Study on some metabolites and Ionic of ovarian follicular fluid in relation to follicular size in local female goats

دراسة بعض المركبات الايضية والايونية للسائل الجريبي المبيضي وعلاقتها بحجم الجريبة في أناث المعز المحلي

م.م.علي جاسم جعفر النعيمي
جامعة كربلاء / كلية الطب البيطري

المستخلص :

هدفت هذه الدراسة لبيان تقدير بعض المركبات الأيضية والأيونية للسائل الجريبي المبيضي وعلاقتها بتغير حجم الجريبة في أناث المعز المحلي. جُمعت المبايض (200 مبيض) من 100 أنثى معز غير حامل بالغة بعمر (3-6 سنة) والتي ذُبحت في مجزرة محافظة كربلاء للفترة من كانون الثاني إلى تموز 2013. نُقلت المبايض للمختبر خلال ساعتين بعد الذبح. سُحب السائل الجريبي من الجريبات الصغيرة (<4 ملم) والمتوسطة (4-6 ملم) والكبيرة (>6 ملم) وخُزن بدرجة -4 مئوية لحين التحليل. حُللت عينات السائل الجريبي لتقدير المواد الأيضية (البروتين الكلي والكلوكوز والكوليستيرول) والأيونات (الصوديوم والبوتاسيوم والمغنيسيوم) باستعمال العدة التجارية. بينت النتائج انخفاض معدل تركيز البروتين الكلي معنوياً ($P<0.05$) مع زيادة حجم الجريبة. أرتفع معنوياً ($P<0.05$) معدل تركيز الكلوكوز والكوليستيرول مع زيادة حجم الجريبة. أرتفع معنوياً معدل تركيز أيون الصوديوم مع كبر حجم الجريبة. أنخفض معنوياً معدل تركيز أيون البوتاسيوم مع تغير حجم الجريبة. كان الاختلاف غير معنوي في معدل تركيز أيون المغنيسيوم بين الجريبات الصغيرة والمتوسطة، بينما كان معنوياً بين الجريبات الكبيرة وكلتا المجموعتين الصغيرة والمتوسطة من الجريبات.

Abstract :

The aim of this study was to estimate some metabolites and Ionic composition of ovarian follicular fluid (FF) and It's relationship with changes of follicular size in local female goats. Ovaries were collected (200 ovaries) from 100 non-pregnant adult female goats (3-6 yr - old) slaughtered at abattoir of province of Karbala during the period from January to July 2013. The ovaries were transported to the laboratory within 2 hrs post slaughter. FF was aspirated from small (<4mm), medium (4-6mm) and (>6mm) follicles and stored at -4°C for further analysis. The FF samples were analyzed for metabolites (total protein, glucose and cholesterol) and ions (sodium, potassium and magnesium), using commercial kits. The results revealed that the mean of total protein concentration was significantly lower ($P<0.05$) with increased of follicular size. The mean of glucose and cholesterol concentration were significantly higher ($P<0.05$) with increased of follicular size. The mean of sodium concentration was significantly higher with increase of follicular size. The mean of potassium concentration was significantly lower with changes of follicular size. The differences in the mean of magnesium concentration was non-significantly between small and medium follicles, while was significantly between large follicles and both small and medium categories of follicles.

المقدمة :

يُعد المعز حيوان متميز في خصائصه وصلاحيته للمعيشة في الأراضي الصحراوية ومقدرته على تسلق الجبال للبحث عن غذائه وقدرته على هضم الألياف من أي مخلفات وسهولة رعايتها كما أنها تقوم بدور تنموي في المجتمعات البدوية(1). أن تحسين برامج الرعاية التناسلية وذلك بإدخال الطرائق العلمية والتقنية الحديثة في التكاثر(2). يُنتج السائل الجريبي موضعياً خلال النشاط الأيضي لخلايا الجريبة وجزء منه يترشح من مصل الدم وهذا مرتبط مع الفعاليات الأيضية لخلايا الجريبة، لذلك فأن تركيب السائل الجريبي يكون مشابهاً وليس مطابقاً مع بلازما الدم (3). يمتلك السائل الجريبي القابلية على المحافظة على الانقسام الاختزالي للبويضة في حالة سكون (4) ويحمي البويضة من التحلل عند إفرازها أثناء الإباضة (5) ورفع جاذبية وحركة النطفة وتفاعل قبعة النطفة(acrosome) (6). تنتج خلايا الجريبة الهرمونات وعوامل النمو (7) وعوامل التثبيط (8) والمواد الأيونية والدهون (9) وعدد من العناصر والأملاح (10). تشير الدراسات السابقة في مختلف أنواع اللبائن بوضوح باحتواء السائل الجريبي على مواد ضرورية لنضج وأخصاب البويضة وأن التغيرات في المواد الكيموحيوية في السائل الجريبي لها تأثير في نضج ونوعية البويضة (11).

تُعطي دراسة مكونات السائل الجريبي فهم لميكانيكية وتطور الجريبة وتحسين نظام نضج البويضة الخارجي (IVM) (12). التغيرات الأيضية في مصل الدم ربما تنعكس على المركبات الكيموحيوية في السائل الجريبي وممكن أن تؤثر بصورة غير مباشرة على نوعية البويضة (13). 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، وتعطي دراسة مكونات السائل الجريبي صورة واضحة عن مدى احتياج الجريبة والبويضة لمختلف المواد الايضية والايونية والهرمونية والدهنية والعناصر والأملاح ومثبطات النمو ومحفزاته واحتياجاتها الأساسية والضرورية لاستمرار نموها ونضجها ومن ثم ينعكس هذا على أنضاج البويضات وأخصابها خارج جسم الحيوان (14). يجهز السائل الجريبي المبيضي الظروف الدقيقة المناسبة لتطور ونمو ونضج البويضة والمحافظة على النشاط الحيوي للخصوبة في الأنثى (15). تؤثر التغيرات في المركبات الكيموحيوية في السائل الجريبي على عملية تكوين الهرمونات الشحمية ونوعية البويضة والاباضة ونقل البويضة إلى قناة البيض (16).
تهدف هذه الدراسة لتقدير المكونات الأيضية (البروتين الكلي والكلوكوز والكوليسيترول) والأيونات (الصوديوم والبوتاسيوم والمغنيسيوم) وعلاقتها بالتغيرات في حجم الجريبة ، بيانات هذه الدراسة ربما تستعمل كدليل لتكوين وسط زرعي لنمو ونضج البويضة والخلايا الجريبية في أناث المعز المحلي.

المواد وطرائق العمل

1. جمع وفحص المبايض

أنجزت الدراسة في مختبرات كلية الطب البيطري/جامعة كربلاء وقسم تقنيات الإنتاج الحيواني في الكلية التقنية/المسيب (50 كم جنوب بغداد) للمدة من كانون الثاني إلى تموز 2013 ، جُمعت المبايض (200 مبيض) من 100 أنثى غير حامل بالغة بعمر(3-6 سنة) والتي ذبحت في مجزرة محافظة كربلاء (90 كم جنوب غرب بغداد) وكان الحيوان بحالة سليمة من الناحية الصحية قبل الذبح وفُحصت القناة التناسلية بعد الذبح وكانت طبيعية وخالية من التشوهات الخلقية وغير حامل. 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) ، وصنفت الجريبات طبقاً لهذه القياسات إلى ثلاثة مجاميع صغيرة ذات قطر(<4 ملم) ومتوسطة ذات قطر(4-6 ملم) وكبيرة ذات قطر (>6 ملم) . سُحب السائل الجريبي من كل جريبة بأستعمال محاقن طبية معقمة نبيذة (disposable) ذات أحجام 1 و5 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 قناني مخروطية (Centrifuge tube) ذات حجم 10 مليلتر لمدة 20 دقيقة لكي يستقر ، بعد ذلك وضعت القناني بجهاز النبذ المركزي(Centrifuge-Hettich-Germany) وبسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ، بعدها سُحب السائل الجريبي الطافي بواسطة ماصة معقمة وحفظ بدرجة -4 مئوية لحين التحليل.

2. التحاليل الكيموحيوية

حُللت عينات السائل الجريبي لتقدير المواد الأيضية (البروتين الكلي والكلوكوز و الكوليستيرول)والأيونات (الصوديوم والبوتاسيوم والمغنيسيوم) باستعمال العدة التجارية المناسبة والمتوفرة . قيس تركيز أيون الكلوكوز باستعمال عدة تجارية من شركة (Bio Systems Kit, Spain) من خلال الطريقة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer–PD303-Germany) وبطول موجي 545 نانوميتر، وقيست تراكيز البروتين الكلي والكوليستيرول باستعمال عدة تجارية من شركة(BIOLABO Kit, France) ومن خلال الطريقة الضوئية وبواسطة جهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 480 و 500 نانوميتر بالتتابع. حُللت الأيونات باستعمال عدة تجارية من شركة (Bio check Kit, USA) ومن خلال الطريقة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 500 نانوميتر لقياس أيون الصوديوم و 578 نانوميتر لأيون البوتاسيوم و520 نانوميتر لأيون المغنيسيوم ، أنجزت جميع القياسات طبقاً للجهة المصنعة للعدة التجارية.

3. التحليل الإحصائي

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

النتائج والمناقشة :

بينت نتائج هذه الدراسة أن معدل تركيز البروتين الكلي انخفض معنوياً ($P<0.05$) مع زيادة حجم الجريبة، إذ بلغ في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة 8.70±0.27 غرام/ديسيلتر وفي الجريبات المتوسطة 6.62±0.12 غرام/ديسيلتر وفي الجريبات الكبيرة بلغ 4.97±0.68 غرام/ديسيلتر (جدول1). تلعب محتويات السائل الجريبي من البروتين الكلي دوراً مهماً في نمو وتطور ونضج البويضة (19) . 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

الجريبات ، وعندما يكتمل بناء الخلايا في الجريبات الكبيرة يصبح احتياجها للبروتين اقل نسبياً (5) . 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 (20)، وربما يعزى قلة تركيز البروتين الكلي في الجريبات الكبيرة لزيادة انتاج الهرمونات الشحمية والتي تحتاج الى البروتينات الرابطة لنقل هذه الهرمونات (21). يوضح الارتباط العالي بين محتويات البروتين الكلي في السائل الجريبي ومصل الدم ، ان الجزء الاساسي من محتويات البروتين في السائل الجريبي منشأه من مصل الدم (22). تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره (23) في المعز ولا تتفق مع (24). لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (25) في الأبقار و (26) في الجاموس إذ بينوا ثبوت معدل تركيز البروتين الكلي بين مختلف الجريبات. تتوافق نتائج هذه الدراسة في الجاموس مع (27) ، بينما في الأغنام تختلف مع (28) وتتفق مع (27)، وفي الأبل تتوافق نتائج هذه الدراسة مع (30) وتختلف مع (31و32). يتضح من نتائج الجدول (1) وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدل تركيز الكلوكوز في السائل الجريبي المبيضي مع نمو حجم الجريبة، إذ بلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة 25.27±2.21 ملغم/ديسيلتر والمتوسطة 32.07±1.02 ملغم/ديسيلتر والكبيرة 42.20±2.02 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 (28و33) ، او زيادة نفاذية الحواجز بين الجريبة والدم خلال نموها ولذلك يترشح مزيداً من الكلوكوز الى السائل الجريبي من مصل الدم (34). يلعب الكلوكوز دوراً مهماً في الأيض المبيضي بسبب اعتباره المصدر الرئيس للطاقة وذلك لتأييضه خلال المسار اللاهوائي الذي يؤدي إلى تكوين اللاكتيت (35) .

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 الركامية (Cumulus cells) (36) . أن ارتفاع معدل تركيز الكلوكوز في مصل الدم عن السائل الجريبي الموجود في كلا المجموعتين من الجريبات ، يعني المصدر الاساسي للكلوكوز في السائل الجريبي هو الدم وان كمية قليلة منه تصنع موضعياً بواسطة الخلايا الحبيبية للجريبات (31). تتفق نتائج هذه الدراسة في المعز مع ما ذكره (19و32). تتفق نتائج هذه الدراسة مع (26) في الجاموس و (23) في الأبقار و(28) في الأغنام، وفي الأبل تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره (31و32) ولا تتفق مع (30) إذ بين أن تركيز الكلوكوز عالي نسبياً في الجريبات الصغيرة مقارنة مع الموجود في الجريبات الكبيرة. تبين نتائج جدول (1) ارتفاعا معنوياً ($P<0.05$) في معدل تركيز الكوليسيترول في السائل الجريبي مع زيادة حجم الجريبة إذ بلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة 55.67±3.32 و 86.20±9.02 و165.27±12.26 ملغم/ديسيلتر بالتتابع. يُعد الكوليسيترول المادة الاولية لتصنيع الهرمونات الشحمية (Steriod) ويحتوي السائل الجريبي فقط على البروتينات الدهنية عالية الكثافة High Lipoprotein (HDL) Density لذلك فان الخلايا الحبيبية الوعائية للجريبات تعتمد على الكوليسيترول المترشح من هذه الدهون المشتقة من بلازما الدم خلال عبورها الغشاء القاعدي للخلايا الحبيبية (24)، ولا تعتمد على جزيئات البروتينات واطئة الكثافة (LDL) وذلك لامتلاكها جزيئات كبيرة لا تستطيع المرور ضمن الحواجز التي تفصل بين الدم والجريبة (37) .

ان التركيز الواطيء للكوليستيرول في السائل الجريبي للجريبات الصغيرة ربما يعزى الى زيادة احتياج الخلايا الحبيبية لهذه الجريبات للكوليستيرول اثناء نموها وتكاثرها، لذلك يسحب 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 (38) ، او ربما تعزى الزيادة في الكولستيرول في الجربيات الكبيرة الى زيادة نفاذية جدار هذه الجريبات مما تؤدي لرفع أو زيادة جزيئات الدهون عالية الكثافة في السائل الجريبي (25) ، او امتلاك الخلايا الحبيبية خزين كبير من خلات الكوليستيرول والتي ربما تجهز الكوليستيرول الحر لهرمون الحمل او عملية تصنيع الهرمونات الشحمية (39). تتوافق نتائج هذه الدراسة في المعز مع ما ذكره(23 و24)، ولا تتوافق مع (40) إذ بين أن المستوى المنخفض للكوليسيترول في الجريبات الكبيرة تشير إلى تحول الكوليسيترول إلى الهرمونات الشحمية (Steroids) ، تتوافق نتائج هذه الدراسة مع (26) ولا تتوافق مع (41) في الجاموس، وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع (33) ولا تتوافق مع (42) في الأبقار، وتتوافق مع (28) في الأغنام، وتتوافق هذه الدراسة مع (32و43) ولا تتوافق مع (30 و31) في الأبل. يتضح من نتائج الجدول (1) ارتفاع معدل تركيز أيون الصوديوم معنوياً ($P<0.05$) مع زيادة حجم الجريبه في السائل الجريبي المبيضي وبلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة 110.23± 3.04ملغم/ديسيلتر والمتوسطة 117.53± 2.22ملغم/ديسيلتر والكبيرة 131.76± 2.01 ملغم/ديسيلتر. ان زيادة معدل تركيز ايون الصوديوم في السائل الجريبي المبيضي له علاقة بحيوية الجريبة ومرتبطة بنشاط تكوين الجريبة لهرمون المودق، الذي له القدرة على احتباس ايون الصوديوم في داخل الجريبة (22). تَوسعت ابعاد الجريبة كثيرا مع نمو الجريبة بسبب حركة الماء من الدم الى تجويف الجريبة وتحتاج هذه العملية الى ميل تناضحي عبر جدار الخلية ، لذلك فان زيادة تركيز الصوديوم في الجريبات الكبيرة ربما اوجد ميل تناضحي عبر جدار الجريبة لتسهيل عملية التناضح (44) . تتوافق نتائج هذه الدراسة في المعز مع ما ذكره (40) ، وفي الجاموس تتوافق مع (45) وتختلف مع (26)، وتتوافق مع (28) في الأغنام، وفي الأبل تتوافق مع ما جاء به (43) وتختلف مع (46). تبين نتائج الجدول (1) انخفاض معدل تركيز أيون البوتاسيوم معنوياً ($P<0.05$) مع زيادة حجم الجريبة في السائل الجريبي المبيضي وبلغ معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة 18.25±60 و15.60 ±0.03 و12.46± 0.20 ملغم/ديسيلتر بالتتابع. ان انخفاض معدل تركيز ايون البوتاسيوم مع تطور حجم الجريبة ربما يعزى الى زيادة استعمال الكلوكوز بواسطة نمو وتطور الجريبة اذ تؤدي هذه العملية الى تحويل ايون البوتاسيوم من مواقع خارج الخلية الى مواقع داخل الخلية وبالتالي سوف يقل تركيزه في السائل الجريبي كلما كبرت الجريبة (28). تبين الزيادة المعنوية العالية لمعدل تركيز أيون البوتاسيوم في السائل الجريبي المبيضي للجريبات مقارنة مع تركيزه في مصل الدم مع غياب الارتباط بينهما ان البوتاسيوم ربما يُنتج موضعيا بواسطة خلايا الجريبة (33 و46) ، أو أن التغيرات بعد موت الخلية ربما تؤثر على تركيز

البوتاسيوم بواسطة تسربه بعد تلف الخلايا (26). تتوافق نتائج هذه الدراسة في المعز مع ما جاء به (40)، وتتوافق مع (45) في الجاموس و(33) في الأبقار و (28) في الأغنام.

يتضح من نتائج الجدول ادناه عدم وجود اختلاف معنوي في معدل تركيز أيون المغنيسيوم في السائل الجريبي المبيضي بين الجريبات الصغيرة والمتوسطة، إذ بلغ تركيزه في الصغيرة 0.12±1.95 والمتوسطة 0.10±2.50 ملغم/ديسيلتر بالتتابع، بينما أرتفع معنوياً (P<0.05) معدل تركيزه في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الكبيرة عن معدل تركيزه في الجريبات الصغيرة والمتوسطة وبلغ 0.78±3.17 ملغم/ديسيلتر . ان التركيز العالي للمغنيسيوم في الجريبات الصغيرة ربما يساعد على الانقسام الخيطي (Mitosis) لخلايا الجريبة اثناء تكوين الخثرين (thrombin)، كما ان المغنيسيوم يكون البديل عن ايون الكالسيوم في تكوين الخثرين في حالة انخفاض نسبة الكالسيوم عن المغنيسيوم في الجريبات الصغيرة (28)، علما ان ايون المغنيسيوم هو مضاد لايون الكالسيوم وان انخفاض ايون المغنيسيوم مع تطور الجريبة قد يسهل عمل الكالسيوم في الجريبات الكبيرة (47). تتوافق نتائج هذه الدراسة في المعز مع ما ذكره (24و40)، تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به (26) في الجاموس و(28) في الأغنام.

جدول - معدل تركيز المكونات الأيضية والأيونية في السائل الجريبي المبيضي للجريبات الصغيرة والمتوسطة والكبيرة في إناث المعز المحلي

Composition	Small follicles (<4mm)	Medium follicles (4-6mm)	Large follicles (>6mm)
Metabolites			
Total protein g/dl	8.70±0.27 A	6.62±0.12 B	4.97±0.68 C
Glucose mg/dl	25.27±2.21 C	32.07±1.02 B	42.20±2.02 A
Cholesterol mg/dl	55.67±3.32 C	86.20±9.02 B	165.27±12.26 A
Ions			
Sodium mg/dl	110.23±3.04 C	117.53±2.22 B	131.76±2.01 A
Potassium mg/dl	18.25±1.60 A	15.60±0.03 B	12.46±0.20 C
Magnesium mg/dl	1.95±0.12 B	2.50±0.10 B	3.17±0.78 A

(±SEM) = الخطأ القياسي

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

نستنتج من نتائج هذه الدراسة أن البويضة وخلايا الجريبة تنمو وتنضج في ظروف ايضية وايونية متقلبة لدرجة كبيرة مع حجم الجريبة وربما تستعمل نتائج هذه الدراسة لتكوين وسط زرعي لنمو ونضج البويضة وخلايا الجريبة في أناث المعز المحلي.

المصادر

1. **العذب ، محمود عبد السلام ، (2008).** رعاية الاغنام والماعز. مجلة البيطرة العربية ، مدينة مبارك للأبحاث والتطبيقات التكنولوجية. جامعة بنها ، مصر .
2. **Atsan, T.; Emsen, E.; Yaprak, M.; Dagdemir, V.;and Diaz, C.A.G.(2007).** An economic assessment of differently managed sheep flocks in eastern Turkey. Ital. J.Anim. Sci. ;6:407– 414.
3. **Jiang, J.Y.; Macchiar, G.; Tsang. B.K. and Sato. E. (2003).** Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. Reproduction, 125:211-223.
4. **McNatty, K.P; Smith, D.M; Makris, A.; Osathanondh, R. and Ryan, KJ. (1979).** The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in the antral fluid, the population of granulosa cells and the status of the oocyte in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab, 49:851-860.
5. **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.
6. **Somfai, T.; Inabam, Y.; Watanabe, S.; Geshi, M.;and Nagai, T. (2012).** Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. Reprod Fertil Dev, 24:743-752.
7. **Fortune, J.E.; Rivera, G.M.and 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.
8. **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 preantral follicles.

Small Rumin. Res, 70: 93-100.

9. **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.
10. **Sharma, R. K. and Vasta, R. (1998**). Biochemical changes in trace elements in antral follicles of goats. Indian. J. Anim. Sci, 68: 330- 331.
11. **Gode, F.; Gulekli, B.; Dogan, E.; Korhan, P.; Dugan, S.; Bige, O.; Cimrin, D. and Atahes, N. (2011).** Influence of follicular fluid GDF9 and BMPI5 on embryo quality. Fertil Steril, 95: 2274-2278.
12. **Kafi, M.; Mesbah, F.; Nili, H. and Khalili, A. (2005).** Chronological and ultra structural changes in camel (Camelus dromedarius) oocytes during in vitro maturation. Theriogenology, 63:2458-2470.
13. **O'Callaghan, D. and Boland, M.P. (1999).** Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. Anim. Sci, 68: 299-314.
14. **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.
15. **Findlay, J.K.; Kerr,J.B.; Britt,K.; Liew,S.H.; Simpson,E.R.; Rosairo,D. and Drummond,A.(2009).** Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. Anim.Repord.,V.6,n.1,p.16-19.
16. **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 a synthetic follicle fluid medium . Reprod. Fertil. Dev.17: 407- 415.
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. **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.
20. **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.
21. **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.
22. **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.
23. **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.
24. **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.
25. **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.
26. **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 peripheral blood in buffaloes .Pakistan Vet.J.,25:66-72
27. **Thangavel, A. and Nayeem, M. (2004).** Studies on certain biochemical profile of the buffalo follicular fluid. Indian Vet. J, 81:25-27.
28. **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.
29. **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.
30. **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.

31. **El-Shahat, K.H., El-Moaty, A.M., 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.
32. **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.
33. **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.
34. **Ying, Sh.; Wang, Z.; Wang, Ch.; Nie, H.; He, D.; Jia, R.; Wu,Y.; Zhou, Z.; Yan, Y.; Zhang, Y.; 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.
35. **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 vitro. Hum. Reprod. 9:617-623.
36. **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.
37. **Bauchart, D. (1993).** Lipid absorption and transport in ruminants. J. Dairy Sci, 76: 3864-3881.
38. **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.
39. **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.
40. **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
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. **Wehrman,M,E.;Welsh,T.H. and Williams,G.L. (1991).** Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian dynamics and the onset of postpartum luteal activity. Biol, 45:514-522.
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-breeding seasons. Journal of American Science,7
44. **Campbell, B. K. (2009).** The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. Anim. Reprod, 1:159-171
45. **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.
46. **AlFattah, M.A.; Al-Mubarak, A.I.; Althnaian, T.A.and 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.
47. **Kalmath, G. P. (2000).** Biochemical analysis of ovarian antral follicular fluid in buffaloes (M.V.Sc. Thesis). University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.