Relationship of some hormonal and Ionic Constituents of ovarian follicular fluid with size of the follicle in local cows

علاقة بعض المكونات الهرمونية والأيونية للسائل الجريبي المبيضي مع حجم الجريبة في الأبقار المحلية

م.م. ميادة صاحب حسن
كلية الطب البيطري جامعة كربلاء

المستخلص :

الغرض من هذه الدراسة لتقدير بعض المكونات الهرمونية والأيونية للسائل الجريبي المبيضي وعلاقتها بحجم الجريبة في الأبقار. أنجزت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الإنتاج الحيواني في الكلية التقنية/المسيب للمدة من أيلول 2014 إلى شباط 2015. جُمعت المبايض (120) مبيض من (60) بقرة غير حامل والتي ذبحت في مجزرة محافظة كربلاء. نقلت المبايض إلى المختبر خلال ساعتين بعد الذبح. سُحب السائل الجريبي من الجريبات الصغيرة (3-5 ملم) والجريبات المتوسطة (6-10 ملم) والجريبات الكبيرة (11-20 ملم)، وخزن بدرجة -5 درجة مئوية لحين التحليل، حُللت عينات السائل الجريبي بأستعمال العدة التجارية. بينت النتائج أرتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) في تركيز هرموني الحمل والمودق مع زيادة حجم الجريبة. كان الأختلاف غير معنوي في تركيز أيون الصوديوم بين الجريبات الصغيرة والمتوسطة، بينما أرتفع معنوياً في الجريبات الكبيرة. كان الأختلاف غير معنوي في تركيز أيون المغنيسيوم بين مجاميع الجريبات الثلاثة . بينت نتائج الدراسة الحالية أيضاً أرتفاعاً معنوياً في تركيز أيون الكالسيوم مع زيادة حجم الجريبة، بينما بالعكس أنخفض معنوياً ($P<0.05$) تركيز أيون البوتاسيوم مع كبر حجم الجريبة.

الكلمات المفتاحية : الهرمونات –الأيونات – السائل الجريبي – الجريبة - الأبقار

Abstract :

The purpose of this study was to examine the hormonal and ionic constituents of ovarian follicular fluid in relation to follicle size in local cows. The study was conducted at laboratories of department of animal technical production/ Al-Musaib technical collage, from September 2014 to February 2015. The ovaries were collected (120) ovaries from (60) non-pregnant cows which slaughtered at abattoir of province of Karbala. The ovaries were transported to the laboratory within 2hours post slaughter. Follicular fluid was aspirated from small (3-5mm), medium (6-10mm) and large (11-20mm) follicles, and stored at -5 C° for further analysis. The follicular fluid samples were analyzed using commercial kits. The results show that the follicular progesterone and estradiol hormones concentration were significantly increased ($P<0.05$) with increase of follicular size. The difference in concentration of sodium between small and large follicles was non-significant, while was significantly higher ($P<0.05$) in large follicles. The difference in concentration of magnesium among three categories of follicles were non-significant. The results of the present of the study also indicated the concentration of calcium was significantly higher with increased of follicular size, while reverse the concentration of potassium was significantly lower ($P<0.05$) with enlargement of follicular size.

Key words: hormones , Ions , follicular fluid , follicle , cows

المقدمة :

يُعد التكاثر عامل مهم في اقتصاديات الانتاج الحيواني. ان تحسين مستوى الأداء التناسلي للأبقار من خلال تشخيص المعوقات التي تعرقل تطور الثروة الحيوانية، هي عوامل مهمة في زيادة العائد الاقتصادي لمشاريع تربية الابقار (1)، ونظراً لأهمية هذه الحيوانات بات من الضروري اجراء مزيداً من الدراسات لتسليط الضوء على الجوانب المختلفة في تكاثرها وحل المشكلات التي تؤدي الى عرقلة زيادة أعدادها بأساليب علمية صحيحة بعد أن ثبت أن أساليب التربية التقليدية غير قادرة على مواكبة حجم الانتاج العالمي لهذه الثروة ومنتجاتها(2)، لذا أصبح من الضروري أدخال التقانات الحديثة في الاخصاب الخارجي ونقل الأجنة والأنتخاب الوراثي على المدى البعيد لرفع الأداء التناسلي والأنتاجي وتحسينهما(3). تُعد المجازر مصدراً رخيصاً ومهماً للحصول على أنواع متعددة من البيوض لأنتاج الأجنة وأبحاث التطور الحياتي والوظيفي والتقانات الحياتية التكاثرية المختلفة(4). يُنتج السائل الجريبي موضعياً خلال النشاط الأيضي لخلايا الجريبة وجزء منه يترشح من مصل الدم وهذا مرتبط مع الفعاليات الايضية لخلايا الجريبة، لذلك فأن تركيب السائل الجريبي يكون مشابهاً وليس مطابقاً مع بلازما الدم (5). ترتبط مكونات السائل الجريبي وتركيزها من الكاربوهيدرات والدهون والبروتينات والمعادن والعناصر النادرة بحجم الجريبة وحالة الحيوان

الوظيفية والموسم والعمل وغيرها من العوامل الأخرى المتعلقة بالتكاثر (6)، فضلاً عن ذلك تزودنا هذه المكونات بمعلومات مفيدة من المتطلبات الواجب توفرها لنمو البويضة والنضج الخارجي بصياغة اوساط زرعية مناسبة لنضج البيوض أو زرع خلايا الأنواع خارج الجسم (7). يوفر السائل الجريبي بيئة مناسبة لنمو ونضج البويضة مرتبطة بحجم الجريبة من صغيرة إلى كبيرة (8) ، وأن الصفات الايضية والايونية والانزيمية في السائل الجريبي لها علاقة قوية بتطور ونضج البويضة واخصابها (9). يرتبط حجم الجريبة بتطور ونضج البويضة ويُعد كصفة لاختيار البويضةذات النوعية الجيدة في الابقار (10)، فضلاً عن ذلك وجود علاقة موجبة بين قطر الجريبة ونضج وتطور الكفاءة التطورية للبويضة(11). تنتج خلايا الجريبة الهرمونات وعوامل النمو (12) وعوامل التثبيط (13) والمواد الأيونية والدهون (14) وعدد من العناصر والأملاح (15) تُعطي دراسة مكونات السائل الجريبي فهم لميكانيكية وتطور الجريبة وتحسين نظام نضج البويضة الخارجي (IVM) (16) . تهدف هذه الدراسة لتقدير المكونات الهرمونية والأيونية في السائل الجريبي المبيضي وعلاقته مع حجم الجريبة لمعرفة مسار تغذية الجريبة والبويضة من هذه المكونات في مبيض الأبقار.

المواد وطرائق العمل

جمع وفحص المبايض Collection and examination of ovaries

أنجزت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الإنتاج الحيواني في الكلية التقنية / المسيب للمدة من تشرين ايلول 2014 إلى شباط 2015 ، جُمعت المبايض (120 مبيض) من 60 بقرة غير حامل والتي ذبحت في مجزرة محافظة كربلاء في موسم التناسل 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 القدِمة (Vernier calipers) ، وصُنفت الجريبات طبقاً لهذه القياسات إلى مجموعتين صغيرة ذات قطر (3-5 ملم) ومتوسطة ذات قطر (6-10ملم) وكبيرة ذات قطر (11-20 ملم) . سُحب السائل الجريبي من كل جريبة بأستعمال محاقن طبية معقمة نبيذة (disposable) ذات أحجام 1 و5 و10 ملليتر 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 قناني مخروطية (Centrifuge tube) ذات حجم 10 ملليتر لمدة 30 دقيقة لكي يستقر ، ووضعت القناني بجهاز النبذ المركزي(Centrifuge-Hettich-Germany) وبسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ، وسُحب السائل الجريبي الطافي بواسطة ماصة معقمة وحفظ بدرجة -5 درجة مئوية لحين التحليل.

التحاليل الكيموحيوية Biochemical analysis

حُللت عينات السائل الجريبي لتقدير المواد الهرمونية (هرموني المودق و الحمل) والأيونات (الصوديوم والمغنيسيوم والكالسيوم والبوتاسيوم) باستعمال العدة التجارية المناسبة والمتوفرة، وقيست الهرمونات (المودق والحمل) بوساطة استعمال عدد تجارية من شركة (Biolbo,Kit,France) وباستخدام الطريقة المناعية بواسطة جهاز (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) (Metertech ELISA-Germany) وبطول موجي 460 نانوميتر لكلا الهرمونين ، قيست الأيونات باستعمال عدة تجارية من شركة (Biocheck Kit, USA) ومن خلال الطريقة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 578 نانوميتر لقياس أيون البوتاسيوم و 550 نانوميتر لأيون الكالسيوم و500 نانوميتر لأيوني المغنيسيوم والصوديوم، أنجزت جميع القياسات طبقاً للجهة المصنعة للعدة التجارية.

التحليل الإحصائي Statistical analysis

أستعمل التصميم العشوائي الكامل Completely randomized design لدراسة أهمية التباين أو الأختلاف في معدل القيم (±SE) من تراكيز مختلف المكونات الهرمونية والأيونية للسائل الجريبي في الجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات بأختبار Duncan (17) متعدد المديات (Multiple Range test) ، وأستعمل البرنامج الأحصائي SAS (18) في التحليل الإحصائي للبيانات.

النتائج والمناقشة

اوضحت نتائج الدراسة ارتفاعاً معنوياً في معدل تركيز هرمون المودق مع زيادة حجم الجريبة ، وبلغ تركيزهُ في السائل الجريبي المبيضي الموجود في الجريبات الصغيرة 4640.87±553.25 بيكوغرام/ملليتر وفي الجريبات المتوسطة 1823.42±6473.72 بيكوغرام/ملليتر في الجريبات الكبيرة 514.07±12726.22 بيكوغرام/ملليتر (جدول 1) . يملك هرمون المودق لوحده تأثير قليل على الخلايا الحبيبية في نضج الجريبات ولكن هذا التأثير مهم في انشاء المستقبلات لهرمون الاباضة (Luteinizing Hormone) كتعبير واستجابة (19) ، ومنع عملية التقهقر (Atresia) (20). ان الارتفاع المعنوي في معدل تركيز هرمون المودق مع كبر حجم الجريبة ربما يعزى الى بداية نمو التجويف في الجريبة النامية ، اذ تبدأ خلايا القراب (Theca cells) في الجريبة بالنمو وبناء مستقبلات هرمون الاباضة، وتصبح لها القابلية على إنتاج الاندروجينات وخاصة هرمون الشحمون الخصوي (Testosterone) بتأثير هرمون الاباضة (21)، ومع استمرار الجريبة السائدة (Dominant) بالنمو فان الخلايا الحبيبية للجريبة تنتج كميات كبيرة من هرمون المودق بمساعدة هرمون محفز الجريبات (Follicle Stimulating Hormone) ، وتبلغ الى اعلى مستوى من الانتاج عندما تصل الجريبة الى وقت ماقبل الاباضة ، اذ تصبح ذات فعالية في تحويل الاندروجينات التي تنتج من خلايا القراب الى هرمون المودق (22) . تتوافق نتائج هذه الدراسة في

الابقار مع ماجاء به (23و24) وفي الجاموس (25و26) وفي الابل (27) وفي الاغنام (28و29) وفي المعز (30). هذه الملاحظات تعزز نتائج هذه الدراسة.

تبين نتائج الجدول (1) ارتفاع معدل تركيز هرمون الحمل معنوياً ($P<0.05$) في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة وبلغ 64.45±8.80 نانوغرام/ملليتر عن معدل تركيزه الموجود في السائل الجريبي المبيضي وفي الجريبات المتوسطة وبلغ 55.67±8.73 نانوغرام/ملليتر والجريبات الصغيرة وبلغ 43.14±10.14 نانوغرام/ملليتر . يُعد هرمون الحمل المفتاح الرئيس في تنظيم دورة الشبق، ويؤدي دوراً مهماً كمادة وسطية في تطور الجريبة (31). ان ارتفاع معدل تركيز هرمون الحمل معنوياً في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة عن الموجود في الجريبات الصغيرة ربما يعزى ان حصول اللوتنه (Luteinization) لخلايا الجريبة الحبيبية مع نمو وتطور الجريبة وبداية افراز هرمون الحمل (32) . يتحول هرمون الشحمون الخصوي والذي يفرز من خلايا القراب في الجريبة وبتحفيز من هرمون الاباضة الى هرمون المودق بواسطة الخلايا الحبيبية للجريبة وتحت تأثير هرمون محفز الجريبة (33) ، ولكن بعض من هذا الهرمون ربما يتحول الى هرمون الحمل في داخل الجريبة ويكون سبباً بارتفاع تركيزه مع تطور الجريبة (27) . تتوافق نتائج هذه الدراسة في الابقار مع ماجاء به (23و24) ، وفي الجاموس مع ماجاء به (25و35) وفي الأغنام والمعز (30).

يتضح من نتائج الجدول (1) اختلاف غير معنوي في معدل تركيز أيون الصوديوم في السائل الجريبي المبيضي بين الجريبات الصغيرة والمتوسطة إذ بلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة 1.37±38.21 ملغم /ديسيليتر وفي الجريبات المتوسطة 0.81±40.19 ملغم /ديسيليتر ، بينما أرتفع معنوياً ($P<0.05$) معدل تركيزه في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة عن الموجود في الجريبات الصغيرة والمتوسطة وبلغ 1.24±42.76 ملغم /ديسيليتر. أن زيادة معدل تركيز ايون الصوديوم في السائل الجريبي المبيضي في الجريبات الكبيرة مرتبط بحيوية ونشاط الجريبة لتكوين هورمون المودق والذي يزداد مع كبر حجم الجريبة وله القدرة على احتباس ايون الصوديوم داخل الجريبة (36). حركة الماء من الدم إلى تجويف الجريبة يُسبب زيادة في أبعاد الجريبة مع استمرار نموها ، وهذه العملية تحتاج إلى ميل تناضحي عِبر غشاء الخلية لذلك فأن معدل تركيز أيون الصوديوم في الجريبات الكبيرة ربما أحدث أو كون هذا الميل التناضحي عبر غشاء الخلية لتسهيل عملية التناضح (20). تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (1و36) في الأبقار و (37) في الجاموس و (22) في الأبل و (14) في الأغنام و (38) في المعز. ولا تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (39) في الابقار و (40) في الجاموس.

جدول (1) معدل (±SEM) تركيز المكونات الهرمونية والايونية في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة في الأبقار المحلية

المكونات	الجريبات		
	الصغيرة 3-5 ملم	المتوسطة 6-10ملم	الكبيرة 11-20 ملم
الهرمونية			
هرمون المودق بيكوغرام/ملليتر	553.25±4640.87 C	1823.42±6473.72 B	514.07±12726.22 A
هرمون الحمل نانوغرام/ملليتر	10.14±43.14 C	8.73±55.67 B	8.80±64.45 A
الأيونية			
الصوديوم ملغم/ديسيليتر	1.37±38.21 B	0.81±40.19 B	1.24±42.76 A
المغنيسيوم ملغم /ديسيليتر	0.32±6.21 A	0.17±5.87 A	0.22±5.07 A
الكالسيوم ملغم /ديسيليتر	0.20±6.21 C	1.23±8.63 B	1.42±10.23 A
بوتاسيوم ملغم /ديسيليتر	2.12±11.64 A	1.23±9.98 B	0.31±6.12 C

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

تبين نتائج جدول (1) عدم وجود اختلاف معنوي في معدل تركيز أيون المغنيسيوم في السائل الجريبي المبيضي بين مجاميع الجريبات المبيضية الثلاثة ، إذ بلغ تركيزه في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة 0.32±6.21 والمتوسطة 0.17±5.87 والكبيرة0.22±5.07 ملغم /ديسيليتر بالتتابع. أن الأرتفاع غير المعنوي في تركيز أيون المغنيسيوم في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة مقارنة مع الموجود في الجريبات الكبيرة في هذه الدراسة تتوافق مع ما جاء به في الأبقار (36) وفي الجاموس (37 و41) وفي الأبل (42) وفي الأغنام (14) وفي المعز (38). أن التركيز العالي لأيون المغنيسيوم في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة ربما يساعد على الأنقسام الخيطي لخلايا الجريبة أثناء تكوين مادة الثرومبين (thrombin) . أن أيون المغنيسيوم هو مضاد لعمل أيون الكالسيوم وأن أنخفاضه مع نمو وتطور الجريبة ربما يسهل عمل الكالسيوم في الجريبات الكبيرة (43).

فيما يخص أيون الكالسيوم بينت نتائج جدول (1) أن ايون الكالسيوم أرتفع معنوياً ($P<0.05$) في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة وبلغ 10.23±1.42 ملغم /ديسيليتر عن تركيزه في السائل الجريبي المبيضي الموجود في الجريبات المتوسطة والصغيرة إذ بلغ 8.63±1.23 و 6.21±0.20 ملغم /ديسيليتر بالتتابع . زيادة معدل تركيز أيون الكالسيوم مع زيادة حجم الجريبة ربما يعزى إلى مشاركته في تصنيع هرمون المودق إذ يزداد أفرازه مع تطور الجريبة لذلك تحتاج خلايا الجريبة إلى كمية كبيرة منه لذا يُسحب من الدم إلى داخل السائل الجريبي (44) ، وكذلك يؤدي الكالسيوم دوراً مهماً في تنظيم هرمونات المناسل لعملية تصنيع الهرمونات الشحمية للمبيض وعملية الإباضة (45). أيون الكالسيوم له دوراً مهماً كبيراً في التكاثر وأن نقصانه يؤثر على الخصوبة ، ويبدو أن أيون الكالسيوم الحر مشترك في تنظيم نمو البويضة وتحديد الأنقسام الأختزالي في بداية نضوج البويضة (46) . تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (36) في الأبقار (19 و25 و 37) في الجاموس و (40) في الإبل و (14) في الأغنام و (38) في المعز ، وتختلف نتائج هذه الدراسة مع (39) في الجاموس الذي أوضح انخفاض أيون الكالسيوم مع كبر حجم الجريبة وتختلف أيضاً مع (42) في الإبل إذ بيّن بعدم وجود تأثير لحجم الجريبة على محتويات أيون الكالسيوم في السائل الجريبي المبيضي ، هذا الأختلاف ربما يعزى إلى الأختلاف في النوع والسلالات بين الأنواع المختلفة وحتى ضمن النوع الواحد.

بينت نتائج جدول (1) انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) في معدل تركيز أيون البوتاسيوم في السائل الجريبي المبيضي مع زيادة حجم الجريبة وبلغ تركيزه في الجريبات الكبيرة 6.12±0.31 ملغم /ديسيليتر وفي الجريبات المتوسطة 9.98±1.23 ملغم /ديسيليتر وفي الجريبات الصغيرة 11.64±2.12 ملغم /ديسيليتر. أن أنخفاض تركيز أيون البوتاسيوم مع زيادة نمو وتطور حجم الجريبة ربما يسبب زيادة احتياج واستعمال الكلوكوز لنمو وتطور خلايا الجريبة، وبالتالي تؤدي هذه العملية إلى تحويل أيوم البوتاسيوم من خارج الخلية إلى داخل الخلية وبذلك ينخفض تركيزه في السائل الجريبي كلما توسع حجم الجريبة (14). بين (1 و 40) أن الزيادة المعنوية العالية لمعدل تركيز أيون البوتاسيوم في السائل الجريبي المبيضي مقارنة مع تركيزه في مصل الدم مع غياب الارتباط بينهما، أن البوتاسيوم ربما ينتج موضعياً بواسطة خلايا الجريبة. تتوافق نتائج هذه الدراسة مع (1 و 36) في الأبقار و في الجاموس مع (37 و 39) وفي الإبل مع (40 و 42) وفي الأغنام مع (14) .

نستنتج من هذه الدراسة أن البويضة وخلايا الجريبة في الأبقار تنمو وتنضج في ظروف كيموحيوية متذبذبة لدرجة كبيرة مع تغير حجم الجريبة لذا تستعمل نتائج هذه الدراسة كدليل لصياغة ظروف ملائمة لزراعة البويضة وخلايا الجريبة خارج جسم الحيوان.

المصادر

1. **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.
2. **Baruselli , P.S.; Sa Filho; M.F., Ferreira, R.M.; Sales, A.L J.N. S.b, Gimenes; L.U.,Vieira.; L.M., Mendanha.; M. F. and Bo,G.A. (2012).** Manipulation of follicle e .Reprod Dom, 47: 134 -141.
3. **Sutton, M. L.; Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G. (2005).** Effect of hexoses and gonadotropin on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in asynthetic follicle fluid medium . Reprod. Fertil. Dev.17: 407- 415.
4. **Orsi, N.; Gopichandran, N.; H.J.; Picton, H.M. and Harris, S.E. (2005).** Flactuations in bovine ovarian follicular fluid composition throught the oestrous cycle. Repord. 129: 219-228.
5. **Jiang, J.Y.; Macchiarelli, G.; Tsang, B.K. and Sato, E.(2003).** Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. Reprod., 125:211–223.
6. **Kor, N. M.; Khanghah, K. M. and Veisi, A.(2013).** Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows .Annual review and research in biology ,3.4:397 -404.
7. **Blanco M.R.; Deo, Mmyda S.; Moreno M. M. and Genero E.,(2011).** Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes. Biotechnology and molecular biology review , Vol .6.7:155-165.
8. **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 .
9. **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.
10. **Lequarre, A. S.; Vigneron, C.; Ribaucour, F.; Holm, P.; Donnay, I.; Dalbies-Tran, R.; Callesen, H., and Mermillod, P.(2005**). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. Theriogenology 63:841–859.

11. **Rodgers, R.J. and Irving –Rodgers H.F. (2010 a).** Formation of the overian follicular antrum and follicular fluid .Biol. of Reprod., vol. 82 no. 6 1021 – 1029.
12. **Fortune, J.E.; Rivera G.M.; Yang M.Y. (2004)**. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*, 82/83:109-126.
13. **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.
14. **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.
15. **Sharma, R. K. and Vasta, R. (1998).** Biochemical changes in trace elements in antral follicles of goats. Indian. J. Anim. Sci, 68: 330- 331.
16. **Kafi M, Mesbah F, Nili H, Khalili A**. (**2005).** Chronological and ultrastructural changes in camel (Camelus dromedarius) oocytes during in vitro maturation. Theriogenology, 63:2458-2470.
17. **Duncan, D.B.(1955).** Multiple Range and Multiple Test. Biometrics.11:1-42.
18. **SAS. (2004).** SAS / STAT Users Guide for Personal Computers. Release 7.0. SAS Institute Inc., Cary,NC., USA. (SAS=Statistical Analysis System).
19. **Kalmath, G. P. (2000).** Biochemical analysis of ovarian antral follicular fluid in buffaloes (M.V.Sc. Thesis). University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.
20. **Sharma, R.K.; Vats, R. and Sawhney, A.(1995).** Changes in electrolytes antral follicles in goat. Indian J. Anim. Report, 16:18-21.
21. **Campbell, B, K. (2009).** The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. Anim. Reprod, 1:159-171.
22. **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
23. **Naik, B.R., Siva, Kumar, A.V.N., Bramhaiah, K.V., Ravi A. and Praveen Chakravarthi V. (2013).** Estrogen and progesterone hormone levels in Punganur cattle. IOSR. J. Agric. Vet. Sci., 2: 50-53.
24. **Tabatabaei, S., Moghadam, A.M, Mamoei, M., Mirzadeh, K. and Aghaei, A. (2013).** Hormonal profile of ovarian follicular fluid and blood plasma during different stages of estrous cycle in Holstein cattle Iranian. Journal of applied Animal science., 4: 263-268.
25. **Eissa, H.M. (1996).** Concentrations of steroids and biochemical constituents in follicular fluid of buffalo cows during different stages of the oestrous cycle. British Vet J., 152: 573-581.
26. **Alkalby, J.M.A., Bushra. H. and Fahad,T.A. (2012)**. Study on some hormonal and biochemical constituents of follicular fluid and blood plasma in buffaloes. Basrah J. Res., 11: 90-102.
27. **Ali S.; Ahmad, N., Akhtar, N., Rahman, Z.U. and Ahmad, M**. **(2011)**. Hormonal profiles in the serum and follicular fluid of female camel (Camelus dromedarius) during the peak and the low breeding season. Pak Vet J., 31:331-335.
28. **Souza, C.J.H., Campbell, B.K. and Baird, D.T. (1997).** Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. Biol. Reprod., 156: 483-488.
29. **Zieba, D.A., Murawski, M. and Wierzchos, E. (2001).** Pattern of follicular development during the oestrous cycle of prolific Olkuska sheep. Arch. Tierz. Duinmerstorf., 44: 203-212.
30. **Pang, X.S., Wang, Z.Y., Zhu, T.G., Yin, D.Z., Zhang, Y.L., Meng, L. and Wang, F. (2010).** Concentrations of progesterone and estradiol in peripheral plasma during the estrous cycle and after ovariectomy in Huanghuai goats of high or poor prolificacy. Asian-australs J. Anm. Sci., 23:188-196.

31. **Deshpande, S.B. and Pathak, M.M. (2010).** Hormonal and Biochemical profiles in follicular fluid of unovulated follicles in superovulated Goats ovaries. Vet. World, 5:221-223.
32. **Rahman ZU, Bukhari SA, Ahmad N, Akhtar N, Ijaz A, Yousaf MS, Haq IU**. **(2008).** Dynamics of follicular fluid in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reprod Domest Anim*, 43:664-671.
33. **Hafez, E.S.E.; and Hafez, B. (2006)**. Reproduction in Farm Animals. 7' Ed. Blackwell PubI. Philadelphia, USA.
34. **Sakhong, D., Vongpralub, T., Katawatin, S. and Sirisathien, S. (2011).** Ovarian follicular patterns and hormone profile in Thai native cattle (Bos indicus). Thai. J. Vet. Med., 41: 439-447.
35. **Khan, F.A., Das, G.K., Pande, M., Sarkar M., Mahapatra R.K. and Shankar, U., (2012).** Alterations in follicular fluid estradiol, progesterone and insulin concentrations during ovarian acyclicity in water buffalo (Bubalus bubalis). Anim. Reprod. Sd., 130: 27-32.
36. **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.
37. **Kaur, J.; Takkar, O.P. and Khera, K.S. (1997).** Mineral elements in follicular fluid of Buffalo ovary, India J. Anim. Reprod, 18: 36-38.
38. **Bordoloi, PK., 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
39. **Arshad, H.M.; Ahmad, N.; Zia-ur-Rahman, H.; Samad, A.; Akhtar, N. and Ali, S.(2005).**Studies on biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peipheal blood in buffaloes .Pakistan Vet.J.,25:66-72
40. **AlFattah, M.A., Al-Mubarak, A.I., Althnaian, T.A., Albokhadaim, I.F. (2012).** Effect of feeding high urea diets on metabolites, Hormones and Ionic composition of follicular fluid in camels. Research Journal of pharmacology, 6: 1-3.
41. **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.
42. **Al-Rubaeae, H.M. (4014).** Studies on biochemical composition in follicular fluid and blood serum in relation to follicular size in Iraqi she-camels(Camelus dromedaries) during breeding season.Journal of karbala University.,2:192-202
43. **Nasrallah, M.K.; Kaveh, M.K.; 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.
44. **Shoushtari, S.M.A., Rezaie, S.A., Khaki, A., Belbasi, A. and tahmasebian, H. (2014).** Calcium and magnesium content of the uterine fluid and blood serum during the estrus cycle and pre-pubertol phase in water buffaloes. veterinary research forum., 5: 301-305.
45. **Subha, G. (2013).** Role of biochemical factor and mineral supplementation in live stock ration for maintenance of their fertility and healthy reproductive status. Res. J. Chem. Sci.,3: 102-106.
46. **Marketa, S and Rozinek Petr J. (2002).** Labeling of bound calcium in pig egg ultra structure. 2 Annual Ming of CSMS, VranovskaVesTemna Microopy., 59: 14-15.