

KISRAKLARDA GEBELİĞİN OVULASYON FİKSASYON ARASI DÖNEMDE PLAZMA OKSİDAN/ANTIOKSİDAN SEVİYELERİ

Nurettin Aydilek¹@ M. Osman Atlı² Hayrettin Çetin³ Hüdayi İpek¹

Plasma Oxidant/Antioxidant Status in Period from the Day of Ovulation until Embrional Fixation Day of Pregnancy in Mares

Özet: Bu çalışmada, kısırlarda gebeliğin fiksasyona kadar olan döneminde plazma 17 β östradiol ve progesteron hormon profilleri, oksidan/antioksidan seviyeleri ve bunlar arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amaçlandı. Bunun için 12 adet safkan kısıraktan ovulasyon günü (0. gün), gebeliğin 5., 10. ve 16. günlerinde kan numuneleri alındı. Plazma 17 β östradiol, progesteron konsantrasyonları ile oksidan (malondialdehit; lipid peroksidasyon indeksi) ve antioksidan (E vitamini, β -karoten, glutatyon, katalaz, glutatyon peroksidaz) değerleri ölçüldü. 17 β östradiol seviyesi ovulasyondan sonraki günlerde düşerken ($p<0.05$), progesteron seviyesinin giderek yükseldiği ($p<0.05$) görüldü. Plazma malondialdehit seviyesindeki artış 5. ve 16. günlerde önemli bulundu ($p<0.05$). E vitamini haricindeki diğer antioksidan parametrelerin ise genellikle tedricen artarak 16. günde ovulasyon gününe kıyasla önemli derecede yüksek ($p<0.05$) olduğu gözlemlendi. Ayrıca, plazma malondialdehit ve 17 β östradiol konsantrasyonları arasında önemli bir negatif korelasyon ($r=-0.50$) olduğu görüldü. Sonuç olarak, kısırlarda gebeliğin fiksasyona kadar olan döneminde plazma malondialdehit seviyesinde genel bir artış görülürken, buna karşı β -karoten ve glutatyon konsantrasyonları ile glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinin arttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Oksidan, Erken gebelik, Kısırak

Summary: This study was conducted to investigate plasma estradiol 17 β and progesteron profiles, oxidant/antioxidant status and the relationship among these parameters during the period from the day of ovulation until embrional fixation day in mares. Blood samples were collected on the day of ovulation (d=0) and on days 5, 10, and 16 of pregnancy in 12 purebred mares. Plasma was analyzed for oxidant (malondialdehyde, index of lipid peroxidation) and antioxidants (Vitamin E, β -carotene, glutathione, catalase, glutathione peroxidase) values. Estradiol 17 β level decreased after ovulation while, progesteron level gradually increased ($p<0.05$). Plasma malondialdehyde level on days 5 and 16 of pregnancy significantly were higher than d 0 ($p<0.05$). Plasma antioxidant parameters except for vitamin E gradually increased and this increase on 16th day was significantly higher than on day of ovulation day. Moreover, a negative correlation was observed ($r=-0.50$) between the plasma estradiol 17 β and malondialdehyde concentrations. In conclusion, plasma malondialdehyde level generally increased, however the concentrations of β -carotene, glutathione and activities of glutathione peroxidase and catalase parallelly increased during the period from the day of ovulation until embrional fixation day in mares.

Key Words: Antioxidant, Oxidant, Early pregnancy, Mare

Giriş

Kısırlarda östrüste tohumlanma ile başlayan daha sonra ovulasyon, fertilizasyon, embriyonal kesenin oviduktan uterus içine taşınması, embriyonal kesenin uterus içinde migrasyonu ve fiksasyona kadar geçen ilk 16 gün, gebelikte maternal kabulü de içine alan bir dönemdir. Embriyonik kayıpların

bir kısmının (%30) bu dönemde görülmesi nedeniyle gebeliğin en kritik safhasıdır (Ball, 1993).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir. Süperoksit, hidroksil, peroksil ve hidroperoksil anyonları vücutta üretilen başlıca radikaller olup, kararsız yapılarından dolayı oldukça reaktif moleküllerdir. Bun-

lar canlılardaki normal fizyolojik süreçlerde bol miktarda üretilirler. Diğer taraftan bu radikallerin oluşturacağı hasarı önlemek için vücutta çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri, β -karoten ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı kimyasal maddeler ile süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz, organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H_2O_2 'yi suya indirgeyen katalaz (CAT) gibi enzimlerden oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1996). Normalde serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Bu dengenin oksidanlar lehine kayması sonucu oksidatif stres gelişir. Oksidatif stres hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olur. Özellikle lipidlerin oksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon olup geri dönüşümsüz membran hasarı, hücre ölümleri ve mutasyonlar sonucu kanser, diyabet, atheroskleroz ve pre-eklempsia gibi birçok hastalığa neden olabilir (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller diğer organ ve sistemlerde olduğu gibi reproduktif sistemdeki birçok fizyolojik ve patolojik süreçte de rol alırlar. Bu radikaller özellikle luteal fonksiyonlar, ovarial steroidogenezis, ovulasyon, luteolizis, fertilizasyon, oosit maturasyonu, embriyo gelişimi, gebeliğin sonraki aşamaları ve doğumda önemli rol oynar (Agarwal ve ark., 2005). Örneğin, prenatal dönemde embriyo için toksik ve terotojenik olan bu radikallerin embriyo fragmentasyonu, DNA tahribatı ve apoptozise neden olarak gebelik oranını azalttığı bildirilmektedir (Sharma ve Agarwal, 2004). Kısaca, serbest radikaller genital kanalda başarılı fertilizasyon ve implantasyonu etkileyen önemli faktörlerden biridir. Diğer taraftan insan ve bazı hayvan türlerinde östrojen ve progesteronun bazı oksidan ve antioksidan parametreleri etkilediği, bunun sonucu olarak da seksüel siklus ve gebelik gibi fizyolojik süreçlerdeki hormonal değişimlerden dolayı antioksidan sistemde değişimlerin görülebileceği bildirilmektedir (Serviddio ve ark., 2002; Lapointe ve Bilodeau, 2003).

Kısırlarda gebeliğin fiksasyona kadar ki safhasında plazma hormon profili ortaya konulmasına rağmen, aynı dönemdeki plazma oksidan/antioksidan sisteminin durumu ve bu sistemin hormonlarla arasındaki etkileşim bilinmemektedir. Bu nedenle kısırlarda gebeliğin kritik bir safhası olan ilk 16 günde plazmadaki 17β östradiol ve progesteron hormon konsantrasyonları, oksidan/

antioksidan dengesi ve bu parametreler arasındaki etkileşimin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, oksidan olarak lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonu, antioksidan olarak ise GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ile GSH, β -karoten ve E vitamini konsantrasyonları ölçüldü.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali olarak klinik muayenelerde herhangi bir fonksiyonel ve enfeksiyöz infertilite sorunu olmayan 5-15 yaşlı 12 adet safkan kısırak kullanıldı. Östrüs tespiti, ultrasonografik muayenede (6-8 MHz Transrektal prob, Pie medical 100 LC) ovaryumlar üzerinde ≥ 30 mm follikül ve endometrial ödemleşmenin tespiti, spekulum muayenesinde vagina mukozasının pembe, ödemli olması ve serviks önünde ipliksi bir sıvı görülmesi, ayrıca aygır muayenesine pozitif reaksiyon kriterleri kullanılarak yapıldı. Östrüste olduğu tespit edilen kısıraklar fertilitate kayıtları bilinen aygırlarla sadece bir defa çiftleştirildi. Çiftleştirmeyi takiben ovulasyonu uyarmak için hCG (Pregnyl, 3000 IU, i.m.) uygulandı. Ovulasyon, 24 saat ara ile yapılan muayeneler ile tespit edildi ve ovulasyon günü 0. gün olarak ($d=0$) kabul edildi. Çalışma planına uygun olarak ovulasyon gününde (0. gün), embriyo oviduktta iken (5. gün), uterus içerisinde anti-luteolizis oluşturmak için migrasyon yaptığı dönemde (10. gün) ve muhtemel fiksasyon gününde (16. gün) olmak üzere 4 defa kan numunesi alındı. Kısırakların gebeliği 12. günde transrektal olarak ultrasonografi ile belirlendi ve gebeliğin devamı 22. günde aynı yöntemle doğrulandı.

Alınan kanların bir kısmı santrifüj edilerek plazmaları çıkarıldı ve analiz gününe kadar $-80^\circ C$ 'de muhafaza edildi. Geri kalan kan numunelerinde ise immunassay analizörde (Roche, Elecsys 1010) ticari kitler (Elecsys reagent kit) kullanılarak 17β östradiol ve progesteron seviyeleri ölçüldü. Plazmadaki lipid peroksidasyon seviyesi, Matkovics ve ark. (1988) tarafından modifiye edilen Placer ve ark. (1966) metodu ile tespit edildi. Oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon değerleri, malondialdehit (MDA) olarak ifade edildi. GSH-Px aktivitesi, Lawrence ve Burk (1976)'un bildirdiği metoda, CAT aktivitesi ise Goth (1991)'un bildirdiği metoda göre spektrofotometrik (Janway 6100) olarak ölçüldü. GSH analizi, Sedlak ve Lindsay (1968)'in metoduna göre yapıldı. E vitamini konsantrasyonu, Desai (1984)'nin bildirdiği metotta, β -karoten kon-

santrasyonu ise Suzuki ve Katoh (1990) tarafından bildirilen metoda göre ölçüldü. Protein analizlerinde Lowry ve ark. (1951)'in metodu kullanıldı.

İstatistiksel analizler SPSS (10.0) programı ile yapıldı. Zamana bağlı değişimler, tekrarlı ölçümlerde tek faktörlü varyans analizi ve LSD (en küçük fark) çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. Parametreler arasındaki ilişkiler ise Pearson korelasyon analizi ile tespit edildi.

Bulgular

Kısırların tamamının 12. ve 22. günde yapılan ultrasonografik muayenelerde gebe oldukları görüldü. Kısırlarda ovulasyon (0.) günü ve bunu takip eden 5., 10. ve 16. günlerde plazma 17 β östradiol ve progesteron konsantrasyonları ile plazmadaki oksidan (MDA) ve antioksidan (GSH, β -karoten, E vitamini konsantrasyonları ve GSH-Px, CAT enzim aktiviteleri) parametrelerine ait ortalamalar Tablo 1'de, bu parametreler arasındaki korelasyon katsayıları ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Kısırlarda gebeliğin fiksasyona kadarki döneminde plazma 17 β östradiol, progesteron hormonları ile oksidan/antioksidan seviyeleri (ortalama \pm standart sapma)

	0. Gün	5. Gün	10. Gün	16. Gün
17 β Östradiol (pg/ml)	56.9 \pm 15.7 a	42.46 \pm 7.64 bc	48.95 \pm 11.77 ac	43.99 \pm 12.56 b
Progesteron (ng/ml)	0.04 \pm 0.0081 a	6.08 \pm 1.59 b	6.08 \pm 1.59 b	9.62 \pm 2.49 c
MDA (μ mol/L)	0.72 \pm 0.12 a	0.90 \pm 0.09 b	0.83 \pm 0.09 ab	0.86 \pm 0.1 b
GSH (μ mol/L)	0.017 \pm 0.007 a	0.019 \pm 0.007 ab	0.019 \pm 0.006 ab	0.020 \pm 0.007 b
β -Karoten (μ mol/L)	1.02 \pm 0.22 a	1.44 \pm 0.68 ab	1.52 \pm 0.58 b	1.6 \pm 0.46 b
E Vitamini (μ mol/L)	7.44 \pm 2.35	7.15 \pm 2.39	6.95 \pm 2.33	6.98 \pm 1.87
GSH-Px (IU/gr protein)	9.7 \pm 2.09 a	10.61 \pm 2.04 a	10.94 \pm 2.06 a	11.1 \pm 2.81 b
Katalaz (kU/L)	24.09 \pm 3.80 a	27.91 \pm 4.99 ab	29.56 \pm 5.57 ab	30.55 \pm 5.56 b

MDA: Malondialdehit, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

a,b; Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (p<0.05)

Tablo 2. Kısırlarda gebeliğin fiksasyona kadarki döneminde plazma 17 β östradiol, progesteron hormonları ile oksidan/antioksidan parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları

Değişkenler	17 β							
	Östradiol	Progesteron	MDA	GSH	β -Karoten	E Vitamini	GSH-Px	Katalaz
17 β Östradiol	1,0							
Progesteron	-,232	1,00						
MDA	-,506**	,315	1,00					
GSH	-,428*	,267	,239	1,00				
β -Karoten	-,246	,484**	,427*	,163	1,00			
E Vitamini	,120	,050	,039	-,069	,043	1,00		
GSH-Px	-,213	,388*	,184	,857**	,233	,043	1,00	
Katalaz	,193	,451*	-,135	,024	-,099	,009	,124	1,00

MDA: Malondialdehit, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

*: p<0.05

** : p<0.01

Tartışma ve Sonuç

Kısıraklarda gebeliğin fiksasyona kadar olan döneminde hormon profili incelendiğinde (Tablo 1), 17 β östradiol seviyesinin ovulasyondan sonraki günlerde (10. gün hariç) önemli derecede düşük olduğu görüldü. Progesteron seviyesi ise 5. günde yükseldikten ($p<0.05$) sonra 10. güne kadar sabit kalmıştır. Normal östrus siklusunda tekrar düşmesi beklenen progesteron seviyesinin 16. günde de yükselmeye devam ettiği görülmüştür ($p<0.05$).

Çalışmamızda lipit peroksidasyon seviyesinin (MDA) dalgalı bir seyir takip ettiği görüldü. Özellikle 5. günde önemli yükselişten ($p<0.05$) sonra 10. günde düşme eğilimine giren MDA seviyesi 16. günde tekrar yükselmiştir ($p<0.05$). MDA seviyesindeki bu dalgalanmaların bir kaç sebebi olabilir. Özellikle E vitamini gibi fenol hidroksil hal-kasına sahip östrojen hormonu, peroksil radikallerine bir H⁺ iyonu vererek güçlü bir antioksidan etkinlik göstermiş olabilir (Sugioka ve ark., 1987). Diğer taraftan gebelik sırasında lipit metabolizması da hormonal değişimlere karşı oldukça hassastır. Özellikle oksidasyona oldukça duyarlı düşük yoğunluklu lipoprotein seviyesindeki hormonal değişimlere bağlı dalgalanmalar da MDA seviyesindeki değişimin bir nedeni olabilir (Winkler ve ark., 2000). Subbiah ve ark. (1993), equilin gibi kısırak östrojenlerinin insanlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirmektedir. Diğer taraftan Yağ ve Komura (1986), östrojenlerin rat karaciğerinde lipit peroksidasyonu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, kısıraklarda plazma 17 β östradiol ve lipit peroksidasyon seviyesi arasında önemli bir negatif korelasyonun ($r = -0,506$, $p<0.05$) bulunması da yukarıdaki sonuçları destekler niteliktedir (Tablo 2).

Glutasyon peroksidaz, organik hidroperoksitleri, CAT ise H₂O₂'i zararsız bileşiklere indirgeyerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan antioksidan enzimlerdir (Akkuş, 1995). Çalışmamızda kısıraklardaki GSH seviyesi ile GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ovulasyondan itibaren tedricen arttığı ve 16. günde artışın ilk güne kıyasla önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür (Tablo 1). Normal şartlarda MDA seviyesinin artmasıyla birlikte GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerinin azalması beklenir. Antioksidan enzim aktivitelerindeki böyle azalmalar, serbest radikallere duyarlı olan bu enzimlerin inaktivasyonu olarak değerlendirilir (Godin ve ark., 1988). Bu çalışmada ise beklenen aksine, önemli bir korelasyon olmamakla birlikte MDA seviyesine paralel olarak GSH seviyesi ve GSH-Px aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum

lipit peroksidasyonu artışına karşı GSH-Px enzim aktivitesinin kompensatuar antioksidatif cevabı olarak değerlendirilebilir (Godin ve ark., 1988). Ayrıca bu sonuçlar Ohwada ve ark. (1996)'ın progesteron uygulamalarının rat endometriumunda GSH-Px aktivitesini artırırken, östradiolün ise tersine azalttığını bildiren sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Kısırak plazmasında progesteron ile GSH-Px ($r=0.388$) ve CAT ($r=0,451$) aktiviteleri arasındaki korelasyonun varlığı da bununla izah edilebilir (Tablo 2).

Glutasyon, bol miktarda tiyol ihtiva eden düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptittir. GSH, dokularda açığa çıkan hidroperoksitler, H₂O₂ ve birçok toksik maddenin detoksifikasyonunda görev alır. Ayrıca GSH-Px enziminin kofaktörü olarak görev yapar ve okside olarak tüketilir (Halliwell ve Gutteridge, 1996). Kısırak plazmasındaki GSH konsantrasyonunun tedrici artışı, yine artan lipit peroksidasyona karşı dengeleyici bir tepki olarak düşünülebilir. Ayrıca, en önemli GSH kaynağı olan karaciğerde hormonal değişimler sonucu GSH sentezinin artırılması da söz konusudur. Ruiz-Larrea ve ark. (1993), östradiolün rat hepatositlerinde GSH konsantrasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Kısıraklarda yapılan bu çalışmada da 17 β östradiol ve GSH seviyesi arasında önemli bir negatif ilişki ($r=-0.428$, $p<0.05$) yukarıdaki sonucu desteklemektedir (Tablo 2).

A vitamini prekürsörü olan β -karoten, düşük oksijen basınçlarında güçlü bir antioksidan etkinlik gösterir. Serbest radikallerle reaksiyona girerek okside olan β -karoten, E vitamini tarafından tekrar düzülte edilir (Sies ve ark., 1992). Kısıraklarda yapılan bu çalışmada, ovulasyondan itibaren plazma β -karoten seviyesi giderek artmış ve 10-16. günlerdeki artışlar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca plazma β -karoten seviyesindeki bu artışın progesteron seviyesindeki artışla korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($r=0.484$, $p<0.01$). Benzer şekilde Haliloğlu ve ark. (2002)'in ineklerde yaptıkları çalışmada östrüs, metaöstrüs ve diöstrüs boyunca plazma progesteron ve β -karoten seviyesinin birbirine paralel olarak giderek arttığı ve gebelikte de bu artışın devam ettiği bildirilmektedir. Bir çok çalışmada β -karoten uygulamalarının plazma progesteron seviyesini artırdığı ve korpus luteumu oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (Weng ve ark., 2000). Fakat normal gebelikte görülen progesteron konsantrasyon artışını β -karoten seviyesindeki artışa bağlamak doğru olmayabilir. Aksine, Adams ve ark. (1981)'in progesteron uyguladıkları domuzların uterusunda A vitamini

konsantrasyonu arttığı gibi, kısırak plazmasındaki β -karoten konsantrasyonundaki artış da progesteron seviyesindeki yükselişe bağlı olabilir. Veya β -karoten seviyesindeki bu artış, oksidatif hasara karşı β -karotenin kompensatuar bir cevabı olarak değerlendirilebilir.

Kısırlardaki plazma E vitamini seviyesinde istatistiksel olmasa da bir düşme eğilimi görülmüştür. Bu eğilim, vücutta oksidatif hasara karşı ilk savunma hattını oluşturan E vitamininin öncelikli kullanılması sonucu olabilir.

Sonuç olarak, gebeliğin fiksasyona kadar olan döneminde lipit peroksidasyon seviyesinde önemli artış görülürken, buna karşı β -karoten ve GSH konsantrasyonları ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri artmıştır. Ayrıca, 17β östradiolün antioksidatif etkinliği bu çalışmada da görülmüş ve bu dönemdeki hormonal değişimlerin oksidan/antioksidan değerleri üzerinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

Adams, K.L., Bazer, F.W., Roberts, R.M. (1981). Progesterone-induced secretion of a retinol binding protein in the pig uterus. *J. Reprod. Fertil.*, 62, 39-47.

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 3: 28.

Akkuş, İ. (1995). "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri". Mimoza Yayınları, Konya.

Ball, B.A. (1993). Embryonic Death in Mares. In "Equine Reproduction", Ed., A.O. Mckinnon, J.L., Voss. Lea & Febiger, Philadelphia.

Desai, I.D. (1984). Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods Enzymol.*, 105, 138-147.

Godin, D.V., Saleh, A.W., Mauren, E.G., Goumeniauk, A.D. (1988). Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 223-231.

Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.*, 196, 143-57.

Haliloglu, S., Baspınar, N., Serpek, B., Erdem, H., Bulut, Z. (2002). Vitamin A and β -carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 96-99.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1996). "Free Radicals in Biology and Medicine". Clarendon Pres, Oxford.

Lapointe, J., Bilodeau, J.F. (2003). Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 68, 1157-1163.

Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., 71, 952-958.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin- phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Matkovic, B., Szabo, L., Varga, I.S. (1988). Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laborat. Diagn.*, 15, 248-249.

Ohwada, M., Suziki, M., Sato, I., Tsukamoto, H., Watanabe, K. (1996). Glutathione peroxidase activity in endometrium: effect of sex hormones and cancer. *Gynecol. Oncol.*, 60, 277-282.

Placer, Z.A., Cushmann, L.L., Johnson, B.C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16, 359-364.

Ruiz-Larrea, M.B., Garrido, M.J., Lacort, M. (1993). Estrogen-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes. *J. Biochem.*, 113, 563-567.

Sedlak, J., Lindsay, R.H.C. (1968). Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellmann's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205.

Serviddio, G., Loverro, G., Vicino, M., Prigigallo, F., Grattagliano, I., Altomare, E., Vendemiale, G. (2002). Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 2843-2848.

Sharma, R.K., Agarwal, A. (2004). Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reprod. Med. Biol.*, 3, 177-199.

Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R. (1992). Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta carotene and other carotenoids. *Ann. NY.Acad. Sci.*, 669, 7-20.

Subbiah, M.T.R., Kessel, B., Agrawal, M., Rajan, R., Abplanalp, W., Rymaszewski, Z. (1993). Antioxidant potential of specific estrogen on lipid peroxidation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 1095-1097.

Sugioka, K., Shimosigawa, Y., Nakano, M. (1987). Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipids peroxidation. *Febs Letters*, 210, 37-39.

Suzuki, J., Katoh, N. (1990). A simple and cheap method for measuring vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 52, 1282-1284.

Weng, B.C., Chew, B.P., Wong, T.S., Park, J.S., Kim, H.W., Lepine, A.J. (2000). β -carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *J. Anim. Sci.*, 78, 1284-1290.

Winkler, K., Wetzka, B., Hofmann, M.M., Friedrich, I., Kinner, M., Baumstark, M.W., Wieland, H., Marz, W., Zahradnik, H.P. (2000). Low density lipoprotein (LDL) subfractions during pregnancy: accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 4543-4550.

Yagi, K., Komura, S. (1986). Inhibitory effect of female hormones of lipid peroxidation. *Biochem. Internat.*, 13, 1051-1055.