

Wojciech Mościcki

**Określenie i porównanie stężeń wybranych hormonów,
czynników wzrostu i składników biochemicznych
w dominujących i atretycznych pęcherzykach
jajnikowych w odniesieniu do surowicy u krów
mlecznych w różnym wieku**

*Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze
Biotechnologii Rozrodu
Zwierząt i Higieny Środowiska
pod kierunkiem dr hab. inż.
Barbary Błaszczuk, prof. ZUT*

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować mojej kochanej Żonie Ewie,
wspaniałym Rodzicom Jolancie i Zbigniewowi
oraz cudownym Teściom Helenie i Wojciechowi.
Serdecznie dziękuję za poświęcony czas, przekazaną wiedzę, wskazówki i korekty
mojemu Promotorowi dr hab. inż. Barbarze Błaszczuk, prof. ZUT*

SPIS TREŚCI

I.	WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY	4
II.	WSTĘP.....	5
III.	PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	7
1.	Folikulogeneza i steroidogeneza pęcherzykowa u krów.....	7
1.1.	Wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych.....	7
1.2.	Steroidogeneza pęcherzykowa	11
1.3.	Płyn pęcherzykowy	13
1.4.	Atrezja pęcherzykowa	16
1.5.	Czynniki wpływające na folikulogenezę.....	17
2.	Rozwój i funkcja ciała żółtego	19
3.	Cykl rujowy u krów.....	20
IV.	CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA.....	23
V.	MATERIAŁY I METODY	24
1.	Klasyfikacja pęcherzyków jajnikowych i wyznaczenie badanych grup	24
2.	Badane parametry	28
3.	Analiza statystyczna.....	30
VI.	WYNIKI.....	32
VII.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	51
VIII.	WNIOSKI	59
IX.	PIŚMIENNICTWO	61
X.	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	81
XI.	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	82

I. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

TGF- β - nadrodzina transformujących czynników wzrostu beta (*transforming growth factor beta family*)

GnRH - gonadoliberyna (gonadotropin-releasing hormone)

BMPs - białka morfogenetyczne kości (bone morphogenetic proteins)

GDFs - czynniki wzrostu i różnicowania (growth differentiation factors)

EGF – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor)

LH - hormon luteinizujący (luteinizing hormone)

LHR – receptor hormonu luteinizującego (luteinizing hormone receptor)

FSH - hormon folikulotropowy (*follicle-stimulating hormone*)

FSHR- receptor hormonu folikulotropowego (follicle-stimulating hormone receptor)

LDLs - cząsteczki lipoprotein o niskiej gęstości (low-density lipoproteins)

HDLs – cząsteczki lipoprotein o wysokiej gęstości (high-density lipoproteins)

E₂ - 17- β -estradiol (estrogen steroid hormone)

P₄ – progesteron (occurring steroid hormone)

mRNA – matrycowy RNA (messenger RNA)

StAR - białkowy regulator steroidogenezy (steroidogenic acute regulatory protein)

IGFs - insulinopodobne czynniki wzrostu (insulin-like growth factors).

COX-2 - cykloksygenaza 2 (cyclooxygenase 2)

HAS-2 - syntaza kwasu hialuronowego 2 (hyaluronic acid synthase 2)

GREM1 - inhibitorem szlaku sygnałowego TGF- β (gremlin 1)

VEGF - śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor)

TGF- α - transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor alpha)

FGF - fibroblastowy czynnik wzrostu (fibroblast growth factor)

MAPK - szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenem (mitogen-activated protein kinase)

II. WSTĘP

Naturalna długość życia krów wynosi 18-22 lata i jest kilkakrotnie wyższa niż wiek, w którym samice tego gatunku poddawane są ubojowi. Ta tendencja skracania długości życia krów spowodowana jest efektami ekonomicznymi, na które wpływa przede wszystkim wydajność mleczna. Dlatego też przeciętny okres użytkowania krów wynosi około 3-4 lata. Nie ulega jednak wątpliwości, iż zbyt wiele krów jest za wcześnie brakowanych. Należy bowiem podkreślić, że płodne krowy rodzące zdrowe cielęta w wieku 15-20 lat nie są rzadkością. Spadek wydajności mlecznej następuje bowiem wiele wcześniej niż obniżenie się zdolności do rozrodu związanej z zahamowaniem aktywności jajników.

Niewątpliwie czas trwania aktywności rozrodczej zależy od liczby funkcjonalnych pęcherzyków jajnikowych. Potencjał rozrodczy, zdeterminowany liczbą pęcherzyków jajnikowych w momencie narodzin, w kolejnych latach życia samicy ulega znacznemu obniżeniu. Szacuje się, że jajniki cieliczki w momencie urodzenia zawierają około 70 tysięcy pęcherzyków jajnikowych, u krów w wieku 3 lat około 20 tysięcy, a u 10-letniej krowy w jajnikach znajduje się już tylko kilka tysięcy pęcherzyków jajnikowych. To zmniejszenie ilości pęcherzyków jajnikowych i znajdujących się w nich oocytów spowodowane jest procesami degeneracji pęcherzyków, tzw. atrezją. Należy też uwzględnić, iż proces dojrzewania pęcherzyków obejmuje procesy związane z dominacją i selekcją. Dlatego też istotne wydają badania nad poszerzeniem wiedzy o jakości pęcherzyków jajnikowych znajdujących się w jajnikach krów w różnym wieku. Do badań tych należy między innymi ocena składu płynu pęcherzykowego, który tworzy naturalne środowisko rozwoju i dojrzewania oocytów.

Należy podkreślić, że skład ten odzwierciedla zmiany w procesach sekrecyjnych komórek tworzących pęcherzyk, a także zależy od stężeń wielu składników krwi. W związku z powyższym uzasadnionym wydaje się określenie zależności między stężeniem badanych składników w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy. Ponadto ważnym aspektem badań są także prace nad szerszym poznaniem roli czynników należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta (TGF- β), które obok gonadotropin, hormonów steroidowych i innych substancji biologicznie czynnych uczestniczą w regulacji folikulogenezy. Jednak niewiele wiadomo na temat fluktuacji

stężeń tych czynników w płynie pęcherzykowym w zależności od dominacji i atrezji pęcherzykowej, a także wieku samic.

Mając powyższe na uwadze, uzasadnionym wydaje się podjęcie badań nad składem płynu bydłych pęcherzyków jajnikowych w zależności od ich statusu oraz wieku krów.

III. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

1. Folikulogeneza i steroidogeneza pęcherzykowa u krów

1.1. Wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych

Pęcherzyk jajnikowy jest podstawową jednostką strukturalną i funkcjonalną jajnika. Jego podstawową funkcją jest tworzenie optymalnych warunków dla rozwoju oocytu, a także jego uwolnienia w trakcie owulacji. W pęcherzyku jajnikowym syntetyzowane są również substancje biologicznie czynne (hormony i liczne czynniki wzrostu), które nie tylko tworzą kontrolowane środowisko dojrzewania oocytu, ale wpływają też na czynność całego układu rozrodczego i oddziałują na uwalnianie gonadoliberyny (GnRH – gonadotropin-releasing hormone) i hormonów przysadkowych (Parrott i Skinner, 1999).

Proces powstawania pęcherzyka jajnikowego rozpoczyna się już w życiu płodowym, kiedy oocyt zostaje otoczony pojedynczą warstwą spłaszczonych komórek ziarnistych, na zewnątrz której tworzy się błona podstawna (Blanco i in., 2011). Tak powstały pęcherzyk pierwotny ma średnicę od 30 do 40 μm , a średnica znajdującego się w nim oocytu wynosi od 20 do 30 μm (Kątska, 1997). Jest to pierwszy etap folikulogenezy – procesu prowadzącego do ukształtowania i wzrostu dojrzałego pęcherzyka jajnikowego. U bydła pęcherzyki pierwotne pojawiają się w jajniku około 140 dnia ciąży (Driancourt, 2001). Szacuje się, że ich liczba pomiędzy 170. a 270. dniem ciąży może wahać się między 180 000 a 200 000 (Cognie i in., 1998). Dalszy etap folikulogenezy zachodzi wraz z osiągnięciem dojrzałości płciowej samicy, która u krów rozpoczyna się zwykle między 6 a 8 miesiącem życia.

U krów czas trwania wzrostu i dojrzewania pęcherzyka jajnikowego od momentu wejścia pęcherzyka pierwotnego w fazę wzrostu do osiągnięcia stadium owulacyjnego trwa w przybliżeniu od 4 do 6 miesięcy i proces ten zachodzi przez cały okres aktywności płciowej (Hunter i in. 2004). W tym czasie dochodzi do gwałtownego wzrostu oocytu oraz różnicowania i proliferacji komórek somatycznych tworzących pęcherzyk jajnikowy (Araújo i in., 2014). Według Braw-Tal i Yossefi (1997) intensywny wzrost pęcherzyków bydlęcych zachodzi, gdy znajduje się w nich około 40 komórek ziarnistych, a oocyt ulega znacznemu powiększeniu. W wyniku postępującej folikulogenezy dochodzi do

utworzenia wypełnionej płynem jamki (*antrum*) oraz wysoko wyspecjalizowanych komórek kumulusa, które mają bezpośrednio kontakt z oocytem (Krysko i in., 2008).

Do pęcherzyków przedantralnych (stadia rozwojowe przed wytworzeniem *antrum*) należą pęcherzyki pierwotne oraz pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe (Hirshfield, 1991; Nilson i Skinner, 2009). Do 4. roku życia ich liczba wynosi 133 000, a do wieku 15 – 20 lat stopniowo spada do około 3000 (Smorąg i in., 1999).

W pęcherzyku pierwszorzędowym wokół rosnącego oocytu formułuje się ciągła warstwa kuboidalnych komórek ziarnistych, które za pomocą desmosomów i złącz szczelinowych kontaktują się z oocytem. Ich zadaniem jest przekazywanie substancji odżywczych oraz cząsteczek regulatorowych (Britt, 2008). Jednocześnie między warstwą komórek ziarnistych bezpośrednio otaczających oocyt a oocytem powstaje glikoproteinowa osłonka przejrzysta (*zona pellucida*), która początkowo odkłada się w postaci kłaczek, a w miarę wzrostu oocytu staje się warstwą ciągłą zwiększając swoją gęstość i stopień polimeryzacji. Proliferację i różnicowanie komórek ziarnistych pobudzają między innymi czynniki wzrostu z nadrodziny transformujących czynników wzrostu – β (TGFs- β – transforming growth factors- β family) (Li i in., 2008). W jajniku czynniki te produkowane są głównie przez oocyt, ale również przez komórki somatyczne pęcherzyka. Należą do nich między innymi białka morfogenetyczne kości (BMPs - bone morphogenetic proteins) tj. BMP-15, BMP-8a oraz BMP-8b oraz czynniki wzrostu i różnicowania (GDFs - growth differentiation factors) np. GDF-9 (Dube i in., 1998; Knight i Glister, 2006; Findlay i in., 2009). Czynniki wzrostu BMP-15 bierze udział w stymulowaniu ekspansji wzgórka jajonośnego poprzez zwiększenie ekspresji naskórkowego czynnika wzrostu (EGF – epidermal growth factor) w komórkach kumulusa. Z kolei EGF stymuluje podziały komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej (Yoshino i in., 2006). Liczba komórek ziarnistych wzrasta i tworzą one strukturę zwaną warstwą ziarnistą (*membrana granulosa*). Następuje też niemal pełne wykształcenie się osłonki przejrzystej. W komórkach ziarnistych rozpoczyna się synteza receptorów dla hormonu folikulotropowego (FSHR – follicle-stimulating hormone receptor) (Kanitz, 2003). Tak powstały pęcherzyk nosi nawet pęcherzyka drugorzędowego.

U krów pęcherzyki pierwszorzędowe i drugorzędowe osiągają średnicę od 30 do 70 μm (Kątska, 1997). Charakterystyczne dla stadium pęcherzyka drugorzędowego jest tworzenie się wokół błony podstawnej osłonki wewnętrznej (*theca interna*), która zbudowana jest początkowo z komórek przypominających kształtem fibroblasty (Fair i in., 1997). W kolejnym etapie komórki osłonki wewnętrznej zmieniają kształt,

upodabniając się do komórek nabłonkowych (Rodgers i Irving-Rodgers, 2010a). Następnie do osłonki zaczynają wnikać naczynia krwionośne, co zapoczątkowuje jej różnicowanie na osłonkę zewnętrzną (*theca externa*) i zbudowaną z komórek steroidogennych osłonkę wewnętrzną (*theca interna*). W błonach komórek osłonki wewnętrznej pojawiają się receptory dla hormonu luteinizującego (LHR – luteinizing hormone receptor) (Phoophitphong i in., 2016). Dzięki tym zmianom dochodzi do utworzenia pęcherzyka trzeciorzędowego.

Dalsze powiększanie się pęcherzyka związane jest z tworzeniem się jamki (antrum). W tym czasie pomiędzy komórkami ziarnistymi dochodzi do powstania szczelin, które wypełnia płyn. Jest on produktem wydzielniczym tych komórek oraz w mniejszym stopniu, przesączem osocza (Cheon, 2012). Szczeliny łączą się w jedną, centralnie ułożoną jamkę, co doprowadza do powstania pęcherzyka antralnego. U krów do 4 roku życia liczba pęcherzyków przedantralnych wynosi około 200 – 250, a u krów 15 – 20 letnich liczba ta spada do około 100 – 125 (Smorąg i in., 1999). Średnica bydlęcych pęcherzyków trzeciorzędowych wynosi około 170 μm (Kątska, 1997).

Pęcherzyki antralne, ze względu na różnice w wielkości dzielone są na małe, średnie i duże (Hatzirodos i in., 2014). Liczebność pęcherzyków antralnych u krów do 4 roku życia wynosi od 30 do 60, a u krów 15 – 20 letnich pozostaje zaledwie połowa z nich (Smorąg i in., 1999). Ich średnica waha się od 3 do 20 mm, jednakże najliczniejszą grupę stanowią pęcherzyki o średnicy od 3 do 3,9 mm (Burns i in., 2005). Najbardziej zewnętrznie położoną częścią pęcherzyka antralnego jest osłonka zewnętrzna zbudowana z komórek mięśni gładkich, fibroblastów, włókien kolagenowych i naczyń krwionośnych (Fraser, 2006). Posiada ona unerwienie autonomiczne, składające się przede wszystkim z włókien adrenergicznych i cholinergiczych. Od wewnątrz sąsiaduje z osłonką wewnętrzną zawierającą przeważnie wielościennie lub okrągłe, aktywne steroidogenne komórki. W kierunku centrum pęcherzyka znajduje się błona podstawna, zbudowana z lamininy, kolagenu, fibronektyny i proteoglikanów. Występuje ona pomiędzy unaczynioną osłonką wewnętrzną a pozbawioną naczyń warstwą komórek ziarnistych (Irving-Rodgers i in., 2001). Warstwa komórek ziarnistych składa się, z osadzonych na błonie, komórek muralnych oraz występujących bliżej jamki, komórek antralnych. Komórki muralne są kształtu kolumnowego i ułożone są w bardzo zwartą strukturę. Posiadają większą liczbę receptorów dla LH oraz wyższą aktywność enzymów zaangażowanych w steroidogenezę (Eppig, 2001). Komórki antralne otaczające jamkę pęcherzyka są bardziej kuliste i luźniej ułożone. Z kolei komórki bezpośrednio otaczające

położony w pęcherzyku oocyt tworzą wzgórek jajonośny (*cumulus oophorus*) i wieniec promienisty (*corona radiata*). Wieniec promienisty od oocyta oddziela osłonka przejrzysta (Rodgers i Irving-Rodgers, 2010). Dojrzały pęcherzyk jajnikowy nosi nazwę pęcherzyka Graafa. Bydlęcy pęcherzyk Graafa ma największą średnicę ze wszystkich zwierząt gospodarskich, która wynosi 16-22 mm (Hunter i in. 2004).

W ostatnim etapie rozwoju pęcherzyka, który następuje po przedowulacyjnym wyrzucie hormonu luteinizującego (LH - luteinizing hormone) z przysadki mózgowej dochodzi do wznowienia mejozy w oocycie i szeregu morfologicznych zmian prowadzących do owulacji.

U bydła, podobnie jak u innych przeżuwaczy (owca, koza) występuje falowy wzrost pęcherzyków polegający na, rozpoczętym w jednym czasie, wzroście grupy pęcherzyków (Medan i in., 2005). Podczas jednego cyklu rujowego występują przeważnie dwie lub trzy fale wzrostu pęcherzyków, z których jedna zakończona jest owulacją (Hunter i in., 2004). Zarówno przy występowaniu dwóch, jak i trzech fal pęcherzykowych pierwsza fala pojawia się w dniu owulacji (dzień 0). Pojawienie się drugiej fali następuje w 9. lub 10. dniu, a w przypadku cykli trójfalowych w 8-9. i 15-16. dniu cyklu rujowego. Wykazano, że pojawienie się fali pęcherzykowej u bydła charakteryzuje się nagłym (w ciągu 2–3 dni) wzrostem 8–41 małych pęcherzyków o średnicy 3–4 mm. Początkowo tempo wzrostu tych pęcherzyków jest podobne, ale już po ok. 2 dniach do dalszego rozwoju rekrutowanych jest tylko kilka pęcherzyków antralnych, które poddawane są procesowi selekcji. Z tych, które mają odpowiednią ilość receptorów dla hormonu folikulotropowego FSH (follicle-stimulating hormone) wyłaniają się pęcherzyki dominujące osiągające wyższy stopień rozwoju od pozostałych zwanych podrzędnymi. Selekcja pęcherzyków dominujących rozpoczyna się, gdy osiągną one średnicę ok. 8,5 mm. Pęcherzyki dominujące nieowulacyjne rosną do około 15 mm, po czym ulegają atrezji, natomiast dominujący pęcherzyk owulacyjny osiąga średnicę około 20 mm (Adams i in., 1994). Uważa się, że moment osiągnięcia przez pęcherzyk średnicy powyżej 8 mm jest momentem progowym. Uwidacznia się wówczas rozbieżność w tempie wzrostu dwóch największych pęcherzyków, co związane jest z różną ich wrażliwością na działanie LH. Komórki ziarniste dominującego pęcherzyka przedowulacyjnego posiadają bowiem większą zdolność wiązania LH. Wykazano, że pęcherzyk dominujący, który jest obecny na jajniku na początku luteolizy staje się pęcherzykiem owulacyjnym. Z kolei wysokie stężenie progesteronu w czasie aktywności ciała żółtego powoduje, że pęcherzyki dominujące kolejnych fal nie osiągają stadium

owulacyjnego i ulegają atrezji. Należy też podkreślić, że oba jajniki działają jako jedna całość, która współuczestniczy w regulacji falowego wzrostu pęcherzyków jajnikowych (Adams i in., 1994; Hunter i in., 2004).

1.2. Steroidogeneza pęcherzykowa

Jedną z podstawowych funkcji pęcherzyka jajnikowego jest produkcja hormonów steroidowych. Już w okresie życia płodowego jajnik wykazuje aktywność steroidogenną (Dominquez i in., 1988). Wiele doświadczeń wskazuje, iż aktywność ta zależy od wzrostu i różnicowania się komórek pęcherzyka, a jej kierunek zmienia się w zależności od stadium, w jakim znajduje się pęcherzyk, a także od fazy cyklu rujowego (Drummond, 2006). Zdolność do produkcji hormonów steroidowych rozwija się w pęcherzyku wraz ze wzrostem receptorów dla hormonów gonadotropowych FSH i LH (Szołtys, 1992).

Do czasu przedowulacyjnego piku LH w pęcherzykach dominuje produkcja estrogenów i androgenów. Po tym okresie wzrasta synteza progesteronu. Prekursorem wszystkich hormonów steroidów jest cholesterol (Skrzypczak, 1999). Może on być syntetyzowany *de novo* z octanu, w wieloetapowej reakcji, w której enzymem regulującym jest reduktaza 3-hydroksy3-metylo-koenzym-A (enzym wrażliwy na gonadotropiny). Cholesterol może być też pozyskiwany z estrów nagromadzonych w kroplach lipidowych (Szołtys, 1999). Jednakże głównym źródłem cholesterolu dla komórek steroidogennych pęcherzyka jajnikowego są cząsteczki lipoprotein o niskiej (LDLs - low-density lipoproteins) i wysokiej (HDLs - high-density lipoproteins) gęstości. Cząsteczki lipoprotein o niskiej gęstości przechwytywane są krążenia przez specyficzne receptory (LDLr), a następnie są transportowane w pęcherzykach opłaszczonych klatryną do lizosomów. Z kolei HDL wychwytywany oraz przenoszony jest za pomocą receptorów SR-B1 (scavenger receptor class B, type I) (Christenson i Devoto, 2003). Cząsteczki lipoprotein dostają się do cytoplazmy komórki na drodze endocytozy, gdzie w wyniku estryfikacji i hydrolizy docierają do mitochondriów. Pod wpływem monoooksygenazy cholesterolu cytochromu (P450_{scc}) dochodzi do przekształcenia cholesterolu w pregnenolon. Steroidogeneza kontynuowana jest następnie w retikulum endoplazmatycznym. Przy udziale dehydrogenazy Δ^5 -3 β -hydroksysterydowej (3 β HSD) pregnenolon ulega przekształceniu w progesteron. Następnie dochodzi do hydroksylacji

progesteronu, która katalizowana jest przez 17α -hydroksylazę/ $c17$ - 20 -liazę ($P450_{C17\alpha}$). W wyniku tej reakcji powstają androgeny (Conley i in., 1994).

Kolejny etap związany jest z wpływem aromatazy ($P450_{AROM}$), która powoduje aromatyzację androgenów do estrogenów. Testosteron przekształca się w estradiol, a androstendion w estron (Corbin i in., 2003). Synteza estrogenów zależna jest od zdolności aromatyzacyjnej oraz dostępności androgenów. Dojrzałe pęcherzyki jajnikowe wykazują wysoką aktywność aromatazy oraz wysoką koncentrację estradiolu w płynie pęcherzykowym (Hunter i in., 2004).

Istotną rolę w procesie folikulogenezy zachodzącej u ssaków odgrywa 17β -estradiol (E_2). U większości gatunków, wzrost syntezy i uwalnianie tego hormonu poprzedza przedowulacyjny wyrzut gonadotropin, a także koordynuje wiele funkcji pęcherzykowych (Hunter i in., 1992). U krów, w trakcie fazy pęcherzykowej, podczas wzrostu produkcji estradiolu, rozpoczyna się morfologiczna reorganizacja warstw komórek somatycznych tj. komórek ziarnistych oraz osłonki wewnętrznej. Jest to związane ze zmianą kierunku steroidogenezy, która po owulacji nastawiana jest głównie na produkcję progesteronu (Smith i in., 1994).

Proces pęcherzykowej steroidogenezy zależny jest od skoordynowanego oddziaływania FSH i LH z ich receptorami na komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej (Bao i Garverick, 1998). Komórki osłonki wewnętrznej są stymulowane przez LH, a komórki warstwy ziarnistej – przez FSH (Szołtys, 1999).

Model steroidogenezy w pęcherzyku jajnikowym oparty jest o tzw. „teorię dwóch komórek i dwóch gonadotropin”, według której komórki ziarniste i tekalne zaangażowane są w produkcję 17β -estradiolu (Allen i in., 2016). Według jej głównego założenia komórki osłonki pęcherzyka produkują androgeny, które w wyniku aromatyzacji w warstwie ziarnistej ulegają przemianie w estrogeny (Ireland, 1987). Zgodnie z tą teorią, w komórkach ziarnistych znajdują się receptory dla FSH, a w komórkach osłonki wewnętrznej receptory dla LH. W obu typach komórek występuje enzym oksydaza cytochromowa odszczepiająca boczny łańcuch cholesterolu $P450_{SCC}$ niezbędny do konwersji cholesterolu do steroidów C-21 (progestyn). Progestyny, pregnenolon lub progesteron są prekursorami syntezy androstendionu w komórkach osłonki. Wiązanie LH z jego receptorem w komórkach osłonki stymuluje aktywność cytochromu $P450_{17\alpha}$ -hydroksylazy ($P450_{C17}$) niezbędnego do przekształcenia progestyn w androstendion (Bao i Garverick, 1998).

Jak wskazuje Fortune (1986) w komórkach ziarnistych występuje większe stężenie androstendionu niż w komórkach osłonki wewnętrznej. W przeciwieństwie do komórek osłonki, komórki ziarniste nie produkują androgenów, jednakże to w nich dochodzi do ich przekształcenia w 17- β -estradiol przez aromatazę cytochromu P450 (P450_{arom}). Podczas późniejszych stadiów rozwoju pęcherzyków estradiol oraz FSH indukują syntezę receptorów LH na błonach komórek ziarnistych (McNeilly i in., 1991).

W płynie pęcherzyków nieatretycznych (zdrowych) występuje wyższe stężenie estradiolu, a zarazem niższe stężenie progesteronu niż w płynie pęcherzyków atretycznych (Henderson i in., 1987; Price i in., 1995). Ponadto zmiany w ekspresji mRNA dla receptorów gonadotropowych oraz kluczowych enzymów steroidogennych (P450_{SCC}, P450_{C17}, P450_{arom}, 3 β HSD) zależą od etapu rozwoju pęcherzyków. Ekspresja mRNA dla receptorów gonadotropin, enzymów steroidogennych oraz białkowego regulatora steroidogenezy (StAR – steroidogenic acute regulatory protein) zwiększa się wraz z postępującym rozwojem pęcherzyków. Najwyższy poziom odnotowywany jest, gdy dominujący pęcherzyk osiąga maksymalną wielkość. W przypadku pęcherzyków atretycznych ekspresja mRNA jest bardzo niska lub niewykrywalna (Xu i in., 1995; Bao i Garverick, 1998).

1.3. Płyn pęcherzykowy

Płyn pęcherzykowy jest wytworem komórek warstwy ziarnistej oraz wybiórczym przesączem osocza, który gromadzi się w jamce pęcherzyka jajnikowego (Tabatabaei i Mamoei, 2011). Jego skład odzwierciedla zmiany w procesach sekrecyjnych komórek warstwy ziarnistej i warstwy osłonki wewnętrznej, a także zmiany w składzie osocza (Ben-Rafael i in., 1987). Zapewnia on mikrośrodowisko dla rozwoju oocytów, wpływa na ich jakość oraz zdolność do zapłodnienia (Ali i in., 2008). Składa się on głównie z wody oraz glikozoaminoglikanów: kwasu hialuronowego, siarczanu chondroityny, siarczanu dermatonu. W jego skład wchodzi też aminokwasy, białka, związki lipidowe, cukry, sole, hormony i wiele czynników wzrostu (Szołtys, 1992). Stężenia wielu pierwiastków znajdujących się w płynie pęcherzykowym zbliżone są do ich stężeń w surowicy (Kor i Moradi, 2013).

Zmiany w składzie biochemicznym płynu wpływają na steroidogenezę, dojrzewanie i jakość oocytów, owulację, transport komórki jajowej do jajowodu, a także

przygotowanie pęcherzyka do późniejszego formowania ciała żółtego (Sato i Jiang, 2001). Stężenia biochemicznych metabolitów w płynie pęcherzykowym mogą ulegać znacznym wahaniom w zależności od stadium cyklu jajnikowego, wielkości pęcherzyka i stanu pęcherzyka oraz obecności dużych pęcherzyków (Atheya i Totey, 2002; Ashkar i in., 2010; Tabatabaei i Mamoei, 2011). Wskazuje się, iż skład płynu pęcherzykowego zmienia się wraz ze wzrostem oraz dojrzewaniem pęcherzyków (Leroy i in., 2004a).

Płyn pęcherzykowy bogaty jest w hormony steroidowe, których stężenie zależy od rozmiarów pęcherzyka, stadium rozwojowego oraz etapu cyklu rujowego (Bearden i Fuquay, 1997; Thangavel i Nayeem, 2004; Kor i in., 2013). Głównym hormonem steroidowym jest 17β -estradiol, który zwiększa aktywność mitotyczną komórek ziarnistych, stymuluje powstawanie złącz szczelinowych i powiększanie się jamki, pobudza syntezę receptorów gonadotropowych, a także własnych receptorów. Dzięki temu na drodze autokrynej i parakrynej reguluje funkcję pęcherzyka czyniąc go wrażliwym na sygnały prowadzące do owulacji. Spośród tych sygnałów za najważniejszy uważa się przedowulacyjny wyrzut LH, uruchamiający szereg reakcji prowadzących do uwolnienia komórki jajowej (Ireland, 1987; Szołtys, 1992). Jak już wspomniano estradiol koordynuje wiele funkcji pęcherzykowych (Hunter i in., 1992). Należą do nich: promowanie wzrostu pęcherzyka i przyczynianie się do dominacji wybranych pęcherzyków jajnikowych podczas każdego cyklu jajnikowego. Jak wskazują Sarhan i in. (2017) wysoki poziom estradiolu w płynie pęcherzykowym charakteryzuje pęcherzyki, których oocyty będą zdolne do wznowienia mejozy. Z kolei progesteron, którego sekrecja nasila się po wyrzucie LH uczestniczy w procesach prowadzących do aktywacji enzymów proteolitycznych rozkładających ścianę pęcherzyka w czasie owulacji, reguluje tempo przejścia oocytu przez jajowód, a obecność receptorów dla progesteronu w plemnikach może świadczyć o jego ważnej roli w indukcji reakcji akrosomalnej (Szołtys, 1999; Hsueh i in., 2015). Testosteron natomiast działa głównie we wczesnych stadiach folikulogenezy, wpływając na aktywację i wzrost pęcherzyków (Drummond, 2006). Należy podkreślić, że od proporcji hormonów steroidowych w płynie pęcherzykowym zależy jakość oocytów (Vanluchene i in., 1991; Abe i in., 2002). Przykładem mogą być, wykazane przez Ashkar i in. (2010) różnice w procesie zapłodnienia między oocytami pochodzącymi z pęcherzyków, w których stężenie progesteronu w płynie pęcherzykowym różniło się. Również podwyższone stężenie androgenów w płynie pęcherzykowym negatywnie wpływa na jakość oocytów (Uehara i in., 1985). Xia i Younglai (2000) wykazali, iż stosunek estradiolu do testosteronu jest

wyższy w przypadku pęcherzyków ulegających zapłodnieniu. Wynika z tego, iż niski stosunek estradiolu do androgenów w płynie pęcherzykowym jest związany z wczesną atrezią pęcherzykową, co może negatywnie wpływać na żywotność komórki jajowej i ograniczać jej szansę na zapłodnienie (Balakrishna, 1994). Należy jednak podkreślić, że właściwy poziom androgenów jest niezbędny do uzyskania optymalnego wzrostu pęcherzyków (Kim i in., 2001).

Oprócz hormonów steroidowych w bydlęcym płynie pęcherzykowym zawarte są hormony gonadotropowe, hormony tarczycy, insulina i wiele innych substancji biologicznie czynnych. Biorą one udział w prawidłowym przebiegu funkcji pęcherzyków jajnikowych, hamują lub indukują aktywność enzymów steroidogennych (Ireland, 1987; Wise, 1987; Gregoraszczyk i in., 1998, Błaszczuk i in., 2006; Ashkar i in., 2010).

Spośród składników biochemicznych wchodzących w skład płynu pęcherzykowego należy wymienić glukozę, która jest głównym źródłem energii dla pęcherzyka. Jej udział w lokalnej regulacji nasila się zwłaszcza w okresie okołouwulacyjnym, a jej zwiększone zużycie zanotowano podczas indukowanego przez gonadotropiny dojrzewania meiotycznego oocytów (Downs i in. 1996).

W płynie pęcherzykowym występują również substancje o działaniu antyoksydacyjnym oraz witaminy, które jak wskazują Roberts i Sporn (1984) mogą pobudzać, bądź też hamować rekrutację i selekcję pęcherzyków. Witamina A odgrywa ważną rolę przy prawidłowym różnicowaniu tkanki nabłonkowej. Wykazano również, iż stężenie tej witaminy w bydlęcym płynie pęcherzykowym zależy od jakości pęcherzyków (Schweigert i Zucker, 1988). Stężenie witaminy C u krów jest najwyższe w czasie ruiny (Pascu i in., 1969). Natomiast stężenie witaminy E w płynie pęcherzykowym krów praktycznie nie zmienia się w trakcie rozwoju pęcherzyków (Andersen i in., 1976; Schweigert i Zucker, 1988).

Ważną rolę odgrywają składniki mineralne zawarte w płynie pęcherzykowym. Szczególne znaczenie mają: wapń, fosfor, potas, sód, chlor, siarka, magnez, żelazo, jod, miedź, mangan, cynk, kobalt, molibden i selen. Ich właściwe stężenie ma korzystny wpływ na wzrost pęcherzyków jajnikowych i dojrzewanie oocytów (Chang i in., 1976; Fortune i Hansel, 1985; Close, 1998).

Wykazano, że na skład płynu pęcherzykowego może wpływać obecność ciała żółtego na jajniku (Maruo i in., 1992; Bordoloi i in., 2000; Tomac i in., 2011). Jak wskazują Penitente-Filho i in. (2014) obecność funkcjonalnego ciała żółtego może wpływać na ilość i jakość oocytów bydlęcych.

1.4. Atrezja pęcherzykowa

Pomimo dużej puli początkowej pęcherzyków jajnikowych, tylko 1% z tej populacji osiąga stan przedowulacyjny podczas żeńskiego okresu rozrodczego, podczas gdy większość z nich ulega atrezji. Pęcherzyki jajnikowe ulegają atrezji poprzez apoptozę, która jest naturalnym procesem fizjologicznym zapewniającym homeostazę narządu. W jajniku apoptoza limituje ilość i rozwój pęcherzyków jajnikowych, a także zabezpiecza przed rozwojem ciąży mnogiej z kilkunastoma zarodkami (Dragovich i in., 1998; Nunez i in., 1998). Apoptoza jest zaprogramowanym procesem odpowiedzialnym za utratę 99% pęcherzyków (Santos i in., 2013).

Morfologiczne cechy apoptozy obejmują skurcz komórek, błony komórkowej, fragmentację DNA i tworzenie ciał apoptotycznych (Antonsson i Martinou, 2000). Ostatecznymi efektorami procesu apoptozy są kaspazy - grupa silnie uregulowanych i wysoce specyficznych proteaz. Kaskada aktywacji kaspazy wynika z proteolitycznego cięcia nieaktywnych prekursorowych form co prowadzi ostatecznie do aktywacji kaspazy 3, która jest wspólnym efektem tego procesu we wszystkich tkankach (Johnson, 2003). Apoptoza rozpoczyna się izolowaniem komórki od otoczenia, co powoduje utratę wszelkich połączeń międzykomórkowych. W komórce dochodzi do szeregu zmian zarówno morfologicznych, jak i biochemicznych: chromatyna ulega kondensacji, cytoplazma obkurcza się na skutek utraty wody, następuje agregacja chromatyny przy błonie jądrowej oraz fragmentacja jądra. Procesy te najczęściej poprzedzone są cięciem DNA przez endonukleazy. Końcowym etapem apoptozy jest fragmentacja cytoplazmy i rozdział nienaruszonych organelli komórkowych na struktury otoczone błoną zwane ciałkami apoptycznymi. W fagocytozie ciałek apoptycznych komórek ziarnistych uczestniczą makrofagi i sąsiadujące komórki (Błaszczuk i in. 2000; Hatzirodos i in., 2014).

Atrezja pęcherzyków antralnych obejmuje początkowo komórki ziarniste, a następnie komórki tekalne i w końcowym etapie oocyt (Tilly i in., 1991; Hatzirodos i in., 2012; Matsuda i in., 2012). W pęcherzyku atretycznym dochodzi do szeregu zmian zarówno biochemicznych, jak i morfologicznych. Prowadzą one utraty zdolności do syntezy 17- β -estradiolu. Dlatego też w płynie pęcherzyków atretycznych stwierdza się podwyższone stężenie progesteronu i obniżone stężenie estradiolu. Zmiany morfologiczne zaczynają się od oddzielenia komórek ziarnistych od błony podstawnej. Powstałe luki w wyniku utraty połączeń międzykomórkowych są przyczyną zapadnięcia

się jamki pęcherzykowej, pofałdowania i obkurczenia osłonki. W dalszych etapach atrezji zanika błona podstawna, komórki osłonki wewnętrznej ulegają hipertrofii i przekształcają się w tzw. wtórne komórki interstycjalne lub tworzą struktury podobne do ciała żółtego, w środku których są resztki oocytów. W toku dalszej inwolucji pozostają tylko skupienia komórek śródmiąższowych (Irving-Rodgers i in., 2001; Rodgers i Irving-Rodgers, 2010a).

W jajniku częstotliwość atrezji jest zróżnicowana i zależy od fazy cyklu rujowego oraz od stadium rozwoju pęcherzyków. Stwierdzono, że najwięcej pęcherzyków degeneruje we wczesnej fazie antralnej. Jest to faza intensywnego różnicowania się pęcherzyka, a wiele związanych z tym procesów wymaga stymulującego działania FSH. Większość pęcherzyków w tej fazie nie posiada odpowiedniej ilości receptorów FSH i ulega atrezji (Tilly i in., 1991). Na atrezję pęcherzyków jajnikowych wpływają także androgeny, estrogeny i insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFs – insulin-like growth factors). Wykazano, że w płynie pęcherzyków atretycznych stężenie androgenów jest większe niż w pęcherzykach nieatretycznych. Udowodniono, że androgeny przyspieszają, a estrogeny hamują atrezję pęcherzyków jajnikowych (Matsuda-Minehata i in., 2006; Matsuda i in., 2012).

1.5. Czynniki wpływające na folikulogenezę

Procesy związane z końcowym dojrzewaniem pęcherzyków są całkowicie zależne od obu gonadotropin i hormonów steroidowych. Dominująca rola tych hormonów jest dobrze udokumentowana, jednakże dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, owulacja, luteinizacja i atrezja zależy od wielu innych czynników. Należą do nich inne hormony przysadkowe, takie jak prolaktyna, hormon wzrostu, hormony pozagonadowe, a także liczne steroidowe i niesteroidowe związki obecne lub syntetyzowane w jajniku. W ostatnich latach podkreśla się również znaczenie licznych czynników wzrostu, między innymi czynnika wzrostu BMP-15 (Chang i in., 2016). Należy on do nadrodziny TGF- β (Hanrahan i in., 2004). Czynniki te odkryte zostały w 1998 roku przez dwa niezależne laboratoria. Charakterystyczną cechą strukturalną BMP-15 jest brak czwartej reszty cysteiny z siedmiu cystein, które zazwyczaj są zachowane u ponad 40 członków nadrodziny TGF- β . Ponieważ czwarta cysteina jest odpowiedzialna za tworzenie międzylańcuchowych wiązań dwusiarczkowych, możliwe jest, że BMP-15 może być

monomerem lub łączy się niekowalencyjnie jako hetero- i/lub homodimer białek (Otsuka i in., 2000). Wykazano, że BMP-15 jest wydzielany bezpośrednio przez sam oocyt i działając autokrynnie odpowiada za osiągnięcie jego dojrzałości cytoplazmatycznej. Ponadto czynnik ten wpływa na proliferację oraz różnicowanie komórek ziarnistych i ich ekspansję w czasie dojrzewania oocyty (Otsuka i in., 2000; Su i in., 2004; Opiela i Kątska-Książkiewicz, 2005; Knight i Glister, 2006; Belli i Shimasaki, 2017). Przypuszcza się, że BMP-15 jest niezbędny do wzrostu oocytów oraz posiada hamujące działanie na atrezię pęcherzykową oraz apoptozę komórek (Orisaka i in., 2006; Behrouzi i in., 2016). Białko BMP-15 reguluje ekspresję mRNA kluczowych genów dla ekspansji komórek kumulusa w trakcie dojrzewania oocyty oraz przed jego owulacją włączając w to członków rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) tj. cykloksygenazę 2 (COX-2 – cyclooxygenase 2), inhibitor szlaku sygnałowego TGF- β (GREM-1 - gremlin 1), syntazę kwasu hialuronowego 2 (HAS-2 - hyaluronic acid synthase 2). Wszystkie geny docelowe BMP-15 znajdują się w komórkach kumulusa oraz ziarnistych (Pangas i Matzuk, 2005; Yoshino i in., 2006). W oocytach była mRNA BMP-15 ulega ekspresji w stadium pęcherzyków pierwotnych, a ekspresja trwa po zapłodnieniu do stadium 8-komórkowego (Pennetier i in., 2004; Hosoe i in., 2011). Jak wskazują Wu i in. (2007) oraz Sugiyama i in. (2010) BMP-15 może być wykorzystywany jako wskaźnik zapłodnienia komórek jajowych bądź dojrzałości oocytów.

Spośród czynników wpływających na folikulogenezę należy wymienić czynniki wpływające na angiogenezę pęcherzyka. Pęcherzykowy rozwój zależy bowiem od właściwego ich unaczynienia. Wykazano, że dominujące pęcherzyki są bardziej unaczynione w porównaniu z innymi pęcherzykami. Ważną rolę odgrywa tu śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF - vascular endothelial growth factor), który jest angiogenną cytokiną produkowaną przez komórki ziarniste. Do innych czynników wzrostu uczestniczących w rozwoju pęcherzyka jajnikowego należą transformujący czynnik wzrostu (TGF- α - transforming growth factor alpha), fibroblastowy czynnik wzrostu (FGF - fibroblast growth factor) oraz insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-1 i IGF-2) (Hunter i in. 2004). Ponadto czynniki środowiskowe, takie jak odżywianie czy utrzymanie zwierząt mogą wpłynąć na rozwój pęcherzyków i jakość oocytów.

2. Rozwój i funkcja ciała żółtego

Ciało żółte jest przejściowym gruczołem wydzielania wewnętrznego, które rozwija się z komórek ściany pękniętego pęcherzyka Graafa w procesie zwanym luteinizacją. Ciało żółte wymagane jest do podtrzymania ciąży u ssaków oraz regulacji cyklu rujowego (Quintal-Franco i in., 1999; Penitente-Filho i in., 2014).

Podczas luteinizacji zapadają się ściany pękniętego pęcherzyka jajnikowego, a błona podstawna pomiędzy osłonką wewnętrzną i warstwą ziarnistą rozpada się w wyniku działania enzymów proteolitycznych. Proces ten doprowadza do wnikania naczyń krwionośnych i komórek osłonki wewnętrznej do warstwy ziarnistej. (Murphy, 2004). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono dużą aktywność mitotyczną migrujących komórek osłonki wewnętrznej. Z kolei nie dzielące się już komórki ziarniste ulegają hipertrofii, w wyniku której zwiększa się ilość cytoplazmy. W komórkach tych obserwuje się zmiany w organellach komórkowych, wzrasta liczba mitochondriów, zwiększają się rozmiary aparatu Goldiego oraz ilość gładkiej siateczki endoplazmatycznej. Przekształcenie pęcherzyka jajnikowego w ciało żółte wymaga również przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. W jej reorganizacji uczestniczą metaloproteinazy oraz aktywatory plazminogenu i plazmina. Luteinizacja komórek ziarnistych wiąże się z ekspresją inhibitorów cyklu komórkowego (białka p27kip1 i p27cip1), które blokują działanie kinaz zależnych od cyklin i zatrzymują cykl komórkowy w fazie G1 (Murphy, 2000). W luteinizujących komórkach wzrasta ekspresja białek zaangażowanych w syntezę progesteronu, natomiast hamowana jest częściowo lub całkowicie aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę androgenów i estrogenów (Murphy i in., 2001, Murphy, 2004). Komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego przekształcają się w duże komórki lutealne, natomiast komórki osłonki wewnętrznej stają się małymi komórkami lutealnymi (Rodgers i Irving-Rodgers, 2010a; Mitan i Grzesiak, 2015).

Ciało żółte ma budowę heterogenną. W jego obrębie oprócz komórek lutealnych znajdują się komórki związane z siecią naczyń krwionośnych (komórki śródbłonna, perycyty), komórki tkanki łącznej (fibroblasty) oraz układu immunologicznego (makrofagi, limfocyty, eozynofile, neutrofile). Wzajemne interakcje pomiędzy poszczególnymi populacjami komórek są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania ciała żółtego (Grazul-Bilska i in., 1997).

Stopień rozwoju i czas trwania ciała żółtego uzależniony jest od losów komórki jajowej. W przypadku zapłodnienia utrzymuje się ono jako ciało żółte ciążowe, które u krów osiąga maksymalny rozwój do trzeciego miesiąca ciąży (Reynolds i Redmer, 1999). Jeżeli nie dojdzie do zapłodnienia i implantacji zarodka ciało żółte utrzymuje się do 16-18 dnia cyklu rujowego, następnie ulega regresji inicjując następny cykl rujowy. U krów jego maksymalny rozwój przypada na 7-9 dzień po owulacji. Regresję ciała żółtego charakteryzują dwa procesy: zmiany morfologiczne i spadek zdolności do syntezy progesteronu. Obserwuje się wzrost liczby kropeł lipidowych, spadek ilości granul sekrecyjnych, zmiany w mitochondriach i obniżenie syntezy receptorów dla LH. Dalsze zmiany luteolityczne obejmują tworzenie się włókien kolagenowych, degenerację naczyń krwionośnych i cytolizę komórek lutealnych. W efekcie powstaje włóknisty twór o zabarwieniu szarym lub białawym. Do głównych czynników regulujących procesy związane z regresją ciała żółtego należą: prostaglandyna F2 α , steroidy, oksytocyna, czynniki wzrostu, cytokiny, tlenek azotu i reaktywne formy tlenu (Błaszczuk i in. 2000).

W przypadku bydłych ciał żółtych możemy wyróżnić cztery stadia rozwojowe, które zostały zaproponowane przez Irelanda i in. (1980). Jak podają cytowani autorzy, ciało żółte w I. stadium rozwoju charakteryzuje się czerwonym zabarwieniem, wypełnione jest krwią, a jego średnica wynosi od 0,5 do 1,5 cm. Na tym etapie nie występują na jajniku pęcherzyki o średnicy powyżej 10 mm. Jest to forma występująca do 4. dnia cyklu rujowego. Ciało żółte w II. stadium osiąga średnicę od 1,6 do 2 cm. W III. stadium dochodzi do zmiany zabarwienia - z zewnątrz jak i wewnątrz ciało żółte staje się pomarańczowe. W IV. stadium ciało jest koloru żółtego lub białego. Na jajniku widoczny jest wówczas pęcherzyk o średnicy powyżej 10 mm (Ireland i in., 1980).

3. Cykl rujowy u krów

Krowy należą do zwierząt poliestralnych, u których cykle rujowe trwają około 21 dni z wahaniami od 18 do 24 dni. U jałówek cykl rujowy jest nieco krótszy, trwa około 20 dni. Cykl rujowy to okres od pierwszego dnia wystąpienia zewnętrznych objawów rui do ostatniego dnia przed następną rują (Ray, 1961; Crowe i Mullen, 2013). Zmiany obserwowane w cyklu rujowym są ściśle powiązane z czynnością jajnika, a także wyższych ośrodków na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej, które sterują i nadzorują tę czynność.

Ze względu na cykliczne zmiany zachodzące na jajniku cykl rujowy można utożsamiać z cyklem jajnikowym, w których wyróżnia się fazę pęcherzykową i fazę lutealną. W fazie pęcherzykowej zadaniem regulacyjnym jest dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych. Pierwszego dnia rui, czyli dnia zerowego cyklu, pęcherzyk jajnikowy jest w pełni rozwinięty i znajduje się wtedy w fazie przedowulacyjnej. Do owulacji dochodzi między 1.-2. dniem cyklu. Pod koniec tej fazy w miejscu pękniętego pęcherzyka tworzy się ciało żółte i rozpoczyna się faza lutealna. Procesy jakie zachodzą w tej fazie związane są z przebudową pękniętego pęcherzyka i syntezą progesteronu, a następnie unieczynnieniem ciałek żółtych, co jest warunkiem inicjacji nowego cyklu (Downey, 1980).

Inny podział cyklu rujowego uwzględnia zmiany w behawiorze samic. Według tego podziału, cykl rujowy dzieli się na fazę przedrujową (proestrus) trwającą 2-3 dni, ruję (estrus) trwającą 12-36 godzin, fazę porujową (metestrus) trwającą 2-3 dni i fazę międzyrujową (diestrus) trwającą 14-16 dni (Niswender, 1981). W tym momencie rozpoczyna się faza ciała żółtego.

Nadrzędną rolę w regulacji osi podwzgórze-przysadka-jajnik odgrywają podwzgórzowe neurony wydzielające gonadoliberynę. Komórkami docelowymi dla GnRH są komórki gonadotropowe znajdujące się w przednim płacie przysadki mózgowej, które z kolei wydzielają do krwi gonadotropiny (FSH i LH) działające na jajnik. Na poziomie jajnika w regulacji cyklu rujowego uczestniczą głównie hormony steroidowe i białkowe (aktywina, inhibina) oraz prostaglandyna F2 α syntetyzowana w endometrium (Schally i in., 1971; Roche, 1996; Crowe i Mullen, 2013).

Pulsacyjne wydzielanie GnRH z pola przedwzrokowego podwzgórza oraz przedowulacyjny wzrost wydzielania tego neurohormonu z centrum podwzgórza zapobiega odczulaniu receptora GnRH na komórkach gonadotropowych przedniego płata przysadki. Po przeniesieniu gonadoliberyny z podwzgórza do przysadki za pośrednictwem układu krwioobiegu przysadkowego, GnRH wiąże się z receptorem sprzężonym z białkiem G na powierzchni komórek gonadotropowych (Moenter i in., 1992; Kakar i in., 1993). To wiązanie uwalnia wewnątrzkomórkowy wapń, który uruchamia szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenem (MAPK - mitogen-activated protein kinase) prowadząc do wydzielania FSH i LH. Pod wpływem tych gonadotropin możliwa jest sekrecja hormonów steroidowych i białkowych jajnika, które z kolei na zasadzie ujemnych i dodatnich sprzężeń zwrotnych wpływają na oś podwzgórzowo-przysadkową (Farnworth, 1995; Weck i in., 1998).

Podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego w wyniku regresji ciała żółtego dochodzi do spadku poziomu progesteronu. W tym czasie zwiększa się stężenie estradiolu wynikające z szybkiej proliferacji przedowulacyjnego dominującego pęcherzyka. Doprowadza to do wzrostu wydzielania GnRH, a także wpływa na wystąpienie rui behawioralnej, podczas której jałówki/krowy są aktywne płciowo - gotowe do kopulacji i zapłodnienia (Frandsen i in., 2003). Ten przedowulacyjny wzrost uwalniania GnRH indukuje zwiększone wydzielanie LH prowadzące do owulacji (Sunderland i in., 1994; Roche, 1996). Owulacja występuje 10-14 godzin po rui, po której następuje faza lutealna. W początkowym etapie tej fazy dochodzi do luteinizacji, a powstałe ciało żółte wydzielają coraz większe ilości progesteronu (Niswender, 1981). W kolejnych dniach stężenie progesteronu ulega podwyższeniu, a nawracające fale rozwoju pęcherzyka są nadal inicjowane przez uwalnianie FSH. Jednak te pęcherzyki, które rosną podczas fazy lutealnej cyklu, z powodu niewystarczającej częstotliwości pulsów LH, nie owulują tylko ulegają atrezji. Dominujący wpływ progesteronu podczas fazy lutealnej na cykl rujowy, poprzez ujemne sprzężenie zwrotne, pozwala jedynie na wydzielanie większej amplitudy, ale mniej częste pulsy LH (1 puls na 3 do 4 godzin), które są niewystarczające do owulacji dominujących pęcherzyków (Rahe i in., 1980). Stężenie progesteronu zaczyna się zmniejszać w wyniku regresji ciała żółtego, a głównym hormonem luteolitycznym jest PGF_{2α}. Spadek stężenia progesteronu inicjuje dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych i cykl zmian się powtarza (Hansel i Convey in., 1983).

IV. CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA

Celem niniejszej pracy było określenie zależności między wybranymi składnikami w płynie pęcherzyków jajnikowych a ich stężeniem w surowicy krów z uwzględnieniem wieku zwierząt.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Przeprowadzenie analizy porównawczej w składzie płynu pęcherzyków jajnikowych pomiędzy dużymi pęcherzykami przedowulacyjnymi, dominującymi i atretycznymi. W analizie uwzględniono hormony steroidowe (P_4 , E_2), białko morfogenetyczne kości (BMP-15), hormon folikulotropowy (FSH), glukozę, białko, mocznik, kreatyninę, kwas moczowy, składniki lipidowe i jonowe.
2. Przeprowadzenie powyższej analizy porównawczej w odniesieniu do wieku krów.
3. Określenie zależności pomiędzy stężeniem wybranych składników płynu pęcherzykowego a ich stężeniem w surowicy u krów.

HIPOTEZA

Hipoteza badawcza zakłada, że stężenia hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

V. MATERIAŁY I METODY

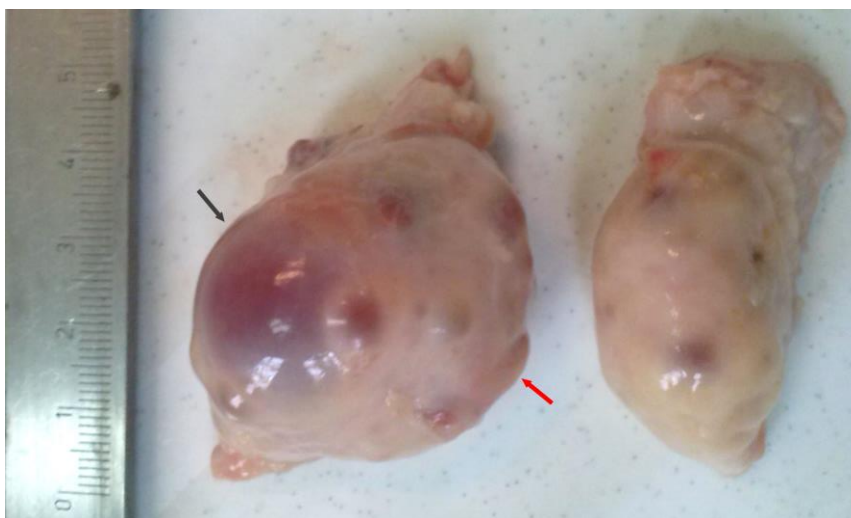
Doświadczenie wykonano na 72 krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (czarno-białej), ubijanych w lokalnej ubojni. Wcześniej krowy użytkowane były rozplodowo na fermie hodowlanej bydła mlecznego (Polska; Agrofirma Witkowo). Badania wykonano na krowach uwzględniając ich wiek: od 2,5 do 6,5 lat (I. grupa wiekowa), od 6,6 do 10 lat (II. grupa wiekowa), od 10,1 do 18 lat (III. grupa wiekowa).

W trakcie uboju od krów pobierano krew (12 ml) do próbek z aktywatorem wykrzepiania i granulatem do separacji surowicy (BioMaxima, Polska). Po odwirowaniu próbek krwi (przy 2000 x g/15 minut) oddzieloną surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania analiz.

Od krów poubojowo pozyskiwano jajniki, które w możliwie jak najkrótszym czasie były transportowane do laboratorium (do 60 minut). Jajniki pozyskiwano tylko od krów, u których w układzie rozrodczym nie było widocznych nieprawidłowości tj. zapalenia macicy, guzów macicy i cyst jajnikowych.

1. Klasyfikacja pęcherzyków jajnikowych i wyznaczenie badanych grup

Z pary jajników u każdej krowy wybierano jajnik, na którym obecny był co najmniej jeden duży pęcherzyk o średnicy powyżej 10 mm (Ireland i in., 1980, Nishimoto i in., 2009).



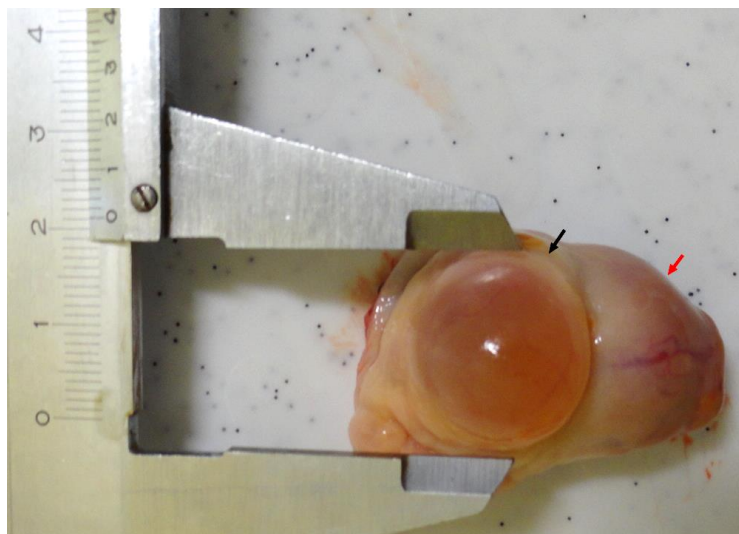
Fot. 1. Para jajników od jednej krowy (czarna strzałka – duży pęcherzyk jajnikowy; czerwona strzałka – ciało żółte w stadium IV)

Fotografia 1 przedstawia parę jajników od jednej krowy. Na jednym z jajników widoczny jest duży pęcherzyk jajnikowy (fot. 1).

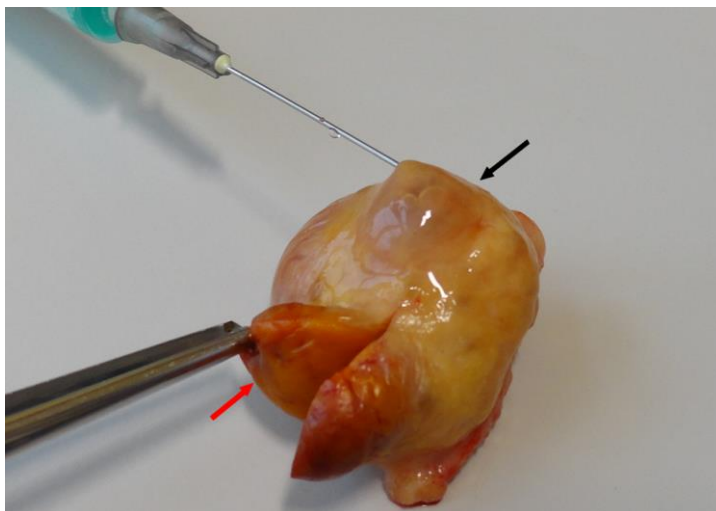
Kolejnym, oprócz obecności dużego pęcherzyka jajnikowego, kryterium wyboru jajników było stadium rozwojowe ciała żółtego (CL). Uwzględniając to kryterium jajniki podzielono na grupy z ciałkami żółtymi w stadium I, II, III i IV zgodnie z klasyfikacją bydłęcych ciałek żółtych podaną przez Irelanda i in. (1980).

- Obecność ciała żółtego w **stadium I** jest charakterystyczna dla okresu od owulacji do 4. dnia cyklu rujowego. W tym czasie, w miejscu pękniętego pęcherzyka, nabłonek rozrasta się i tworzy się wierzchołek ciała żółtego.
- Z kolei obecność ciała żółtego w **stadium II** jest charakterystyczna dla okresu od 5. do 10. dnia cyklu rujowego. W tym okresie ciało żółte jest w pełni uformowane, wierzchołek jest czerwony lub brązowy, a pozostała część ciała żółtego jest koloru żółtego/pomarańczowego.
- W **stadium III** całe ciało żółte jest koloru żółtego/pomarańczowego i występuje od 11. do 17 dnia cyklu rujowego.
- Z kolei obecność ciała żółtego w **stadium IV** przy jednoczesnej obecności co najmniej jednego dużego pęcherzyka jajnikowego (pow. 10 mm) jest charakterystyczna dla okresu od 18. do 20. dnia cyklu rujowego. Na powierzchni ciała żółtego w tym stadium rozwojowym niewidoczne są naczynia krwionośne, a po jego rozcięciu nie wypływa krew (Ireland i in., 1980).

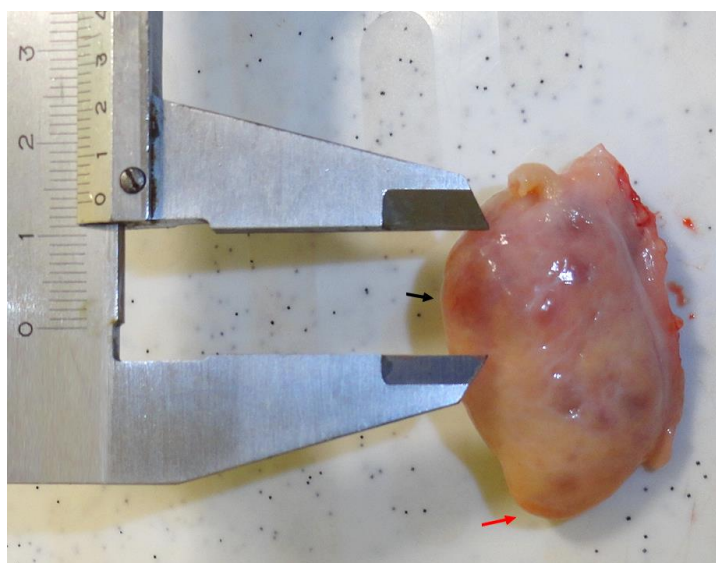
Uwzględniane stadia rozwojowe ciałek żółtych udokumentowano fotograficznie (fot. 1-4).



Fot. 2. Jajnik z dużym pęcherzykiem jajnikowym (czarna strzałka) i ciałkiem żółtym w stadium II (czerwona strzałka)



Fot. 3. Jajnik z dużym pęcherzykiem (czarna strzałka) i ciałkiem żółtym w stadium III (czerwona strzałka)



Fot. 4. Jajnik z dużym pęcherzykiem (czarna strzałka) i ciałkiem żółtym w stadium IV (czerwona strzałka)

Po dokonaniu tej wstępnej selekcji jajników, uwzględniającej wielkość pęcherzyka i stadium rozwojowe ciała żółtego, z każdego największego pęcherzyka jajnikowego (1 pęcherzyk z pary jajników) pozyskiwano płyn pęcherzykowy. Płyn pozyskiwano za pomocą igły i strzykawki (fot. 3), a uzyskane próbki wirowano (2000 x

g/15 minut). Po oddzieleniu od elementów morfotycznych uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania analiz.

Dla dokonania kolejnego podziału pęcherzyków w uzyskanych próbkach oznaczono stężenie progesteronu (P_4) i 17- β -estradiolu (E_2), a następnie wyliczono stosunek E_2/P_4 . Opierając się na klasyfikacji pęcherzyków jajnikowych podanej przez Nishimoto i in. (2009) pęcherzyki podzielono na pęcherzyki przedowulacyjne, dominujące i atretyczne. Przy tym podziale uwzględniono następujące kryteria:

- pęcherzyki przedowulacyjne - średnica $\geq 8,5$ mm, stosunek $E_2/P_4 \geq 1$, obecność na jajniku ciała żółtego w stadium IV.
- pęcherzyki dominujące - średnica $\geq 8,5$ mm, stosunek $E_2/P_4 \geq 1$, obecność na jajniku ciała żółtego w stadium I-III.
- pęcherzyki atretyczne - średnica $\geq 8,5$ mm, stosunek $E_2/P_4 < 1$, obecność na jajniku ciała żółtego w stadium II-IV.

Biorąc pod uwagę kryteria dotyczące pęcherzyków jajnikowych i uwzględniając wiek krów (Iwata, 2017; Hori i in., 2018) dokonano ostatecznego podziału pęcherzyków jajnikowych (Tab. 1.).

Tabela 1. Podział pęcherzyków i wyznaczenie badanych grup

Kryterium podziału pęcherzyków	Grupy wiekowe zwierząt								
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat), n=24			II grupa (od 6,6 do 10 lat), n=24			III grupa (od 10 do 18 lat), n=24		
Średnica pęcherzyka (mm)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Stadium rozwoju Cl	IV	I-III	II-IV	IV	I-III	II-IV	IV	I-III	II-IV
E_2/P_4	3,02 ±	2,21 ±	0,03 ±	4,69 ±	1,64 ±	0,25 ±	2,35 ±	1,54 ±	0,52 ±
	1,22	0,97	0,00	1,43	0,51	0,21	1,38	0,18	0,26
Rodzaj pęcherzyków	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)	przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)

Każdej próbce płynu pęcherzykowego (pęcherzyki przedowulacyjne i dominujące) przyporządkowano próbkę surowicy pozyskaną od odpowiedniej krowy.

2. Badane parametry

W uzyskanych próbkach płynu pęcherzykowego i surowicy oznaczono stężenie następujących hormonów i czynników wzrostu: białka morfogenetycznego kosci-15 (BMP-15), folitropiny (FSH), progesteronu (P_4) i 17- β -estradiolu (E_2).

Ponadto oznaczono stężenie glukozy (GLU), białka całkowitego (TP), kwasu moczowego (URIC), kreatyniny (CREA), mocznika (UREA), bilirubiny całkowitej (TBIL), całkowitego cholesterolu (CHOL), HDL-cholesterolu (HDL), LDL-cholesterolu (LDL), trójglicerydów (TAG), fosforu (P), wapnia (Ca), magnezu (Mg) i żelaza (Fe), sodu (Na) i potasu (K).

- BMP-15; metoda immunoenzymatyczna (ELISA), specyficzne gatunkowo zestawy (Bovine Bone Morphogenetic Protein 15; Elisa Kit, BlueGene, Cat. No. E11B0394). Czulość testu wynosiła 1,0 pg/ml. Błąd zewnętrzny i wewnętrzny wynosił < 10%. Odczyt przy długości fali 450 nm na fluorymetrze Wallac 1420 VICTOR² (Wallac Oy, Turku, Finlandia).
- FSH; metoda immunoenzymatyczna (ELISA), specyficzne gatunkowo zestawy (Bovine follicle-stimulation hormone, (ELISA Kit, CUSABIO, Cat. No. CSB-E15856B). Czulość testu wynosiła 2,0 mIU/ml. Błąd zewnętrzny i wewnętrzny wynosił < 15%. Odczyt przy długości fali 450 nm na fluorymetrze Wallac 1420 VICTOR² (Wallac Oy, Turku, Finlandia).
- P_4 ; metoda immunoenzymatyczna (ELISA), zestawy (Progesterone ELISA DRG, Cat. No. EIA-1561). Czulość testu wynosiła P_4 - 0,045 ng/ml. Błąd zewnętrzny i wewnętrzny wynosił odpowiednio 6,42% i 6,63%. Odczyt przy długości fali 450 nm na fluorymetrze Wallac 1420 VICTOR² (Wallac Oy, Turku, Finlandia).
- E_2 ; metoda immunoenzymatyczna (ELISA), zestawy (Estradiol ELISA DRG, Cat. No. EIA-2693). Czulość testu wynosiła 0,0097 ng/ml, Błąd zewnętrzny i wewnętrzny wynosił odpowiednio 4,55% i 7,61%. Odczyt przy długości fali 450 nm na fluorymetrze Wallac 1420 VICTOR² (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

- Glukoza; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products GLU Slides, Cat. No. 170 7801). Zakres pomiarowy wynosił 1,11-34,69 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Białko całkowite; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products TP Slides, Cat. No. 680 0120). Zakres pomiarowy wynosił 20,00-110,00 g/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Bilirubina całkowita; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products TBIL Slides, Cat. No. 815 9931). Zakres pomiarowy wynosił 1,70-461,70 μ mol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Kreatynina; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products CREA Slides, Cat. No. 680 2584). Zakres pomiarowy wynosił 4,00-1238,00 μ mol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Mocznik; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products UREA Slides, Cat. No. 810 2204). Zakres pomiarowy wynosił 0,71-42,83 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Kwas moczowy; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products URIC Slides, Cat. No. 194 3927). Zakres pomiarowy wynosił 29,7-1101,2 μ mol/l. Odczyt przy długości fali 670 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Cholesterol całkowity; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products CHOL Slides, Cat. No. 166 9829). Zakres pomiarowy wynosił 1,29-8,40 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Cholesterol HDL; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products HDL Slides, Cat. No. 680 1895). Zakres pomiarowy wynosił 0,13-2,84 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).

- Cholesterol LDL; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products LDL Slides, Cat. No. 680 1728). Zakres pomiarowy wynosił 0,78-9,05 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Trójglicerydy; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products TRIG Slides, Cat. No. 133 6544). Zakres pomiarowy wynosił 0,11-5,93 mmol/l. Odczyt przy długości fali 540 nm na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Sód; metoda potencjometryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products Na Slides, Cat. No. 837 9034). Zakres pomiarowy wynosił 75,00-250,00 mmol/l. Odczyt wykonany na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Fosfor; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products PHOS Slides, Cat. No. 151 3209). Zakres pomiarowy wynosił 0,16-4,20 mmol/l. Odczyt wykonany na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Wapń; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products Ca Slides, Cat. No. 145 0261). Zakres pomiarowy wynosił 0,25-3,49 mmol/l. Odczyt wykonany na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Magnez; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products Mg Slides, Cat. No. 825 5093). Zakres pomiarowy wynosił 0,08-4,11mmol/l. Odczyt wykonany na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).
- Żelazo; metoda kolorymetryczna, zestawy (VITROS Chemistry Products Fe Slides, Cat. No. 151 5808). Zakres pomiarowy wynosił 1,81-107,46 μ mol/l. Odczyt wykonany na analizatorze biochemicznym (Ortho Clinical Diagnostics Vitros 5,1 FS Chemistry System; Johnson & Johnson's).

3. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przeprowadzonej za pomocą programu komputerowego STATISTICA 12, StatSoft, Polska. Do opracowania wyników

zastosowano analizę wariancji (Anove – Analysis of variance), gdzie zmienną zależną był badany parametr w płynie pęcherzykowym i surowicy, a czynnikami grupującymi – wiek zwierząt i rodzaj pęcherzyka. Istotność różnic między średnimi określono testem Duncana (przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$) Wyliczono również korelację Pearsona między wiekiem a stężeniem badanych parametrów, a także między ich stężeniem w pęcherzykach jajnikowych a stężeniem w surowicy.

VI. WYNIKI

W tabeli 2. zamieszczono wyniki dotyczące średnich stężeń progesteronu (P_4) i 17- β -estradiolu (E_2) w płynie pęcherzykowym u krów w różnym wieku.

W pęcherzykach krów najstarszych (III. grupa wiekowa) średnie stężenie P_4 było najwyższe i różniło się istotnie od stężenia tego hormonu u krów najmłodszych (I. grupa wiekowa). Poza tym, u krów w III. grupie wiekowej stężenie P_4 w pęcherzykach przedowulacyjnych było istotnie wyższe ($P < 0.01$) niż w pęcherzykach przedowulacyjnych u krów w II. grupie wiekowej. Między stężeniem pęcherzykowego progesteronu a wiekiem krów wykazano dodatnią korelację ($r=0,27$; $P < 0.05$).

Z kolei średnie stężenie E_2 ze wszystkich grup pęcherzyków nie różniło się istotnie między krowami w różnym wieku. Różnice zanotowano natomiast między pęcherzykami atretycznymi, w których najniższe stężenie tego hormonu stwierdzono w I. grupie wiekowej (Tab. 2).

Tabela 3 prezentuje wyniki dotyczące stężeń P_4 i E_2 w surowicy krów w różnym wieku, u których na jajnikach występowały pęcherzyki przedowulacyjne lub dominujące. U krów najstarszych stężenie P_4 w surowicy było najwyższe i różniło się istotnie od stężenia, jakie zanotowano w grupie I. W każdej grupie wiekowej stężenie P_4 było istotnie wyższe u krów z pęcherzykami dominującymi niż z pęcherzykami przedowulacyjnymi. Podobnie jak w przypadku progesteronu, również stężenie E_2 było najwyższe u krów najstarszych. Różniło się ono istotnie od stężenia, jakie zanotowano u krów w I. i II. grupie wiekowej.

Pomiędzy stężeniem P_4 w surowicy a stężeniem tego hormonu w pęcherzykach stwierdzono dodatnią zależność (Tab. 4).

Tabela 2. Stężenie progesteronu (P₄) i 17-β-estradolu (E₂) w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych u krów w różnym wieku

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt															Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=24)					II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=24)					III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=24)					
	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)	atretyczne (n=8)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=8)			
	1	2	3			4	5	6			7	8	9			
P ₄ (ng/mL)	16,50 ± 4,70	20,60 ± 6,46	34,23 ± 2,65	3 > 1, 2**	21,44 ± 8,28	11,34 ± 2,98	22,38 ± 8,29	35,91 ± 2,97	6 > 4,5** 5 > 4**	25,03 ± 11,34	21,30 ± 9,34	26,38 ± 8,29	32,89 ± 6,18	9 > 7**	27,71 ± 8,36	I > III* 7 > 4**
E ₂ (ng/mL)	45,47 ± 6,31	40,23 ± 5,36	0,98 ± 0,02	3 < 1, 2**	35,00 ± 17,83	49,76 ± 0,93	33,81 ± 7,02	9,32 ± 7,77	6 < 4, 5** 5 < 4**	28,00 ± 17,94	41,67 ± 7,81	39,84 ± 5,30	15,72 ± 4,94	9 < 6, 7**	30,03 ± 13,99	3 < 6, 9** 6 < 9*

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru ze wszystkich pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające ogólne różnice (I, II, III) i ten sam rodzaj pęcherzyków między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 3. Stężenie progesteronu (P₄) i 17-β-estradolu (E₂) w surowicy krów w różnym wieku z pęcherzykami przedowulacyjnymi lub dominującymi

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt												Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=17)				II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=16)				III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=16)				
	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)			
	1	2			3	4			5	6			
P ₄ (ng/mL)	0,72 ± 0,48	14,69 ± 4,94	2 > 1**	6,18 ± 7,59	0,97 ± 0,07	16,72 ± 6,77	4 > 3**	9,63 ± 9,42	1,27 ± 0,25	20,22 ± 4,18	6 > 5**	12,64 ± 10,27	III > I* 6 > 2*
E ₂ (ng/mL)	63,88 ± 17,63	64,75 ± 13,20	BR	64,22 ± 15,73	70,29 ± 26,91	75,50 ± 18,22	BR	73,16 ± 22,06	68,20 ± 15,02	138,90 ± 17,24	6 > 5**	110,62 ± 39,67	III > I, II** 6 > 2, 4*

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyka obecnego na jajniku w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające różnice między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 4. Korelacje między stężeniem progesteronu, 17- β -estradiolu, białka morfogenetycznego kości-15 i hormonu folikulotropowego w płynie pęcherzykowym a stężeniem tych parametrów w surowicy u krów (n=49)

Parametr	Współczynnik korelacji (r)	Poziom istotności
Progesteron	0,39	p < 0.05
17- β -estradiol	0,20	NS
Białko morfogenetyczne kości-15	0,97	p < 0.01
Hormon folikulotropowy	0,16	NS

NS – korelacja statystycznie nieistotna

Wyniki dotyczące stężeń białka morfogenetycznego kości-15 (BMP-15) i hormonu folikulotropowego (FSH) w płynie pęcherzyków jajnikowych u krów w różnym wieku zamieszczono w tabeli 5.

W pęcherzykach krów najstarszych średnie stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż u krów młodszych (grupa I i II). Najwyższe stężenie tego czynnika zanotowano w pęcherzykach atretycznych, przy czym w III. grupie wiekowej krów było ono istotnie wyższe niż w grupie I. i II. Ponadto w pęcherzykach atretycznych u krów najstarszych stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących. Między stężeniem pęcherzykowego BMP-15 a wiekiem krów wykazano dodatnią korelację ($r=0,45$; $P < 0.01$).

Dodatnią korelację wykazano również między wiekiem a stężeniem FSH w pęcherzykach jajnikowych ($r=0,62$; $P < 0.01$). Średnie stężenie tego hormonu w pęcherzykach krów starszych było istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów młodszych.

Tabela 5. Stężenie białka morfogenetycznego kości-15 (BPM-15) i hormonu folikulotropowego (FSH) w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych u krów w różnym wieku

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt														Różnice statystyczne ³	
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=24)					II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=24)					III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=24)					
	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹		Ogółem ²
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)	atretyczne (n=8)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=8)			
	1	2	3			4	5	6			7	8	9			
					I					II					III	
BMP-15 (pg/mL)	234,85 ± 82,64	280,99 ± 147,17	289,83 ± 29,09	BR	262,90 ± 98,66	333,86 ± 97,81	281,43 ± 66,92	395,89 ± 191,29	BR	340,32 ± 113,07	424,77 ± 122,54	385,70 ± 45,97	834,91 ± 298,40	9 > 7, 8**	682,24 ± 112,03	III > I, II** 9 > 3, 6**
FSH (mIU/mL)	3994,73 ± 1365,74	4135,66 ± 1558,85	2956,48 ± 208,17	BR	3850,66 ± 911,31	5455,95 ± 1082,00	5444,34 ± 1785,63	7597,67 ± 1376,68	BR	6308,57 ± 1765,73	6483,64 ± 2240,45	9525,04 ± 3114,02	7399,68 ± 2649,38	BR	7745,20 ± 2778,69	I < II, III** II < III* 3 < 6, 9*

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru ze wszystkich pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające ogólne różnice (I, II, III) i/lub ten sam rodzaj pęcherzyków między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 6 prezentuje wyniki dotyczące stężeń BMP-15 i FSH w surowicy krów w różnym wieku. Najniższe stężenie BMP-15 zanotowano u krów najmłodszych (grupa I.), a różnice między tą grupą a krowami starszymi (grupą II. i III.) były statystycznie istotne. Ponadto, stężenie BMP-15 w surowicy było dodatnio skorelowane z wiekiem krów ($r=0,55$; $P < 0.01$). Wysoką dodatnią zależność stwierdzono również między stężeniem BMP-15 w surowicy a jego stężeniem w płynie pęcherzykowym (Tab. 4). Dodatnią korelację wykazano także między stężeniem FSH w surowicy a wiekiem krów ($r=0,39$; $P < 0.05$). U krów najmłodszych (grupa I.) stężenie FSH było istotnie niższe niż u krów starszych (grupa II. i III.). Ponadto, w każdej grupie wiekowej stężenie FSH było istotnie wyższe u krów z pęcherzykami dominującymi niż z pęcherzykami przedowulacyjnymi.

Tabela 6. Stężenie białka morfogenetycznego kości-15 (BPM-15) i hormonu folikulotropowego (FSH) w surowicy krów w różnym wieku z pęcherzykami przedowulacyjnymi lub dominującymi

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt												Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=17)				II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=16)				III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=16)				
	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			
	1	2			3	4			5	6			
BMP-15 (pg/mL)	342,14 ± 88,89	320,60 ± 101,81	BR	333,71 ± 92,49	739,75 ± 261,17	606,05 ± 249,90	BR	666,21 ± 246,48	705,84 ± 231,97	1334,51 ± 417,19	6 > 5**	1083,04 ± 328,88	III > I, II** II > I* 1 < 3, 5* 4 > 2* 6 > 2, 4**
FSH (mIU/mL)	49,83 ± 18,62	1233,90 ± 413,32	2 > 1**	513,16 ± 241,44	166,28 ± 74,64	1618,21 ± 445,58	4 > 3**	964,84 ± 378,01	198,83 ± 67,21	2755,85 ± 577,22	6 > 5**	1733,05 ± 689,31	III > I, II** II > I* 1 < 3, 5* 6 > 2*, 4**

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyka obecnego na jajniku w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające różnice między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

W tabeli 7. zamieszczono wyniki dotyczące stężeń glukozy, białka, bilirubiny, kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego w płynie pęcherzykowym u krów w różnym wieku.

W każdej grupie wiekowej najwyższe stężenie glukozy zanotowano w pęcherzykach dominujących.

Natomiast stężenie białka w pęcherzykach krów najmłodszych (grupa I.) i najstarszych (grupa III.) niezależnie od rodzaju pęcherzyków było na zbliżonym poziomie. Jedynie u krów grupy II. stężenie białka w pęcherzykach przedowulacyjnych było istotnie niższe niż w pęcherzykach dominujących i atretycznych.

Podobnie kształtowały się różnice dotyczące stężenia bilirubiny, przy czym w pęcherzykach krów grupy II. stężenie tego parametru było istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów I. i III. grupy wiekowej.

Stężenie kreatyniny było najniższe w pęcherzykach przedowulacyjnych u krów grupy I. i II, a różnice między tym stężeniem a stężeniem w pęcherzykach dominujących były statystycznie istotne.

Z kolei stężenie mocznika w pęcherzykach krów w każdej grupie wiekowej było na zbliżonym poziomie, jedynie w pęcherzykach dominujących w grupie II. było ono istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i atretycznych. Stężenie kwasu moczowego w pęcherzykach krów najstarszych było istotnie niższe niż w pęcherzykach krów młodszych (grupa I. i II.).

Tabela 7. Stężenie glukozy, białka, bilirubiny, kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych u krów w różnym wieku

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt															Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=24)					II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=24)					III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=24)					
	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)	atretyczne (n=8)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=8)			
	1	2	3		I	4	5	6		II	7	8	9		III	
Glukoza (mmol/L)	2,65 ±0,07	4,24 ±0,71	2,54 ±0,69	2>1, 3*	3,71 ±0,99	2,76 ±0,21	3,62 ±1,04	2,61 ±0,57	5 > 4, 6*	2,99 ±0,82	3,73 ±1,07	4,01 ±1,01	3,57 ±1,07	8 > 9*	3,74 ±0,98	II < I, III* 9 > 3, 6*
Białko (g/L)	62,50 ±0,71	64,00 ±5,10	66,02 ±5,83	BR	65,17 ±4,36	48,67 ±1,53	64,00 ±5,52	75,43 ±10,24	4 < 5, 6*	66,27 ±12,81	58,25 ±4,19	60,03 ±4,31	62,33 ±2,08	BR	60,00 ±3,87	4 < 1** 4 < 7*
Bilirubina (μmol/L)	2,05 ±0,08	2,10 ±0,37	1,99 ±0,22	BR	2,08 ±0,29	1,84 ±0,16	3,32 ±1,72	3,88 ±0,75	4 < 5,6**	4,62 ±5,64	3,15 ±2,25	2,82 ±1,35	2,43 ±0,42	BR	2,84 ±1,65	II>I, III* 7 > 1, 4* 6 > 3, 9*
Kreatynina (μmol/L)	71,70 ±9,41	112,25 ±25,47	95,54 ±12,69	1< 2*	95,40 ±21,90	81,97 ±4,72	128,52 ±18,21	109,77 ±9,17	4 < 5*	110,46 ±25,03	115,68 ±15,48	114,01 ±11,01	112,83 ±13,97	BR	114,46 ±13,68	1, 4 < 7* 9 > 3, 6*
Mocznik (mmol/L)	4,26 ±0,08	3,60 ±0,84	3,89 ±0,56	BR	3,82 ±0,73	3,33 ±0,06	4,46 ±0,45	3,84 ±0,16	4 < 5, 6*	3,58 ±0,79	3,95 ±1,48	4,02 ±0,91	4,86 ±1,68	BR	4,34 ±1,51	BR
Kwas moczowy (μmol/L)	155,50 ±19,71	136,50 ±19,55	129,52 ±31,22	1 > 3*	140,17 ±25,12	148,33 ±10,12	170,60 ±29,96	165,14 ±25,24	BR	160,93 ±24,51	126,00 ±21,67	120,32 ±18,35	116,67 ±15,31	BR	119,71 ±28,66	III<I, II* 7 < 1,2* 8 < 5* 9 < 6**

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru ze wszystkich pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające ogólne różnice (I, II, III) i/lub ten sam rodzaj pęcherzyków między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 8 prezentuje wyniki dotyczące stężeń glukozy, białka, bilirubiny, kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego w surowicy badanych krów.

Stężenie glukozy było wyższe u krów z pęcherzykami dominującymi niż u krów z pęcherzykami przedowulacyjnymi, przy czym różnice te w grupie I. i II. były statystycznie istotne.

Stężenie białka, bilirubiny i mocznika w surowicy krów wszystkich grup wiekowych kształtowało się podobnie i było dodatnio skorelowane ze stężeniem pęcherzykowym (Tab. 9).

Z kolei stężenie kreatyniny w surowicy krów najmłodszych (grupa I.) było istotnie niższe niż u krów starszych (grupa II. i III.) i także stwierdzono dodatnią korelację ze stężeniem tego parametru w płynie pęcherzykowym (Tab. 9).

Stężenie kwasu moczowego w surowicy krów najstarszych było najniższe, a różnice między tą grupą a grupą II. były statystycznie istotne.

Tabela 8. Stężenie glukozy, białka, bilirubiny, kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego w surowicy krów w różnym wieku z pęcherzykami przedowulacyjnymi lub dominującymi

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt												Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=17)				II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=16)				III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=16)				
	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			
	1	2			3	4			5	6			
Glukoza (mmol/L)	5,87 ±0,58	6,95 ±1,12	2.>1*	5,71 ±1,76	6,90 ±2,07	8,60 ±2,76	4>3*	7,81 ±2,53	6,05 ±1,65	6,93 ±2,57	BR	6,43 ±1,95	4 > 2, 6*
Białko (g/L)	82,33 ±9,55	84,25 ±4,03	BR	83,43 ±7,32	82,57 ±6,13	75,63 ±10,95	BR	78,87 ±8,62	76,25 ±2,87	84,33 ±7,23	BR	79,71 ±6,34	BR
Bilirubina (µmol/L)	7,30 ±0,35	7,73 ±0,38	BR	7,54 ±0,40	7,06 ±0,42	6,63 ±2,05	BR	6,67 ±1,53	6,60 ±0,92	7,90 ±0,95	BR	7,11 ±1,33	BR
Kreatynina (µmol/L)	86,10 ±9,08	106,15 ±12,01	1<2**	98,84 ±11,07	112,60 ±17,08	121,66 ±15,88	BR	117,43 ±16,11	112,50 ±13,84	121,23 ±11,83	BR	116,24 ±11,92	I < II, III* 1 < 3, 5*
Mocznik (mmol/L)	3,93 ±0,64	4,15 ±1,14	BR	4,06 ±0,89	3,89 ±0,77	4,14 ±0,77	BR	3,83 ±0,82	4,13 ±1,54	5,03 ±1,36	BR	4,73 ±1,54	BR
Kwas moczowy (µmol/L)	61,33 ±2,89	48,00 ±7,75	1>2*	53,71 ±9,14	62,00 ±10,57	57,63 ±9,15	BR	59,67 ±9,25	46,00 ±4,32	50,33 ±5,51	BR	48,43 ±7,07	II > III*

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyka obecnego na jajniku w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające różnice między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 9. Korelacje między stężeniem glukozy, białka, bilirubiny, kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego w płynie pęcherzykowym a stężeniem tych parametrów w surowicy u krów (n=49)

Parametr	Współczynnik korelacji (r)	Poziom istotności
Glukoza	-0,07	NS
Białko	0,48	p < 0.01
Bilirubina	0,48	p < 0.01
Kreatynina	0,54	p < 0.01
Mocznik	0,92	p < 0.01
Kwas moczowy	-0,30	NS

NS – korelacja statystycznie nieistotna

W tabeli 10 zamieszczono wyniki dotyczące stężeń składników lipidowych w płynie pęcherzykowym u badanych krów.

Średnie stężenie cholesterolu w pęcherzykach krów w II. grupie było istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów I. i III. grupy wiekowej.

Stężenie cholesterolu LDL było najwyższe w pęcherzykach krów najmłodszych, przy czym w niektórych grupach pęcherzyków jego stężenie było niewykrywalne.

W stężeniu pęcherzykowego cholesterolu HDL nie stwierdzono zależnych od wieku różnic. Stwierdzono natomiast różnice zależne od rodzaju pęcherzyków. W I. i II. grupie wiekowej stężenie cholesterolu HDL w pęcherzykach atretycznych było wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących.

Stężenie trójglicerydów we wszystkich rodzajach pęcherzyków w każdej grupie krów było zbliżone.

Tabela 10. Stężenie składników lipidowych w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych u krów w różnym wieku

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt														Różnice statystyczne ³	
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=24)					II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=24)					III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=24)					
	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹		Ogółem ²
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)	atretyczne (n=8)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=8)			
	1	2	3			4	5	6			7	8	9			
Cholesterol (mmol/L)	1,95 ±0,07	1,40 ±0,27	1,54 ±0,69	BR	1,58 ±0,35	2,55 ±0,83	1,68 ±0,58	2,35 ±0,59	BR	2,16 ±1,66	1,48 ±0,21	1,29 ±0,18	1,47 ±0,06	BR	1,47 ±0,15	II>1,III*
Cholesterol LDL (mmol/L)	0,35 ±0,21	0,25 ±0,12	0,59 ±0,16	BR	0,55 ±0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,42 ±0,29	6>4, 5*	0,34 ±0,26	0,25 ±0,19	0,12 ±0,10	0,00 ±0,00	BR	0,14 ±0,13	I > III*
Cholesterol HDL (mmol/L)	1,16 ±0,01	0,92 ±0,15	1,39 ±0,20	3> 2*	1,00 ±0,17	1,09 ±0,10	1,19 ±0,48	1,75 ±0,39	6>4, 5*	1,43 ±0,48	0,94 ±0,26	0,99 ±0,31	1,16 ±0,05	BR	1,03 ±0,22	BR
Trójglicerydy (mmol/L)	0,28 ±0,25	0,20 ±0,04	0,25 ±0,12	BR	0,20 ±0,16	0,21 ±0,02	0,24 ±0,08	0,27 ±0,10	BR	0,24 ±0,08	0,18 ±0,07	0,19 ±0,06	0,19 ±0,03	BR	0,19 ±0,05	BR

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru ze wszystkich pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające ogólne różnice (I, II, III) i/lub ten sam rodzaj pęcherzyków między grupami wiekowymi zwierząt

* - średnie różnią się przy $p < 0.05$; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 11 przedstawia wyniki dotyczące stężeń składników lipidowych w surowicy badanych krów. Stężenie cholesterolu całkowitego było wyższe u krów z pęcherzykami przedowulacyjnymi niż u krów z pęcherzykami dominującymi, przy czym w grupie wiekowej I. i II. różnice te były statystycznie istotne. Najwyższe stężenie cholesterolu całkowitego, a także cholesterolu HDL zanotowano u krów II. grupy wiekowej.

Nie stwierdzono natomiast różnic w stężeniu cholesterolu LDL i trójglicerydów - we wszystkich grupach krów stężenie tych parametrów było na zbliżonym poziomie.

Jak pokazano w tabeli 12 stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w surowicy były dodatnio skorelowane ze stężeniami tych parametrów w płynie pęcherzykowym.

Tabela 11. Stężenie składników lipidowych w surowicy krów w różnym wieku z pęcherzykami przedowulacyjnymi lub dominującymi

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt												Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=17)				II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=16)				III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=16)				
	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			
	1	2		I	3	4		II	5	6		III	
Cholesterol (mmol/L)	3,93 ±1,50	2,85 ±0,52	1>2*	3,31 ±1,11	5,76 ±0,69	3,42 ±1,21	3>4*	4,52 ±1,55	3,35 ±0,90	3,03 ±0,32	BR	3,21 ±0,68	II > I, III* 2 < 4*
Cholesterol LDL (mmol/L)	1,66 ±0,58	1,13 ±0,19	BR	1,36 ±0,46	1,33 ±0,47	1,06 ±0,09	BR	1,18 ±0,35	1,56 ±0,51	1,04 ±0,07	BR	1,33 ±0,45	BR
Cholesterol HDL (mmol/L)	2,03 ±0,79	1,86 ±00,17	BR	1,93 ±0,48	3,87 ±00,80	2,41 ±1,00	BR	3,09 ±1,16	2,16 ±0,48	2,08 ±0,41	BR	2,13 ±0,42	II > I**, III* 3 > 2, 5*
Trójglicerydy (mmol/L)	0,20 ±0,06	0,20 ±0,05	BR	0,20 ±0,05	0,30 ±0,12	0,24 ±0,09	BR	0,27 ±0,10	0,19 ±0,05	0,25 ±0,03	BR	0,21 ± 0,05	BR

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyka obecnego na jajniku w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające różnice między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 12. Korelacje między stężeniem składników lipidowych w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy u krów (n=49)

Parametr	Współczynnik korelacji (r)	Poziom istotności
Cholesterol	0,44	p < 0.05
HDL	0,31	NS
LDL	0,54	p < 0.01
Trójglicerydy	-0,08	NS

NS – korelacja statystycznie nieistotna

Tabela 13 prezentuje wyniki dotyczące stężeń składników jonowych w płynie pęcherzykowym badanych krów.

Stężenie sodu, magnezu i żelaza nie różniło się istotnie między badanymi grupami pęcherzyków. Nie stwierdzono też różnic zależnych od wieku. Zależnych od wieku różnic nie wykazano także między średnimi stężeniami fosforu i wapnia. W przypadku stężenia fosforu zanotowano natomiast różnice zależne od rodzaju pęcherzyków. W pęcherzykach dominujących było ono wyższe niż przedowulacyjnych i atretycznych, przy czym różnice w II. i III. grupie wiekowej krów były statystycznie istotne.

W tabeli 14 zamieszczono wyniki dotyczące stężeń składników jonowych w surowicy krów. Średnie stężenie sodu, fosforu, wapnia i magnezu nie różniło się istotnie między badanymi grupami krów. Zależne od wieku różnice stwierdzono natomiast w stężeniu żelaza. U krów najstarszych było ono najwyższe, a zanotowane różnice między I. a III. grupą wiekową były statystycznie istotne. Ponadto stężenie żelaza było dodatnio skorelowane z wiekiem ($r=0,39$; $P < 0.05$).

Z kolei korelacje między stężeniem jonów w płynie pęcherzykowym, a ich stężeniem w surowicy przedstawia tabela 15. W przypadku magnezu, fosforu i żelaza korelacje te były istotne.

Tabela 13. Stężenie składników jonowych w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych u krów w różnym wieku

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt															Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=24)					II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=24)					III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=24)					
	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków			Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=7)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=7)	atretyczne (n=8)			przedowulacyjne (n=8)	dominujące (n=8)	atretyczne (n=8)			
	1	2	3		I	4	5	6		II	7	8	9		III	
Sód (mmol/L)	136,50 ±4,71	134,70 ±3,45	137,54 ±3,69	BR	135,30 ±2,85	129,80 ±5,10	146,06 ±11,79	138,76 ±7,25	BR	135,20 ±9,54	134,13 ±4,52	133,29 ±3,18	131,57 ±3,56	BR	133,03 ±4,04	BR
Fosfor (mmol/L)	2,41 ±0,14	2,75 ±0,51	2,38 ±0,16	BR	2,63 ±0,34	2,29 ±0,16	3,01 ±0,87	2,81 ±0,56	4<5*	2,75 ±0,77	2,69 ±0,21	3,02 ±0,10	2,75 ±0,34	7<8*	2,71 ±0,27	BR
Wapń (mmol/L)	2,34 ±0,01	2,22 ±0,11	2,42 ±0,20	BR	2,26 ±0,10	1,98 ±0,21	2,42 ±0,23	2,61 ±0,20	4<5,6*	2,32 ±0,21	2,32 ±0,16	2,41 ±0,21	2,31 ±0,13	BR	2,32 ±0,14	4<1,7*
Magnez (mmol/L)	0,91 ±0,01	0,87 ±0,06	0,85 ±0,12	BR	0,89 ±0,05	0,79 ±0,15	0,95 ±0,18	0,98 ±0,07	BR	0,91 ±0,17	0,88 ±0,11	0,89 ±0,06	0,75 ±0,01	BR	0,83 ±0,10	BR
Żelazo (μmol/L)	23,60 ±3,99	28,95 ±5,38	25,95 ±4,08	BR	22,17 ±4,97	35,83 ±8,08	41,68 ±9,50	36,54 ±4,15	BR	36,78 ±7,75	32,08 ±3,64	36,01 ±2,21	32,23 ±1,91	BR	33,14 ±5,31	BR

¹ Różnice statystyczne uwzględniające rodzaj pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt;

² Średnie stężenie badanego parametru ze wszystkich pęcherzyków w tej samej grupie wiekowej zwierząt;

³ Różnice statystyczne uwzględniające ogólne różnice (I, II, III) i/lub ten sam rodzaj pęcherzyków między grupami wiekowymi zwierząt;

* - średnie różnią się przy $p < 0.05$; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 14. Stężenie składników jonowych w surowicy krów w różnym wieku z pęcherzykami przedowulacyjnymi lub dominującymi

Parametr	Grupy wiekowe zwierząt												Różnice statystyczne ³
	I grupa (od 2,5 do 6,5 lat; N=17)				II grupa (od 6,6 do 10 lat; N=16)				III grupa (od 10,1 do 18 lat; N=16)				
	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	Rodzaj pęcherzyków		Różnice statystyczne ¹	Ogółem ²	
	przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			przedowulacyjne (n=9)	dominujące (n=8)			
	1	2			3	4			5	6			
Sód (mmol/L)	143,40 ±1,90	146,55 ±3,18	BR	145,20 ±3,02	149,26 ±3,52	144,63 ±3,24	BR	146,79 ±4,03	144,18 ±3,86	145,70 ±7,69	BR	144,83 ±5,27	BR
Fosfor (mmol/L)	2,17 ±0,04	2,09 ±0,21	BR	2,12 ±0,16	2,25 ±0,48	2,54 ±0,20	BR	2,41 ±0,38	2,06 ±0,49	2,25 ±0,36	BR	2,14 ±0,41	BR
Wapń (mmol/L)	2,41 ±0,02	2,40 ±0,10	BR	2,41 ±0,07	2,61 ±0,24	2,26 ±0,18	BR	2,42 ±0,27	2,44 ±0,13	2,46 ±0,16	BR	2,45 ±0,13	BR
Magnez (mmol/L)	0,69 ±0,19	0,79 ±0,11	BR	0,75 ±0,14	0,77 ±0,05	0,77 ±0,12	BR	0,77 ±0,09	0,80 ±0,10	0,70 ±0,01	BR	0,75 ±0,09	BR
Żelazo (µmol/L)	20,40 ±2,08	28,98 ±3,41	1<2**	21,01 ±3,29	21,58 ±6,71	32,31 ±6,82	3<4*	27,30 ±7,50	33,28 ±5,66	33,77 ±5,46	BR	33,49± 6,03	III>I** 5>1,3**

¹ Różnice statystyczne uwzględniające 3,41rodzaj pęcherzyka obecnego na jajniku w tej samej grupie wiekowej zwierząt

² Średnie stężenie badanego parametru w tej samej grupie wiekowej zwierząt

³ Różnice statystyczne uwzględniające różnice między grupami wiekowymi zwierząt

*, ** - średnie różnią się przy $p < 0.05$ i $p < 0.01$, odpowiednio; BR – brak różnic statystycznie istotnych

Tabela 15. Korelacje między stężeniem składników jonowych w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy u krów (n=49)

Parametr	Współczynnik korelacji (r)	Poziom istotności
Sód	-0,13	NS
Wapń	0,09	NS
Magnez	0,75	$p < 0.01$
Fosfor	0,79	$p < 0.01$
Żelazo	0,48	$p < 0.01$

NS – korelacja statystycznie nieistotna

VII. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Płyn pęcherzykowy zgromadzony w *antrum* wpływa na steroidogenezę pęcherzykową, dojrzewanie i jakość oocytów, owulację, transport oocyta do jajowodu, luteinizację, a po zapłodnieniu na rozwój wczesnego zarodka (Arshad, 2005, Nandi i in., 2007, Stankiewicz i in., 2008, Abd Ellah i in., 2010). Płyn pęcherzykowy jest też stosowany jako suplement medium hodowlanego dla oocytów podczas dojrzewania *in vitro*, a pozyskiwany z pęcherzyków przedowulacyjnych jest naturalnym stymulatorem ostatecznego dojrzewania oocytów (Stankiewicz i in., 2008). U krów w każdym cyklu jajnikowym, od dwóch do trzech pęcherzyków jajnikowych osiąga średnicę powyżej 8,5 mm stając się dominującymi (Ginther i in., 1997; Ginther, 2000; Noseir, 2003). Jednakże w większości przypadków tylko jeden z tych pęcherzyków kontynuuje wzrost i dojrzewanie do etapu przedowulacyjnego, podczas gdy inne z fali ulegają atrezji (Ginther i in., 2001; Berisha i Schams, 2005). W związku z powyższym skład biochemiczny pęcherzyków przedowulacyjnych może się różnić od składu biochemicznego pęcherzyków dominujących i atretycznych, mimo, że wielkość tych pęcherzyków jest zbliżona. Oprócz statusu pęcherzyków ważnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na skład płynu pęcherzykowego jest wiek zwierząt.

W prezentowanej pracy, stężenie estradiolu i progesteronu w pęcherzykach atretycznych było zbliżone do zanotowanego w tego typu pęcherzykach u jałówek (Oussaid i in., 2000) i krów (Hendriksen i in., 2003). Zanotowane w niniejszej pracy wyższe stężenie progesteronu i niższe 17- β -estradiolu w pęcherzykach atretycznych w porównaniu do pęcherzyków przedowulacyjnych i dominujących stwierdzono też w innych badaniach (Faes i in., 2007, Nishimoto i in., 2009). Uważa się, że obniżenie stężenia estradiolu i wzrost stężenia progesteronu jest jedną z cech pęcherzyków atretycznych (Guthrie i Cooper, 1996). Ta zmiana kierunku steroidogenezy spowodowana jest zmianami w aktywności enzymów steroidogennych, które w efekcie prowadzą do procesów degeneracyjnych pęcherzyka jajnikowego (Bao i Garverick, 1998).

W przeprowadzonej pracy, w stężeniu oznaczanych hormonów steroidowych w pęcherzykach jajnikowych stwierdzono też różnice zależne od wieku. U krów najstarszych stężenie progesteronu było najwyższe. Tę zależność potwierdza również dodatnia korelacja między stężeniem tego hormonu a wiekiem badanych krów. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych na temat wpływu wieku na stężenie hormonów steroidowych w płynie pęcherzykowym u krów. Niemniej wskazuje się, że aktywność wydzielnicza pęcherzyków

jajnikowych zależy od wieku samicy, a efektem zmian w tej aktywności są różnice w stężeniach hormonów steroidowych we krwi (Carnevale i in., 1994; Malhi i in., 2005). Zależne od wieku różnice w stężeniach hormonów steroidowych w surowicy stwierdzono także w niniejszej pracy. Zanotowane wyższe stężenie 17- β -estradiolu w surowicy krów starszych niż młodszych potwierdzają badania innych autorów (Malhi i in., 2005).

Z uwagi na znaczącą rolę w rozwoju pęcherzyka jajnikowego czynników wzrostu z nadrodziny TGF- β , w przeprowadzonej pracy oznaczono stężenie BMP-15 należące do tej nadrodziny. Wcześniejsze badania wykazały, że białko to syntetyzowane jest zarówno przez komórki somatyczne pęcherzyka jajnikowego, jak i przez sam oocyt (Su i in., 2008; Peng i in., 2010). Uważa się, że uczestniczy ono w końcowych procesach związanych z dojrzewaniem pęcherzyka przedowulacyjnego i owulacją (Li i in., 2008; Palomino i De Los Reyes, 2016). Nie można też wykluczyć znaczenia BMP-15 w patogenezie zaburzeń pęcherzykowych (Sun i in., 2012; Stankiewicz i Błaszczuk, 2014; Stankiewicz i Błaszczuk, 2016). Dlatego ważne są prace nad dokładnym poznaniem roli BMP-15 w funkcjonowaniu jajnika (Galloway i in., 2002; Persani i in., 2014). W niniejszej pracy, podobnie jak w innych badaniach u krów (Behrouzi i in., 2016) i innych gatunków ssaków (Gueripel i in., 2006; McNatty i in., 2005a; Stankiewicz i Błaszczuk, 2014), stwierdzono obecność tego czynnika w płynie pęcherzykowym. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem, że BMP-15 współtworzy środowisko rozwoju pęcherzykowego (Su i in., 2008).

W prezentowanej pracy, w pęcherzykach atretycznych stężenie BMP-15 było wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących. Taką zależność zaobserwowano we wszystkich grupach wiekowych krów, aczkolwiek statystycznie istotne różnice zanotowano tylko u krów w wieku powyżej dziesiątego roku życia. Niemniej jednak to wyższe stężenie BMP-15 w pęcherzykach atretycznych u krów z każdej grupy wiekowej sugeruje znaczenie tego czynnika w atrezji pęcherzykowej, na które wskazują też inni autorzy (Wu i in., 2007). Trudno jednoznacznie wyjaśnić ewentualny związek między stężeniem BMP-15 a atrezią pęcherzykową. Należy jednak podkreślić, iż BMP-15 i inne czynniki wzrostu z nadrodziny TGF- β uczestniczą w zachowaniu prawidłowej równowagi pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek pęcherzykowych (Moore i Shimasaki, 2005; Sun i in., 2012). Zaburzona równowaga pomiędzy tymi procesami zachodzi natomiast w trakcie atrezji pęcherzykowej (Błaszczuk i in., 2000). Dlatego też wyższe stężenie BMP-15 w pęcherzykach atretycznych może być związane z atrezią pęcherzykową. Potwierdzeniem tej sugestii są wcześniejsze badania przeprowadzone na owcach, w których wykazano wyższą ekspresję mRNA BMP-15 w oocytach pęcherzyków atretycznych niż nieatretycznych (Crawford i in., 2011). Ponadto w pęcherzykach atretycznych

szczurów stwierdzono wzmożoną ekspresję mRNA dla receptorów BMP-15 (Erickson i Shimasaki, 2003). Cytowani autorzy wskazują też, że wzór ekspresji genów dla BMP-15 (i receptorów dla BMP-15) ulega znaczącym zmianom podczas folikulogenezy i inaczej kształtuje się w czasie pęcherzykowej selekcji, dominacji, atrezji, owulacji czy luteinizacji. Wyniki niniejszej pracy sugerują, że wzór ten może zależeć również od wieku samicy. W płynie pęcherzykowym krów najstarszych (powyżej 10. roku życia) stężenie BMP-15 było bowiem istotnie wyższe niż u krów młodszych (w wieku od 2,5 do 10 roku życia). Ponadto stężenie BMP-15 było dodatnio skorelowane w wiekiem. Na zależność między wiekiem a syntezą BMP-15 wskazują też badania Hosoe i in. (2011). Cytowani autorzy, w komórkach kumulusa pęcherzyków jajnikowych pozyskanych z jajników krów stwierdzili znacznie wyższą ekspresję mRNA BMP-15 niż w komórkach kumulusa pozyskanych z jajników jałówek. Z kolei u myszy wyższy poziom ekspresji mRNA BMP-15 zanotowano w pęcherzykach samic młodszych niż u samic starszych (Jiao i in., 2012; Shen i in., 2017). Te odmiennie kształtujące się zależności być może zależą od gatunku zwierząt. Jak podają McNatty i in. (2005b) i Chen i in. (2017) efekty fizjologiczne i mechanizmy działania czynników wzrostu z nadrodziny TGF- β nie są identyczne i mogą się różnić w zależności od gatunku zwierząt.

W przeprowadzonej pracy różnice w stężeniu BMP-15 w surowicy kształtowały się podobnie jak w pęcherzykach. U krów starszych stężenie tego białka było istotnie wyższe niż u krów młodszych i było dodatnio skorelowane z wiekiem. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac dotyczących kształtowania się stężeń BMP-15 w surowicy krów w zależności od ich wieku czy aktywności rozrodczej. Nie można jednak wykluczyć, iż określenie stężenia BMP-15 w surowicy czy osoczu krwi może być przydatne w ocenie, zależnego od wieku, potencjału rozrodczego krów. Na możliwość wykorzystania pomiarów stężeń BMP-15 w surowicy w ocenie funkcji rozrodczych wskazują badania Riepsamena i in. (2019), przeprowadzone u kobiet. Cytowani autorzy stwierdzili, że stężenie tego czynnika zależy od ich wieku i potencjału rozrodczego.

Analiza wyników uzyskanych w niniejszej pracy wykazała dodatnią korelację między stężeniem BMP-15 w płynie pęcherzyków a stężeniem tego czynnika w surowicy. Podobne zależności wykazano również u świń (Stankiewicz i Błaszczyk, 2016). Płyn pęcherzykowy jest produktem zarówno aktywności sekrecyjnej pęcherzyka jak i przesączem osocza krwi, a z drugiej strony stężenie wielu substancji biologicznie czynnych we krwi odzwierciedla aktywność sekrecyjną i status pęcherzyka (Leroy i in. 2004a). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują zatem, że BMP-15 może przenikać barierę krew-pęcherzyk. Należy jednak podkreślić, iż w niniejszej pracy stężenie BMP-15 w surowicy było znacznie wyższe niż

w pęcherzykach. Nie można więc wykluczyć, iż źródłem BMP-15 w surowicy badanych krów mogą być również komórki narządów pozajajnikowych. Sugestię tę potwierdzają dane wskazujące, że BMP-15 syntetyzowane jest nie tylko w pęcherzyku jajnikowym, ale także przez komórki przysadki mózgowej (Otsuka i Shimasaki, 2002; Pan i in., 2015).

Wykazano, że BMP-15 poza udziałem w regulacji proliferacji komórek ziarnistych reguluje w trakcie folikulogenezy syntezę FSH (Moore i Shimasaki, 2005), który to hormon był kolejnym oznaczanym parametrem w pracy. Hormon folikulotropowy to gonadotropina syntetyzowana i wydzielana z przedniego płata przysadki mózgowej w odpowiedzi na GnRH (Armstrong i Webb, 1997). Istotną rolą tej gonadotropiny jest wpływ na syntezę estradiolu w komórkach ziarnistych oraz udział w hamowaniu procesu apoptozy (Yang i Rajamahendran, 2000; Huhtaniemi i Themmen, 2005).

W niniejszej pracy stwierdzono istotne różnice między stężeniem FSH w pęcherzykach krów starszych a stężeniem tego hormonu w pęcherzykach krów młodszych, co najprawdopodobniej spowodowane było zależnymi od wieku zmianami w aktywności jajnikowej. W pęcherzykach krów starszych stężenie FSH było istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów młodszych. Podobną zależność wykazano także u kłacz (Ginther i in. 2008) i kobiet (Klein i in., 2004; Von Wald i in., 2009).

Podobnie jak w przypadku stężenia pęcherzykowego FSH również w stężeniu tego hormonu w surowicy zanotowano istotne różnice zależne od wieku oraz dodatnią korelację między stężeniem FSH a wiekiem krów. W surowicy krów najstarszych było ono istotnie wyższe niż w surowicy krów młodszych. Podobną zależność stwierdzono też w innych badaniach u krów (Malhi i in. 2005). Również u kobiet wchodzących w okres menopauzy obserwuje się wzrost stężenia FSH w surowicy (MacNaughton i in., 1992).

W przeprowadzonej pracy w każdej grupie wiekowej krów odnotowano istotne różnice w stężeniu FSH w surowicy, które zależało od obecności na jajniku pęcherzyków przedowulacyjnych lub dominujących. Uwzględniając przyjęte w pracy kryteria podziału pęcherzyków można sądzić, iż różnice te spowodowane były fazą cyklu jajnikowego i możliwym oddziaływaniem aktywności ciała żółtego na sekrecję FSH z przysadki mózgowej (Zeleznik i Fairchild-Benyo, 1994). Sekrecja FSH zależy od stadium cyklu jajnikowego i w okresie przedowulacyjnym, kiedy na jajniku obecny jest pęcherzyk przedowulacyjny jej poziom ulega obniżeniu (Zeleznik i in., 1987; Schipper i in., 1998; Raju i in., 2013). W niniejszej pracy stężenie FSH w tym okresie cyklu jajnikowego było zbliżone do zanotowanego przez innych autorów (Kaneko i in., 1995; Mondal i in., 2004).

Kolejnym analizowanym parametrem była glukoza. Jej stężenie w pęcherzykach dominujących było wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i atretycznych. Niższe stężenie glukozy w pęcherzykach owulacyjnych odnotowano również w badaniach przeprowadzonych u kłaczy (Gérard i in. 2002). Być może różnice te wynikają z różnego nasilenia przemian energetycznych zachodzących w pęcherzykach jajnikowych. Ponadto są dane wskazujące, że stężenie glukozy w płynie pęcherzykowym jest dodatnio skorelowane z poziomem glukozy w surowicy (Gupta i in. 2005; Ślebodziński, 2005). Potwierdza to wyniki uzyskane w niniejszej pracy, gdyż w każdej grupie wiekowej stężenie glukozy w surowicy było wyższe u krów z pęcherzykami dominującymi niż przedowulacyjnymi. Wyniki te sugerują, że stężenie glukozy może ulegać pewnym wahaniom w zależności od stadium cyklu rujowego.

W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu białka. Zarówno w pęcherzykach krów młodszych jak i starszych kształtowało się ono na zbliżonym poziomie i było dodatnio skorelowane ze stężeniem w surowicy. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na krowach i samicach innych gatunków zwierząt (Leroy i in. 2004b; Arshad i in., 2005; Abd Ellah i in., 2010; Stankiewicz, 2015). Wskazuje się, że stężenie białka w płynie pęcherzykowym stanowi około 75% stężenia białka w surowicy (Edwards, 1976; Wise, 1987).

W składzie analizowanych pęcherzyków jajnikowych uwzględniono też bilirubinę, której znaczenie w rozwoju pęcherzyków jajnikowych nie do końca jest wyjaśnione. Sugeruje się jej udział w dojrzewaniu oocytów (Bayer i in. 1992). Są też doniesienia, że pełni ona rolę antyoksydacyjną (Abdul-Razzaq i in., 2020). Należy podkreślić, iż stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem negatywnie wpływającym na folikulogenezę i dojrzewanie oocytów. Dlatego w pęcherzyku jajnikowym musi istnieć skuteczny układ przeciwutleniaczy chroniący przed procesami oksydacyjnymi (Abdul-Razzaq i in., 2020). W niniejszej pracy stężenie bilirubiny w pęcherzykach krów najmłodszych i najstarszych było zbliżone, natomiast u krów w wieku od 6,6 do 10 lat było istotnie wyższe. Poza tym w pęcherzykach jajnikowych u krów w tej grupie wiekowej najwyższe stężenie bilirubiny zanotowano w pęcherzykach atretycznych, natomiast w pęcherzykach przedowulacyjnych było ono najniższe. Trudno zinterpretować te wyniki, ale intersujące dane przedstawili Pallisco i in. (2020) w doniesieniu dotyczącym stężenia bilirubiny w ludzkim płynie pęcherzykowym. W swoich badaniach, autorzy wykazali związek między jakością oocytów a stężeniem bilirubiny w płynie pęcherzykowym. Z kolei w badaniach przeprowadzonych u samic bawoła wodnego stwierdzono wyższą koncentrację bilirubiny w cystach pęcherzykowych niż w płynie prawidłowych pęcherzyków jajnikowych (Khan i in., 2011). Niewykluczone, że stężenie bilirubiny w płynie pęcherzykowym może być

jednym ze wskaźników rozwoju pęcherzyka jajnikowego i/lub jakości oocytów. Należy też podkreślić, iż stężenie bilirubiny w surowicy krów wszystkich grup wiekowych było zbliżone.

Ważnymi komponentami płynu pęcherzykowego są kreatynina i kwas moczowy. Związki te należą do ważnych antyoksydantów rozpuszczalnych w wodzie (Nath i in., 2014). Dlatego można sądzić, iż również w pęcherzyku jajnikowym pełnią funkcję związków o właściwościach przeciwutleniających. Ogólnie stężenie kreatyniny było zbliżone do zanotowanych w pęcherzykach krów przez innych autorów (Kor i in., 2013). W niniejszej pracy w stężeniu tego składnika w płynie pęcherzykowym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic zależnych od wieku krów. Niemniej jednak u krów młodszych (grupa wiekowa I. i II) w pęcherzykach przedowulacyjnych było ono najniższe. Stężenie kreatyniny w płynie pęcherzykowym i surowicy kształtowało się na podobnym poziomie, a ścisłą zależność w tym przypadku potwierdza statystycznie istotny współczynnik korelacji. Podobną zależność zanotowano u samic bawoła (Abd Ellah i in., 2010). Można więc sądzić, iż stężenie pęcherzykowej kreatyniny zależy od jej stężenia we krwi. Z kolei stężenie kwasu moczowego w płynie pęcherzykowym nie było skorelowane ze stężeniem w surowicy. Ponadto zaobserwowano, że na poziomie pęcherzyka było ono znacznie wyższe niż w surowicy. Podobne wyniki uzyskali Cassano i in. (1999) u samic bawoła wodnego. Obserwacje te sugerują, że źródłem pęcherzykowego kwasu moczowego mogą być przemiany lokalne zachodzące w pęcherzyku jajnikowym. Kwas moczowy jest przeciwutleniaczem zdolnym do wychwytywania nadtlenu, rodnika hydroksylowego i tlenu singletowego, a dodatkowo powstaje we wszystkich procesach rozpadu i przebudowy komórek. Najprawdopodobniej to wysokie stężenie wewnątrzpęcherzykowe kwasu moczowego związane jest z obroną antyoksydacyjną pęcherzyka jajnikowego (Simic i Jovanovic, 1989). Dlatego też istnieje prawdopodobieństwo, że zanotowane w niniejszej pracy wyższe stężenie kwasu moczowego w pęcherzykach krów najstarszych może być efektem zależnym od wieku różnic w nasileniu procesów oksydacyjnych w czasie folikulogenezy.

Kolejnym analizowanym parametrem był mocznik, którego stężenie w pęcherzykach jajnikowych i surowicy krów wszystkich grup wiekowych było zbliżone. Ponadto stwierdzono wysoką dodatnią korelację między stężeniem mocznika w pęcherzykach i surowicy. Podobne zależności wykazali u krów Leroy i in. (2004b). Warto jednak podkreślić, iż nadmierna ilość mocznika w płynie pęcherzykowym może być bardzo niekorzystna dla rozwoju pęcherzyka jajnikowego. Jego nadmierne stężenie w tym płynie może spowodować nieodpowiednie pH w jajowodzie, do którego dostaje się oocyt wraz z płynem pęcherzykowym. Z kolei to nieodpowiednie pH negatywnie oddziałuje na ruchliwość plemników (Westwood i in., 1998;

Leroy i in., 2004a). Dawuda i in. (2002) wysnuli hipotezę, że mocznik wpływa na jakość oocytu i jest toksyczny dla zarodków. Również badania Kowsara i in. (2018) potwierdzają tę hipotezę, zakładając, iż podwyższone stężenie mocznika znacząco zmniejsza późniejszą zdolność rozwojową oocytów bydlęcych.

Ważnymi składnikami płynu pęcherzykowego są lipidy. Dlatego też w pracy określono stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i LDL oraz trójglicerydów. W niniejszej pracy stężenie pęcherzykowego cholesterolu całkowitego było istotnie wyższe u krów w drugiej grupie wiekowej niż u krów młodszych (I. grupa) i najstarszych (III. grupa). Podobnie kształtowały się różnice dotyczące stężenia cholesterolu całkowitego i HDL w surowicy. Wynika to najprawdopodobniej z tego, że głównym źródłem cholesterolu w płynie pęcherzykowym jest osocze krwi. Jak podają De Placido i in. (2005) całkowity poziom cholesterolu w płynie pęcherzykowym wynosi około 42% stężenia stwierdzonego we krwi. Należy jednak podkreślić, iż cholesterol w płynie pęcherzykowym pochodzi nie tylko z osocza, ale powstaje również z syntezy *de novo* z octanu (Kor i Moradi, 2013). Cholesterol obecny w płynie związany jest głównie z HDL (Brantmeier i in., 1987). W stężeniu tej frakcji lipoprotein w pęcherzykach jajnikowych nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od wieku krów. Różnice dotyczyły natomiast poszczególnych rodzajów pęcherzyków. W pęcherzykach atretycznych pozyskanych od krów I. i II. grupy wiekowej stężenie HDL było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących. Podobną tendencję zaobserwowano w pęcherzykach krów najstarszych. Te zależne od rodzaju pęcherzyka różnice w stężeniu HDL najprawdopodobniej wynikają z różnej przepuszczalności ściany pęcherzykowej, na co zwracają uwagę również inni autorzy (Wehrman i in., 1991; Sato i Jiang, 2001). Niemniej jednak zanotowane średnie stężenie pęcherzykowego cholesterolu całkowitego i HDL było zbliżone do stężenia obserwowanego w innych badaniach na krowach (Błaszczuk i in. 2006). W pracy oprócz stężenia cholesterolu HDL oceniono również stężenie cholesterolu LDL. W pęcherzykach krów najmłodszych stężenie tej frakcji lipoprotein było najwyższe, natomiast w pozostałych grupach na granicy wykrywalności lub nawet niewykrywalne. Niektórzy autorzy wskazują, że bariera krew-pęcherzyk jest nieprzepuszczalna dla cholesterolu LDL (Brantmeier i in., 1987). Brak LDL wykazano w płynie pęcherzykowym kobiet (Perret i in., 1985), loch (Chang i in., 1976) i klaczy (Le Goff, 1994).

W niniejszej pracy wykazano, że stężenie trójglicerydów w płynie pęcherzykowym niezależnie od rodzaju pęcherzyków oraz wieku krów było na zbliżonym poziomie. Podobnie kształtowało się stężenie trójglicerydów w surowicy badanych krów, aczkolwiek nie wykazano istotnych korelacji między ich stężeniem w pęcherzykach a stężeniem w surowicy. Brak tych

zależności może być potwierdzeniem badań innych autorów wskazujących, że trójglicerydy nie przechodzą przez barierę krew-pęcherzyk, a ich obecność w płynie pęcherzykowym jest efektem lokalnych przemian metabolicznych (Leroy i in. 2004a; Tabatabaei i Mamoe, 2011). Jak podają Wehrman i in. (1991) stężenie trójglicerydów w bydlęcych pęcherzykach jajnikowych utrzymuje się na stabilnym poziomie niezależnie od wzrostu ich stężenia w surowicy spowodowanego stanem fizjologicznym bądź dietą.

W niniejszej pracy analizowano również stężenie składników jonowych, których znaczenie w follikulogenezie podkreśla wielu autorów (Sharma i in., 1995; Yamada i in. 1998; Rodgers i Irving-Rodgers, 2010b). Przykładowo sód jest ważnym elektrolitem wpływającym na zmiany przepuszczalności tekalnych naczyń kapilarnych i biorącym udział w mechanizmie gromadzenia się płynu antralnego (Sharma i in., 1995; Rodgers i Irving-Rodgers, 2010b; Jayachandran i in., 2013). Fosfor uczestniczy w wielu reakcjach, głównie poprzez udział w syntezie fosfolipidów i cyklicznego adenozylo 3', 5'-monofosforatu (cAMP) (Jayachandran i in., 2013). Wapń i magnez uczestniczą w regulacji tworzenia trombiny (Yamada i in. 1998). Z kolei z badań na pęcherzykach ludzkich wynika, że jony żelaza są silnym prooksydantem, które katalizują wytwarzanie wolnych rodników w reakcji Haber-Weissa (Paszkowski i in., 1996). Dlatego też uważa się, że zwiększona biodostępność żelaza w płynie pęcherzykowym może powodować uszkodzenia oksydacyjne komórek (Paszkowski i in., 1996).

W niniejszej pracy nie stwierdzono by stężenie sodu, fosforu, wapnia, magnezu i żelaza w płynie pęcherzykowym zależało od wieku krów. Ponadto stężenie sodu, magnezu i żelaza nie różniło się także w zależności od rodzaju pęcherzyków. Również w surowicy krów nie stwierdzono istotnych różnic, za wyjątkiem stężenia żelaza, które było najwyższe u krów najstarszych. Ogólnie stężenia badanych jonów w surowicy mieściły się w zakresie norm dla krów (Winnicka, 2008). Zanotowane natomiast istotne dodatnie wartości współczynników korelacji między stężeniem magnezu, fosforu i żelaza w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy wskazują, że koncentracja tych jonów w pęcherzykach zależy od ich stężenia we krwi.

VIII. WNIOSKI

1. Wykazane różnice w stężeniu białka morfogenetycznego kości (BMP-15), hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego (FSH) i składników biochemicznych w przedowulacyjnych, dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych sugerują potrzebę szerszego wyjaśnienia znaczenia i zależności między tymi wskaźnikami na poszczególnych etapach dojrzewania pęcherzyka jajnikowego. Może to być pomocne w pracach nad modyfikacjami mediów hodowlanych dla bydlęcych oocytów w warunkach *in vitro*. Wyniki te mogą też być wykorzystane w ocenie jakości pęcherzyków jajnikowych w procedurach związanych z pozyskiwaniem oocytów i w badaniach nad dominacją, selekcją i atrezią pęcherzykową.
2. Zanotowane różnice w stężeniu hormonów steroidowych, FSH, BMP-15 i niektórych składników biochemicznych w płynie pęcherzykowym u krów w różnym wieku wskazują, że wiek jest ważnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na skład płynu pęcherzykowego. Wyniki te mogą być przydatne w pracach nad oceną procesów rozrodczych w późnym okresie życia krowy oraz doskonalenia procedur hodowli oocytów i zarodków pozyskiwanych od samic w różnym wieku.
3. Stwierdzone, zależne od wieku, wyższe stężenie BMP-15 w pęcherzykach atretycznych niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących sugeruje znaczenie tego czynnika w atrezi pęcherzykowej. Wzbogacając dotychczasowy stan wiedzy w temacie, wyniki te zachęcają do dalszych prac nad szerszym wyjaśnieniem roli czynników wzrostu należących do nadrodziny TGF- β w czynnościach jajników krów w różnym wieku.
4. Dostarczając konkretnych danych na temat kształtowania się zawartości oznaczanych parametrów w płynie pęcherzyków jajnikowych i surowicy, uzyskane wyniki potwierdzają, że skład płynu pęcherzykowego zależy od składu biochemicznego krwi, a także od lokalnych przemian zachodzących w pęcherzyku jajnikowym.

Mając zatem powyższe na uwadze, wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają hipotezę badawczą, że stężenie hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka

morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

IX. PIŚMIENNICTWO

1. **Abe H.**, Yamashita S., Satoh T., Hoshi H.: 2002. Accumulation of cytoplasmatic 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.
2. **Abd Ellah M.R.**, Hussein H.A., Derar D.R.: 2010. Ovarian follicular fluid constituents in relation to stage of estrus cycle and size of the follicle in buffalo. *Vet World.* 3. 263-267.
3. **Abdul-Razzaq L.N.**, Salih K.M., Al-Musaw B.J.: 2020. Evaluation of Total Antioxidant Capacity in Serum and Follicular Fluid of Women Undergoing ICSI and its Association with Implantation Failure. *Medico-legal.* 20(2). 549-554.
4. **Adams G.P.**, Matteri R.L., Kastelic J.P., Ginther O.J.: 1992. Association between surges of follicle-stimulation hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94(1). 177-188.
5. **Adams C. P.**, Evans A. C. O., Rawlings N. C.: 1994. Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fert.* 100. 27-33.
6. **Ali S.**, Ahmad N., Akhtar N., Zia-Ur-Rahman, Noakes D.E.: 2008. Metabolite contents of blood serum and fluid from small and large sized follicles in dromedary camels during the peak and the low breeding seasons. *Anim Reprod Sci.* 108. 446-456.
7. **Allaire F.R., Gibson J.P.**: 1992. Genetic Value of Herd Life Adjusted for Milk Production. *J Dairy Sci.* 75. 1349-1356.
8. **Allen J.J.**, Herrick S.L., Fortune J.E.: 2016. Regulation of steroidogenesis in fetal bovine ovaries: differential effects of LH and FSH. *Journal of Molecular Endocrinology.* 57(4). 275-286.
9. **Andersen M.M.**, Kroll J., Byskov A.G., Faber M.: 1976. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J. Reprod Fert.* 48. 109-118.
10. **Antonsson B., Martinou J.C.**: 2000. Minireview: the Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 256. 50–70.
11. **Araújo V. R.**, Lima-Verde I. B., Name K. P. O., Bão S. N., Campello C. C., Silva J. R. V., Rodrigues A. P. R., Figueiredo J. R.: 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 12. 78.
12. **Armstrong D.G., Webb R.**: 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod.* 2. 139–146.

13. **Arshad M.**, Ahmad N., Zia-ur-Rahman, Samad H.A., Akhtar N., Ali S.: 2005. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. Pak Vet J. 25. 189-193.
1. **Ashkar F.**, Bartlewski M., Singh J., Malhi P., Yates K., Singh T., King A.: 2010 Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows. Exp Biol and Med. 235. 215-221.
2. **Atheya U.K., Totey S.M.:** 2002. Steroid concentration of the buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicular fluid. Buflalo J. 18(1). 137-141.
3. **Bao B.**, Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Youngquist R.S.: 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome 450chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. Biology of Reproduction. 56(5). 1158-1168.
4. **Bao B., Garverick H.A.:** 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. J Anim Sci. 76. 1903–1921.
5. **Balakrishna P.P.:** 1994. Studies on certain factors affecting the in vitro maturation of follicular oocytes in sheep (PhD Thesis), Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai, India.
6. **Bayer S.R.**, Zeind A.J., Turksoy R.N., Emmi A.M., Reindollar R.H.: 1992. Further study and characterization of the yellow pigments in follicular fluid that are related to oocyte quality. Fertility and Sterility. 58(5). 964-969.
7. **Bearden H.J., Fuquay W.J.:** 1997. Nmendocrine Regulators of Reproduction (Chapter 4) in Applied Animal Reproduction. 4.
8. **Behrouzi A.**, German Colazo M., Justus Ambrose D.: 2016. Alterations in bone morphogenetic protein 15, growth differentiation factor 9, and gene expression in granulosa cells in preovulatory follicles of dairy cows given porcine LH. Theriogenology. 85. 1249-1257.
9. **Belli M.**, Shimasaki S.: 2018. Chapter Twelve – Molecular Aspects and clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. Vitamins and Hormones. 107. 317-348.
10. **Ben-Rafael Z.**, Meloni F., Strauss J.F. 3rd, Blasco L., Mastroianni Jr., Flickinger G.L.: 1987. Relationships between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin-treated women. Fertil Steril. 47. 284-288.
11. **Berisha B., Schams D.:** 2005. Ovarian function in ruminants. Domest Anim Endocrinol 29. 305-317.

12. **Blanco M. R.**, Demyda S., Moreno Milan M., Genero E.: 2011. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 6. 155-165.
13. **Błaszczyk B.**, Udała J., Gączarzewicz D.: 2000. Apoptoza w atrezji pęcherzyków jajnikowych. *Med. Weter.* 56. 58-62.
14. **Błaszczyk B.**, Udała J., Lasota B.: 2000a. Wybrane mechanizmy regulacji regresji ciała żółtego. *Med. Weter.* 56. 288-292.
15. **Błaszczyk B.**, Stankiewicz T., Udała J., Gączarzewicz D., Lasota B., Błaszczyk P., Szymańska A., Szymańska-Pasternak J.: 2006. Free thyroid hormones and cholesterol in follicular fluid of bovine ovaries. *Bull Vet Inst Pulawy*. 50. 189-193.
16. **Bordoloi P.K.**, Sarmah B.C., Dutta D.J., Deka B.C.: 2000. Follicular fluid cholesterol in goat ovary. *Indian Vet J*. 77. 638-639.
17. **Brantmeier S.A.**, Grummer R.R., Ax R.L.: 1987. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci*. 70. 2145-2149.
18. **Braw-Tal R.**, Yossefi S.: 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod. Fertil*. 109. 165–171.
19. **Braw-Tal R.**, Roth Z.: 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*. 129(4). 453-461.
20. **Britt J.H.**: 2008. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37. 110-115.
21. **Burns D. S.**, Jimenez - Krassel F., Ireland J. L., Knight P. G., Ireland J. J.: 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle - stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod*. 73. 54-62.
22. **Camp T.A.**, Rahal J.O., Mayo K.E.: 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicles-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol*. 5. 1405-1417.
23. **Canty M.J.**, Boland M.P., Evans A.C., Crowe M.A.: 2006. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*. 93. 199–217.
24. **Carnevale E.M.**, Bergfelt D.R., Ginther O.J.: 1994. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. *Animal Reproduction Science*. 35(3-4). 231-246.

25. **Cassano E.**, Tosto L., Balestrieri M., Zicarelli L., Abrescia P.: 1999. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol Biochem.* 9. 106-116.
26. **Chang S.C.S.**, Jones J.D., Ellefson R.D.: 1976. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol. Reprod.* 15. 321-328.
27. **Chang H.M.**, Qiao J., Leung P.C.K.: 2016. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update.* 23(1). 1-18.
28. **Chen H.**, Liu C., Jiang H., Gao Y., Xu M., Wang J., Liu S., Fu Y., Sun X., Xu J., Zhang J., Dai L.: 2017. Regulatory Role of miRNA-375 in Expression of BMP15/GDF9 Receptors and its Effect on Proliferation and Apoptosis of Bovine Cumulus Cells. *Cell Physiol Biochem.* 41(2). 439-450.
29. **Cheon Y-P.**: 2012. Regulation and 3-dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clin Exp Reprod Med.* 39(3). 95-106.
30. **Christenson L. K.**, **Devoto L.**: 2003. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1. 90.
31. **Close W.H.**: 1998. The role of organic trace mineral proteinates in pig nutrition. *Biotechnology in the Feed Industry.* 469-484.
32. **Cognie Y.**, Benoit F., Poulin N., Khatir H., Driancourt M. A.: 1998. Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 112. 379-386.
33. **Conley A.J.**, Howard H.J., Slanger W.D., Ford J.J.: 1994. Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biology of Reproduction.* 51 (4). 655-661.
34. **Corbin C.J.**, Moran F.M., Vidal J.D., Ford J.J., Wise T., Mapes S.M., Njar V.C., Brodie A.M., Conley A.J.: 2003. Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol.Reprod.* 69. 390-397.
35. **Crawford J.L.**, Heath D.A., Reader K.L., Quirke L.D., Hudson N.L., Juengel J.L., McNatty K.P.: 2011. Oocytes in sheep homozygous for a mutation in bone morphogenetic protein receptor 1B express lower mRNA levels of bone morphogenetic protein 15 but not growth differentiation factor 9. *Reproduction.* 142(1). 53-61.
36. **Crowe M.A.**, Driancourt M.A., Boland M., Kelly P.: 2001. Effect of Follicle-Stimulating Hormone with and without Luteinizing Hormone on Serum Hormone Concentrations, Follicle Growth, and Intrafollicular Estradiol and Aromatase Activity in Gonadotropin-Releasing Hormone-Immunized Heifers. *Biology of Reproduction.* 64(1). 368-374.

37. **Crowe M.A.**, Mullen M.P.: 2013. Regulation and Differential Secretion of Gonadotropins During Post Partum Recovery of Reproductive Function in Beef and Dairy Cows. *Gonadotropin*. 1. 107-124.
38. **Czaplicka M.**, Puchajda Z., Szalunas T.: 2004. Długość użytkowania i przyczyny brakowania krów wysoko wydajnych. *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego*. 72(1). 129-136.
39. **Dawuda P.M.**, Scaramuzzi R.J., Leese H.J., Hall C.J, Peters A.R., Drew S.B., Wathes D.C.: 2002. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 58. 1443-1455.
40. **De Placido G.**, Alviggi C., Perino A., Strina I., Lisi F., Fasolino A., De Palo R., Ranieri A., Colacurci N., Mollo Al.: 2005. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) stepup protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 20. 390-396.
41. **Dominquez M.M.**, Liptram R.M., Basrur P.K.: 1988. Steroidogenesis in fetal bovine gonads. *Can J Vet Res*. 52(4). 401-406.
42. **Dorrington J.H.**, Roller N.F., Fritz I.B.: 1975. Effect of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. *Mol Cell Endocrinol*. 3(1). 57-70.
43. **Downey B.R.**: 1980. Regulation of the Estrous Cycle in Domestic Animals – A Review. *Candian Veterinary Journal*. 21(11). 301-306.
44. **Downs S.M.**, Humpherson P.G., Martin K.L., Leese H.J.: 1996. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 44(1). 121-131.
45. **Dragovich T.**, Rudin C.M., Thompson C.B.: 1998. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene*. 17. 3207–3213.
46. **Driancourt M. A.**: 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55. 1211-1239.
47. **Drummond A.E.**: 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:16.
48. **Dube J.L.**, Wang P., Elvin J., Lyons K. M., Celeste A.J., Matzuk M.M.: 1998. The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. *Molecular Endocrinology*. 12(12). 1809-1817.
49. **Edwards R.G.**:1974. Follicular fluid. *J reprod fertile*. 37. 189-219.

50. **Eppig J.J.:** 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829-838.
51. **Erickson G.F., Shimasaki S.:** 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*. 1(9).
52. **Evans A.C.O., Fortune J.E.:** 1997. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonaotropin Receptors. *Endocrinology*. 138(7). 2963-2971.
53. **Faes R.F., Caldas-Bussiere M.C., Rosa-e-Silva A.A.M, Antunes-Rodrigues J., Barbosa J.C.:** 2007. Relationship among nitric oxide, progesterone and estradiol-17beta concentrations in follicular fluid during follicular development in cattle. *Anim. Reprod*. 4. 31-37.
54. **Fair T., Hulshof S.C., Hyttel P., Greve T., Boland M.:** 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195. 327–336.
55. **Farnworth P.G.:** 1995. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J Endocrinol*. 145(3). 387-395.
56. **Findlay J.K., Kerr J.B., Britt K., Liew S.H., Simpson E.R., Rosairo D., Drummond A.:** 2009. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Anim. Reprod*. 6 (1). 16-19.
57. **Fortune J.E., Hansel W.:** 1985. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol. Reprod*. 32. 1069-1079.
58. **Fortune J.E.:** 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod*. 35. 292-299.
59. **Fortune J.E., Sirosis J., Quirk S.M.:** 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 29(1). 95-109.
60. **Fortune J.E.:** 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 50. 225–232.
61. **Frandsen R.D., Wilke W.L., Fails A.D.:** 2003. *Anatomy and Physiology of Farm Animal*. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. 226-233.
62. **Fraser H.M.:** 2006. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4(1):18.

63. **Galloway S.M.**, Gregan S.M., Wilson T., McNatty K.P., Juengel J.L., Ritvos O., Davis G.H.: 2002. Bmp15 mutations and ovarian function *Molecular and Cellular Endocrinology*. 191(1). 15-18.
64. **Gérard 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. *Reproduction*. 124. 241-248.
65. **Ginther O.J.**, Kot K., Kulick L.J., Wiltbank M.C.: 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. 48(1). 75-87.
66. **Ginther O.J.**: 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*. 2. 61-79.
67. **Ginther O.J.**, Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K.: 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*. 65(3). 638-647.
68. **Ginther O.J.**, Bergfelt D.R., Beg M.A., Kot K.: 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction*. 124(4). 475-482.
69. **Ginther O. J.**, Gastal M. O., Gastal E. L., Jacob J. C., Siddiqui M.A.R., Beg M. A.: 2008. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares *Reproduction. Fertility and Development*. 20(8). 955-963.
70. **Gougeon A., Lefevre B.**: 1983. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil*. 69(2). 497-502.
71. **Grazul-Bilska A. T.**, Redmer D. A., Reynolds L. P.: 1997. Cellular interactions in the corpus luteum. *Semin. Reprod. Endocrinol*. 15. 383–393.
72. **Gregoraszczuk E.L.**, Słomaczyńska M., Wilk R.: 1998. Thyroid hormone inhibits aromatase activity in porcine thecal cells cultured alone and in coculture with granulosa cells. *Thyroid*. 8. 1157-1163.
73. **Gueripel X.**, Brun V., Gougeon A.: 2006. Oocyte Bone Morphogenetic Protein 15, but not Growth Differentiation Factor 9, Is Increased During Gonadotropin-Induced Follicular Development in the Immature Mouse and Is Associated with Cumulus Oophorus Expansion. *Biology of Reproduction*. 75. 836-843.
74. **Gupta P.S.P.**, Ravindranatha J.P., Kumar V.G., Raghu H.M., Nandi S.: 2005. Stimulation of in vitro ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Rumin. Res*. 59. 33-40.

75. **Guthrie H.D.**, Cooper B.S.: 1996. Follicular Atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod.* 55(3). 543-547.
76. **Hanrahan J.P.**, Gregan S.M., Mulsant P., Mullen M., Davis G.H., Powell R., Galloway S.M.: 2004. Mutation in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod.* 70. 900-909
77. **Hansel W.**, **Convey E.M.**: 1983. Physiology of the Estrous Cycle. *Journal of Animal Science.* 57(2). 404-424.
78. **Hatzirodos N.**, Nigro J., Irving-Rodgers H.F., Vashi A.V., Hummitzsch K., Caterson B., Sullivan T.R., Rodgers R.J.: 2012. Glycomic analyses of ovarian follicles during development and atresia. *Matrix Biol.* 31(1). 45-56.
79. **Hatzirodos N.**, Irving-Rodgers H.F., Hummitzsch K., Harland M.L., Morris S.E., Rodgers R.J.: 2014. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. *BMC Genomics.* 15(1):40.
80. **Henderson K. M.**, McNatty K. P., Smith P., Gibb M., O'Keeffe L. E., Lun S., Heath D. A., Prisk M. D.: 1987. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 79(1). 185-193.
81. **Hendriksen P.J.M.**, Gadenlla B.M., Vos P.L.A.M., Mullaart E., Kruip T.A.M., Dieleman S.J.: 2003. Follicular Dynamics Around the Recruitment of the First Follicular Wave in the Cow. *Biology of Reproduction.* 69. 2036-2044.
82. **Hillier S.G.**: 1994. Cortisol and oocyte quality. *Clin. Endocrinol.* 40. 19-20.
83. **Hirshfield A.N.**: 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124. 43–101.
84. **Hori K.**, Matsuyama S., Nakamura S., Iwata H., Kuwayama T., Miyamoto A., Shirasuna K.: 2018. Age-related changes in the bovine corpus luteum function and progesterone secretion. *Reproduction in Domestic Animals.* 54(1). 23-30.
85. **Hosoe M.**, Kaneyama K., Ushizawa K., Hayashi K., Takahashi T.: 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 9(33).
86. **Hsueh A.J.W.**, Kawamura K., Cheng Y., Fauser B.C.J.M.: 2015. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocr Rev.* 36(1). 1-24.

87. **Huhtaniemi I.T., Themmen A.P.:** 2005. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine*. 26. 207–217.
88. **Hunter M.G.,** Biggs C., Faillace L.S., Picton H.M.: 1992. Current concepts of folliculogenesis in monovular and polyovular farm species. *J. Reprod. Fertil.* 45.21-38.
89. **Hunter M. G.,** Robinson R. S., Mann G. E., Webb R.: 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Repr. Scie.* 82-83. 461-477.
90. **Ireland J.J.,** Murphee R.L., Coulson P.B.: 1980. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. *J Dairy Sci.* 63. 155-160.
91. **Ireland J.J., Roche J.F.:** 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 111(6). 2077-2086.
92. **Ireland J.J., Roche J.F.:** 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112(1). 150-156.
93. **Ireland J.J.:** 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod.Fert.* 34. 39-54.
94. **Irving-Rodgers H.F.,** van Wezel I.L., Mussard M.L., Kinder J.E., Rodgers R.J.: 2001. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*. 15(5). 761-775.
95. **Iwata H.:** 2017. Age-associated changes in granulosa cells and follicular fluid in cows. *Journal of Reproduction and Development*. 63(4). 339-345.
96. **Jayachandran S.,** Nanjappan K., Muralidharan J., Selvaraj P., Manoharan A.: 2013. Blood biochemical and mineral status in cyclic and postpartum anestrus buffaloes. *Int J Food Agri Vet Sci.* 3. 93–97.
97. **Jiang J.Y.,** Cheung C.K.M., Wang Y.F., Tsang B.K.: 2003. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci.* 8. 222–237.
98. **Jiao Z.X.,** Xu M., Woodruff T.K.: 2012. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: potential markers of oocyte competence. *Fertil Steril.* 98(2). 480-486.
99. **Johnson A.L.:** 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci.* 78. 185–201.

100. **Kakar S.S.**, Rahe C.H., Neill J.D.: 1993. Molecular cloning, sequencing and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol.* 10(4). 335-342.
101. **Kaneko H.**, Kishi H., Watanabe G., Taya K., Sasamoto S., Hasegawa Y.: 1995. Changes in Plasma Concentrations of Immunoreactive Inhibin, Estradiol and FSH Associated with Follicular Waves during the Estrous Cycle of the Cow. *Journal of Reproduction and Development.* 41(4). 311-320.
102. **Kanitz W.**: 2003. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. *Arch. Tierz., Dummerstorf.* 46(2), 187-198.
103. **Kątska L.**: 1997. Izolacja i hodowla in vitro bydłych pęcherzyków jajnikowych. *Med. Weter.* 53. 387-390.
104. **Khan F.A.**, Nabi S.U., Pande M., Das G.K., Sarkar M.: 2011. Bilateral follicular cysts in a water buffalo. *Trop Anim Health Prod.* 43. 539-541.
105. **Kim J.Y.**, Kinoshita M., Ohnishi M., Fukui Y.: 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reprod.* 122. 131-138.
106. **Klein N.A.**, Houmard B.S., Hansen K.R., Woodruff T.K., Sluss P.M., Bremner W.J., Soules M.R.: 2004. Age-related analysis of inhibin A, inhibin B, and activin a relative to the intercycle monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6). 2977–2981.
107. **Knight P.G.**, Glister C.: 2006. TGF- β superfamily members and ovaria follicle development. *Reproduction.* 132. 191–206.
108. **Kor N.M.**, Khanghah K.M., Veisi A.: 2013. Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows. *Annu Rev Res Biol.* 3. 397-404.
109. **Kor N.M.**, Moradi K.: 2013. A Review of Biochemical Metabolites Concentration and Hormonal Composition of Ovarian Follicular Fluid in Domestic Animals. *Annual Review & Research in Biology.* 3(3). 240-255.
110. **Kowsar R.**, Iranshahi V.N., Sadeghi N., Riasi A., Miyamoto A.: 2018. Urea influences amino acid turnover in bovine cumulus-oocyte complexes, cumulus cells and denuded oocytes, and affects in vitro fertilization outcome. *Scientific Reports.* 8(12191).
111. **Krysko D.V.**, Diez-Fraile A., Criel.G., Svistunov A.A., Vandenabeele P., D’Herde K.: 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 13. 1065-1087.

112. **Kulick L. J.**, Kot K., Wiltbank M. C., Ginther O. J.: 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52. 913–921.
113. **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.
114. **Leroy J.L.**, Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., de Kruif A.: 2004a. 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.
115. **Leroy J.L.**, Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., Dewulf J., de Kruif A.: 2004b. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post-partum. *Theriogenology*. 62. 1131–1143.
116. **Li H.K.**, Yang H.S., Chen L.R., Li S.S., Huang H.W.: 2008. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim Reprod Sci*. 103(3–4). 312–322.
117. **Lucy M.C.**: 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*. 85(13). 89–99.
118. **MacNaughton J.**, Banah M., McCloud P., Hee J., Burger H.: 1992. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 36(4). 339–345.
119. **Malhi P.S.**, Adams GP, Singh J.: 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod*. 73(1). 45–53.
120. **Maruo T.**, Hiramatsu S., Otani T., Hayashi M., Mochizuki M.: 1992. Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells in follicular maturation. *Acta Endocrinology*. 127. 152–160.
121. **Matsuda F.**, Inoue N., Manabe N., Ohkura S.: 2012. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*. 58(1). 44–50.
122. **Matsuda-Minehata F.**, Inoue N., Goto Y., Manabe N.: 2006, The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev*. 52. 695–705.
123. **McNatty K.P.**, Galloway S.M., Wilson T., Smith P., Hudson N.L., O’Connell A., Bibby A.H., Heath D.A., Davis G.H., Hanrahan J.P., Juengel J.L.: 2005a. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol*. 37. 25–38.
124. **McNatty K.P.**, Lawrence S., Groome N.P., Meerasahib M.F., Hudson N.L., Whiting L., Heath D.A., Juengel J.L.: 2005b. Oocyte signalling molecules and their effects on reproduction in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 18(4). 403–412.

125. **McNeilly A. S.**, Picton H. M., Campbell B. K., Baird D. T.: 1991. Gonadotropic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 43. 177-186.
126. **Medan M. S.**, Watanabe G., Sasaki K., Groome N. P., Sharawy S., Taya K. 2005.: Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *J. Reprod. Dev.* 51. 455-463.
127. **Mihm M.**, Austin E.J., Good T.E., Ireland J.L, Knight P.G., Roche J.F., Ireland J.J.: 2000. Identification of potential intra-follicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod.* 63. 811–819.
128. **Mitan A., Grzesiak M.**: 2015. Ciałko żółte – mały gruczoł o wielkim znaczeniu. *Kosmos.* 64(2). 247-259.
129. **Moenter S.M.**, Brand R.M., Midgley A.R., Karsch F.J.: 1992. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology.* 130. 503–510.
130. **Mondal S.**, Prakash B.S., Palta P.: 2004. Peripheral plasma FSH concentration in relation to expression of estrus in Sahiwal cattle (*Bos indicus*). *Indian J Physiol Pharmacol.* 48(2). 245-250.
131. **Moore R.K.**, Shimasaki S.: 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol.* 234. 67-73.
132. **Murphy B. D.**: 2000. Models of luteinization. *Biol. Reprod.* 63. 2–11.
133. **Murphy B. D.**, Gévry N., Ruiz-Cortés T., Côté F., Downey B. R., Sirois J.: 2001. Formation and early development of the corpus luteum in pigs. *Reprod.* 58. 47–63.
134. **Murphy B. D.**: 2004. Luteinization. *The Ovary.* Elsevier Inc. 185–200.
135. **Nandi S.**, Girish Kumar V., Manjunatha B.M., Gupta P.S.P.: 2007. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Develop Growth Differ.* 49. 61-66.
136. **Nath R.**, Mahanta N., Deka S., Islam M.: 2014. Biochemical characterization of preovulatory and cystic ovarian follicular fluid of sow. *Veterinary World.* 7(10). 895-898.
137. **Nilsson E.E., Skinner M.K.**: 2009. Progesterone Regulation of Primordial Follicle Assembly In Bovine Fetal Ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 313(1-2). 9-16.
138. **Nishimoto H.**, Hamano S., Hill G.A., Miyamoto A., Tetsuka M.: 2009. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. *J Reprod Dev.* 55(2). 219-224.
139. **Niswender G. D.**: 1981. Mechanisms controlling luteolysis. *Dynamics of ovarian function.* 153.

140. **Noseir W.M.B.:** 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endocrinol.* 1(50).
141. **Nunez G.,** Benedict M.A., Hu Y., Inohara N.: 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17. 3237–4325.
142. **Opiela J.,** Kątska-Książkiewicz L.: 2005. Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia.* 2(69). 151-162.
143. **Orisaka M.,** Orisaka S., Jiang J.Y., Craig J., Wang Y., Kotsuji F.: 2006. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol.* 20. 2456–2468.
144. **Otsuka F.,** Yao Z., Lee T., Yamamoto S., Erickson G.F., Shimasaki S.: 2000. Bone Morphogenetic Protein-15: Identification of target cells and biological functions. *The Journal Of Biological Chemistry.* 275(50). 39523-39528.
145. **Otsuka F., Shimasaki S.:** 2002. A Novel Function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the Pituitary: Selective Synthesis and Secretion of FSH by Gonadotropes. *Endocrinology.* 143(12). 4938-4941.
146. **Oussaid B.,** Lonergan P., Khatir H., Guler D., Monniaux D., Touze J.L., Beckers J.F., Cognie Y., Mermillod P.: 2000. Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers. *Journal of Reproduction and Fertility.* 118. 137-144.
147. **Pallisco R.,** Bilotta G., Listorti I., Lazzarino G., Tavazzi B., Capozzolo T., Guarino A., Lazzarino G., Mangione R., Bilotta P.: 2020. Bilirubin in follicular fluid: a biochemical signature of female infertility. *Alma Res.*
148. **Palomino J., De Los Reyes M.:** 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology.* 86(6). 1541-1549.
149. **Pan Z.Y.,** Di R., Tang Q.Q., Jin H.H., Chu M.X., Huang D.W., He J.N., Liu Q.Y., Hu W.P., Wang X.Y., Yao Y.X., Liu L., Song C.L.: 2015. Tissue-specific mRNA expression profiles of GDF9, BMP15, and BMP1B genes in prolific and non-prolific goat breeds Czech J. Anim. Sci. 60(10). 452–458.
150. **Pangas S.A., Matzuk M.M.:** 2005. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod.* 73. 582–585.
151. **Parrot J.A., Skinner M.K.:** 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology.* 140(9), 4262-71.

152. **Pascu T.**, Mihai D., Lunca H.: 1969. Concentration du sodium et du potassium dans le liquide folliculaire normal et dans le liquid des kystes folliculaires ovariens, ainsi que dans le sang des mêmes vaches. *Rec.Méd. Vét.* 145. 1283-1291.
153. **Paszkowski T.**, McMaster D., Traub A.I.: 1996. Total iron levels in the preovulatory follicular fluid of *in vitro* fertilization patients. *Med. Sci.Res.* 24. 187–188.
154. **Peng X.**, Yang M., Wang L., Tong C., Guo Z.: 2010. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *J Assist Reprod Genet.* 27. 247-257.
155. **Penitente-Filho J.M.**, Carrascal E., Oliveira F.A., Zolini A.M., Oliveira C.T., Soares I.A.C., Torres C.A.A.: 2014. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for *In vitro* Embryo Production in Cattle. *British Biotechnology Journal.* 4(12). 1305-1312.
156. **Pennetier S.**, Uzbekova S., Perreau C., Pappillier P., Mermillod P., Dalbies-Tran. R.: 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocyte and preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 71. 1359-1366.
157. **Perret B.P.**, Parinaud J., Ribbes H., Moatti J.P., Pontonnier G., Chap H., Douste-Blazy L.: 1985. Lipoprotein and phospholipid distribution in human follicular fluids. *Fertil Steril.* 43. 405–409.
158. **Persani L.**, Rossetti R., Di Pasquale E., Cacciatore Ch., Fabre S.: 2014: The fundamental role of *bone morphogenetic protein 15* in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reproduction Update.* 20(6). 869–883.
159. **Phoophitphong D.**, Srisuwatanasagul S., Tummaruk P.: 2016. Immunohistochemical Localization of Luteinizing Hormone Receptor in the Cyclic Glit Ovary. *Journal of Veterinary Medicine Anatomia, Histologia, Embryologia.* 46(1). 94-100.
160. **Pokorska J.**, Kułaj D., Ormian M.: 2012. Przyczyny brakowania krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej użytkowanych w fermie towarowej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego.* 8 (2). 17-24.
161. **Price C.A.**, Carrière P.D., Bhatia B., Groome N.P.: 1995. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 103(1). 63-68.
162. **Quintal-Franco J.A.**, Kojima F.N., Melvin E.J., Lindsey B.R., Zanella E., Fike K.E., Wehrman M.E., Clopton D.T., Kinder J.E.: 1999. Corpus Luteum Development and Function in Cattle with Episodic Release of Luteinizing Hormone Pulses Inhibited in the

- Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle. *Biology Of Reproduction*. 61. 921-926.
- 163.**Rajakoski E.**: 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol Suppl.* 34(52). 1-68.
 - 164.**Raju G.A.**, Chavan R., Deenadayal M., Gunasheela D., Gutgutia R., Haripriya G., Govindarajan M., Patel N.H., Patki A.S.: 2013. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *J Hum Reprod Sci.* 6(4). 227–234.
 - 165.**Rahe C. H.**, Owens R. E., Fleeger J. L., Newton H. J., Harms P. G.: 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*. 107. 498-503.
 - 166.**Ray D.E.**: 1961. Effect of exogenous progesterone on reproductive activity in the beef heifer. *Retrospective Theses and Dissertations*. 2416.
 - 167.**Reynolds L.P.**, Killilea S.D., Grazul-Bilska A.T., Redmer D.A.: 1994. Mitogenic Factors of corpora lutea. *Progress in Growth Factor Research*. 5. 159-175.
 - 168.**Reynolds L.P.**, **Redmer D.A.**: 1999. Growth and development of the corpus luteum. *J Reprod Fertil.* 54. 181-191.
 - 169.**Richards J.S.**: 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. 15. 725-751.
 - 170.**Riepsamen A.H.**, Chan K., Lien S., Sweeten P., Donoghoe M.W., Walker G., Fraison E.H.J., W W.A., Walton K.L., Harrison C.A., Ledger W.L., Robertson D.M., Gilchrist R.B.: 2019. Serum concentrations of oocyte-secreted factors BMP15 and GDF9 during IVF and in women with reproductive pathologies. *Endocrinology*. 160(10). 2298-2313.
 - 171.**Rivera G.M.**, **Fortune J.E.**: 2003. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology*. 144(2). 437-446.
 - 172.**Roberts A.B.**, **Sporn M.B.**: 1984. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *The Retinoids*. 209-286.
 - 173.**Roche J.F.**: 1996. Control and regulation of folliculogenesis—a symposium in perspective. *Rev. Reprod.* 1. 19–27.
 - 174.**Rodgers R.J.**, **Irving-Rodgers H.F.**: 2010a. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Society for Reproduction and Fertility*. 139(2). 309-318.

175. **Rodgers R.J.**, Irving-Rodgers H.F.: 2010b. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biology of Reproduction*. 82. 1021-1029.
176. **Santos S.S.D.**, Ferreira M.A.P., Pinto J.A., Sampaio R.V., Carvalho A.C., Silva T.V.G., Costa N.N., Cordeiro M.S., Miranda M.S., Ribeiro H.F.L., Ohashi O.M.: 2013. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology*. 79. 344-350.
177. **Sarhan D.**, Mazny A.E., Taha T., Aziz A., Azmy O., Fakhry D., Torky H.: 2017. Estradiol and luteinizing hormone concentrations in the follicular aspirate during ovum pickup as predictors of in vitro fertilization (IVF) outcome. *Middle East Fertility Society Journal*. 22(1). 27-32.
178. **Sato E.**, Jiang J.Y.: 2001. Follicular development and ovulation in hypothyroid rdw rats. *Molecular Cell Devol Biol Reprod*. 8. 249-256.
179. **Savio J.D.**, Keenan L., Boland M.P., Roche J.F.: 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifres. *J Reprod Fertil*. 83(2). 663-671.
180. **Sawa A.**, **Bogucki M.**: 2009. Długowieczność krów i przyczyny ich brakowania. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*. 5(2). 55-62.
181. **Sawa A.**: 2011. Cechy funkcjonalne i ich rola we współczesnej hodowli bydła. *Przegląd Hodowlany*. 2. 8-13.
182. **Schally, A.V.**, Arimura, A. and Kastin, A.J.: 1971. Isolation, structural determination and synthesis of hypothalamic LH and FSH releasing hormone. *Res. Reprod*. 3. 1.
183. **Schipper I.**, Hop W.C., Fauser B.C.: 1987. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. *J Reprod Fertil*. 80(2). 403-410.
184. **Schweigert F.J.**, Zucker H.: 1988. Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J. Reprod. Fert*. 82. 575-579.
185. **Sharma R.K.**, Vats R., Sawhney A.: 1995. Changes in electrolytes of antral follicles in goat. *Indian Journal of Animal Reproduction*. 16. 18-21.
186. **Shen M.**, Qi C, Kuang Y.P., Yang Y., Lyu Q.F., Long H., Yan Z.G., Lu Y.Y.: 2017. Observation of the influences of diosgenin on aging ovarian reserve and function in a mouse model. *Eur J Med Res*. 22(42).
187. **Simic M.**, **Jovanovic S.**: 1989. Antioxidation mechanisms of uric acid. *J Am Chem Soc*. 111. 5778-5782.

188. **Skrzypczak J.:** 1999. Steroidogeneza w jajniku w fazie wzrostowej cyklu. *Postępy Biologii Komórki*. 26 (12).
189. **Smith M.F., McIntush E.W., Smith G.W.:** 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*. 72. 1857–1872.
190. **Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J.:** 1999. Rozwój zarodków bydłych wyprodukowanych z oocytów uzyskanych metodą OPU. *Med. Weter.* 55. 277-348.
191. **Stankiewicz T., Błaszczuk B., Udała J.:** 2008. Wybrane aspekty dojrzewania oocytów świni w warunkach fizjologicznych i pozaustrojowych. *Medycyna Weterynaryjna*. 64 (4A). 400-403.
192. **Stankiewicz T., Błaszczuk B.:** 2014. Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in follicular cysts, mono- and polyocyte follicles in gilts. *Acta Veterinaria-Beograd*. 64(1). 24-32.
193. **Stankiewicz T.:** 2015. Biochemical composition of the fluid of ovarian cysts and pre-ovulatory follicles compared to the serum in sows. *Tierärztl Prax*. 43. 216-221.
194. **Stankiewicz T., Błaszczuk B.:** 2015. Macroelements compositions of cystic and follicular fluid in ovaries and their relationship to peripheral blood concentration in sows. *Acta Vet-Beograd*. 65. 217-225.
195. **Stankiewicz T., Błaszczuk B.:** 2016. Relationship between the concentration of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in pre-ovulatory follicles, ovarian cysts and serum in sows. *Animal Production Science*. 56(1). 141-146.
196. **Su Y., Wu X., O'Brien M.J., Pendola F.L., Denegre J.N., Matzuk M.M.:** 2004. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol*. 276. 64–73.
197. **Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K., O'Brien M.J., Affourtit J.P., Pangas S.A., Matzuk M.M., Eppig J.J.:** 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 135. 111-121.
198. **Sugiyama R., Fuzitou A., Takahashi C., Akutagawa O., Ito H., Nakagawa K., Sugiyama R., Isaka K.:** 2010. Bone morphogenetic protein 2 may be a good predictor of success in oocyte fertilization during assisted reproductive technology. *Hum Cell*. 23. 83–88.

199. **Sun Y.L.**, Zhang J., Ping Z.G., Wang C.Q., Sun Y.F., Chen L., Li X.Y., Li C.J., Zhu X.L., Liu Z., Zhang W., Zhou X.: 2012. Relationship Between Apoptosis and Proliferation in Granulosa and Theca Cells of Cystic Follicles in Sows. *Reprod Dom Anim.* 47. 601-608.
200. **Sunderland S.J.**, Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J.: 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility.* 101. 547–555.
201. **Szołtys M.**: 1992. Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków. *Postępy Biologii Komórki.* 26(12).
202. **Szołtys M.** 1999. Funkcja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. *Postępy Biologii Komórki.* 26 (12).
203. **Ślebodziński A.B.**: 2005. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid: the enigma of the thyroid ovary interaction. *Dom Anim Endocrinol.* 29. 97-103.
204. **Tabatabaei S., Mamoei M.**: 2011. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. *Comp Clin Pathol.* 20. 441-445.
205. **Thangavel A., Nayeem M.**: 2004. Studies on certain biochemical profile of the buffalo follicular fluid. *Indian Vet J.* 81. 25-27.
206. **Tilly J.L.**, Kowalski K.I., Johnson A.L., Hsueh A.J.W.: 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 129. 2799–2801.
207. **Tomac J.**, Cekinovic D., Arapovic J.: 2011 Biology of the Corpus luteum. *Period. Biol.* 113(1). 43-49.
208. **Uehara S.**, Naganuma T., Tsuiki A., Kyono K., Hoshiai H., Suzuki M.: 1985. Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization. *Obstet Gynecol.* 66. 19-23.
209. **Vanluchene E.**, Hinting A., Dhont M., De Sutter P., Van Maele G., Vandekerckhove D.: 1991. Follicular fluid steroid levels in relation to oocyte maturity and in vitro fertilization. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 38. 83-87.
210. **Von Wald T.**, Monisova Y., Hacker M.R., Yoo S.W., Penzias A.S., Reindollar R.R., Usheva A.: 2009. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril.* 93(7). 2354-2361.
211. **Weck J.**, Fallest P.C., Pitt L.K., Shupnik M.A.: 1998. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 1998. 12. 451–457.

212. **Wehrman M.E.**, Welsh T.H., Williams G.L.: 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod.* 45. 514-522.
213. **Westwood C. T.**, Lean I.J., Kellaway R.C.: 1998. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: A quantitative review. Part 2. Effect of dietary protein on reproductive performance. *N. Z. Vet. J.* 46. 123–130.
214. **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.
215. **Wu Y.T.**, Tang L., Cai J., Lu X.E., Xu J., Zhu X.M., Luo Q., Huang H.F.: 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod.* 22. 1526– 1531.
216. **Xia P.**, Younglai E.V.: 2000. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *J Reprod Fertil.* 118. 229-233.
217. **Xu Z. Z.**, Garverick H. A., Smith G. W., Smith M. F., Hamilton S. A., Youngquist R. S.: 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53. 951-957.
218. **Yamada M.**, Hirakushi K., Inoue K., Horiuchi T., Sakai J., Okada T., Sugie I.: 1998. Magnesium as a regulator of thrombin formation in bovine ovarian follicular fluid. *J Vet Med Sci.* 60. 837-842.
219. **Yang M.Y., Rajamahendran R.**: 2000. Morphological and Biochemical Identification of Apoptosis in Small, Medium, and Large Bovine Follicles and the Effects of Follicle Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Spontaneous Apoptosis in Cultured Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 62(5). 1209- 1217.
220. **Yoshino O.**, McMahon H.E., Sharma S., Shimasaki S.: 2006. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(28). 10678–10683.
221. **Zelevnik A.J.**, Hutchinson J.S., Schuler H.M.: 1987. Passive immunization with anti-oestradiol antibodies during the luteal phase of the menstrual cycle potentiates the perimenstrual rise in serum gonadotrophin concentrations and stimulates follicular growth in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil.* 80(2). 403-410.

222. **Zeleznik A.J., Fairchild-Benyo D.:** 1994. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in progestins higher primates. *The Physiology of Reproduction*. 751.
223. **Żarnecki A.,** Norman H.D., Jamrozik J.: 1997. Lifetime yield and herd life for crosses of Friesian strains in Poland. *J Anim Feed Sci*. 6(1). 1-11.

X. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Celem pracy było dokonanie analizy porównawczej w składzie płynu pęcherzyków jajnikowych pomiędzy dużymi pęcherzykami przedowulacyjnymi, dominującymi oraz atretycznymi. W analizie uwzględniono hormony steroidowe (P4, E2), białko morfogenetyczne kości-15 (BMP-15), hormon folikulotropowy (FSH), glukozę, białko, mocznik, kreatyninę, kwas moczowy, składniki lipidowe i jonowe. Postanowiono też zbadać wpływ wieku krów na skład płynu pęcherzykowego oraz określić zależności pomiędzy stężeniem badanych czynników w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy krów.

W pracy postawiono następującą hipotezę badawczą: stężenia hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

Doświadczenie wykonano na 72 krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, odmianie czarno-białej (wiek 2-18 lat). Od każdej krowy do badań pobrano poubojowo po jednym jajniku, na którym znajdował się duży pęcherzyk o średnicy od 12 do 20 mm. W uzyskanych próbkach płynu pęcherzykowego i surowicy oznaczono stężenie białka morfogenetycznego kości-15 (BMP-15), hormonu folikulotropowego (FSH), progesteronu (P4) i 17- β -estradiolu (E2). Oznaczano również kolorymetrycznie stężenie glukozy (GLU), białka całkowitego (TP), kwasu moczowego (URIC), kreatyn (CREA), mocznika (UREA), bilirubiny całkowitej (TBIL), całkowitego cholesterolu (CHOL), HDL-cholesterolu (HDL), LDL-cholesterolu (LDL), trójglicerydów (TAG), fosforu (P), wapnia (Ca), magnezu (Mg) i żelaza (Fe). Metodą potencjometryczną oznaczano stężenie sodu (Na).

W niniejszej pracy zanotowano wyższe stężenie progesteronu i niższe 17- β -estradiolu w pęcherzykach atretycznych w porównaniu do pęcherzyków przedowulacyjnych i dominujących ($P < 0.01$). Stwierdzono też różnice zależne od wieku. Dotyczyły one zarówno stężeń hormonów steroidowych w pęcherzykach, jak i surowicy. Istotne różnice wykazano także w stężeniu BMP-15 i FSH. W pęcherzykach krów najstarszych stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż u krów młodszych ($P < 0.01$). Ponadto w pęcherzykach atretycznych u krów najstarszych stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących ($P < 0.01$). Między stężeniem pęcherzykowego BMP-15 a wiekiem krów wykazano dodatnią korelację ($r=0,45$; $P < 0.01$). Podobną zależność stwierdzono również w stężeniu tego czynnika w surowicy. Stężenie FSH w pęcherzykach krów starszych było

istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów młodszych, a korelacja między wiekiem a stężeniem tego hormonu była dodatnia ($r=0,62$; $P < 0.01$).

W pracy wykazano również istotne różnice w składzie biochemicznym. Różnice zależne od statusu pęcherzyka dotyczyły przede wszystkim glukozy, cholesterolu HDL oraz fosforu. Najwyższe stężenie glukozy oraz fosforu zanotowano w pęcherzykach dominujących ($P < 0.05$). Natomiast stężenie cholesterolu HDL było najwyższe w pęcherzykach atretycznych ($P < 0.05$). Ponadto wykazano zależności między stężeniem badanych składników w pęcherzykach jajnikowych a ich stężeniem surowicy oraz wiekiem krów.

Na podstawie przeprowadzonych badań, wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają hipotezę badawczą, że stężenie hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

XI. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The study objective was a comparative analysis on the composition of ovarian follicles between large pre-ovulation, dominant and atretic follicles. The analysis included steroid hormones (P_4 , E_2), bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), follicle-stimulating hormone (FSH), glucose, protein, urea, creatinine, uric acid, lipid and ion components. What is more, the impact of cow age on the composition of follicular fluid and the relationship between the concentration of the tested factors in follicular fluid and their concentration in cow serum were tested.

The following research hypothesis was established in the study: concentration of steroid hormone, follicle-stimulating hormone, bone morphogenetic protein and biochemical composition of follicular fluid depend on the follicle status and cow age.

The experiment was carried out on 72 Black-and-White Holstein-Friesian cows (aged 2-18). One ovary was collected from each cow after slaughter, containing a large follicle measuring 12 to 20 mm. Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), follicle-stimulating hormone (FSH), progesterone (P_4) and 17- β -estradiol (E_2) were determined in the obtained follicular fluid. What is more, concentrations of glucose (GLU), total protein (TP), uric acid (URIC), creatines (CREA), urea (UREA), total bilirubin (TBIL), total cholesterol (CHOL), HDL-cholesterol (HDL), LDL-cholesterol (LDL), triglycerides (TAG), phosphorus

(P), calcium(Ca), magnesium (Mg) and iron (Fe) were determined via colorimetry. Sodium (Na) concentration was determined via potentiometric method.

The present study demonstrated that the higher concentration of progesterone and lower of 17- β -estradiol was demonstrated in atretic follicles compared to pre-ovulatory and dominant follicles ($P < 0.01$). Differences depending on age were also found. They concerned both follicle and serum concentrations of steroid hormones. Significant differences were also shown in the concentration of BMP-15 and FSH. In the follicles of the oldest cows, the BMP-15 concentration was significantly higher than in the younger cows ($P < 0.01$). Moreover, in atretic follicles in the oldest cows, the BMP-15 concentration was significantly higher than in pre-ovulatory and dominant follicles ($P < 0.01$). There was a positive correlation between the follicular BMP-15 concentration and the age of the cows ($r = 0.45$; $P < 0.01$). A similar relationship was also found in the concentration of this factor in the serum. The concentration of FSH in the follicles of older cows was significantly higher than in the follicles of younger cows, and the correlation between age and concentration of this hormone was positive ($r = 0.62$; $P < 0.01$).

The study also showed significant differences in the biochemical composition. The differences depending on the status of the follicle concerned mainly glucose, HDL cholesterol and phosphorus. The highest concentration of glucose and phosphorus was recorded in the dominant follicles ($P < 0.05$). In contrast, HDL cholesterol was highest in atretic follicles ($P < 0.05$). Moreover, the relationship between the concentration of the tested components in the follicles and their serum concentration and the age of the cows was demonstrated.

On the basis of the conducted research, the results obtained in this study confirm the research hypothesis that the concentration of steroid hormones, follicle-stimulating hormone, bone morphogenetic protein and biochemical components in the ovarian follicle fluid differs depending on the status of the follicle and the age of the cows.