# Study on changes some metabolites composition of ovarian follicular fluid in relation to follicular size in local Buffaloes

# دراسة التغيرات في بعض المركبات الأيضية في السائل الجريبي المبيضي وعلاقتها بحجم الجريبة في الجاموس المحلي

د. هاشم مهدي الربيعي ماهر عباس حسين المعموري
جامعة الفرات الأوسط التقنية / الكلية التقنية - المسيب
Drhashem48@yahoo.com

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

**المستخلص**

هدف هذه الدراسة لتقدير بعض المركبات الأيضية للسائل الجريبي المبيضي من جريبات مختلفة الأحجام وعلاقتها بحجم الجريبة في الجاموس المحلي . جُمعت المبايض (80) مبيض من (40) أنثى جاموس غير حامل والتي ذبحت في مجازر محافظة بابل للفترة من آذار إلى آب 2014. نُقلت المبايض إلى المختبر خلال ساعتين بعد الذبح. سُحب السائل الجريبي من الجريبات الصغيرة (3-5 ملم) ، الجريبات المتوسطة (6-10 ملم) والجريبات الكبيرة (11-20 ملم)، وخُزن بدرجة (-5) درجة مئوية قبل التحليل. حُللت عينات السائل الجريبي لتقدير الكلوكوز و البروتين الكلي والدهون الثلاثية والكوليستيرول الكلي ، و باستعمال العدة التجارية الجاهزة. بينت النتائج أرتفاع معدل تركيز الكوليستيرول الكلي والكلوكوز معنوياً ($P<0.05$) في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة عن السائل الجريبي الموجود في الجريبات الصغيرة، بينما أنخفض معنوياً ($P<0.05$) معدل تركيز الدهون الثلاثية والبروتين الكلي في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة عن الموجود في الجريبات الصغيرة.

## Abstract

The aim of this study was to estimate the some metabolites composition of ovarian follicular fluid from different sized follicles and it's relationship with follicular size in local buffaloes. Ovaries were collected (80 ovary) from 40 non-pregnant female buffaloes which slaughtered at abattoirs of province of Babylon during the period from March to August 2014. The ovaries were transported to the laboratory within 2 hours post slaughter. Follicular fluid was aspirited from small (3-5mm), medium (6-10mm) and large (11-20mm) follicles and stored at -5ºC prior to assay. The follicular fluid samples were analyzed for glucose, total protein, triglycerides and total cholesterol, , and, using commercially available kits. The result showed that the mean concentration of cholesterol and glucose in follicular fluid of large follicles were significantly higher ($P<0.05$) than the follicular fluid in small follicles. While the mean concentration of triglycerides and total protein in ovarian follicular fluid of large follicles were significantly lower ($P<0.05$) than follicular fluid in small follicles.

**المقدمة**

يتكون السائل الجريبي المبيضي في الجاموس من مواد تُنتج موضعياً اثناء الفعاليات الايضية لخلايا الجريبة وجزء منه يترشح من مصل الدم، لذا فأن تركيبة السائل الجريبي يكون مشابهاً ولكن ليس مطابقاً مع بلازما الدم (1). يُشكل السائل الجريبي الظروف الكيموحيوية للبويضة قبل الاباضة (2). يحتوي السائل الجريبي المبيضي على المواد الايضية والهرمونية والدهون (3) وعوامل النمو والتثبيط (4) وعدد من العناصر والأملاح (5). تنمو وتنضج الجريبة والبويضة بظروف كيموحيوية مرتبطة بتغير حجم الجريبة من صغيرة إلى كبيرة وأن كل هذه المواد الموجودة في السائل الجريبي ذات علاقة بنضج البويضة (6). يمتلك السائل الجريبي وظائف مختلفة منها أبقاء الانقسام الخيطي للبويضة في حالة سكون (7)، وحماية البويضة من التحلل اثناء الاباضة (8)، ورفع جاذبية قبعة النطفة ويؤثر في نضج البويضة واخصابها (9). بينت عدة دراسات خارج جسم الحيوان بأن المواد الأيضية مثل الكلوكوز ربما تؤثر على أكتمال بيوض الابقار ونضجها النهائي وبعد اخصابها ونموها إلى مرحلة الكيس الأرومي (blastocyst) (10و 11 و12). تحدث التغيرات المعنوية في المواد الايضية خلال مرحلة نمو الجريبة بفعل النشاط الايضي وبالأشتراك مع خواص حواجز جدار الخلية (13). تبين دراسة مكونات السائل الجريبي المبيضي صورة واضحة عن مدى احتياج الجريبة والبويضة لمختلف المواد الايضية والايونية والهرمونية والدهنية والانزيمات والعناصر والاملاح وعوامل النمو والتثبيط وذلك

لبيان الاحتياجات الاساسية الضرورية لاستمرار نموها ونضجها ومن ثم ينعكس هذا على انضاج البويضات واخصابها مختبرياً. قبل تسليط الضوء على احتمال تأثير التغيرات الايضية على نوعية الجريبة والبويضة فأنه من الضروري تحديد التراكيز الفسلجية للمواد الايضية الشائعة في السائل الجريبي من جريبات مختلفة الأحجام، وبناءً على ما تقدم فهدف هذه الدراسة تقدير تراكيز بعض المواد الايضية (الكلوكوز والبروتين الكلي والدهون الثلاثية والكوليستيرول ) وعلاقتها بتغير حجم الجريبة لمعرفة احتياج الجريبة والبويضة من هذه المركبات في مختلف مراحل نموها ونضجها.

## المواد وطرائق العمل

### 1. جمع وفحص المبايض

أنجزت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الإنتاج الحيواني في الكلية التقنية / المسيب (50 كم شمال بابل) للمدة من آذار إلى آب 2014 ، جُمعت المبايض (80 مبيض) من 40 أنثى جاموس غير حامل والتي ذبحت في مجازر محافظة بابل وكانت بحالة سليمة من الناحية الصحية قبل الذبح وفُحصت القناة التناسلية بعد الذبح وكانت طبيعية وخالية من التشوهات الخلقية. وضعت المبايض في حقيبة بلاستيكية تحتوي على محلول الملح الفسلجي الطبيعي بتركيز 0.9% ، وأدخلت الحقيبة في صندوق مبرد ونقلت إلى المختبر خلال ساعتين بعد الذبح ، غُسلت المبايض في المختبر مرتين بالمحلول الملح الفسلجي الطبيعي المبرد ووضعت على أوراق التنشيف لتجفيفها، أزيلت الأنسجة العالقة عن المبايض وقيست جريبات كل مبيض بواسطة القَدِمة (Vernier calipers) ، وصُنفت الجريبات طبقاً لهذه القياسات إلى ثلاثة مجاميع صغيرة ذات قطر (3-5 ملم) ومتوسطة ذات قطر(6-10 ملم) وكبيرة ذات قطر (11-20 ملم). سُحب السائل الجريبي من كل جريبة بأستعمال محاقن طبية معقمة نبيذة (disposable) ذات أحجام 1 و5 و10 مليلتر وأبر ذات قياس 23 و29 (gauge23&29). جُمعت محتويات السائل الجريبي من كل صنف ولكل حيوان على حدة، ثم خلط السائل الجريبي المأخوذ من الجريبات ذات الصنف الواحد والتي جمعت في نفس اليوم (في كل عملية جمع) ووضع في أنابيب مخروطية (Centrifuge tube) ذات حجم 10 مليلتر لمدة 10 دقيقة لكي يستقر ، بعد ذلك وضعت الأنابيب بجهاز النبذ المركزي(Centrifuge-Hettich-Germany) وبسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ، بعدها سُحب السائل الجريبي الطافي بواسطة ماصة معقمة وحفظ بدرجة (-5) مئوية لحين التحليل.

### 2. التحاليل الكيموحيوية

حُللت عينات السائل الجريبي لتقدير المواد الأيضية (الكلوكوز و البروتين الكلي والدهون الثلاثية والكوليستيرول الكلي) باستعمال العدة التجارية المناسبة والمتوفرة، قيست تراكيز الكوليستيرول والدهون الثلاثية باستعمال عدة تجارية من شركة (Cromatest Kit, Spain) من خلال الطريقة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer–PD303- Germany) وبطول موجي 446 و 520 نانوميتر بالتتابع وقيس تركيز البروتين الكلي بأستعمال عدة تجارية من شركة (Biochisk Kit, USA) ومن خلال الطريقة الضوئية وبواسطة جهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 550 نانوميتر، وقيس تركيز الكلوكوز باستعمال عدة تجارية من شركة (Randox Kit, England) ومن خلال الطريقة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 510 نانوميتر. أنجزت جميع القياسات طبقاً للجهة المصنعة للعدة التجارية.

### 4. التحليل الإحصائي

أستعمل التصميم العشوائي الكامل (Completely randomized design) لدراسة أهمية التباين أو الأختلاف في معدل القيم (±SE) من تراكيز مختلف المركبات الايضية للسائل الجريبي في الجريبات الصغيرة والمتوسطة الكبيرة ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات بأختبار متعدد المديات (Multiple Range test) (14)، وأستعمل البرنامج الأحصائي في التحليل الإحصائي للبيانات (15) .

## النتائج والمناقشة :

يتضح من نتائج الجدول (1) وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدل تركيز الكلوكوز في السائل الجريبي المبيضي مع تغير حجم الجريبة، إذ بلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة 47.23±2.02 ملغم/ديسيلتر وفي الجريبات المتوسطة 62.71±4.62 ملغم/ديسيلتر وفي الجريبات الكبيرة 77.72 ±6.02 ملغم/ديسيلتر، ان الزيادة المعنوية للكلوكوز مع زيادة حجم الجريبة ربما يعزى لكثرة أيضه واستهلاكه من قبل العدد المتزايد من الخلايا الحبيبية في الجريبات الكبيرة مقارنة مع الصغيرة (16 و 17)، او زيادة نفاذية الحواجز بين الجريبة والدم خلال نموها ولذلك يترشح مزيداً من الكلوكوز الى السائل الجريبي من مصل الدم (18). يلعب الكلوكوز دوراً مهماً في الأيض المبيضي بسبب اعتباره المصدر الرئيس للطاقة وذلك لتأيضه خلال المسار اللاهوائي الذي يؤدي إلى تكوين اللاكتيت (19). إن انخفاض أو زيادة معدل تركيز الكلوكوز في الأوساط الزرعية لتنمية ونضج البويضة خارج جسم الحيوان له تأثيراً مؤذياً وضاراً على نمو خلايا الجريبة ونضج البويضة وعدم اكتمال نضج النواة وتمديد الخلايا الركمية (Cumulus cells) (20). تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة (21) ولا تتفق مع (22) إذ بينوا نقصان تركيز الكلوكوز مع زيادة حجم الجريبة في دراستهم على الجاموس ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع جاء به (7) وتختلف مع (17) إذ بين عدم وجود اختلاف معنوي في معدل تركيز الكلوكوز في الجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة في الأبقار وتتفق مع ما ذكره (23 و 24) في دراستهم على المعز و(16) في دراستهم على الأغنام، و مع ما ذكره (25 و26) في دراستهم على الأبل. فيما يخص معدل تركيز البروتين الكلي بينت نتائج الجدول (1) وجود اختلاف غير معنوي في معدل تركيزه في السائل الجريبي المبيضي بين الجريبات الصغيرة والمتوسطة وبلغ في الجريبات الصغيرة 52.24±0.98 غرام/ديسيلتر والجريبات المتوسطة

1.27±57.07 غرام/ديسيلتر، في حين انخفض معنوياً (P<0.05) في الجريبات الكبيرة مقارنة مع المتوسطة والصغيرة وبلغ 0.22±40.06 غرام/ديسيلتر، تلعب محتويات السائل الجريبي من البروتين الكلي دوراً مهماً في نمو وتطور ونضج البويضة (23). تحتاج الجريبات في بداية تكوينها للبروتين الكلي لبناء الطبقات المتعددة للخلايا الحبيبية وخلايا القراب (Theca cells) التي تحيط بالبويضة لذلك تَسحب الجريبات كمية وفيرة من البروتين من مصل الدم ويزداد تركيزه في الجربيات ، وعندما يكتمل بناء الخلايا في الجربيات الكبيرة يصبح احتياجها للبروتين اقل نسبياً (8) . تُفرز الشحوم البروتينية من الخلايا الحبيبية للجريبة في عملية تكوين الجريبات والانقسام الخيطي قبل الاباضة وتكوين الاوعية الدموية الجديدة للجريبة لذا سوف تزداد في بداية تكوين الجريبة بالتالي تكثر في السائل الجريبي (27) ، وربما يعزى قلة تركيز البروتين الكلي في الجريبات الكبيرة لزيادة انتاج الهرمونات الشحمية والتي تحتاج الى البروتينات الرابطة لنقل هذه الهرمونات (28) . أن الارتباط العالي بين محتويات البروتين الكلي في السائل الجريبي ومصل الدم ، يوضح الجزء الاساسي من محتويات البروتين في السائل الجريبي منشأه من مصل الدم (29). تتفق نتائج هذه الدراسة مع (30و31) ولا تتوافق مع (21) إذ بينوا ثبوت تركيز البروتين الكلي بين مختلف احجام الجريبات ولا تتوافق هذه الدراسة مع (22) إذ بينوا زيادة تركيز البروتين الكلي مع زيادة حجم الجريبة في دراستهم على الجاموس وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ماجاء به (32) في دراستهم على الأبقار، و مع ما ذكره (33) وتختلف مع دراسة (34) في دراستهم على المعز.

جدول (1) معدل (M±SE) تركيز المكونات الأيضية في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة في الجاموس المحلي

| Follicles / Metabolites | Small follicles (3-5mm) | Medium follicles (6-10mm) | Large follicles (11-20mm) |
|---|---|---|---|
| Glucose (mg/dl) | 47.23±2.02 C | 62.71±4.62 B | 77.72±6.02 A |
| Total protein (mg/dl) | 52.24±0.98 A | 57.07±1.27 A | 40.06±0.22 B |
| Triglycerides (mg/dl) | 45.26±4.24 A | 35.27±3.22 B | 27.32±2.72 C |
| Total Cholesterol (mg/dl) | 71.23±4.23 C | 80.26±3.42 B | 90.72±4.32 A |

القيم التي تحمل حروفاً مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنوياً (P<0.05)

M : Means
SE: standard error

يتضح من نتائج الجدول (1) انخفاضاً معنوياً (P<0.05) في معدل تركيز الدهون الثلاثية في السائل الجريبي المبيضي مع كبر حجم الجريبة ، اذ بلغ معدل تركيزها في الجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة 45.26±4.24 و 35.27±3.22 و 27.32±2.72 ملغم/ديسيلتر بالتتابع. الدهون الثلاثية عبارة عن شكل خزين دهني وعند تحليلها مائياً تُنتِج جزئية واحدة من الكليسيرول (glycerol) وثلاثة جزئيات من الاحماض الدهنية وطاقة تحتاجها الجريبة لنموها (25) ، ان سبب ارتفاع تركيز الدهون الثلاثية في الجريبات الصغيرة ربما كونها المصدر البديل للطاقة لخلايا الجريبة (17) ، والسبب الآخر لارتفاع تركيزها في الجربيات الصغيرة هو عدم مقدرة جزيئات الدهون الثلاثية المرور أو العبور بواسطة جزيئات الدهون واطئة الكثافة (VLDL) الى داخل الجريبة خلال هذه الحواجز (35) ، وان استمرار وسرعة استهلاكها قد يؤدي إلى انخفاض تركيز الدهون الثلاثية في الجريبات الكبيرة مقارنة مع الجريبات الصغيرة (36،37). تتفق هذه الدراسة مع ما جاء به (30) في الجاموس وتتوافق هذه الدراسة مع ما جاء به (17 و38) في دراستهم على الأبقار، ومع (39 و25 و26) في دراستهم على الابل ، ومع (16) في دراستهم على الاغنام. بينت نتائج هذه الدراسة أرتفاعاً معنوياً (P<0.05) في معدل تركيز الكوليسيترول الكلي في السائل الجريبي المبيضي مع زيادة حجم الجريبة إذ وصل معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة 71.23±4.23 ملغم/ديسيلتر والجريبات المتوسطة 80.26±3.42 ملغم/ديسيلتر وبلغ في الجريبات الكبيرة 90.72±4.32 ملغم/ديسيلتر (جدول 1) . يُعد الكوليستيرول المادة الاولية لتصنيع الهرمونات الشحمية (Steriod) ويحتوي السائل الجريبي فقط على البروتينات الدهنية عالية الكثافة High-Density Lipoprotein (HDL) لذلك فان الخلايا الحبيبية الوعائية للجريبات تعتمد على الكوليستيرول المترشح من هذه الدهون المشتقة من بلازما الدم خلال عبورها الغشاء القاعدي للخلايا الحبيبية (34) ولا تعتمد على جزيئات البروتينات واطئة الكثافة (LDL) وذلك لامتلاكها جزيئات كبيرة لا تستطيع المرور ضمن الحواجز التي تفصل بين الدم والجريبة (24) . ان التركيز الواطيء للكوليستيرول في السائل الجريبي للجريبات الصغيرة ربما يعزى الى زيادة احتياج الخلايا الحبيبية لهذه الجريبات للكوليستيرول اثناء نموها وتكاثرها، لذلك يُسحب من السائل الجربي فتنخفض نسبته في الجريبات الصغيرة ، وعندما تنمو وتكبر الجربية يقل تكاثر خلاياها الحبيبية وتبدأ بطرح الكوليستيرول في السائل الجريبي لاستعماله في تصنيع الهرمونات الشحمية (40) ، او ربما تعزى الزيادة في الكولستيرول في الجريبات الكبيرة الى زيادة نفاذية جدار هذه الجريبات مما تؤدي لرفع أو زيادة جزيئات الدهون عالية الكثافة في السائل الجريبي (32) ، او امتلاك الخلايا الحبيبية خزين كبير من خلات الكوليستيرول والتي ربما تجهز

الكوليستيرول الحر لهرمون الحمل او عملية تصنيع الهرمونات الشحمية (41). تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره (21) ولا تتوافق مع (28و22) في دراستهم على الجاموس. وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره (40) واختلفت مع دراسة (38) في الأبقار، واتفقت نتائج هذه الدراسة ايضاً مع ما ذكره (33 و34) في دراستهم عن المعز، واختلفت مع دراسة (42) إذ بين أن المستوى المنخفض للكوليسيترول في الجريبات الكبيرة تشير إلى تحول الكوليسيترول إلى الهرمونات الشحمية(Steroids) ، واتفقت مع (16) في دراستهم على الأغنام، ودراسة (26 و 43) واختلفت مع (25 و 44 و 45) في دراستهم على الأبل.

نستنتج من نتائج هذه الدراسة أن خلايا الجريبة تنمو وتنضج في ظروف ايضية متغيرة التركيز مع تغير حجم الجريبة ، وكذلك معرفة احتياج الحريبة والبويضة من المركبات الايضية عند إنضاجها خارج الجسم في إناث الجاموس المحلي .

**المصادر :**


1. **Nishimoto, S.; Glen, A.H.; Akio, M. and Safumi, T. (2009).** Classification of Bovine follicles based on the concentration of steroid , glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. J. Rep; 2:55-62.
2. **Jozwik, M.; Woezynski, S.; Jozwik, M. and Szamatowicz, M. (2001).** Ammonia concentration in human preovulatoy ovarian follicles. Eur. J. Obstet. Gynecol. and Reprod; Biol. 94: 256-260.
3. **Nandi, S.; Girish Kumar, V.; Manjunatha, B.M.; Ramesh, H.S. and Gupta, P.S.P.(2008).** Follicular fluid concentrations of glucose lactate and pyruvate in buffalo and sheep, and their effects on cultured oocytes, granulosa and cumulus cells. Thriogenology, 69:186-196.
4. **Arunakumari, G.; Vagdevi, R.; Rao, B.S.; Naik, B.R.; Naidu, K.S.; Suresh, K.R.V. and Rao, V.H.(2007).** Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preanteral follicles. Small Rumin. Res; 70: 93-100.
5. **Sharma, R. K. and Vasta, R. (1998).** Biochemical changes in trace elements in antral follicles of goats. Indian. J. Anim. Sci; 68: 330- 331.
6. **Iwata, H.; Inouo, J.; Kimura, K.; Kuge, T.; Kuwayama, T. and Mouji, Y. (2006).** Comparison between the characteristics of the follicular fluid and development competence of bovine oocytes. Anim. Reprod. Sci; 19 : 215-223.
7. **Iwata, H.; Hashimoto, S.; Ohota, M.; Kimura, K.;Shibano,K. and Miyake, M. (2004).** Effects of follicls size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competental of bovine oocytes. Reprod; 127:159-164.
8. **Chang, A.S.; Dale, A.N.; and Moley, K.H.(2005).** Maternal diabetes adversely affected preovulatory oocyte maturation,development,and granulosa cell apoptosis. Endocrinol; 146:2445-2453.
9. **Galli, C.; Duchi, R.; Crotti, G.; Turini, P.; Ponderato, N .;Colleoni, S.; Lagutina, I. and Lazzari, G.(2003).** Bovine embryo technologies. Theriogenology, 59: 599–616 .
10. **Hashimoto, S.; Minami, N.; Yamada, M. and Imai, H.(2000)**. Excessive concentration of glucose during in vetro maturation impairs the development competence of bovine oocytes after in vetro fertilization: revelance to intracellular reactive oxygen species and glutathions contents. Mol. Reprod. Dev; 56: 520-526.
11. **Armstrong, D.G.; McEvoy, T.G.; Baxter, G.; Robinson, J.J.; Hogg, C.O.; Woad, K.J.; Webb, R.; and Sinclair, K.D. (2001)**. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vtro: association with the ovarian insuline-like growth factor system. Biol. Reprod. 64, 1624-1632.
12. **De Wit, A.A.C.; Cesar, M.L.F. and Kruip, T.A.M. (2001).** Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. J. Dairy Sci. 84, 1800-1804.
13. **Gosden, R.G.; Hunter, R.H.F.; Telfer, E.; Torrance, C. and Brown, N.; (1988).** Physiological factors underlying formation of ovarian follicular fluid. J. Reprod. Fertil. 82, 813-825.
14. **Duncan, D.B.(1955).** Multiple Range and Multiple Test. Biometrics.11:1-42.
15. **SAS. (2004).** SAS / STAT Users Guide for Personal Computers. Release 7.0. SAS Institute Inc., Cary,NC., USA. (SAS=Statistical Analysis System).

16. **Nandi, S.; Girish Kumar,V.; Manjunatha, B.M.; and Gupta, P.S.P. (2007).** Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. Journal compilation, Japan's Society of Developmental Biologist. Growth Differ,49: 61- 66.
17. **Leroy, J.L.M.R .; Vanholder, T. and Delanghe, J.R. (2004).** Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different – sized follicles and their relationship to serum in dairy cows. Anim. Reprod. Sci; 80 : 201 – 211.
18. **Ying, Sh.; Wang, Z.; Wang, Ch.; Nie, H.; He, D.; Jia, R.; Wu,Y.; Zhou, Z.; Yan, Y.; Zhang, Y. and Wang, F.(2011).** Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. Reproduction, 142: 699-710.
19. **Boland, N.I.; Humpherson, P.G.; Lesse, H.J. and Gosden, R.G., (1994).** The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vetro. Hum. Reprod; 9:617-623.
20. **Nishimoto, H.; Matsutani, R.; Yamamato, S.; Takahashi, T.; Hayashi, K.G.; Miyamoto, A.; Hamano, S. and Tetsuka, M.(2006).** Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1,3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. Endocrinol, 188:111-119.
21. **Arshad, H.M.; Ahmad, N.; Zia-ur-Rahman, Samad, H.A.; Akhtar, N. and Ali, S. (2005).**Studies on biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes .Pakistan Vet.J.,25:189-193
22. **Alkalby, J.M.A; H. Bushra. F. and Fahad, T.A**. **(2012).** Study on some hormonal and technical constituents of follicular fluid and blood plasma in Buffaloes. Bas. J.Vt. R.s. 11. I. 90-102.
23. **Herrick, J.R.; Lane M.; Grander, D.K.; Behoodi, E.; Memili, E.; Balash, S.; Echelard, Y. and Krisher, R.L. (2006).** Metabolism, protein content and in vitro embryonic development of goat cumulus-oocyte complexes matured with physiological concentrations of glucose and L-lactate Mol. Reprod. Dev, 73:255-266.
24. **Bauchart, D. (1993).** Lipid absorption and transport in ruminants. J. Dairy Sci; 76: 3864-3881.
25. **El-Shahat, K.H.; El-Moaty, A.M. and Moawaed, A.R. (2013).** Follicular fluid composition relation to follicular size in pregnant and non-pregnant dromedary camels (Camelus dromedaries). Anim. Reprod; 10:16-23.
26. **Albomohsen, H.; Mamouei, S.; Tabatabaei, S. and Fayazi, J.(2011).** Metabolite composition variations of follicular fluid and blood serum in Iranian dromedary camels during the peak breeding season. J. Anim. and Ver;3: 327-331.
27. **Kiker, W.; A.; Salisbury, M.W.; Green, B. and Engdahl, G.R.(2005).** Effects of Protein and Energy Feeding on Ovine Oocyte Production and Developmental Capcity .Proceeding , Western Section , American Society of Animal Science. 56.
28. **Hunter, M.G.; Robinson, R.S.;Mann,G.E. and Webb, R.(2004).** Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species.Anim. Reprod. Sci;82-83:461-477.
29. **Wise, T. (1987).** Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumine, 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.
30. **Abd Ellah, M.R.; Hussien, H.A. and Derar, D.R.(2010).** Ovarian follicular fluid constituents in relation to stage estrus cycle and size of the follicle in buffalo. Veterinary word, 3: 263-267.
31. **Tabatabaei, S. and Mamoei,M.(2011).** Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. 20.5: 441-445.
32. **Nasrallah, M.K.; Kaveh, M.K. and Ali, V. (2013)**. Follicular Fluid concentration of Biochemical Metabolites and Trace Minerals in Relation to Ovarian Follicle Size in Dairy Cows. Annual Review & Research in biology, 4:397-404.

33. **Singh,D.; Sharma, M.K.; and Pandey, R.S.(1999).** Biochemical and hormone characterization of follicles from follicular and luteal phase ovaries of goat and sheep. Lndian. J. Exp. Biol; 37: 434-438.
34. **Mishra, O.P.;Pandey, J.N.; and Gawande, P.G.(2003).** Study on biochemical constituents of caprine follicular fluid after superovulation. Asian Aust. J. Anim. Sci;16: 1711-1715.
35. **Grummer, R.R. and Carroll, D.J. (1988).** A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. J. Anim. Sci; 66: 3160-3173.
36. **Kim, J.Y.; Kinoshita, M.; Ohnishi, M. and Fukui, Y. (2001)**. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. Reproduction, 122: 131-138.
37. **Abe, H.; Yamashita, S.; Satoh, T. and 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.
38. **Wehrman, M.E.; Welsh,T,H. and Williams,G,L. (1991).** Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol enviroooment, modulates ovarian dynamics and the onset of postpartum luteal activity. Biol; 45:514-522.
39. **Ali, S.; Ahmad, N.; Akhtar, N.; Rahman, Z.U. and 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.
40. **Su, Y.Q.; Sugiura, K.; Wigglesworth, K.; Obrien, M.J.; Affourtit, J.P.; Pangas, S.A.; Matzuk,M.M. and 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. Development, 135:111-121.
41. **Endresen, MJ.; Haug, E.; Abyholm, T. and Henriksen, T (1990).** The source of cholesterol for progesterone synthesis in cultured preovulatory human granulosa cells. Acta Endocrinol. (Copenh),123:359-364.
42. **Bordoloi, P.K.; Sarmah, B.C.; Dutta, D. J. and Deka, B.C. (2001).** Macro and micro minerals in caprine follicular fluid. Indian J. Anim. Reprod; 22: 23-25
43. **Zeidan, A.E.B.; El-Harairy, Sh.A.; Gabr,M.A.; Tag El-Dien.; Abd El-Rahman, and Amer, A.M.(2011).** In vitro maturation of camel oocytes As affected by different media during breeding and non-bnreeding seasons. Journal of American Science,7: 460-472
44. **Rahman, Z.U.; Bukhari, S.A.; Ahmad, N.; Akhtar, N.; Ijaz, A.; Yousaf M.S. and Haq, I.U.(2008).** Dynamics of follicular fluid in one-humped camel (Camelus dromedarius). Reprod Domest Anim; 43:664-671.
45. **Zeidan, A.E.B.; Abd El-Salaam, A.M.; El-Malky, O.M.; Ahamdi, E.A.A.; Sarhan, D.M.A. and Daader, A.H. (2008).** Biochemical and histological changes in the ovary of the dromedary camel during breeding and non breeding seasons. Egyptian J. Basic Appl. Physiol; 7: 287 – 308.