دراسة المكونات الايضية والايونية في السائل الجريبي والدم للابقار المصابة بتكيس المبايض الجريبي

افتخار مهدي كاظم النجار
قسم تقنيات الانتاج الحيواني / الكلية التقنية /المسيب

الخلاصة:

جمعت عينات الدم والسائل الجريبي لمئة بقرة مذبوحة ازيلت مبايضها وسحب السائل الجريبي من الجريبات المبيضية التي يتجاوز قطرها (2.2_3سم) ثم استعملت الطرق السريرية والضوئية والكيمياوية لقياس المكونات الايضية (الكلوكوز و الكوليسترول والبروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين) كذلك قياس المكونات الايونية (الصوديوم و البوتاسيوم و الكالسيوم والعنصر النادر الزنك .

وقد اظهرت الدراسة ان مستوى المكونات الايضية كان في السائل الجريبي اقل من مستواها في الدم ماعدا الالبومين الذي لوحظ زيادة تركيزه في الدم .

وقد اظهرت القيم اختلافاً معنوياً ($P < 0.05$) .كما بينت الدراسة ان تركيز كل من الصوديوم والزنك في السائل الجريبي اقل من تركيزها في الدم أما تركيز البوتاسيوم والكالسيوم في السائل الجريبي فهو اعلى من تركيزها في الدم وقد اظهرت القيم اختلافاً معنوياً ($P < 0.05$) ايضا .

وهذا يوضح بان التغيرات الايونية والايضية في مصل الدم سوف تنعكس في السائل الجريبي وان ذلك سوف يؤثر على نوعية البويضة وتطورها ومن ثم حصول الاباضة أو فشلها مؤدية الى حالة التكيس المبيضي الجريبي .

ABSTRACT:

Blood samples were collected from one handred cows and follicular fluid was aspirated from ovaries to same cows and follicular fluid was aspirated from follicles larg than 2.5 – 3 cm in diameter of the ovaries to same cows after removed , then analysed them by using clinical photometric and chemistry method to measured out the metabolites (Glucose , Cholesterol and total protein as well as the Albumin and Globuline) . And ions measure (Sodium , Potassium , Calcium and the tras elemente , Zink) .

The study demonstrate that the metabolic constituent's . level were lower in follicular fluid than blood except the Albumine which exhibeted increasing in it's concentration in follicular fluid than blood .

The result different significantly at level ($p < 0.05$) , also the study demonstrate that both of sodium and Zink concentrations were lower in follicular fluid than blood wheras the concentration of Pottassium and Calcium were higher in follicular fluid than blood and the results different significantly at level of ($p < 0.05$) too . This explan that the metabolic and ionic changes in serum will be reflect on the follicular fluid and this will affect on the quality of oocyte , granulosa cell development and the occurans of ovnlation or not resulting in follicular cystic ovaries .

المقدمة :

ان السلوك التكاثري هو عامل مهم في تحديد الربحية في قطعان الابقار واقتصادياً فان من المفيد ان تلد البقرة الحلوب كل سنة (1)، كذلك فان السلوك االتكاثري للبقرة يلعب دور في قرارات الاستبعاد وبذلك فانه يؤثر ايجابياً على حياة القطيع النشط ، فالخصوبة هي عملية معقدة والحصيلة النهائية هي نتيجة التناغم ما بين تحت المهاد والنخامية والمبيض والرحم وان أي عامل يتداخل بوظيفة واحد او اكثر من هذا الاعضاء يؤثر على عموم حصيلة التكاثر(2) ، فالخطوة البدائية في تطور ونمو الجريبة عادة تعرقل الكثير من الابقار التي تعاني من قصور وظيفة المبايض اثناء الفترة ما بعد الولادة وهذا القصور يؤدي الى تأخير العودة الى الصراف وبالتالي يؤثر على الخصوبة والتلقيح فيما بعد (3)واحدى حالات القصور الوظيفي للمبيض هي تكوين التكيس الجريبي وفشل الاباضة (4) .

ان تكيس المبايض الجريبي في الابقار يعرف بانه عبارة عن وجود جريبة ذات حجم اكبر من (2.5_3سم) تبقى على المبيض بعد فشل الاباضة لمدة 15 يوم وذلك بغياب الجسم الاصفر (5)وهذا التكيس المرضي يحصل بشكل شائع خلال (60_90) يوم الاولى بعد الولادة(6) وهذا يحصل بنسبة-(10_13%) ان تكيس المبايض الجريبي يحصل نتيجة اختلال وسوء وظيفة كل من تحت المهاد والغدة النخامية والمحاور القندية كذلك فانها حالة اسبابها متعددة العوامل المتعلقة بالوراثة والصفات التشكيلية والعوامل البيئية(7). وبصورة عامة فانها مرتبطة مع مستوى الانتاج العالي للحليب وخاصة ما بعد الولادة ، اذ تعاني الابقار من نقص في الطاقة(Negativ Energy Balance) (NEB)حيث يعود الى عدم التوازن بين الطاقة المأخوذة من خلال التغذية والطاقة المصروفة خلال انتاج الحليب(8).

وهذا النقص في الطاقة يعتبر من اخطر العوامل للقصور الوظيفي للمبايض (9) حيث يغير التركيز الايوني والايضي ويعرقل تطور الجريبة بتأثيره على المحاور الثلاثة تحت المهاد – النخامية – المبايض، (10). ان تكيس المبايض الجريبي هو سبب رئيسي للعقم الثانوي في الابقار فهو يطيل فترة الانقطاع بين ولادة واخرى ، واطالة الانقطاع وكلفة العلاج انتجت خسائر اقتصادية (11) . ولان دور الـ NEB في تكوين التكيس الجريبي تبقى غير محسومة ولأن الفهم الجيد لكيفية تأثير الـ NEB على تكوين الكيس سوف يساعد في تحديد ستراتيجيات لمنع حدوث ظاهرة التكيس الجريبي ويقدم فرصة لتوجيه قطعان الحليب نحو خصوبة عالية ضمن برامج تربية متطور(2). لذا فان الهدف من الدراسة هوالحصول على رؤية واضحة حول النقص السلبي للطاقة في تكوين التكيس الجريبي للمبيض من خلال قياس المكونات الايضية والايونية في مصل الدم ومدى انعكاسها على السائل الجريبي ،وكذالك معرفة العلاقة بين تركيز المواد الايضية والايونية مع النمو الجريبي وتطوره الى التكيس الجريبي .

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات الدم (كل عينة10مل) من الوريد الوداجي من كل بقرة في وقت الذبح في انابيب اختبار معقمة ومفرغة من الهواء وحاوية على مانع تخثر(EDTA Tubes) ووضعت الانابيب في صندوق ثلجي وحملت الى المختبر اذ فصل المصل باستعمال منبذة Centrifuge بسرعة 3000دورة/دقيقة ولمدة10 دقائق ويسحب المصل بواسطة ماصة معقمة ويوضع في انابيب سعة5 سم ورقمت كل واحدة بنفس رقم انبوبة السائل الجريبي لنفس الحيوان (12) .

وجمعت مبايض الابقار المذبوحة في حاوية تحتوي على الملح الفسيولوجي بتركيز 0.9% ومضاد حيوي هو Gentamycin بتريز50ملغم/مل ثم عند وصولها للمختبر غسلت بالملح الفسيولوجي مرتين متتاليتين (13) .

وفحص كل مبيض حول وجود الجريبات المتكيسة والتي يبلغ قطرها اكـثر من cm (2.5-3سم) وتقاس باستعمال Vernier Calipers (14) ،

وسحب السائل الجريبي باستعمال نيدل(gage 22) متصلة بمحقنة ذات حجم5مل ثم اضيف اليه مانع التخثر (الهيبارين20ملغم/مل) ثم خلص السائل الجريبي من القشور والخلايا العالقة به عن طريق اســتعمال جهاز الطرد المركزي بدرجة 40م 5000دورة/دقيقةو ولمدة 30 دقيقة (15) .

ثم رشح السائل بمرشحات ذات قياس 0.2ملم ثم فجمع الراشح في انابيب قياس 5مل ويخزن بدرجةحرارة(-8)م لحين اجراء التحليل الكيموحيوي .

تم تحليل عينات كل من السائل الجريبي والبلازما لمختلف المواد الايضية والايونية والعناصر النادرة باستعمال العدد التجارية المناسبة(16) .

ولقياس مستوى الكلكوز اجري فحص Enzymatic Kinietic Colorimetric باستعمال kit من شركة Plasmatic الايطالية

ولقياس مستوى الكوليسترول اجري فحص Enzymatic Colorimetric Method of Linear Chemic B279 باستخدام Kit من شركة Biolabo SA الفرنسية (17)_.

و قيس البروتين الكلي باجراء Colorimetric باستخدام Proteins Kit من شركة Biolabo SA الفرنسية(18).

ولقياس تركيز الالبومين استخدم Albumin Kit من شركة Bio Ray . اما تركيز الكلوبيولين فقد استحصل من طرح الالبومين من البروتين الكلي.(18)

.

المركبات الايونية قيست حسب طرق(19) كل من تركيزالكالسيوم و الزنك قد قيست باستعمال فحص Atomic Obsorption Photometric باستخدام : Calicum Ki من شركة Human Company الالمانية(20).

وقد اتبعت الطريقة ذاتها باستخدام Spectro Photometer لحساب تركيز Zinc باستخدام Zinc Kit من شركة Human Company الالمانية (21).

اما تركيز الصوديوم والبوتاسيوم فقد حددت باستعمال طرق Flame Photometric Method باستخدام Sodium Kit من شركة Human Company الالمانية .

ان تركيز البوتاسيوم فقد تم حسابه حسب الطريقة التي ذكرت في Potassium Kit من شركة Human Company الالمانية . (21)

التحليل الاحصائي : Statical Analysis :

استخرجت المعدلات والخطأ القياسي لها ثم استعمل اختبار مربع كاي على طريقة Contingency Tables في التحليل الاحصائي لمعرفة معنوية التغيرات في القيم لتراكيز المواد في الدم والسائل الجريبي(22).

النتائج والمناقشة :

أوضحت النتائج في الجدول رقم (1) بان تركيز الكلوكوز في الدم هو اعلى من مستواه في السائل الجريبي كما ان مستواه في الجريبة المتكيسة اعلى من مستواه في الجريبات السائدة الطبيعية (23) وهذا يدل على ان ايض الكلوكوز في الجريبة المتكيسة هو اقل من الجريبة الطبيعية وبذلك يقل استهلاكه من السائل الجريبي ، كما ان زيادة السائل الجريبي في الجريبة المتكيسة هو تفسير اخر لزيادة الكلوكوز حيث ان الجريبة المتكيسة تمتلك عدد اقل من الخلايا الجريبية (granulosa cells) التي تستهلك الكـلوكوز وهذا يتفق مع ما توصل (24) و (25) كذلك هناك سبب اخر لزيادة الكلوكوز في الجريبة المتكيسة هو زيادة نفاذية الحواجز الدموية للجريبه خلال النمو الجريبي حيث ان التوازن ما بين المحتويات الوعائية والسـائل الجريبي يكون سـهلاً جداً في الجريبة المتكيسة وهذا يتفق مع ما وجده (24) الذي وجد فرقاً ما بين كلوكوز الجريبة الصغيرة والكبيرة كذلك بينت الدراسة بان مستوى تركيز الكلوكوز في بلازما الدم كان اعلى من مستواه في السائل الجريبي لمستوى معنوي ($P < 0.05$) وحيث ان مصدر الكلوكوز في السائل الجريبي هو الدم والنسبة القليلة الاخرى تكون موضعياً الجريبة بواسطة الخلايا الحبيبة granulosa Cells (26) .

جدول رقم (1) متوسطات التراكيز للمكونات الايضية في السائل الجريبي والدم في الابقار المصابة بالتكيس الجريبي .

المكونات الايضية	السائل الجريبي	بلازما الدم
Glucose (mg/dl)	95.58 ± 2.34 b	123.55 ± 3.51 a
Cholesterol (mg/dl)	128.19 ± 5.25 b	155.06± 21.01 a
Total Protein (g/dl)	7.04 ± 0.30 b	7.98 ± 0.3 a
Globuline (g/dl)	2.46 ± 0.25 b	4.56 ± 0.38 a
Albumin (g/dl)	4.10 ± 1.14 a	3.26 ± 0.1 b

القيم ذي الحروف المختلفة في الصف الواحد تختلف معنوياً ($P < 0.05$) .

اما بالنسبة للكوليسترول فانه يلعب دور مهم في فسلجة المبايض فهو مخزن للهرمونات الستيرويديه التي تفرز من هذا العضو (27) وقد اوضحت الدراسة بان الكوليسترول في الجريبة المتكيسة يزداد كثيراً عن مستواه في الجريبة السائدة وهذا يتفق مع ما وجده كل من (24) و (28) الذان لاحظا زيادة معنوية في مستوى الكوليسترول كلما كبر حجم الجريبة. ان الكوليسترول يأتي للسائل الجريبي من مصدرين أولهما اعادة التصنيع الخلوي من الخلات والثاني هو الشحوم البروتينية (Lipoprtein) في بلازما الدم (29) . كما بينت الدراسة بان مستوى الكوليسترول في الدم كان اعلى من مستواه في السائل الجريبي حيث ارتفاع الكوليسترول هذا يسبب عدم التوازن في الطاقة الحاصلة بعد الولادة (جدول رقم 1) [10] وكان الاختلاف معنوياً ($P<0.05$) بين الدم والسائل الجريبي وهذا يتفق مع ما توصل اليه كل من [27] و [30] الذين ذكرا انخفاض معنوياً لتركيز الكوليستيرول مقداره (63.90 ±20.07) ملغم/ديسلتر في الابقار الطبيعية مقارنة مع الابقار متكررة الصراف (120.1 ±5.26) ملغم/ديسلتر كما اوضحت الدراسة بان مستوى البروتين في الدم اكثر من مستواه في السائل الجريبي للجريبات المتكيسة (جدول رقم 1) وهذا يتفق مع ما توصل اليه (13) .

ان تركيز البروتين لايزداد مع كبر حجم الجريبة وفي كل الاحوال فان بروتين السائل الجريبي مصدره الدم (31) وربما تكون الزيادة في مستوى البروتين الكلي في بلازما الدم تعود الى زيادة الكلوبيولين حيث انه ذو اهمية معنوية في الجسم تعود الى فعاليته المناعية في حيث ان مستواه في السائل الجريبي يكون واطىء وبكمية قليلة ربما تكون ضرورية لحماية الجريبة من البيئة الخارجية (32) .

اما بالنسبة للالبومين فقد تبين ان تركيزه في السائل الجريبي للجريبة المتكيسة يكون اعلى من مستواه في الدم بمعنوية (P< 0.05) كما مبين في جدول رقم (1) وذلك يعود الى النقل الداخلي الفعال لهذا المركب من الدم الى الجريبه والذي تحتاجه لربط المواد الكيمياوية مثل المعادن في السائل الجريبي لاداء بعض الوظائف الفسلجية مثل نمو ونضج الجريبة (18) .

لقد اوضحت الدراسة بان تركيز الصوديوم كان اعلى في الدم من السائل الجريبي كما مبين في الجدول رقم (2) . كما ان مستوى الصوديوم في السائل الجريبي للجريبة المتكيسة هو ايضاً اعلى من الطبيعي وذلك يعود الى حيوية الجريبة ونشاط عملية تصنيع الاستروجين وكذلك فعالية الوسيط في هذه العملية (19-Hydroxy and Rostenedione) الذي له تأثير احتباسي قوي للصوديوم وهذا يتفق مع ما وجده كل من (23) و (24) ولا يتفق مع ما وجده (13) الذي ذكر بان الصوديوم يزداد بزيادة حجم الجريبة .

جدول رقم (2) متوسطات التراكيز للمكونات الايونية في السائل الجريبي والدم في الابقار المصابة بالتكيس الجريبي .

المكونات الايونية	السائل الجريبي	بلازما الدم
Sodium (mg/dl)	36.18 ± 0.77 b	46.23 ± 0.56 a
Potassium (mg/dl)	5.98 ± 0.09 a	5.11 ± 0.03 b
Calcium (mg/dl)	5.97 ± 0.04 a	3.86 ± 0.13 b
Zinc (mg/dl)	0.20 ± 0.03 b	0.31 ± 0.09 a

القيم ذي الحروف المختلفة في الصف الواحد تختلف معنوياً (P < 0.05) .

لقد بينت النتائج ان مستوى البوتاسيوم في السائل الجريبي كان اعلى من مستواه في الدم كما مبين في جدول رقم (2) وهذا يتفق مع ما وجداه كل من (23) في الابقار ومع ما وجده (29) في الجاموس . وهذه الزيادة بسبب الدخول الفعال لهذا الايون الى داخل الخلية بعد استنفاذ الكلوكوز . كذلك ربما تكون هذه الزيادة في السائل الجريبي بسبب التغيرات الحاصلة بعد موت الخلية والتي يؤدي الى هروب هذا الايون من الخلايا المتحطمة .

لقد اوضحت الدراسة بان مستوى الكالسيوم في السائل الجريبي هو اعلى من مستواه في الدم كما مبين في جدول رقم (2) وان هذه الزيادة تعود الى زيادة حجم الجريبة المتكيسة وزيادة قابليتها على صنع الستيرويدات حيث ان الكالسيوم يلعب دور مهم في تنظيم الهرمونات القندية وبصورة خاصة الاندروجين الجريبي (33) .

كما بينت الدراسة بان مستوى تركيز العنصر النادر الزنك كان في السائل الجريبي اقل مما هو في بلازما الدم (جدول رقم 2) . ان الزنك يرتبط بعملية انقسام وتطور الخلية اضافة الى انه يسيطر على عملية التعبير الجيني وان نقصه يؤثر على عملية الاباضة وفشلها مما يؤدي الى التكيس الجريبي وهذا يتفق مع ما وجده (34) .

المصادر References

1. **Huirne RBM, Saatkamp HW , Bergevoet RHM, 2002** . Economic analysis of common health problem in daing cattl . In kaske M, seholz H, Holter Shinken M. Recent development and perspectives in bovin medicin . Proceedings of XXII world Buiatrics congress , Hannover , Germany , 18 – 23 August .
2. **Butler WR, 2003** . Energy balamce relationship with Follicular development , ovulation and Fertility in postpartum dairy cows . Livest prod sci 83 , 211 – 218.
3. **Rajala PJ, Grohn YT , 2003** . Disease occurance and risk Factor analysis in Finnish Ayrshire cows. Acta vet scan 39 , 1-13.
4. **Christman SA , Bailey MT , Head WA , Wheaton JE, 2000** . Induction of ovarian cystic Follicles in sheep . Domest Anim Endocrin 19 , 133 – 146 .
5. **Shresta HK , Nakao T , Suzuki T , Akita M , 2004**. Effect of abnormal ovarian cycles during preservice period postpartum on subsequent reproductive performance of high – producing Holstein cows – Theriogemo Logy 61 , 1559 – 1571.

6. **Peter AT, 2004** . An update on cystic ovarian degeneration in cattle . Reprod Dommestic Anim 39 , 1 – 7.
7. **Hooijer GA , Van oijen MAAJ, Frankena k , Noordhu . izen JPTM, 2003** . Milk production parameters in early Lactation : potential risk Factors of cystic ovariam disease in Dutch dairy cows . Livest prod sci 81 , 25 – 33.
8. **Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M ,DeluykrH , dekruif A , 1998** . An analysis of ovarian olys Function in high yielding dairy cows after caluing based on progester on profiles . Reprod Domest Anim 33 , 193 – 204 .
9. **Diskin MG , Mackey DR , Roche JF , Sreenan , JM , 2003** . Effect of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian Follicles development in cattle . Anim Reprod sci 78 , 345 – 370.
10. **Tom vanholder , 2005** . cystic ovarian Follicles in the high yielding dairy cow post partum . Doctor thesis . Vet med , Ghent university .
11. **Bleach ECL , Glencross RG, knight PG , 2004**. Association between ovarian Follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles . Reproduction 127 , 621 – 629 .
12. **Prasad , K. S. and S. V. N. Rao , 1998 .** Blood mineral profiles of anoestrus and repeat breeder crossbred cows : a field study . Vet. Bull. , 58(7) : 6658 .
13. **Nandi S, Girish kumar V , Man junatha B.M , Gupta P.S.P , 2008** . Biochemical composition of ovine Follicular Fluid in relation to Follicl size . Anem . nutria and phys Adugodi Bangalore Reprod . (49 , 61 – 66) .
14. **Orsi , N.,Gopchandran , N., Leese , H.J. Picton , H.M. & Harris , S.E. 2005** . Fluctuation in bovine ovarian Follicular Fluid composition throughout the oestrous cycle . Reprod 129, 219- 228.
15. **Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, xu Z.Z. , Loosk , Youngguist Rs ,Salfen BE, 1995** characterization of overian Follicular cyst and associated endocrine profiles profiles in daing cows . Boil Reprod 53 , 890 – 898 .
16. **Burits C.A. and Ashwood E.R.(1999) .** Tietiz fundimentals of clinical chemistry . 4th . ed. W. standers comp. usa.2(1500-1503)**.**
17. **Trinder . P. 1969 .** Determenation of total serum cholesterol . Analyst . 76 : 596 .
18. **Maniwa , J., Izumi , S. , losbe , N. & Terada , T. 2005** . studies on substantially increased protein in follicular fluid . of bavin ovarian follicular cysts using 2 – D PAGE and MALDI – TOF MS . Reprod Biol . Endo crinol . 3 , 23 . Published online 8 Jun 2005 . doi : 10 . 1186 /1477 – 7827 – 3 – 23 .
19. **Richards , L. A. , 1968 .** Diagnosis of Improvement of Saline and Alkaline Soils . 1 st Ed., Agri. Handbook No. 60. IBH Co ., New Delhi , India .
20. **Barnett . R. N. (1973)** The Principle of estimation of serum Calcium . Amer. J.Clin.path . 59. 836.
21. **Hillman . G. : Beyer . G. and Klin . Z. (1967)** Determination of Pottsium concentration Chem. Clinic . biochem . 5: 93.
22. **Steel , R.G.D. and J.H. Torrie , 1982 .** Principles and procedures of statisitics , A biometrical approach . 4th Ed ., Mc Graw HillBook Co. , New York , USA .
23- **الربيعي . هاشم والنجار ز افتخار (2009) .** مقارنه بين التراكيز الايضية والايونية والهرمونية في السائل الجريبي والدم في الابقار . مجلة الفرات الزراعية . المجلد (1) العدد (2) . 2009 .
24. **Leroy , J. M. R. Vanholder , T., Delanghe , J.R. etal . 2008** . Metabolite and lonic composition of follicular Fluid From different – sized Follicles and the relation . Ship to serum in dairy cows . Anim . Reprod . Sei . 80 , 201 – 211.
25. **Landau, S., R. Braw . Tal , M.Kaim and A.Bor, 2000 .** Preovulatory follicular status and diet affect the high yielding dairy cows. Anim. Reprod. Sci., 64(3) : 181- 197 .

26. Leese, H.J. and E.A. Lenton , 1990 . Glucose and Lactate in human follicular fluid : concentrations and interrelationship . Hum. Reprod., 5: 915-919 .

27. Cook DL , Smith CA , Parfet JR , Youngguist RS, Brown EM, Garverick HA , 1990 . Fat aturnnover rate of overian Follicular cyst in dairy cows . J Reprod Fertil 89 , 155 – 166.

28. **Bordoloil, P.K., Sarman , B.C., Dutta, D.J.& Deka , B.C. 2000.** Follicular fluid cholesterol in goat ovary . Indian Vet . J. 77, 638-639 .

29. Arshad , H.M. Ahmad , Zia – ur Rahman , H.A. Samad , N. Akhtar and S.Ali . 2005 studies on som biochemical coustituents of ovariam follicular fhnid and peripheral blood in Buffaloes . Vet . J. , 25 (4) : 2005.

30. Shahzada, N. 1995. Haematological , some serum biochemical and pathological aspects of repeat breeding Nili-Ravi buffaloes. MSC Thesis, Univ . Agri. Faisalabad, Pakistn.

31. Wise, T., 1987 . Biochemical analysis of bovine follicular fluid : albumin , total prptein , Lysosomal enzymes , ions , steroid and ascorbic acid contents inrelation to Follicular size rank , atresia classification and day of oestrous cycle. J. Anim, sci. , 64 : 1153-1169.

32. Lwata , H., inoue , j., kimura , k. , kuge , T. , kuwayama , T. & monji , Y. 2006 . Comparison between the character – estics of following fluid and develop mental competence of bouine ocytes . Anim Reprod . Sci . 91, 215 – 223.

33. Gerard , N., Loiseau , S., Duchampo , G& seguin . F. 2008 . Amalysis of the variations of Follicular fluid composition during Follicular growth and maturation in the mare ucing proton nuvlear magnetic resonance (HNMR) Reprod . 124 , 241 – 248.

34. Leonhard , M.S.,2000 . Why do trace elements have an influence on fertility ? Tieraztliche-Praxis – G – Ausgabe – G – Grosstiere – Nutztiere , 28 (2) : 60 – 65 .