

## İNEKLERDE SEKSÜEL SIKLUSUN ÇEŞİTLİ EVRELERİNDE DOMİNANT VE SEKONDER FOLLİKÜL SIVILARINDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DENGİNİN BELİRLENMESİ

Hacı Ahmet ÇELİK<sup>1\*</sup> Aziz BÜLBÜL<sup>2</sup> Gülcan AVCI<sup>3</sup> İbrahim AYDIN<sup>4</sup> İsmail KÜÇÜKKURT<sup>3</sup>

**Determination of oxidant-antioxidant balance in dominant and secondary follicular fluids at various stages of estrous cycle in cows.**

### SUMMARY

In the present study, we aimed to determine oxidant-antioxidant levels in dominant and secondary follicular fluids of cows at various cycle periods. Ovaries obtained from 60 Holstein cows aged between 4–6 which had been brought into a private slaughterhouse, constituted the material of the study. Estrous cycle was divided into follicular phase (n=13), early (n=17), mid (n=16), and late (n=14) luteal phase groups depending on the postmortem examination of ovaries and plasma estrogen-progesterone levels. Dominant and secondary follicular fluids in ovaries were aspirated. At the end of the study, Glucose, Vitamin A,  $\beta$ -Carotene, Nitric Oxide, Malondialdehyde, and Antioxidant Activity levels were not the same in dominant and secondary follicular fluids of different cycle phases. Moreover, significant differences were found even between dominant and secondary follicular fluids belonging to the same cycle phase. In conclusion, we believe the changes in oxidative stress during phases of estrous cycle may influence follicular development and atresia.

**KEY WORDS:** Cow, Cycle phases, Follicular fluid, Oxidative stress, Lipid peroxidation

### ÖZET

Bu araştırmada ineklerde farklı siklus dönemlerinde dominant ve sekonder follükül sıvılarında oksidan-antioksidan dengedeki değişimlerin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma materyalini özel bir mezbahaya kesim amacıyla getirilen, 4–6 yaşlı, 60 baş Holstein ırkı inekten alınan ovaryumlar oluşturdu. Östrus siklusu, ovaryumların postmortem muayeneleri ve plazma östrojen-progesteron düzeylerine göre, follüküler (n=13), erken (n=17), orta (n=16) ve geç luteal (n=14) döneme ayrıldı. Ovaryum üzerinde bulunan dominant ve sekonder follükül sıvıları aspire edildi. Analiz sonunda, östrüs siklusu dönemlerinin dominant ve sekonder follükül sıvılarında Glikoz, Vitamin A,  $\beta$ -karoten, Nitrik Oksit, Malondialdehit ve Antioksidan aktivite düzeyinin farklı olduğu belirlendi. Bunun yanında aynı siklus döneminin dominant ve sekonder follükül sıvıları arasında da önemli değişimler gözlemlendi. Sonuç olarak östrüs siklusu dönemlerinde oksidatif stres şiddetindeki değişimin follüküler gelişim ve atreziyi etkileyebileceği kanısına varıldı.

**ANAHTAR KELİMELER:** İnek, Siklus dönemi, Follükül sıvısı, Oksidatif stres, Lipid peroksidasyonu

### GİRİŞ

Follüküler sıvı, memeli ovaryumu içinde avasküler bir bölüm olup, perifollüküler stromadan kan-follükül bariyeri ile ayrılmaktadır (Bagavandoss ve ark. 1983, Hafez 1987). Dolaşım kanının eksudatı olarak meydana gelen follükül sıvısı içinde follükül hücreleri tarafından sentezlenen ve bu hücrelerin

metabolizması sonucu açığa çıkan çok sayıda metabolik madde bulunmaktadır (Leroy ve ark. 2004). Follüküler sıvı oosit için uygun biyokimyasal bir ortam sağlarken, oositin olgunlaşması ve follükülden atılmasında da önemli rol oynamaktadır (Gosden ve ark. 1988, Fortune 1994, Guet ve ark. 1999).

Follüküller sıvının biyokimyasal içeriği, follükülün farklı gelişim dönemlerinde hücrelerin etkinliğine

1: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, A. Necdet Sezer Kampusu, AFYONKARAHİSAR.

2: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji ABD, Ahmet Necdet Sezer Kampusu, AFYONKARAHİSAR.

3: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya ABD, Ahmet Necdet Sezer Kampusu, AFYONKARAHİSAR.

4. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, Alaaddin Keykubat Kampusu, KONYA.

\*E-posta: [hacelik@aku.edu.tr](mailto:hacelik@aku.edu.tr)

bağlı olarak değişmekte, oosit kalitesi ve gelişim fizyolojisini etkilemektedir (Wise 1987). Bununla birlikte ovaryumda bulunan fonksiyonel yapıların metabolizması sonucunda serbest radikaller olarak adlandırılan reaktif oksijen türleri de (ROS) oluşmaktadır. Oluşan serbest radikaller folliküler dinamiğin fizyolojisinde önemli işlevlere sahiptir (Agarwal ve ark. 2005). Serbest radikal özelliği bulunan nitrik oksit (NO), ovaryumda görev alan intraovarian araçlardan biridir (Yamauchi ve ark. 1997, Basini ve Tamanini 2000). Ovaryumda belirlenen nitrik oksit/nitrik oksit sentaz (NO/NOS) sistemi follikülogenez, ovulasyon, oosit maturasyonu ve steroid sentezi gibi ovaryum fonksiyonlarının gerçekleşmesinde rol oynar (Chen ve ark. 2001). Gonadotropinler tarafından düzenlenen kan-follikül bariyer işlevinin yerine getirilmesinde de görev alan NO, damar genişletici ve ovulasyon akyuvar dağıtımını üzerindeki etkisi ile ovulasyon ve follikül rupturunu sağlanmasında da fonksiyonel öneme sahiptir (Nemade ve ark. 2002). Bu etki ovaryum damar endotel hücreleri ve nöronlarında üretilen NO tarafından oluşturulur (Jablonka-Shariff ve Olson 1997, Rosselli ve ark. 1998).

Bununla beraber oluşan serbest radikallerin yoğunluğunun da kontrol altında bulunması gerekmektedir. Oksidan-antioksidan dengenin bozulması lipid peroksidasyonunu artırarak protein, nükleik asit ve diğer hücre yapısına zarar vermektedir. Diğer dokularda olduğu gibi ovaryum dokusu ve follikül sıvısında ROS'ların etkilerini engelleyen veya azaltmada işlev gören antioksidanlar bulunmaktadır (Agarwal ve ark. 2005). Antioksidanlar lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak ve ROS'u ortadan kaldırarak işlev görmektedir. Antioksidanlardan vitamin A,  $\beta$ -karoten (Ikeda ve ark. 2005), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroxidase (GPx), ve katalazin follikül sıvısında bulunduğu bildirilmektedir (Fujii ve ark. 2005).

Seksüel siklus dönemlerinde ineklerde follikül sıvısı içeriğinin farklılık gösterdiği bilinmektedir (Hafez 1987). Bu çalışmada, östrüs siklusunun farklı dönemlerinde dominant ve sekonder follikül sıvılarında oksidatif strese bağlı meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır

## MATERYAL ve METOT

Çalışma materyalini özel bir mezbahaya kesim amacıyla getirilen 4-6 yaşlı, 60 baş Holstein ırkı inekten alınan ovaryumlar oluşturdu. Kesim öncesi hayvanların genel sağlık durumunun değerlendirilmesi amacıyla anamnez alındı. Genel sağlık problemi belirlenmeyen, rektal palpasyon ve ultrasonografik muayeneler sonucu reproduktif herhangi bir sorunu olmayan hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

Ovaryumda bulunan follikül ve korpus luteum (CL)'un çapları ultrasonografik muayene ile

belirlendi. Ultrasonografik muayeneler 5-6 MHz, linear array, real time ultrason ile gerçekleştirildi (Falco 100, Pie medical, Maastrich, The Netherlands).

Hormon analizleri için kesim öncesi hayvanların v. jugularislerinden heparinli tüplere kan alındı ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı.

Hayvanların kesimini takiben ovaryumun iç ve dış görünüşü, follikül çapı, CL çapı ve damarlaşma kriterleri (Ireland ve ark. 1980) ile plazma 17 $\beta$ -östradiol ve progesteron düzeylerine göre gruplar; folliküler dönem (FD) (n=13), erken (ELD) (n=17), orta (OLD) (n=16) ve geç luteal (GLD) (n=14) dönem olmak üzere oluşturuldu.

Postmortem inceleme sonrası ovaryum üzerindeki en büyük çapa sahip follikül (Dominant) ile ikinci en büyük çapa sahip (Sekonder) follikülerin sıvısı 22 G enjektör iğnesi ile aspire edildi. Elde edilen folliküler sıvısı 3000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant biyokimyasal analizler için ayrıldı.

### Plazma 17- $\beta$ östradiol ve progesteron düzeyinin belirlenmesi:

Östradiol (Cayman chemical company, USA, cat.no. 582251) ve progesteron (Cayman chemical company, USA, cat.no. 582601) düzeyi EIA ticari kit kullanılarak, üretici firmanın önerilerine göre belirlendi.

### Follikül sıvısı nitrik oksit düzeyinin belirlenmesi:

Follikül sıvıları %10'luk Triklor asetik asit ile proteinden arındırıldıktan sonra ELISA pleytlerine 100  $\mu$ l aktarıldı. Üzerine 50 ml hidroklorik asitte 400 mg Vanadium klorür çözündürülmesiyle elde edilen çözüldürme 100  $\mu$ l eklendi. Bunun üzerine seri halde %2'lik hidroklorik asit ile 100 ml'ye tamamlanmış 2 g sülfanilamid çözeltisinden 50  $\mu$ l ve distile suda hazırlanmış %0.1'lik N-(1-naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochlorid çözeltisinden 50  $\mu$ l ilave edildi. Örnekler 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kültür plağı okuyucusunda (Titerteks-Multiskan, M.C., Finlandiya) 550 nm'de okundu. Absorbanslar sodyum nitrat ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisinde değerlendirildi.

### Follikül sıvısında glikoz, vitamin A, $\beta$ -karoten, malondialdehit ve antioksidan aktivite düzeyinin belirlenmesi

Örneklerde glikoz (TECO Diagnostics, California, USA) ve MDA (Bioxytech MDA-586, OxisResearch, CA, USA) ticari kitler ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Vitamin A ve  $\beta$ -karoten düzeyi Suziki ve Katoh (1990) ve antioksidan aktivite düzeyi ise Koracevic ve ark. (2001) belirttiği yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlendi.

### İstatistikî analizler:

Dominant ve sekonder folliküllerin biyokimyasal sonuçları bakımından gruplar arasında farklılığın belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için ise Duncan testi yapıldı. Ayrıca grup içerisinde dominant ve sekonder folliküller arasında farklılığın belirlenmesinde ise paired t-testi kullanıldı. Tüm değerler mean±S.D. şeklinde sunuldu. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

İneklerde folliküler dönem ile erken, orta ve geç luteal dönemlere ait dominant follikül ve corpus

luteum çapları Tablo 1'de gösterilmiştir. Follikül çapı, orta ve geç luteal dönemlerde benzerken folliküler dönemde en büyük, erken luteal dönemde ise en küçük olarak belirlendi ( $P<0.001$ ). Korpus luteum çapı orta luteal dönemde en büyük, erken luteal dönemde ise en küçük olarak tespit edildi ( $P<0.001$ ).

Plazma 17- $\beta$  östradiol ve progesteron düzeyleri Tablo 2'de gösterilmiştir. En yüksek 17- $\beta$  östradiol düzeyi folliküler dönemde, en düşük ise erken luteal dönemde ölçüldü ( $P<0.001$ ). Progesteron düzeyinin orta ve geç luteal dönemde farklı olmadığı bu iki dönemin folliküler ve erken luteal döneme göre yüksek olduğu tespit edildi ( $P<0.001$ ).

Dominant folliküllerde glikoz, vitamin A,  $\beta$ -karoten, NO, Malondialdehid (MDA) ve Antioksidan Aktivite (AOA) düzeyleri Tablo 3'de, sekonder folliküllerde ise Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Folliküler ve luteal dönemde dominant follikül ve korpus luteum çapı (mm).

	FD	ELD	OLD	GLD	P<
Follikül	16.23±0.62 <sup>a</sup>	10.17±0.35 <sup>c</sup>	13.10±0.65 <sup>b</sup>	12.96±0.52 <sup>b</sup>	0.001
CL	-	10.80±0.08 <sup>c</sup>	23.10±0.16 <sup>a</sup>	19.30±0.13 <sup>b</sup>	0.001

FD: Folliküler dönem, ELD: Erken luteal dönem, OLD: Orta Luteal dönem, GLD: Geç luteal dönem, CL: Korpus luteum  
<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistikî fark belirlenmiştir.

Tablo 2. Folliküler ve luteal dönemde plazma 17-  $\beta$  östradiol (pg/ml) ve progesteron (ng/ml) düzeyleri.

	FD	ELD	OLD	GLD	P<
17- $\beta$ östradiol	7.84±0.51 <sup>a</sup>	1.22±0.07 <sup>d</sup>	4.78±0.54 <sup>b</sup>	2.84±0.55 <sup>c</sup>	0.001
Progesteron	0.76±0.05 <sup>b</sup>	1.28±0.08 <sup>b</sup>	5.79±0.56 <sup>a</sup>	4.86±0.71 <sup>a</sup>	0.001

FD: Folliküler dönem, ELD: Erken luteal dönem, OLD: Orta Luteal dönem, GLD: Geç luteal dönem  
<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistikî fark belirlenmiştir.

Tablo 3. Folliküler ve luteal dönem dominant follikül sıvılarında glikoz, vitamin A,  $\beta$ -karoten, MDA, NO ve AOA düzeyleri.

	FD	ELD	OLD	GLD	P<
Glikoz (mg/dl)	90.20±4.16 <sup>b</sup>	129.50±4.71 <sup>a</sup>	129.33±4.36 <sup>a</sup>	126.25±5.95 <sup>a</sup>	0.001
Vitamin A ( $\mu$ g/dl)	127.89±4.06 <sup>a</sup>	14.91±0.79 <sup>c</sup>	13.47±0.83 <sup>c</sup>	86.33±4.09 <sup>b</sup>	0.001
$\beta$ -karoten ( $\mu$ g/dl)	49.49±2.42 <sup>a</sup>	28.34±1.33 <sup>b</sup>	31.91±1.29 <sup>b</sup>	28.45±2.02 <sup>b</sup>	0.001
MDA ( $\mu$ mol/L)	7.84±0.39 <sup>a</sup>	5.35±0.22 <sup>b</sup>	5.77±0.21 <sup>b</sup>	5.60±0.29 <sup>b</sup>	0.001
NO ( $\mu$ mol/L)	34.22±1.96 <sup>a</sup>	21.76±1.10 <sup>b</sup>	23.88±1.08 <sup>b</sup>	23.01±1.18 <sup>b</sup>	0.001
AOA (mmol/L)	7.30±0.54 <sup>b</sup>	8.32±0.42 <sup>b</sup>	8.49±0.44 <sup>b</sup>	9.94±0.45 <sup>a</sup>	0.01

FD: Folliküler dönem, ELD: Erken luteal dönem, OLD: Orta Luteal dönem, GLD: Geç luteal dönem  
 MDA: Malondialdehid, NO: Nitrik oksit, AOA: Antioksidan aktivite  
<sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistikî fark belirlenmiştir.

Tablo 4. Folliküler ve luteal dönemde sekonder follikül sıvılarında glikoz, vitamin A,  $\beta$ -karoten, MDA, NO ve AOA düzeyleri.

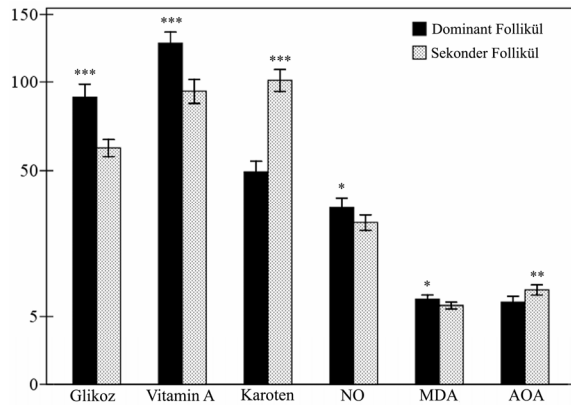
	FD	ELD	OLD	GLD	P<
Glikoz (mg/dl)	60.96±2.16 <sup>b</sup>	70.40± 4.00 <sup>b</sup>	67.48±4.42 <sup>b</sup>	108.90±3.03 <sup>a</sup>	0.001
Vitamin A ( $\mu$ g/dl)	94.00±3.77 <sup>a</sup>	25,76± 1.52 <sup>d</sup>	40.52±2.49 <sup>c</sup>	50.22±3.80 <sup>b</sup>	0.001
$\beta$ -karoten ( $\mu$ g/dl)	101.08±3.62 <sup>a</sup>	17.05± 1.10 <sup>b</sup>	19.81±1.06 <sup>b</sup>	21.27±1.22 <sup>b</sup>	0.001
MDA ( $\mu$ mol/L)	6.73±0.27 <sup>a</sup>	2.58± 0.10 <sup>b</sup>	3.01±0.09 <sup>b</sup>	2.00±0.09 <sup>b</sup>	0.001
NO ( $\mu$ mol/L)	28.69±1.36 <sup>a</sup>	8.15± 0.42 <sup>b</sup>	10.01±0.48 <sup>b</sup>	9.81±0.25 <sup>b</sup>	0.001
AOA (mmol/L)	9.67±0.52 <sup>a</sup>	7.79± 0.50 <sup>b</sup>	10.20±0.38 <sup>a</sup>	9.90±0.42 <sup>a</sup>	0.02

FD: Folliküler dönem, ELD: Erken luteal dönem, OLD: Orta Luteal dönem, GLD: Geç luteal dönem  
 MDA: Malondialdehid, NO: Nitrik oksit, AOA: Antioksidan aktivite  
<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistikî fark belirlenmiştir.

Glikoz düzeyinin dominant folliküllerde erken, orta ve geç luteal dönemlerde değişmediği folliküler dönemde ise bu dönemlere göre azaldığı; sekonder folliküllerde ise folliküler, erken ve orta luteal dönemlerde fark olmadığı bu dönemlere göre geç luteal dönemde arttığı görüldü ( $P<0.001$ ). Vitamin A dominant folliküllerde en yüksek folliküler dönemde, en düşük ise erken ve orta luteal dönemde belirlendi. Sekonder folliküllerde ise en yüksek folliküler dönemde, en düşük erken luteal dönemde görüldü.  $\beta$ -karoten, Nitrik oksit ve MDA düzeyinin dominant ve sekonder folliküllerde erken, orta ve geç luteal dönemde benzer olduğu folliküler dönemde ise arttığı belirlendi ( $P<0.001$ ). Antioksidan aktivite ise dominant folliküllerde geç luteal dönemde en yüksek, sekonder folliküllerde ise folliküler, orta ve geç luteal dönemler arasında fark belirlenmezken erken luteal dönemde azaldığı belirlendi ( $P<0.01$ ).

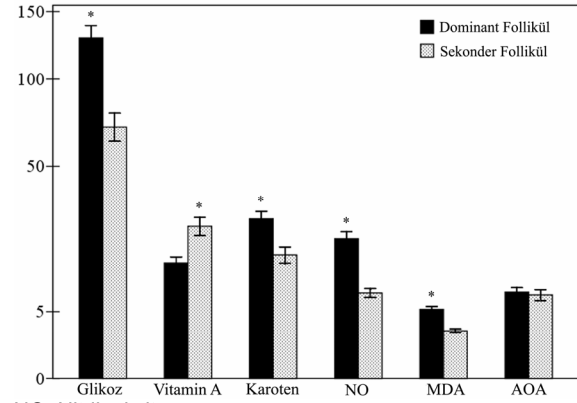
Folliküler dönemde, dominant folliküllerde glikoz ( $P<0.001$ ), vitamin A ( $P<0.001$ ), MDA ( $P<0.001$ ) ve NO ( $P<0.05$ ) düzeyinin sekonder folliküllere göre yüksek,  $\beta$ -karoten ( $P<0.001$ ), ve AOA'nin ( $P<0.05$ ) düşük olduğu belirlendi. (Şekil 1.) Erken luteal dönemde dominant folliküllerde glikoz ( $P<0.001$ ),  $\beta$ -karoten ( $P<0.001$ ), NO ( $P<0.001$ ), MDA ( $P<0.001$ ) düzeyinin sekonder folliküllere göre yüksek, vitamin A'nın ( $P<0.001$ ) düşük, AOA'nin benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 2.)

Şekil 1. Folliküler dönem dominant ve sekonder folliküllerinde Glikoz (mg/dl), Vitamin A ( $\mu$ g/dl),  $\beta$ -karoten ( $\mu$ g/dl), NO ( $\mu$ mol/L) MDA ( $\mu$ mol/L) ve AOA (mmol/L) düzeyleri.



NO: Nitrik oksit;  
MDA: Malondialdehid;  
AOA: Antioksidan aktivite  
\*: ( $P<0.05$ ), \*\*: ( $P<0.01$ ), \*\*\*: ( $P<0.001$ ).

Şekil 2. Erken luteal dönem dominant ve sekonder folliküllerinde Glikoz (mg/dl), Vitamin A ( $\mu$ g/dl),  $\beta$ -karoten ( $\mu$ g/dl), NO ( $\mu$ mol/L), MDA ( $\mu$ mol/L) ve AOA (mmol/L) düzeyleri.

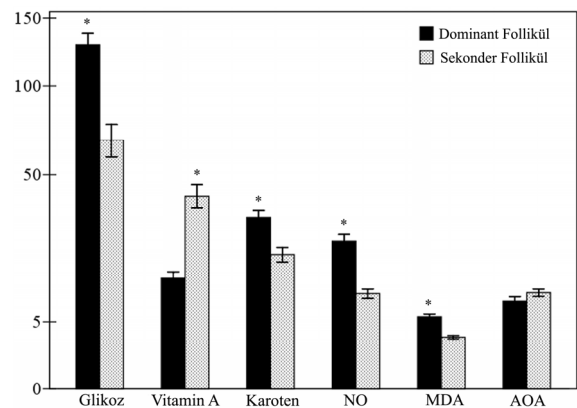


NO: Nitrik oksit;  
MDA: Malondialdehid;  
AOA: Antioksidan aktivite  
\*: ( $P<0.001$ ).

Orta luteal dönemde dominant folliküllerde glikoz ( $p<0.001$ ),  $\beta$ -karoten ( $P<0.001$ ), NO ( $P<0.001$ ), MDA ( $P<0.001$ ) düzeyinin sekonder folliküllere göre yüksek, vitamin A ( $P<0.001$ ) düzeyinin düşük olduğu, ayrıca AOA'nin benzer olduğu tespit edildi (Şekil 3).

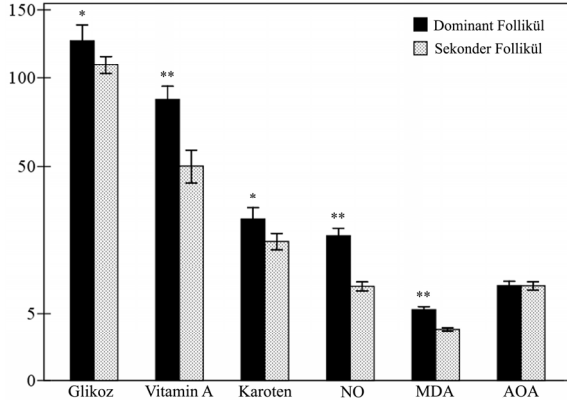
Geç luteal dönemde dominant folliküllerde glikoz ( $P<0.001$ ), vitamin A ( $P<0.001$ ),  $\beta$ -karoten ( $P<0.05$ ), NO ( $P<0.001$ ) ve MDA ( $P<0.001$ ) düzeyinin sekonder folliküllere göre yüksek, AOA'nin ise benzer olduğu belirlendi (Şekil 4).

Şekil 3. Orta luteal dönem dominant ve sekonder folliküllerinde Glikoz (mg/dl), Vitamin A ( $\mu$ g/dl),  $\beta$ -karoten ( $\mu$ g/dl), NO ( $\mu$ mol/L), MDA ( $\mu$ mol/L) ve AOA (mmol/L) düzeyleri.



NO: Nitrik oksit;  
MDA: Malondialdehid;  
AOA: Antioksidan aktivite  
\*: ( $P<0.001$ ).

Şekil 4. Geç luteal dönem dominant ve sekonder folliküllerinde Glikoz (mg/dl), Vitamin A (µg/dl), β-karoten (µg/dl), NO (µmol/L), MDA (µmol/L) ve AOA (mmol/L) düzeyleri.



NO: Nitrik oksit;  
MDA: Malondialdehid;  
AOA: Antioksidan aktivite  
\*: (P<0.05), \*\*: (P<0.001).

#### TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidatif stres; oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesi olarak adlandırılmaktadır (Agarwal ve ark. 2005). Sunulan çalışmada östrüs siklusunun farklı dönemlerinde dominant ve sekonder follikül sıvılarında oksidatif stresde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacıyla follikül sıvısında glikoz, vitamin A, β-karoten, NO, MDA ve AOA düzeyleri belirlendi.

Siklus döneminin tespitinin ovaryumlar üzerlerinde bulunan fonksiyonel yapıların iç ve dış görünüşü, follikül çapı, CL çapı ve vaskülarizasyon gibi morfolojik kriterlere bağlı olarak yapılabileceği bildirilmektedir (Ireland ve ark. 1980). İneklerde folliküllerin östrojen sentezleme yeteneği follikül gelişimine paralel bir şekilde artış göstermektedir (Fortune 1994). Ginther ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada siklusun luteal döneminde artan progesteron baskısı nedeni ile follikül gelişiminin folliküler döneme göre daha düşük düzeyde gerçekleştiğini bildirmektedirler. Bildirilere uygun olarak bu çalışmada folliküler dönemde plazma östrojen düzeyi luteal döneme göre daha yüksek, progesteron düzeyi ise düşük belirlenmiştir (P<0.001). Plazma östrojen ve progesteron düzeyleri postmortem ovaryum bulgularını destekler nitelikte bulunmuştur.

Ovaryumun ana enerji kaynağının glikoz olduğu bildirilmektedir (Rabiee ve Lean 2000). Aynı zamanda inek oositlerinde maturasyon için glikozun dışarıdan alması gereken bir enerji substratı olduğu ifade edilmektedir (Iwata ve ark. 2004). Mihm ve ark. (1996) folliküler dönemde hücrel faaliyetlerin arttığını, Ginther ve ark. (2000) ise luteal dönemde

progesteronun baskılayıcı etkisi ile metabolik faaliyetlerin azaldığını bildirmektedirler. Bu çalışmada folliküler dönemde dominant ve sekonder folliküllerde glikoz düzeyi, luteal döneme göre düşük bulunmuştur (P<0.001). Bu bulgu, folliküler dönemde folliküllerdeki metabolik faaliyetlerin sonucunda glikozun harcandığını düşündürmektedir. Araştırmamızda dört dönemde de sekonder folliküllerde dominant folliküllere göre glikoz düzeyinin düşük bulunması sekonder folliküllerin atrezi olması sonucunda enerji kullanım gereksinimlerinin azalmasına bağlanabilir. Nitekim Ginther ve ark. (1989) ovaryum üzerinde bulunan sekonder folliküllerin, folliküler sapma sonrasında gelişim yeteneğini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Vitamin A reproduksiyon için esansiyel olup hem follikül çapını hem de kalitesini etkilemektedir. Follikül çapı ile vitamin A düzeyi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Schweigert ve ark. 1986). Bildirimlerle uyumlu olarak bu çalışmada folliküler dönem dominant follikülünde vitamin A düzeyinin en yüksek olduğu belirlendi. Benzer olarak sekonder folliküllerde de bu dönemde vitamin A'da artış belirlendi. İneklerde follikül sıvısında bulunan vitamin A follikül içine özel taşıyıcılara bağlı şekilde kandan selektif olarak taşınmakta aynı zamanda follikül granuloza hücrelerinde bulunan β-karoten cleavage aktivitesi ile de β-karotenden vitamin A sentezlenmektedir. Dolaşım ile gelen retinol ile follikül hücrelerinde sentezlenen retinol, intrafolliküler vitamin A için kaynak oluşturmaktadır (Ikeda ve ark. 2005). Sunulan çalışmada folliküler dönem dominant ve sekonder follikül sıvılarında β-karoten düzeyinin diğer dönemlere göre yüksek bulunması, β-karotenden vitamin A sentezinin arttığını gösterirken, bu dönemlere ait vitamin A düzeyindeki artışlar da bunu desteklemektedir.

Vitamin A düzeyinin dominant folliküllerde sekonder folliküllere göre daha yüksek seviyede bulunduğu bildirilmektedir (Schweigert ve ark. 1986). Çalışmada ise vitamin A düzeyinin erken ve orta luteal dönemin sekonder folliküllerinde daha yüksek, geç luteal ve folliküler dönemde ise düşük olduğu belirlendi.

Aynı zamanda oksidan olarak ifade edilen reaktif oksijen türlerinin steroidogenezis ve folliküler atresi gibi reproduktif fizyolojide görev aldığı ifade edilmektedir (Valdez ve ark. 2005). Nitekim serbest radikal olarak ifade edilen nitrik oksit de follikül gelişimi için gerekli olduğu bildirilmektedir (Chen ve ark. 2001). Gerek plazmada gerekse follikül sıvısında nitrik oksit artışından östrojenin de sorumlu olduğu, özellikle östrojenin folliküllerde NOS ekspresyonunu artırarak NO sentezini uyardığı bildirilmektedir (Tamanini ve ark. 2003). Bu çalışmada da folliküler dönemde gerek sekonder gerekse dominant folliküllerde nitrik oksit artışı belirlendi. Ayrıca nitrik oksit düzeyi dominant folliküllerde sekonder folliküllere göre 4 dönemde de yüksek belirlendi. Bu bulgu ovulasyona gidecek olan dominant follikül için nitrik oksidin önemini ortaya koymaktadır.

Malondialdehit, non-enzimatik yolla çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu ya da araşidonik asidin oksijenasyonunda yan ürün olarak açığa çıkmakta ve serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Niedernhofer ve ark. 2003). Folliküler sıvıda lipid peroksidasyonunda artışın folliküler atresiye neden olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada dominant folliküllerde folliküler dönemde erken, orta ve geç luteal dönemlere göre MDA düzeyinin dolayısı ile lipid peroksidasyonunun arttığı belirlendi. Aynı zamanda sekonder folliküllerde, dominant folliküllere göre MDA düzeyinde artış görüldü. Araştırma bulguları Valdez ve ark. (2005)'nin bildirimleri ile uyumlu bulunmuştur.

Folliküler dinamik sürecinde geç luteal dönem dominant follikülü gelişimini devam ettirerek folliküler dönemde ovulasyona uğramaktadır. Araştırmada AOA'nın dominant folliküllerde geç luteal dönemde diğer dönemlere göre yüksek olması ovumun gelişme döneminde lipid peroksidasyonunun zararlarına karşı koruyucu bir rol oynadığını düşündürmektedir. Buna karşın folliküler dönem dominant follikülünde MDA'nın yüksek, AOA'nın ise düşük olması lipid peroksidasyonundaki artışın ovulasyonun fizyolojisinde önemli olduğu izlenimi vermektedir.

Sonuç olarak, östrüs siklusu dönemlerinde dominant ve sekonder follikül sıvılarında glikoz, vitamin A, B-karoten, NO, MDA ve AOA düzeyinin değiştiği belirlenmiştir. Bu değişimler oksidan-antioksidan dengenin follikül sıvısında dinamik olduğunu ve oksidatif stresin folliküler gelişim ve atreziyi etkileyebileceğini ifade etmektedir.

#### KAYNAKLAR

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

Bagavandoss P, Midgley AR and Wicha M (1983) Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*; 31: 633-640.

Basini G and Tamanini C (2000) Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domest Anim Endocrinol*; 18: 1-17.

Chen HW, Jian WS and Tzeng CR (2001) Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril*; 75: 1163-71.

Fortune JE (1994) Ovarian follicular growth and development of mammals. *Biol Reprod*; 50: 225-232.

Fujii J, Iuchi Y and Okada F (2005) Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*; 3: 43.

Ginther OJ, Kastelic JP and Knopf L (1989) Composition and characteristic of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*; 20: 187-200.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ and Kot K. (2000) Selection of the dominant follicle in cattle: Role of estradiol. *Biol Reprod*; 63: 383-389.

Gosden RG, Hunter RHF, Telfer E, Torrance C and Brown N (1988) Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil*; 82: 813-825.

Guet P, Royere D, Paris A, Lansac J and Driancourt MA (1999) Aromatase activity of human granulosa cells in vitro: effects of gonadotropin and follicular fluid. *Human Reprod*; 14: 1182-1189.

Hafez ESE (1987) Reproductive cycles, physiology of reproduction. In "Reproduction in Farm Animals", 5th edition, Lea and Febiger, Philadelphia.

Ikeda S, Kitagawa M, Imai H and Yamada M (2005) The Roles of Vitamin A for Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes. *J Reprod Dev*; 51 (1): 23-35.

Ireland JJ, Murphee RL and Coulson PB (1980) Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci*; 63: 155-160.

Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K and Miyake M (2004) Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*; 127: 159-164.

Jablonka-Shariff A and Olson LM (1997) Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*; 138: 460-468.

Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S and Cosic V (2001) Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*; 54: 356-361.

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J and de Kruif A (2004) Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*; 15: 1131-1143.

Mihm M, Diskin MG and Roche JF (1996) Regulation of follicle wave growth in cattle. *Reprod Dom Anim*; 31: 531-538.

Nemade RV, Carrette O, Larsen WJ and Markoff E (2002) Involvement of nitric oxide and the ovarian blood follicle barrier in murine follicular cyst development. *Fertil Steril*; 78: 1301-1308.

Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Grene RE and Marnett LJ (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*; 278: 31426-31433.

Rabee AR and Lean IJ (2000) Uptake of glucose and cholesterol by the ovary of sheep and cattle and the influence of arterial LH concentrations. *Anim Reprod Sci*; 64: 199-209.

- Rosselli M, Keller PJ and Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod*; 4 (1): 3-24.
- Schweigert FJ, Lutterbach A, Rambeck WA and Zucker H (1986) Vitamin a and b-carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size. *J Vet Med A*; 33: 360-364.
- Suzuki J and Katoh N (1990) A simple and cheap methods for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci*; 52: 1281-1283.
- Tamanini C, Basini G, Grasselli F and Tireli M (2003) Nitric oxide and the ovary. *J Anim Sci*, 81, E1-E7
- Valdez KE, Cuneo SP and Turzillo AM (2005) Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction*; 130: 71-81.
- 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 estrous cycle. *J Anim Sci*; 64: 1153-1169.
- Yamauchi J, Miyazaki T, Iwasaki S, Kishi I, Kuroshima M, Tei C and Yoshimura Y (1997) Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*; 138 (9): 3630-3637.