مقارنه بين تركيز المكونات الأيضيه، الآيونيه والهرمونيه للسائل الجريبي مع تركيزها في الدم لدى الأبقار

. هاشم مهدي الربيعي افتخار مهدي النجار
الكلية التقنية/ المسيب

المستخلص

جمعت نماذج الدم من 15 بقرة والسائل الجريبي (Follicular fluid) من المبايض لنفس الابقار بعد ازالتها. أستعملت وسائل القياس التجاريه (السريريه والضوئيه والكيميائيه) لقياس آيونات الصوديوم، الكالسيوم، البوتاسيوم والكلورايد. وتم قياس الكلوكوز، الكولستيرول، البروتين وهرمون الانسولين.أظهرت النتائج ان تركيز البروتين، الكولستيرول، البوتاسيوم والكالسيوم في السائل الجريبي اعلى من تركيزها في الدم بينما يقل الصوديوم، الكلورايد، الانسولين والكلوكوز في السائل الجريبي عن مستواه في الدم وبمعنوية $P<0.01$. وبينت الدراسه بأن البويضه والخلايا الحبيبيه للأبقار تنمو وتنضج في وسط كيميائي حيوي وان الإرتباط المعنوي بين مكونات السائل الجريبي ومصل الدم يوضح ان التغيرات الأيضيه في مصل الدم تنعكس في السائل الجريبي ولذلك تؤثرعلى نوعية البويضه والخلايا الحبيبيه.

Comparison between the concentration of metabolize,ionic and hormonal composition of follicular fluid and the concentration in blood at cows

H. M. Al-Rubaiae E. M. Al- Naggar

ABSTRACT

Blood samples were collected from 15 cows and follicular fluid from ovaries to same cows after removed. Using commercial measure (clinical, photometric and chemistry)to measure out the ions (sodium, calcium, potassium and chlorid), (glucose, cholesterol, and protein) also hormones were measured such as insulin. Results demonstrated that concentration of protein, cholesterol, potassium and calcium in follicular fluid is higher than the in blood concentration while decrease of sodium, chloride, insulin and glucose in follicular fluid from level in blood significant ($P< 0.01$). These results suggest that the oocyte and granulosa cells of cows grow and mature in biochemical environment and significant correlation between the composition of follicular fluid and serum to indicate that metabolic changes in serum will be reflecting on the follicular fluid and therefore, may affect on the quality of oocyte and the granulosa cells.

المقدمة:

السائل الجريبي خليط معقد التركيب مؤلف من المصل والافرازات المصنعة من خلايا الجريبة (Wise, 1987) وانه مشتق من البلازما في التجويف الجريبي المبكر (Gosden *et al*., 1988) ويجهز التغذية وينظم نضوج البويضة (Krisher and Bavister, 1988) ان وجود الآيونات، الكلوكوز، الكوليسترول، البروتين والهرمونات في السائل الجريبي يؤثر على نضج واخصاب البويضة (Galli *et al*., 2003). تتولد الطاقة للبويضة من الايض التأكسدي للسكريات والأحماض الأمينيه(Rieger and Loskutoff, 1994) . تُجهز السكريات مستوى عالي للنضج وتكوين الاحماض الامينية للنوى البدائية في البويضة المخصبة التي تؤدي الى تحسين طاقة الأيض للبيوضة (Lim *et al*., 1999). للسائل الجريبي علاقه وظيفيه بالبيضه اذ يديم توقف الأنقسام الخيطي، يحافظ على البيضه من التحلل ويؤدي الى بروز البويضه على سطح الجريبه عند الإباضه (Smitz and Cortvrindt, 1999) . كما ان للسائل الجريبي علاقه بانجذاب النطفة للبيوضه خلال عملية الأخصاب(Rodriguez *et al*., 2001)، يؤثر على تفاعل غطاء الراس (Acrosome) للنطفة ويعادل التأثيرات المعدنيه العكسيه على البيوضه (Wang *et al*., 2001). ان الهدف من الدراسه هو تحديد تركيز المكونات الأيضيه، الايونية والهرمونيه في السائل الجريبي وعلاقتها بتركيز هذه المكونات في الدم و معرفة تأثير هذه العلاقه على تطور البويضه.

ISSN 2072-3875

المواد وطرائق العمل

1. جمع عينات الدم

تجمعت عينات الدم من خمسة عشر بقرة بعمر 5-8 سنوات قبل الذبح من الوريد الوداجي (Jugular vein) بمحقنة طبية بعد تعقيم منطقة الوخز بالكحول الاثيلي بتركيز 70% ووضعت في انابيب اختبار معقمة ومفرغة من الهواء (Vcutainer) وحاوية على مانع التخثر، وترك الدم لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة وبشكل مائل بعد ذلك تم فصل المصل باستعمال جهاز النبذ المركزي (Centerifuge) وبسرعة 1500دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق وبعدها سحب بواسطة ماصة معقمة ويوضع في انابيب سعة 5 سنتميتر مكعب وارسل الى المختبر.

2. جمع السائل الجريبي

عزلت المبايض من نفس الأبقار بعد الذبح مباشرة في المجزرة المحلية وتوضع في حاوية تحتوي على محلول الملح الفسلجي 0.9% بعد ذلك وضعت الحاوية في صندوق بلاستيكي يحتوي على الثلج (Dooly, 1983). سُحبَ السائل الجريبي من الجريبات الناضجة ذات الاحجام من 20-25 مليميتر بواسطة محقنة طبية حجم 5 مليميتر وابرة ذات قياس 23 (Gauge 23) وبعد ازالة الجزء المدبب منها عن طريق البرد باستعمال حجر سن ناعم ليصبح غير مدبب وذلك لغرض منع تسرب السائل الجريبي عند ادخالها في الجريبة ويوضع السائل الجريبي في انابيب حجم 5 سنتميتر مكعب حاوية على مانع التخثر وترسل الى المختبر(Birth *et al*., 2002).

3. **التحليل الاحصائي**

استعملت الطرق السريرية التجاريه لتحليل العناصر وقياس نسبها في الدم والسائل الجريبي وتم استخراج المعدلات ومعامل الخطأ القياسي للمتوسطات.استمعل أختبار مربع كاي على طريقة Contingency tables في التحليل الأحصائي لمعرفة معنوية التغيرات في القيم (المتوسطات) لتراكيز المواد في الدم والسائل الجريبي(Steel and Torrie, 1960).

النتائج والمناقشة

اوضحت النتائج ان مستوى الكلوكوز في السائل الجريبي يقل عن مستواه في الدم (جدول رقم 1) اذ ان الكلوكوز يلعب دور مهم في عمليات الايض المبيضي وانه مصدر مهم للطاقة في المبيض خلال تايضه في الطرائق اللاهوائية (Anaerobic pathways) التي تؤدي الى تكون اللاكتوز (Landan *et al*., 2000). يزداد تركيز الكلوكوز بازدياد حجم الجريبة وهذا يتفق مع Leroy *et al*. (2004) في الابقار و Chang *et al*. (1976) في الخنازير. تحتوي الجريبات الكبيرة على عدد قليل من الخلايا الحبيبية تستهلك الكلوكوز من السائل الجريبي وتفرز اللاكتوز بكميات كبيرة فيه وهذا يفسر قلة تركيز الكلوكوز في السائل الجريبي عن الدم(Gull *et al*., 1999). ان زيادة النفاذية للحواجز (Barrirer) التي تفصل الدم عن الجريبة خلال النمو الجريبي سبب اخر لقلته في السائل الجريبي عن الدم (Thakur *et al*., 2003) ان قلة تركيز الكلوكوز في السائل الجريبي عن الدم تتفق مع (Orsi *et al*., 2005) في الابقار.

ان مستوى البروتين في السائل الجريبي اكثر من مستواه بالدم (جدول رقم 1) وهذا عكس ماتوصل اليه Singh *et al*. (1999) و Mishra *et al*. (2003) اذ بينوا ان هناك توازن في تركيز البروتين بين البلازما الدموية والسائل الجريبي. ان هناك تشابه في تركيز البروتين في الجريبات الصغيرة والكبيرة (Thngavel and Nayeem, 2004; Leroy *et al*., 2004).

يشتق الكوليسترول في السائل الجريبي من مصدرين اولهما اعادة التصنيع الخلوي من الخلات (Acetate) والثاني الشحوم البروتينية (Lipoprotein) في بلازما الدم (Bordoloi *et al*., 2000). ان تركيز الكوليسترول في السائل الجريبي اكثر من مصل الدم (جدول رقم 1) وبمعنوية ($P< 0.01$) وهذا يتفق مع Huang *et al*. (2002) في الخنازير و(2004) Thngavel and Nayeen في الجاموس. يزداد تركيز الكوليسترول في الجريبات الكبيرة وهذا يتفق مع Thakur *et al*. (2003) و Mishra *et al* . (2003) .

ISSN 2072-3875

الجدول رقم (1) المكونات الايضية في السائل الجريبي وبلازما الدم

composition	Follicular fluid	plasma	Significance
Total protein (g/liter)	**135.57 ± 15.37[a]**	**70.71 ± 2.90[b]**	**P<0.01**
Glucose (mmol/Liter)	**4.48 ± 0.08[b]**	**5.31 ± 0.13[a]**	**P<0.01**
Cholesterol (mg/dl)	**236.25 ± 24.61[a]**	**155.06 ± 21.01[b]**	**P<0.01**

لوحظ زيادة في تركيز الكالسيوم في السائل الجريبي عن بلازما الدم (جدول رقم 2) وهذا يتفق مع Lwata *et al.* (2004) في الابقار، Kaur *et al.*(1997) في الجاموس و Gosden *et al.* (1988) في النعاج. وان سبب زيادة الكالسيوم في السائل الجريبي عن بلازما الدم هو الزيادة الحاصلة مع تطور الجريبة لان الكالسيوم يلعب دور مهم في تكوين الستيرويدات، تنظيم هرمونات القند و عملية الاباضة Lwata *et al.* (2004).

اما بالنسبة لتركيز البوتاسيوم فكان في السائل الجريبي اعلى منه في الدم (جدول رقم 2) وهذا يتفق مع Wise (1987) ، Kaur *et al.*(1997) في الجاموس و Bordoloi *et al.* (2000) في المعز اذ ذكروا بان البوتاسيوم يقل مع تطور حجم الجريبة لزيادة استعمال الكلوكوز من قبل الجريبة المتطورة التي تؤدي الى نقل البوتاسيوم من مواقع خارج الخلية الى داخل الخلية (Chang *et al.*, 1976).

اظهرت الدراسة ان تركيز الصوديوم في السائل الجريبي اقل من مستواه في الدم (جدول رقم 2) وهذا لايتفق مع Nandin *et al.*(2007) الذي ذكر بان الصوديوم يزداد مع كبر حجم الجريبة لزيادة حيويتها في تصنيع هرمون الاستروجين وان زيادة حجم الجريبة هو نتيجة عبور الماء من الدم الى السائل الجريبي وهذا يتطلب اختلاف بالضغط الازموزي عبر جدار الجريبة وان زيادة تركيز الصوديوم في الجريبة الناضجة سوف يخلق انحدار ازموزي عبر الوسطين (Sharma *et al.*, 1995). اما ايون الكلوريد فقد بينت الدراسة ان مستواها في السائل الجريبي هو اقل من الدم (جدول رقم 2) وبمعنوية ($P< 0.01$) وهذا يتفق مع Leroy *et al.* (2004) ولايتفق مع Lwata *et al.* (2004).

الجدول رقم (2) المكونات الايونية والهرمونية في السائل الجريبي وبلازما الدم

composition	Follicular fluid	Plasma	Significance
Sodium (mmol/liter)	**124.17 ± 327[b]**	**137.17 ± 3.68[a]**	**P<0.01**
Potassium (mmol/liter)	**14.20 ± 0.86[a]**	**5.14 ± 021[b]**	**P<0.01**
Calcium (mg/dl)	**10.58 ± 0.13[a]**	**9.17 ± 0.33[b]**	**P<0.01**
Chloride (mmol/liter)	**78.20 ± 3.35[b]**	**101.20 ± 2.08[a]**	**P<0.01**
Insulinng/dl	**8.60 ± 0.15[a]**	**7.17 ± 0.12[b]**	**P<0.01**

ان تركيز الانسولين في السائل الجريبي هو اكثر من تركيزه بالدم (جدول رقم 2) يزاد تركيز الانسولين في الجريبات الكبيرة، لما لهذا الهرمون من اهمية اذ يؤثر على المبيض، الخلايا الحبيبية، خلايا القراب (Theca cells) وعلى عملية تكوين الستيرويدات (Miyoshi *et al.*, 2001) . الانسولين مهم لنضج الجريبة وتحفيز مستقبلات الهرمون اللوتيني (LH) على الخلايا الحبيبية (Opsomer *et al.*, 1999). يؤثر هبوط تركيز الانسولين في السائل الجريبي على تطور ونضوج البويضة وعدم الاستجابة لهرمون الاباضة (LH) وبالتالي يؤدي الى عدم الاباضة وحصول تكيس المبايض (Spicer *et al.*, 2002)

ونستنتج من الدراسة بان السائل الجريبي يتكون من البروتينات، الهرمونات والايونات المتعددة وكل هذه المكونات تختلف تراكيزها في السائل الجريبي والدم مع تطور الجريبة وكل هذا ينعكس على نوعية البويضة وتطورها وعلى الاباضة والاخصاب وان أي نقص لهذه المكونات في الدم ينعكس على تركيزها في السائل الجريبي لذا فان تعديل نسبها في الدم قد يؤثر في تحسين خصوبة الحيوان.

المصادر :

Birth, A.; Iotte, S., Tina, J., Lngird, B. and Torben, G. (2002). Invitro Maturation of Cumulus Oocyte complexs in undiluted fluid: effect on nuclear maturation, pronuleus formation and embryonic development. Biol. Reprod; (64) 1801- 07.

ISSN 2072-3875

Brodoloi, P.K., Sarmah, B.C., Dutta, D.J. and Deka, B.C. (2000). Follicular fluid cholesterol in goat ovary. Indian Vet. J. (77) 638-639.

Brodoloi, 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.

Chang, S.C.S., Jones, J.D., Ellefson, R.D and Ryan, R. J. (1976). The Porcine ovarian follicle: Selected chemicalanalysis of follicular fluid at different developmental stages boil. Reprod . (15) 321-328.

Dooly, V. G. (1983). Follicular Oocytes maturation foruse in bovine exogenous and in vitro fertilization. pH. D. Thesis, Michigan state University, U.S.A.

Galli, C., Duchi, R., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina and Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. Theriogenology. (59) 599 – 616 .

Gosden, R.G., Hunter, R.H., Telfer, E., Torrance, C. and Brrown, N. (1988). physiological factor underlying the formation of ovarian follicular fluid. Journal of Reproduction and fertility. (82) 813-825.

Gull, I., Geva, E., Lerner-Geval, L. T., Wolman, I. and Amit, A. (1999). Anaerobic glycol sis. The metabolism of preounlatory human oocyte. European Journal of obstetrics, Gynecology and Reproductiv Biology. (85) 225-228.

Huang, W.T., Lu, S.G. and Tang, P.C. (2002). Biochemical composition of follicular fluid and the effects of culture conditions on the in vitro development of pig oocytes. Asian Aust. J. Anim. Sci. (15) 1403-1411.

Kaur, J. Takkar, O.P. and Khera, K.S. (1997). Mineral elements in follicular fluid of Buffalo ovary. Indian J. Anim. Reprod. (18) 36-38.

Krisher, R.L. and Bavister, B.D. (1998). Responses of oocytes and embryos to the cullure environment theriogenology. (49) 103-114

Landau, S., Braw-Tal, R., Kaim, M., Bor,A. and Bruckental, L. (2000). Preovulatory follicular Status affects the insulin and glucose content of the follicles in high yielding dairy cows.Anim. Reprod. sci. (64) 299-314.

Leroy, J.L., Vanholder, T., Delanghe, J.R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bol Pe de kruif, A., metabolit and Ionic. Composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. Anim Reprod Sci.2004 80. (3-4) 201-11.

Lim, J. M., Lee, B.C., Chung, H.M., Ko, J.J., Park, S.E., Cha, K.Y. and Hwang, W.S. (1999). In vitro maturation and invitro fertilization of oocytes cultured in achemically defined, Protein. free medium: effects of carbohydrates and amino acids. Reproduction, Fertility and Development. (11) 127- 132 .

Lwata, H., Hashimoto, S., Ohota, M., Kimura, K., Shibano, K. and Miyake, M. (2004). Effects of follicular size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and development competence of bovin oocytes. Reprod. (127) 159-164.

Mishra, O.P., Pandey, J.N. and Gawandery, P.G. (2003). Study on biochemical constituents of caprin ovarin follicular fluid after super avulation. Asian Aust. J.anim. Sci. (16)1711-1715.

Miyoshi, S., Pat, J.L. and Palmauist, D.L. (2001). Effects of propylene glycol drenching on energy balance plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dainy cows. Anim reprod. Sci. (68) 29-43

ISSN 2072-3875

Opsomer, G., wensing, T., Loevens, H., Coryn, M. and De kruif, A. (1999b). In sulin risistance : the link between metabolic disorders and cystic varian disease in high yielding dairy cows ? Anime Repord. Sci. (56) 211-222

Orsi, N., Gopichandran, N., Leese, H.J., Picton, H.M. and Harris, S.E. (2005). Flactuations in bovine ovarian follicular fluid composition thought the oestrous cycle. Repord. (129) 219-228.

Rieger, D. and Loskutoff, N.M. (1994). Change in the inetabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during inaturation of cattle oocytes in vitro. Journal of Reproduction and Fertility. (100) 257- 262.

Rodriguez, H., Torres, C., Valdes, X., Pastor, L.M., Maccallini, G. and Bustos – obregon, E. (2001). The acrosomal reaction is stallion spermatozoa: Inductive effect of the mare preovulatory follicular fluid . Biocell. (25) 115- 120.

Sharma, R.K., Vats, R. and Sawhney, A. (1995). Changes in electrolytes of antral follicles in goat. Indian J. Anim. Reprod. (16) 18-21.

S. Nandin, V.Girish, B. Kumar, M. Manjunatha and P.S.P. Gupta. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. Journal compilation 2007 Japanes society of Developmental Biologist.

Singh, D., Sharma, M.K. and pandey, R.S. (1999).Biochemical and hormonal characterization of follicles from follicular and luteal phase ovaries of goat and sheep. Indian.J. Exp. Biol. (37) 434-438.

Smitz, J. and Cortvrindt, R. (1999). Oocyte invitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. Human Reproduction. (14) 145-161.

Spicer, L.J., Chamberlain, C.S. and Maciel, M.S. (2002). Infuluence of gonadotropins on insulin and insulin – like growth factor – 1 induced steroid production by bovine granulosa cells . Domest Anim. Endocrin . (22) 237-254 .

Stell, R. G. and Torrie, J. H. (1960). Principles and procedures of statics. 2nd MCGraw – Hill Book company. Newyork.

Thakur, R.S., Chauhan, R.A.S. and singh, B.K. (2003). Studies on biochemical constituents of caprin follicular fluid. Indian Vet. J. (80) 160-162.

Thangavel, A. and Nayeem. M. (2004). Studies on certain biochemical profile of the buffalo follicular fluid. Indian Vet. J. (81) 25-27.

Wang, Y., Storeng, R., Dale, P.O., Abyholm, T. and Tanbo, T. (2001). Effecte of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility ofhuman spermatozoa invitro . Gynaecology and Endocrinology. (15) 286- 292.

Wise, T. (1987). Biochemical analysis of bovin follicular fluid: albomin, total protein lysosomol enzymes, ions, steroid and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank atresia classification and ay of oestrans cycle. J. Anim. Sci. (46) 1153-1169.

ISSN 2072-3875