

Influence of The dominant follicle on the yield of intact oocytes from subordinate follicles of local cows .

Dr. Zohair Ibrahim Jabbour*¹

(Received 30 / 10 / 2018. Accepted 27 / 2 /2019)

□ ABSTRACT □

The aim of this research was to determine the influence of the dominant follicle on morphological characteristics of cumulus oocyte complex consequently on the yield of morphologically intact oocytes for in vitro culturing. Oocytes were collected from cow ovaries of animals after slaughter. Ovaries were divided into the following groups: (a) ovaries (n=32) with dominant follicle; (b) ovaries (n=20) without dominant follicle. Collected oocytes from subordinate follicles with diameters (2-8 mm), were morphologically evaluated. The results showed that, the highest percentage intact oocytes yield (11.75 ± 0.42) was recorded in ovaries without dominant follicle ,whereas the lowest percentage of intact cells were recorded in ovaries with dominant follicle (8.6 ± 0.67). There was significant difference ($p < 0.01$) between the two groups for intact cells.

Keywords: oocyte, cumulus cells, dominant follicle, subordinate follicles, morphological evaluation.

¹ *Associate Prof ,Dep animal production , Fac.Agric; Teshreen Univ; Lattakia,Syria

تأثير الجريب السائد على مردودية البييضات السليمة في الجريبات الثانوية للأبقار المحلية

د. زهير إبراهيم جبور^{*1}

(تاريخ الإيداع 30 / 10 / 2018 . قبل للنشر في 27 / 2 / 2019)

□ ملخص □

كان الهدف الرئيس من هذا البحث، تحديد تأثير الجريب السائد على الخصائص الشكلية، وعلى القدرة التطورية لمعدّد البييضة- خلايا الرُّكمة (الكومولوس)، وبالتالي على مردودية البييضات السليمة المأخوذة من الجريبات الثانوية والصالحة للإخصاب والإخصاب *In vitro*.

فُسّمت المبايض المدروسة إلى مجموعتين : مجموعة أولى لاحتوي جريباً سائداً (n=20) ومجموعة ثانية تحتوي جريباً سائداً (n=32) وتم تقييم البييضات المأخوذة من جريبات ثانوية بأقطار (2 - 8) ملم على أساس الخصائص الشكلية لمعدّد البييضة - خلايا الرُّكمة.

بينت النتائج في هذا البحث، أنّ مردودية البييضات السليمة شكلياً، في المبايض تختلف حسب درجة تطور الجريبات، ففي المبايض التي لاتملك جريباً سائداً كانت المردودية أعلى، إذ بلغت (0.42±11.75)، بالمقارنة مع المبايض، التي تملك جريباً سائداً، إذ بلغت هذه المردودية وسطياً (0.67± 8.6) بييضة، وقد كان الفرق معنوياً بين المجموعتين (p<0.01).

الكلمات المفتاحية : بييضة ، الرُّكمة (الكومولوس)، جريب سائد، جريبات ثانوية، تقييم شكلي .

¹*استاذ مساعد - قسم الإنتاج الحيواني- كلية الزراعة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية .

مقدمة :

في الحيوانات الزراعية، كما في الأنواع الحيوانية المهتدة بالإنقراض، لاتزال التقانات الحيوية التناسلية كالإخصاب المختبري *In vitro* ، ونقل الأجنة والإستساح ، والتعديل الوراثي، تملك تأثيراً محدوداً في زيادة الكفاءة التناسلية، وفي الإستفادة من المخزون الوراثي للإناث، نظراً لمحدودية نسبة البويضات المخصبة .

وعلى الرغم من أنّ التحفيز على الإباضة المتعددة بالمنشطات المنسلية (Gonadotropins)، يزيد عدد البويضات المتحررة في الدورة الجنسية الواحدة، وبالتالي زيادة عدد الأجنة *In vivo*، إلا أنّ الإستجابة للحثّ الهرموني ماتزال متفاوتة المردودية، بعض النظر عن الآثار الجانبية، التي يمكن أن تسببها عملية الحثّ الهرموني، كإضطراب التوازن الهرموني للأنتى، والمقاومة المناعية للإستجابة للحثّ الهرموني عند تكرار المعاملة بالهورمون نفسه. لذا، فإنّ الإنتاج والإخصاب المختبري *In vitro* للبويضات غير الناضجة، المأخوذة من الجريبات، يشكّل طريقة بديلة، لزيادة عدد البويضات المخصبة عند الثدييات، ومنها الحيوانات الزراعية، وبالتالي زيادة النسل ذي القيمة الوراثية والإنتاجية العالية (Hark & Zhao, 2005).

مع الأخذ بعين الإعتبار، أنّ هذه التقانة لاتزال تتسبب بجملة من المشاكل للنسل الناتج منها، ولعلّ أكثرها شيوعاً متلازمة النسل الضخم (Thompson, 1997). Large offspring syndrome.

ونظراً لأنّ البويضات تنمو داخل الجريب، فإنّ عدداً من العوامل يؤثّر على سلامتها وقدرتها التطورية اللاحقة إلى بيضة ناضجة قادرة على الإخصاب .

من هذه العوامل، حجم الجريب (قطره)، ودرجة تدهور خلايا الرّكمة، وحالة الأغلفة المحيطة بالبيضة، وكذلك وجود أو غياب الجريب السائد، ووجود الجسم الأصفر ودرجة تطوره، أو غيابه (Hagemann, 1999).

وقد بات من المعروف بأنّ التطور الجريبي في أغلب الحيوانات الزراعية، ومنها الأبقار يحدث على شكل أمواج قد تصل إلى ثلاث خلال الدورة الجنسية الواحدة . والموجة الجريبية عبارة عن تطور منظم لمجموعة من الجريبات تحت تأثير المنشطات المنسلية (FSH, LH)، والتي تزداد في الحجم مع تقدم الموجة، إنما أغلبها يتراجع ويتدهور في عملية تسمى الرّيق (Atresia) ، وهذه الجريبات التي تتدهور تعرف بالجريبات الثانوية Subordinate follicles والتي يبلغ أقصى قطر لها نحو 8 ملم، أما الجريب الذي يستمر بالتطور، فيعرف بالجريب السائد Dominant follicle، والذي يتراوح قطره بين 10 - 20 ملم (Savio et al. 1988).

يترافق تطور الجريب السائد بإزدياد عدد مستقبلات LH في خلايا الخلايا الحبيبية (الغرانيولوزا) وازدياد الإسترايول وبتكريز عالٍ من عامل النمو الشبيه بالإنسولين IGF1 (Ginther, 2018). إذ أنّ هذا العامل يلعب دوراً مميزاً في النمو الجريبي، وفي زيادة الفعالية الوظيفية لكل من FSH و LH، وكذلك يؤمّن بمفرده تكاثر الخلايا الحبيبية (الغرانيولوزا)، لكنه يؤثّر تآزرياً مع المنشطات المنسلية (Gonadotropins) على تمايز الخلايا الجريبية، (Zeilak - Steciwko and Evans, 2016).

إنّ نمو البويضات داخل الجريبات، يتم بواسطة التأثير الخلوي Cell signaling بين البويضات والخلايا المحيطة بها إذ أنّ الجريب يؤثّر على البيضة بواسطة ثلاثة طرز خلوية هي خلايا تيكا (الخلايا الغمدية) وخلايا الغرانيولوزا (الخلايا الحبيبية) وخلايا الرّكمة (الكومولوس)، وهذه الطبقات الخلوية هي التي تبقي البويضات في حالة الخمود الميوزي (الإختزالي)، حتى لحظة الإباضة وتوفر البيئة التي تمكّن البويضات من اكتساب القدرة التطورية لاحقاً، إذا أنّ هذه الطبقات الخلوية على تماس مع بعضها البعض من جهة، ومع البيضة من جهة ثانية، من خلال الهرمونات وعوامل

النمو المختلفة، وهذه العلاقات الخلوية مع البييضات لاغنى عنها من أجل نمو البييضات، والوصول إلى النضج النووي والسيتوبلازمي المتزامن. (Hammond *et al.*, 1988).

لذلك يُعتمد في تقييم صلاحية البييضات للإنبضاج المختبري، على الحالة الشكلية لمعقد البييضة - الزكمة Cumulus-oocyte complex (COCs). مع الأخذ بعين الاعتبار أن معقد COCs في الجريبات المختلفة الحجم، يختلف في احتياجاته الغذائية، ولذلك فإن تقانة الإنبضاج المختبري (IVM) *In vitro maturation* تحتاج تحسيناً، يأخذ بالحسبان هذه الاختلافات، من أجل تحسين القدرة التطورية للبييضات في المراحل اللاحقة للإنبضاج المختبري. (Monniaux *et al.*, 1997).

تعتبر أبعاد الجريبات المعيار الرئيس في انتخاب البييضات بغرض الإنبضاج والإخصاب المختبري، مع أن الجريبات التي تمتلك نفس الأبعاد قد تتواجد فيها البييضات أحياناً في مراحل فيزيولوجية مختلفة، إلا أن قدرة البييضات على التطور لاحقاً بعد إنبضاجها مختبرياً، تتأثر بشكل رئيس بوجود الجسم الأصفر، أو بوجود الجريب السائد في المبيض، الذي أخذت منه (Vassena *et al.*, 2003).

ونظراً لأن الحصول على نسل أكبر من الحيوانات المتفوقة وراثياً وإنتاجياً، يشكل هدفاً رئيساً لدى مربي الحيوان، فإن استخدام مبايض الأبقار المذبوحة أو المُنسقة، يشكل مصدراً إضافياً للبييضات، وبالتالي للأجنة التي يمكن تربيتها والحصول عليها مختبرياً *In vitro*. ففي طريقة التناسل التقليدية أو العادية نحصل على إياضة واحدة كل دورة شبق، بينما يمكننا أن نحصل على 10 - 15 بيضة من مبايض الأبقار المذبوحة، صالحة للإنبضاج والإخصاب المختبري *In vitro*.

إنّ التحدي التقني، لتحقيق هذا الهدف هو زيادة نوعية وكمية البييضات، لإنتاج الأجنة القادرة على التطور وإعطاء النسل. لذلك يجري التركيز على تأمين تجانس مجاميع البييضات، بالإعتماد على خصائصها المورفولوجية قبل تحصيلها، لإنبضاجها وإخصابها مختبرياً *In vitro*. (Merton, 2003). بينت الدراسات السابقة أن مردودية البييضات، التي تطورت إلى مرحلة البلاستولا، والمأخوذة من جريبات في مرحلة النمو ومقاربة في الحجم، هي أكبر من تلك المأخوذة من مبايض تملك جريباً سائداً (Hagemann, 1999).

وقد لوحظ أيضاً أن الجريبات الثانوية المتواجدة تحت تأثير الجريب السائد، تتميز بمعدل مرتفع من الموت الخلوي المبرمج Apoptosis، وذلك بالمقارنة مع مرحلة النمو الجريبي، وهذا يدل على ميل نحو التدهور الخلوي تحت تأثير الجريب السائد، أي أن الجريب السائد يؤثر على قدرة البييضات التطورية، حتى أنه يثبط الإستجابة لهورمون FSH داخل المبيض (Manjunantha *et al.*, 2007; Wolfsdorf 1997).

ومن الملفت أنه في الجريبات الصغرى، المتواجدة تحت تأثير الجريب السائد، يكون تمثّل الغلوكوز أقل، أي أن الإحتياجات الغذائية، تتفاوت حسب مرحلة التطور الجريبي (Hagemann, 1999). يُعدّ الإنخفاض المستمر في خصوبة أبقار الحليب، مشكلة حقيقية في العقود الأخيرة، فقد انخفض الحمل من التلقيح الأول بعد الولادة، من 41,2% إلى 53% (Katsuhisa *et al.*, 2015).

تشير أغلب الأبحاث، إلى أن العوامل الرئيسية المسببة لإنخفاض الخصوبة، هي التغذية والتحسين الوراثي، والتهابات الرحم (Sheldon *et al.*, 2009)، لكن الخصوبة، كما يرى آخرون، هي خاصية متعددة العوامل، وانخفاضها يعود إلى جملة من العوامل الوراثية والبيئية والإدارية، لذلك يصبح من الصعب تحديد السبب الدقيق لهذا الإنخفاض. (Walsh *et al.*, 2011).

حالياً، يعتبر احتياطي المبايض من البويضات، هو العامل الأكثر أهمية في تحديد خصوبة الماشية ومنها أبقار الحليب، إذ يعبر احتياطي المبايض من البويضات، عن قدرتها على إنتاج بويضات ذات قدرة تطويرية وإعطاء حمل ناجح، وطرح هورمونات جنسية محفزة على دورات الشبق وعلى استمرار الحمل بعد الإخصاب (Velde & Pearson.,2002).

يتأثر احتياطي المبايض من البويضات، بالعوامل الوراثية والإدراية (الرعاية)، فمثلا عندما تكون التغذية تحت المستوى المطلوب في مرحلة الحمل، بالإقتران مع العوامل الوراثية والبيئية، فإنها تؤثر على احتياطي المبايض من البويضات عند الأبقار، ويعتبر عدد الجريبات الكهفية أو المُجَوِّفة Antral follicles، هو المؤشر الرئيس على احتياطي المبايض من البويضات، لأن عدد الجريبات الكهفية يعكس عدد الجريبات الأولية في المبايض (Ireland et al.,2008).

من هنا تتبثق أهمية هذا البحث في دراسة تأثير الجريب السائد على مردودية البويضات الصالحة شكليا للإنضاج والإخصاب المختبري *In vitro*

طرائق البحث و موادّه:

أجري البحث في مخبر فيزيولوجيا وصحة الحيوان ،في كلية الزراعة في جامعة تشرين، إذ تم الحصول على المبايض من الأبقار المحلية بعمر (5-7) سنوات، وهي أبقار منسقة وتم ذبحها في المسلخ المحلي، في اللاذقية . وضعت المبايض في ترمس حراري يحوي سيروماً ملحياً،ونقلت إلى المختبر خلال ساعتين ،وقبل أن تُعزل البويضات من المبايض ،تم استبعاد المبايض التي تحوي جسماً نرفياً أو جسماً أصفراً حليماً، وتلك التي يغلب عليها النسيج الشحمي .

فُسِّمَت المبايض الباقية إلى مجموعتين :

المجموعة الأولى، ذات المبايض التي لاتحتوي جريباً سائداً (n=20) ، والمجموعة الثانية ذات المبايض ،التي تحتوي جريباً سائداً (n =32) .

عُزِلت البويضات من المجموعتين من جريبات بأقطار 2 - 8 ملم، وغُسِلت بمحلول ملحي لأربع مرات، ثم نقلت إلى طبق بتري يحتوي محلولاً ملحياً، أُضيف إليه الهيبارين بتركيز جزء واحد من المليون /مل،لمنع تلاحق الخلايا مع بعضها البعض، ولتسهيل عملية العدّ والتقييم. تم تصنيف البويضات شكلياً إلى ثلاثة أنواع : خلايا سليمة ،وخلايا متدهورة ، وخلايا عارية وفق تصنيف(De Loos et al.,1989).

وقُسمَت البويضات وفق التصنيف السابق إلى:

1 - الخلايا السليمة : الرُكْمَة متراصة في عدة طبقات (غير منتشر) ، والأووبلازم حُببي متجانس، المنطقة الشفافة Zona Pellucida دائرية بشكل منتظم، وغير متجددة كما في الشكل (1).



الشكل(1): خلية سليمة

2 - الخلايا المتهورة : الرُكمة هشة، غير مترابطة، أو متوصلة، أو مُعندة، والأوبلازم غير متجانس، او متوصل، والمنطقة الشفافة متجعّدة كما في الشكل (2) .



الشكل (2) خلية متهورة

3 - الخلايا العارية : أي غير مغلفة بأي طبقة من الرُكمة كما في الشكل (3).

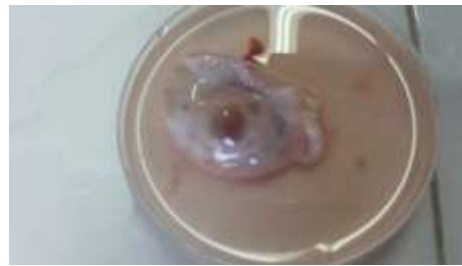


الشكل (3) خلية عارية

استخدم في البحث 52 مبيضاً، منها 32 مبيضاً تحتوي جريباً سائداً كما في الشكل رقم (4) و 20 مبيضاً لا تحتوي جريباً سائداً كما في الشكل (5). سحب منها 825 بيوضة، خضعت جميعها للتقييم الشكلي .



الشكل (5) مبيض لا يحتوي جريباً سائداً



الشكل (4) مبيض يحتوي جريب سائد

أُجري التحليل الإحصائي للمعطيات باستخدام تحليل التباين ANOVA، إذ أخذ بالحسبان متوسط عدد البييضات السليمة والمتهورة والعارية في كل مبيض .

النتائج والمناقشة:

تبين المعطيات الواردة في الجدول (1) أن متوسط عدد البييضات السليمة في كل مبيض من المبايض، التي لا تحتوي جريباً سائداً، قد بلغ (0.42 ± 11.75)، بينما بلغ هذا المتوسط في المبيض، الذي يحوي جريباً سائداً (8.6 ± 0.67).

الجدول (1): تأثير الجريب السائد على مردودية البييضات الصالحة للإنتاج *In vitro*

متوسط الخلايا المأخوذة من المبايض			العدد الكلي للبييضات المأخوذة	عدد المبايض	نوع المبيض
الخلايا المتدهورة	الخلايا العارية	الخلايا السليمة			
4.7±0.57 a	2.8±0.46 a	8.6±0.67 b	419	32	يحتوي جريباً سائداً
2.1±0.37 b	1.45±0.38 b	11.75±0.42 a	306	20	لا يحتوي جريباً سائداً

تشير الأحرف المختلفة في الأعمدة إلى وجود مغنوية عند $P < 0.01$.

بلغ متوسط عدد البييضات المتدهورة (2.1 ± 0.37) في المبيض، الذي لا يحتوي جريباً سائداً، بينما بلغ (4.7 ± 0.57) في المبيض، الذي يحتوي جريباً سائداً، أما متوسط عدد الخلايا العارية، فكان (1.45 ± 0.38) في المبيض التي لا تحتوي جريباً سائداً و (2.8 ± 0.46) في المبيض، التي تحتوي جريباً سائداً، وقد كان الفرق مغنويًا بالنسبة لكل المجموعات الخلوية بين المبايض، التي تحتوي جريباً سائداً، وتلك التي لا تحتوي جريباً سائداً، حيث ($p < 0.01$). إن هذه الأرقام تظهر التأثير الحاسم للجريب السائد على مردودية البييضات السليمة، وعلى معدل تدهور البييضات في المبايض.

تلعب نوعية خلايا الكومولوس دوراً هاماً في تحديد درجة إخصابية البييضات، إذ يعتقد بأن الإخصابية المنخفضة للبييضات تعود إلى انخفاض نوعية خلايا الكومولوس، فقد ثبت أن تعبير بعض الجينات في خلايا الكومولوس هو مؤشر دال على نوعية هذه الخلايا، وعلى إمكانية التنبؤ بالقدرة التطورية اللاحقة للبييضات، وخاصة جين (مورثة) تخليق الهياالورونان (HAS2). (Salhab et al., 2010). ويلعب هورمونا الإنهيبين والإسترايول المفريزين من قبل الجريب السائد، دوراً هاماً في قمع تطور الجريبات الثانوية، عن طريق تثبيطهما لإفراز FSH الذي يعتبر أساسياً في نمو وتطور الجريبات الثانوية (Ginther et al., 1999, Wilt bank et al., 2002). وكذلك فإن إشباع مستقبلات هورمون LH في الخلايا لحبيبية للجريب السائد، يؤدي إلى إنحراف في معدل نمو الجريبات الثانوية، بينما يستمر الجريب السائد بالنمو، فإن الجريبات الثانوية تتوقف عن النمو وتضمحل تدريجياً، وبعضها يتدهور سريعاً، نظراً لأنها تنمو في وسط فقير بهورمون FSH. (Adams et al., 2008).

يسبب الجريب السائد إنخفاضاً في تركيز FSH، الذي يرافقه إنخفاض في عدد الجريبات الباقية القادرة على النمو اللاحق، الأمر الذي يؤكد الدور القامع للجريب السائد في نمو وتطور جريبات لاحقة، ويعود ذلك إلى وجود عوامل مثبّطة يفرزها وتمنع تطور جريبات أخرى، منها الإنهيبين والإسترايول بمستويات عالية، التي تتسبب وفق آلية العلاقة العكسية السالبة في إنخفاض طرح FSH من قبل الفص الأمامي للغدة النخامية، الذي يؤدي بدوره إلى تدهور الجريبات الصغيرة، بينما يستمر الجريب الكبير بالتطور، ويتجنب التعرض لعملية التدهور، بالتحوّل من الإعتماد على هورمون FSH إلى الإعتماد على هورمون LH، (Bulnes-Gonzalez et al., 2004).

على أية حال لا يمكن الجزم في أنّ تأثير الجريب السائد، أو الجريبات الكبرى على تطور الجريبات الثانوية، يتم فقط بواسطة قمع إفراز FSH في الدم، أو فيما إذا كانت هنالك آليات أخرى أو عوامل تسبب التثبيط المباشر لتطور الجريبات على مستوى المبيض نفسه، الأمر الذي يقتضي إجراء دراسات لاحقة لنفي أو تأكيد ذلك.

وعليه ، فإن Webb وآخرين (1999) يفترضون إمكانية وجود آلية أخرى يستطيع الجريب السائد من خلالها تثبيط نمو الجريبات الثانوية ، وذلك بإفرازه عوامل تثبيطية متواجدة في السائل الجريبي نفسه ، منها الإنهيبين الذي يثبّط تكاثر الخلايا الحبيبية التي تلعب دوراً هاماً في تطور الجريبات نفسها. أما البعض الآخر من هذه العوامل المثبّطة لم تتحدّد طبيعته بعد .

وإضافة إلى ذلك فإن الجريبات الثانوية ، المأخوذة من مبايض تحتوي جريباً سائداً ، تتميز بمعدّل مرتفع من الخلوي المبرمج (Apoptosis) ، بالمقارنة مع الجريبات المتواجدة في مرحلة النمو الجريبي ، المأخوذة من مبايض لا تحتوي جريباً سائداً (Manjunantha *et al.*, 2007; Wolfsdorf 1997). وقد يفسر هذا المعدل المرتفع للموت الخلوي المبرمج تحت تأثير الجريب السائد إرتفاع نسبة المؤشرات التدهورية في البييضات المأخوذة من المبايض التي تحتوي جريباً سائداً، نظراً لأن هذه البييضات قد تطورت في جريبات تعاني طرزها الخلوية (الخلايا الغمدية والحبيبية والرّكّمة المتواجدة على تماس مع البييضات) من الموت الخلوي المبرمج ، وبالتالي إختلال التآثر الخلوي Cell signaling بين البييضات والطرز الخلوية المذكورة .

وقد وجد Ginther (2018) ، أن الجريب السائد يتميز بإحتوائه على تركيز عالٍ من عامل النمو الشبيه بالإنسولين IGF1 ، الذي يلعب دوراً في النمو الجريبي وفي تكاثر خلايا الغرانولوزا ، وإنخفاض محتوى الجريبات الثانوية من هذا العامل ، وربما يفسّر ذلك ما وجده Hagemann (1999) من أنّ الجريبات الصغرى المتواجدة تحت تأثير الجريب السائد ، تتميز بتمثّل أقلّ لسكّر الغلوكوز ، وبالتالي زيادة معدّل تدهورها .

ويجدر التنويه بأن عملية إزالة الجريب السائد قبل التحفيز الهرموني على الإباضة الفائقة Superovulation ، قد زادت مردودية الأجنة الحية في كل عملية حث هورمونية من 3.9 إلى 5.4 جنين من البقرة الواحدة، وهذا ما يؤكد الدور السلبي للجريب السائد على تطور مجاميع الجريبات الثانوية، (Merton *et al.*, 2003).

وكذلك ، فإنّ قدرة البييضات على استئناف الإنقسام الإختزالي والإتحاد مع الحيوان المنوي، والنقلُج بعد الإخصاب والتطور الجنيني ، الذي يعطي نسلأ سليماً ، يشكل التحدي الرئيس أمام تقانة الإخصاب المختبري *In vitro* . لأن المعدّل المرتفع من موت الأجنة في مراحل تطورها المبكرة ، مرتبط ببراءة نوعية البييضات، أي بالعوامل الأمومية (Sirard *et al.*, 2006).

الاستنتاجات والتوصيات :

- 1- المبايض التي لاتحوي جريباً سائداً هي الأعلى في مردودية البييضات السليمة شكلياً، بالمقارنة مع المبايض الحاوية على جريب سائد .
- 2- إعداد نظم تربية مختبرية وأوساط غذائية مرنة تمكّنا من الإستفادة من البييضات العارية .
- 3- ضرورة إنضاج وإخصاب البييضات المأخوذة من المبايض التي تحوي جريباً سائداً بشكل منفصلٍ عن تلك المأخوذة من المبايض التي لاتحوي جريباً سائداً، لمعرفة أيها الأفضل في مقدرته التطورية.

المراجع:

- 1-Adams, G, P; Jaiswal, R; Singh, J; Malhi, p. *Progress in understanding ovarian follicular in Cattle*. Theriogenology.2008, 69, 72-80.
- 2 -Bulnes .A. Gonzalez, Souza B. C.J.H., Campbell B.K., Baird D.T. *Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth*. Animal Reproduction Science.2004, 84, 107-119.
- 3 – De loos, F; Van Vliet, C; Van Maurik, P; Kruip, Th, A, M. *Morphology of immature Bovine oocytes*. Gamete Research. 1989,24, 197-204.
- 4- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. *Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations*.Theriogenology 1999; 52:1079-93..
- 5 –Ginther O J. *Variations in follicle-diameter deviation and a growth spurt in the dominant follicle at deviation in Bos Taurus heifers*.Animal Reproduction Science . 2018,188, Pages 155-164.
- 6 – Hagemann, L, J. *Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles*.Theriogenology.1999, 51, 449-459.
- 7 - Hammond JM, Hsu C-J, Mondschein JS, Canning SF. *Paracrine and autocrine functions of growth factors in the ovarian follicle*. J AnimSci 1988; 66(suppl 2):21-3 1. 23.
- 8 – Hark, R; Zhao, J. *Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles*.Thyriogenology. 2005, 63, 1717-1751.
- 9 - Ireland J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J. *Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adultcattle*. Biol. Reprod.2008, 79, 1219-1225.
- 11- Katsuhisa, N; Yojiro, Y; Seiji, K; Masashi, N. *Fertilizability of oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries*.Anim.Reprod.Sci, 2015, 11, 1-16.
- 12 – Manjunantha,B,M;Gupta, P,S,P; Ravindra,J,P; Devaraj,M;Ramesh,H,S; Nandi,S.*In vitro development competence of buffalo oocytes collected at various stages of estrous cycle*. Theriogenology.2007,68,,882- 888.
- 13– Merton,J,S;DeRoos,A,PW;Mullaart,E;DeRuigh,L;Kaal,L;Vos,P ,L,A,M; Dieleman,S,J. *Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technology in the cattle breeding industry*.Theriogenology.2003,59,,651-674.
- 14 - Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. *Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants*. Theriogenology.1997; 47:3 -12 - Salhab,M;Papillier,P,Perreau 15-

,Ch;Guyader,C;Dupont,J;Mermillod,P;Uzbekova,S.*Thymosins β -4 and β -10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation.* Reproduction, Fertility and Development.2010, 22, 1206 – 1221.

16 – Savio,JD;Keenan,L;Boland,MB;Roche,JF. *Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers.* J Reprod Fertil. 1988,83,663 – 671

17 -Sheldon, I.M., Price, S.B., Cronin, J., Gilbert, R.O., Gadsby, J.E. *Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle.* Reprod. Dom. Anim.2099; 44, 1-9.

18 - Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology. 2006, 65, 126–136.

19- Thompson, J, G. *Comparison between in vivo derived and in vitro produced pre-elongation embryos from domestic ruminants.* Reproduction, Fertility and Development.1997, 9, 341-354.

20- Vassena,R;Mapletoft,J, R; Allodi, S; Singh,J; Adams ,P,G. *Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status.* Theriogenology, 60, 2003,923 – 932.

21 - Velde, E.R., Pearson, P.L *The variability of female reproductive ageing.* Hum. Reprod.2002 20; 458, 141-154.

22 - Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O. *A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows.* Anim. Reprod. Sci. 2011; 123, 127-138.

23– Webb, R; Gosden.R; Tefler, E, E; Moor, R, M. *Factors affecting folliculogenesis in ruminants.* Animal science.1999, 68, 257- 284.

24 – Zeilak- Steciwko, A, E; Evans, A, C, O. *Genomic portrait of ovarian follicle growth regulation in cattle.* Reproductive Biology. 2016, 10, 1-7.