T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# OVARYUM FOLLİKÜL SIVISININ BİYOKİMYASAL İÇERİĞİ VE FOLLİKÜL ÇAPI İLE İLİŞKİSİ

Ali Uğur

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**Danışman**

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

KONYA- 2008

## ii. ÖNSÖZ

Ovaryum folliküllerinin gelişimi ile ilgili çeşitli hayvan türlerinde yapılan araştırmalarda daha çok repdüktif hormonlarla ilişkiler araştırılmış, diğer biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi ikinci planda kalmıştır.

Bilindiği gibi ovaryum follikül sıvısı serum eksudatlarından biridir ve lokal olarak folliküler hücrelerin metabolik aktiviteleriyle ilişkili olarak üretilen maddeleri de içinde barındırır. Bu nedenle follikül sıvısının içeriği follikülün büyümesi ve gelişmesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Metabolik aktivite ve kan-follikül bariyerinin özelliği follikülün büyüme evreleri boyunca değişkenlik gösterir ve bu nedenle follikül sıvısının biyokimyasal içeriğinin de follikülün çapına göre değişebileceği beklenir.

Bu araştırma ile ineklerde follikül sıvısı içinde bulunan değişik biyokimyasal parametrelerin follikül çapı ile ilişkilerinin araştırılması, seksüel siklusun farklı evrelerinde meydana gelen değişimler ve parametreler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. İncelenecek parametrelerin seçiminde karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasının önemli ögelerinden bir ya da birkaçının (glukoz, total protein, albumin, kolesterol ve trigliserid) seçilmesinin mekanizmaların anlaşılabilmesi açısından daha doğru olacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde mali desteğini aldığımız Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne, S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Elemanlarına, Uzman Avni İlik'e, çalışma süresince özellikle materyal toplanmasında büyük özveri ve desteklerini esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hüseyin

Erdem'e ve KONET mezbahası veteriner hekimleriyle çalışanlarına teşekkürleri bir borç bilirim.

**iii.İÇİNDEKİLER**


| | Sayfa No |
|---|---|
| **1- GİRİŞ** | 5 |
| 1.1. İneklerde Seksüel Siklus ve Ovaryumda Meydana Gelen Değişiklikler | 5 |
| 1.1.1. Folliküler Evre (Proöstrus ve Östrus) | 6 |
| 1.1.2. Luteal Evre (Metöstrus ve Diöstrus) | 9 |
| 1.2. Kan-Follikül Bariyeri ve Follikül Sıvısının Oluşumu | 10 |
| 1.3. Follikül Sıvısının Biyokimyasal İçeriği ve Önemi | 12 |
| **2. GEREÇ VE YÖNTEM** | 19 |
| 2.1 Hayvan Materyali ve Örneklerin Toplanması | 19 |
| 2.2 Biyokimyasal Analizler | 20 |
| 2.2.1 Follikül Sıvısı Glukoz Analizi | 20 |
| 2.2.2 Follikül Sıvısı Total Protein Analizi | 21 |
| 2.2.3 Follikül Sıvısı Albumin Analizi | 21 |
| 2.2.4 Follikül Sıvısı Kolesterol Analizi | 22 |
| 2.2.5 Follikül Sıvısı Trigliserid Analizi | 23 |
| 2.3. İstatistik Analiz | 24 |
| **3. BULGULAR** | 25 |
| **4. TARTIŞMA VE SONUÇ** | 30 |
| **5. SONUÇ VE ÖNERİLER** | 41 |
| **6. ÖZET** | 42 |
| **7. SUMMARY** | 44 |
| **8. KAYNAKLAR** | 46 |
| **9. ÖZGEÇMİŞ** | 51 |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. İneklerde Seksüel Siklus ve Ovaryumda Meydana Gelen Değişiklikler

Sığırlar genellikle cinsel olgunluğa 8-12 aylıkken ulaşırlar. Yetiştirmede ise 18-24 aylıkken kullanılmaya başlamakla birlikte vücut gelişimi, özellikle ırklar arasında farklılıklar gösterebilir. Dişilerde pubertadan sonra normal üreme fonksiyonlarına sahip oldukları dönemlerde, cinsiyet hormonlarının sekresyonundaki aylık ritmik değişiklikler, ovaryumlar ve cinsel organlarda da benzer ritmik değişikliklerin oluşmasına neden olur. Bu ritmik modele dişilerde seksüel siklus (östrus siklusu) adı verilir (Guyton 2001).

İnsan ve hayvan türlerinde farklılıklar gösteren seksüel siklusun süresi ineklerde ortalama 21 gün kadardır. Seksüel siklus sırasında ovaryumlardaki değişiklikler tamamen ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin hormonlara bağımlıdır. Puberta öncesi olduğu gibi, gonadotropin hormonlarla stimüle edilmeyen ovaryumlar tamamen inaktif kalırlar. Ön hipofizden ovaryumların tüm fonksiyonları için temel oluşturan iki hormon salgılanır: Follikül stimülan hormon (FSH) ve Luteinizan hormon (LH). Bunların her ikisi de yaklaşık 30.000 molekül ağırlığında glikoprotein yapısında moleküllerdir. Hem FSH hem de LH ovaryumdaki hedef hücreleri, hücre membranında bulunan yüksek düzeyde spesifik reseptörlere bağlanarak stimüle eder. Aktive edilen reseptörler de bu hücrelerin sekresyon hızları ile büyüme ve proliferasyonlarını artırır (Chappel ve ark 1983, Beitins ve Padmanabhan 1991).

Doğumla birlikte genellikle 300.000-400.000 ovumun her biri granuloza hücrelerinden oluşan tek bir tabaka ile çevrilidir. Bunlara primordial follikül adı

verilir. Puberta öncesi granulosa hücrelerinin ovumun beslenmesini üstlendiği, aynı zamanda oosit matürasyonu inhibitör faktörünü salgılayarak ovumu primordial halde kalmasını sağladığı kabul edilmektedir. Pubertadan sonra ön hipofiz bezinden büyük miktarda FSH ve LH salgılanmasıyla birlikte ovaryumların tümü içindeki folliküller de büyümeye başlar (Price 1991, Guyton 2001).

Follikül büyümesinde ilk aşama ovumun oldukça genişlemesiyle çapının 2-3 kat artmasıdır. Daha sonra granulosa hücre tabakaları artarak folliküller primer follikül niteliğini kazanırlar. Bu dönemdeki gelişme hiç değilse kısmen FSH ve LH'nın yokluğunda da olabilir. Fakat bunun ötesinde bu iki hormon bulunmadığı durumda gelişme olamaz (Beitins ve Padmanabhan 1991).

### 1.1.1. Folliküler Evre (Proöstrus ve Östrus)

Siklusun başlangıcından sonra ilk birkaç gün içinde FSH ve LH konsantrasyonları kat kat artar. Bu artış FSH'da LH'ya göre daha önce görülür. Bu hormonlar, özellikle FSH, her siklusta 6-12 primer follikülün büyümesini hızlandırır (Chappel ve ark 1983). İlk etki granulosa hücrelerinin hızlı proliferasyonu şeklinde kendini gösterir. Aynı zamanda ovaryum interstitiumundan kaynaklanan birçok iğ hücreleri de granulosa hücrelerinin etrafında birçok tabaka halinde toplanarak teka adı verilen ikinci bir hücre kitlesi oluştururlar. Dıştaki tabaka olan teka eksterna ileri derecede damarlanmış bağ dokusundan ibaret bir kapsül şeklindedir ve gelişen follikülün kapsülünü oluşturur (Adams ve ark 1994).

Büyümenin bu erken proliferatif fazından sonra, granulosa hücre kitlesinde önemli dişi cinsiyet hormonlarından biri olan östrojen hormonunu yüksek konsantrasyonda içeren follikül sıvısı salgılanır. Sıvının birikimi granulosa hücre

kitlesi içinde bir antrumun belirmesine yol açar. Antrum birikimi oluştuktan sonra granulosa ve teka hücreleri daha da hızlı prolifere olarak sekresyon hızı artar ve büyüyen folliküllerin her biri veziküler folliküle dönüşür (Savio ve ark 1988, Kaneko ve ark 1995).

Primer folliküllerdeki ilk büyüme, başlıca FSH tarafından stimüle edilir. Ancak veziküler follikülün oluşumuna götüren hızlı büyümede başka faktörlerin de katkısı vardır: İlk olarak ön hipofiz bezinden gittikçe artan miktarda salgılanan LH granülosa ve teka hücreleri üzerine FSH'nın stimülasyonunu destekleyen sinerjik bir etki gösterir ve yalnız başına FSH'nın göstereceğinden çok daha büyük bir stimülasyon ortaya çıkar. İkinci olarak folliküle salgılanan östrojen, granulosa hücrelerinin daha çok FSH reseptörü yapmasını sağlayarak granulosa hücrelerini FSH'ya daha duyarlı hale getirir. Böylece bir kez büyümeye başlayan follikülde büyüme gittikçe daha da hızlanır (Chappel ve ark 1983, Price 1991, Adams ve ark 1992).

Veziküler follikül genişlerken, ovum follikülde granulosa hücre kitlesinin bir kutbunun içinde bulunur. Ovumu çevreleyen granulosa hucreleriyle birlikte yapıya kumulus ooforus adı verilir (Guyton 2001).

Folliküllerde görülen bir süre büyümenin ardından folliküllerden birinin daha fazla büyümeye başladığı, diğerlerinde ise büyümenin gerilediği (atrezi, atretik follikül) görülür (Sunderland ve ark 1994). Daha fazla gelişen follikül fazla miktarda östrojen salgılar ve pozitif feedback etki göstererek granulosa hücrelerinin proliferasyonunu, FSH reseptörlerinin sayısını ve dolayısıyla FSH'nın bu folliküldeki uyarıcı etkisini artırır (Kesner ve Convey 1982, Price 1991). Follikül gelişmesinin son dönemlerinde salgılanan östrojen, hipotalamusu etkileyerek hipofiz ön lobundan

FSH ve LH sekresyonunu azaltır. Bu da daha az gelişmiş folliküllerin stimülasyon derecesini düşürür. Bu nedenle gonadotropik hormonlar artık artmasa da, en büyük follikül büyümeye devam ederken diğer folliküllerin büyümesi duraklar. Atrezi olayının, yalnız bir follikülün ovulasyona elverişli olacak şekilde büyümesini sağlama açısından önemli olduğu açıktır (Convey ve ark 1977, Kesner ve Convey 1982, Chappel ve ark 1983). Follikülün nihai büyümesi ve ovulasyon için LH gereklidir. Bu hormonun eksikliğinde follikül yeterli büyüklüğe ulaşsa dahi ovulasyon gerçekleşemez (Savio 1988).

Ovulasyondan hemen önce follikülün dış çeperi dışa doğru kabarır ve kapsülün merkezinde stigma adı verilen küçük bir alan meme başı gibi bir çıkıntı yapar. Oluşumdan hemen sonra follikül sıvısı stigmadan dışarı sızmaya başlar. Follikül, sıvı kaybı sonucu küçülürken, stigma geniş bir şekilde yırtılır (Savio 1988).

Ovulasyondan önce LH düzeyleri 6-8 kat artarak birkaç saat öncesinde maksimum düzeylere ulaşır. Aynı zamanda FSH da 2 kat kadar artarak sinerjik etki ile LH ile birlikte follikülün ovulasyondan önce şişmesi sağlanır. LH granulosa hücrelerine özgün bir etki göstererek ilk olarak daha az östrojen, daha sonra da gittikçe artan progesteron salgılanmasını sağlar. Böylece ovulasyondan önce östrojen sekresyonunun hızı düşmeye başlar ve az miktarda progesteron sekresyonu görülür. Follikülün hızla büyüdüğü, hızlı östrojen sekresyonunun ardından sekresyonun yavaşladığı ve progesteron sekresyonunun başladığı bu ortamda ovulasyon gerçekleşir (Savio 1988, Sunderland ve ark 1994).

### 1.1.2. Luteal Evre (Metaöstrus ve Diöstrus)

Ovumun follikülden atılmasını izleyen ilk birkaç saat içinde geri kalan granüloza hücreleri hızla lutein hücrelerine dönüşür. Bunların çapları granulosa hücelerinin 2 katı kadar büyür ve içlerine dolan lipid inkluzyonu nedeniyle sarımsı bir renk alır. Bu sürece luteinizasyon, total hücre kitlesine de korpus luteum adı verilir. Korpus luteum özellikle progesteron hormonunun sentez edildiği yer olmakla birlikte az miktarda da olsa östrojen sentezinin yapıldığı görülür (Hunter ve ark 1970, Guyton 2001).

Granuloza hücrelerinin lutein hücrelere dönüşümü LH'nın kontrolü altındadır. Ayrıca granulosa hücrelerinin luteinleşmesi ovumun folikülden atılmasına da bağlıdır. Follikül sıvısında luteinizasyonu inhibe edici faktör aracılığıyla granulosa hücrelerinin lutenize edilmesinin engellendiği bildirilmektedir. Bu nedenle ovulasyon oluncaya kadar follikül içersinde korpus luteum gelişemez (Beitins ve Padmanabhan 1991, Price 1991).

Yeni oluşan lutein hücreleri proliferasyon, genişleme, sekresyon ve dejenerasyon aşamalarına maruz kalır. Ovaryum siklusunun luteal fazında korpus luteumdan salgılanan, özellikle östrojen ve daha küçük ölçüde progesteron kuvvetli bir feedback etkiyle hipofiz ön lobundan FSH ve LH sekresyonunu azaltırlar (Chappel ve ark 1983). Ayrıca luteal hücrelerden salgılanan inhibin özellikle FSH sekresyonunu inhibe eder. Sonuç olarak FSH ve LH düzeylerinin düşüşü korpus luteumun tamamen dejenere olmasına neden olur. Korpus luteumun involusyonu adı verilen bu olayın ardından korpus luteumdan salınan progesteron, östrojen ve inhibinin FSH ve LH üzerine basklıyıcı etkisi ortadan kalkar ve ovaryumda yeniden

FSH ve LH etkisiyle folliküller gelişmeye ve yeni bir siklus oluşmaya başlar (Chappel ve ark 1983, Guyton 2001).

### 1.2. Kan-Follikül Bariyeri ve Follikül Sıvısının Oluşumu

Yaklaşık 50 yıl önce varlığı saptanan kan-follikül bariyerinin gerek ovaryum follikülünün gelişmesinde gerekse bazı ovaryum hastalıklarında önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (Zhou ve ark 2007).

Organizmada ovaryum follikül sıvısının primer follikülden ovulasyona kadar ilerlerken aşamalı olarak artış gösteren dinamik bir yapı olduğu bilinmektedir. Bu folliküler gelişmeye ovaryumlarda perifolliküler kapillar ağda meydana gelen yapısal değişiklikler eşlik eder (Machiarelli 2000). İlk olarak sekonder follikülün granuloz hücre membranının oluşumuyla meydana gelen kapillar folliküler ağ, granuloza hücre tabakasının artışıyla birlikte gelişir. Ayrıca bu ağ, teka interna hücrelerinin gelişimiyle birlikte de sekonder follikülden graff folikülüne kadar evrelerde gelişmeye devam eder (Yamada ve ark 1994, Machiarelli 2000, Jiang ve ark 2002). Ovaryumdaki bu mikrodamarlaşmada meydana gelen yapısal değişikliklerin gelişen follikülün büyüme sırasında gereksinim duyduğu besin maddelerini kandan sağladığının bir göstergesi olduğu kabul edilir. Follikül sıvısını oluşumunda granuloza hücrelerinin sekresyonları ve follikül gelişimi süresince tekal kapillarlardan serum proteinlerinin difüzyonunun da önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (Shalgi ve ark 1973, Anderson ve ark 1976). Son yıllarda yapılan proteomik çalışmalarla yaklaşık 210 kadar proteinin follikül sıvında bulunduğu, bunların büyük bir kısmının transferin, seruloplazmin, afamin, hemopeksin, haptoglobulin ve serum amiloid protein gibi akut faz proteinlerden oluştuğu gösterilmiştir. Bu bulgu ovulasyon olayının bir yangısal olay gibi

değerlendirilebileceği hipotezini destekler niteliktedir. Adı geçen proteinlere ek olarak follikül sıvısında katalaz, süperoksid dismutaz, glutasyon transferaz, protein disülfit izomeraz gibi önemli antioksidan enzimlerin varlığının belirlenmesi, follikülün olgunlaşma sürecinde çeşitli toksik ajanlardan ve oksidatif stresten korunduğunu göstermektedir (Angelucci ve ark 2006).

Follikül sıvısı ile kanın içeriğinin birbiri ile oldukça benzer olduğu kabul edilmesine karşın, yapılan araştırmalarda gerek protein konsantrasyonları ve içeriğinin gerekse diğer biyokimyasal içeriklerin birbirinden farklılıklar oluşturduğu ve bu farklılığın sebebinin kan-follikül bariyerinin varlığından kaynaklandığı gösterilmiştir (Zhou ve ark 2007). İlk olarak Zachairae ve Jensen (1958) tarafından tanımlanan kan-follikül bariyeri "moleküler bir elek" olarak olarak tarif edilmiştir ve bu bariyerin kapillar endotel, subendotelial bazal lamina, teka interna, follikül duvarı ve membrana granulosada molekülleri büyüklüklerine göre ayrımladığından söz edilmiştir. Yapılan araştırmalar kan-follikül bariyerinin küçük molekül ağırlıklı proteinlerin follikül sıvısına geçişine izin verdiğini, 500 kDa'dan daha büyük moleküllerin geçişine izin vermediğini göstermiştir (Shalgi ve ark 1973, Cran ve ark 1976). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar follikül sıvısının bu seçici geçirgenliğinde nitrik oksidin de görev aldığı (Hess ve ark 1998, Zhuo ve Kimata 2001), ayrıca bu seçiciliğin sadece moleküler büyüklükle ilgili olmadığı aynı zamanda moleküllerin elektriksel yükünün de etkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda kan-follikül bariyerinin özellikleri üzerine yapılan yoğun araştırmalar, follikül sıvısının biyokimyasal içeriğinin ve kaynağının belirlenmesi açısından da büyük önem arz etmektedir.

### 1.3. Follikül Sıvısının Biyokimyasal İçeriği ve Önemi

Ovaryum follikül sıvısı, yarı visköz ve sarımsı renkte, pH'sı plazmaya benzer şekilde 7.4 civarında olan oldukça kompleks, ekstraselüler bir sıvıdır. Kısmen serum transudatı olan sıvı kısmen de folliküler hücrelerin metabolik hareketleriyle ilgili olan follikül içerisinde üretilen maddelerden oluşur (Edwards 1974, McNatty 1978).

Sığırlarda seksüel siklus döneminde 2–3 dalga halinde follikül gelişimi görülür. Ovaryumlarda her dalgada küçük sıvı dolu folliküllerin birçoğu gelişmeye başladığı ve 1–2 günlük gelişim sürecinin sonucunda dominant follikül olarak tanımlanan bir follikül gelişimine devam ederken, diğer folliküller dalganın başlangıcından 3-4 gün sonra atreziye uğradığı, siklusların çoğunluğunun da 2 ya da 3 dalgalı olduğu bildirilmektedir (Taylor ve Rajamahendran 1991). 3 dalgalı folliküler gelişmeler siklusun 2, 9 ve 16. günlerinde gözlenirken, 2 dalgalı folliküler gelişmelerin 2 ve 11. günlerde ortaya çıktığı, dalga sayılarının luteal dönemin süresini belirlediği, 3 dalgalı folliküler gelişim gösteren ineklerin luteal dönemlerinin daha uzun sürdüğü ve hem erken dönem, hem de luteal dönemin ortalarında 1.6 cm çapında folliküllerle karşılaşılabileceği yazılmaktadır (Stoch ve Stolla 1995).

Follikül sıvısı yapısında, steroid biyosentezi, follikül gelişimi, oositin olgunlaşması, ovidukta transportunun gerçekleştirilebilmesi ve ovulasyon gibi ovaryum fizyolojisi için esansiyel olan birçok biyokimyasal maddeyi içerir (Edwards 1974, McNatty 1978). Temel olarak orijinini periferal plazmadan alan follikül sıvısı ayrıca follikül duvarındaki hücreler tarafından sentezlenen steroidler ve glikoproteinleri de içerir. Birçok fizyolojik önemi olan bileşikler içeren follikül sıvısının içeriğinin kan serumu ile benzerlik gösterdiği bilinmesine karşın bugün

ulaşılan bilgilerle özellikle lokal özel hücreler aracılıyla içeriğin serumdan farklılıklar gösterebileceği anlaşılmış, follikül sıvısının biyokimyasal içeriğinin follikülün büyümesine bağlı olduğu görülmüştür (Wise 1987). Follikül sıvısı serumdakine benzer oranlarda ancak farklı konsantasyonlarda steroidler, glukozaminoglikanlar ve Na K gibi birçok metaboliti yapısında bulundurur. Oosit maturasyon inhbitörü, LH bağlayıcı inhibitör, inhibin, çeşitli enzimler, büyük folliküllerde bulunan kondroitin sülfat, folliküler fazda yüksek konsantrasyonda östradiol 17-β ve ovulasyonda progesteron gibi komponentler fizyolojik olarak aktif olan maddelerdir (Hafez 2000).

Herhangi bir biyolojik sıvı gibi follikül sıvısının fizyolojik karakterlerini de içeriğindeki kimyasal yapısı belirler. Follikül duvarının su ve biyokimyasal komponentlere olan geçirgenliği follikül sıvısının içeriğini önemli ölçüde değiştirebilir. Ayrıca granuloza hücrelerinin stimüle ve inhibe edici faktörleri salgılama kabiliyeti follikül sıvısının içeriğini değiştirir. Bu faktörler osmolarite, renk, pH, viskozite ve sıvı hacmi gibi fiziksel parametreleri de etkiler (Fisch ve ark 1990).

Follikül sıvısı seksüel siklus boyunca önemli değişikliklerin etkisi altında kalır:

1. Granüloza hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesi, folliküler büyümenin ve steroidogenezin başlaması
2. Oositin olgunlaşması, ovulasyon ve ovidukta yumurta taşınması
3. Korpus luteum oluşumu için folliküler sıvının hazırlanması
4. Follikül sıvısındaki stimülatör ve inhibitör faktörlerle folliküler siklusun düzenlenmesi

5. Ovulasyonda salınan sıvı miktarı (Bu miktar özellikle spermin metabolizması, kapasitasyonu ve erken embriyonik gelişimin meydana gelmesi açısından önemlidir) (Hafez 2000).

Oositin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü sperm tarafından fertilizasyonu açısından önemli bir ön koşuldur. Ovaryum follikülleri içerisinde gelişen oosit, follikül sıvısı tarafından kaplanmıştır. Büyüyen oositin beslenme gereksinimlerini karşılamasının yanı sıra folliküler sıvısı, oositin büyümesi ve olgunlaşması için de gerekli ortamı sağlar (Hafez 2000).

Follikül sıvısını oluşturan maddelerden en önemlisi kuşkusuz siklus süresince yapısal ve fizyolojik değişimlerin temelini oluşturan hormonlardır. Bu konuda yapılan birçok araştırmada özellikle steroid hormonların seksüel siklusun evresi ve follikülün çapı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Steroid hormonların follikül sıvılarında olağanüstü konsantrasyonlarda bulunmaları, follikül duvarındaki granulosa ve teka hücrelerindeki steroid sekresyonundan kaynaklanmaktadır (Collins ve ark 1997).

Yapılan araştırmalarla ovaryum folliküllerinde, follikülün çapı ile plazma östradiol ve progesteron düzeyleri arasında sıkı bir ilişki saptanmıştır (Eiler ve Nalbandov 1977, Wise ve ark 1986, Brandmeier ve ark 1987a). İneklerde follikül sıvısındaki östradiol düzeylerinin follikül büyüklüğü yanısıra, siklusun evresi, korpus luteum ya da büyük folliküllerin varlığıyla da ilişkili olduğu bildirilmektedir (Brandmeier ve ark 1987a). Dieleman ve ark (1983) LH pikinin oluşumu ve ovulasyondan önce ineklerde ve düvelerde birden fazla follikülde belirlenen östradiol ve progesteron düzeylerinin farklılık göstermediğini saptamışlardır.

Salem ve ark (1997) Suudi Arabistan'da gebe olmayan develerde normal, siklik ve atretik folliküllerin östradiol, progesteron ve tirosin içeriği üzerine yaptıkları araştırmada, ösradiol ve tiroksin konsantrasyonunun büyük folliküllerde daha yüksek olduğunu, küçük folliküllerde ise progesteron düzeylerinin en yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Progesteron ve östradiol için benzer bulgular ineklerde Serpek ve ark (2001) tarafından da doğrulanmıştır.

Follikül sıvısında bulunan proteinler plazmadakinden daha düşük konsantrasyondadır. Proteinlerin follikül sıvısı / serum oranı, total protein için 0.74, albumin için 0.86 olarak belirlenmiştir.Yapılan araştırmalar (Wise 1987, Leroy ve ark 2004) total protein içeriğinin follikül çapı ile ilşkili bir parametre olduğunu göstermiştir. Enzimler özellikle follikül duvarında sentezlenen maddelerin katabolik değişimlerinin gerçekleşmesi açısından büyük önem arzederler. Özellikle hyaluronidaz, endopeptidaz ve kollajenaz enzimlerinin bulunuşu ovulasyonun gerçekleşmesinde büyük önem taşır. Total protein içeriğinin önemli bir bölümünü oluşturan enzimlerin de follikül sıvısında follikül büyüklüğüne göre değişkenlik gösterdiği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Küçük ve orta büyüklükteki follikül sıvılarında GOT düzeylerinin kan serumu düzeylerinden daha yüksek olduğu, büyük folliküllerde ise bu durumun tersine döndüğü, GPT düzeylerinin ise büyük folliküllülerde kan serumundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Rondel 1970).

Follikül sıvısında temel enerji kaynağı olarak kullanılan glukozun da follikül çapı ve siklusun evrelerine göre değişkenlik gösterebileceği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Eissa ve ark (1996) yapmış oldukları araştırmada sığırlarda follikül sıvısı glukoz konsantrasyonlarının siklusun evrelerine göre değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Küçük folliküllerdeki glukoz düzeyleri ise

serumun yarısı kadar belirlenirken, büyük folliküllerden %21 daha düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır.

Follikül sıvısında total karbonhidratın % 75'inin glukoz olduğu fruktozun ise çok küçük miktarlarda olduğu bildirilmektedir (Lutwak-Mann 1954). Glukoz, follikül sıvısında serumdan önemli oranda düşük bulunmuştur ve bu durum folliküldeki glukozun mural granülosa hücrelerindeki glikolizden köken aldığı görüşü ile açıklanmıştır (Gerard ve ark 2002).

Kolesterol, dört halkalı steroid nükleusu ve bir hidroksil grubu olan 27 karbonlu steroldür. Siklopentan ve perhidrofenantren halkalarından olusan kolesterol, hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin önemli bir bileşenidir. Karaciğer, bağırsak, adrenal korteks ile ovaryumlar, testisler ve plasentayı kapsayan üreme dokuları vücudun kolesterol havuzuna en büyük katkıyı yapmasına rağmen, kolesterol hemen hemen tüm dokular tarafından sentez edilir. Kolesterol, safra tuzları, steroid hormonları ve D vitamininin öncül maddesidir (Guyton 2001).

Kolesterol ve kolesterol esterleri kanda plazma lipoproteinleri olarak taşınırlar. Yapılarında protein, fosfolipidler, kolesterol, kolesterol esterleri ve trigliseridler bulunur. Yapılarındaki farklı lipid ve protein kompozisyonundan dolayı her birinin dansitesi farklıdır. Diyetle alınan lipidler şilomikron içinde taşınırlar. Lipoprotein lipaz enzimi ile şilomikronun trigliseridi yapıdan ayrılır. VLDL karaciğerden kolesterol, kolesterol esteri ve trigliseridi diğer dokulara taşır. Triaçilgliserol, lipoprotein lipaz ile yıkılır ve böylelikle VLDL, LDL'ye dönüşür. LDL, kolesterol ve kolesterol esterleri açısından zengindir. LDL, VLDL ve şilomikron remnantları hücreye reseptör aracılı endositoz ile alınır. HDL ekstrahepatik dokulardan kolesterolü, karaciğere taşır (Grummer and Carroll 1988).

Michael Brown ve Joseph Goldstein'ın 13. Nobel Biyoloji Ödülü'nü almasını sağlayan araştırmalarında (Brown and Goldstein 1986) kolesterolün küçük olmasına karşın ne kadar donanımlı bir molekül olduğundan bahsetmektedirler. Steroidojenik hücrelerde kolesterol non-steroidojenik hücrelerden ve fibroblasttan farklı olarak membran sentezi dışında steroid sentezi için de gerekli bir maddedir.

Ovaryumlarda steroid biyosentezinde tüketilen kolesterol de novo sentezden ve lipoproteinlerden elde edilir. Birçok türde, lipoproteinden elde edilen kolesterol de novo sentezden daha yüksektir (Grummer ve Carroll 1988). Kandaki kolesterolün büyük bir kısmının LDL ve HDL aracılığıyla taşınmasına karşın, inek follikül sıvısında sadece HDL bulunur (Brantmeier ve ark 1987b).LDL ve VLDL'nin follikül sıvısında bulunmadığı insan, domuz ve kısrak gibi diğer türlerde de gösterilmiştir (Chang ve ark 1976, Le Goff 1994, Perret ve ark 1985). Bu farklılığın kan-follikül bariyerinin büyük moleküllerin geçişine izin vermediğinden kaynaklandığı ve bu durumun follikül sıvısı kolesterol ve diğer lipidlerin düzeylerinin kandan neden daha düşük olduğunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (Grummer ve Carroll 1988).

Kolesterolün steroid hormonların ön maddesi olması açısından ovaryumdaki düzeyleri de hormonlarla birlikte incelenmiş ve sonuçta serum düzeylerinden düşük olduğu saptanan follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin follikül çapı ve hormon düzeyleri ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu saptanmıştır.

Kolesterolün yanında ovaryumlarda yedek enerji kaynağı olarak kullanılan trigliseridlerin düzeylerinin, kanda ve vücut sıvılarında taşınmalarında kullanılan lipoproteinler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu konuda kan-follikül bariyerinin

geçirgenlik özellikleri, incelenen birçok parametre gibi kolesterol ve trigliserid düzeyleri için de etkili bulunmuştur.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Hayvan Materyali ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Konya'da Haziran-Temmuz aylarında özel bir mezbahaya kesim amacıyla getirilen, her siklus evresinden 20 baş olmak üzere toplam 80 baş sağlıklı Holstein ırkı inekte yürütülmüştür.

Mezbahada kesilen ineklerin kesim sonrası genital organları, soğuk zincirle 30 dakika içerisinde laboratuvara getirilerek postmortem muayeneleri yapılmıştır. Postmortem muayenede ovaryumlarda, uterus ve diğer genital organ bölümlerinde herhangi bir patolojik oluşum olup olmadığı incelenmiş ve sağlıklı olduğu belirlenen ovaryumların su banyosunda ultrasonografik muayeneleri (Aslan ve ark 2000) gerçekleştirilmiştir. Ultrasonografik muayenelerle (B-model, linear-array, 5-7.5 MHz'lik rektal probu bulunan real-time ultrason, Scanner 480 Vet, Pie Data Medical, Maastrich, The Netherlands) ovaryumlarda bulunan follikül çapları belirlenmiş ve hayvanlar postmortem ve ultrasonografik muayeneler sonucu tesbit edilen siklus evrelerine göre (Proöstrus, Östrus, Metaöstrus ve Diöstrus) gruplanmışlardır. Siklusun uzun bir süresini oluşturan diöstrusta, birörneklik olması açısından alınan folliküller, diöstrus ortasında gözlenen midcycle folliküllerden oluşturulmuştur.

Çapları belirlenen folliküllerden aktif olan ovaryumdaki en büyük follikül içerisindeki follikül sıvısı ince uçlu bir enjektör yardımıyla alınmış ve 1000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilerek olası partiküllerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizler yapılmak üzere –80 $^{o}$C'lik derin dondurucuda saklanmışlardır.

## 2.2 Biyokimyasal Analizler

Alınan follikül sıvılarında glukoz, total protein, albumin, kolesterol ve trigliserid analizleri ticari kitler aracılığıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

### 2.2.1 Follikül Sıvısı Glukoz Analizi (Linear Chemicals)

Glukozun hidrojen peroksit oluşturmak üzere glukoz oksidaz (GOD) enzimi aracılığıyla D-glukonata okside edilir (Trinder reaksiyonu). Peroksidaz (POD) enziminin varlığında, fenol ve 4-aminoantipirin (4-AA) hidrojen peroksit tarafından kırmızı renkli kinonimine okside olur. Meydana gelen renkli ürün (Kinonimin) örnekteki glukoz düzeyleri ile orantılıdır.

$$\beta\text{-D-glukoz} + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{D-Glukonat} + H_2O_2$$

$$\text{4-AA} + \text{Fenol} \xrightarrow[POD]{H_2O_2} \text{Kinonimin} + H_2O$$

Follikül sıvısı glukoz düzeylerinin belirlenmesi amacıyla örnek sayısınca deney tüpü, blank ve standart tüpleri alınarak birer ml reaktif üzerine 10 µl sırasıyla örnek, distile su ve glukoz standartı (100 mg/dl) ilave edilerek 37 $^{o}$C'de 5 dakika inkubasyona bırakıldılar. İnkubasyonun ardından örnekler ve standardın absorbansı blanka karşı 500 nm'de okundu.

Hesaplanması:

Örnek Abs. / Standart Abs. X Standart Konsant. = mg/dl Glukoz

### 2.2.2 Follikül Sıvısı Total Protein Analizi (Linear Chemicals)

Proteinlerin peptit bağları ile $Cu^{+2}$ iyonları arasında alkali ortamda şelat oluşumu prensibinden (Biüret reaksiyonu) hareketle yapılan analizlerde oluşan renkli kompleksin absorbansı fotometrik olarak ölçülür. Oluşan rengin şiddeti örnekteki protein düzeyleri ile doğru orantılıdır.

$$Cu^{+2} + \text{protein} \xrightarrow[25\text{-}37\ ^{o}C]{pH > 12} \text{Bakır-protein kompleksi}$$

Follikül sıvısı total protein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla örnek sayısınca deney tüpü, blank ve standart tüpleri alınarak üzerlerine birer ml reaktif ilave edilmiş ve reaktiflerin üzerine 20 µl sırasıyla örnek, distile su ve protein standartı (7 g/dl) ilave edilerek 37 $^{o}$C'de 10 dakika inkubasyona bırakıldılar. İnkubasyonun ardından örnekler ve standardın absorbansı blanka karşı 540 nm'de okundu.

Hesaplanması:

Örnek Abs. / Standart Abs. X Standart Konsant. = g/dl total protein

### 2.2.3 Follikül Sıvısı Albumin Analizi (Linear Chemicals)

Metot, Brom kresol green (BCG)'nin asit ortamda protein ile renkli kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin renginin şiddetinin albumin düzeyleri ile ilişkilendirilmesi prensibinde hareketle geliştirilmiştir.

$$\text{BCG} + \text{albumin} \xrightarrow{pH\ 4.3} \text{BCD-albumin kompleksi}$$

Follikül sıvısı albumin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla örnek sayısınca deney tüpü, blank ve standart tüpleri alınarak üzerlerine birer ml reaktif ilave edilmiş ve reaktiflerin üzerine 20 µl sırasıyla örnek, distile su ve protein standartı (5 g/dl sığır serum albumini) ilave edilerek tüpler oda ısısında 10 dakika inkubasyona bırakıldılar. İnkubasyonun ardından örnekler ve standardın absorbansı blanka karşı 630 nm'de okundu.

Hesaplanması:

Örnek Abs. / Standart Abs. X Standart Konsant. = g/dl albumin

### 2.2.4 Follikül Sıvısı Kolesterol Analizi (dds Diagnostic Systems)

Enzimatik hidroliz ve oksidasyondan sonra kolestrol tayini prensibinden hareketle peroksidazın katalitik fonksiyonu altında hidrojen peroksidin 4-aminoantipirin (4-AA) ve fenolle reaksiyonundan oluşan kinoniminin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle analizler gerçekleştirilir.

$$\text{Kolesterol ester} + H_2O \xrightarrow{\text{CHE}} \text{Kolestrol} + \text{Yağ asitleri}$$

$$\text{Kolestrol} + O_2 \xrightarrow{\text{CHO}} \text{Kolestenon} + H_2O_2$$

$$\text{4-AA} + \text{Fenol} \xrightarrow[\text{POD}]{H_2O_2} \text{Kinonimin} + H_2O$$

Follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin belirlenmesi amacıyla örnek sayısınca deney tüpü, blank ve standart tüpleri alınarak üzerlerine birer ml reaktif ilave edilmiş ve reaktiflerin üzerine 10 µl sırasıyla örnek, distile su ve kolesterol standartı (200

mg/dl) ilave edilerek tüpler 37 $^{o}$C'de 10 dakika inkubasyona bırakıldılar. İnkubasyonun ardından örnekler ve standardın absorbansı blanka karşı 500 nm'de okundu.

Hesaplanması:

Örnek Abs. / Standart Abs. X Standart Konsant. = mg/dl kolesterol

### 2.2.5 Follikül Sıvısı Trigliserid Analizi (dds Diagnostic Systems)

Lipoprotein lipazla enzimatik olarak parçalanmasından sonra trigliserid tayini yapılır. Peroksidazın katalitik aktivitesi altında 4-aminopiridin ve 4-klorofenolün hidrojen peroksitle birleşmesinden meydana gelen kinoniminin renginin fotometrik olarak belirlenmesiyle trigliserid düzeyleri belirlenir.

$$\text{Trigliseridler} \xrightarrow{\text{LPL}} \text{Gliserol + Yağ asitleri}$$

$$\text{Gliserol + ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Gliserol 3-fosfat + ADP}$$

$$\text{Gliserol 3-fosfat + } H_2O \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihidroksiaseton fosfat + } H_2O_2$$

$$\text{4-AA + } 2H_2O_2 \text{ +4 -klorofenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Kinonimin + HCl + } 4H_2O$$

Follikül sıvısı trigliserid düzeylerinin belirlenmesi amacıyla örnek sayısınca deney tüpü, blank ve standart tüpleri alınarak üzerlerine birer ml reaktif ilave edilmiş ve reaktiflerin üzerine 10 µl sırasıyla örnek, distile su ve trigliserid standartı (200 mg/dl) ilave edilerek tüpler 37 $^{o}$C'de 10 dakika inkubasyona bırakıldılar.

İnkubasyonun ardından örnekler ve standardın absorbansı blanka karşı 500 nm'de okundu.

Hesaplanması:

Örnek Abs. / Standart Abs. X Standart Konsant. = mg/dl trigliserid

### 2.3. İstatistik Analiz

İncelenen parametrelerin siklus evrelerine göre değişimleri, parametreler arasındaki ilişkiler ve follikül çapı ile ilişkileri istatistiki yöntemlerle SPSS 6.0 paket programında belirlenmiştir.

## 3- BULGULAR

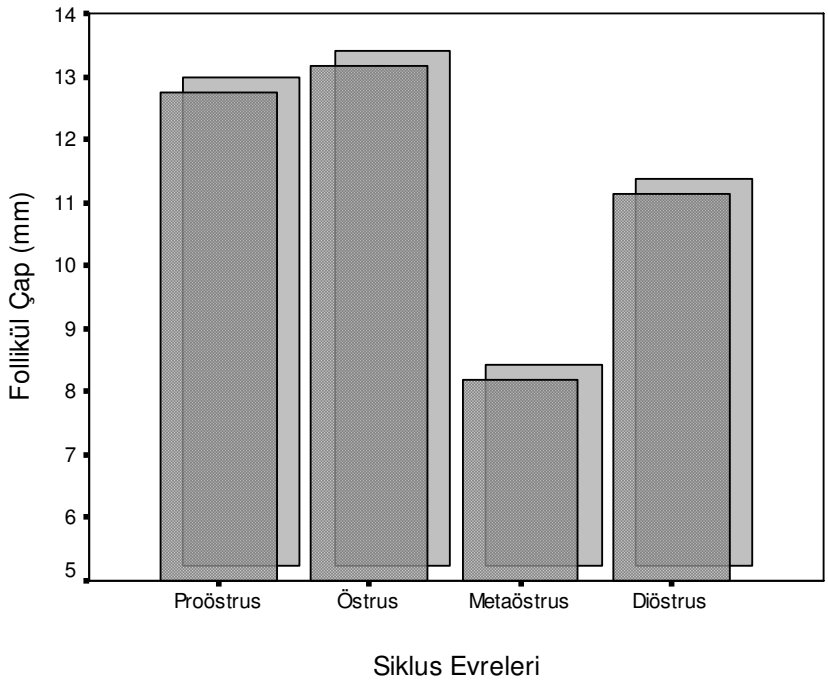
Araştırmada materyal olarak kullanılan her siklus evresinden 20 baş olmak üzere toplam 80 baş Holstein ırkı inek elde edebilmek için Haziran-Temmuz ayları içerisinde toplam 150 baş hayvanın ovaryumu toplanmıştır. Toplanan ovaryumlar çeşitli nedenlerle (ovaryum kisti bulunması, hayvanın düve olması, gebelik, siklus evresinin net olarak belirlenememesi vb) tasnif dışı bırakılarak 80 baş inek ovaryumu kullanılmıştır.

Seksüel siklusun evrelerine göre ovaryum folliküllerinin çapları ve biyokimyasal parametrelerde gözlenen değişimler Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelgede özetlenen düzeylerin grafikler de ayrı ayrı Şekil 1-6'da resmedilmiştir.

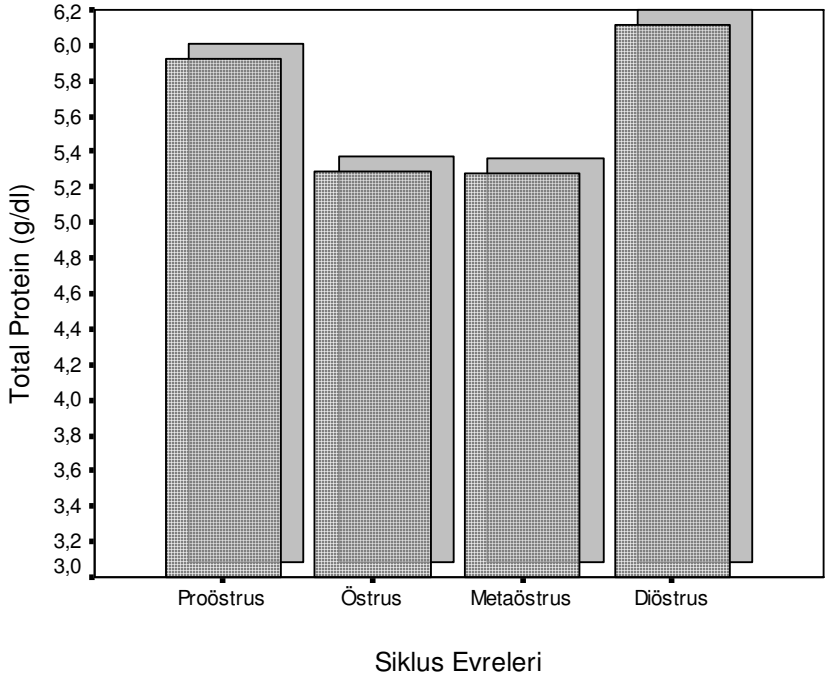
Çizelge 1. Holstein ırkı ineklerde genel ve seksüel siklusun evrelerine göre ovaryum folliküllerinin çapları ve follikül sıvısı biyokimyasal parametrelerde gözlenen değişimler

| Siklus Evreleri | Foll. çapı (mm) | Glukoz (mg/dl) | Trigliserid (mg/dl) | Kolesterol (mg/dl) | T. Protein (g/dl) | Albumin (g/dl) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Proöstrus** | 12,74±0,97a | 48,12±4,53a | 13,58±1,60c | 70,80±5,00a | 5,93±0,16ab | 2,98 ± 0,12a |
| **Östrus** | 13,16±1,13a | 36,13±4,53b | 60,00±2.42a | 54,12±8,82b | 5,29±0,44a | 2,39±0,31b |
| **Metaöstrus** | 8,20±0,40b | 35,88±2,31b | 66,00±3.38a | 47,88±3,89b | 5,28 ± 0,17a | 2,42±0,99b |
| **Diöstrus** | 11,15±1,06a | 44,85±4,14a | 39,18±4,65b | 49,30±5,06b | 6,11±0,22b | 2,66±0,15ab |
| **Genel** | 11,18±0,54 | 41,91±2,11 | 43,22±3.36 | 54,98±2,99 | 5,72 ± 0,13 | 2,63±0,70 |

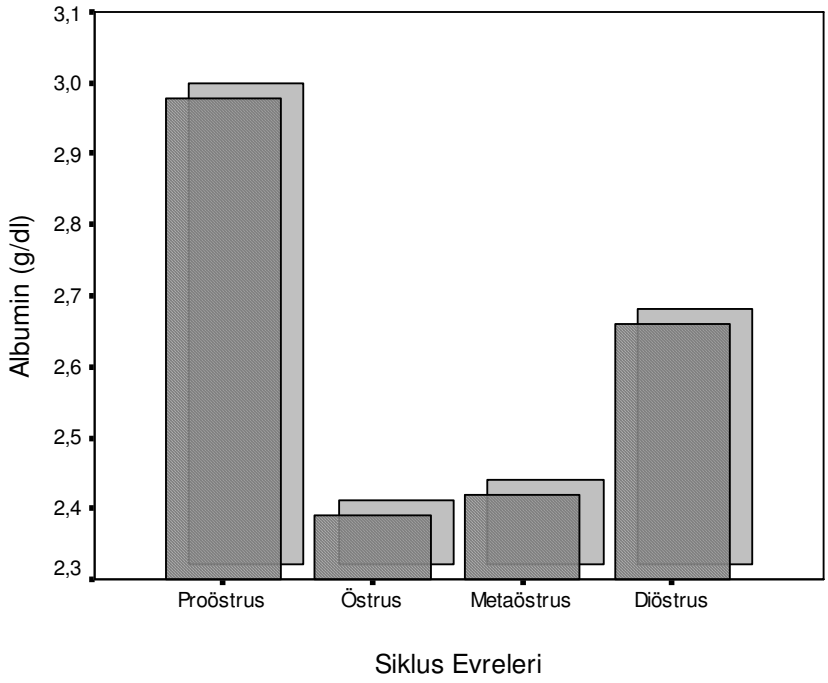
Not: Aynı sütun içerisindeki farklı harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).



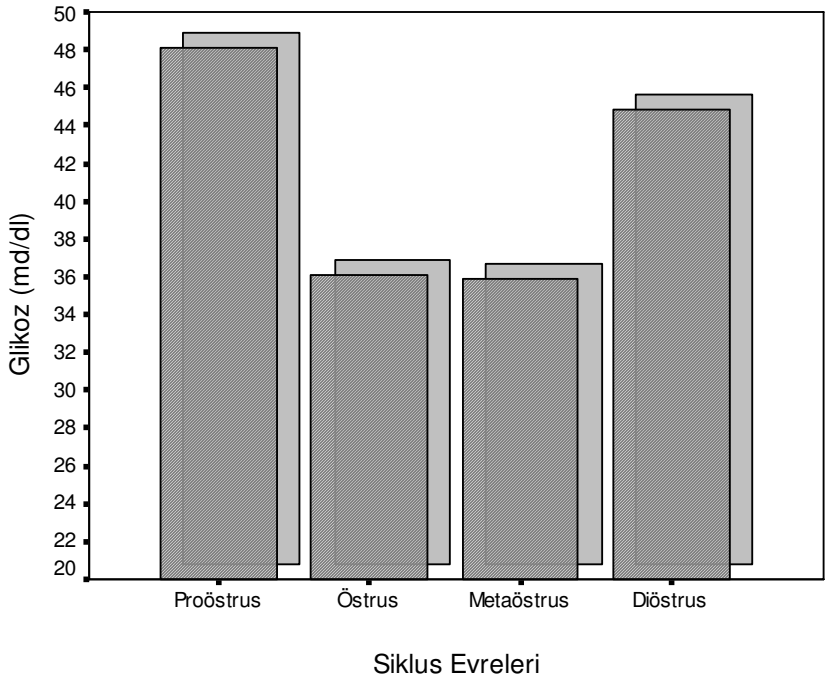

Şekil 1. Follikül çapının seksüel siklus evrelerine göre değişimleri.



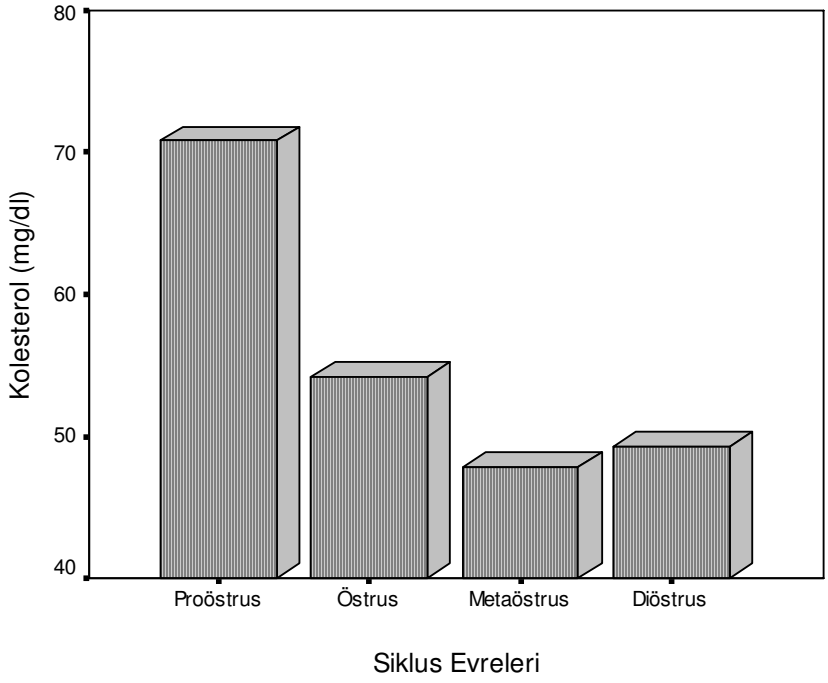

Şekil 2. Follikül sıvısı total protein düzeylerinin seksüel siklus evrelerine göre değişimleri.



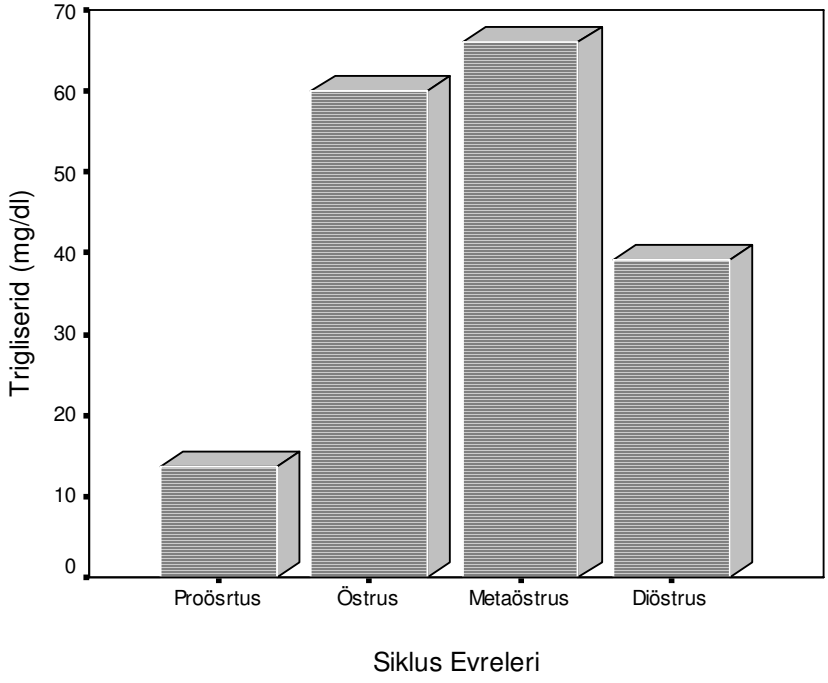

Şekil 3. Follikül sıvısı albumin düzeylerinin seksüel siklus evrelerine göre değişimleri.




Şekil 4. Follikül sıvısı glukoz düzeylerinin seksüel siklus evrelerine göre değişimleri.




Şekil 5. Follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin seksüel siklus evrelerine göre değişimleri.




Şekil 6. Follikül sıvısı trigliserid düzeylerinin seksüel siklus evrelerine gore değişimleri.

Ayrıca çalışmada elde edilen düzeyler arasındaki ilişkiler hem bütün siklus evrelerinde ayrı ayrı hem de genel olarak incelenmiş ve parametreler arasındaki korelasyon Çizelge 2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. Holstein ırkı ineklerde genel ve seksüel siklusun evrelerine göre incelenen parametreler arasındaki ilişkiler (* p< 0.05 ; ** p< 0.01).

| **GENEL** | **Glukoz** | **Trigliserid** | **Kolesterol** | **T. Protein** | **Foll. çapı** | **Albumin** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glukoz | 1,000 | | | | | |
| Trigliserd | -0,180 | 1,000 | | | | |
| Kolesterol | -0,172 | -0,393** | 1,000 | | | |
| T. Protein | 0,009 | -0,210 | 0,342* | 1,000 | | |
| Foll. çapı | 0,582** | -0,129 | 0,233 | -0,066 | 1,000 | |
| Albumin | 0,077 | -0,447** | 0,385** | 0,080 | -0,051 | 1,000 |
| **Proöstrus** | | | | | | |
| Glukoz | 1,000 | | | | | |
| Trigliserid | 0,278 | 1,000 | | | | |
| Kolesterol | 0,042 | -0,182 | 1,000 | | | |
| T. Protein | -0,152 | 0,412 | 0,026 | 1,000 | | |
| Foll. çapı | 0,626* | -0,116 | 0,533* | -0,461* | 1,000 | |
| Albumin | 0,103 | -0,394 | -0,155 | -0,053 | 0,192 | 1,000 |
| **Östrus** | | | | | | |
| Glukoz | 1,000 | | | | | |
| Trigliserid | -0,642* | 1,000 | | | | |
| Kolesterol | -0,709** | 0,596* | 1,000 | | | |
| T. Protein | -0,343 | 0,163 | 0,322 | 1,000 | | |
| Foll. çapı | 0,442 | -0,095 | 0,267 | 0,174 | 1,000 | |
| Albumin | 0,271 | -0,114 | 0,403 | -0,145 | -0,051 | 1,000 |
| **Metaöstrus** | | | | | | |
| Glukoz | 1,000 | | | | | |
| Trigliserid | -0,249 | 1,000 | | | | |
| Kolesterol | 0,103 | 0,212 | 1,000 | | | |
| T. Protein | 0,560* | 0,375 | 0,220 | 1,000 | | |
| Foll. çapı | -0,086 | -0,058 | 0,668** | -0,299 | 1,000 | |
| Albumin | 0,035 | -0,023 | -0,079 | -0,176 | -0,251 | 1,000 |
| **Diöstrus** | | | | | | |
| Glukoz | 1,000 | | | | | |
| Trigliserid | 0,439* | 1,000 | | | | |
| Kolesterol | -0,407* | -0,546* | 1,000 | | | |
| T. Protein | -0,194 | 0,030 | 0,568** | 1,000 | | |
| Foll. çapı | 0,737** | 0,408* | 0,474* | -0,272 | 1,000 | |
| Albumin | -0,340 | -0,454* | 0,492* | 0,117 | -0,373* | 1,000 |

## 4- TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekonomik amaçla yetiştirilen çiftlik hayvanlarının en önemli verimi döl verimidir. Çünkü, et, süt gibi ekonomik önem taşıyan döl verimi üstün kuşakların varlığı ile mümkündür. İneklerde döl veriminin diğer önemli bir yanı da yavrulamayan ineğin süt veremeyeceği gerçeğinden kaynaklanmaktadır.

Ovaryum follikül sıvısının steroid biyosentezi, follikül gelişimi, oositin olgunlaşma ve ovidukta transportunun gerçekleştirilebilmesi ve ovulasyon gibi ovaryum fizyolojisi için gerekli birçok biyokimyasal maddeyi içermesi, bu maddelerin döl verimi üzerine de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle follikül sıvısının içeriği değişik hayvan türlerinde farklı amaçlarla birçok araştırıcının dikkatini çekmiştir. Serum eksudatını bir bölümünden ve folliküler hücrelerin metabolik aktiviteleri ile ilişkili lokal olarak üretilen maddelerden oluşan ovaryum follikül sıvısı bu nedenle serumla benzerlik göstermesine karşı bazı farklılıklar da gösterir (Edwards 1974).

Follikül sıvısındaki yüksek protein ve albumin konsantrasyonu birçok araştırıcı tarafından bildirilirken bu yüksekliğin serum düzeylerinin altında kaldığı da belirlenmiştir. Shalgi ve arkadaşları (1973), kan-follikül bariyerinin varlığından bahsederken, IgM gibi büyük moleküllerin bariyeri geçemediğini, albuminden küçük proteinlerin ise bariyeri geçerek follikül sıvısının yapısına katıldığını bildirmektedirler. Arshad ve ark (2005), mandalarda follikül sıvısı total protein ve albumin içeriğinin follikül çapı ile ilişkili olmadığını bildirirken, Wise (1987) total protein ve albumin düzeylerinin follikül sıvısında follikül çapı ile negatif ilişkili olduğundan bahsetmektedir. Wise (1987), ineklerde seksüel siklus boyunca follikül sıvısı protein konsantrasyonunu incelediği çalışmasında; düzeylerin siklus süresince

değişiklik gösterdiğini ($p< 0.01$) en düşük konsantrasyona siklusun 5-10. günlerinde rastlandığını (yaklaşık 5,6 – 6.0 g/dl) ve östrusa ulaşıldıkça düzeylerin yükseldiğini (yaklaşık 6,0 g/dl) belirlemiştir. Follikül sıvısı albumin düzeylerindeki değişimler ise total protein düzeylerine büyük oranda benzerlik göstermiş ve düzeyler 3,6-4,4 g/dl arasında değişmiştir. Total protein ve albumin düzeylerini atretik folliküllerde daha yüksek bulan Wise (1987), siklusun ileri aşamalarında albumin açısından bu durumun daha da belirginleştiğini bildirmektedir. Araştırıcı, total protein ve albumin konsantrasyonunun atretik folliküllerde daha yüksek bulunuşunu follikülün su içeriği ve dilusyon oranına ve östrojen içeriğindeki farklılaşmalara bağlamaktadır. Ayrıca aktif olarak gelişen follikülün amino asitlere gereksinim duyduğunu, ovaryumun en çok protein katabolize eden dokular içerisinde yer alması açısından bulgularının değerlendirilebileceğini bildirmektedir. Follikül çapındaki büyümenin kısmen folliküldeki su oranının artışı ile de ilişkilendiren Wise (1987), sonuç olarak follikül sıvısındaki protein konsantrasyonundaki farklılaşmanın permeabilite ve maddelerin klirensi ile açıklanabileceğini bildirmiştir. En büyük ve 2. derecede en büyük follikül arasında total protein ve albumin düzeyleri arasında bir farklılık gözlenmezken, albumin ve total protein düzeyleri ile follikül çapının artışı arasında negatif ilişki belirlenmiştir. Bütün bunların yanında total protein ve albumin düzeyleri ile folliküler steroid düzeyleri arasında ilişkiye rastlamazken, LDH ve ALP düzeyleri arasında pozitif ilişki bulmuştur.

Wise (1987)'ın bulguların aksine Leroy ve ark (2004) ineklerde küçük (<4 mm), orta (6-8 mm) ve büyük (>10 mm) çaplı ovaryum folliküllerinde follikül sıvısı total protein düzeylerinin çap ile ilişkili olmadığını ve düzeylerin sırasıyla 6,59±0,10; 6,36±0,11; 6,50±0,11 g/dl olarak belirlendiğini bildirmektedirler. Ayrıca aynı

araştırıcılar serum düzeyleri ile paralellik gösteren follikül sıvısı proteininin serumdan köken aldığının bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir.

Bütün bunların yanında Sureshkumar ve Janakiraman (1993) keçilerde ovaryum dokusunda total protein düzeylerinin incelendiği çalışmalarında, luteal faz ve folliküler fazın ortalarında düzeylerin yüksek olduğunu bildirirlerken, Eissa (1996) mandalarda siklusun folliküler fazı olarak ifade edilen proöstrus ve östrus evrelerinde follikül sıvısı total protein düzeylerinin luteal faz olan metaöstrus ve diöstrustaki düzeylerden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen follikül sıvısı total protein düzeyleri (Çizelge 1) Wise (1987) ile Leroy ve ark (2004)'nın inekler için bildirdikleri ortalama düzeylerle benzerlik göstermektedir. Araştırmamızda total protein düzeylerinin östrus ve metaöstusta diğer evrelerden daha düşük olduğu ($p<0,05$) gözlenmiş (Çizelge 1), ayrıca total protein düzeylerinin kolesterol düzeyleri ile pozitif ilişkili olduğu (Çizelge 2) bulunmuştur. Özellikle diöstrusta ve ardından proöstrusta total protein düzeylerinin diğer evrelerden daha yüksek oluşu Sureshkumar ve Janakiraman (1993)'ın keçiler için bildirdikleri bulgularla uyumludur. Nitekim çalışmamızda diöstrusta elde edilen follikül sıvıları, follikül çaplarının büyüklüklerinden de anlaşılabileceği gibi, diöstrus ortasında oluşan "midcycle follikül" olarak adlandırılan folliküllerden oluşturulmuştur.

Araştırmamızda gözlenen total protein düzeyleri ile kolesterol düzeyleri arasındaki pozitif korelasyonun, kolesterolün organizmada taşınmasından sorumlu lipoproteinlerin kolesterol artışına bağlı olarak düzeylerinin yükselişinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda bu bulgu Grummer ve Carroll

(1988)'un ovaryum follikül sıvısında lipoprotein kaynaklı kolesterolün de novo sentezden daha fazla olduğu görüşünü de doğrulamaktadır.

Follikül çapları ile total protein düzeyleri arasında ilişkilere bakıldığında, çalışmamızda total protein düzeylerinin büyük oranda follikül çapı ile negatif ilişkili olduğu, bu ilişkinin proöstrusta anlamlı hale geldiği gözlenmiştir (Çizelge 2). Bu bulgu Wise (1987)'ın bulgularına benzerlik göstermesine karşın, tüm siklus süresince benzer bir ilişki belirlenemeyişinin, çalışmamızda total protein düzeylerinin günlük takip edilmeyişinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Follikül sıvısı albumin düzeylerinin ise Wise (1987)'ın inekler için bildirdikleri düzeylerden nisbeten düşük olduğu, Leroy (2004)'nın bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüş, en yüksek düzeylere diöstrusta rastlanmıştır (Çizelge 1). Ayrıca, incelenen diğer parametrelerle follikül sıvısı albumin düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlanmazken, düzeylerin sadece diöstrus ve genel korelasyonda follikül sıvısı trigliserid düzeyleri ile negatif, kolesterol düzeyleri ile pozitif ilişkili olduğu (Çizelge 2) bulunmuştur.

Organizmadaki birçok dokuda olduğu gibi glukoz, ovaryumlarda ve follikül sıvılarında da enerji kaynağı olması açısından büyük önem taşır. Ayrıca glukozun follikül sıvısında steroid biyosentezi ve follikül gelişimi ile direkt ilişkili olduğu belirlenen vitamin C'nin (Serpek ve ark 2001) ruminantlarda ön maddesi olması da ovaryum dokusundaki önemini bir kat daha artırmaktadır. Glukoz, ovaryum metabolizmasında laktat oluşturmak üzere anaerobik yolla metabolize edilen önemli bir enerji kaynağıdır (Leese ve Lenton 1990, Boland ve ark 1994, Rabiee ve ark 1997).

Tıpkı total protein ve albumin düzeyleri gibi, ovaryum follikül sıvısı glukoz içeriğinin de serum ya da plazma glukoz içeriğinden daha düşük olduğu birçok araştırıcı tarafından belirlenmiştir (Collins ve ark 1997, Leese ve Lenton 1990, Leroy ve ark 2004, Orsi ve ark 2005, Nandi ve ark 2007). Develerde bu oranın serumun yaklaşık %57'si olduğu saptanmıştır (Shujait 2006).

Seksüel siklus süresince follikül sıvısı glukoz düzeylerinde gözlenen değişimler ve follikül çapı ile follikül sıvısı glukoz düzeyleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen bulgular birbiri ile çelişkilidir. Orsi ve ark (2005) ineklerde follikül sıvısı piruvat ve laktat düzeylerinin follikül hacmi ile pozitif ve negatif olarak ilişkili olduğunu ancak glukoz düzeylerinin siklusun evrelerinde nisbeten birörnek olduğunu (ortalama 80 mg/dl), follikül hacmi ve çapı ile ilişkisinin belirlenemediğini bildirmektedirler.

Shujait (2006), develerde follikül sıvısı glukoz düzeylerini 106,60 ±13.70 mg/dl olarak belirlemişler, yaş ve mevsimin follikül sıvısı glukoz düzeyleri üzerine etkili olmadığını gözlemişlerdir. Bununla birlikte aynı araştırıcılar küçük folliküllerde büyüklere oranla glukoz düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmektedirler. Bu follikül çapı artışı ile birlikte glukoz düzeylerindeki düşüşü karbonhidrat katabolizmasındaki lokal artışla açıklayan Shujait (2006) ayrıca büyüyen folliküldeki su oranının artışının da düzeylerin düşmesinde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Shujait (2006)'in aksine domuzlarda (Chang ve ark 1976), koyunlarda (Nandi ve ark 2007) ve ineklerde (Landau ve ark 2000) follikül sıvısı glukoz düzeylerinin büyük folliküllerde daha yüksek olduğunu ve bu durumun büyük follikülün daha çok glukoz kullanabildiğinin bir göstergesi olduğunu bildirmektedirler. Collins ve ark

(1997) ve Gerard ve ark (2002) da kısraklarda follikül sıvısı glukoz içeriğinin dominant folliküllerde (20-25 mm çaplı) düşükken, preovulatör follikülde (33-35 mm çaplı) arttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Leroy ve ark (2004) ineklerde küçük (<4 mm), orta (6-8 mm) ve büyük (>10 mm) çaplı ovaryum folliküllerinde follikül sıvısı glukoz düzeylerinin çap ile pozitif ilişki gösterdiğini, düzeylerin sırasıyla 36,22 ± 1,80; 51,35 ± 2,88; 67,56 ± 3,24 mg/dl olduğunu belirlemiştir (Küçükten büyüğe düzeyler %46 artmıştır).

Leese ve Lenton (1990) da insanlarda follikül hacminin follikül sıvısı glukoz düzeyleri üzerine etkili olduğunu bildirmiştir. Küçük folliküllerdeki düşük glukoz düzeyleri, küçük folliküllerin yüksek metabolik aktiviteleriyle (Hammon ve ark 2000) açıklanmış ve folliküllerin büyük bir kısmının atretik kalmasının izahının da içeriğindeki karbonhidrat miktarlarıyla ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür (Kruip and Dieleman 1982).

Boryczko ve ark (1995) ineklerde kistik ovaryum olgularında luteal kistli hayvanlarda kist sıvısı glukoz düzeylerinin folliküler kist ve preovulatör follikülden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu durum luteal kistte artan miktarlarda progesteron sentezi için kullanılan vitamin C'nin ön maddesi olması (Serpek ve ark 2001) ile de açıklanmıştır.

Fizyolojik olarak serum glukoz düzeyleri düşük olan ruminantlarda, follikül sıvısı glukoz düzeylerinin Orsi ve ark (2005)'nın bildirdikleri düzeylere (80 mg/dl) ulaşmasının oldukça güç olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmada da siklus evrelerinde elde edilen follikül sıvısı glukoz düzeylerinin (Çizelge 1) Orsi ve ark (2005)'nın inekler için bildirdikleri düzeylerden oldukça düşük olduğu Leroy ve ark (2004)'nın bildirdikleri düzeylere daha yakın olduğu gözlenmiştir. Araştırmalar

arasındaki glukoz düzeylerindeki bu farklılığın, organizmada glukoz düzeylerinin fazlasıyla etkilendiği bilinen ırk, mevsim ve beslenme farklılıklarından da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Shujait (2006)'in aksine ve Leroy ve ark (2004) gibi yukarıda bildirilen birçok araştırmacının bulgularına uyumlu olarak follikül sıvısı glukoz düzeylerinin follikül çapı ile pozitif ilişkili olduğu belirlenmiştir. Nitekim Shujait (2006)'in bildirdikleri gibi follikül sıvısındaki su miktarının artışı follikül sıvısında glukoz düzeylerinin düşüşüne sebep olmayacağı açıktır. Aksine, karbonhidratların su tutucu özelliklerinden dolayı, glukoz miktarı artışının follikül içerisindeki su miktarını artırarak, folliküler büyümenin etkenlerinden biri olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yapılan araştırmalar (Mc Natty ve ark 1978; Gosden ve ark 1988) büyük follikülde daha az miktarda granulosa hücrelerinin glukoz tükettiğini ve laktat ürettiğini göstermiştir.

Follikül çapı ile follikül glukoz düzeylerinin pozitif ilişki içinde oluşu büyük folliküllerde glukoz metabolizmasının küçüklere oranla daha düşük olduğu anlamına gelmektedir ki bu durum glukozun follikül sıvısında daha az tüketimi ile sonuçlanmaktadır. Bu bulgu büyüyen follikülde laktat üretiminin azalması ile de desteklenmiştir (Leroy ve ark 2004). Bu konuda ikinci bir görüş de follikülün büyümesiyle birlikte kan-follikül bariyerinin geçirgenliğinin de artışıdır (Edwards 1974, Zannoni 1974, Okuda ve ark 1983, Bagavandos ve ark 1983). Serum ya da plazma içeriği ile follikül sıvısı arasındaki ilişkilerin büyük folliküllerde daha belirgin çıkması (Leroy 2004) bu görüşü desteklemektedir.

Kolesterol organizmada bilinen önemli birçok fonksiyonlarının yanında özellikle steroid yapıdaki hormonların ön maddesi olması açısından reprodüksiyonla

da direkt ilişkili moleküllerden biridir. Follikül sıvısında kolesterol HDL'lere bağlı olarak bulunur çünkü diğer lipoprotein fraksiyonları kan-follikül bariyerini geçemeyecek kadar büyük yapıya sahiptirler (Puppione 1978, Grummer ve Carroll 1988, Wehrman ve ark 1991, Bauchart 1993).

Diğer birçok madde gibi kolesterol ve trigliseridin de serum düzeyleri ile karşılaştırıldığında follikül sıvısında daha düşük düzeylerde olduğu (Chang ve ark 1976, Leroy ve ark 2004) bunun yanında follikül çapı ile ilişkili oldukları gözlenmiştir. Ancak farklı hayvan türlerinde ve insanlarda düzeyleri ve diğer parametrelerle ilişkileri ile ilgili bilgiler değişkenlik göstermektedir.

Chang ve ark (1976) domuzlarda follikül sıvısı trigliserid düzeylerinin follikül çapı ile negatif ilişkili olduğunu, kolesterol düzeylerinin ise yine en yüksek düzeylere küçük folliküllerde rastlamalarına karşın istatistiki bir farklılık belirlenemediğini bildirmektedirler. Araştırıcılar bu bulgularını organizmada lipidlerin taşınmasında rol oynayan VLDL ve betaLDL'nin moleküler büyüklüklerinden dolayı kan-follikül bariyerini geçemeyişi ve follikül sıvısı içerisinde bulunmaması ile açıklamaya çalışmışlardır. Metabolik aktivite ve beslenme ile direkt ilişkili olan trigliseritlerin (Wehrman ve ark 1991) follikül sıvısı içerisindeki varlığı birçok soru işaretini de beraberinde getirmektedir. Organizmada öncelikle VLDL'ler aracılığıyla taşındıklarından trigliseridler folliküler membranı geçemezler. Çünkü VLDL follikül bariyerini geçemeyecek kadar büyük moleküllerdir (Grummer and Carrol 1988). Bu nedenle trigliseridler için bölgesel bir sentezden söz etmek mümkündür. Bu sentezin ne şekilde olduğu, folliküler steroid sentezi yapan hücrelerin parçalanmasının bir ürünü mü yoksa başka bir sentez yolunun mu bulunduğu yapılan araştırmalarda netlik kazanmamasına karşın,

trigliseridlerin follikül sıvısında alternatif enerji kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kim ve ark 1996; 2001, Abe ve ark 2002).

Yapmış olduğumuz araştırmada trigliserid düzeylerinin proöstrus dışında Leroy ve ark (2004)'nın bildirdiği düzeylerden daha yüksek olduğu özellikle bu farkın östrus ve metaöstrusda daha da belirginleştiği tesbit edilmiştir. Çalışmamızda proöstrusta gözlenen follikül sıvısı trigliserid düzeylerinin belirgin olarak düşüklüğü, aynı evrede bulunun kolesterol düzeylerinin yüksekliği ile açıklanabilir. Yüksek trigliserid düzeyleri hayvanlar arasındaki ırk ve sezon gibi farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Berger ve ark (1987) kadınlarda folliküler gelişim ile follikül sıvısı kolesterol düzeyleri arasında bir ilişkiye rastlamadıklarını ve kolesterolün folliküler gelişimle ilişkili bir parametre olmadığını bildirmektedirler. Aynı araştırıcılar bu bulgularının aksine, follikül sıvısı steroid ve kolesterol düzeyleri arasında direkt bir ilişkinin varlığından da söz etmektedirler. Steroid hormonlardan özellikle östradiol 17β'nın follikül çapı ile direkt ilişkili bir molekül olduğu artık bilinen bir gerçektir. Bu nedenle kolesterol düzeylerinin steroid hormonlarla ilişkili olup, follikül çapı ile ilişkili olmaması beklenemez.

Yukarıdaki bulguların aksine Leroy ve ark (2004) ineklerde küçük (<4 mm), orta (6-8 mm) ve büyük (>10 mm) çaplı ovaryum folliküllerinde follikül total kolesterol miktarlarının follikül çapı ile paralellik gösterdiğini, trigliserid miktarlarının negatif ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Follikül çaplarına göre total kolesterol düzeyleri sırasıyla 55,9±3,36; 62,7±2,91;63,7±3,23 mg/dl, trigliserid düzeyleri ise sırasıyla 21,8±0,60; 16,6±0,55; 17,0±0,91 mg/dl olarak bulunmuştur. Hatta araştırıcılar küçük folliküllerdeki trigliserid miktarlarının serumun da daha

yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kan ve follikül sıvısı trigliserid düzeyleri açısından ilişkiye ise sadece büyük folliküllerde rastlayan Leroy ve ark (2004) bu bulgu ile folliküler trigliseridin düzeylerinin lokal metabolik bir oluşumun sonucu olduğu kanısına varmışlardır. Blaszcyk ve ark (2006) ineklerde follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin istatistiki olarak farklılık göstermemekle birlikte follikül çapına paralel olarak artış gösterdiğini ve ortalama kolesterol düzeyinin 64,58 ± 2.82 mg/dl olduğunu belirlemişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen ortalama follikül sıvısı kolesterol düzeyleri (Çizelge 1) Leroy ve ark (2004) ile Blaszcyk ve ark (2006)'nın inekler için bildirdikleri düzeylerden düşük olmakla birlikte benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Seksüel siklus evrelerine göre follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin araştırmamızda da follikül çapı ile pozitif ilişkili bulunuşu Leroy ve ark (2004)'nın bulgularıyla paralellik göstermiştir.

Sureshkumar ve Janakiraman (1993) keçilerde ovaryum dokusunda kolesterol düzeylerinin siklusun evrelerine göre farklılık gösterdiğini ve en yüksek düzeylerin diöstrus ortasında belirlendiğini bildirirlerken, Shujait (2006) develerde follikül sıvısı kolesterol düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında yüksek kolesterol düzeylerinin yüksek östrojen düzeyleriyle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Yapmış olduğumuz araştırmada da her ne kadar steroid hormon düzeyleri belirlenmemiş de olsa östrojen hormonunun etkin ve yüksek düzeylerde olduğu siklusun folliküler evrelerinde (proöstrus ve östrus) follikül sıvısı kolesterol düzeylerinin de yüksek bulunması Shujait (2006)'in bulguların da destekler niteliktedir ve kolesterolün steroid hormonların ön maddesi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Total kolesterol konsantrasyonunun büyük folliküllerde daha yüksek oluşu kan-follikül bariyerindeki geçirgenlik artışı ile de açıklanabilir. Bu durumda bariyer molekül büyüklüklerine göre diğer lipoprotein bağlı kolesterolün de geçişine izin verebileceği gibi (Bagavandoss ve ark 1983, Wehrman ve ark 1991), follikül büyümesiyle birlikte follikül içerisinde de novo sentezde artış da sözkonusu olabilir.

## 5- SONUÇ VE ÖNERİLER

Gelişimi süresince oldukça dinamik bir yapı olan ovaryum follikül sıvısının oluşumunda kan-follikül bariyeri yanında folliküler hücreler tarafından yapılan de novo sentezin de önemli bir etken olduğu blr gerçektir.

Yapılan araştırma sonucunda özellikle follikül sıvısı glukoz ve kolesterol düzeylerinin siklusun evrelerine ve follikülün çapına göre değişimler gösterdiği ve bu iki molekülün de folliküldeki metabolik aktivite ile direkt ilişkili moleküller olduğu ortaya çıkmıştır. Özellikle kolesterol düzeylerinin belirlenmesinin yanında kolesterolün organizmada taşınmasında görev alan lipoproteinlerin follikül sıvılarındaki düzeylerinin ya da varlıklarının belirlenmesi de kolesterolün ovaryum metabolizmasındaki etkilerinin derinleştirmesi açısından önem arz edeceği açıktır.

Bütün bunların yanında araştırılan partametrelere ek olarak ovaryum metabolizmasında etkili olduğu düşünülen diğer parametrelerin (enzim ve bazı antioksidan vitaminler gibi) de yapılacak çalışmalara ilave edilmesinin ve ayrıca kan-follikül bariyerinin geçirgenliğinin de araştırılabileceği imunohistokimyasal çalışma bulgularıyla ortak yorum yapılmasının daha yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

## 6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Ovaryum Follikül Sıvısının Biyokimyasal İçeriği ve Follikül Çapı ile İlişkisi**

**Ali Uğur**

**Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı**

**Danışman**

**Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2008**

İneklerde ovaryum follikül sıvısının biyokimyasal içeriği ve follikül çapı arasındaki ilişkiler ve seksüel sikluslara göre meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma özel bir mezbahaya kesim amacıyla getirilen, her siklus evresinden 20 baş olmak üzere toplam 80 baş sağlıklı Holstein ırkı inekte yürütülmüştür.

Mezbahada kesilen ineklerin sağlıklı olduğu belirlenen ovaryumlarının su banyosunda ultrasonografik olarak follikül çapları belirlenmiş ve hayvanlar siklus evrelerine göre (Proöstrus, Östrus, Metöstrus ve Diöstrus) gruplanmışlardır. Çapları belirlenen folliküllerden aktif olan ovaryumdaki en büyük follikül içerisindeki follikül sıvısı ince uçlu bir enjektör yardımıyla alınarak follikül sıvılarında glukoz, total protein, albumin, kolesterol ve trigliserid düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Yapılan analizler sonucu en düşük trigliserid düzeylerine proöstrusta rastlanırken, aksine aynı evrede glukoz ve kolesterol düzeylerinin diğer evrelerde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Total protein ve albumin düzeylerinde siklus evrelerine göre gözlenen değişimlerin istatistiki olarak önemli olmadığı gözlenmiştir. Siklus evrelerine göre incelenen parametrelerde farklı ilişkiler gözlenmesinin yanında özellikle follikül sıvısı glukoz ve kolesterol düzeylerinin follikül çapı ile pozitif ilişki gösterdiği görülmüştür. Total protein düzeylerinin proöstrusta, albumin düzeylerinin ise diöstrus evresinde follikül çapı ile negatif ilişkili olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak özellikle glukoz ve kolesterolün ovaryum fonksiyonlarıyla direkt ilişkili moleküller olduğu ancak konunun daha derinlemesine incelenip anlaşılabilmesi için kan-follikül bariyerinin geçirgenliğinin de araştırılabileceği imunohistokimyasal çalışma bulgularıyla ortak yorum yapılmasının daha yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Follikül sıvısı; inek; biyokimyasal parametreler

## 7-SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Biochemical Composition of Ovarian Follicular Fluid and Relation to Follicle Size**

**Ali Uğur**

**Department Biochemistry (Vet)**

**Consultant**

**Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu**

**GRADUATE THESIS / KONYA-2008**

This study which is performed in order to determine the changes that occur according to the relation between biochemical composition of ovarium follicle fluid and its follicle diameter and sexsual cycles carried out with 20 cows from each cycle stage and totally 80 healthy Holstein cows that are brought to a private slaughterhouse for the purpose of slaughtering.

Follicle diameters of healthy ovariums of the cows that are slaughtered in the slaughterhouse are defined ultrasonographically in water bathtube and animals are classified according to their cycle stage (proestrus, estrus, metestrus and diestrus). Defined diameters of follicles, follicle liquid in the biggest follicle is taken with help of fine tipped injector and defined their glucose, total protein, albumin, cholesterol and trigliserid levels spectrophotmetrically in follicle fluids.

According to the analyses made, the lowest trigliserid levels are reported in proestrus, conversely in the same stage, it is reported that glucose and cholestrol levels are greater than the other stages. It is observed that changes acquired according to cycle stages in total protein and albumin levels are not important statistically. Besides observing varying relations in parameters that are investigated in terms of cycle stages, especially it is observed that there is a positive relation between glucose and cholestrol levels of follicle fluid and follicle diameter. It is seen that total protein levels have negative relations with its follicle diameter in proestrus stage; albumin levels have it in diestrus stage.

As a result, especially it is found that glucose and cholestrol are molecules that are directly related with ovarium functions but, in order to investigate and understand the subject deeply it is decided that it is more useful to make mutual comments with the findings of immunohistochemical studies in which permeability of blood-follicle barrier can also be investigated.

**Key words:** Follicle fluid; cow; biochemical parameters

## 8- KAYNAKLAR


Abe H, Yamashita S, Satoh T & Hoshi H (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol Reprod Dev, **61:** 57–66.

Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC (1994). Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. J Reprod Fertil; **100**:27-33.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginter OJ (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. Reprod Fertil, **94:** 177-188.

Anderson MM, Kroll J, Byskov AG and Faber M (1976). Protein composition in the fluid of individual bovine follicles J Reprod Fert **48**: 109-118.

Angelucci S, Ciavardelli D, Giuseppe FD, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Paola Palumbo, Ilio CD (2006). Proteome analysis of human follicular fluid, Bioch Bioph Acta - Proteins & Proteomics, 1764; 1775-1785

Arshad HM, Ahmad N, Rahman Z, Samad HA, Akhtar N, Ali S (2005). Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes, Pakistan Vet J, **25:** 189-193.

Aslan S, Fındık M, Erünal-Maral N, Kalender H, Çelebi M und Saban E (2000) Vergleich verschiedener untersuchungsmethoden bei der ovardiagnostik des rindes. Dtsch Tierarztl Wschr, **107:** 227-230.

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.

Bauchart D (1993). Lipid absorption and transport in ruminants. Journal of Dairy Science, **76**: 3864-3881

Beitins IZ, Padmanabhan V (1991). Bioactivity of gonadotropins. In: Styne D (ed.), Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, vol. 20. Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 85-120.

Berger MA, Laufer N, Lewin A, Navot D, Rabinowitz R, Eisenberg S, Margalioth EJ and Schenker JG (1987). Cholesterol and steroid levels in human follicular fluids of human menopausal gonadotropin-induced cycles for in vitro fertilization. J Ass Reprod Gen. **4:** 30-33.

Blasczyk B, Stankiewicz T, Udala J, Gaczarzewicz T, Lasota B, Blasczyk B, Szymanska A, Szymanska-Pasternak J (2006). Free throid hormones ans cholesterol in follicular fluid of bovine ovaries, Bull Vet Inst Pulawy, **50:** 189-193.

Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ & Gosden RG (1994). Characterization of follicular energy metabolism. Human Reproduction **9:** 604–609.

Boryczko Z, Bostedt H, Hoffmann B (1995). Comparison of hormonal and chemical composition of the fluid from bovine ovarian follicles and cysts. Reprod Domest Anim, **30:** 36–38.

Brandmeier SA, Bellin ME, Boehm SK, Bushmeyer SM, Grummer RR, Ax RL (1987a). Influence of stage of cycle, corpus luteum location, follicle size and number of large follicles on estradiol 17β concentrations in bovine follicles, J Dairy Sci., **70:** 2138-2144.

Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL (1987b). Concentrations of high-density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. J. Dairy Sci. **70:** 2145–2149.

Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptormediated pathway for cholesterol homeostasis. Science **232:**34-42.

Chang SCS, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ (1976). The porcine ovarian follicle: selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. Biol. Reprod, **15:** 321–328.

Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C (1983). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. Endocr Rev, **4:** 179-211.

Collins A, Palmer E, Bezard J, Burke J, Duchamp G & Buckley T (1997). A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. Equine Veterinary Journal Supplement **25:** 12–16.

Convey EM, Beck TW, Neitzel RR, Bostwick EF, Hafg HD (1977). Negative feedback control of bovine serum luteinizing hormone (LH) concentration from completion of the preovulatory LH surge until resumption of luteal function. J Anim Sci, **46:** 792-799.

Cran DG, Moor RM & Hay MF (1976). Permeability of ovarian follicles to electron-dense macromolecules. Acta Endocrinologica 82 631–636.

Dieleman SJ, Kruip AM, Fontijne P, De Jong HR, Van der Weygen GC (1983). Changes in oestradiol progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone, J Endocrinol, **97:** 31-42.

Edwards RG (1974). Follicular fluid. J Reprod Fertil, **37:** 189-219.

Eiler H and Nalbandov AV (1977). Sex steroids in follicular fluid and blood plasma during the estrous cycle of pigs, Endocrinology, **100:** 331-338.

Eissa HM (1996). Concentrations of steroids biochemical constituents in follicular fluid of buffalo cows during different stages of oestrous cycle. Br Vet J, **152:** 573-579.

Fisch B, Goldberg I, Ovadia J, Tadir Y (1990). Physicochemical properties of ollicular fluid and their relation to *in vitro* fertilization (IVF) outcome. J In Vitro Fertil Embryo Transf, **7:** 67-73.

Gerard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F (2002). Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (HNMR). Reprod, **124**: 241–248.

Gosden RG, Hunter RHF, Telfer E, Torrance C, Brown N (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid, J Reprod Fertil, **82**: 7813–7825.

Grummer RR, Carrol DJ (1988). A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian functions, J Anim Sci, **66:** 3160–3173.

Guyton AD (2001). Tıbbi Fizyoloji. Prof. Dr. Hayrünnisa ÇAVUŞOĞLU (çeviri editörü). Yüce Yayınları, cilt 2, İstanbul.

Hafez B (2000). Reproduction in Farm Animals (7th Ed.). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. Chapter 5. pp. 69.

Hammon DS, Wang S, Holyoak GR (2000). Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. Anim Reprod Sci, **58:** 1–8.

Hess KA, Chen L & Larsen WJ 1998 The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size selective in mice. Biology of Reproduction **58:** 705–711.

Hunter DL, Erb RE, Randel RD, Garverick HA, Callahan CJ, Harrington RB (1970). Reproductive steroids in the bovine. I. Relationships during late gestation. J Anim Sci, **30:** 47-59.

Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K & Sato E (2002). Follicular microvasculature in the porcine ovary. Cell and Tissue Research **310:** 93–101.

Kaneko H, Kishi H, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S and Hasegawa Y (1995). Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. J Reprod Dev, **41:** 311–317

Kesner JS, Convey EM (1982). Interaction of estradiol and luteinizing hormone releasing hormone on follicle stimulating hormone release in cattle, J Anita Sci, 54: 817-822.

Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K (1996). The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. Theriogenology 45:787-799.

Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M & Fukui Y (2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. Reproduction, **122:** 131–138.

Kruip TAM, Dieleman S J (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. Reprod. Nutr. Dev, **22**: 256–260.

Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I (2000). Preovulatory follicular status affects the insulin and glucose content of the follicles in high yielding dairy cows. Anim Reprod Sci, **64:** 299–314.

Le Goff D (1994). Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. Biochim Biophys Acta, **1210:** 226–232.

Leese HJ, Lenton EA (1990). Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationship. Hum Repord, **5:** 915-919.

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe J R (2004). Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different–sized follicles and their relationship to serum in dairy cows. Anim Reprod Sci, **80:** 201–211.

Lutwak-Mann C (1954). Note on the chemical composition of bovine follicular fluid. J Agric Sci (Camb) **44:** 477-478.

Macchiarelli G (2000). The microvasculature of the ovary: a review by S.E.M. of vascular corrosion casts. Journal of Reproduction and Development **46:** 207–225.

McNatty KP (1978). Follicular fluid. In The Vertebrate Ovary, pp 215–259. Ed. RE Jones. New York: Plenum Press.

McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ (1978). The microenvironment of human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in the antral fluid, the population

of granulosa cells, and the status of the oocytes in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab, **49:** 851-860.

Nandi S, Girish Kumar V, Manjunatha BM and Gupta PSP (2007). Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size Develop. Growth Differ, **49:** 61–66

Okuda ve ark 1983, Okuda Y, Okamura H, Kanzaki H, Takenaka A (1983). Capillary permeability of rabbit ovarian follicles prior to ovulation. J Anat, 137: 263-269.

Orsi N, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE (2005). Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. Reprod. **129:** 219-228.

Perret BP, Parinaud J, Ribbes H, Moatti JP, Pontonnier G, Chap H, Douste-Blazy L (1985). Lipoprotein and phospholipid distribution in human follicular fluids. Fertil Steril, **43:** 405–409.

Price CA (1991). The control of FSH secretion in the larger domestic species. J Endocr, **131:** 177–184.

Puppione DL (1978). Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. J. Dairy Sci. 61:651.

Rabiee AR, Lean, IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ (1997). An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. Anim. Reprod. Sci. 48: 9-25.

Rondell P (1970). Biophysical aspects of ovulation. Biol Reprod (Suppl), **2:** 64-89.

Salem HAL, Serur BH, Amer HA (1997). Oestradiol, progesterone and thyroxine in follicular fluids of normal, cystic and athretic follicles of non-pregnant camels in Saudi Arabia. J Camel Prac Res, **4:** 81-83.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JE (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. J Reprod Fertil, **83:** 663-671.

Serpek B, Baspınar N, Halıloglu S, Erdem H (2001). The relationship between ascorbic acid, oestradiol 17β and progesterone in plasma and in ovaries during the sexual cycle in cattle. *Revue Méd. Vét.,* **152:** 253-260.

Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M & Soferman N 1973 Proteins of human follicular fluid: the blood–follicle barrier. Fertility and Sterility **24:** 429–434.

Shujait A (2006). Studies on ovarian follicular morphology, serum biochemical and hormonal profiles in female camel during the low and the peak breeding seasons, PhD Thesis, Fiasalabad, Pakistan.

Stoch EA, Stolla R (1995). Der dominante Ovarfollikel beim Rind Physiologische Zusammenhänge und Praktischen Bedeutung. Tierärztl Umschau, **50:** 543-550.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. J Reprod Fertil, **101:** 547-555.

Sureshkumar PK, Janakiraman K (1993). Histomorphological changes of the caprine ovary relative to the stages of the estrous cycle. Small Rum. Res, **12:** 287-300.

Taylor C and Rajamahendran R (1991). Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. J Dairy Sci, **74:** 115-123.

Wehrman ME, Welsh TH, Jr and Williams GL (1991). Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity *Biology of Reproduction* **45:** 514–522

Wise T, Vernon MW. Maurer RR (1986). Oxytocin, prostaglandins E and F, estradiol, progesterone, sodium and potassium in preovulatory bovine follicles either developed normally or stimulated by follicle stimulating hormone. Theriogenology, **26:** 757-778.

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.

Yamada O, Abe M, Takehana K, Iwasa K & Hiraga T (1994). Scanning electron microscopical observation of the intramitochondrial body in the bovine corpus luteum during pregnancy and after parturition. J Vet Med Sci **56:** 459–464.

Zachariae F, Jensen CE (1958). Studies on the mechanism of ovulation: Histochemical and physico-chemical investigations on genuine follicular fluids. Acta Endocr, **27:** 343.

Zannoni V, Lynch M, Goldstein S, Sato P (1974). A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. Biochem Med, **11:** 41-48.

Zhuo L & Kimata K 2001 Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. Cell Structure and Function **26:** 189–196.

Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh F, Sei Fujii Y, Ohno S (2007). Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood–follicle barrier formation of mice revealed by ‘in vivo cryotechnique. Reproduction, **134:** 307–317.

## 9- ÖZGEÇMİŞ

Osmaniye ilinin Bahçe ilçesinde 15.07.1980 doğumlu olan Ali Uğur emekli öğretmen anne ve babanın üç çocuğundan ikincisidir.

İlkokulu 4.sınıfa kadar Hasanbeyli İlköğretim Okulu'nda, beşinci sınıfı Osmaniye Ertuğrul Gazi İlköğretim Okulu'nda okudu. Osmaniye Derviş Paşa Lisesi ve Adana Atatürk Ortaokulu'nda ortaöğrenimini tamamladı ve liseyi Adana Borsa Lisesi'nde okudu.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu'nun Sağlık Memurluğu bölümünü 2000 yılında kazandı ve 2001-2002 Öğretim yılının başında Niğde Üniversitesi Aksaray Sağlık Yüksek Okulu'nun Sağlık Memurluğu bölümüne yatay geçiş yaparak 2004 yılının haziran ayında Aksaray Sağlık Yüksek Okulu'ndan mezun oldu. 2005-2006 güz döneminde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya başladı.

Yüksek lisans öğrenciliği sırasında, 2007 yılının temmuz ayında Konya Meram Eğitim Araştırma Hastanesi'ne Sağlık Memuru olarak atanan Ali Uğur, 2008 yılının şubat ayında Adana Dr. Ekrem Tok Hastanesi'ne Sağlık Memuru olarak atandı. Halen aynı yerde Sağlık Memuru olarak görev yapan Uğur, ayrıca Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi 4. sınıf öğrencisidir.