta, 797, 136-139.

**Tijssen P (1992)** *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, In "Laboratory Techniques In "Biochemistry and Molecular Biology", Eds RH Burton, P H Van Knippenberg, vol. 15, Elsevier, Amsterdam.

**Tolbert BM (1979)** *Ascorbic acid metabolism and physiological function*, In : "Vitamin C Recent Advances and Aspects in Virus Diseases Cancer and in Lipid Metabolism" Eds A Hanc, G Ritzel, Int J Vitam Nutr Suppl, 19, 127-142.

**Tsang CPW (1978)** *Plasma levels of estrone sulphate free estrogens and progesterone in the pregnant ewe throughout gestation*, Anim Res Inst Conct, 10, 97-110.

**Tsuji M, Ito Y, Fukuda H, Terada N, Mori H (1989)** *Aromatase activity and progesterone metabolism in ovaries of scorbutic mutant rats unable to synthesis ascorbic acid*, Int J Vitam Nutr Res, 4, 353-359.

**Van de Wiel DFM and Koops W (1986)** *Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma*, Anim Reprod Sci, 10, 201-213.

**Van de Wiel DFM, Visscher AH and Dekker TP (1976)** *Use of a radioimmunoassay of plasma progesterone for predicting litter size and subsequent adaptation of feeding level in sheep*, 547- 553., In "Nuclear Techniques in Animal Production and Health", Int Atomic Agency, Vienna.

**Ward WR (1986)** *The breeding season and the estrous cycle*, In " Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Diseases in Small and Large Animals", 846-850, Ed by DA Morrow, WB Saunders Company, Philadelphia.

**Ward SJ and Williams HL (1993)** *Ovarian activity and fertility during the first breeding season of friesland ewe lambs*, Br Vet J, 149, 269-275.

**Webster G M and Haresing W (1983)** *Seasonal changes in LH and Prolactin concentrations in ewes of two breeds*, J Reprod Fertil, 67, 465-471.

**Wegger I, Palludan B (1984)** *Ascorbic acid status of swine. Genetic and developmental variations*, In "Ascorbic Acid in Domestic Animals" Eds by Wegger I, FJ Tagwerke and J Mousgaard 148-151, Copenhagen.

**Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J (1984)** *Ascorbic acid in domestic animals*, Workshop, Roy, Danish Agric Soc, Copenhagen.

**Wegger I, Palludan B (1994)** *Vitamin C deficiency causes hematological and skeletal abnormalities during fetal development*, J Nutr, 124, 241-248.

**Weigl RM, Tilton JE, Haugse CN, Light MR and Buchanan ML (1975)** *Pregnancy diagnosis in the ewe. II. Plasma progesterone levels*, ND Farm Res, 33, 11-13.

**Wenk C, Fenster R, Völker L (1992)** Ascorbic acid in domestic animals, Proceed 2nd Symp, 527, Ittingen.

**Wise T (1987)** *Biochemical analysis of bovine follicular fluid : Albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of oestrous cycle*, J Anim Sci, 64 (4), 1153-1169.

**Yen JT and Pond WG (1981)** *Effect of dietary vitamin C addition on performance, plasma vitamin C and hepatic iron status in weaning pigs*, J Anim Sci, 53, 1292-1294.

**Yen JT and Pond WG (1983)** *Response of swine to periparturient vitamin C supplementation*, J Anim Sci, 56 (3), 621-624.

**Yenson M (1984)** *Vitaminler ve Biyofonksiyonları*, 637-640., "İnsan Biyokimyası". 5. Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul.

**Yu HK, Cabalum T, Jansen CAM, Buster JE and Nathanielsz PW (1983)** *Androstenedion, testosterone, and estradiol concentrations in fetal and maternal plasma in late pregnancy in the sheep*, Endocrinology, 113 (6), 2216-2220.

**Zerobin K (1985)** *Biologie und Pathophysiologie Der Fortpflanzung*, Ders Notları, Zürich.

## **9. ÖZGEÇMIŞ**

1969 yılında İzmir'de doğdu. İlk öğrenimini Merzifon ve Eskişehir'de, orta öğrenimini Bursa'da tamamladıktan sonra, 1986 yılında A.Ü. Veteriner Fakültesini kazandı ve 1991 yılında mezun oldu. 1992 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi'nde açılan sınavı kazanarak araştırma görevlisi olarak atandı. Halen aynı görevi sürdürmektedir.

Evli ve bir çocuk babasıdır.



## **10. TEŞEKKÜR**

Doktora tezi süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Eski Başkanı Prof. Dr. Leyla Kalaycıoğlu ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr Mehmet Nizamlioğlu'na, öğretim üyeleri Doç. Dr. Nuri Başpinar ve Yard. Doç. Dr. Firuze Kurtoğlu'na, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarına içtenlikle teşekkür ederim.

Hayvan materyali sağlanmasında gerekli kolaylığı sağlayan Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Recep Ergül'e, yardımcılarını esirgemeyen Koyunculuk Ünitesi çalışanlarına ve İnjacom C temin edilmesinde katkılarından dolayı Roche Firması yetkilileri ile S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Hüseyin Erdem'e şükranlarımı sunarım.