

Republic of Iraq
Ministry high education and scientific research
University of Al-Qadisiyah/College of education
Biology Department



**Effect of steroid free bovine follicular fluid and/or
treated with anti-inhibin on ovarian folliculogenesis
in mature female rats**

A Thesis

*Submitted To The Council of the College of Education, University of
AL-Qadisiyah, in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctorate of Philosoph In Biology /Animal science*

By

Ennas Mohamed MajhwolAL-Khozai

Supervised by

Prof. Dr. Jabbar. A. A. AL-Sa'aidi

2017

1438



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية التربية/قسم علوم الحياة

تأثير السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات و/أو المعامل بمضاد الأنهيين على التطور الجريبي لمبايض اناث الجرذان البالغة

أطروحة مقدمة إلى مجلس كلية التربية/ جامعة القادسية وهي جزء من
متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ علم الحيوان

من قبل

إيناس محمد مجبول الخزامي

ماجستير علوم في علوم الحياة 20 11

إشراف

الأستاذ الدكتور جبار عباس احمد السامعي

سَلَامٌ عَلَيْكَ يَا عَلِيُّ

((وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا))

صدق الله العلي العظيم

(سورة طه: الآية 114)

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي لا يحمد إلا سواه صاحب الفضل والكرم الذي أكرمني برحمته وأعانني بقوته على إتمام اطروحتي والصلاة والسلام على خير الأنام وسيد الكائنات الرسول الأعظم محمد وعلى آل بيته الطيبين الطاهرين ...
وانا أضع اللمسات الأخيرة في اطروحتي يطيب لي إن أقدم بجزيل الشكر وعظيم الامتنان الى أستاذي الفاضل الدكتور جبار عباس أحمد الساعدي صاحب مناهل العلم الصافي الذي كان له الأثر الأكبر في تذليل الصعوبات ومتابعته المستمرة طيلة مدة إعداد الدراسة وعلى ما أحاطني به من رعاية وجهود كبيرة أضاءت الطريق لهذه الأطروحة .

كما أقدم بالشكر الجزيل لرئاسة قسم علوم الحياة /كلية التربية/جامعة القادسية وأتقدم بوافر الشكر والامتنان للدكتور حاتم عبد الكريم الشويلي/كلية البحوث الزراعية /جامعة سومر و المدرس المساعد حسين جاسم/كلية الطب البيطري /جامعة القادسية والدكتورة الاء محمد حسون /كلية العلوم/جامعة القادسية لما قدموه لي من مساعدة خلال اجراء البحث وأخيراً أقدم خالص شكري وامتناني لعائتي الكريمة لدعمهم وتشجيعهم طوال مدة الدراسة وشكري الى كل من ساهم ومد لي يد العون والمساعدة . . . وأسأل الله التوفيق .

الإهداء

إلى من افخر بمجمل اسمه والدي العزيز

إلى من روتني العطف والحنان والدتي العزيزة

إلى من أعدّهم سندي وقوتي إخوتي

إلى نور عيني اولادي

إلى رفيقي في الحياة زوجي

إلى من يسعده نجاحي اهدي لهم ما وفقني إليه ربي

ايناس

اقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا اعضاء لجنة التقويم والمناقشة اطلعنا على الأطروحة الموسومة بـ (تأثير السائل الجريبي البعري منزوع الستيرويدات و / أو المعامل بمضاد الأنهيين على التطور الجريبي لمبايض اناث الجرذان البالغة) وناقشنا الطالبة (ايناس محمد مجهول) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2017/9/19 وانها جديرة لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/علم الحيوان وبتقدير (امتياز)

عضو اللجنة	عضو اللجنة	رئيس اللجنة
التوقيع:	التوقيع:	التوقيع
الاسم: حيدر صالح جفات	الاسم: ستار جاسم حنروش	الاسم: نصير جواد حمد
المرتبة العلمية: استاذ مساعد	المرتبة العلمية: استاذ	المرتبة العلمية: استاذ
العنوان: جامعة الكوفة/كلية العلوم	العنوان: جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة	العنوان: جامعة بابل/كلية الطب
التاريخ:	التاريخ:	التاريخ:
عضو اللجنة (المشرف)	عضو اللجنة	عضو اللجنة
التوقيع:	التوقيع:	التوقيع
الاسم: جبار عباس الساعدي	الاسم: وجدان ثامر مهدي	الاسم: حسين خضير عبيس
المرتبة العلمية: استاذ	المرتبة العلمية: استاذ مساعد	المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: جامعة القادسية/كلية الطب البيطري	العنوان: جامعة القادسية/كلية العلوم	العنوان: جامعة القادسية/كلية التربية
التاريخ:	التاريخ:	التاريخ:

مصادقة عمادة كلية التربية

التوقيع:

الاسم: خالد جواد كاظم العادلي

المرتبة العلمية: استاذ

المنصب: عميد كلية التربية

التاريخ: 2017/10/15

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية في قسم علوم الحياة في كلية التربية بجامعة القادسية خلال الفترة الممتدة من آذار 2015 الى آب 2015 بهدف تحديد تأثير المصل المضاد للسائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والسائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في نمو وتطور الجريبات المبيضية وخصوبة اناث جردان الوستر الناضجة منتظمة دورات الشبق. تم سحب السائل الجريبي من جريبات كراف لمبايض الأبقار (ذات أقطار أكبر من 15 ملمتر)، بعد تدوير السائل الجريبي بجهاز الطرد المركزي لأزالة المخلفات الخلوية، تم تحضير السائل الجريبي منزوع الستيرويدات S-FBFF بمعاملته مع الفحم المنشط، تم تقسيم السائل الجريبي منزوع الستيرويدات الى جزئين، أستخدم الجزء الأول في تمنيع 10 أرناب ذكور ناضجة لتحضير مضاد الأنهيين S-FBFF antiserum، وعومل الجزء الثاني مع مضاد الأنهيين المصنع تجاريا ثم أستخدم في تمنيع 10 أرناب ذكور ناضجة لتحضير مضاد الأكتفين IS-FBFF antiserum، بعد مرور شهر على آخر حقنة من أصل أربعة حقنات (مدة اسبوع بين كل حقنة وأخرى)، تم جمع الدم من جميع الأرناب ثم تدويرها بجهاز الطرد المركزي والحصول على الأمصال المضادة للأنهيين والأكتفين وحفظها بدرجة -20 مئوية الى حين الأستعمال، أستخدمت جردان الوستر الناضجة منتظمة دورة الشبق، بعمر 65 يوما ووزن يتراوح بين 150-170 غم، في الدراسة الحالية، تم فحص المسحات المهبلية يوميا لجميع الاناث لتأكيد أطوار دورة الشبق.

تم تقسيم 100 إنثى عشوائيا على خمس مجموعات متساوية (مجموعة سيطرة وأربع مجموعات معاملة). حقنت إناث السيطرة بالمحلول الفسلجي (100 مايكرونتر في البريتون) في طور Proestrus ، وحقنت مجاميع المعاملة 100 مايكرونتر في البريتون بمضاد S-FBFF في طور Proestrus (T1) و مضاد IS-FBFF في طور Proestrus (T2) و مضاد S-FBFF في طور Metestrus (T3) ومضاد IS-FBFF في طور Metestrus (T4)، على التوالي، في طور Estrus ، تم تخدير عشرة إناث من كل مجموعة بحقن 0.3 مل كيتامين و 0.1 مل زايلازين/كغم من وزن الجسم، وتم سحب نماذج دم لغرض قياس تركيز الهرمون محفز الجريب FSH والاستراديول E2 والعامل شبيه الأنسولين-1 و IGF-1 and IGF-2 وهرمون النمو GH، تم بعدئذ أخذ عينات من الغدد النخامية لغرض دراسة مستوى تعبير جيني FSH β و GH فيها والمبايض لغرض دراسة مستوى تعبير جينات IGF-1 و IGF-2 و مستقبلات هرمون النمو GH-r فيها، كما أخذت عينات من المبايض والأرحام و وزنت ثم وضعت في محلول الفورمالين المتعادل 10% لغرض دراسة التغيرات النسجية الوظيفية فيها، أما الاناث العشرة المتبقية من كل مجموعة فتركت للتزاوج مع الذكور، في اليوم الثامن من الحمل، حقنت الاناث بـ 500 مل من محلول Pontamin blue (1% w/v) في الوريد ، وبعد مرور 15 دقيقة تمت التضحية بالاناث وتم حساب مواقع الانبات وأعداد الأجنة في الأرحام، أكدت نتائج الدراسة الحالية على فعالية مضاد السائل الجريبي

منزوع الستيرويدات S-FBFF antiserum في معادلة الانهيين الداخلي مناعيا وعلى وجه الخصوص عند حقنه في طور Metestrus والذي رافقه ارتفاعا معنويا في تركيز هرمونات FSH و E2 و GH و IGF-1 و IGF-2 في الدم، بينما لم يؤثر استخدام نفس المضاد في طور Proestrus على مستوى الهرمونات، من جانب آخر، أدى حقن مضاد الاكتفين (IS-FBFF antiserum) الى نتائج معكوسة في كلا طوري Proestrus و Metestrus. فقد ارتفع تركيز FSH معنويا في إناث مجموعة T3 بعد حقن مضاد S-FBFF في طور Metestrus وانخفض معنويا في إناث مجموعة T4 بعد حقن مضاد IS-FBFF في نفس الطور بينما لم يتأثر المستوى في إناث مجموعتي T1 و T2 اللتان حقننا بمضادي S-FBFF و IS-FBFF في طور Proestrus، على التوالي، بالمقارنة مع السيطرة.

أظهرت نتائج الدراسة الجزيئية للغدة النخامية ارتفاعا معنويا في مستوى تعبير كل من جيني FSH β و GH لاناث مجموعة T3 المعاملة بمضاد S-FBFF في طور Metestrus وعدم وجود فرق معنوي لكلا الجينين في مجموعة T4 المعاملة بمضاد IS-FBFF في طور Metestrus بالمقارنة مع اناث السيطرة. كما ارتفع مستوى تعبير جينات IGF-1 و IGF-2 و GH-r في أنسجة مبايض اناث مجموعة T3 بينما لم تظهر فروقات معنوية في تعبير تلك الجينات في أنسجة مبايض إناث مجموعات T1 و T2 و T4 بالمقارنة مع السيطرة، أظهرت النتائج المظهرية والنسجية الوظيفية أن حقن مضاد S-FBFF في طور Metestrus (مجموعة T3) أدى الى حصول زيادة معنوية في أوزان المبايض والأرحام وأعداد الجريبات الأبتدائية وكراف وأقطار المبايض إضافة الى زيادة نمو وتطور الجريبات المبيضية وبطانة الرحم، بينما أدى حقن مضاد IS-FBFF في طور Metestrus الى نتائج عكسية في حين كانت نتائج مجموعتي T1 و T2 أما غير معنوية أو متباينة التغيرات بين الزيادة الطفيفة أو النقصان بالمقارنة مع السيطرة، كانت أعداد مواقع الانبات وأعداد الأجنة داخل أرحام إناث مجموعة T3 أعلى معنويا من تلك التي سجلت في أرحام اناث السيطرة، في حين كانت نتائج مجموعات T1 و T2 و T4 منخفضة معنويا بالمقارنة مع السيطرة.

يمكن الاستنتاج أن لمضاد S-FBFF، عند حقنه في طور Metestrus، دورا في معادلة الأنهيين الداخلي مناعيا والذي تسبب في زيادة نمو وتطور المبايض ورفع مستويات هرمونات FSH و E2 و GH و IGF-1 و IGF-2 إضافة الى زيادة مستوى تعبير جيني FSH β و GH في أنسجة النخامية وجينات IGF-1 و IGF-2 و GH-r في أنسجة المبايض، وعليه فأن التمنيع الميسر ضد أنهيين السائل الجريبي يمكن تطبيقه في تحسين وظائف المبيض والخصوبة، وقد تكون النتائج الحالية مؤشرا ايجابيا نحو تطبيق الدراسة في الحقل الميداني لتحسين خصوبة الحيوانات الحقلية.

قائمة المحتويات

1-3	الفصل الأول: المقدمة
1	1- المقدمة
3	1-1- الهدف من الدراسة
	الفصل الثاني: استعراض المراجع
4	1-2- تنظيم الدورة التكاثرية في الإناث
7	2-2- تركيب المبيض
8	1-2-2- تأثير محرضات القند والهرمونات الستيرويدية على المبيض
11	2-2-2- العوامل المنظمة داخل المبيض
12	1-2-2-2- الأنهيين
15	1-1-2-2-2- التنظيم الجيني للأنهيين
17	2-2-2-2- الأكتفين
20	3-2-2-2- دور الأنهيينات والأكتفينات في العمليات التكاثرية للإناث
23	2-3- التمنيع السلبي
26	2-4- السائل الجريبي
31	2-4-1- تأثير الفحم النشط على السائل الجريبي
32	2-5- هرمون النمو والمبيض
36	2-5- نظام عوامل النمو شبيهة الأنسولين
	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل
39	3-1- المواد
39	3-1-1- الأجهزة والأدوات
40	3-1-2- العدد
40	3-1-2-1- عدد فحص الأليزا
41	3-1-2-2- عدد قياس تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي
42	3-1-3- المواد الكيميائية
42	3-2- تصميم التجربة
42	3-2-1- تحضير السائل الجريبي منزوع الستيرويد
43	3-2-2- تحضير مضادات الأنهيين والأكتفين معاً ومضاد الأكتفين لوحده
44	3-2-3- حيوانات التجربة
47	3-3- طرائق العمل
47	3-3-1- تحضير صبغة البونتايمين الزرقاء
47	3-3-2- فحص واعداد المسحات المهبلية
48	3-3-4- الاختبارات الهرمونية
48	3-4-1- تقدير تركيز الهرمون المحفز للجريبات FSH (وحدة دولية / لتر) في المصل
50	3-4-2- تقدير تركيز هرمون النمو GH (نانوغرام/مل) في المصل
51	3-4-3- تقدير تركيز عامل النمو IGF1 (بيكوغرام / مل) في المصل
51	3-4-4- تقدير تركيز عامل النمو IGF2 (بيكوغرام / مل) في المصل
52	3-4-5- تقدير تركيز هرمون الأسترايول (نانوغرام/لتر) في المصل
53	3-5- الدراسة الجزيئية

53	3-5-1- تحضير المواد الكيميائية
54	3-5-2- فحص تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي
62	3-6-الدراسة النسجية
62	3-6-1-تحضير المقاطع النسجية
63	3-6-2- تصيبغ المقاطع النسجية
64	3-6-3- فحص الشرائح النسجية
64	3-6-4- التصوير المجهرى
64	3-7-التحليل الإحصائي
الفصل الرابع : النتائج	
65	4-1- هرمونات مصل الدم
65	4-1-1- الهرمون محفز الجريب
66	4-1-2-الاستراديول
67	4-1-3- هرمون النمو
68	4-1-4- العامل شبيه الأنسولين 1
69	4-1-5-العامل شبيه الأنسولين2
70	4-2- التعبير الجيني
70	4-2-1- المبايض
70	4-2-1-1- تركيز الحامض النووي الرايبوزي
71	4-2-1-2- تعبير جين العامل شبيه الأنسولين 1
72	4-2-1-3- تعبير جين العامل شبيه الأنسولين2
73	4-2-1-4- تعبير جين مستقبلات هرمون النمو
74	4-2-2- الغدة النخامية
74	4-2-2-1- تركيز الحامض النووي الرايبوزي
75	4-2-2-2- جين الهرمون محفز الجريب
76	4-2-2-3- جين هرمون النمو
77	4-3- التغييرات الشكلية- النسجية- الوظيفية
77	4-3-1- المبايض
77	4-3-1-1- اوزان المبايض
78	4-3-1-2- اعداد الجريبات
79	4-3-1-3- اقطار المبايض
79	4-3-1-4- التغييرات النسجية- الوظيفية
81	4-3-2- الأرحام
81	4-3-2-1- اوزان الأرحام
82	4-3-2-2- التغييرات النسجية الوظيفية
84	4-3-2-3- سمك بطانة الرحم
85	4-3-2-4- سمك عضل الرحم
86	4-4- نتاج الخصوبة
86	4-4-1- اعداد الأجنة
87	4-4-2- نمو الأجنة داخل الرحم
الفصل الخامس : المناقشة	

89	1.5. الدراسة الهرمونية
93	2.5. الدراسة الجزيئية
93	1.2.5. تركيز الحامض النووي الرايبوزي في انسجة المبايض والنخامية
94	2.2.5. التعبير الجيني
99	3.5. التغيرات الشكلية والنسجية-الوظيفية
99	1.3.5. المبايض
104	2.3.5. الأرحام
106	4.5. الخصوبة
الفصل السادس: الأستنتاجات والتوصيات	
112	1.6. الأستنتاجات
112	2.6. التوصيات
113	المصادر
	الملاحق
A-C	Summary

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	الرقم
39	الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة الحالية	(1-3)
40	عدد فحص الأليزا المستخدمة في الدراسة الحالية	(2-3)
41	العدد المستخدمة في قياس تفاعل qRT-PCR المستخدمة في الدراسة	(3-3)
41	يبين البادئات Primers المستخدمة في تفاعل qRT-PCR للكشف عن التعبير الجيني للجينات المستهدفة في الدراسة الحالية	(4-3)
42	يبين المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	(5-3)
58	جدول يبين عدة أنزيم DNase1	(6-3)
59	تحضير تفاعل للأستنساخ العكسي لتحويل الـ RNA الى cDNA	(7-3)
59	الظروف الحرارية لتصنيع الـ cDNA	(8-3)
60	مزيج qRT-PCR Master Mix للجينات المستهدفة	(9-3)
60	مزيج qRT-PCR Master Mix للجين المحافظ (GapdH gene)	(10-3)
61	الظروف الحرارية لفحص qPCR	(11-3)

قائمة الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1-3	تصميم الدراسة	46
1-4	تركيز الهرمون محفز الجريب في مصل الدم (ملي وحدة دولية/مللتر)	65
2-4	تركيز هرمون الأسترااديول في مصل الدم (بيكوغرام/مللتر)	66
3-4	تركيز هرمون النمو في مصل الدم (نانوغرام/لتر)	67
4-4	تركيز العامل شبيه الانسولين -1 في مصل الدم (بيكوغرام/مللتر)	68
5-4	تركيز العامل شبيه الانسولين -2 في مصل الدم (مايكروغرام/لتر)	69
6-4	التركيز الكلي للحامض النووي الرايبوزي (نانوغرام/مايكرولتر)	70
7-4	التغيير التضاعفي لتعبير جين العامل شبيه الانسولين -1	71
8-4	التغيير التضاعفي لتعبير جين العامل شبيه الانسولين -2	72
9-4	التغيير التضاعفي لتعبير جينات مستقبلات هرمون النمو	73
10-4	التركيز الكلي للحامض النووي الرايبوزي (نانوغرام/مايكرولتر)	74
11-4	التغيير التضاعفي لتعبير جين الهرمون محفز الجريب	75
12-4	التغيير التضاعفي لتعبير جين هرمون النمو	76
13-4	معدل أوزان المبايض (غم/ 100 غم من وزن الجسم)	77
14-4	معدل أعداد جريبات المبيض الأبتدائية والثانوية وكراف	78
15-4	معدل أقطار المبايض (مايكرومتر)	79
16-4	مقاطع نسجية في مبايض الإناث	80
17-4	معدل أوزان الأرحام (غم/ 100 غم من وزن الجسم)	81
18-4	مقاطع نسجية في الأرحام	83
19-4	معدل سمك بطانة الرحم (مايكرومتر)	84
20-4	معدل سمك بطانة الرحم (مايكرومتر)	85
21-4	معدل أعداد الأجنة داخل الرحم	86
22-4	صور لأرحام الإناث الحوامل	88

قائمة المختصرات

المختصرات	المعنى
ACTR	Activin Receptor
ALKs	Activin receptor Like Kinases
ARIPs	Activin Receptor Interacting Proteins
AR	Androgen Receptor
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenine Triphosphate
BFF	Bovine Follicular Fluid
BGH	Bovine Growth Hormone
cDNA	Complementary DNA
Ct	Threshold cycle number

ddH₂O	Double distilled water
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
D.W	Distilled water
E₂	Estradiol
EDTA	Ethylene-diamine-tetra acetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Estrogen Receptor
ERα	Estrogen Receptors alpha
ERβ	Estrogen Receptors beta
FF	Follicular Fluid
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
FSH	Follicle stimulating hormone
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GH	Growth Hormone
GHBP	Growth Hormone Binding Protein
GHR	Growth Hormone Receptor
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
Gn	Gonadotropin
GnRH	Gonadotropin Releasing hormone
GnRHR	Gonadotropin Releasing Hormone Receptor
HCG	Human Chorionic Gonadotrophin
HRP	Horseradish peroxidase
IGFs	Insulin like growth factor system
IGF1	Insulin like growth factor -1
IGF2	Insulin like growth factor - 2
IGFBPs	IGF – Binding proteins
INFγ	Interferon gamma
IVF	In Vitro Fertilization
IVM	InVitro maturation Media
KDa	Kilodalton
LH	Luteinizing Hormone
LHR	Luteinizing Hormone Receptor
LHRH	Luteinizing Releasing Hormone
ml	Milliliter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Ng	Nano gram
NSILA	Non-suppressible Insulin-Like Activity

OSE	Ovarian Surface Epithelium
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
P4	Progesterone
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase PCR
Ref	Reference gene
RNA	Ribonucleic acid
SF-1	steroidogenic factor -1
SC	Subcutaneous
SS	Somatostatine
TBE	Tris, Borate & EDTA buffer
TGF-β	Transforming growth factors
TMB	Tetramethylbenzidine
μl	Micro litter
UV	Ultra violet

Introduction

1- المقدمة

ينظم التكاثر في إناث اللبائن من خلال نظام هرموني معقد يتمثل بمحور تحت المهاد - النخامية - المبيض Hypothalamic- Pituitary- Ovarian axis ، إذ إن الهرمونات المحررة لمحرضات القند (GnRH) التي تفرز من تحت المهاد تحفز إفراز محرضات القند النخامية التي تشمل الهرمون اللوتيني (LH) والهرمون محرض الجريب (FSH). تنتقل محرضات القند من خلال الدورة الدموية Circulation الى المناسل Gonads ، حيث تنظم نمو ووظيفة المناسل ، كما ان تعبير Expression هذه الهرمونات ومستوياتها الدائرة في الدم تختلف وفقاً لأدوارها في الدورة المبيضية للإناث Female ovarian cycle ، يعدّ الهرمون محرض الجريب FSH مسؤولاً عن حث نمو الجريبات المبيضية وبذلك يزداد إنتاج الأستروجينات، بينما الهرمون اللوتيني LH يعزز وجود الكولستيرول اللازم لتخليق الستيرويدات Steroidogenesis وكذلك يحفز الإباضة Ovulation في الإناث (Melamed, 2010).

تشير الدراسات الى أنّ الببتيدات المبيضية لها دور أساسي في تنظيم هذا النظام الهرموني، إذ تحور العوامل داخل المبيضية Intraovarian factors فعالية محرضات القند كما وتساهم في جميع خطوات نشأة الجريبات. هنالك تفاعلات معقدة تتضمن هرمونات النخامية مثل الهرمون محرض الجريب FSH و كلايكوبروتينات المناسل مثل الأنهيين inhibin وستيرويدات المناسل مثل الأسترايول estradiol يتطلبها التطور السريع لتكاثر الجريبات وتنسيق مسارات الإشارة signaling pathways خلال محور التكاثر (De Jong, 1988)، تنتج العوامل داخل المبيض موقعياً بتنظيم عوامل أو هرمونات أخرى، وتكون فعاليتها إما ذاتية autocrine أو جوارية paracrine، فالأنهيينات والأكتيفينات تنتج في المبيض وتعمل كمنظمات للدورة المبيضية (Findlay, 1993)، وهي عوامل متضادة وظيفياً Functionally antagonistic في عائلة عوامل النمو الناقلة بيتا ($TGF\beta$) (Miyazono *et al.*, 2010)، عُرّلت هذه العوامل في البداية من السائل الجريبي المبيضي للأبقار والخنازير في عام 1980 وسميت اعتماداً على قدرتها في اضعاف (inhibins) او تعزيز (activins) تخليق وافراز FSH من خلايا الغدة النخامية خارج الجسم in vitro، إذ تعمل الأنهيينات على تثبيط افراز الهرمون محرض الجريب النخامي عن طريق التغذية الأسترجاعية السالبة Negative feedback (De Jong, 1988)، يتضائل افراز الأنهيين بفعل الهرمونات المحررة لمحرضات القند GnRH ويتعزز بوجود العامل شبيه الأنسولين IGF1 (Skinner *et al.*, 1989). يفرز الأنهيين من الخلايا الحبيبية لجريبات المبيض او من خلايا الجسم الأصفر corpus luteum في المبيض ومن خلال خلايا سرتولي Sertoli cells في الخصية (Roberts *et al.*, 1993; Marchetti *et al.*, 2003).

التمنيع ضد الأنهيين Immunization against inhibin أستخدم في الأصل لدراسة الدور الفسيولوجي للأنهيين ويعدّ اسلوب جديد لتعزيز انتاج الأمشاج gametes والخصوبة (Voge Fertility and Wheaton, 2007)، إذ يزيد التمنيع الميسر ضد الأنهيين Passive immunization

Culler and Negro-Vilar,) من تركيز الهرمون محفز الجريب في بلازما الدم (against inhibin (1988)، ويتسبب في زيادة في نسبة الأباضة في إناث الجرذان (Rivier and Vale, 1989) والأبقار (Medan *et al.*, 2003; Akagi *et al.*, 2002; Medan *et al.*, 2004) والمعز والأغنام (Padilla *et al.*, 2007)، كما اثبتت الدراسات ان التمنيع ضد الأنهيين يعزز تطور خلية البيضة oocyte (Ishigame *et al.*, 2005)، ويسرع البلوغ في إناث الجرذان (Samir, 2010) ويعزز نمو وتطور الغدة اللبنية Mammary gland (Baqir, 2011).

تشير الدراسات الى ان محرضات القند النخامية هي المنظم الرئيسي لوظيفة المناسل، اصبح معروفاً جيداً الآن أنّ عوامل النمو والهرمونات التي تنتج موقعياً في المبيض تلعب ادواراً مهمة في تنظيم الوظيفة التكاثرية في اللبائن (Hunter *et al.*, 2004)، وتقترح أغلب الدراسات أن هرمون النمو يشترك بشكل مباشر لوحده أو بمشاركة الهرمون اللوتيني والهرمون محرض الجريب في تطور الجريبات ونضج البويضات خارج وداخل الجسم *in vitro* and *in vivo* (Hull and Harvey, 2001; Kais *et al.*,) (2001; Bevers and Izadyar, 2002)، يلعب هرمون النمو دور مهم في تخليق الستيرويدات وتطور الجريبات المبيضية في الفئران فاقدة lacking مستقبلات هرمون النمو GHR والبروتينات الرابطة لهرمون النمو ، ويكون التطور الجريبي في تلك الفئران أقل استجابة لتحفيز محرضات القند النخامية (Bachelot *et al.*, 2002).

Aim of the study

الهدف من الدراسة

تهدف الدراسة الحالية الى تحضير المضادات المصلية لكل من الأنهيين والأكتفين عن طريق حقن السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو المعامل بمضاد الأنهيين، على التوالي ، ثم دراسة تأثيرهما في التطور الوظيفي لمبايض إناث الجرذان البالغة منتظمة دورة الشبق، من خلال دراسة:

1- تركيز الهرمون محرض الجريب FSH والأسترايديول E₂ وهرمون النمو GH والعامل شبيه الأنسولين IGF1 والعامل شبيه الأنسولين IGF2 في مصلى الدم.

2- تقييم مستوى تعبير جينات الهرمون محرض الجريب FSH وهرمون النمو GH في النخامية والعامل شبيه الأنسولين IGF1 والعامل شبيه الأنسولين IGF2 ومستقبلات هرمون النمو GHr في المبيض.

3- دراسة التغيرات الشكلية و النسجية-الوظيفية للمبايض والأرحام.

4- دراسة دليل الخصوبة عن طريق حساب اعداد الأجنة ومستوى نموها داخل الرحم.

Review of Literature

2- إستعراض المراجع

1-2 تنظيم الدورة التكاثرية في الإناث Regulation of the Female Reproductive cycle

يعدُّ تحت المهاد هو المسؤول عن تنسيق جميع فعاليات الدورة التكاثرية في الإناث من خلال اشارات تختلف في مادتها الكيميائية وكميتها وترددات إفرازها من خلال نمط متذبذب من التغذية الاسترجاعية السالبة والموجبة للعوامل الستيرويدية المبيضية وهرمونات الغدة النخامية وتحت المهاد، هذه الدورة الهرمونية تسمح بالتطور الفسيولوجي لحصول البلوغ puberty والتزواج coitus والحمل pregnancy لدى اناث اللبائن ، وفي حالة عدم حصول الأحداث السابقة الذكر يعاد تتابع الدورة الهرمونية من جديد (Jerom and Michael, 1995; Adamson *et al.*, 2008).

يفرز المبيض في مرحلة الطفولة كميات قليلة من هرمون الأستروجين تؤثر بدورها عن طريق التغذية الاسترجاعية السالبة على تحت المهاد فلا تفرز إلا كميات ضئيلة من الهرمونات المحررة لمحرضات القند (GnRH) وبذلك لا تفرز النخامية الأمامية anterior pituitary gland كميات ذات تأثير من محرضات القند (LH,FSH) وعند اقتراب سن البلوغ تصبح تحت المهاد اقل استجابة لهرمون الأستروجين فتبدأ بإفراز كميات متزايدة من الهرمونات المحررة لمحرضات القند GnRH يتبع ذلك إفراز كميات متزايدة من الهرمون اللوتيني LH والهرمون محرض الجريب FSH من النخامية الأمامية اللذين

يسببان نضج الجريبات المبيضية (Jones and Lopez, 2006) , تسمى الدورة التكاثرية في اناث الجرذان بالدورة الشبقية estrous cycle وهي تتمثل بأربعة أطوار هي طور قبل الشبق proestrus phase و طور الشبق estrus phase والطور التالي للشبق metestrus (1-diestrus) والطور الرابع هو طور بعد الشبق diestrus-2 (Long and Evans, 1922; Freeman, 1988).

يترافق البلوغ في إناث الجرذان مع ظهور الفتحة المهبلية vaginal opening وظهور طور ما قبل الشبق (Maeda *et al.*, 2000) ، الدورة الشبقية المنتظمة تبدأ بعد اسبوع من ظهور الفتحة المهبلية ، وان افراز الهرمونات المحررة لمحرضات القند هي عوامل أساسية لبدء البلوغ ، حالما يبدأ الإفراز النبضي pulsatile release للهرمونات المحررة من تحت المهاد ، يرتفع مستوى محرضات القند تدريجيا وهذا بدوره يحث البلوغ، وقد يكون مستوى محرضات القند مرتفعا الى حد ما في مصل الدم خلال بداية البلوغ على الرغم من غياب الإفراز النبضي للهرمونات المحررة لمحرضات القند وقد يرجع سبب هذا الإرتفاع النسبي الى التحفيز من خلال بعض العوامل التي تساعد خلايا الغدة النخامية المنتجة لمحرضات القند gonadotroph cells لتكون جاهزة للتحفيز بهرمونات GnRH (Grumbach and Styne, 1992).

إن مستويات الهرمونات المحررة لمحرضات القند تتغير خلال الدورة الشبقية للحيوان بسبب تأثير الهرمونات الستيرويدية من خلال التغذية الراجعة، وتبين الدراسات أنّ ارتفاع مستوى الهرمونات المحررة لمحرضات القند يزيد من تحفيز الهرمون اللوتيني اكثر من الهرمون محفز الجريب، بينما التركيز الواطيء من الهرمونات المحررة لمحرضات القند يدعم تخليق وافراز الهرمون محرض الجريب وفي نفس الوقت لايزيد تركيز الهرمون اللوتيني (Lukin *et al.*, 1997)، وعلى الرغم من ان الهرمونات المحررة لمحرضات القند ضرورية لتحرير هرموني LH وFSH إلا أنّ هناك عوامل اخرى بجانب الهرمونات

المحررة لمحرضات القند تعتبر ضرورية لتخليق وافراز الهرمون محرض الجريب (Esbenshad *et al.*, 1986; Clark, 1989).

تشير الدراسات الى أن لهرمونات المحررة لمحرضات القند دور أساسي في السيطرة على إفراز الهرمونات التكاثرية، حيث ترتبط مع مستقبلات تظهر على سطوح الخلايا المنتجة لمحرضات القند gonadotroph cells في الغدة النخامية، وإن تنشيط تلك المستقبلات تؤدي الى زيادة تخليق وتحرير محرضات القند والتي بدورها تسيطر على نشأة الجريبات والأباضة وتخليق الستيرويدات في اناث اللبائن (Counis *et al.*, 2009)، ان الهرمونات المحررة لمحرضات القند في الرئيسيات primates تنتجها خلايا عصبية توجد في الجزء القاعدي الواسطي لتحت المهاد mediat-basal hypothalamus وبشكل رئيسي خلال النواة القوسية arcuate حيث وجدت الدراسات ان استئصال النواة القوسية جراحياً في القرود يسبب قصور الغدد التناسلية (Kaufman *et al.*, 1985).

وجدت بعض الدراسات أن الخلايا العصبية المنتجة للهرمونات المحررة لمحرضات القند في تحت المهاد hypothalamus تكون خالية من مستقبلات الهرمونات الستيرويدية، الا أن الدراسات الحالية تشير الى أن GT1-7 cells line تُظهر مستقبلات الأستروجين مما يدعو الى الاقتراح أن الأستروجين ينظم انتاج الهرمونات المحررة لمحرضات القند في الخلايا العصبية المنتجة لتلك الهرمونات (Shimasaki, 2004)، من جانب آخر تشير الدراسات الى أن الهرمونات المحررة لمحرضات القند تحت التأثير المثبط inhibitory effect لإفراز البروجستيرون progesterone من خلايا الجسم الأصفر للأبقار خارج الجسم in vitro (Milvae *et al.*, 1984).

يظهر التأثير المثبط للهرمونات المحررة لمحرضات القند على تخليق الستيرويدات في المناسل لبعض أنواع القوارض من خلال كبح مستقبلات الهرمون اللوتيني والهرمون محرض الجريب او الأنزيمات التي تتوسط مسارات تخليق الهرمونات الستيرويدية ومنها البروتين المنظم لتخليق الستيرويدات (0)

Sridaran β -hydroxysteroid dehydrogenase وCholesterol-side-chain cleavage (P₄₅)

(*et al.*, 1999)، كذلك تشير دراسات التفاعلات المناعية immunoreactive في التجويف الطلائي لقناة البيض oviduct epithelium في الجرذان، إذ تساعد GnRH في استمرار الحمل من خلال تأثيره الذاتي autocrine أو الصمي endocrine أو الجوارى paracrine في قناة البيض أثناء مرحلة ما بعد الغرس (Sengupta *et al.*, 2007).

Ovary structure

2-2- تركيب المبيض

يتكون الجهاز التناسلي الأنثوي من مبيضين ovaries، ينتجان البويضات ويفرزان الهرمونات الجنسية sexual hormones، وقناتي بيض تدعيان أيضاً إنبوبي الرحم uterine tubes ويشكلان مكاناً لاختصاص البويضات وتعبّر عن طريقهما الحيوانات المنوية القادمة من الرحم لتصل إلى البويضة وتخصبها، تتصل قناتا البيض بالرحم في أعلى جانبيه ويشكل الرحم مكاناً لأنبات البويضات المخصبة. يقع المبيضان على جانبي الرحم ويثبت كل مبيض في موقعه بتجويف الحوض بواسطة أربطة عدة ligaments كالرباط المبيضي ovarian ligament الذي يثبت المبيض بالرحم والرباط المعلق suspensory ligament الذي يعلقه جانبياً إلى جدار الحوض، ويغذي المبيض شرايين مبيضية ovarian arteries وفرع من الشرايين الرحمية (Heffner and Schust, 2006).

عند دراسة التركيب النسجي histological structure للمبيض نجده يحاط من الخارج بطبقة طلائية حرشفية تسمى الطبقة المولدة germinal epithelium، يقع إلى الداخل من هذه الطبقة محفظة ليفية تسمى طبقة القميص الأبيض tunica albuginea، ثم إلى الداخل من هاتين الطبقتين يوجد سدى المبيض stroma الذي يتميز إلى طبقتين أحدهما خارجية تمثل القشرة cortex وداخلية تمثل اللب medulla، توجد الجريبات المبيضية ovarian follicle في طبقة القشرة وتكون بدرجات متفاوتة من النضج maturation، أما اللب فيضم الأوعية الدموية والأعصاب، إذ تحتوي كل جريبة على خلية

بيضة oocyte غير ناضجة immature ، ويمكن تمييز درجة نضج الجريبات المبيضية من خلال تركيبها ،حيث تسمى جريبة اولية primordial follicle اذا كانت تتكون من خلية بيضة غير ناضجة محاطة بطبقة واحدة من خلايا حرشفية squamous cells ، وتسمى جريبة ابتدائية primary follicle عندما تكون خلية البيضة محاطة بطبقتين أو أكثر من خلايا مكعبة cuboidal أو عمودية columnar وخلايا حبيبية granulosa cells، وتكون الجريبة ثانوية secondary follicles عندما تحتوي على تجاويف مملوءة بالسائل الجريبي follicular fluid يظهر بين الخلايا الحبيبية وقد تلتحم هذه التجاويف مكونة تجويف كبير يسمى الكهف antrum، وعندما تكون خلية البيضة الناضجة معلقة الى جانب الجريبة بواسطة عنق stalk من الخلايا الحبيبية ويكون معظم التجويف الجريبي ممتلئاً بالسائل فإنها تسمى جريبة كراف Graffian Follicle وهذه تتفجر قرب سطح المبيض لتنتقل منها البويضة الناضجة بعملية الإباضة (Heffner and Schust, 2006).

1-2-2 تأثير محرضات القند والهرمونات الستيرويدية على المبيض Effect of Gonadotropins and steroids on the ovary

الهرمونات المنشطة للمناسل Gonadotropins هي سلاسل غلايكوبروتينية مزدوجة dimeric glycoproteins، تتألف من تحت الوحدة الفا (α -subunit) وتحت الوحدة بيتا (β -subunit) وتكون α -subunit هي الأكثر شيوعاً ، تُفرز محرضات القند بالاعتماد على تحفيز الهرمونات المحررة لمحرضات القند التي تفرز من تحت المهاد لتصل الى النخامية الأمامية anterior pituitary gland التي تفرز بدورها محرضات القند الى الدورة الدموية ومنها الى المبيض (Ahmed *et al.*, 1994; Melmed, 2002) ، حيث يعتبر هرمونا LH وFSH مسؤولان بالدرجة الأولى عن تحفيز نمو الجريبات و تحفيز تكوين خلايا الطبقة الحبيبية وتكوين الغار الجريبي و تخليق الهرمونات الستيرويدية steroidogenesis و حدوث الإباضة (Kwon *et al.*, 2000)، حيث ان التغذية الراجعة الموجبة

للاستروجين خلال الطور الجريبي follicular phase للدورة الشبقية يسمح بأندفاع surge هرموني LH وFSH الى الدورة الدموية وتحفيز الإباضة (Melamed, 2010)، أما الصعود الثاني للهرمون FSH يظهر بعد 27 ساعة تقريبا من وصول الهرمون اللوتيني LH مستوى الذروة وبالتزامن مع زيادة البروجستيرون، في حين يكون مستوى LH وFSH منخفضا خلال الطور الأصفر luteal phase من دورة الشبق (Van de Wiel *et al.*, 1981; Guthrie *et al.*, 1992).

تشير الدراسات الى ان تطور المبيض يعتمد على الهرمون اللوتيني والهرمون محرض الجريب والهرمون المحرر لمحرضات القند والبرولاكتين وهرمون النمو، كما بينت الدراسات أن مستويات الهرمون محرض الجريب في إناث الجرذان تزداد منذ الولادة وتصل القمة في اليوم الثاني عشر بعد الولادة ، بينما الهرمون اللوتيني يزداد بأعتدال الى حدٍ ما ثم يرتفع بشكل كبير قبل حدوث الإباضة (Ojeda *et al.*, 1986). من خلال سلسلة من الخزعات biopsies المبيضية التي أخذت من نساء تعاني من نقص افراز hypogonadotropic GnRH وقصور الغدد التناسلية hypogonadism، وجد ان التطور الجريبي بعد مرحلة الجريبات الأبتدائية primordial stage يكون نادراً ، بينما يمكن ان تُحفز الإباضة بعد 10-14 يوم من المعاملة بمحرضات القند النخامية في تلك النساء (Goldenberg *et al.*, 1976)، كما اثبتت الدراسات التي اجريت على الجرذان مستأصلة الغدة النخامية Hypophysectomy أن هرمون FSH خارجي المصدر Exogenous يحفز نمو الجريبات ويحث مستقبلات LH ويحفز فعالية الهرمونات الستيرويدية (Mannaerts *et al.*, 1991; Tapanainen *et al.*, 1993) ، ومن جانب اخر وجد Kaufman *et al.* (1985) ان نسبة كبيرة من البويضات التي جمعت من القروود المعاملة مع الهرمون محرض الجريب يكون فيها الأنقسام الأختزالي الثاني مكتملا مقارنة مع الحيوانات التي تم معاملتها مع FSH وLH بنسبة 1:1.

ان تطور الجريبات في المرحلة قبل الغارية المتأخرة Late preantral stage والمرحلة الغارية المبكرة early antral stage يكون غير معتمداً على محرضات القند النخامية، بالرغم من الكشف عن وجود مستقبلات الهرمون محرض الجريب في الخلايا الحبيبية للجريبات الأبتدائية Primary Follicles، كما اثبتت تجارب إزالة النخامية hypophysectomy ان محرضات القند الزامية لاستمرار نمو الجريبات بعد مرحلة الجريبات الغارية الصغيرة والمتوسطة (Knight and Glistler, 2001).

يعدّ انتاج الستيرويدات المبيضية ضرورياً للتطور الطبيعي ووظيفة انسجة متعددة في المرأة تشمل الرحم والثدي والعظام والدماغ والأهم ان الستيرويدات تنتج من المبيض ويكون انتاجها أمّا ذاتياً autocrine أو جوارياً paracrine ولها تأثيرات موضعية local effects تُعد اساسية لفسولوجيا المبيض الطبيعية ، حيث تنتج الستيرويدات داخل المبيض تحت سيطرة محرضات القند ويساهم في تعديل انتاجها عوامل داخل مبيضية (Odum *et al.*, 2002)، وإنّ تخليق الستيرويدات في أغلب اللبائن ومن ضمنها الإنسان والفئران يحدث عن طريق اثنين من الخلايا واثنين من محرضات القند two cell /two gonadotropin ، إذ تخلق الأندروجينات من الكولسترول في خلايا القراب وبتحفيز من LH يلي ذلك تحويل الأندروجين الى استروجين في الخلايا الحبيبية وبتحفيز من هرمون FSH و مستقبلات الهرمون اللوتيني LHR وأنزيم CYP17 يحولان ال pregnenolone و progesterone الى androstenedione و dehydroepiandrosterone (DHEA) يوجد تعبيرهما الجيني في خلايا القراب theca cells، بينما مستقبلات الهرمون محرض الجريب FSHR وأنزيم CYP19 aromatase يحولان الأندروجين الى استروجين، يوجد تعبيرهما الجيني بشكل رئيسي في الخلايا الحبيبية، وتشير الدراسات ان مستقبلات الهرمون اللوتيني LHR لاينحصر وجودها في خلايا القراب ولكن يظهر تعبيرها الجيني في الخلايا الحبيبية الجدارية mural granulosa cells، وقد لوحظ زيادة في استجابة الخلايا

الحبيبية لهرمون FSH فقط قبل زيادة LH surge (Stephen and Piquette *et al.*, 1991; Jamnongjit, 2006).

يعتبر الأسترايول هو المكون الحيوي الذي يتطلبه نضج البويضات، ويُخَلَق الأسترايول في الخلايا الحبيبية من سلائف الأندروجينات androgen precursors التي تنتجها خلايا القراب التي تحيط بالخلايا الغارية antral cells ، ينتج الأسترايول بكميات كبيرة من خلال الجريبات النامية التي تصل الى مرحلة قبل الإباضة (Young and McNeilly, 2010) preovulatory، وتشير الدراسات الى ان قبل التعبير الجيني لأنزيم اروماتيز aromatase في الخلايا الحبيبية، تتعرض الجريبات لمستويات متنوعة من الأندروجينات المشتقة من خلايا القراب تحت سيطرة الهرمون اللوتيني (Hu *et al.*, 2004). يوجد نوعين من مستقبلات الأستروجين (ER) هما $ER\alpha$ و $ER\beta$ ، توجد $ER\beta$ في خلايا الطبقة الحبيبية مما يشير الى أن هذه المستقبلات ربما تنظم الأسترايول الذي يتوسط تحفيز نمو الخلايا الحبيبية وتعديل فعالية الهرمون محرض الجريب FSH، وفقاً لذلك فإن الجريبات التي عُزلت من الفئران الفاقدة لـ Knockout mice $ER\beta$ لها استجابة ضعيفة للأسترايول الخارجي مع تراجع في كتلة خلايا الركاب Cumulus Cell Mass وانخفاض في نسبة الإباضة للأنثى مقارنة مع مجموعة السيطرة (Krege *et al.*, 2004; Havclock *et al.*, 1998; *al.*، وتشير بعض الدراسات الى وجود علاقة معكوسة بين الأسترايول و FSH، الا ان الأسترايول ليس له تأثير مثبط لافراز FSH ولا يلعب دور كعامل مستقل في تنظيم FSH أثناء الدورة الحيضية Menstrual cycle ، كما وجد ان التأثير المثبط للأسترايول على FSH يحدث اولاً خلال الطور الأصفر وفي مرحلة انتقال الطور الأصفر الى الطور الجريبي وليس خلال الطور الجريبي (Welt *et al.*, 2003).

2-2-2- العوامل المنظمة داخل المبيض Intraovarian Regulatory Factors

تلعب الجريبات المبيضية دوراً مركزياً في الدورة التكاثرية للإناث، فمن الناحية الفسلجية هي الوحدة الوظيفية التي تساهم في إنتاج البويضات الناضجة، ولها أهمية في تحقيق استتباب الغدد الصم endocrine homeostasis وإن تكوين الجريبات هي عملية منتظمة تتطلب تفاعل منسق لعوامل عدة من داخل أو خارج المناسل (McGee and Hsueh, 2000). العوامل داخل المبيض هي عوامل غير ستيرويدية تنتج بواسطة المبيض، تعمل على تحويل إفراز الكونادوتروبينات وتلعب دوراً في الوظيفة التكاثرية الطبيعية، عُرفت بأسم الأنهيبن (Tonetta and Dizerega, 1989) inhibin، تشترك في نشأة الجريبات المبيضية يُنظم إنتاجها موضعياً بواسطة هرمونات أو عوامل أخرى وهي أما تفرز ذاتياً أو جوارياً (Findlay *et al.*, 2001).

الأنهيبن والأكتيفين أعضاء في عائلة عوامل النمو الناقلة بيتا ($TGF\beta$)، وهي غلايكوبروتينات ذات سلاسل مزدوجة متباينة heterodimeric، تتألف من تحت الوحدة الفا α -subunit وتحت الوحدة بيتا β -subunit وهي الشائعة في تركيبها، أما الفولستاتين فهو بروتين مفرد السلسلة monomeric chain من الممكن أن يرتبط أماً بالأكتيفين أو بالأنهيبن من خلال β -subunit الشائعة فيهما (Vale *et al.*, 1988; Ying, 1989; Tsuchida *et al.*, 2008). أشارت الدراسات إلى أنّ مستخلص أنسجة المناسل منزوع الستيرويد له القدرة على تثبيط إفراز كوندوتروبين الغدة النخامية، من جانب آخر المراحل المبكرة من التطور الجريبي وحتى تكوين الجريبات الغارية المبكرة (EAF) Early Antral Follicle تكون معتمدة وتستجيب بدرجة عالية لهرمون FSH، وتحفيز هذا الهرمون يتطلب وجود عوامل المبيض (Hsueh *et al.*, 2000; Knight and Glistler, 2006).

هو بروتين يفرز من خلايا الطبقة الحبيبية granulosa cells للمبيض في الأناث ومن خلايا سرتولي Sertoli cells في الذكور وهو أحد عوامل Transforming Growth Factor- β superfamily ، وان عوامل هذه العائلة تكون تركيبياً مماثلة لعوامل النمو إلا أنها تختلف عنها وظيفياً (Messague and Wotton, 2000; Miyazono *et al.*, 2010). يتركب الأنهيين من ازدواجات متباينة لسلاسل جلايكوبروتينية heterodimeric glycoproteins chains ، ترتبط هذه السلاسل مع بعضها بواسطة اواصر ثنائية الكبريت disulphide bonds ، تتكون من تحت وحدتين هما α -subunit ووزنها الجزيئي 18KDa و β -subunit ووزنها الجزيئي 14KDa ، يوجد نوعان من β -subunit هما α -subunit و β -subunit ، وبذلك يوجد نوعان من الأنهيين هما inhibin-A و inhibin-B ، وان التركيب المؤلف من سلاسل α β A يسمى inhibin-A اما التركيب المؤلف من سلاسل α β B يسمى inhibin-B ، كما توجد درجة عالية من التشابه في تتابع الأحماض الأمينية amino acid لتلك الوحدتين تصل حوالي 70% (De Kretser *et al.*, 2002; Raivio and Dunkel, 2002). ينظم الأنهيين افراز FSH من خلال التغذية الاسترجاعية السالبة بين المبيض والغدة النخامية (Knight and Glister, 2001; Medan *et al.*, 2004).

يوجد الانهيين في بلازما الدم بالرغم من صعوبة الكشف عنه، الا انه اثبتت الدراسات ان الأنهيين يوجد بكميات كبيرة في السائل المنوي seminal plasma والسائل الجريبي follicular fluid (Robertson *et al.*, 1985). للأنهيين دور مهم في العمليات التكاثرية في كل من الذكور والأناث، وله وظائف متعددة تشترك في السيطرة على افراز FSH من الغدة النخامية (Xue *et al.*, 2004; Luisi *et al.*, 2012). اشار Scott *et al.* (1980) الى ان α -subunit و β -subunit لها وظائف مختلفة اعتماداً على نمط تجمعها وموقع انتاجها، ففي الأناث يكون مستوى inhibin-B الدائر

circulating مرتفعاً خلال الطور الجريبي follicular phase، بينما inhibin-A يكون مرتفعاً خلال الطور الأصفر Luteal phase، كما يكون إنتاج الأنهيين في الخلايا الحبيبية وخلايا الجسم الأصفر ويحفز بشكل رئيسي بواسطة الهرمون محرض الجريب ويزداد بوجود الأستروجين والتستوستيرون (Vale *et al.*, 1994)، تشير الدراسات ان الأنهيين B يرتبط عكسياً مع FSH، في حين ان الأنهيين A لا يرتبط عكسياً معه، كما توجد علاقة ضعيفة بين inhibin-A والهرمون محرض الجريب FSH خلال الطور الجريبي والطور الأصفر، كذلك وجد ان مستوى inhibin-A و inhibin-B في مصل الدم في الإنسان متشابهة خلال الطور الجريبي مما أدى الى الاستنتاج ان inhibin-A اقل فعالية من inhibin-B في كبح الهرمون محرض الجريب (Makianji *et al.*, 2009).

اعتماداً على تأثيرات مضادات الأستروجين على الدورة التكاثرية ومستوى هرموناتها والدراسات على الأنث في مرحلة قبل البلوغ، ان مستويات inhibin-A و inhibin-B تزداد مع تقدم العمر وان الهرمون محرض الجريب يزداد حتى يصل الهضبة plateau بين 14-18 سنة ، هذه الزيادة تعكس التأثيرات المحفزة للهرمون محرض الجريب على تطور الجريبات وتخليق الأنهيين A,B ، ويزداد افراز الأنهيين الى المرحلة التي يصبح فيها المبيض قادراً على تنظيم افراز الهرمون محرض الجريب من خلال ميكانيكية التغذية الراجعة feedback mechanism (Corfton *et al.*, 2002).

يعدّ المبيض هو المصدر الرئيسي للأنهيين خلال سن الأنجاب fertile age ، بينما خلال الحمل ، المشيمة placenta تنتج الأنهيين بشكل رئيسي ، في الدورة الطبيعية menstrual cycle في النساء تركيز الأنهيين يبدأ بالازدياد باتجاه الطور الجريبي ، ثم فجأة يهبط مستوى الأنهيين بعد الإباضة ثم يبدأ بالارتفاع مرة أخرى بشكل موازي للأستروجين E₂ والبروجستيرون P₄ خلال الطور الأصفر المبكر early luteal phase، إذ يصل الأنهيين الى القمة في منتصف الطور الأصفر mid luteal phase وفي حالة بقاء الجسم الأصفر عند استمرار الحمل ووجود HCG يبقى مستوى الأنهيين مرتفعاً (Dye *et al.*,)

(1992)، كما ينخفض تركيز الانهيبين في المصل في نهاية الطور الأصفر بينما يبدأ الهرمون محرض الجريب بالأرتفاع مما يشير الى أنّ هذا أساس لتوظيف جماعات جديدة من الجريبات قبل الغارية وهي علاقة عكسية بين الأنهيبين و الهرمون محرض الجريب، وهذا يتفق مع التأثير المثبط للأنهيبين على وظيفة الغدة النخامية وهو دليل على التغذية الأسترجاعية السالبة بين الأنهيبين و الهرمون محرض الجريب (Groom *et al.*, 1996). وفي مرحلة الطفولة المبكرة يكون تركيز الأنهيبين منخفضاً بشدة، ثم يبدأ بالأرتفاع في عمر 10-12 سنة ويصل الى أعلى تركيز بين 12-18 سنة (Chellakooty *et al.*, 2003).

2-2-2-1-1-2-1 التنظيم الجيني للأنهيبين Inhibin Gene Regulation

إنّ انتاج الأنهيبين في الخلايا الحبيبية وخلايا الجسم الأصفر في الرئيسيات Primates يُحفز بواسطة الهرمون محرض الجريب، إذ إنّ هذا الهرمون يحث تخليق الأنهيبين فضلاً عن انه يتحسن انتاج الأنهيبين بوجود الأستروجين Estrogen والتستوستيرون Testosterone والأندروستيستيرون Anrostenedione ، في حال وجود الهرمون محرض الجريب فأن التركيز الواطيء من الهرمون اللوتيني يحفز تخليق الأنهيبين، بينما التراكيز المرتفعة منه وكونادوتروبين المشيمة البشري HCG يثبط تخليق الأنهيبين (Findlay *et al.*, 1993; Vale *et al.*, 1994).

هناك عوامل أخرى تظهر لتنظيم تخليق الأنهيبين وهي تكون مختلفة بين الأنواع وهي الأكتفين Activin وعامل النمو شبيه الأنسولين IGF-1 و $TGF-\beta$ والهرمون محرض الجريب الذي يحث انتاج الأنهيبين في مزرعة الخلايا الحبيبية granulosa cells culture للجرذان خارج الجسم ، وان التأثير المحفز للأكتفين على انتاج α -subunit يتطلب عامل النمو شبيه الأنسولين IGF-1 (Kubo *et al.*, 1998)، في حين وجد Ling *et al.* (1990) ان عامل النمو البشري (EGF) و $TGF-\alpha$ و GnRH و Follistatin تثبط تخليق الأنهيبين في مزرعة الخلايا الحبيبية للجرذان، كما ان الأنترفيرون غاما

($INF\gamma$) في حالة وجود الهرمون محرض الجريب يثبط انتاج الأنهبين في حين يحفز انتاج الأنهبين في حالة غياب الهرمون محرض الجريب. وجد *Guthrie et al.* (1992) في الخنازير ان subunit α -mRNA وانتاج البروتين يزداد خلال الطور قبل الأباضة، لذلك تكون كمية الأنهبين التي تنتج من الجريبات الكبيرة هي اكثر من الكمية التي تنتجها الجريبات متوسطة الحجم، وخلال الطور الجريبي يزداد α - subunit gene expression ثم ينخفض في نهاية الطور الجريبي في الجريبات متشابهة الحجم ، للأنهبين مواقع ارتباط متخصصة في الأنسجة مثل الغدة النخامية (*Roportsone et al.,*) (2000).

هناك نوعان من المستقبلات المتخصصة للأنهبين وهي Betaglycan و P_{120} ، إذ يعدّ الـ Betaglycan من الناحية الوظيفية مستقبل مساعد CO-Receptor في حالة وجود مستقبلات الأكتفين من النوع الثاني -II Activin Receptor type (ActR-II) مما يؤدي الى تحسين فعالية الأكتفين المضادة للأنهبين اما Betaglycan (The TGF β type III receptor) يربط وحدة α بألفة عالية كما انه يحسن من ارتباط الأنهبين مع ActR-II من خلال β -subunit وبذلك يمنع اقتراب الأكتفين من ActR-II، كما ان ألفة الارتباط تزيد حوالي 30 مرة في الخلايا التي يظهر فيها التعبير الجيني لـ ActR-II و Betaglycan ، وان Betaglycan يمنح الأنهبين حساسية عالية للخلايا التي تظهر استجابة قليلة له (Lewis *et al.,* 2000)، اما بالنسبة لـ P_{120} فإنه عزل من الغدة النخامية للأبقار عبر تفاعلات بايوكيمياوية على اساس قابليته للارتباط بالأنهبين A ، ويكون متموضعا في الـ Gonadotropes في الغدة النخامية، كما وجد في خلايا لايدك Lydig Cell وخلايا سرتولي Sertoli Cell (Chong *et al.,* 2000)، ويسمى P_{120} البروتين الرابط للأنهبين ،وهو مستقبل الأنهبين B المتخصص Specific inhibin B- receptor ويتجمعه مع مستقبل الأكتفين نوع IB activin

receptor يبدو ضرورياً لحث التأثير المضاد للأنهيين B على الأكتفين المحفز لنقل الإشارة Signal Transduction (Chapman and Woodruff, 2001).

أشارت الدراسات الى أن FSH ينظم التعبير الجيني للأنهيين في المبيض، حيث ان مستوى الأنهيين يبدأ بالارتفاع خلال البلوغ عندما يزداد مستوى الكونادوتروبيينات (Burger *et al.*, 1988)، ويتذبذب تركيز الأنهيين A خلال السائل الجريبي ومجرى الدم يتذبذب بشكل متوازي مع الأستروجين خلال الدورة الشبقية، حيث ان الموجة الثانية للهرمون محرض الجريب تحفز تعبير الأنهيين A ، كما ان تركيز الأنهيين A في المصل والأنسجة ينخفض بسرعة ويصل الى ادنى مستوى بعد الارتفاع الأول للهرمون محرض الجريب إذ يرتبط الأنهيين عكسياً معه (Woodruff *et al.*, 1993).

من الملاحظات المهمة أن مستوى تعبير α -subunit للأنهيين يكون دائماً اعلى من مستوى تعبير β -subunit في الخلايا الحبيبية للجريبات النامية بشكل صحي healthy ، كما ان التعبير الجيني α -subunit mRNA \downarrow gene expression و β A-subunit و β B-subunit في طبقة الخلايا الحبيبية لمبيض الجرذان يزداد مع تقدم نمو الجريبات (Meunier *et al.*, 1988). من الواضح أن الأنهيين مهم جداً لتنظيم افراز FSH عن طريق التغذية الراجعة في اناث وذكور الإنسان كما هو الحال في الأنواع الأخرى (Vale *et al.*, 1988)، وأشارت الدراسات انه لا تزال الميكانيكية الوحيدة المعروفة التي بواسطتها يستطيع الأنهيين ان يؤثر على الأكتفين الذي يتوسط انتاج FSH من خلال قابليته على التنافس مع الأكتفين للأرتباط بالمستقبل ActR-II، هذه الفعالية تتطلب تراكيز عالية من الأنهيين تفوق الأكتفين اكثر من المتحققة خلال دورة الشبق (Groome *et al.*, 1996).

يعتبر الأنهيين وسيط ذاتي الافراز autocrine او/ و جوارى الافراز paracrine خلال المناسل يحفز كل من خلايا لايدك وخلايا القراب لأنتاج الأندروجينات التي تثبط نضج خلية البيضة وتكوين النطف (Hakovirta *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1999)، يضاف الى ذلك ان الأنهيين كاج للورم

Tumor Suppressor في المناسل وقشرة الكظر Adrenal Cortex، كما وجد ان وجود الأنهبين قليل مع حالات امراض الكبد الشديدة Liver Pathologies (Matzuk *et al.*, 1995).

The activin

2-2-2-2- الأكتفين

اكتشف الأكتفين في عام 1980 كبروتين يفرز من المناسل وهو يحفز افراز FSH من الغدة النخامية كما اعتبر كهرمون تكاثري ، كما ان للأكتفين فعاليات اضافية وصفت في انواع مختلفة من الخلايا خلال مراحل تطورها (Xia and Schneyer, 2009). ينتمي الأكتفين الى عائلة $TGF-\beta$ بوصفه عامل نمو وتمايز Growth and Differentiation Factor (Massague and Gomis, 2006). يخلق الأكتفين كدايميرات متماثلة Homodimeric او متباينة Heterodimeric ، تربط بينها اواصر ثنائية الكبريت Disulphide Bond ، يوجد ثلاثة انواع جزيئية من الأكتفين هي Activin-A مكون من $\beta A - \beta A$ Subunits و Activin-AB مكون من $\beta A - \beta B$ Subunits و Activin-B مكون من $\beta B - \beta B$ Subunits (Xu and Hall, 2006; Deli *et al.*, 2008)، هذه البروتينات هي عوامل في Transforming Growth Factor- β Family، وهي عوامل صمية او جوارية او ذاتية، كما ان لها مدى واسع من الوظائف الضرورية في العمليات التطورية والفسلجية الطبيعية لكل من الذكور والآنث (Dara *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008).

يُعد الأكتفين المنظم الأساسي في العمليات التكاثرية لكل من الذكور والآنث حيث يحفز تخليق وافراز الهرمون محرض الجريب (Seachrist *et al.*, 2012)، وقد وجد ان التمنيع ضد الأكتفين يثبط تحرير الهرمون محرض الجريب من النخامية كما هو الحال في الجرذان مستأصلة الغدة النخامية Hypophysectomized (de Paolo, 1997)، هذه الملاحظات دعمت الأبحاث التي تشير الى ان حذف مستقبلات الأكتفين من النوع الثاني Activin type II receptors يؤدي الى انخفاض تحرير الهرمون محرض الجريب في الفئران (Matzuk *et al.*, 1995). ان تنظيم التخليق الحيوي ل-subunit

α وتكوينها ازدواجات مع β -subunit يستطيع ان يغير التخليق الحيوي للأكتفين في الخلايا التي تخلق كلا الوجدتين مثل الخلايا الحبيبية المبيضية، فقد اشارت الدراسات الى ان Activin mRNA gene expression يوجد في اعضاء مختلفة مثل الدماغ والنخامية والمشيمة والكلية والرئة والبنكرياس والطحال والرحم (Antenos *et al.*, 2007).

تشير الدراسات الى أن Smad₃ المنظم الأساسي للأكتفين الذي يحث استساخ FSH- β subunit Transcription، بينما Smad₂ اكثر فاعلية في تنظيم استساخ FSH- β subunit في الخلايا المنتجة للغونادوتروبيين gonadotrope cells للفئران (Suszko *et al.*, 2008)، كما ان للأكتفين اهمية كبيرة في تنظيم انتاج FSH mRNA وان كل من الأكتفين والهرمونات المحررة للغونادوتروبيين GnRH منظمات فسيولوجية قوية لتخليق وتحرير FS (Welt *et al.*, 2002)، كما أشار Seachrist *et al.* (2012) الى ان التنشيط الأختياري لآشارات الأكتفين activin signaling قد يزودنا بأقتراحات لتطوير موانع الحمل بدون فعالية وتخليق الأندروجينات ، ولالأكتفين تأثيرات متنوعة على العمليات الفسلجية في الجسم والتي تشمل تكاثر الخلايا والموت الخلوي المبرمج والأبيض واستتباب الجسم والتمايز الخلوي والأستجابة المناعية ووظائف الغدد الصم (Chen *et al.*, 2006).

تنظم فعالية الأكتفين داخل الخلايا بواسطة كل من الأنهيبن والفوليسنتاتين، وتظهر فعالية الأكتفين من خلال وجود مستقبلات الأكتفين متعددة المظهر Pleiotrophic (Tsuchida *et al.*, 2009)، إذ يرتبط الأكتفين مع نوعين من المستقبلات هما Activin Receptor type-I and II (ActR-I and II) (Derynck and Feng, 1997; Tsuchida *et al.*, 2004)، يتضمن مسار اشارات الأكتفين ارتباط الأكتفين الى واحدة من مستقبلات النوع الثاني (ActR-II A or B) في معقد Complex مع مستقبل الأكتفين من النوع الأول (ActR1) وهذا يقود الى فسفرة Phosphorylation المستقبل من النوع الأول Type1Receptor، ومن ثم هذا المستقبل يفسر الجزئيات الناقلة الثانية وهي Smad₂

وSmad₃ وهذه بمجرد تنشيطها يتكون معقد مع Smad,Smad4 ثم ينتقل هذا المعقد الى النواة Nucleus حيث يتم تنشيط ترجمة الجينات Gene transcription، كما تم تشخيص Smad7 بوصفه مثبط Smad inhibitory إذ يقطع فسفرة Smad2, Smad3 وهذا يزود دائرة قصيرة من التغذية الأسترجاعية السالبة لمسارات الأشارة (Tsuchida *et al.*, 2008)، توجد مستقبلات الأكتفين بنوعيه في الإنسان والقوارض لغرض اظهار التأثير الذاتي والجواري للأكتفين (Dara *et al.*, 2006). بينت الدراسات ان البروتينات المنظمة لمستقبلات الأكتفين تسيطر على فعالية اشارات الأكتفين، كما ان المستقبلات من الثاني ActR II على سطح الخلية هي المستقبلات الأساسية للأكتفينات، وتنظم بواسطة مجموعة من البروتينات (Matsuzaki *et al.*, 2002).

2-2-2-3 دور الأنهيبيات والأكتفينات في العمليات التكاثرية للأناث Role of Inhibin and

Activin in the Female Reproduction

تشير الدراسات الى أن دور الأنهيبين والأكتفين في العمليات التكاثرية للأناث جوهرى اكثر من الذكور وعلى هذا الأساس اجريت كثير من الدراسات على التطور الجريبي خارج الجسم (*in vitro*) De (Kretser *et al.*, 2002)، حيث ان للأنهيبين بنوعيه A,B قابلية كبح افراز FSH من الغدة النخامية ، وبما أن مستويات Inhibin-A و estradiol تكون بدورات متشابهة لذا من الصعب ان نصف بدقة الدور المتخصص لهما في السيطرة على تنظيم افراز الهرمون محرض الجريب في الجزء الأخير من الطور الجريبي، وعلى أي حال إن ارتفاع inhibin-B في المرحلة المبكرة الى الوسطى من الطور الجريبي مسؤول عن انخفاض مستويات الهرمون محرض الجريب في الطور المتأخر من الطور الجريبي، وهذه الأنماط من الأنهيبين تعكس التأثير الموقعي لهذه البروتينات في التطور الجريبي (Roberts *et al.*, 1993).

تظهر الجريبات قبل الغارية Preantral Follicles إنتاج β B-subunit ولم يُكشف عن إنتاج α subunit في هذه الجريبات، لذلك فإن ازدواجات السلاسل البروتينية تنتج Activin-B، ومع تطور الجريبات فإن هرمون FSH يحفز إنتاج α -subunit وهذه مع β B-subunit تنتج inhibin-B ، يضاف الى ذلك ان inhibin-B ينتج من قبل الجريبات الصغيرة ،وقد وجد ان ارتفاع مستويات FSH في النساء التي تعاني من شبه انقطاع الطمث Perimenopausal يعود الى انخفاض انتاج المبيض للأنهيين B بسبب انخفاض عدد الجريبات الصغيرة ، إذ يمثل الأنهيين التغذية الراجعة السلبية لتنظيم افراز FSH ، ومن المحتمل أن يكون دور الأكتفين أكثر تأثيراً على إفراز FSH من خلال ميكانيكية الأفرار الجوارى Paracrine mechanism عبر الغدة النخامية وبالتالي فإن للأنهيين والأكتفين تأثيراً موقعياً على نشأة الجريبات المبيضية (Findlay *et al.*, 2001).

تشير الدراسات الكيميائية النسجية المناعية Immunohistochemistry الى الفعالية الموضعية للأنهيين والأكتفين وإن هذه البروتينات تنتج من الخلايا الحبيبية للمبيض والخلايا الصفراء Luteal cells وليس من خلايا القراب theca cells (Sidis *et al.*, 1998)، وعليه يكون السائل الجريبي غني بالأنهيين، ومن خلال دراسات أجريت على اناث الجرذان مستأصلة المبايض Ovariectomy، تعدّ المبايض المصدر الرئيسي للأنهيين الدائر في تلك الحيوانات ، حيث فقدت فعالية الأنهيين المناعية من دم تلك الحيوانات مستأصلة المبايض (Rivier *et al.*, 1986)، وقد أشار الباحثون الى أن التعبير الدوري Cyclic expression للحامض النووي المرسل mRNA لوحدها وبيتا توجد في طبقة الخلايا الحبيبية للجريبات المبيضية (Meunier *et al.*, 1988).

يتبع الأرتفاع surge الأول لمحرضات القند انخفاض ملحوظ بمستوى الأنهيين في المصل، هذا الانخفاض في مستويات الأنهيين أُقترح انه السبب لموجة FSH الثانية خلال طور الشبق مما يؤدي الى تجنيد أعداد جديدة من الجريبات المبيضية (Woodruff *et al.*, 1989) ، أشارت إحدى الدراسات على

Macaca fascicularis وهو نوع من القرود الى أن الخلايا الحبيبية للجريبات الغارية الصغيرة يظهر فيها β -subunit mRNA expression للأنهيين مما يؤدي الى تخليق Activin-B والذي له تأثيرات جوارية Paracrin وذاتية Autocrin في المبايض وفي تنظيم تحرير FSH من الغدة النخامية. ينخفض التعبير الجيني للحامض النووي المرسل لتحت الوحدة بيتا β -subunit mRNA expression في الخلايا الحبيبية للجريبات الرئيسية Dominant Follicles الى مستوى لايمكن الكشف عنه، بينما يظهر فيها فقط α -Subunits , β A (Woodruff *et al.*, 1990)، وان التأزر مع فعالية FSH تظهر من خلال تحفيز زيادة تعبير انزيم الأروماتيز Aromatase بواسطة الأكتفين مما يسبب زيادة افراز الأسترايول، بينما تثبيط افراز البروجستيرون بواسطة الأكتفين يؤدي الى تثبيط او تأخير تكوين الجسم الأصفر Luteinization (Miro *et al.*, 1991).

تقترح بعض الدراسات ان بروتينات الأنهيين والأكتفين بإمكانها ان تحور قابلية خلية البيضة بالتقدم خلال الأنقسام الأختزالي Meiosis ، إذ ينتج الأنهيين والأكتفين موقعياً في خلايا الركام المبيضي Cumulus وخلية البيضة، فقد وجد mRNA expression للأنهيين والفولستاتين في خلايا الركام المبيضي (Roberts *et al.*, 1993; Sidis *et al.*, 1998). اثبت ان Activin-A يحفز الأنقسام الأختزالي في خلية البيضة خارج الجسم In vitro في اغلب الأنواع ومن ضمنها الأنسان، بينما يعيق الأنهيين نضج خلية البيضة في الجرذان غير الناضجة (Alak *et al.*, 1998) وبذلك يرى الباحثون ان الأكتفين ربما يكون عامل مهم لنضج البويضات وذلك للمساعدة في برامج التكاثر reproduction programmes ، كما ان الأكتفين يزيد من قابلية خلية البيضة لتكوين كيس البلاستولا blastocyst في الأبقار (Silva and Knight, 1998).

يكون الأكتفين معاكس للأنهيين من حيث الوظيفة، حيث يقلل الأكتفين انتاج الهرمون اللوتيني المحفز للأندروجينات في خلايا القراب الداخلي لمبايض الجرذان والأنسان (Hillier *et al.*, 1991).

ومن خلال دراسة اجراها *Cuiling Lu et al.* (2009) وجد ان اضافة inhibin-A الى مزرعة الخلايا الحبيبية للجرذان يسبب كبح معنوي للهرمون محرض الجريب وانخفاض معنوي لمستويات مستقبلات الهرمون محرض الجريب FSHR حيث يعمل الأنهبين على تثبيط فعالية الحفازات Promoters لمستقبلات FSH ، بالإضافة الى ذلك Inhibin-A يستطيع كبح انتاج البروجستيرون والأسترايديول ولكنه لم يخفض Forskolin الذي يحث تكوين الستيرويدات Steroidogenesis، في حين استطاع تثبيط SF-1 expressios ومستقبلات الأندروجينات للجرذان (Heckert, 2001). كما انه ينظم في مختلف الخلايا، البروتينات المتخصصة التي تشترك في تكوين الستيرويدات (Bakke *et al.*, 2001; Anderson and Byskov, 2006; Humaidan *et al.*, 2006) inhibin-A وعليه استنتج أن Lalli) قادر على كبح FSH عن طريق التغذية الراجعة المضادة من خلال خفض مستقبلاته FSHR (and Sassone-Corsi, 2003).

من خلال اهمية الأنهبين والأكتفين كمنظمات موقعية لتخليق الستيرويدات من قبل خلايا القراب أجريت دراسة شخصلت تأثير الأنهبين على خلايا القراب المنتجة للأندروجينات ودور الأنزيمات المتعلقة بتخليق الستيرويدات، حيث اشار الباحثون الى ان الأكتفين بتركيز (1-100 ng/ml) يكبح انتاج androstenedione في مزرعة خلايا القراب خارج الجسم *in vitro* ، بينما الأنهبين بتركيز (1-100 ng/ml) يعيق التأثير الكابح للأكتفين في نفس المزرعة، وكذلك يزداد انتاج androstenedione عند اضافة الأنهبين فقط (Young and Mc Neilly, 2012)، إذ ينظم افراز الأندروجينات من خلال خلايا القراب للجريبات الغارية الصغيرة مثل الجريبات النامية الى الجريبات قبل الإباضة خلال دورات التكاثر الطبيعية (Young and Mc Neilly, 2010)، فقد اشارت دراسات سابقة الى ان الأكتفين يستطيع تخفيض انتاج الأندروجينات *in vitro* في الإنسان وان الأنهبين يحفز انتاج الأندروجينات ومعادلة تأثير الأكتفين وذلك من خلال ارتباط الأنهبين مع مستقبلات betaglycan و ActR11 وذلك لأعاقبة تأثيرات

الأكتفين (Lewis *et al.*, 2000)، كذلك اشارت دراسات على الفئران الى أن الطبقة الحبيبية لمبايض الفئران تحتوي على (ERs β) التي تستحث بالأكتفين ، ومن جانب آخر الأستروجين يكبح التعبير الجيني للأكتفين ، هذه النتائج ادت الى اقتراح التغذية الراجعة بين الهرمونات المنظمة للجريبات (Kipp *et al.*, 2007).

2-3 التمنيع السلبي Passive Immunization

تشير الدراسات الى أن الأستجابة المناعية Immune Response يمكن أن تتولد من خلال بعض التوليفات الصغيرة small synthesized لبيبتيدات الأنهبين والتي تشمل α -subunits 1-32، 1-26 و 7-26، وأثبت ان التأثيرات المناعية لـ α -subunits 1-32 افضل من القطع الأخرى بالرغم من ضعفها الاستضادى Immunogenicity (Anderson *et al.*, 1998)، كما كان الأنهبين هدفاً لدراسات اجريت في العقد الماضي بوصفه بديلاً محتملاً لتطوير لقاحات الخصوية، والسبب في ذلك هو ان بروتينات الغدد التناسلية أساس جيد لهرمونات التغذية الأسترجاعية السالبة لتنظيم افراز الهرمون محرض الجريب من الغدة النخامية ، إذ يعدّ FSH الهرمون الرئيسي الذي يعزز انتاج النطف ونمو الجريبات المبيضية الغارية (Findlay, 1993).

ان تمنيع الحيوانات ضد الأنهبين الداخلي من المفترض أن يقلل تأثيرات التغذية الأسترجاعية السالبة لهرمونات الغدد التناسلية على انتاج الهرمون محرض الجريب وبذلك يتحسن تركيز FSH المفرز من الغدة النخامية والموجود في مصل الدم، حيث ان الأرتفاع النسبي لتركيز الهرمون محرض الجريب في الدورة الدموية للحيوانات الممنعة يعزز نمو الجريبات ويزيد نسبة الأباضة ، اضافةً الى ان الأنهبين له تأثيرات سلبية ذاتية او جوارية على وظيفة المناسل والتي ربما تكبح الفعالية التكاثرية (Hakovirta *et al.*, 1993)، كما وجد ان حقن السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات المعامل بالفحم النشط Charcoal في الثيران بعمر 1-2 سنة يخفض مستوى الهرمون محرض الجريب الدائر في الدم نتيجة

لدور الأنهيين في كبح افرازه من الغدة النخامية ان كان في الأناث أو الذكور (Kaneko *et al.*, 1993;)
(de Kretser *et al.*, 2000).

ان التمنييع السلبي ضد الأنهيين الداخلي Endogenous inhibin يعطي علامة واضحة لزيادة مستويات FSH في عمر 6 أشهر في الثيران (Kaneko *et al.*, 1993) ، هذه الدراسة كشفت ان الأنهيين يشترك في تنظيم افراز FSH في الثيران في المرحلة الأخيرة من التطور السابق للبلوغ. فقد اجريت دراسات المعادلة المناعية Immunoneutralization على القوارض، إذ ادت معادلة الأنهيين في مزرعة الجربيات للجرذان خارج الجسم الى انخفاض مستويات الأسترايول بينما عززت مستويات البروجستيرون وكلاهما عاد الى مستواه الطبيعي عند المعاملة مع الأنهيين خارجي المنشأ (Smyth *et al.*, 1994)، كما لوحظ التأثير الجواني على تخليق الهرمونات الستيرويدية في مزرعة خلايا القراب حيث لوحظ تحسن انتاج الأندروجين استجابة لأضافة الأنهيين، وهذه الأندروجينات تتحول الى الأسترايول بواسطة الخلايا الحبيبية (Hsueh *et al.*, 1987; Hillier *et al.*, 1991).

اثبت الباحثون ان التمنييع السلبي ضد الأنهيين يزيد افراز الهرمون محرض الجريب في طور الشبق مع زيادة افراز الأسترايول أو مع ارتفاع افراز البروجستيرون في منتصف الطور الأصفر Mid-Luteal phase، كذلك تمكنوا من استحداث التبييض المتعدد Multiple Ovulation بنجاح من خلال التمنييع السلبي ضد الأنهيين في اغلب الأنواع كالفتران والجرذان والهامستر والأبقار والخيول (Kishi *et al.*, 1996; Akagi *et al.*, 1997; Nambo *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; AL-Sa'aidi and Samir, 2010)، كما وجد ان التمنييع ضد الأنهيين يسرع البلوغ في اناث الجرذان ويعزز تطور المبيض (Ishigame *et al.*, 2005; AL-Sa'aidi and Samir, 2010). تشير النتائج الى ان تثبيط التأثيرات السلبية للأنهيين على تطور الجربيات المبيضية ونضج البويضات يحسن القدرة على انتاج الأجنة في الأبقار (Liu *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2015). أثبتت فحوصات الأشعة فوق الصوتية

Ultrasonographic والاختبارات المناعية و Immuno tests ارتفاع عدد الجريبات المتطورة في الماعز الممنوع ضد الأنهبين بينما التمنيع الفعال لم يحسن الخصوبة في الماعز *Norduz goats* (Cedden *et al.*, 2007). كذلك أثبتت إحدى الدراسات إن التمنيع بـ 1-32 α -subunit inhibin يحث نمو الجريبات قبل الغارية في الأبقار فقط حتى عشرة أيام ولكن يظهر انخفاض في النمو بسبب الموت الخلوي المبرمج في مزرعة 15 و 25 يوم *in vitro* (Zoheir and Allam, 2013).

2-4- السائل الجريبي Follicular Fluid

في العام 1948 وصف السائل الجريبي بأنه مجرد راشح بسيط من الدم يتجمع بين طبقات الخلايا الحبيبية خلال نمو الجريبات المبيضية (Harter, 1948)، ثم أصبح يعرف بالسائل الجريبي، ويتم الحصول عليه من مبايض اللبائن والتي تكون قد تعرضت لتأثيرات مختلفة خلال عمليات التكاثر إضافة إلى تأثيرات الغدد الصماء (Wallace and Mc Neilly, 1985). يكون السائل الجريبي الخام مصدراً للأنهبين في مختلف الدراسات التي تجرى داخل وخارج الجسم، كما إن السائل الجريبي منزوع الستيرويدات يكون غني بالأنهبين الفعال حيويًا، (Dejong and Sharpe, 1976; Knight *et al.*, 1991)، ويمثل الأنهبين منظماً للهرمون محرض الجريب عن طريق التغذية الأسترجاعية السالبة، ويعتبر FSH المفتاح الذي يحدد نمو وتطور الجريبات (Knight and Glister, 2001).

حُدثت العلاقة المعكوسة بين تحرير الهرمون محرض الجريب من الغدة النخامية والأنهبين الجريبي من خلال دراسات في الماعز (Medan *et al.*, 2003)، إذ تشير الدراسات إلى إن السائل الجريبي يسبب تثبيطاً أولياً لنمو الجريبات، وهذا ينتج عنه لاحقاً تعزيز النمو الجريبي وبالتالي زيادة نسبة الإباضة (Miller *et al.*, 1979; Wallace and Mc Neilly, 1985)، وأن هذه الزيادة في التطور الجريبي تُعزى إلى فرط إفراز Hypersecretion هرمون FSH بعد انقطاع المعاملة مع السائل الجريبي (Cumminus *et al.*, 1983; Miller and Martin, 1993)، وكما هو الحال في السائل الجريبي

البقري فأن السائل الجريبي من الجاموس Buffalo هو الآخر غنيا بهرمون الأنهيين (Palta *et al.*, 1996).

اشارت الدراسات الى أن استخدام السائل الجريبي الخام خارج الجسم او استخدام وزن جزئي معين من الأنهيين يسبب تأخير البروجسترون الذي يحث بداية دورة الشبق والأباضة في الماعز والأبقار الهجينة Crossbred Cattle (Kumar *et al.*, 1998) ، كما بينت دراسات حديثة، التي إشملت الدورة الشبقية في القوارض، أهمية الميكانيكية المبيضية الموقعية في تنظيم تكاثر الطبقة الطلائية المبيضية ovarian squamous epithelium، كما ان الدورة التكاثرية في الجرذان والفئران تتعزز من خلال محرضات القند (Davies *et al.*, 1999; Burdette *et al.*, 2006) وقد وجد ان محرضات القند والأستروجينات والأندروجينات تستطيع تحفيز تكاثر الطبقة الطلائية المبيضية خارج الجسم (Syed *et al.*, 2001; Gubbay *et al.*, 2004).

يحتوي السائل الجريبي على مكونات كيميائية حيائية ضرورية لفسولوجيا المبيض مثل تكوين الستيرويدات و نمو الجريبات و نضج البويضات والأباضة ، كما وجد أن لبروجسترون السائل الجريبي دورا مهما في حث فعالية الجسم الطرفي Acrosome للنطف في فحول الخيل (Rath *et al.*, 2003) والثيران Bulls (Lenz *et al.*, 1982)، ومن الوظائف الأخرى للسائل الجريبي هي تثبيط تخليق Prostaglandins وتحويل الجريب الى الجسم الأصفر في منتصف الدورة الشبقية Mid-estrus cycle، على الرغم من أن هذا التأثير المثبط لم يلاحظ عندما اخذ السائل الجريبي من جريبات قبل الأباضة (Shemesh, 1979)، كما وجد ان السائل الجريبي يزود خلية البيضة وخلايا الطبقة الحبيبية بالتغذية اللازمة من خلال تسهيل نقل المغذيات من بلازما الدم، ووصولها الى النمو والتطور خلال الدورة التكاثرية (Edwards, 1974)، العوامل الفسيولوجية في الجريبات المبيضية تتأثر بشكل رئيسي بصفات وخصائص الأنسجة التي تفصل السائل الجريبي من الدورة الدموية، كما ان نفاذية جدار الجريبات للماء

والمكونات البايوكيميائية والتي يكون مصدرها من الدم يمكن اعتبارها من مكونات السائل الجريبي ، إضافة الى ذلك ان قابلية الخلايا الحبيبية على افراز العوامل المحفزة والمثبطة كنتيجة لعمليات الأيض يمكن ان تحور مكونات السائل الجريبي ، هذه العوامل بدورها تؤثر في المعايير الفيزيائية مثل الأوزموزية واللون والأس الهيدروجيني pH واللزوجة وحجم السائل المتكون خلال تطور الجريبات (Fisch *et al.*, 1990).

يحتوي السائل الجريبي على مجموعة كبيرة ومتنوعة من مكونات مصل الدم جنباً الى جنب مع مجموعة من الأفرزات التي تخلق بواسطة خلايا متخصصة في المحيط الصغير للجريبات، نتيجةً لذلك فإن مكونات السائل الجريبي تتغير خلال نمو واتساع الجريبات (Wise, 1987) ومن المكونات المهمة للسائل الجريبي هما محرضات القند والهرمونات الستيرويدية ومثلما تنمو الجريبات فإن اعداد مواقع ارتباط محرضات القند تتغير في كميتها ونوعيتها (Channing, 1972)، وكما يبدو ان FSH يلعب دور في تكاثر خلايا الجريبات جنباً الى جنب مع تطور الغشاء القاعدي كما ان LH وFSH معاً تعزز تكوين الغار Antrum لكل جريبة ولتمكين خلايا القراب الداخلي Theca interna لتصبح وعائية خلال التطور (Eshkol *et al.*, 1972).

ان تركيز الستيرويدات الموجودة في السائل الجريبي يختلف خلال المراحل المختلفة للدورة التكاثرية ، كما أن التراكيز تكون مختلفة على نطاق واسع بين الجريبات المختلفة في نفس الحيوانات ولنفس الأنواع، وان التأثير المثبط للسائل الجريبي على النضج التلقائي للبويضات وصف لأول مرة من قبل Chang (1955) في الأرانب، ثم وجد انه يثبط النضج في الجرذان (Tsafriri *et al.*, 1977) والهامستر (Gwatkin and Anderson, 1976)، كما لاحظ Amesterdam *et al.* (1979) ان Gonadotropin-sensitive adenylate cyclase الموجود في الغشاء البلازمي لمبايض الجرذان

يثبط بواسطة السائل الجريبي البقري، وان معاملة السائل الجريبي بالفحم النشط Charcoal لأزالة
الستيرويدات لم تغير في الفعالية التثبيطية للسائل الجريبي.

اشارت دراسات اخرى الى ان خلايا الطبقة الحبيبية للمبيض تنتج عامل مثبط للنضج النووي في
مزرعة لخلايا البويضات خارج الجسم in vitro وهذه النتائج أدت الى اقتراح أن الخلايا الجسمية الجريبية
Follicular somatic cells تثبط النضج النووي (Klumpp, 2004)، وان تحديد هوية المواد القادرة
على تأخير النضج النووي وبالتالي السماح للتغيرات النووية والساييتوبلازمية ان تظهر بشكل متزامن كانت
مادة لدراسات متعددة (Liu *et al.*, 2003; Hussein *et al.*, 2006; Sirard *et al.*, 2007;)
(Albuz *et al.*, 2010).

وجد أن السائل الجريبي في الأبقار يخفض من النسبة المئوية لخلايا البويضات التي لها القابلية
على النضج (Sirard *et al.*, 1992; Ducolomb *et al.*, 2013) ، كما ان السائل الجريبي البقري
الذي جمع من الجريبات بعد اربع ساعات من تدفق الهرمون اللوتيني LH يثبط نضج البويضات الأ ان
هذا التأثير المثبط كان غائباً في السائل الجريبي الذي تم جمعه بعد ثمان ساعات او اقل بعد تدفق
الهرمون اللوتيني LH (Romero–Arredondo and Seidel, 1994).

اشار Aguilar *et al.* (2001) الى ان السائل الجريبي يتألف من الشوارد Electrolytes و
الهرمونات Hormones والأحماض الأمينية Amino acids و عوامل النمو Growth Factor
ومكونات اخرى استخدمت كمواد طبيعية لمنع الأنقسام الأختزالي، كما وثقت بعض الدراسات ان وسط
النضج المضاف اليه السائل الجريبي يجهز وسط مناسب لتطور البويضات في الأبقار ، حيث انه يزيد
درجة اتساع خلايا الركام المبيضي Cumulus ويعزز التطور الجنيني (Algriany *et al.*, 2004)،
كما وجد Hypoxanthine (البيورين الشائع) في السائل الجريبي ، وهو يكبح نضج البويضات لفترات
طويلة ، وان تركيز Hypoxanthine في السائل الجريبي البقري قادراً لوحده على ادامة كبح الأنقسام

الأختزالي للبيوضات في الفئران ولكنه يبقى واحداً من عدة عوامل (Kadam and Koide, 1990). كما وجد ان بروتين الترسين Trypsin Protein وهو بروتين غير مستقر يسمى البروتين المنظم الجريبي Follicle Regulator Protein الذي تم عزله من السائل الجريبي للخنازير Porcine FF يثبط النمو الجريبي في الجرذان والقردة داخل الجسم (Ono *et al.*, 1986)، إضافةً الى ان عامل النمو البشري EGF الذي ينتج من خلال خلايا القراب (Skinner and Coffey, 1988).

إضافة الى الأنهيبن، يحتوي السائل الجريبي عوامل اخرى تشترك في تطور الجريبات ونمو البويضات وتكاثر الخلايا الجريبية (Armstrong and Webb, 1997; Mishra *et al.*, 2003). تقتصر ببتييدات الجريبات المبيضية على انظمة ارتباط (IGF) Insulin Like Growth Factor و Inhibin و Activin و Proteoglycans إضافة الى مجموعة كبيرة من الببتييدات في السائل الجريبي للأغنام مع اختلافات نوعية وليست كمية متعلقة بحالة الجريبات مثل الحجم و الرتق والطرز الجيني (Roche, 1996). ان جميع هذه الببتييدات وادوارها الفسلجية ربما تؤدي الى فهم افضل لميكانيكية السيطرة على وظيفة المبيض، حيث ان 60KDa من الببتيد المعزول من السائل الجريبي البقري يثبط نضج البويضات (Dostal *et al.*, 1996)، بينما البروتين 26.6 يعزز نضج البويضات خارج الجسم في الجاموس (Gupta *et al.*, 2005b) والنعاج (Gupta *et al.*, 2005a).

أشار Nandi *et al.* (2006) الى تأثير العامل داخل الجريبي الغنمي بوزن جزيئي 30.1KDa في تنظيم تطور الجريبات الغارية والبويضات، حيث يعتبر الببتيد المعزول مثبثاً لكل من الركاب المبيضي وخلايا الطبقة الحبيبية خارج الجسم في النعاج، وقد وجد EL-Shahat *et al.* (2013) أن مكونات السائل الجريبي تختلف طبقاً للحالة التكاثرية للحيوان وان الأهمية الفسيولوجية لتلك الاختلافات انها تؤثر على نضج البويضات ومايتبعه من تطور في الجمال، كما أشارت دراسات سابقة الى ان إضافة السائل الجريبي الى وسط النضج خارج الجسم (IVM) يعزز من نشاط المايٹوكوندريا وبالتالي زيادة في تطور

البويضات في الخنازير (Brevinie *et al.*, 2005) كما انه يعزز اختراق السبيرمات من خلال تحسين اتساع الركام المبيضي وتعزيز مستويات ATP في البويضات (Somfai *et al.*, 2012).

2-4-1- تأثير الفحم النشط على السائل الجريبي Effect of Charcoal on FF

أشارت عدد من الدراسات الى تأثيرات السائل الجريبي، إذ أن وجود الأنهيين في السائل الجريبي البقري يكبح افراز الهرمون محرض الجريب في النعاج (Miller *et al.*, 1982)، وبذلك فأن الأنهيين ينظم افراز FSH من خلال دوره غير المباشر عن طريق السيطرة على عملية نشأة الجريبات (Findlay *et al.*, 2001)، لاحظ Miller *et al.* (1979) أن حقن 10 مل من السائل الجريبي البقري المعامل بالفحم النشط في الأبقار مرتين باليوم ولمدة ثلاثة ايام يؤخر ظهور طور الشبق estrus والأباضة Ovulation وقد فسر هذا التأخير على انه نتيجة لتأثير السائل الجريبي البقري على المبيض او الغدة النخامية، مما دعاهم الى الاقتراح ان السائل الجريبي الغنمي قد يحتوي على مكونات اخرى غير ستيرويدية، منها الأنهيين، التي تؤدي الى كبح افراز الهرمون محرض الجريب في الجاموس (Nandi *et al.*, 2006).

في دراسة اجراها Welschen *et al.* (1979) حول تأثير السائل الجريبي البقري والخنزيري منزوع الستيرويد على FSH في الجرذان مستأصلة المبيض Unilateral ovariectomized rats ، وجد ان حقن 60 µl من السائل الجريبي يؤدي الى انخفاض معنوي في مستويات FSH بينما سبب حقن 250 µl انخفاض اكبر في FSH ، حيث يعتبر السائل الجريبي مصدر غني بهرمون الأنهيين وهو مع الأسترايول يسيطر على تركيز FSH في الدورة الدموية (Mann *et al.*, 1990). كما وجد ان المعاملة المتكررة للنعاج مع السائل الجريبي منزوع الستيرويد خلال الطور الأصفر او الطور الجريبي من الدورة الشبقية ينتج عنه انخفاض FSH، يتلوه نهوض افراز FSH بعد انقطاع المعاملة مع السائل

الجريبي منزوع الستيرويد (Wallace *et al.*, 1985)، وقد لوحظت التأثيرات ذاتها عند تكرار الحقن بالسائل الجريبي منزوع الستيرويد بالنعاج خلال الطور الجريبي (Henderson *et al.*, 1986; Baird *et al.*, 1990).

أن التمنيع ضد السائل الجريبي المنقى جزئياً Partially purified يزيد نسبة الأباضة في النعاج من غير زيادة ثابتة في تركيز FSH في بلازما الدم (Henderson *et al.*, 1986; AL-Obaidy *et al.*, 1987)، إضافة الى ذلك أن تمنيع النعاج ضد السائل الجريبي البقري ينتج عنه زيادة ثلاث مرات في تركيز FSH عن المستوى الطبيعي، بينما نسبة الأباضة تزداد معنوياً حوالي 40% (Miller *et al.*, 1982)، كما أن معاملة الجرذان مع السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويد يسبب زيادة في نسبة الأباضة التي تتجلى من خلال تراكيز البروجستيرون المفرز من الجسم الأصفر (AL-Hassan and Moussa, 1998). فقد أشارت الدراسات الى ان الجرعة العالية (4ml) من السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويد تؤدي الى ارتفاع المستويات الفسلجية لـ inhibin-A، وبعد يوم واحد من التوقف لوحظ ارتفاعاً كبيراً في مستويات FSH، أن هذه النتائج تشير الى مساهمة ميكانيكية التغذية الراجعة السلبية للأنهيين في تنظيم محرضات القند (Bleach *et al.*, 2001).

Growth hormone and Ovary

2-5- هرمون النمو والمبيض

يفرز هرمون النمو من الفص الأمامي للغدة النخامية adenohipophysis وهو يشكل الجزء الأكبر من الغدة النخامية من ناحية الحجم والوزن (Ganong, 2012)، يعرف هرمون النمو أيضاً بـ Somatotropine حسب مامعروف عن دور هرمون النمو في النمو الجسمي بعد الولادة، عند افراز هرمون النمو من الفص الأمامي للغدة النخامية الى الدورة الدموية يحفز تخليق وتحرير عامل النمو شبيه الأنسولين (IGF1) من الكبد وبعض الأنسجة الموقعية ويعد هرمون النمو الوسيط الرئيسي للنمو خلال مرحلة الطفولة Childhood (Le Roith *et al.*, 2001)، ويفرز بطريقة نبضية من خلال

Somatotrophs في الغدة النخامية الأمامية (Edmondson *et al.*, 2003) تحت سيطرة ببتيديات عصبية تسمى الهرمونات المحررة لهرمون النمو (GH-RH) والسوماتوستاتين (SS) ، حيث ان SS يثبط تحرير هرمون النمو GH من غير ان يؤثر في تخليق هرمون النمو.

تشير العديد من الدراسات ان الهرمونات المحررة لهرمون النمو GH-RH هي التي تبدأ التحرر النبضي لهرمون النمو بينما SS ينظم وصول نبضات GH الى مستوى الذروة، وان حجب فعالية الهرمون المحرر لهرمون النمو GH-RH Blocking the action من خلال التمنيع السلبي في الجرذان Passive immunization of rats أو من خلال GH-RH antagonist في الجرذان والأنسان يثبط التحرير النبضي لهرمون النمو، فقد وجد أن حقن هرمون النمو تحت الجلد يومياً لمدة 2-5 ايام يخفض من استجابة endogenous GH للهرمونات المحررة لهرمون النمو وان هذا التأثير ربما يتوسطه افراز عامل النمو شبيه الأنسولين IGF-1 من الكبد (Ross *et al.*, 1987).

يمتلك هرمون النمو اثنين من اوجه الارتباط المتميزة التي ترتبط بمستقبلات هرمون النمو GHR على جانبي الجزيئة تعرف بالمواقع 1,2 (Site 1,2) ، تحتوي هذه المواقع على حقول Domains متطابقة تماماً مع المستقبلات (De Vos *et al.*, 1992)، يزيد هرمون النمو من دعم سلائف الصفيحة المشاشية الغضروفية epiphyseal growth plate chondrocyte precursors والخلايا الجذعية stem cells (Wang and Hardy, 2004)، تختلف هرمونات النمو في تأثيراتها على النمو الجسمي والأبيض وتنظيم تكوين الدهون في الجسم Adipogenesis بفعل تنشيط مسارات الأشارة المحددة (Edmondson *et al.*, 2003) Activation of distinct pathways.

تشير الدراسات الى اهمية دور هرمون النمو في الوظيفة المبيضية للفئران نوع murine وهي فئران قزمية Dwarfs تعاني من انخفاض شديد في مستويات العامل شبيه الأنسولين IGF-1 الدائر في الدم (Zhou *et al.*, 1997) ، كما ان النضج الجنسي فيها يكون متأخر وكما هو الحال في الأنسان نقص

هرمون النمو GH او مستقبلات هرمون النمو GHR يؤدي الى تأخر النضج الجنسي (Laron, 1999)، هذه الفئران تكون خصبة بالرغم من حجمها الصغير ، الطراز المظهري للمبيض Ovarian phenotype تم فحصه بدقة في تلك الفئران الطافرة Mutant mice ، فقد سجلت الجريبات انخفاض ملحوظ في مستقبلات هرمون النمو GHR ومن خلال متابعة جميع مراحل التطور الجريبي وجد ان اعداد الجريبات الرتيقة atretic follicle لم تزداد (Zakzek *et al.*, 2002)، وقد اظهرت هذه الفئران انخفاض في نسبة الأباضة نتيجة لمعاملتها بمحرضات القند مما يشير الى وجود خلل اساسي على مستوى المبيض (Bachelot *et al.*, 2002).

ان معاملة الجرذان الخالية من مستقبلات هرمون النمو بالعامل شبيه الأنسولين(IGF-1) لمدة اسبوعين لم تنجح في انقاذ الخصوبة او قابليتها على الاستجابة لمحرضات القند ، هذه الملاحظات تشير الى أن endogenous GH يعزز توظيف Recruitment او بقاء survival الجريبات في مبيض الفئران وبذلك يعزز القدرة التكاثرية ، كما ان حقن GH ينتج عنه زيادة في نسبة الأباضة في الفئران (Cecim *et al.*, 1995)، يكون مستوى التعبير واطناً في الولادة ثم يرتفع الى مستوياته في البلوغ خلال خمسة اسابيع من الولادة ، وأن استأصال الغدة النخامية والمعاملة مع هرمون النمو لم تؤثر في مستويات الحامض النووي الرايبوزي المرسل لمستقبلات هرمون النمو (Mathews *et al.*, 1994).

لتحديد الأثار المترتبة على غياب مستقبلات هرمون النمو GHR والبروتينات الرابطة له GHBP على الوظيفة التكاثرية في الأنثى، استخدم نموذج عطل فيها الجين GHR/GHBP من خلال التركيب المتماثل Homologous recombination ، حيث كان التأثير الرئيسي على الوظيفة التكاثرية الذي لوحظ هو انخفاض منتظم في Litter size (عدد الأجنة في البطن الواحدة) وهذا الخلل يعود الى انخفاض نسبة الأباضة، فضلاً عن أن استجابة الأباضة عند المعاملة بـ Exogenous

gonadotropins كانت ثلاث مرات اقل في GHR/GHB Knockout مقارنة بمبايض الطراز البري Wild type، أكدت هذه النتائج على ان انخفاض نسبة الأباضة تعود بشكل اساسي الى خلايا مبيضية وليس نقصا او خلايا في كوندوتروبينات النخامية (Bachelot *et al.*, 2002).

ان هرمون النمو يسيطر على عدة جوانب في نمو الحيوان وأيضه الغذائي كذلك يؤثر في الفعالية التكاثرية في الحيوانات، وان التعبير الجيني لمستقبلات هرمون النمو في الكبد تجاوز تعبيره في الانسجة التكاثرية بحوالي 70 مرة ، إذ أن ارتباط هرمون النمو في الكبد يحفز سلسلة من التغيرات الايضية Metabolic Change وهذه بدورها تؤثر في نمو وأيض أبقار الحليب Dairy Cattle (Lucy, 2000). يعدّ هرمون النمو عامل مهم في النضج الجنسي والوصول الى البلوغ، وان تأثيرات هرمون النمو قد تكون مباشرة من خلال وجود مستقبلاته في الخلايا الحبيبية وخلايا البيض oocytes أو قد تكون غير مباشرة تتوسطها زيادة العامل شبيه الأنسولين IGF-1 .

تشير الدراسات الى ان هرمون النمو البقري يؤدي الى تأخير البلوغ عند حقنه في اناث الجرذان الفتية (Advis *et al.*, 1981)، خلافاً لما له من فعاليات محفزة على المناسل- النخامية، فقد اشارت الدراسات الى ان تعبير جين GH في خصى أجنة الفئران (Nguyen *et al.*, 1996) وفي الديوك البالغة ومبايض الدجاج (Harvey *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004; Ahumada-Solorzano *et al.*, 2012)، والإنسان (Berger *et al.*, 1999)، إذ يلعب هرمون النمو دورا مهما من خلال المبايض في الإفراز المبكر للهرمون محفز الجريب غير المعتمد على التطور الجريبي، وتكون فعالية الارتباط لهرمون النمو في قمتها خلال نشأة الجريبات المبكرة في الخنازير (Gomez *et al.*, 1998)، وفي الإنسان يظهر ان هرمون النمو يزيد من نسبة النضج الجنسي فقط عندما يكون النمط البلوغي لأفراز محرضات القند من الغدة النخامية ثابتاً (Sharara and Giudice, 1997)، ان هرمون النمو يزيد

احتمالية الحمل السريري Clinical Pregnancy وزيادة المواليد الحية في المبايض ضعيفة الاستجابة والتي تم تحفيزها مع GnRH و Gn (IVF) (Kolibianakis *et al.*, 2009).

2-5- نظام عوامل النمو شبيهة الأنسولين Insulin Like Growth Factor System

يشمل هذا النظام العوامل شبيهة الأنسولين IGF1 و IGF2 و IGF3 ، المستقبلات المقابلة لها Corresponding Receptor والبروتينات الرابطة لعوامل النمو (IGFBPS)، تمت دراسة هذا النظام بشكل موسع في اللبائن (Stewart and Rotwein, 1996; Le Roith *et al.*, 2001) لدوره المهم في التطور والأدماة (Wood *et al.*, 2005; Le Roith and Yakar, 2007)، كما انه يساهم في عمليات التكاثر والتمايز ومنع الموت الخلوي المبرمج (Werner *et al.*, 1991). تتكون العوامل شبيهة الأنسولين IGF1 و IGF2 من اربع حقول Domains هي A,B,C,D حيث ان A,B domains تشابه الأنسولين اما C domain فهو لايشابه الأنسولين حيث انه لايتشطر في IGFS الناضج اما D domain فهو غير موجود في الأنسولين (Le Roith *et al.*, 2001).

المصدر الرئيس للعامل شبيه الأنسولين-1 في الدورة الدموية هو الكبد ويظهر تعبيره بشكل واسع في اغلب الأنسجة خاصة خلال التطور بعد الولادة (Daughaday and Rotwein, 1989)، وهي تمثل ببتيديات رباعية التركيب Tetramer Structure تنشأ من Prehormone الهرمون السلف سداسي التركيب ، حيث يتألف من 6- domains وعند الأنتشار التحللي Proteolytic Cleavage لهذا الهرمون ينتج عنه الببتيد الناضج (Wood *et al.*, 2005). تفرز هذه الببتيديات من خلال الكبد ومن ثم الى الدورة الدموية ، يتألف IGF1 من 70 حامض أميني مرتبة في سلسلة مفردة مع ثلاث جسور ثنائية الكبريت Disulfied Bridges ضمن الجزيئات ، يبلغ الوزن الجزيئي ل IGF1 7649 Dalton ، وله

القدرة على توليد الانقسام الخيطي Mitogenic activity وتنظيم النمو، يسمى ايضاً الـ Somatomedine-C وشخص كوسيط لفعاليات هرمون النمو (Laron, 2001).

يوجد IGF1 في الأنسان ويشفر له من خلال IGF-1 Gene ، ومن اثاره عدم كبح فعاليته الشبيهة بالأنسولين (Jansen *et al.*, 1983; Höppener *et al.*, 1985)، يكون العامل IGF1 مرتبطاً مع العديد من الصفات التكاثرية مثل العمر عند اول ولادة (Kadakia *et al.*, 2001; Yi Lmaz *et al.*,) (Patton *et al.*, 2007) ومعدل الحمل (2006; Brickell *et al.*, 2007) والبيوضات التوأم (Echternkamp *et al.*, 2004) والتطور الجنيني قبل الغرس (Velazquez *et al.*, 2005) ، وهناك دراسات تشير الى دوره المهم في التطور قبل الولادة ، إذ وجد أن الفئران التي احدث فيها حذف متماثل من IGF1 Gene كانت اوزان الولادات فيها اقل بحوالي 60% من الفئران ذات الطراز البري Wild Type ، كما أن معدل الوفيات بعد الولادة كان مرتفعاً بسبب قصور في تطور الرئتين والحجاب الحاجز (Liu *et al.*, 1993).

بالأضافة الى الدور الصمي، فإن IGF1 له دور جواربي او/ و ذاتي مهم خلال التطور الطبيعي ونمو الكائنات الحية (Yakar *et al.*, 1999)، وان الأنتاج الموضعي له فعاليات متنوعة في المبيض تتضمن تحسين تكاثر الخلايا وفعالية انزيم اروماتيز والتخليق الحيوي للبروجستيرون (Adashi *et al.*, 1992; Kamada *et al.*, 1985). وجد Bonilla *et al.* (2011) ان اضافة IGF1 كمكمل Supplementation الى مزرعة جنين الأبقار Bovine Embryo Culture ادى الى زيادة نسبة تطور كيس البلاستولا Blastocyst وبقاء الأجنة، كذلك لاحظوا انخفاض تأثيرات الصدمة الحرارية على الأجنة. وتشير الدراسات الى وجود صنفين من عامل النمو شبيه الأنسولين-1 هما 1 و2 شخصاً في مبيض ورحم الفأر وان للأستروجين تأثير كبير في اظهار التعبير الجيني للصنف الأول (Adamo *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1993; Ohtsuki *et al.*, 2007).

أما العامل شبيه الأنسولين IGF2 هو بيتيد متعدد مفرد السلسلة يماثل العامل شبيه الأنسولين IGF1 بنسبة 70% (Nielsen, 1992 ; Buyalos, 1995)، وعند مقارنته مع IGF1 نجد انه لايعتمد بشكل قوي على هرمون النمو GH ، حيث ان IGF2 لم يعزز النمو في الجرذان مستأصلة الغدة النخامية (Brown *et al.*, 1986)، تشير الدراسات في القوارض وبعض الأنواع الأخرى ان IGF 2 يعمل كعامل نمو جنيني، حيث ان حذف جينه يسبب تأخير في النمو داخل الرحم والفترة المحيطة بالولادة (Schoenle *et al.*, 1985; Dechiara *et al.*, 1990).

تشير الدراسات الى أن المعاملة مع الهرمون محرض الجريب يؤدي الى زيادة في تعبير IGF1mRNA خلال مزرعة الجريبات قبل الغارية، في حين اضافة IGF1 الى وسط المزرعة يدعم تطور الجريبات قبل الغارية في الماعز (Magalhaes–Padilha *et al.*, 2012)، كما اشارت الدراسات ان اضافة العامل شبيه الأنسولين 1 (IGF1) بالتأزر مع الهرمون محرض الجريب الى مزرعة الجريبات قبل الغارية يحفز نمو الجريبات في الانسان (Louhio *et al.*, 2001) والأبقار (Gutierrez *et al.*, 2000) والجرذان (Zhao *et al.*, 2001) والفتران (Liu *et al.*, 1998).

3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المواد Materials

3-1-1- الأجهزة والأدوات Equipments and Instruments

الجدول (1-3) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية

المنشأ	الشركة	اسم الجهاز
Lebanon	Concord	ثلاجة Refrigerator
Belgium	Consort	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus
Korea	Techne	جهاز الدورات الحرارية PCR Thermocycler
BIO - RAD	Miniopticon	جهاز تفاعل سلسلة البلمرة حقيقي الوقت qRT-PCR
Japan	Fisons	جهاز تقطير Distiller
Germany	Hettich	جهاز نبد المركزي Centrifuge
Germany	Memert	حاضنة Incubator
Germany	Memert	حمام مائي Water bath
Vietnam	Samsung	كاميرا رقمية Digital camera
Korea	Exispin	مازج Mixture
Japan	MT	مجهر ضوئي Microscopic (MEIJI)
Germany	Hermle	منبذة أبندورف باردة Cooled Eppendorf Centrifuge
Germany	TOMY®	موصدة Autoclave
England	Gallen Kaamp	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance
Korea	HYSC	هزاز ممغنط حراري Hot magnetic stirrer
England	Biochrom	ELISA reader
U.K	THERMO	Nanodrop spectrophotometer
Korea	Bionner	Nano drop
Korea	Bioneer	Spin down mixer centrifuge
Belgium	CYAN	Vortex
المنشأ	الشركة	اسم الأداة
Italy	Boeco	أسطوانة بحجم Cylinder1000 , 100 ml
Italy	HAILAO	بيكر سعة 250ml
USA	BIO BASIC INC.	حامل أنابيب بارد Cold rack tubes
USA	Rockefeller	حاوية النتروجين السائل Liquid nitrogen can
Belgium	CYAN	ماصة دقيقة سعة 0.5-10, 20-200, 100-1000 مايكرو لتر Micropipette
USA	Geneaid	مدقات صغيرة Micropistlles
Belgium	CYAN	ماصات عديدة الأفتية Multichannel micropipette

Kits -2-1-3

ELISA Kits -1-2-1-3

الجدول (2-3) عدد فحص الأليزا المستعملة في الدراسة الحالية

المنشأ	الشركة	نوع عدة القياس	العدة
Switzerland	ABO	عدة قياس هرمون FSH	-1
		Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisa stripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (48 IU/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle	
Switzerland	ABO	عدة قياس هرمون النمو GH	-2
		Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisa stripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (80 ng/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle	
Switzerland	ABO	عدة قياس الأسترايول	-3
		Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisa stripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stop solution: 6ml x 1bottle Standard (1600 pg/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle	
Switzerland	ABO	عدة قياس IGF1	-4
		Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisa stripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard(4000pg/ml): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle	
Switzerland	ABO	عدة قياس عامل النمو IGF2	-5
		Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisa stripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (4000pg/ml): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle	

3-2-2-1-2- عدد قياس تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي qRT-PCR Kits
 يبين الجدول (3-3) و (4-3) العدد المستعملة في قياس تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت
 الحقيقي الكمي في الدراسة الحالية
 الجدول (3-3) يبين العدد المستعملة في قياس تفاعل qRT-PCR في الدراسة الحالية

Korea	Bioneer	AccuZol™ Total RNA Extraction Kit	-1
		Trizol(100ml)	
Korea	Bioneer	AccuPower® RocktScript RT PreMix	-2
		RocketScript Reverse Transcriptase (200 u) 5× Reaction Buffer (1×) DTT (0.25 mM) dNTP (250 µM each) RNaseInhibitor (1u)	
Korea	Bioneer	AccuPower® Greenstar™ qPCR PreMix	-3
		PreMix SYBER Green fluorescence Exicycler™ 20 µL reaction 8 Well strips × 12 each DEPC – D.W. 1.8 ml × 4 tubes	
USA	Geneaid	Genomic DNA Minikit (Tissue)	-4
		GT Buffer (60 ml) GBT Buffer (60 ml) W1 Buffer (45 ml) Wash Buffer (25 ml) Elution Buffer (30 ml) Protinase K (1.1 ml) GD column (100 pcs) 2 ml collection tube (200 ml) - Micropestle (100 pcs)	

الجدول (4-3) يبين البادئات Primers المستعملة في تفاعل qRT-PCR للكشف عن التعبير الجيني

Primer	Sequence		Product size	ACCESSION No.
FSH	F	TGAAGTCGATCCAGCTTTGC	115bp	NM_001007597.1
	R	ATGCAGAAACGGCACTCTTC		
GH	F	TGTTTGCCAATGCTGTGCTC	109bp	NM_001034848
	R	TGAATGGAATAGCGCTGTCC		
GHr	F	TTACCACTACTGCCGAATGC	139bp	NM_017094.1
	R	TTGTCAGGCAAAGGCAAAGC		
IGF1	F	ACAGAAAATGCCACGTCACC	74bp	NM_178866.4
	R	ATTTGGCAGGTGTTCCGATG		
IGF11	F	TTGGCTCAGACTTGATCTCAG	83bp	NM_001190163.1
	R	GCACTGAAGCAATGACATGC		
GAPDH	F	ATGCCCCATGTTTGTGATG	136bp	NM_017008
	R	TCCACGATGCCAAAGTTGTC		

3-1-3 - المواد الكيميائية Chemical material

يبين الجدول (3-5) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية

المنشأ	الشركة	المواد الكيميائية
USA	Sigma-Aldrich	أكاروز Agarose
Syria	Elsaad pharma	كيتامين Ketamine
USA	Sigma-Aldrich	كلوروفورم Chloroform
USA	Invitrogen	دبك DEPC
Iraq	univ. Vet. Med., Al-Qadisiya uni	ماء مقطر Distilled water
USA	Sigma-Aldrich	أيثانول مطلق 100% Ethanol
England	Bio-Labs	أثيديوم بروميد Ethidium Bromide
USA	Sigma-Aldrich	أيزوبروبانول Isopropanol
England	Bio-Labs	صبغة الترحيل Loading dye
Germany	Merk	شمع بارافين Paraffin wax
USA	Invitrogen	ماء محرر أنزم الرنا RNasefree water
USA	Sigma-Aldrich	كلوريد الصوديوم Sodium chloride
USA	Amresco	Tris-Borat-EDTA(TBE)
USA	Invitrogen	Trizol® reagent
India	Labort	فورمالين 10% Formalin
Germany	Riedel- dehaenag	أبوسين الكحولي الحامضي Acidic Alcoholic eosin
USA	Ambion	RNAlater® Solution
Germany	Merk	هيماتوكسليين Hematoxylin
India	Labort	محلول فسلجي Normal saline
England	Milpharm	زايلين Xylene
Holland	Alfasan	زايلازين 2% Xylazine

Expermental design

2-3 - تصميم التجربة (الشكل 3-1)

1-2-3 - تحضير السائل الجريبي منزوع الستيرويد Preparation of SFBFF

1- تم جمع السائل الجريبي البقري بواسطة شفط aspirating الجريبات المبيضية ذات

القطر $15 \text{ mm} \leq$ ، حيث تم جمع السائل الجريبي البقري من مجزرة محافظة النجف.

2- تم حفظ السائل الجريبي في التجميد الى حين إجراء عملية الطرد المركزي centrifugation

بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 4 م° لأزالة الحطام الخلوي cellular

debris والحصول على سائل متجانس وحفظ بدرجة -20 م°.

3- بعد جمع الكمية الكافية من السائل الجريبي، أجريت له عملية الأذابة وأضيف اليه الفحم

النشط charcoal بتركيز 10 mg/ ml لنزع الستيرويدات ومزج جيدا لمدة ساعة بدرجة 4 م°.

4- تمت إزالة الفحم النشط من السائل الجريبي بعملية الطرد المركزي بسرعة 1400 دورة بالدقيقة لمدة 90 دقيقة بدرجة 4 م°.

5- تم تجميد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات بدرجة (-20 م°) الى حين الاستخدام في التجربة الحالية، ان 99% من الستيرويدات في السائل الجريبي تزال بواسطة هذه التقنية (Nandi et al., 2006).

2-3-2- تحضير مضادات الأنهبين والأكتفين معاً ومضاد الأكتفين لوحده

تم تقسيم السائل الجريبي منزوع الستيرويدات الى جزئين:

1- استخدم الجزء الأول في تمنيع ذكور الأرانب ضد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات (Anti-SFBFF)، فقد تم حقن عشرة من ذكور الأرانب البالغة بعمر 90-95 يوم ووزن 1550±56 g، وضعت في البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري بجامعة القادسية لمدة اسبوع لغرض التكيف ثم حقنت بالسائل الجريبي منزوع الستيرويدات (1 مل تحت الجلد) ولأربعة اسابيع متتالية، بعد مرور شهر على آخر حقنة ، خُدرت الحيوانات بحقن مزيج من 0.3ml كيتامين و 0.1ml زايلازين لكل كغم من وزن الجسم داخل البريتون intraperitoneal، وتم جمع حوالي 20ml دم من الوريد البطني abdominal vein. وضعت عينات الدم في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض الحصول على مصل الدم blood serum الحاوي على مضادات الأنهبين والأكتفين معاً وحفظ بدرجة -20 م° الى حين الأستخدام.

2- تم معاملة الجزء الثاني من السائل الجريبي منزوع الستيرويدات بمضاد وحدة الأنهبين الفا Anti-S-Inh-) (200µl anti-inhibin alpha subunit ، ثم استخدم لتمنيع ذكور الأرانب (Anti-S-Inh-) (FBFF) ، حيث حقنت عشرة من ذكور الأرانب البالغة بالسائل الجريبي منزوع الستيرويدات والمعامل بمضاد الأنهبين (1مل تحت الجلد) ولأربعة اسابيع متتالية بعد مرور شهر على اخر

حقنة، خُدرت الحيوانات بحقن مزيج من 0.3ml فيتامين و0.1ml زايلازين لكل كغم من وزن الجسم داخل البريتون، وتم جمع 20ml دم من الوريد البطني. وضعت عينات الدم في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض الحصول على مصل الدم الحاوي على مضادات الأكتفين وحفظ بدرجة -20 م.

Experimental animals

3-2-3 حيوانات التجربة

استخدمت في التجربة الحالية اباكير اناث الجرذان البالغة من سلالة الوستر ذات دورات شبق منتظمة Adult virgin cycling female wistar rats بعمر 65 يوم ووزن 150-170 غرام، حيث ولدت هذه الحيوانات في البيت الحيواني التابع الى كلية الطب البيطري بجامعة القادسية، وتمت تربيتها في ظروف مختبرية قياسية، بنظام إضاءة بمعدل 12 ساعة ضوء و12 ساعة ظلام وبدرجة حرارة 22-24 مئوية، وقد قدمت للحيوانات العليقة القياسية (19% بروتين و3000 سعرة حرارية)، كما قدم الماء للحيوانات بصورة حرة *ad libitum*. وللتأكد من انتظام دورة الشبق كانت تفحص المسحات المهبلية للأنثى يومياً ولدورتي شبق متتاليتين، وتم اختيار الأنثى ذات دورات الشبق المنتظمة، حيث تم اختيار 100 انثى وزعت على خمس مجموعات متساوية (سيطرة واربع معاملات) وتم معاملة المجموعات على النحو الآتي:-

- 1- السيطرة: (20 انثى) حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي (100مايكروليتر في البريتون) لمرة واحدة في طور قبل الشبق *proestrus*.
- 2-المعاملة 1 (T1): (20انثى) حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكروليتر في البريتون) لمرة واحدة في طور قبل الشبق *proestrus*.
- 3- المعاملة 2 (T2): (20انثى) حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والمعامل بمضاد الأنهبين (100 مايكروليتر في البريتون) لمرة واحدة في طور قبل الشبق *proestrus*.

4- المعاملة 3 (T3): (20 أنثى) حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100

مايكروليتر في البريتون) لمرة واحدة في طور بعد الشبق Metestrus.

5- المعاملة 4 (T4): (20 أنثى) حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والمعامل

بمضاد الأنهبين (100 مايكروليتر في البريتون) لمرة واحدة في طور بعد الشبق Metestrus.

في اليوم الخامس من المعاملة ، تم تخدير 10 إناث من كل مجموعة في طور Estrus باستخدام

مزيج من 0.3ml كيتامين و0.1ml زايلازين لكل كغم من وزن الجسم وتم تشريحها واخذ منها نماذج دم

في أنابيب ابندورف (لاحتوي على مانع التخثر)، و دورت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة

3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة للحصول على مصل الدم، لغرض الدراسة الهرمونية. وأخذت منها

نماذج من الغدد النخامية والمبايض لغرض الدراسة الجزيئية وكذلك تم اخذ المبايض والأرحام وحفظت في

المحلول المثبت (10% فورمالين) لغرض الدراسة الفسلجية-النسجية. أما الإناث المتبقية (10 إناث من

كل مجموعة)، فقد تمت مزواجتها مع ذكور متمرسة (1 ذكر :3 إناث) لدراسة تأثير المعاملة بمضادات

الأنهبين والأكتفين معاً أو مضاد الأكتفين لوحده على الخصوبة fertilization وأعداد الأجنة داخل الرحم

من خلال مواقع الغرس implantation sites. بعد التأكد من الحمل، وذلك عن طريق رؤية السداة

المهبلية vaginal plug، حقنت الإناث الحوامل في اليوم الثامن من الحمل داخل الوريد intravenously

(iv) بـ 500 مايكروليتر من صبغة البونتايمين الزرقاء (1% w/v) تحت التخدير الخفيف وذلك من اجل

التسرب الدمى extravasation للصبغة الى مساحات الغرس في البطانة الرحمية endometrium، ثم

شرحت الإناث بعد 15 دقيقة من معاملتها بالصبغة وتم حساب أعداد الأجنة داخل الرحم (Ishigame

et al., 2005).

تحضير المضاد المصلي للسانال الجريبي منزوع الستيرويدات والانسولين



تم توزيع 100 من اناث الجرذان الأباكير على خمس مجموعات وكالاتي

السيطرة (C): 20 انثى حقنت في البريتون بـ 100 مايكرو لتر من السائل الفسلجي في طور Proestrus
المعاملة الأولى (T1): حقنت في البريتون بـ 100 مايكرو لتر من مضاد S-FBFF في طور Proestrus
المعاملة الثانية (T2): حقنت في البريتون بـ 100 مايكرو لتر من مضاد IS-FBFF في طور Proestrus
المعاملة الثالثة (T3): حقنت في البريتون بـ 100 مايكرو لتر من مضاد S-FBFF في طور Metestrus
المعاملة الرابعة (T4): حقنت في البريتون بـ 100 مايكرو لتر من مضاد IS-FBFF في طور Metestrus

في طور الشبق التالي، تم تخدير 10 إناث من كل مجموعة وتم قياس المعايير التالية:

عينات دم لقياس تركيز كل من FSH, IGF-1, IGF-2, E2 and GH في مصل الدم
الغدد النخامية لغرض تقييم تعبير جيني FSH β and GH
المبايض لغرض تقييم تعبير الجينات IGF-1, IGF-2 and GH-r
أوزان المبايض والأرحام
الدراسة النسجية الفسلجية للمبايض والأرحام

اما الإناث المتبقية (10 من كل مجموعة) فقد تمت مزواجتها مع الذكور ، في اليوم الثامن من الحمل تم حقن الاناث بصبغة Pontamine الزرقاء لغرض حساب عدد الأجنة في الأرحام .

الشكل (3-1): تصميم الدراسة

3-3-1 - تحضير صبغة البونتايمين الزرقاء Pontamine sky blue stain preparation

تم الحصول على الصبغة من GREEN STONE SWISS CO.LIMIED ، وهي صبغة زرقاء اللون سائلة القوام بتركيز 30% ، ولتحضير محلول 1% تم اضافة 1ml من محلول الصبغة الأصلي stock solution الى 29ml ماء مقطر ، تم حقن 500 مايكروليتر من المحلول المعد داخل الوريد (الوريد الودجي jugular vein) بعد ان تم تخدير الحيوان بشكل خفيف light anesthesia باستخدام الكلوروفورم ، ولأظهار الوريد الودجي نعمل شق صغير small incision في الجزء السفلي من عنق الحيوان بعد التخدير الخفيف.

3-3-2- فحص المسحات المهبلية Vaginal smear preparation and examination

باستخدام طريقة الماصة pipette smear technique ، تم حقن 100 مايكروليتر من المحلول الملحي الفسلجي normal saline (0.9% NaCl) بلطف خلال المهبل vagina بأستخدام ماصة Micropipette ، بعد غسل المهبل. وقبل اخراج الماصة تم سحب جزء من السائل الموجود داخل المهبل ، وطبقاً للسائل الناتج قد تعاد هذه الخطوة او لاتعاد، فإذا كان السائل الناتج ضبابي cloudy هذا يعني لانتحاج الى اعادة هذه الخطوة ، بعد ذلك نضع السائل الناتج على شريحة زجاجية نظيفة لغرض الفحص تحت المجهر.

ثم فحصت العينات مباشرة تحت قوة تكبير X10 و X40 ، عندما تحتوي المسحة على عدد كبير من الخلايا المتقرنة cornified cells وفي نفس الوقت تكون على شكل تكتلات clumps ، هذا يشير الى أن الإناث في طور الشبق estrus phase ، أمّا في حالة وجود عدد كبير من خلايا الدم البيضاء leucocytes والتي تكون صغيرة الحجم هذا يشير الى ان الإناث في طور بعد الشبق metestus phase، وإذا احتوت المسحة المهبلية على خلايا الدم البيض والخلايا الطلائية epithelial cells

والخلايا المتقرنة هذا يشير الى ان الأناث في طور ثنائي الشبق diestrus ، أما إذا كانت الخلايا
الطلائية هي السائدة في المسحة المهبلية ، هذا يعني أنّ الإناث في طور قبل الشبق (proestrus Long
(and Evans, 1922 ; Mandl, 1951).

3-4 - الاختبارات الهرمونية Hormonal tests

3-4-1 - تقدير تركيز الهرمون المحفز للجريبات FSH (وحدة دولية / لتر) في المصل

تم تقدير تركيز هرمون FSH في المصل باستخدام جهاز ELISA وحسب العدة المصنّعة من شركة
(ABO, Switzerland) كما يأتي:

3-4-1-أ - المبدأ الأساسي Basic Principles

تعتمد تقنية الاليزا لعدة فحص مستوى FSH على استخدام طبقة لوحة الحفر الحاوية على الجسم المضاد
المنقى الخاص بهرمون (FSH-antibody)، تضاف العينات إلى الحفر حيث يتحد الجسم المضاد لـ FSH
الموجود في الحفر (الذي يُعَلَّم بـ HRP) مع المستضد (FSH) antigen الموجود في العينة) ليتكون معقد الأنزيم
الأجسام مضادة-المستضدات Antigen-antibody enzyme complex ، بعد اكتمال الغسل يضاف محلول
TMB والذي يصبح لونه أزرق عند التفاعل المحفز بالأنزيم HRP والذي ينتهي بإضافة محلول حامض الكبريتيك .
ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 450 نانومتر . ويحدد تركيز هرمون FSH في
العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

3-4-1-ب - طريقة العمل Procedure

1- التخفيف Dilution : تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز الآتية:

طريقة التحضير	المحلول القياسي	التركيز
150µl Original density Standard+150µl Standard diluent	5 Standard	24 IU/L
150µl 5 Standard+150µl Standard diluent	4 Standard	12IU/L
150µl 4 Standard+150µl Standard diluent	3 Standard	6 IU/L
150µl 3 Standard+150µl Standard diluent	2 Standard	3 IU/L
150µl 2 Standard+150µl Standard diluent	1 Standard	1.5 IU/L

2- تمت إضافة 40 مايكروليتر من محلول تخفيف العينة Sample addition و 10 مايكروليتر من العينة الى

حفرة عينة الاختبار ثم خففت العينة خمس مرات. تبقى حفرة البلانك (فارغة) blank على حدة (لا يضاف

اليها العينة و HRP-Conjugate reagent وتجري عليها بقية الخطوات كما في بقية الحُفر).

- 3- غطيت لوحة الحُفر ثم حُضنت Incubation لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مئوية.
- 4- بعد كشف الغطاء عن اللوحة، نُبذ السائل بواسطة الرج وتم إضافة محلول الغسل Washing لكل الحفر ولمدة 30 ثانية في كل مرة وكررت خمس مرات ثم تركت لتجف.
- 5- تم إضافة 50 مايكروليتر من إنزيم الكشف HRP-Conjugate reagent لكل الحُفر عدا حُفرة البلانك.
- 6- حضنت العينات مرة ثانية لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مئوية .
- 7- تم الغسل مرة ثانية لمدة 30 ثانية في كل مرة وكررت خمس مرات ثم تركت لتجف.
- 8- إضيف 50 مايكروليتر من محلول Chromogen Solution A و محلول Chromogen Solution B الى كل حُفرة، والابتعاد عن الضوء لمدة 15 دقيقة بدرجة 37 مئوية حيث أصبحت الحفر متلونة باللون الأزرق.
- 9- تم إيقاف التفاعل Stop reaction بأضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution لكل حُفرة، إذ أنّ توقف التفاعل يحصل عند تحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر.
- 10- بعدها تم الفحص بجهاز الأليزا بعد التصفير مقابل البلانك، قرأت الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر بعد إضافة محلول التوقف ب 15 دقيقة.

3-1-4-ت- الحسابات Calculation

تم أولاً رسم المنحنى القياسي وذلك بوضع التراكيز التصاعدية للمحاليل القياسية على المحور الأفقي وقيم الامتصاصية لتلك التراكيز على المحور العمودي، بعدئذ تم وضع قيم الامتصاصية للعينات المدروسة على المحور العمودي ورسم خط أفقي للالتقاء مع المنحنى القياسي، ثم رسم عمود نازل من نقطة الالتقاء تلك الى المحور الافقي لتحديد تركيز تلك العينات في نقطة الالتقاء على المحور الأفقي. كررت العملية لقيم امتصاصية جميع العينات لمعرفة جميع التراكيز لتلك العينات. كما تم تأكيد تلك النتائج احصائيا وذلك باستخراج معادلة الخط المستقيم بالاعتماد على معدل التراكيز المخففة (y) ومعدل الامتصاصية لها (x) لاستخراج قيمة الانحدار (b) Slope لتبقى

المعادلة بمجهولين أحدهم يمثل قيمة الامتصاصية لكل عينة والآخر قيمة التركيز لتلك العينة. وباستخدام تلك المعادلة تم إدخال كل قيمة امتصاصية حصلنا عليها من العينات لاستخراج كل تركيز للعينات.

3-4-2- تقدير تركيز هرمون النمو GH (نانوغرام/مل) في المصل

تم تقدير تركيز هرمون GH في المصل باستخدام جهاز Elisa وحسب العدة المصنعة من شركة (ABO,

Switzerland) كما يأتي:

3-4-2-أ- المبدأ الأساسي Basic Principles

تعتمد تقنية الاليزا لعدة فحص مستوى GH على استخدام طبقة لوحة الحفر الحاوية على الجسم المضاد المنقى الخاص بهرمون (GH-antibody)، تضاف العينات إلى الحفر حيث يتحد الجسم المضاد لـGH الموجود في الحفر (الذي يُعَلَّم بـ HRP) مع المستضد antigen (GH الموجود في العينة) ليتكون معقد الأنزيم الأجسام مضادة-المستضدات Antigen-antibody enzyme complex ، بعد اكتمال الغسل يضاف محلول TMB الذي يصبح لونه أزرق عند التفاعل المحفز بالأنزيم HRP والذي ينتهي بإضافة محلول حامض الكبريتيك. ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 450 نانومتر . ويحدد تركيز هرمون GH في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

3-4-2-ب- طريقة العمل Procedure

1- التخفيف Dilution : تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز الآتية:

ng/ml	ng/ml	ng/ml
150µl Original density Standard+150µl Standard diluent	5 Standard	20ng/ml
150µl 5 Standard+150µl Standard diluent	4 Standard	10 ng/ml
150µl 4 Standard+150µl Standard diluent	3 Standard	5 ng/ml
150µl 3 Standard+150µl Standard diluent	2 Standard	2.5 ng/ml
150µl 2 Standard+150µl Standard diluent	1 Standard	1.25ng/ml

ثم اجريت باقي الخطوات كما جاء في الفقرات 3-4-1 - ب و ت

3-4-3- تقدير تركيز عامل النمو IGF1 (بيكوغرام / مل) في المصل

تم تقدير تركيز هرمون IGF1 في المصل باستخدام جهاز ELISA وحسب العدة المصنعة من شركة (ABO, Switzerland) كما يأتي:

3-4-3- أ- المبدأ الأساسي Basic Principles

تعتمد تقنية الاليزا لعدة فحص مستوى IGF1 على استخدام طبقة لوحة الحُفر الحاوية على الجسم المضاد المنقى الخاص بهرمون IGF1-1، تضاف العينات إلى الحفر حيث يتحد الجسم المضاد للـ IGF1 الموجود في الحفر (الذي يُعَلَّم بـ HRP) مع المستضد (antigen IGF1) الموجود في العينة) ليتكون معقد الأنزيم الأجسام مضادة-المستضدات Antigen-antibody enzyme complex، بعد أكتمال الغسل يضاف محلول TMB والذي يصبح لونه أزرق عند التفاعل المحفز بالأنزيم HRP والذي ينتهي بأضافة محلول حامض الكبريتيك. ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 450 نانومتر. ويحدد تركيز هرمون IGF1 في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي .

3-4-3- ب- طريقة العمل Procedure

1- التخفيف Dilution :- تم تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز الآتية:

طريقة التحضير	المحلول القياسي	التركيز
150µl Original density Standard+150µl Standard diluent	5 Standard	2000pg/ml
150µl 5 Standard+150µl Standard diluent	4 Standard	1000pg/ml
150µl 4 Standard+150µl Standard diluent	3 Standard	500pg/ml
150µl 3 Standard+150µl Standard diluent	2 Standard	250pg/ml
150µl 2 Standard+150µl Standard diluent	1 Standard	125pg/ml

ثم اجريت باقي الخطوات كما جاء في الفقرات 3-4-1 - ب و ت

3-4-4- تقدير تركيز عامل النمو IGF2 (بيكوغرام / مل) في المصل

تم تقدير تركيز عامل النمو IGF2 في المصل باستخدام جهاز ELISA وحسب العدة المصنعة من قبل شركة

(ABO, Switzerland) كما يأتي:-

3-4-4-A- المبدأ الأساسي Basic Principles

تعتمد تقنية الاليزا لعدة فحص مستوى عامل النمو IGF2 على استخدام لوحة الحفر الحاوية على الجسم

المضاد الخاص بهرمون IGF2. أضيفت العينات إلى الحفر ليتحد الجسم المضاد IGF2 (المُعَلَّم بـ HRP) مع

مستضد IGF2 الموجود في العينة ليتكون معقد بين الأنزيم والجسم المضادة والمستضد Antigen-antibody

enzyme complex. بعد اكتمال الغسل يضاف محلول TMB والذي يصبح لونه أزرق عند التفاعل المحفز

بالأنزيم HRP والذي ينتهي بأضافة محلول حامض الكبريتيك. ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند

الطول الموجي 450 نانومتر. ويحدد تركيز هرمون IGF2 في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع

المنحني القياسي.

3-4-4-B- طريقة العمل Procedure

1- التخفيف Dilution : تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز الآتية:

طريقة التحضير	المحلول القياسي	التركيز
150µl Original density Standard+150µl Standard diluent	5 Standard	2000pg/ml
150µl 5 Standard+150µl Standard diluent	4 Standard	1000pg/ml
150µl 4 Standard+150µl Standard diluent	3 Standard	500pg/ml
150µl 3 Standard+150µl Standard diluent	2 Standard	250pg/ml
150µl 2 Standard+150µl Standard diluent	1 Standard	125pg/ml

اجريت باقي الخطوات كما جاء في الفقرات 3-4-1 - ب و ت

3-4-5- تقدير تركيز هرمون الأسترايول (نانوغرام/لتر) في المصل

تم تقدير تركيز هرمون الأسترايول في المصل باستخدام جهاز ELISA وحسب العدة المصنعة من شركة (ABO,

Switzerland) كما يأتي:

3 - 4 - 5 - A - المبدأ الأساسي Basic Principles

تعتمد تقنية الاليزا لعدة فحص مستوى الأسترايول على استخدام لوحة الحفر الحاوية على الجسم المضاد الخاص بهرمون الأسترايول. أضيفت العينات إلى الحفر ليتحد الجسم المضاد الأسترايول (المُعَلَّم بـ HRP) مع مستضد الأسترايول الموجود في العينة ليتكون معقد بين الأنتيم والجسم المضادة والمستضد Antigen-antibody enzyme complex. بعد اكتمال الغسل يضاف محلول TMB والذي يصبح لونه أزرق عند التفاعل المحفز بالأنزيم HRP والذي ينتهي بأضافة محلول حامض الكبريتيك. ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 450 نانومتر. ويحدد تركيز هرمون الأسترايول في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي.

3-4-5-ب- طريقة العمل Procedure

1- التخفيف Dilution : تخفيف المحلول القياسي الأساسي للحصول على التراكيز الآتية:

طريقة التحضير	المحلول القياسي	التركيز
150µl Original density Standard+150µl Standard diluent	5 Standard	64ng/L
150µl 5 Standard+150µl Standard diluent	4 Standard	32ng/L
150µl 4 Standard+150µl Standard diluent	3 Standard	16ng/L
150µl 3 Standard+150µl Standard diluent	2 Standard	8ng/L
150µl 2 Standard+150µl Standard diluent	1 Standard	4ng/L

اجريت باقي الخطوات كما جاء في الفقرات 3-4-1 - ب و ت

3-5- الدراسة الجزيئية Molecular study

3-5-1- تحضير المواد الكيميائية Preparation of chemicals

- داي أثيل بايروكاربونات DEPC (Surzycki, 2000)

تحضر طبقا لتعليمات الشركة كالاتي:-

1- حُضِر 1لتر من الماء المقطر في قنينة ديوران Duran bottle

2- تم إضافة 1مل من محلول DEPC الى قنينة ديوران مع الرج.

3- تم تغطية فوهة قنينة ديوران بورق سليفون foil وحفظت عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل.

4- عقت قناني ديوران بالموصدة autoclave عند درجة حرارة 121 م° ولمدة 30 دقيقة وحفظت عند درجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام.

• الأيثانول 75%

حضر الأيثانول 75% من الأيثانول 100% طبقا للمعادلة الآتية :-

التركيز الأول (C1) × الحجم الأول (V1) = التركيز الثاني (C2) × الحجم الثاني (V2)

$$C1V1 = C2V2$$

$$75 \times 100 = 100 \times V2$$

V2~ 75 ml (Volume of 100% ethanol) plus 25 ml of DW 3A.

• برومايد الأثيديوم (Surzycki, 2000)

حضر بإذابة 0.25 غم من برومايد الأثيديوم في 50 مل من الماء المقطر للحصول على التركيز النهائي 5 ملغرام/مليلتر

• داريء (Surzycki, 2000) (1L, 10X) TBE buffer

1- وزن 108 غم من مادة Tris-base و55غم من حامض البورك Boric acid 39غم من EDTA.

2- ذوبت المكونات السابقة بـ 1 لتر من الماء المقطر في قنينة ديوران ومزجت باستخدام شريط مغناطيسي على هزاز مغناطيسي لحين أختفاء الراسب.

3- عقم المزيج بالموصدة عند درجة حرارة 121 م° ولمدة 30 دقيقة وحفظ عند درجة حرارة الغرفة لحين

الاستخدام (يجب تخفيف المزيج بالماء المقطر بنسبة 1:10 قبل الاستخدام).

3-5-2- فحص تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي qRT-PCR

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي وذلك لقياس المستويات الكمية للحامض النووي الريبوزي المرسل mRNA الذي يستنسخ من أعضاء المبيض والنخامية للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجينات *FSH, GH, GHR, Igf1, Igf2* genes كذلك تم استخدام جين الـ *GaPdh* gene كجين محافظ قياسي Housekeeping gene لحساب التعبير الجيني. وتم اجراء هذا الفحص حسب الخطوات الآتية (Wang and hardy, 2004):

3-5-2-أ- استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحامض النووي الريبوزي الكلي Total RNA باستخدام عدة الترايزول Trizol kit المجهز من قبل شركة بايونير الكورية ولقد تم العمل بهذا العدة حسب تعليمات الشركة المصنعة مع بعض التحويرات :-

1. صعقت الأعضاء (المبيض والنخامية) مباشرة بعد استئصالها بالنتروجين السائل ثم وضعت في أنابيب ابندورف epindorf tube حاوي على 0.5 مل من ماء ديك DEPC water .
2. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين .
3. تم سحب DEPC ويبقى فقط النسيج .
4. أضيف 0.5 مل من الترايزول .
5. سُحق النسيج بالمدقات الصغيرة micropistells حتى هرس وتجانس جيداً.
6. تم اكمال الأنابيب الحاوية على الأنسجة المسحوقة إلى 1 مل من الترايزول.
7. إضافة كلوروفورم 200 مايكروليتر .
8. رجت الأنابيب بجهاز vortex .
9. حفظت في تجميد freezing الثلجة لمدة 5 دقائق.
10. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة .

11. نقل الرائق في أبندورف جديد .
12. إضافة 500 مايكروليتر من الأيزوبروبانول isopropanol.
13. رُجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في تجميد الثلجة لمدة 10 دقائق .
14. وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 15000 دورة/دقيقة.
15. تم التخلص من الطافي ليبقى فقط المترسب pellet.
16. تم إضافة 1مل من الكحول الأيثلي ethanol alcohol إلى المترسب بتركيز 80% ورج بشكل مستمر بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه 12000 دوره/دقيقه لمدة 5 دقائق وتم التخلص من الطافي وأخذ المترسب pellet .
17. جُفف المترسب جيدا بقلب الأبندورف على ورق نشاف وتركه بدرجه حراره الغرفة ولمدة 10 دقائق
18. إضافة 50 مايكروليتر من الدبك.
19. حمام مائي بدرجة 70°C لمدة 10 دقائق .

3-5-2-ب- قياس ونقاوة الحامض النووي الريبوزي Assessment of RNA yield and quality

تم الكشف عن الحامض النووي RNA المستخلص من العينات من خلال ثلاثة جوانب الأول لتحديد التركيز (نانوغرام/ ميكروليتر) باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer والثاني لقياس النقاوة من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260 و 280 نانومتر أما الجانب الثالث فهو لتوثيق وجود الحامض النووي RNA باستخدام الترحيل الكهربائي Electrophoresis وتم القياس على النحو الآتي:

1. بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع RNA .
2. تُصفر ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1مايكروليتر من ddH₂O باستخدام ماصة صغيرة micropipette معقمة على سطح ركيزة المقياس وأجراء التصفير وبعدها تُنظف الركيزة لقياس العينات.

3. الضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ RNA وذلك باستخدام 1مايكرو لتر من كل عينة

من الـ RNA المستخلص ومن ثم تُنظف ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4. كذلك تم تحديد نقاوة عينات الـ RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية في جهاز Nanodrop

Spectrophotometer على طولين موجيين 260 / 280 نانومتر حيث ان الحمض النووي

RNA المستخلص هو يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية تقريباً (1.8).

5. بعدها أستخدمت طريقة الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophorsis لترحيل

الحامض النووي RNA لتحديد سلامة RNA من التحلل بفعل الإنزيمات المحللة.

وتم اجراء هذه الطريقة كالآتي:

أ- تم إذابة 1غم من هلام الاكاروز بـ 10 مل من محلول (0.5X)TBE buffer وعلية باستخدام الهزاز

المغناطيسي الحراري hot magnetic stirrer لمدة 15دقيقه لحين ظهور البلورات في محلول الاكاروز.

ب- بعد تبريده أُضيف 3 مايكرو لتر من برومايد الأثيديوم للمحلول ووضع الهلام في قالب صب

الهلام tray مع تثبيت مشط تكوين الحُفر comb قرب احد النهايتين على بُعد 1سم من طرف

القالب وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة .

ج- بعدها نقل إلى جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول دارى (0.5X)TBE .

د- حُضرت عينات الـ RNA لغرض اجراء عملية الترحيل Loading وذلك بمزج 25 مايكرو لتر

من عينه الحمض النووي RNA مع 5 مايكرو لتر من صبغة الترحيل Loading dye ونقلت

العينات الى حفر الهلام .

ه- تم ترحيل العينات بإمرار فرق جهد قدره 100 فولت لمدة ساعة.

و- تم فحص مواقع حزم bands الحامض النووي RNA المستخلص بواسطة جهاز UV عند

طول موجي 260 نانومتر

3-5-2-ج- المعاملة بأنزيم (DNase1) DNase inactivation Treatment

تم معاملة المستخلص من الحامض النووي RNA باستخدام DNase I treatment للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم كما في الجدول المبين أدناه طبقاً للطريقة التي وصفتها تعليمات شركة Promega company في الولايات المتحدة الأمريكية USA .

الجدول (3-6) يبين عدة أنزيم DNase1

Mix	Volume
Total RNA 100ng/ul	10ul
DNase I enzyme	1ul
10X buffer	4ul
DEPC water	5ul
Total	20ul

بعد ذلك تم حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37م لمدة 30 دقيقة، وبعدها تم إضافة 1 مايكروليتر من مادة EDTA وحضنت أيضاً بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 م لمدة 10 دقائق وذلك لتنشيط فعل الانزيم.

3-5-2-د- تصنيع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين المكمل cDNA synthesis

تم استخدام طريقة تصنيع الحامض النووي cDNA المكمل DNA complementry من عينات الحامض النووي RNA وذلك لاستخدامه في تضخيم جينات التعبير الجيني للجينات المستهدفة والجين المحافظ بفحص Real-Time PCR، حيث تم استخدام عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من شركة بايونير الكورية. وتم اجراء هذا العملية طبقاً لتعليمات الشركة:-

1- تم توحيد تراكيز جميع عينات RNA المعاملة بـ DNase لنفس التركيز المقاس بـ nanodrop

بواسطة DEPC.

2- تم تحويل RNA الى cDNA بواسطة تحضير تفاعل PreMix reaction للاستنساخ العكسي

في الوقت الحقيقي الكمي كما في الجدول الآتي:-

الجدول (3-7) تحضير تفاعل للاستنساخ العكسي لتحويل RNA الى cDNA

RT PreMix	Volume
Total RNA (100ng/ μ L)	10 μ L
Oligo(dT) 15 primer 10 pmole	2 μ L
DEPC water	8 μ L
Total	20L

3- بعد ذلك تم إضافة 20مايكروليتر من مكونات مزيج RT master mix التي ذكرت في

الجدول أعلاه إلى أنابيب عدة cDNA synthesis (Accupower Rockscript RT)

Premix kit) والحاوية على إنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcription .

4- وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge بسرعة 3000

دورة /دقيقة لمدة 3 دقائق.

5- بعد ذلك تم نقل الأنابيب إلى جهاز الدوار الحراري Thermocycler وتم تطبيق الظروف

الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول:

الجدول (3-8) الظروف الحرارية لتصنيع الـ cDNA

Step	Temperature	Time
cDNA synthesis	50°C	1 hour
Heat inactivation	95°C	5 minutes

6- بعد ذلك نقلت العينات الحفظ بدرجة -20C° لحين استخدامها في فحص Real-time PCR .

3-5-2-5-هـ - فحص (qRT- PCR) Quantitative Real-Time PCR

تم إجراء فحص الـ qPCR لعينات الـ cDNA باستخدام عدة Accupower Green Star Real-Time

PCR kit و جهاز Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block المجهزين من شركة

بايونير الكورية حسب طريقة Cheon *et al.* (1999)، و يعتمد هذا الفحص على صبغة سايبير الخضراء Syber Green في عدة الكشف qRT-PCR PreMix والذي صمم لتضخيم الـ PCR لـ cDNA الجينات المستهدفة *FSH, GH, GHR, IGF₁, IGF₂*, باستخدام البادئات primers وجين *GapdH* كجين محافظ (قياسي) Housekeeping gene لتقدير كمية عدد النسخ الناتجة من الـ PCR مقارنة بعدد النسخ للمنحني القياسي للجينوم الناتج من qPCR ترتبط صبغة السايبير الخضراء الموجودة في العدة مع النسخ الجديدة للقطع المتضخمة للجينات المستهدفة target والجين المحافظ بعدها تُسجل الأشارات الومضية fluorescent signals في جهاز الدور الحراري الـ Thermocycler Real Time PCR. تم رسم المنحني القياسي الجينومي من جين *GapdH* للجرذ *Rattus norvegicus* (27.9Mbp) والذي تم الحصول عليه من بنك الجينات NCBI-Gene Bank بما يقارب (1×10^7) نسخة أُستخدمت كمنحني قياسي لـ Genomic DNA.

3-5-2-و- تصميم تجربة الـ qRT-PCR

لتقدير كمية التعبير الجيني للعينات المدروسة عند التضاعف أُستخدم جين *GapdH* كجين محافظ house keeping وسيطرة إذ أُستخدم لتصحيح مستوى التعبير الجيني، وحضر مزيج تفاعل qRT-PCR master mixes للمنحني القياسي لـ Genomic DNA والجينات المستهدفة والجين المحافظ.

الجدول (3-9) مزيج qRT-PCR Master Mix للجينات المستهدفة

qPCR PreMix		Volume
cDNA template		10 µL
Primers	Target gene -F	2 µL
	Target gene -R	2 µL
DEPC water		6 µL
Total		20 µL

الجدول (3-10) مزيج qRT-PCR Master Mix للجين المحافظ (*GapdH* gene)

qRT-PCR Master Mix		Volume
cDNA template		10 µL
Primers	GAPDH-F	2 µL
	GAPDH-R	2 µL
DEPC water		6 µL
Total		20 µL

تمت إضافة مزيج تفاعل qPCR PreMix الى أنابيب-Accupower Green Star Real-Time PCR kit بعدها تم تغطية فوهة الأنابيب بفيلم لاصق adhesive film ثم مزجت بواسطة vigorous vortexing لإعادة عالق الراسب PreMix pellet ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين. من ثم وضعت انابيب مزيج تفاعل الـ qPCR لكل من المنحنى القياسي والجينات المستهدفة والجين المحافظ في صفيحة وبعدها نُقلت الى جهاز Exicycler 96 Real-Time PCR وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل الجينات حسب البرنامج الآتي:

الجدول (3-11) الظروف الحرارية لفحص qPCR

Step	Temp.	Time	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	45
Annealing/Extension	60 °C	45 sec	
Detection(Scan)			
Melting	-	-	1

3-5-2-ز- طريقة تحليل البيانات data analysis of Real-Time PCR

تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة $2^{-\Delta\Delta Ct}$ التي وضعت من قبل Livak و schmittgen (2001)، تعتمد هذه الطريقة على استخراج الكمية النسبية Relative Quantitive حيث أن الكميات النسبية يجب أن تصحح بطريقة بحيث تصبح ذات معنى بايولوجي.

يمثل الجين المحافظ *Gapdh* جين تصحيح ممكن أن يستخدم لحساب التعبير الجيني النسبي أو التغيير التضاعفي fold change في الجينات المستهدفة *FSH, GH, GHR, Igf₁, Igf₂* لذلك تم تصحيح قيم عدد دورات العتبة (Ct) threshold cycle number للجين المستهدفة مع قيم Ct للجين المحافظ بواسطة مستويات التعبير الجيني الكمي النسبي (التغير التضاعفي)، وفي هذه الطريقة تُعد أحد العينات

التجريبية مقياساً calibrator مثل عينات السيطرة Control samples وكل القيم المصححة للجين المستهدف Ct values تُقسم على قيم الجين المستهدف المصححة مع العينة القياسية calibrator لأستخراج مستويات التعبير النسبي relative expression levels، بعدها أستخدمت طريقة دلنا دورات العتبة ΔCT Method مع جين التصحيح Reference Gene:

1- تصحيح قيمة Ct للجين المحافظ reference gen(ref) من كل من الجين المستهدف لعينة

القياس والجين المستهدف لعينة الأختبار كما في المعادلتين الآتيتين:-

$$\begin{aligned}\Delta Ct (\text{test}) &= Ct (\text{target, test}) - Ct (\text{ref, test}) \\ \Delta Ct (\text{calibrator}) &= Ct (\text{target, calibrator}) - Ct (\text{ref, test})\end{aligned}$$

2- تصحيح قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة الأختبار من قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة القياس كما في المعادلة الآتية:-

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{test}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$$

3- يحسب التغيير التضاعفي للتعبير الجيني النسبي حسب المعادلة الآتية:-

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

3-6 - الدراسة النسجية Histological study

3-6-1 تحضير المقاطع النسجية (Luna, 1968) Preparation of histological sections

1- التثبيت Fixation: تم تثبيت العينات المدروسة (المبيض والرحم) بأستخدام الفورمالين (10%)

، حيث ان التثبيت يجعل النسيج اكثر ملائمة للتصبغ ويتراوح وقت التثبيت 24-28 ساعة.

2- الغسل والأنكاز Washing and Dehydration: غسلت العينات في الماء لمدة 3

ساعات لأزالة الفورمالين ، ثم تمرر العينات بسلسلة تراكيز تصاعدية من الأيثانول 70%, 80%

90%, 95% and 100% , لحوالي 1-2 ساعة لكل تركيز .

3- الترويق **Clearing**: تجرى هذه العملية لأزالة محلول الأيثانول وذلك بأستخدام الزايلين لثلاث مرات.

4- التشريب **Infiltration**: بأستخدام شمع البارافين السائل في 58-56 درجة مئوية لمرتين.

5- الطمر **Embedding**: يتم ادخال العينات في كونتينرات containers تحتوي على البارافين السائل في 56-58°C وتترك في درجة حرارة الغرفة حتى تتصلب بعد ذلك تحرر من الكونتينرات وتوضع في التجميد.

6- التقطيع **Sectioning**: يتم أستخدام المشراح الدوار Rotary microtome لعمل مقاطع بسمك 5 مايكروميتر ، توضع بعد ذلك في حمام مائي (50-55°C)، ثم يتم وضع المقاطع النسجية على سلايدات مؤشرة بألبومين ماير Mayer 's albumin .

3-6-2- تصبيغ المقاطع النسجية (Luna, 1968) Staining of histological sections

1- ازالة البارافين **Deparaffinization**: يتم في هذه الخطوة ازالة البارافين من الشرائح الزجاجية slides بواسطة وضعها في الفرن (55-70°C) لمدة 5 ساعات ، ثم توضع في الزايلين لمدة ساعة .

2- تجفف الشرائح الزجاجية من الزايلين ويعاد لها الماء rehydration من خلال وضعها في سلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الأثيلي 100% و 90% و 80% و 70% و 50% لحوالي 3 دقائق في كل تركيز ثم تغسل بالماء لمدة 5 دقائق.

3- توضع الشرائح الزجاجية في صبغة هيماتوكسلين- هاريس Harris-hematoxyline لمدة ربع ساعة.

4- الغسل بالماء الجاري.

5- توضع الشرائح الزجاجية بالكحول الحامضي acidic-alcohol لبضع ثواني.

- 6- تغسل الشرائح الزجاجية بالماء حتى يعود اللون الأزرق.
- 7- توضع الشرائح الزجاجية بصبغة الأيوسين المائية لمدة 10 دقائق.
- 8- تغسل بالماء الجاري.
- 9- الأنكاز بواسطة وضع الشرائح الزجاجية في سلسلة من تراكيز تصاعدية من الأيثانول 70% و 80% و 90% و 100% لمدة 2-3 ثواني في كل تركيز.
- 10- توضع الشرائح الزجاجية في الزايلين لمدة 24 ساعة.
- 11- تحميل Mounting السلايدات مع مادة لاصقة (D.P.X) ووضع غطاء الشريحة ، ثم تترك حتى تجف وتفحص.

3-6-3 فحص الشرائح النسجية

تم فحص الشرائح النسجية (المبيض والرحم) باستخدام المجهر المركب compound microscope تحت قوة التكبير 4x و 10x على التوالي لغرض الدراسة النسجية- الفسلجية.

3-6-4 التصوير المجهرى

تم التقاط صور للمقاطع النسيجية(المبيض والرحم) باستخدام المجهر المركب Olympus compound microscope BH₂ المزود بكاميرا تصوير نوع DCM310 Camera

3-7- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة وأجريت المقارنات باستخدام تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA1). وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال (5%). واستخرجت جميع التحليلات الإحصائية باستخدام برنامج Graph Prism- 5 كما تم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمالية 0.05 (Scheffler,1980).

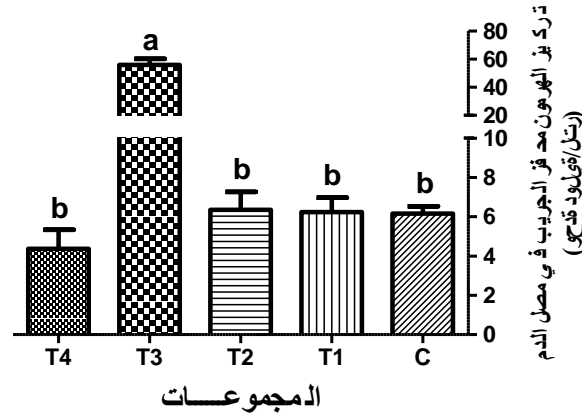
Results

4- النتائج

4 - 1 - هرمونات مصل الدم

4-1-1- الهرمون محفز الجريب

تشير النتائج المبينة في الشكل (4-1) الى زيادة تركيز الهرمون محفز الجريب في مصل دم إناث مجموعة T3 ، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus ، معنوياً ($p < 0.05$) مقارنة مع السيطرة، في حين لم تسجل فروقات معنوية ($p > 0.05$) بين تراكيز الهرمون في مصل دم إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات عند حقنه في طور Proestrus ومجموعة T2 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Proestrus ومجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Metestrus.



الشكل (4-1): تركيز الهرمون محفز الجريب في مصل الدم (ملي وحدة دولية/مللتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في

طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

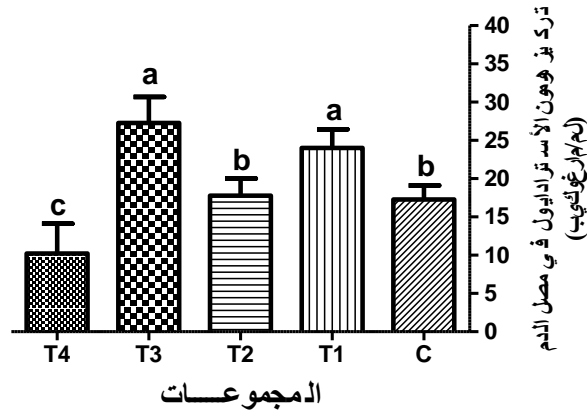
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-1-2- الأستراڊايول

تبين النتائج المشار إليها في الشكل (4-2) زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تركيز الأستراڊايول في مصل دم إناث مجموعتي T1 و T3، المعاملتين بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طوري Proestrus و Metestrus، على التوالي بالمقارنة مع السيطرة، في حين لم يظهر فرقا معنويا ($p > 0.05$) بين تراكيزي الهرمون في مصل دم إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T2 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Proestrus. أما مجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Metestrus فقد أظهرت انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في تركيزها عن تراكيز بقية المجموع.



الشكل (4-2): تركيز هرمون الأستراڊايول في مصل الدم (بيكوغرام/مللتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري

Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

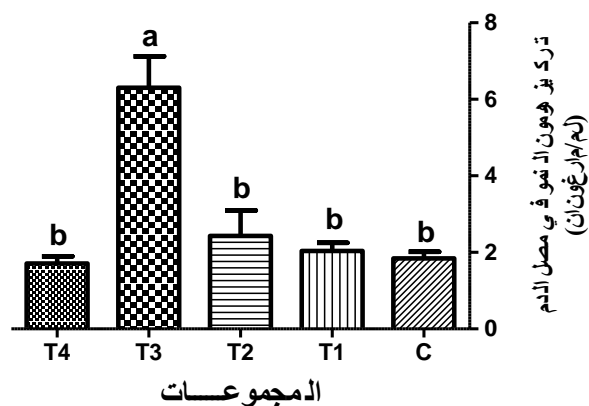
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

3-1-4- هرمون النمو

تشير النتائج المبينة في الشكل (3-4) الى زيادة تركيز هرمون النمو في مصل دم إناث مجموعة T3 ، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus ، معنويا ($p < 0.05$) مقارنة مع السيطرة، في حين لم تسجل فروقات معنوية ($p > 0.05$) بين تراكيز الهرمون في مصل دم إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات عند حقنه في طور Proestrus ومجموعة T2 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Proestrus ، ومجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Metestrus.



الشكل (3-4): تركيز هرمون النمو في مصل الدم (نانوغرام/لتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

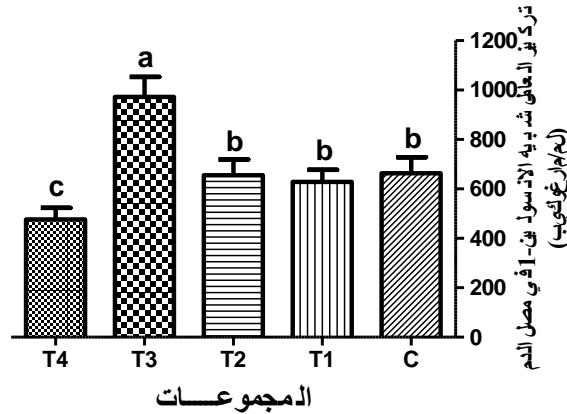
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-1-4- العامل شبيه الانسولين-1

تبين النتائج المشار اليها في الشكل (4-4) زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تركيز العامل شبيه الانسولين-1 في مصل دم إناث مجموعتي T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus بالمقارنة مع السيطرة، في حين لم يظهر فرقا معنويا ($p > 0.05$) بين تراكيز الهرمون في مصل دم إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات عند حقنه في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Proestrus. أما مجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور Metestrus فقد أظهرت انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في تركيزها عن تراكيز بقية المجموع.



الشكل (4-4): تركيز العامل شبيه الانسولين-1 في مصل الدم (بيكوغرام/مليلتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

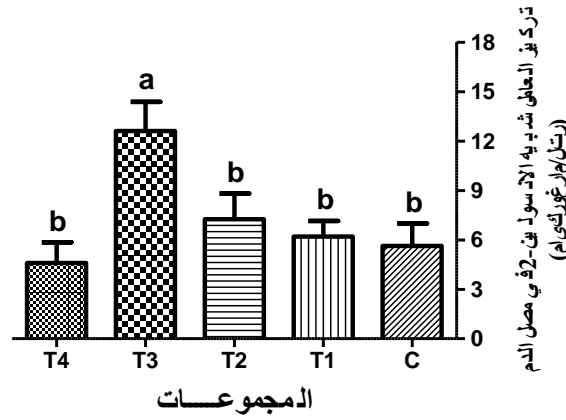
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-1-5- العامل شبيه الانسولين-2

توضح النتائج المبينة في الشكل (4-5) حصول زيادة في تركيز العامل شبيه الانسولين -2 في
مصل دم إناث مجموعة T3 ، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور
Metestrus ، معنويا ($p<0.05$) مقارنة مع السيطرة، في حين لم تسجل فروقات معنوية ($p>0.05$)
بين تراكيز العامل شبيه الانسولين -2 في مصل دم إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1 المعاملة
بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات عند حقنه في طور Proestrus ومجموعة T2
المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنه في طور
Proestrus ومجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا
عند حقن المضاد في طور Metestrus.



الشكل (4-5): تركيز العامل شبيه الانسولين -2 في مصل الدم (مايكروغرام/لتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل
الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري
Proestrus و Metestrus.
النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p<0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرولتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Metestrus.

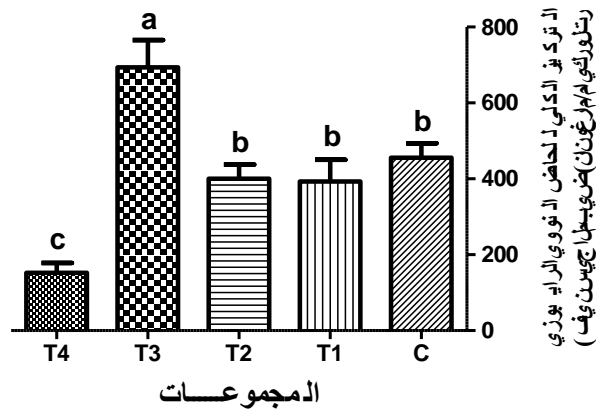
4-2- التعبير الجيني

4-2-1- المبايض

4-2-1-1- تركيز الحامض النووي الرايبوزي

تبين النتائج المشار إليها في الشكل (4-6) زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تركيز الحامض

النووي الرايبوزي في أنسجة مبايض إناث مجموعتي T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع السيطرة، في حين لم يظهر فرقا معنويا ($p > 0.05$) بين تراكيز إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا عند حقنه في طور Proestrus. أما مجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا عند حقنه في طور Metestrus فقد أظهرت انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في تركيزها عن تراكيز بقية المجموع.



الشكل (4-6): التركيز الكلي للحامض النووي الرايبوزي (نانوغرام/مايكرولتر) في أنسجة مبايض إناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرولتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Proestrus.

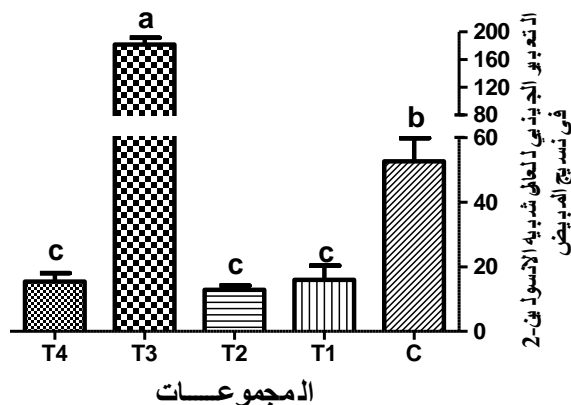
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرولتر) في البريتون في طور Metestrus.

3-1-2-4- تعبير جين العامل شبيه الانسولين-2

يشير الشكل (4-8) الى حصول زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تعبير جين العامل شبيه الانسولين-2 في أنسجة مبايض مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، مقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. بالمقابل سجلت معدلات مجموعة السيطرة تعبيراً أعلى معنوياً ($p < 0.05$) من مجموعات T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، و T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معاً في طور Proestrus، و T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معاً في طور Metestrus، التي لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) عند إجراء المقارنة الاحصائية فيما بينها.



الشكل (4-8): التغيير التضاعفي لتعبير جين العامل شبيه الانسولين-2 في أنسجة مبايض إناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معاً في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

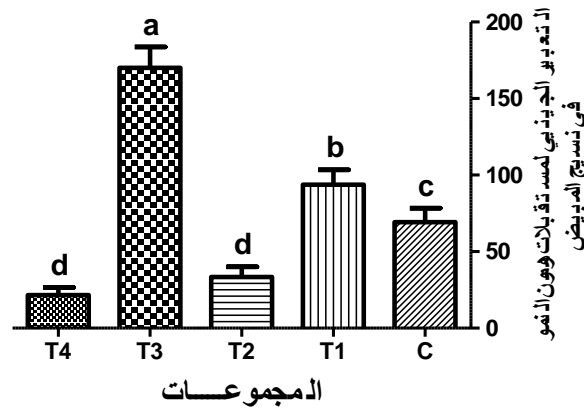
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-1-2-4- تعبير جين مستقبلات هرمون النمو

بينت نتائج الدراسة حصول زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تعبير جين مستقبلات هرمون النمو في أنسجة مبايض إناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، مقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. كما بين التحليل الاحصائي ارتفاع مستوى التعبير الجيني لأنسجة مبايض إناث مجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، معنويا ($p < 0.05$) مقارنة مع السيطرة، في حين لم تسجل فروقات معنوية ($p > 0.05$) بين مستوى التعبير الجيني لأنسجة مبايض إناث مجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Proestrus، ومجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Metestrus، إلا أنهما كانا أقل معنويا ($p < 0.05$) من السيطرة (الشكل 4-9).



الشكل (4-9): التغيير التضاعفي لتعبير جينات مستقبلات هرمون النمو في أنسجة مبايض إناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

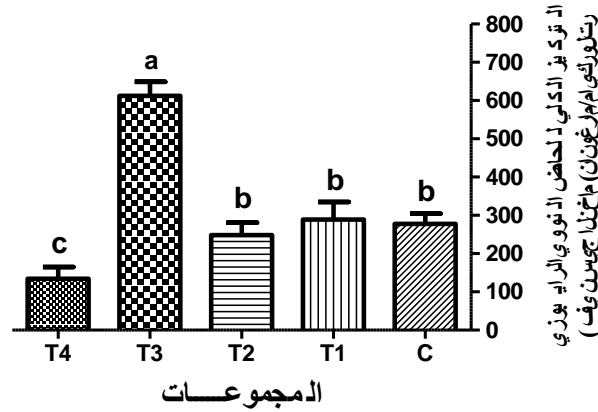
T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

2-2-4- الغدة النخامية

1-2-2-4- تركيز الحامض النووي الرايبوزي

تبين النتائج المشار إليها في الشكل (4-10) زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تركيز الحامض النووي الرايبوزي في أنسجة نخام إناث مجموعتي T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع السيطرة، في حين لم يظهر فرقا معنويا ($p > 0.05$) بين تراكيز إناث مجموعة السيطرة ومجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهبين معا عند حقنه في طور Proesreus. أما مجموعة T4 المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهبين معا عند حقنه في طور Metesreus فقد أظهرت انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في تركيزها عن تراكيز بقية المجموع.



الشكل (4-10): التركيز الكلي للحامض النووي الرايبوزي (نانوغرام/مايكرو لتر) في أنسجة نخام إناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهبين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

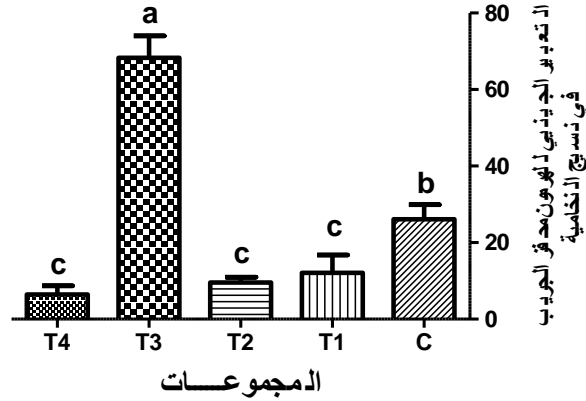
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهبين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهبين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-2-2-2 - جين الهرمون محفز الجريب

أظهرت الدراسة زيادة معنوية ($p < 0.05$) في مستوى تعبير جين الهرمون محفز الجريب في أنسجة الغدة النخامية لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. من جانب آخر، أظهر التحليل الإحصائي تسجيل مستويات منخفضة معنويًا ($p < 0.05$) لتعبير جين الهرمون محفز الجريب في أنسجة نخام إناث مجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طور Proestrus، ومجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طور Metestrus، بالمقارنة مع السيطرة، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) عند إجراء المقارنة فيما بينها (الشكل 4-11).



الشكل (4-11): التغيير التضاعفي لتعبير جين الهرمون محفز الجريب في أنسجة النخام الغدي لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حققت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

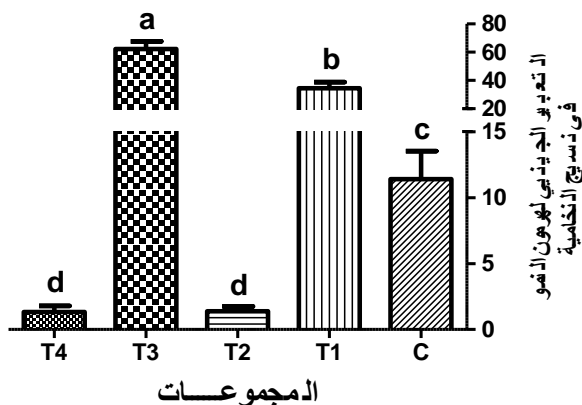
T2: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-2-2-3- جين هرمون النمو

بينت نتائج الدراسة حصول زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تعبير جينات هرمون النمو في أنسجة الغدة النخامية لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، مقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. كما بين التحليل الاحصائي ارتفاع مستوى التعبير الجيني لأنسجة الغدة النخامية في إناث مجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، معنويا ($p < 0.05$) مقارنة مع السيطرة، في حين لم تسجل فروقات معنوية ($p > 0.05$) بين مستوى التعبير الجيني لأنسجة الغدة النخامية في إناث مجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Proestrus، ومجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Metestrus، إلا أنهما كانا أقل معنويا ($p < 0.05$) من السيطرة (الشكل 4-12).



الشكل (4-12): التغيير التضاعفي لتعبير جين هرمون النمو في أنسجة النخام الغدي لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

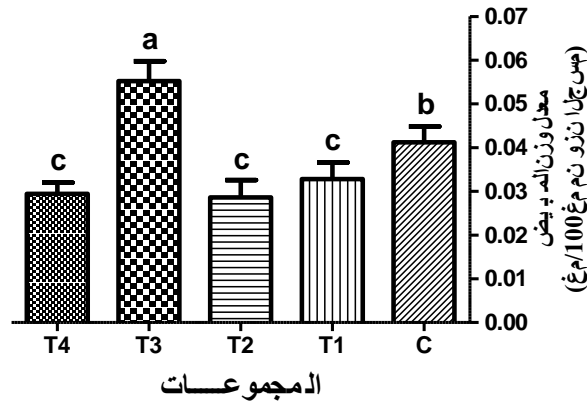
T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

3-4- التغيرات الشكلية والنسجية-الوظيفية

1-3-4- المبايض

1-1-3-4- أوزان المبايض

أظهرت الدراسة زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل اوزان المبايض (غم/ 100 غم من وزن الجسم) لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. من جانب آخر، أظهر التحليل الاحصائي تسجيل مستويات منخفضة معنويا ($p < 0.05$) لأوزان مبايض إناث مجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Proestrus، ومجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Metestrus، بالمقارنة مع السيطرة، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) عند اجراء المقارنة فيما بينها (الشكل 4-13).



الشكل (4-13): معدل أوزان المبايض (غم/ 100 غم من وزن الجسم) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري

Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

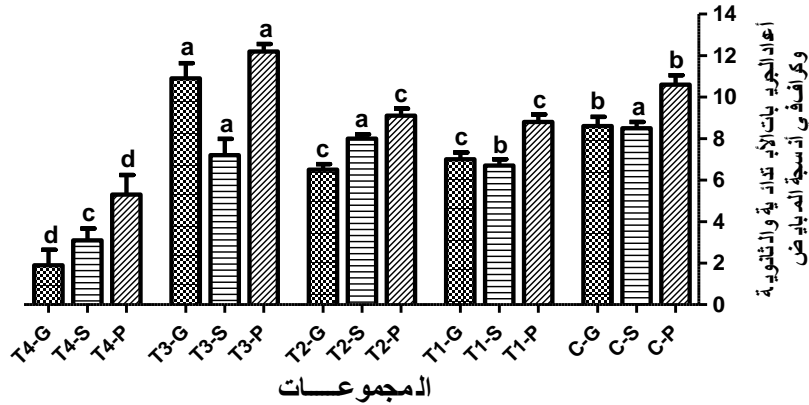
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-1-3-2- أعداد الجريبات

يبين الشكل (4-14) نتائج أعداد الجريبات المبيضية بأنواعها الثلاث، الأبتدائية والثانوية وكراف، لإناث مجموعات الدراسة الخمس. أظهر التحليل الاحصائي زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل أعداد الجريبات الابتدائية وجريبات كراف لمبايض إناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع السيطرة، التي كان معدلها أعلى معنويا ($p < 0.05$) من مجموعات الدراسة الثلاث الأخرى، في حين لم تظهر فروقات معنوية ($p > 0.05$) بين أعداد الجريبات الابتدائية لمجموعتي T1 و T2، المعاملتين بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا عند حقنهما في طور Metestrus، بينما سجلت مجموعة T4 معدلا هو الأقل معنويا ($p < 0.05$) بين المجاميع. أما أعداد الجريبات الثانوية، فقد كانت متقاربة احصائيا ($p > 0.05$) بين مجموعات السيطرة و T2 و T3، إلا أنها كانت أعلى معنويا ($p < 0.05$) من معدل مجموعة T1، التي كانت هي الأخرى أعلى معنويا ($p < 0.05$) من معدل مجموعة T4.



الشكل (4-14): معدل أعداد جريبات المبيض الأبتدائية والثانوية وكراف لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري

Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

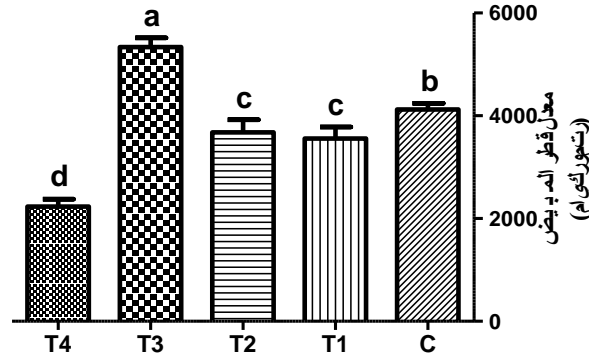
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-3-1-3-3-1-3-4- أقطار المبايض

أظهرت الدراسة زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل أقطار المبايض (مايكرومتر) لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع المجموع الأخرى. كما بينت النتائج تسجيل معدلات أقل معنويا ($p < 0.05$) لأقطار مبايض إناث مجموعتي T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، و T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Proestrus، مقارنة مع السيطرة، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) فيما بينها. أما مجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Metestrus فقد كانت الأقل معنويا ($p < 0.05$) من بين مجموعات الدراسة الخمس (الشكل 4-15).



الشكل (4-15): معدل أقطار المبايض (مايكرومتر) المجموعات لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 ميكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 ميكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 ميكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 ميكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 ميكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

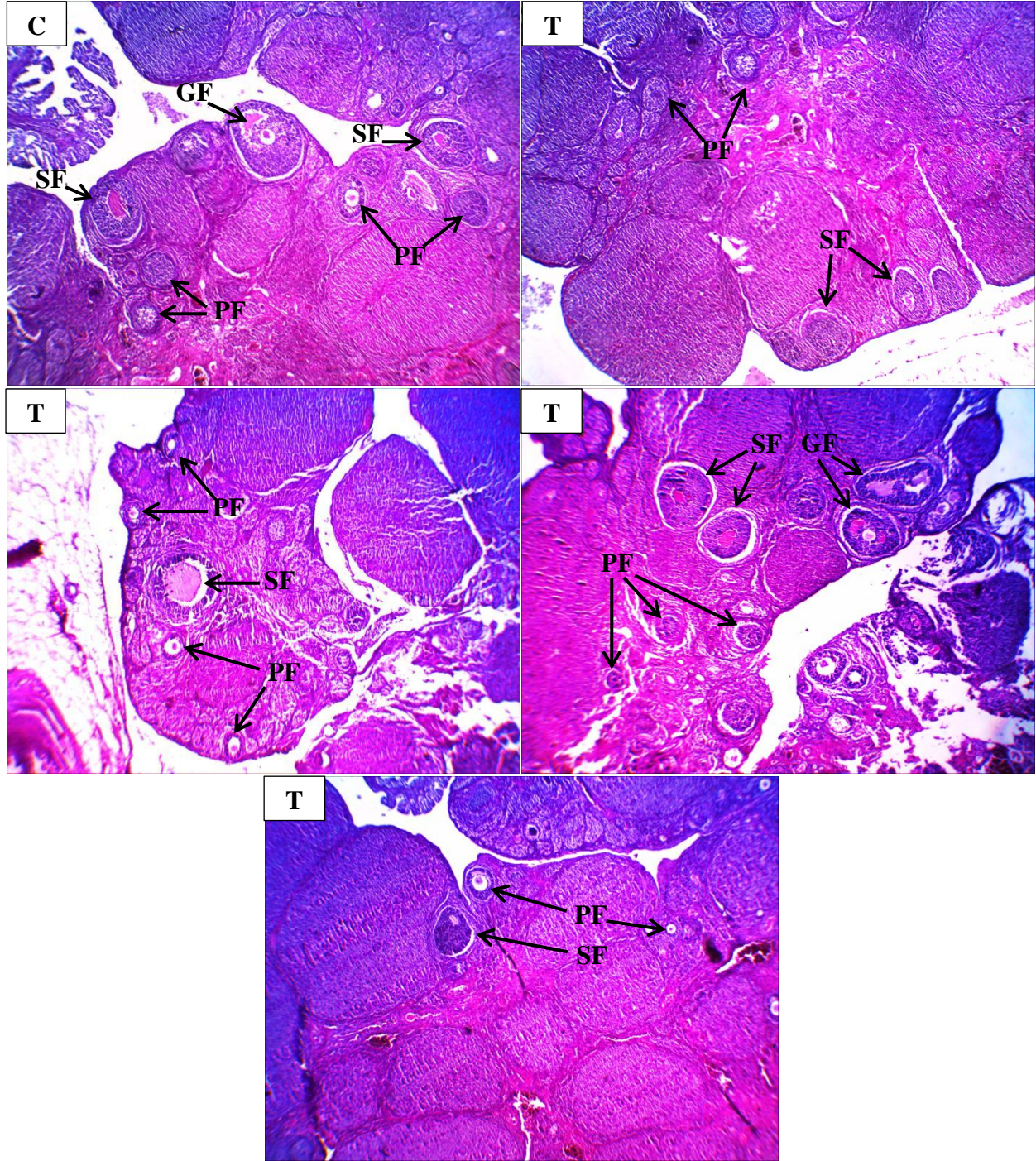
4-1-3-4- التغييرات النسجية-الوظيفية

تؤكد النتائج الموضحة في الشكل (4-16) على تلك المشار اليها في الشكل (4-15)، إذ

يشير الشكل الى الزيادة الحاصلة في نمو وتطور مبايض مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي

البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، مع زيادة أعداد الجريبات الابتدائية وجريبات كراف

بالمقارنة مع السيطرة والمجموع الأخرى.

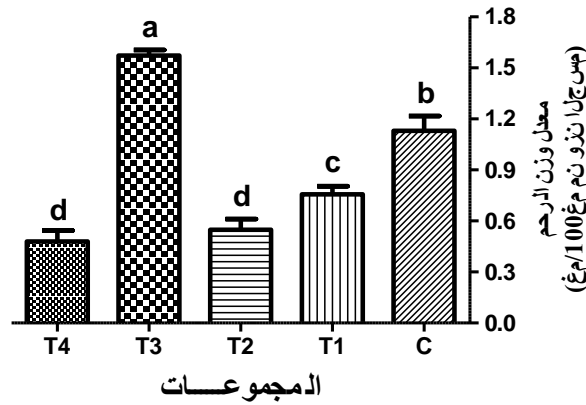


الشكل (4-16): مقاطع نسيجية مأخوذة من مبايض إناث مجموعة السيطرة (C) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus (T1) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Proestrus (T2) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus (T3) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus (T4)، تظهر فيها الزيادة الواضحة في نمو وتطور وزيادة أعداد الجريبات المبيضية الأبتدائية (PF) والثانوية (SF) وكراف (GF) في مجموعة T3 بالمقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى مع الإشارة الى أن أعداد الجريبات الأبتدائية والثانوية كان منخفضاً في مجموعة T4 وعدم وجود جريبات ناضجة (كراف). (إيوسين-هيماتوكسيلين 125x).

4-3-2- الأرحام

4-3-2-1- أوزان الأرحام

تشير النتائج الموضحة في الشكل (4-17) حصول زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل اوزان الأرحام لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. من جانب آخر، أظهر التحليل الاحصائي تسجيل مستوى منخفض معنويا ($p < 0.05$) لأوزان أرحام إناث مجموعة T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، بالمقارنة مع السيطرة، إلا أن أوزان مجموعتي T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبي معاً في طور Proestrus، ومجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبي معاً في طور Metestrus، كانت أقل معنويا ($p < 0.05$) من معدل مجموعة T1، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) عند اجراء المقارنة فيما بينها.



الشكل (4-17): معدل أوزان الأرحام (غم/ 100 غم من وزن الجسم) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبي معاً في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

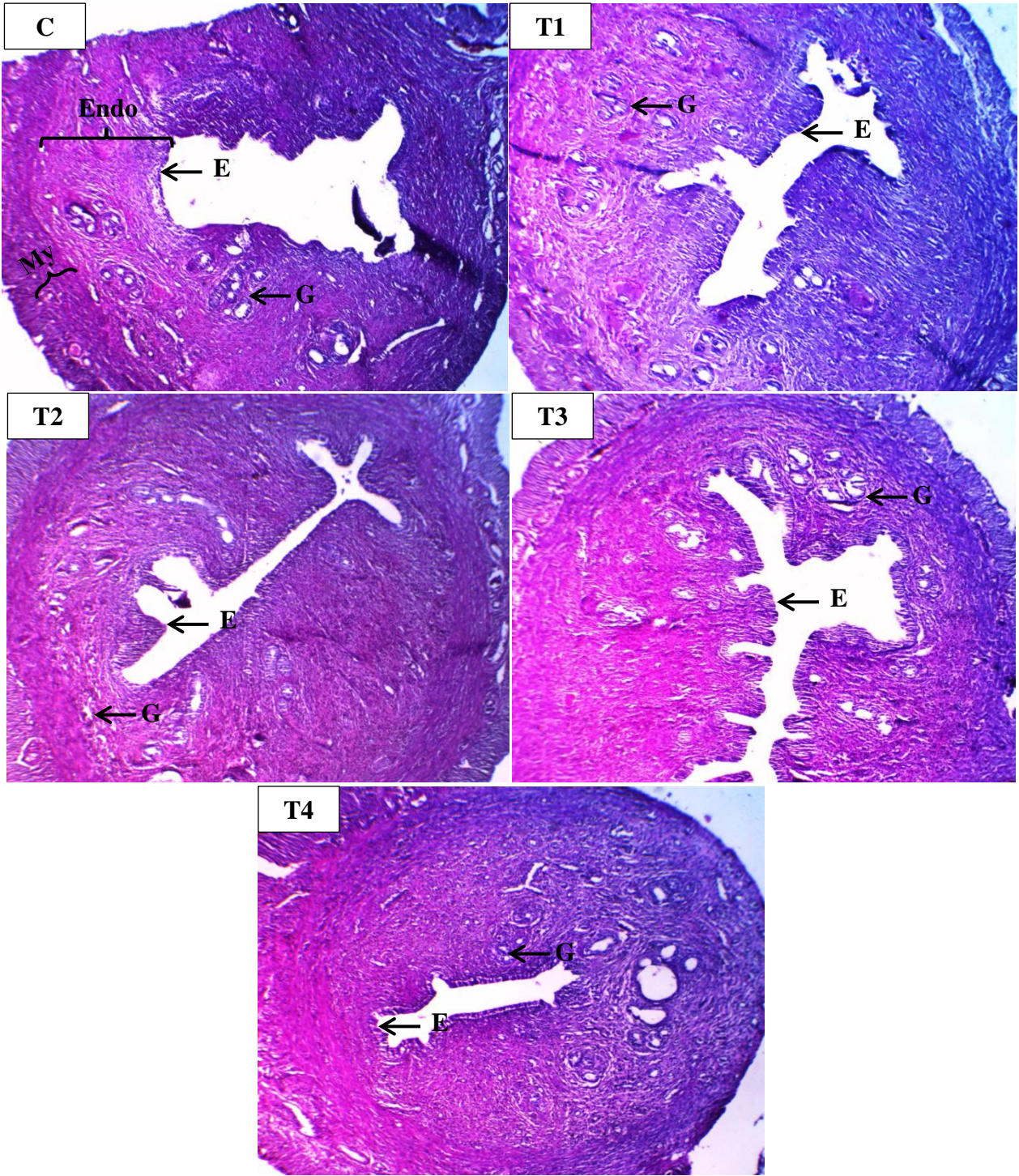
T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبي (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبي (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

2-2-3-4 - التغيرات النسجية-الوظيفية

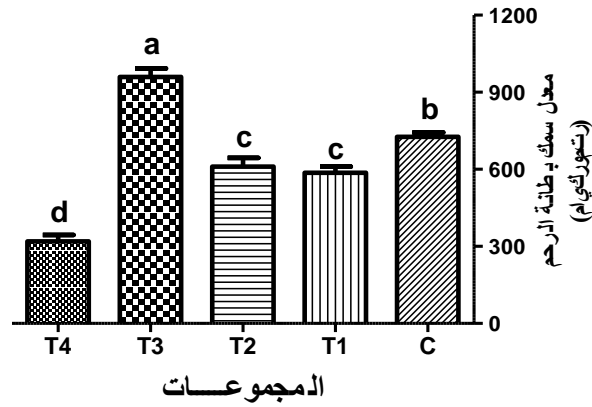
يبين الشكل (4-18) مقاطع نسجية مأخوذة من أرحام في طور النمو Proliferative phase لإناث مجموعة السيطرة (C) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus (T1) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus (T2) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus (T3) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور (T4). عند المقارنة مع مقاطع أرحام إناث مجموعة السيطرة، توضح مقاطع أرحام إناث مجموعة T3 نموًا وتطورًا ملموسًا في طبقة البطانة الداخلية للرحم Endometrium وخصوصًا في الطبقة الوظيفية Functionalis المتكونة من جزأين أساسيين هما الطبقة الظهارية الفارزة Secretory epithelium والغدد الرحمية Uterine glands، إذ تمثلت التطورات بزيادة سمك الطبقة الظهارية الفارزة مع زيادة ارتفاع الخلايا العمودية المبطنة لها مع زيادة أعداد الغدد الرحمية، التي تظهر ملتوية Coiled ومتشعبة. أما طبقة عضلات الرحم فلم تظهر عليها تغيرات نسجية ملحوظة بين المجموعات. بينت مقاطع أرحام مجموعتي T1 و T2 معالم نسجية مقارنة لتلك الملاحظة في السيطرة ماعدا الغدد الرحمية التي كانت أقل عددًا وتطورًا في تلك المجموعتين بالمقارنة مع السيطرة. أما مقاطع أرحام مجموعة T4 فقد كانت الأقل نموًا وتطورًا من بين مجموعات الدراسة الخمس، إذ ظهر عليها انخفاضًا واضحًا في سمك الطبقة الظهارية الفارزة مع انخفاض ارتفاع الخلايا العمودية المبطنة لها. كما أظهرت المقاطع النسجية لأرحام تلك المجموعة انخفاضًا واضحًا في أعداد الغدد الرحمية المتواجدة في الطبقة الوظيفية من بطانة الرحم الداخلية إضافة إلى ذلك، تظهر المقاطع عدم تطور تلك الغدد، إذ لم تظهر عليها الاستطالة والألتواءات الملاحظة لا في مقاطع أرحام السيطرة ولا مقاطع أرحام مجموعة T4.



الشكل (4-18): مقاطع نسيجية مأخوذة من أرحام إناث مجموعة السيطرة (C) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus (T1) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيبين في طور Proestrus (T2) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus (T3) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيبين في طور Metestrus (T4)، تظهر فيها زيادة في طبقة البطانة الداخلية للرحم (Endo) مع نمو واضح للطبقة الظهارية الفارزة (Ep) التي تبدو أثنى مع زيادة أعداد الغدد الرحمية (G) التي تظهر ملتوية ومنتشعبة في مجموعة T3 بالمقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى مع الإشارة إلى أرحام مجموعة T4 تظهر أقل نمواً وثخانة (إيوسين-هيماتوكسيلين 125x).

3-2-3-4 - سمك بطانة الرحم

أظهرت الدراسة زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل سمك بطانة الرحم (مايكرومتر) لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع مجاميع الدراسة الأخرى. من جانب آخر، أظهر التحليل الاحصائي تسجيل مستويات منخفضة معنوية ($p < 0.05$) لسمك بطانة أرحام إناث مجموعتي T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، ومجموعة T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Proestrus، بالمقارنة مع السيطرة، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) عند اجراء المقارنة فيما بينها. أما مجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طور Metestrus فقد كانت الأقل معنوية ($p < 0.05$) من بين مجموعات الدراسة الخمس (الشكل 4-19).



الشكل (4-19): معدل سمك بطانة الرحم (مايكرومتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والانهيبيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حققت بالمحلول الفسلجي (100 ميكرومتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 ميكرومتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 ميكرومتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 ميكرومتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والانهيبيين (100 ميكرومتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-2-3-4 - سمك عضلة الرحم

يبين الشكل (4-20) سمك عضلات أرحام في طور النمو Proliferative phase

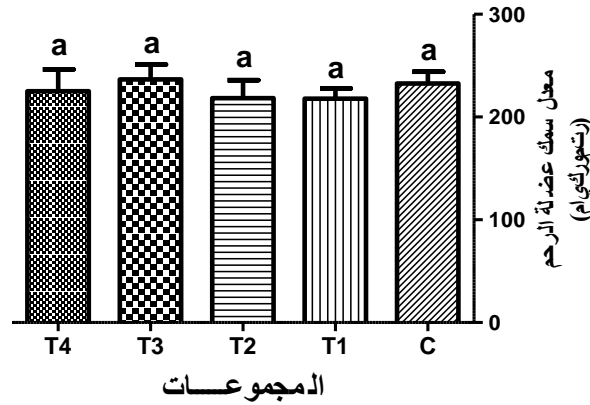
لإناث مجموعة السيطرة (C) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور

Proestrus (T1) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور

Proestrus (T2) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus

(T3) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus

(T4)، إذ تبين النتائج عدم وجود فروقات معنوية تذكر بين مجموعات الدراسة الخمس.



الشكل (4-20): معدل سمك بطانة الرحم (مايكرومتر) لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع

الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طوري Proestrus و

Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حقنت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

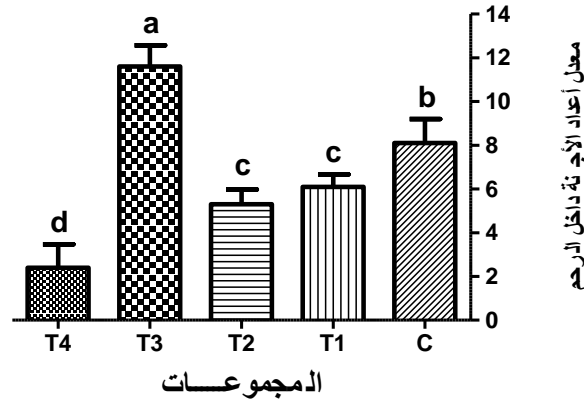
T3: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

4-4- نتائج الخصوبة

4-4-1- أعداد الأجنة داخل الرحم

أظهرت الدراسة زيادة معنوية ($p < 0.05$) في معدل أعداد الأجنة داخل الرحم لإناث مجموعة T3، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus، بالمقارنة مع المجاميع الأخرى. كما بينت النتائج تسجيل معدلات أقل معنويا ($p < 0.05$) لأعداد أجنة مجموعتي T1، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Proestrus، و T2، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طور Proestrus، مقارنة مع السيطرة، إلا أنها لم تسجل أية فروقات معنوية ($p > 0.05$) فيما بينها. أما مجموعة T4، المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طور Metestrus فقد كانت الأقل معنويا ($p < 0.05$) من بين مجموعات الدراسة الخمس (الشكل 4-21).



الشكل (4-21): معدل أعداد الأجنة داخل الرحم لإناث الجرذان المعاملة بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات أو مضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات والأنهيين معا في طوري Proestrus و Metestrus.

النتائج تمثل المعدلات \pm الخطأ القياسي

الحروف المختلفة تشير إلى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$).

C: مجموعة السيطرة، حققت بالمحلول الفسلجي (100 مايكرو لتر) في البريتون في بداية طور Proestrus.

T1: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T2: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Proestrus.

T3: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

T4: حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100 مايكرو لتر) في البريتون في طور Metestrus.

2-4-4 نمو الأجنة داخل الرحم

يبين الشكل (4-22) أعداد الأجنة ومستوى نموها داخل أرحام إناث السيطرة (C) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus (T1) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Proestrus (T2) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus (T3) والإناث المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus (T4)، إذ تظهر الصور تفوقا واضحا لنمو أجنة مجموعة T3 مقارنة مع السيطرة، التي كانت هي الأخرى متفوقة على مجموعتي T1 و T2، بينما كانت مجموعة T4 الأقل عددا وتطورا من بين مجموعات الدراسة الخمس.



الشكل (4-22): صور لأرحام الإناث الحوامل من مجموعة السيطرة (C) والمجموعة المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus (T1) والمجموعة المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Proestrus (T2) والمجموعة المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus (T3) والمجموعة المعاملة بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus (T4)، تظهر فيها الزيادة الواضحة في نمو وتطور الأجنة في مجموعة T3 بالمقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى مع الإشارة الى أن مجموعة T4 عانت بعضها من تردي نمو الأجنة وقلة أعدادها بشكل ملحوظ (صبغة البونتايمين الأزرق).

1-5- الدراسة الهرمونية

اثبتت الدراسة الحالية ان المعاملة الثالثة والتي حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100µl) في البريتون في طور Metestrus قد حققت ارتفاعا معنويا في تراكيز الهرمونات التي تم قياسها في التجربة والتي اُشتملت الهرمون محرض الجريب و الأسترايول و العامل شبيه الأنسولين-1 و العامل شبيه الأنسولين-2 وهرمون النمو بالمقارنة مع السيطرة والمعاملات الأولى التي حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات (100µl) في البريتون في طور Proestrus والثانية التي حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100µl) في البريتون في طور Proestrus والرابعة التي حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين (100µl) في البريتون في طور Metestrus.

وقد يعزى السبب في ذلك الى التمنيع السلبي والذي ادى الى انخفاض في تركيز الأنهيين مما ادى الى ارتفاع تركيز الهرمون محرض الجريب في مصل الدم وهذا بدوره يعكس الدور الفسلجي في تثبيط تخليق وافراز الهرمون محرض الجريب النخامي عن طريق التغذية الراجعة، وهذه النتيجة تتفق مع Luisi *et al.* (2005) الذي اشار الى دور الأنهيين في تثبيط افراز الهرمون محرض الجريب في العديد من الأنواع ومنها القوارض واللبائن الأخرى والأنسان وهذا يتفق مع نتائج المعاملة الرابعة والتي سجلت انخفاضا في مستوى الهرمون محرض الجريب مقارنة مع السيطرة والمجموعات الأخرى في الدراسة. او قد تكون هذه الزيادة في تراكيز الهرمونات الى النشاط الموقعي للأكتفينات في خلايا الغدة النخامية المنتجة للكونادوتروبينات لتحفيز افراز الهرمون محرض الجريب وذلك يعود الى التضاد الوظيفي للأكتفينات والأنهيينات، على الرغم من ان الأنهيينات والأكتفينات تشخص كبروتينات المناسل الا انها تمتلك فعالية صمية على النخامية الأمامية (Miyazono *et al.*, 2010).

كما ان هناك العديد من التساؤلات فيما اذا كانت الأكتفنيات تصنف كهرمونات غدد صم Endocrine وذلك اعتمادا على تركيزها في المصل ام انها لم تصل الى التراكيز الكافية مقارنة مع الهرمونات الأخرى (Dpaolo *et al.*, 1991) ، ولكن من المؤكد ان للأكتفنيات فعالية جوارية Paracrine في الغدة النخامية، إذ وجدت احدى الدراسات عند اضافة مضادات الأكتفين Neutrolizing monoclonal antibodies activin-B الى وسط زرع نشرت فيه خلايا الغدة النخامية ادى الى تثبيط افراز الهرمون محرض الجريب (Corrigan *et al.*, 1991)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، كما نجد ان المعاملة الأولى كانت قريبة من السيطرة ولم تسجل فرقا معنويا، والذي قد يعود الى التأثير الجوارى للأنتهيين في خلايا الغدة النخامية والذي يثبط افراز الهرمون محرض الجريب، حيث شخّصت تحت الوحدة ألفا وبيتا Subunits- α and β في خلايا الغدة النخامية، وقد يعود السبب الى زيادة افراز الأنتهيين من قبل الخلايا الحبيبية للجريبات المبيضية في الطور الجريبي (Tortora and Derrickson, 2009)، والذي قد يكون فيه دور الأكتفين اكثر تأثيرا على افراز الهرمون محرض الجريب من خلال ميكانيكية الإفراز الجوارى خلال الغدة النخامية وبالتالي فان للأنتهيين والأكتفين تأثيرات موضعية على نشأة الجريبات المبيضية (Findlay *et al.*, 2001).

ان زيادة تركيز الهرمون محفز الجريب في مصل الدم رافقتها زيادة في تركيز هرمون الأسترايول، وربما هذا هو السبب الرئيسي الذي يبرهن الكفاءة التناسلية والتي تنعكس على وظيفة الغدة النخامية وهذا ينطبق على المجموعتين الثالثة والأولى في الدراسة الحالية والتي حققت ارتفاعا معنويا في مستويات الأسترايول في مصل الدم مقارنة مع السيطرة والمجموعات الأخرى، في حين سجلت المجموعة الرابعة انخفاضا في تركيز الأسترايول وبالتالي تردت قدرتها التناسلية، فقد اثبتت نتائج مختلف التجارب مشاركة الأنتهيين في العملية التكاثرية لأنات كمنظم لأفراز الهرمون محرض الجريب خلال طور نمو الجريبات الرئيسية خلال الطور الأصفر المبكر Early luteal phase. حيث اثبتت النتائج ارتفاع افراز الهرمون

معرض الجريب بعد معادلة الأنهيين الداخلي خلال الطور الأصفر المبكر وفي نفس الوقت يترافق مع تحفيز نمو وتطور الجريبات المبيضية ، هذه النتائج اثبتت الدور المؤثر للأنهيين كمنظم لأفراز الهرمون معرض الجريب عن طريق التغذية الراجعة السلبية خلال الطور الأصفر المبكر وهذا يترافق مع افراز عالي للأسترايول ، حيث اثبت AL-Shwilly (2016) ارتفاع مستوى الأسترايول بعد مرور 12 و 24 و 36 ساعة من التمنيح ضد الأنهيين في اناث الجرذان وهذه النتائج تتوافق مع الدراسة الحالية.

اشارت الدراسات ان معادلة الأنهيين الداخلي يرفع مستوى العامل شبيه الأنسولين-1 في مصلى اناث الجرذان ، والزيادة في تركيز العامل شبيه الأنسولين-1 ممكن ان تكون نتيجة زيادة في انتاج العامل شبيه الأنسولين-1 في المناسل والأنسجة خارج المناسل (Abdulla, 2013) وهذا يشير الى زيادة في هرمون النمو من النخامية الأمامية ، كما اثبتت النتائج ان هرمون النمو ينشط استتساخ جين العامل شبيهة الأنسولين-1 وينظم التغيرات في تركيب الكروماتين خلال جين العامل شبيهة الأنسولين-1 وترسيم الهدف خلال الكروماتين (Thomas *et al.*, 1994)، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية حيث حققت المعاملة الثالثة ارتفاعا معنويا في كل من هرمون النمو والعامل شبيه الأنسولين-1 والعامل شبيه الأنسولين-2 مقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى في التجربة، في حين سجلت المعاملة الرابعة انخفاضا في مستوى الهرمونات الثلاثة والذي كان معنويا بالنسبة للعامل شبيه الأنسولين-1 مقارنة مع السيطرة وباقي المعاملات.

بالأضافة الى هرمون النمو توجد منشطات اخرى لأنتاج العامل شبيه الأنسولين-1 ومنها الأسترايول والذي سجل ارتفاعا معنويا في المعاملة الثالثة للدراسة الحالية ، اثبتت الدراسات ان انخفاض تركيز الأنهيين في مصلى الدم المترافق مع زيادة تركيز الهرمون معرض الجريب في المصل (-AL) (Sa'aidi *et al.*, 2013) مع زيادة تركيز الأكتفين A ، التي سجلت في الدراسة الحالية ممكن ان تكون أسبابا في زيادة افراز العامل شبيه الأنسولين-1 في المناسل والأنسجة خارج المناسل بواسطة فعالية

هرمون النمو النخامي وهذا يشير الى ان الأكتفين A يحفز افراز هرمون النمو النخامي عن طريق تعديل الأستتساخ الجيني لهرمون النمو (Tamura et al., 2000) ، ان افراز هرمون النمو يتأثر بتركيز العامل شبيهة الأنسولين-1 ففي حالة انخفاض مستوى العامل شبيهة الأنسولين-1 في مصل الدم ينخفض تركيز هرمون النمو اما في حال ارتفاع هرمون النمو يرتفع تركيز العامل شبيه الأنسولين-1 في مصل الدم (Augest, 1990)، ان الأنتاج الموقعي للعوامل شبيهة الأنسولين مهم جدا في فعالية معظم اعضاء الجسم وتشير الدراسات الى ان الهرمونات الستيرويدية هي المنظم الرئيسي لأنتاج العامل شبيهة الأنسولين-1 موقعا في الجهاز التكاثري (LeRoith et al., 1992)، نستنتج من هذا ان مستوى العامل شبيه الأنسولين-1 يزداد جهازيا وموقعا بسبب انخفاض مستوى الأنهبين في المصل وارتفاع مستوى الأستروجين وهذا ماتوصلنا اليه في الدراسة الحالية.

اثبتت الدراسات ان ارتفاع مستوى الأستروجين في المجاميع التي حقنت بمضادات الأنهبين يترافق مع زيادة مستوى الهرمونات المحررة لهرمون النمو في تحت المهاد وهرمون النمو النخامي، كما ان هرمون النمو يتأثر بتخليق الأستروجين خارج وداخل الجسم، ونتاج الهرمونات الستيرويدية بواسطة المبيض يعتبر اساسي لتطور الجريبات المبيضية، نضج خلية البيضة، الأباضة ، وظيفة الجسم الأصفر، ادامة وغرس البلاستولا، تنظيم محور تحت المهاد- النخامية - المناسل وتخليق الستيرويدات ولذلك فهو مهم جدا لأنجاح العملية التكاثرية بالرغم من ان الهرمون اللوتيني والهرمون محرض الجريب هي المنظمات الأولية في تخليق الستيرويدات المبيضية، وبذلك فأن هرمون النمو يحور انتاج الستيرويدات المبيضية (Hull and Harvey, 2001)، نستنتج من هذه الدراسات قد يكون لهرمون النمو تأثير محفز على تخليق الستيرويدات في الخلايا الحبيبية او ربما يحث تخليقها عن طريق زيادة فعالية الكونادوتروبينات وبذلك يحفز انتاج الأسترايول من الجريبات المبيضية، وربما هرمون النمو بالتأزر مع

الكوندوتروبيونات يزيد انتاج الأسترايول وهذا التآزر يعكس زيادة مستقبلات الكوندوتروبيونات بواسطة هرمون النمو او زيادة مستقبلات هرمون النمو بواسطة الكوندوتروبيونات (Thanon, 2013).

اشار *Colon et al.* (2005) الى ان للعوامل شبيهة الأنسولين-1 و 2 اهمية كبيرة في تصنيع الستيرويدات بتأثير غدي صمي او بتأثير غدي ذاتي، وان حذف جين العامل شبيه الأنسولين-1 يؤدي الى انخفاض مستوى الستيرويدات في مصل دم ذكور الجرذان من خلال انخفاض عدد خلايا ليديك (Wang and Hardy, 2004) وهذا ربما ينطبق على الجريبات المبيضية في اناث الجرذان. اوضحت الدراسات ان ارتفاع مستوى العوامل شبيهة الأنسولين في المصل في حالة التمنيح ضد الأنهيين هي نتيجة لزيادة مستوى التعبير الجيني لها في المناسل والأنسجة خارج المناسل، خلال البلوغ تكون النخامية لها الدور الأساسي في دعم كفاءة الوظيفة التكاثرية للأناث، لذلك نضج وعدد خلايا النخامية وانتاج العوامل شبيهة الأنسولين تحدد قوة انتاج النخامية في اللبائن وفي النهاية وظيفة المناسل والأنسجة خارج المناسل والتي لها علاقة بالوظيفة التكاثرية للأناث (Griswold and McLean, 2006).

5-2- الدراسة الجزئية

5-2-1- التركيز الكلي للحامض النووي الرايبوزي في انسجة المبايض والنخامية

اثبتت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع تركيز RNA في انسجة المبايض والنخام الغدي للمعاملة الثالثة التي حقنت بمضاد السائل الجريبي البقري منزوع الستيرويدات في طور Metestrus مقارنة مع السيطرة والمعاملات الأولى التي حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Proestrus والثانية التي حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Proestrus ، في حين سجلت المعاملة الرابعة التي حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Metestrus انخفاضاً معنوياً مقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى في التجربة، قد يعود السبب في ذلك الى ان التمنيح السلبي ضد الأنهيين الداخلي ادى الى زيادة تركيز RNA وهذا يشير بوضوح الى النشاط

الوظيفي للمبيض والنخامية في تخليق البروتينات، كذلك يعكس فعالية الأنقسام الخيطي في الخلايا وزيادة أعدادها في تلك الأعضاء، اوقد يعزى السبب الى تكاثر الخلايا الحبيبية وخلايا القراب للجريبات المبيضية ونشاطها في انتاج الهرمونات المبيضية وبشكل خاص الأسترايول (Cossigny *et al.*, 1987 2012)، او ربما يعكس فعالية المبيض من خلال تهيئة انزيمات تصنيع الستيرويدات ومستقبلات الهرمونات التكاثرية ويشير في نفس الوقت الى النشاط الأفرزي للخلايا النخامية المفردة للكونادوتروبيينات.

من جانب اخر ادى التمنيع ضد الأكتفين الى انخفاض تركيز RNA في المعاملة الرابعة وهذا بدوره يعكس دور الأكتفين الأيجابي في العمليات البنائية، اذ تشير الدراسات الى دور الأكتفين في نشأة الجريبات المبيضية المبكرة من خلال تحفيز تمايز خلية البيضة وتكاثر خلايا الطبقة الحبيبية للجريبات المبيضية كما اثبتت دراسات سابقة أجريت على الجرذان ان التأثير المحفز للهرمون محرض القند في تكاثر خلايا الطبقة الحبيبية خلال المراحل المبكرة لنشأة الجريبات المبيضية ينظم بواسطة الأكتفين (Lei *et al.*, 2010)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية فقد ادى التمنيع ضد الأنهبين في المعاملة الثالثة الى ارتفاع تركيز RNA وهذا بدوره يعكس الدور البنائي للأكتفين، كما تستوجب الإشارة الى ان عدم تغيير تراكيز RNA في المعاملات التي حقنت في طور Proestrus يعود الى التأخر في التمنيع ومرور العمليات في المبيض وانتهاء مرحلة التكاثر.

5-2-2- التعبير الجيني

كان من أهداف الدراسة الحالية هو التعرف على الآلية التي تعمل بها جينات العامل شبيه الأنسولين-1 والعامل شبيه الأنسولين-2 ومستقبلات هرمون النمو في انسجة المبايض وجينات هرمون النمو والهرمون محرض الجريب في انسجة النخام الغدي، فقد وجدنا تفاوتاً في مستويات التعبير الجيني للأنسجة الهدف بالنسبة لمعاملات التجربة، حيث حققت المعاملة الثالثة في التجربة والتي حقنت بمضاد

السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في طور Metestrus ارتفاعا معنويا بالتعبير الجيني لجميع الجينات المقاسة في التجربة مقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى في التجربة، في حين سجلت المعاملة الرابعة والتي حققت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيين في طور Proestrus انخفاضا معنويا بالتعبير الجيني لجميع الجينات المقاسة في التجربة مقارنة مع السيطرة وباقي المعاملات، حيث ادى التمنيع السلبي ضد الأنهيين الى زيادة في تركيز الهرمون محفز الجريب مما ادى الى زيادة عدد المستقبلات السطحية لأغشية الخلايا النخامية والذي انعكس بدوره في زيادة الكفاءة التكاثرية. إذ ان لهرمون النمو دور مهم في العملية التكاثرية، إذ أنه يؤثر في تطور الجريبات المبيضية ووظيفتها من خلال دورانه في الدم او محتمل من خلال التأثير الموقعي عن طريق العامل شبيه الأنسولين-1 في المبيض او بصورة مباشرة حيث ان لهرمون النمو مستقبلات تتوسط تأثير هرمون النمو في المبيض ، وهي احد اعضاء عائلة Cytokine/hemopoietin receptors superfamily تتألف من سلسلة مفردة من الببتيد المتعدد تحتوي على وحدات خارج خلوية، غشاء ناقل وحقول داخل الخلايا.

أن ارتباط هرمون النمو يؤدي الى تكوين دايميرات مع المستقبلات وتنشيطها من خلال Phosphorylation of Janus kinase (JAK-2)، التفاعل اللاحق يكون مع Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)، حيث ان المستقبلات تنشط بواسطة جزيئات الإشارة وهذه بدورها تنشط وظيفة Kinase of Jak ، بروتين STAT يرتبط بالمستقبلات المفسرة ثم تنتقل الإشارة الى النواة لترتبط بالحامض النووي الريبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) ومعرز الترجمة للجينات المستجيبة لـ Promotes transcription of STAT ومن ثم استجابة الخلية (Herrington and Carter-Su, 2001) .

قد يرجع السبب في زيادة مستقبلات هرمون النمو في انسجة المبيض الى فعالية المبيض والنااتجة من تنشيط خلايا الغدة النخامية المنتجة للكوندوتروبيينات ، إذ اثبتت الدراسات ان محرضات القند متأثرة

بمصير ووظيفة خلايا المبيض خلال فعاليتها المباشرة (Janssens *et al.*, 2000)، حيث من المؤكد أن الأنهيبيات والأكتفنيات تلعب دور مهما في السيطرة على افراز محرضات القند ، والأنهيبيين يعمل بشكل رئيسي على تخفيض افراز الهرمون محرض الجريب وكلا الهرمونين يعملان على التعبير الجيني لجين محرضات القند ويعملان في نفس الوقت على تخفيض مستوى التعبير الجيني لمستقبلات الهرمونات المحررة للكونادوتروبيينات (Thanoon, 2013) ، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية حيث اظهرت المعاملات الثانية والرابعة والتي حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهيبيين انخفاض معنويا في تركيز جين الهرمون محرض الجريب في النخام الغدي حيث يعمل الأنهيبيين على خفض مستويات التعبير الجيني للهرمون محفز الجريب في النخام الغدي من خلال تأثيره المثبط للتعبير الجيني لجين الهرمون محرض الجريب.

من جانب اخر يعمل الأكتفين من خلال تأثيره الموقعي الجوارى Paracrine او الذاتي Autocrine على تحسين التعبير الجيني للكونادوتروبيينات بوصفه مضاد وظيفيا للأنهيبيين وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، كما ان التمنيع السلبي ضد الأنهيبيين في الجرذان يزيد من مستوى التعبير الجيني للحامض النووي الرايبوزي المراسل لكل من جينات هرمون النمو النخامي والهرمونات المحررة لهرمون النمو من تحت المهاد (Thanoon, 2013)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث سجلت المعاملات الأولى والثالثة ارتفاعا معنويا في مستويات التعبير الجيني لهرمون النمو في النخام الغدي ، في حين سجلت المعاملتين الثانية والرابعة انخفاضا معنويا مقارنة مع السيطرة والمجموعتان الأولى والثانية في التجربة ، وقد وجد تعبير مستقبلات هرمون النمو في المبيض لعدة انواع مختلفة من ضمنها الجرذان (Zhao *et al.*, 2002)، حيث توجد في اغشية خلايا الطبقة الحبيبية للجريبات الأبتدائية الصغيرة والمتوسطة والجريبات الغارية كما وجدت في الجسم الأصفر كذلك يتركز الحامض النووي المراسل لمستقبلات هرمون النمو (GHR mRNA) في الخلايا الصفراء الكبيرة والتي تكون مسؤولة عن انتاج

تركيز عالي من البروجستيرون (Kolle *et al.*, 1998)، إضافة الى المبيض توجد مستقبلات هرمون النمو في 9-12 من الأنسجة المفحوصة ، كما وجدت بمستويات عالية من التعبير الجيني في الكبد Liver ، الكلية Kidney ، القلب Heart والعضلات Muscle وظيفتها تنظيم التطور في تلك الأنسجة (Le-Roith *et al.*, 2001).

هناك نوعان من المستقبلات التي تتوسط عمل العوامل شبيهة الأنسولين وتأثيراتها البايولوجية في الأنسجة الهدف وتكون هذه المستقبلات عالية الألفة للارتباط بـ العوامل شبيهة الأنسولين ، هذه المستقبلات هي IGF-1 and 2 Receptors (Wood *et al.*, 2005)، اشارت الدراسات ان استئصال الغدة النخامية لم يخفض المحتوى المبيضي من العامل شبيه الأنسولين-1 في الجرذان مما يدعو الى الاقتراح ان وجود (كما في الدراسة الحالية) أو عدم وجود (كما في الدراسة السابقة أعلاه) هرمون النمو ومحرضات القند فأن تعبير العامل شبيه الأنسولين-1 يكون موجودا في الجريبات المبيضية، حيث سجلت المعاملات الأولى والثانية والثالثة ارتفاعا معنويا في التعبير الجيني لجينات العامل شبيه الأنسولين-1 وكان هذا الارتفاع متزامنا مع ارتفاع التعبير الجيني لهرمون النمو والهرمون المحرض للجريب.

ان ارتفاع مستوى التعبير الجيني لجينات العامل شبيه الأنسولين-1 كان متزامنا مع الزيادة في مستوى التعبير الجيني له في النخام الغدي بينما سجلت المعاملة الرابعة انخفاضا معنويا في مستوى التعبير الجيني لجينات العامل شبيه الأنسولين-1 مقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى في التجربة، وقد تشير هذه النتائج الى زيادة افراز هرمون النمو من الفص الأمامي للغدة النخامية كما اثبتت الدراسات ان هرمون النمو ينشط استتساخ جين العامل شبيه الأنسولين-1 وينظم التغييرات في التركيب الكروماتيني خلال الجين وبالإضافة لهرمون النمو يعمل الأسترايول على تنشيط جين العامل شبيه الأنسولين-1 ، يعمل العامل شبيه الأنسولين-1 على تحفيز تخليق DNA في الخلايا الحبيبية للجريبات المبيضية وخلايا

القرب (Duleba *et al.*, 1997) بالإضافة الى دوره في تمايز وتكاثر الخلايا الحبيبية وخلايا القرب.ومن غير الواضح فيما اذا مستويات العامل شبيه الأنسولين-1 تتغير في مبايض الفئران الخالية من مستقبلات هرمون النمو (Bachelot *et al.*, 2002 ; Zakzek *et al.*, 2002)، وقد يعزى السبب الى دور التمنيع السلبي ضد الأنهيين حيث اشار AL-shwilly (2016) الى ارتفاع مستوى العامل شبيه الأنسولين-1 في اناث الجرذان نتيجة التمنيع السلبي ضد الأنهيين ، في حين يعمل الأنهيين على تثبيط تركيز العامل شبيه الأنسولين-1، ويمكن ان يكون سبب ارتفاع التعبير الجيني لـ العامل شبيه الأنسولين-1 هو ارتفاع مستوى محرضات القند في مصل الدم حيث توجد علاقة طردية بين جين العامل شبيه الأنسولين-1 ومحرضات القند وهذه النتيجة ربما تفسر الزيادة المستقلة في تركيز العامل شبيه الأنسولين-1 عن هرمون النمو .

اظهرت نتائج التجربة الحالية انخفاض مستوى التعبير الجيني للعامل شبيه الأنسولين-2 في انسجة المبايض للمعاملات الأولى والثانية والرابعة مقارنة مع السيطرة والمعاملة الثالثة التي حققت ارتفاعا معنويا، قد يعود السبب في ارتفاع مستوى التعبير الجيني لجين IGF-2 الى التأثير التحفيزي لهرمون محرض الجريب الذي يعمل على تنشيط بناء الحامض النووي المرسل للعامل شبيهة الأنسولين-2 في الخلايا الحبيبية للجريبات المبيضية (Voutilainen, 1998)، اظهرت نتائج الدراسة الحالي انخفاض مستوى التعبير الجيني للعامل شبيهة الأنسولين-2 في انسجة المبيض للمعاملات الأولى والثانية والرابعة وهي تتفق مع *Murphy et al.* (1987) الذين اشاروا الى انه لم يكتشف الحامض النووي المرسل للعامل شبيهة الأنسولين-2 في خصى الجرذان البالغة، كما ان الحامض النووي المرسل للعامل شبيه الأنسولين-1 يزداد بينما ينخفض الحامض النووي المرسل للعامل شبيه الأنسولين-2 بعد الولادة ولا يتبع مستوى التستوستيرون، اي ان هذه الدراسات تشير الى الدور الجيني للحامض النووي المرسل للعامل شبيه الأنسولين-2 وربما تنطبق هذه النتائج على المبايض.

أن مايعزز نتائج الدراسة الحالية ان التعبير الجيني لمستقبلات عاملي شبيه الأنسولين-1, و-2 قد تم الكشف عنهما في المبيض وقناة البيض والرحم في الأبقار (Ewellyn *et al.*, 2007; Sudo *et al.*, 2007; Fenwick *et al.*, 2008a,b) والأغنام (Taylor *et al.*, 2001; Hastie *et al.*, 2007). كما أشار (Liu *et al.*, 2000). كما أشار (Baumgarten *et al.*, 2004; Van Lier *et al.*, 2006) الى ان الهرمون محرض الجريب معزز قوي لتعبير جين العامل شبيه الأنسولين-2 في الخلايا الحبيبية لمبيض الأنسان، وأن هذا العامل ينشط مستقبلات العامل شبيه الأنسولين-1 و(AKT) Serine/threonine-Specific Protein Kinase التي يتطلبها الهرمون محرض الجريب لتحفيز جين أنزيم اروماتيز وتكاثر الطبقة الحبيبية، وهذا يؤكد العلاقة الايجابية بين الهرمون محرض الجريب و العامل شبيه الأنسولين-2 التي يتطلبها تكاثر وتمايز الخلايا الحبيبية.

3-5- التغيرات الشكلية والنسجية - الوظيفية

1-3-5- المبايض

اظهرت نتائج التحليل الأحصائي للدراسة الحالية ارتفاع معنوي في المعدل النسبي لوزن المبيض للمعاملة الثالثة والتي حقنت بمضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويد في طور Metestrus مقارنة مع السيطرة والمجموعات الأولى والثانية والرابعة والتي سجلت انخفاضا معنويا بالمقارنة مع السيطرة ولكن لم تظهر فروقات معنوية فيما بينها، وقد يعزى السبب في زيادة اوزان المبايض الى دور التمنيع السلبي ضد الأنهبين الذي ادى الى زيادة مستوى الهرمون محفز الجريب النخامي والذي أدى بدوره الى تحفيز نمو الجريبات المبيضة ووصول العديد منها الى مرحلة الجريبات الناضجة والمسؤولة عن افراز هرمون الأستروجين، من المعروف ان للأستروجين دور مهم في بناء البروتينات والدهون (Murphy, 1997) علاوة على دوره في عملية نضج المبيض وقدرته على تكوين الجريبات وزيادة مستوى انواع معينة من البروتينات مثل الكلوبيلين الرابط للهرمونات الجنسية.

كما ان ارتفاع مستوى هرمون النمو والعوامل شبيهة الأنسولين في دراستنا الحالية قد يكون السبب في زيادة اوزان المبايض، حيث ان العوامل شبيهة الأنسولين تشارك في نمو الجريبات من خلال تحفيز التخليق الحيوي لـ DNA في الخلايا الحبيبية وخلايا الجريبات (Bley *et al.*, 1992; Duleba *et al.*, 1997)، بالإضافة الى دورها في تكاثر وتمايز الخلايا الحبيبية وخلايا القراب، إذ يلعب العامل شبيهة الأنسولين-1 دورا مهما في ادامة الخلايا الحبيبية من خلال تثبيط الموت الخلوي المبرمج (Hsueh *et al.*, 1994) وهذا يؤكد مشاركة العامل شبيهة الأنسولين-1 في نمو ووظيفة معظم أعضاء الجسم (Daughady and Rotwein, 1989; LeRoith *et al.*, 1991)، كما ان الأكتفين النخامي قد يؤدي دور غير مباشر من خلال تأثيره على افراز الهرمون محرض الجريب من خلال ميكانيكية الأفرز الجوارى عبر الغدة النخامية، فضلا عن التأثيرات المباشرة للأنتهيين والأكتفين المبيضي التي تؤدي تأثيرات موقعية على نشأة الجريبات المبيضية (Findlay *et al.*, 2001).

كما اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ان المجموعة الثالثة اظهرت ارتفاعا معنويا في اعداد الجريبات الأبتدائية وجريبات كراف بالمقارنة مع السيطرة التي كان معدلها اعلى معنويا من مجموعات الدراسة الثلاث الأخرى، في حين لم تظهر فروقات معنوية بين اعداد الجريبات الأبتدائية للمجموعتين الأولى والثانية، بينما سجلت المجموعة الرابعة انخفاضا معنويا بين المجاميع، اما اعداد الجريبات الثانوية، فقد كانت متقاربة احصائيا بين السيطرة والثانية والثالثة الا انها كانت اعلى معنويا من المجموعة الأولى التي بدورها اعلى معنويا من المجموعة الرابعة. أن سبب زيادة اعداد الجريبات الأولية والناضجة يعود الى دور التمنيع السلبي ضد الأنتهيين الذي يزيد تركيز الهرمون محرض الجريب، اذ ان الهرمون محرض الجريب يؤدي الى تحفيز موجة تطور الجريبات والتي تتسبب في انتاج أعداد كثيرة من الجريبات الناضجة فضلا عن انتاج كمية كبيرة من الأسترايول الذي يحث الأرتفاع المفاجيء للهرمون

اللوتيني (LH) عن طريق التغذية الراجعة السلبية لمحور تحت المهاد- النخامية مما يؤدي الى استحثاث فرط الإباضة ، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية.

ان تحفيز تطور الجريبات عن طريق التمنيع السلبي ضد الانهيين يترافق معه تحسن افراز الأسترايول (AL-Sa'aidi *et al.*, 2016)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية. اشارت الدراسات الى ان ارتفاع الأسترايول قبل الإباضة يثبط افراز الهرمون محرض الجريب على مستوى النخامية، فقد اشارت Thanoon (2013) الى ارتفاع مستوى الأسترايول بعد حقن مضادات الأنهيين في اناث الجرذان البالغة ، كما اشارت دراسات سابقة الى ان هناك معلومات قليلة عن مسار عمل هرمونات النمو في المبيض ، في حين اشار Zhou *et al.* (1991) الى وجود تعبير مستقبلات النمو في المبيض لأنواع مختلفة ومنها الجرذان، وهذا ماتوصلنا اليه في الدراسة الحالية ، حيث يتركز تعبير مستقبلات هرمون النمو في اغشية الخلايا الحبيبية للجريبات الأبتدائية والجريبات الغارية الصغيرة الحجم وربما هذا يفسر ارتفاع اعداد الجريبات الأبتدائية في المعاملة الثالثة في الدراسة الحالية ، كما اشارت الدراسات الى وجود مستقبلات هرمون النمو في اغشية خلايا الجسم الأصفر والفعالية المناعية تركزت في الخلايا كبيرة الحجم وهي المسؤولة عن افراز الستيرويدات، كما ان لهرمون النمو دور كبير في تحرير محرضات القند عن طريق زيادة تكاثر الخلايا وتثبيط الرتق كما يزيد من خصوبة خلية البيضة ويحسن النضج النووي والسايوتوبلازمي ويسهل الإباضة اي ان لهرمون النمو تأثير كبير على الخصوبة ، في حين العامل شبيهة الأنسولين-1 يشترك في بعض الفعاليات التكاثرية وليس جميعها (Miyazono *et al.*, 2010).

اشارت الدراسات الى ان الهرمون محرض الجريب هو عامل قوي في تعديل افراز العامل شبيه الأنسولين-1 في مزرعة للجريبات قبل الغارية خارج الجسم ، حيث ان وجود العامل شبيه الأنسولين-1 ومستقبلاته في خلية البيضة والخلايا الحبيبية في الجريبات قبل الغارية للأغنام تدعم مساهمة العامل شبيهة الأنسولين-1 كعامل معدل لبقاء الجريبات المبكرة وتطورها من خلال تأثيره الموقعي (Zhao *et*

(*al.*, 2002) والذي يدعم الدور المهم للعامل شبيه الأنسولين-1 في الدراسة الحالية هو النسبة العالية للجريبات الطبيعية الناضجة والتي سجلتها المعاملة الثالثة ، وهذا بدوره يتفق مع العديد من الدراسات السابقة التي اثبتت دور العامل شبيه الأنسولين-1 في ادامة خلية البيضة وتطور الجريبات الغارية في الخنازير والأبقار (Zhou *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2006)، كما ان العوامل شبيهة الأنسولين لها دور مهم من خلال تأثيرها الجواني والذاتي في تطور الجريبات المبيضية وان العامل شبيه الأنسولين-1 يحفز انتاج الهرمونات الستيرويدية من خلال الطبقة الحبيبية للجريبات قبل الإباضة في إناث الجاموس (Singh *et al.*, 2015) ، إذ يرتبط الهرمون محرض الجريب بمستقبلاته ويحفز الأشارات داخل خلوية لتحفيز التعبير الجيني لمستقبلات العامل شبيهة الأنسولين-1 مما يؤدي الى تكوين المزيد من الجريبات الغارية وادامة الجريبات الطبيعية.

ان تأثير العامل شبيهة الأنسولين-1 على تكوين الغار يظهر بسبب فعاليته في تخليق الستيرويدات وشخصت هذه الفعالية في مزرعة الجريبات قبل الغارية في اليوم 6 و 10 و 12 من المعاملة مع العامل شبيهة الأنسولين-1 خارج الجسم (Demeestere *et al.*, 2004) وهذا يتفق مع الدراسة الحالية حيث سجلت المعاملة الثالثة ارتفاعا معنويا في مستوى هرمون النمو والأسترايديول وتركيز الهرمون محرض الجريب و العوامل شبيهة الأنسولين والذي ادى بدوره الى زيادة معنوية في اعداد الجريبات الأبتدائية والناضجة ، بينما سجلت المعاملة الرابعة انخفاضا معنويا في اعداد الجريبات بأنواعها الثلاثة الأبتدائية والثانوية والناضجة (كراف) وربما السبب في هذا الانخفاض يعزى الى دور الأنهيين في تثبيط النمو الجريبي للجريبات المبيضية مع اختفاء دور الأكتفين التحريضي لنمو الجريبات، حيث اثبتت الدراسات ان عدد وحجم الجريبات قبل الغارية يرتفع معنويا في المجموعة المعاملة بمضاد الأنهيين للفترات 5 و 10 و 15 يوم ، ربما هذه الجريبات تكون اكثر حساسية للهرمون محفز الجريبات او ربما بسبب ازدياد التعبير

الجيني للهرمون اللوتيني والهرمون محرض الجريب ومستقبلات العامل شبيهة الأنسولين-1 في المجموعة المعاملة.

ان التعبير الجيني لوحدة الأنهيين α تتأثر بفعالية الهرمون محرض الجريب كما يعمل الأنهيين على تحفيز الموت الخلوي المبرمج في الخلايا الحبيبية للجريبات المبيضية والجريبات الغارية المبكرة (Vital *et al.*, 2008; Dnkova *et al.*, 2004; Geng *et al.*, 2002) والذي يؤدي بدوره الى انخفاض اعداد الجريبات المبيضية وهذه النتائج تتفق مع الدراسة الحالية، كما تعتبر الأكتفنيات منظمات مهمة للعمليات التكاثرية وان لها وظائف متنوعة في انسجة متعددة ولها مدى واسع من الفعاليات تشمل تنظيم وظائف القند والأستتباب الهرموني والنمو والتمايز، كما يشترك في تنظيم تكاثر الخلايا الجنسية خلال المراحل التطورية وبالتالي تكوين الجريبات الأولية في مبايض الفئران (Bristol-Gould *et al.*, 2006) ، وهذه الفعالية البايولوجية تثبط بواسطة بروتينات متعددة منها الأنهيين والفولستاتين (Hashimoto *et al.*, 1997) ، لذلك يمكن ان يعزى السبب في ارتفاع اعداد الجريبات المبيضية في الدراسة الحالية الى ارتفاع مستوى التعبير الجيني للأكتفين في المعاملة الثالثة ، وهذا يتفق مع Khairy and Allam (2013) اللذان أشارا الى ان المعاملة بمضاد الأنهيين للفترات 5 و 15 يوم في مزرعة الجريبات قبل الغارية ادى الى ارتفاع التعبير الجيني للأكتفين في تلك الجريبات ، حيث يزيد الأكتفين من ارتباط الهرمون محرض الجريب والذي يحفز بدوره عملية الأرمته aromatization وهذا يساهم في تحسين فعالية LH في المبيض، وهذا يفسر انخفاض اعداد الجريبات في المعاملة الرابعة نتيجة الى الدور المثبط للأنهيين في نمو وتطور الجريبات المبيضية.

من جانب اخر حققت المعاملة الرابعة انخفاضا معنويا في معدل اقطار المبايض مقارنة مع السيطرة والمجموعات الأخرى في التجربة، وقد يعزى هذا الانخفاض في اقطار المبايض الى النمو المبيضي نتيجة لانخفاض اعداد الجريبات الأولية والثانوية والناضجة الذي تحقق في تلك المعاملة نتيجة

الدور المثبط للأنهيين ، بينما سجلت المعاملة الثالثة ارتفاعا معنويا في معدل اقطار المبايض مقارنة مع السيطرة المجموعات الأخرى، بينما سجلت المعاملتين الأولى والثانية انخفاضا معنويا مقارنة مع السيطرة ، قد يكون السبب هو ان قطر المبيض يعتمد على ما يحتويه من الجريبات المبيضية لذلك نلاحظ ان المعاملة الثالثة حققت ارتفاعا معنويا واضحا في معدل قطر المبيض.

نستنتج من نتائج الدراسة الحالية ان عملية تطور الجريبات المبيضية تتضمن احداث معقدة تشترك فيها العوامل داخل المبيض ومحرضات القند النخامية وتخليق الهرمونات الستيرويدية، بالإضافة الى ذلك ان ارتفاع الأدوار المتخصصة لعوامل النمو الموقعية التأثير خلال نشأة الجريبات المبيضية يزودنا بمفتاح للأدوات التي تساعدنا في التعرف على مسار الجزيئات التي تشترك في نمو وتطور الجريبات المبيضية .

5-3-2 - الأرحام

أن الارتفاع المعنوي في معدل اوزان الأرحام لأناث المعاملة الثالثة مقارنة مع السيطرة والمجموعات الأخرى في التجربة يعود الى التمتع السلبي ضد الأنهيين الذي تسبب بزيادة تركيز الهرمون محفز الجريب والأسترايديول معنويا، إذ توصل Al-Shwilly (2016) في نتائجه الى أن زيادة مستوى الهرمون محفز الجريب في مصل الدم، جراء التمتع الميسر ضد الانهيين، رافقتها زيادة نمو وتطور الجريبات المبيضية والتي تكون مسؤولة عن انتاج كمية كبيرة من الأسترايديول، الذي يكون هو الآخر مسؤولا عن الارتفاع الحاد للهرمون المصفر عن طريق التغذية الراجعة الايجابية للغدة النخامية والذي ينتج عنه فرط الأباضة. وكما هو معروف ان للأسترايديول دورا اساسيا في استحثاث نضج وتطور البطانة الرحمية وزيادة جريان الدم الشرياني اليها (Kenny and Woodruff, 2005) وهذا مايؤيد نتائج الدراسة الحالية حيث حققت المعاملة الأولى والثالثة ارتفاعا معنويا في مستوى الأسترايديول في المصل.

أشارت صور المقاطع النسجية الى زيادة في سمك البطانة الرحمية ونمو الطبقة الظهارية الفارزة مع زيادة في اعداد الغدد الرحمية وتطورها، فقد حددت أماكن تواجد مستقبلات الأستروجين الفا وبيتا في

خلايا البطانة الرحمية Endometrium للخنازير، وتتركز تلك المستقبلات في انوية الخلايا (Cous *et al.*, 1999)، فقد اثبتت الدراسات ان المعاملة بالأسترايول في مزرعة البطانة الرحمية المأخوذة من رحم الفئران غير الناضجة يزيد من التعبير الجيني للعامل شبيهة الأنسولين-1 في خلايا البطانة الرحمية.

يتلخص عمل الأستروجين في تهيئة بطانة الرحم لأنبات البويضات المخصبة وادامة الأجنة وتطورها حتى تتكون الأغشية الجنينية والمشيمة التي تقوم بدورها بأفراز الأستروجين والبروجستيرون. تنظم العوامل شبيهة الأنسولين في الرحم بواسطة الأستروجين المفرز من الأجنة المنغرسه مما دعى الى الاعتقاد بان العوامل شبيهة الأنسولين قد تلعب دورا في الغرس (Ko *et al.*, 1994)، من جانب آخر، اشارت الدراسات الى وجود فعالية للأكتفين في انسجة الرحم خلال الدورة التكاثرية، حيث شخصت الدراسات النسجية المناعية في الطور الأفرزي المتأخر التعبير الجيني للأكتفين في خلايا الغدد الرحمية والطبقة الطلائية للبطانة الرحمية (Leung *et al.*, 1998)، إذ يعمل الأكتفين على زيادة أعداد مستقبلات الأستروجين ويحسن فعاليته وبالمقابل ارتفاع مستوى الأستروجين يكبح تعبير الأكتفين وربما يعيد مستوى مستقبلات الأستروجين الى مستواها الطبيعي عن طريق التغذية الراجعة (Kipp *et al.*, 2007) علاوة على فعالية الأكتفين في تنظيم فعالية تكاثر الخلايا في الطبقة الطلائية للبطانة الرحمية ، فقد شخصت مستقبلات الأكتفين في خلايا البطانة الوعائية خلال الطبقة العضلية بينما كانت اقل تركيزا في الطبقة العضلية للرحم في الإنسان (Schneider- Kolsky *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2003)، فقد اشار Ciarmela *et al.* (2008) الى ان وجود جينات مستقبلات الأكتفين في الطبقة العضلية للرحم يحور حساسية الطبقة العضلية لعوامل التقلص، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية حيث لم تسجل المعاملات فروقا معنوية فيما بينها في سمك الطبقة العضلية.

اشارت النتائج الى ان التمنيع ضد الأنهبين يرفع مستوى العامل شبيهة الأنسولين-1 في المصل وهذه الزيادة ممكن ان تكون نتيجة زيادة انتاج العامل شبيهة الأنسولين-1 في المناسل والأنسجة خارج

المناسل كما ان ارتفاع مستوى هرمون النمو من النخام الغدي ينشط استتساخ العامل شبيهة الأنسولين-1، وكما هو متفق عليه ان العوامل شبيهة الأنسولين له دور مهم في تكاثر الخلايا وتثبيط الموت الخلوي المبرمج في الأنسجة ، كما اثبتت الدراسات ان محفزات الأباضة تعمل على زيادة سمك البطانة الرحمية وزيادة اعداد الغدد الرحمية (Sylvia et al., 2000)، وهذا ماتحقق في الدراسة الحالية والذي يعكس دور التمنيع ضد الأنهيين وما نتج عنه من زيادة في مستوى الهرمونات المحفزة لنمو وتطور الجريبات المبيضية والتي انعكس دورها على الرحم.

5-4- الخصوية

اشارت نتائج الدراسة الحالية ان المعاملة الثالثة سجلت ارتفاعا معنويا واضحا في اعداد الأجنة كما حققت زيادة واضحة في نموها وتطورها بالمقارنة مع السيطرة والمعاملات الأخرى في التجربة، من جانب اخر حققت المعاملة الرابعة انخفاضا معنويا واضحا في اعداد الأجنة وتردي نموها وتطورها مقارنة مع المعاملات الأخرى، إذ ان التمنيع السلبي ضد الأنهيين في طور Metestrus حسن افراز الهرمون محفز الجريب ونمو الجريبات المبيضية وبالنتيجة إزدادت أعداد الجريبات الناضجة مع زيادة نسبة الأباضة، وبالتالي فإن هذه الدراسة والدراسات الأخرى التي اختصت بالتمنيع ضد الأنهيين لزيادة نسبة الأباضة والخصوية فتحت آفاقا جديدة لاستبدال استخدام محرضات القند الخارجية Exogenous gonadotropins لتحسين الخصوية، فقد استنتجت الدراسة الحالية أن التغيرات الهرمونية الحالية واعداد الأجنة العالية تشير الى الكفاءة العالية للتمنيع ضد الأنهيين ألفا في استحداث فرط الاباضة لاناث الجرذان، هذه الفعالية القوية ربما تقودنا الى تطوير استراتيجية جديدة تساعد في دعم العملية التكاثرية وادائها المستقبلي، لذلك قد يلعب التمنيع السلبي ضد الأنهيين دورا قويا في تطبيقات التكاثر الحيوانية، وهو من الأهداف المستقبلية الأساسية في هذا الجانب، يعتبر الأنهيين هرمون منظم اساسي ذو فعالية

وظيفية قوية لتنشيط افراز الهرمون محفز الجريب من الفص الأمامي للغدة النخامية بهدف تنظيم مستوى هذا الهرمون في مختلف اللبائن (Bhardwaj *et al.*, 2000).

اشارت دراسات سابقة الى وجود علاقة سلبية بين تركيز الهرمون محفز الجريب في مصل الدم والأنهبين (Araki *et al.*, 2000) ، وان تعدد الأباضة تستحث بنجاح في حالة التمنيع السلبي ضد الأنهبين الداخلي في اناث الجرذان (AL-Sa'adi and Samir, 2010) وهناك دراسات عديدة أشارت الى حدوث فرط الأباضة في حالة التمنيع السلبي ضد الأنهبين وتكون خلية البيضة قادرة على التطور الطبيعي (Takedomi *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001)، إن انخفاض تركيز الأنهبين يترافق مع زيادة تركيز الأكتفين والهرمون محفز الجريب في مصل الدم (Abdulla , 2013; Al-Sa'aidi *et al.*, 2013)، لذلك يستطيع الأكتفين A ان يعمل على خلايا النخام الغدي المنتجة لمحرضات القند لأفراز المزيد من الهرمون محفز الجريب، حيث ان الأكتفين والأنهبين اعضاء متضادة وظيفيا في عائلة عوامل النمو الناقلة لجزيئات الإشارة خارج الخلية، كما ان ازدياد تركيز الهرمون محفز الجريب سيزيد تركيز الأسترايول وهو ربما السبب الرئيسي لأثبات الكفاءة التكاثرية (Miyazono *et al.*, 2010).

من نتائج الدراسة الحالية، ازداد تركيز الأسترايول معنويا في المجموعة الممنعة ضد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات عند حقنه في طور Metestrus وترافقت هذه الزيادة مع زيادة واضحة في عدد الجريبات النامية ونشأة الجريبات وجريبات كراف والعدد الكلي للجريبات والتي جاءت متوافقة مع دراسة أخرى استخدم فيها التمنيع ضد الانهبين المصنع (AL-Sa'aidi and Samir, 2010)، إذ يؤدي هذا التمنيع الى زيادة التخليق الحيوي للأستروجين من الجريبات المبيضية وهذا يؤكد دور ارتفاع مستوى الهرمون محفز الجريب في تحفيز موجة تطور الجريبات ونتج عن ذلك انتاج كمية كبيرة من

الأسترايول وهذا يحث ارتفاع مستوى الهرمون المصفر عن طريق التغذية الراجعة الموجبة لمحور تحت المهاد - النخامية مما يؤدي الى حث فرط الأباضة.

اشارت دراسات سابقة الى ان تركيز الهرمون محفز الجريب سينخفض مباشرة بالتزامن مع انخفاض عدد الجريبات النامية لذلك افراز الأنهيين من الجريبات النامية الى الدورة الدموية يرتفع بالأرتباط مع انخفاض افراز الهرمون محفز الجريب والذي يؤدي بدوره الى الرتق (Medan, 2007)، وربما هذه النتيجة تفسر انخفاض عدد الأجنة وتردي نموها في المجموعة الرابعة ، وقد اثبتت نتائج مختلف التجارب مشاركة الأنهيين في العملية التكاثرية للأنات كمنظم لأفراز الهرمون محفز الجريب خلال نمو الجريبات الرئيسية في الطور الأصفر المبكر حيث اثبتت النتائج زيادة افراز الهرمون محفز الجريب بعد معادلة الأنهيين الداخلي خلال الطور الأصفر المبكر وهذا يتزامن مع تحفيز نمو وتطور الجريبات المبيضية وهذه النتائج اثبتت الدور المؤثر للأنهيين كمنظم لأفراز الهرمون محفز الجريب عن طريق التغذية الراجعة السلبية خلال الطور الأصفر المبكر وهذا يتوافق مع افراز عالي للأسترايول (Hillier, 1991)، كما اشار AL-Shwilly (2016) الى ان مستوى الأسترايول يرتفع بعد 12 و 24 و 36 ساعة من التمنيع ضد الأنهيين في اناث الجرذان ، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، حيث اشارت الدراسات الى ان التمنيع ضد الأنهيين في الجرذان عامل مهم يستطيع ان يحث زيادة نضج الجريبات والتي ينتج عنها زيادة في عدد الأجنة (Li et al., 2008).

بينت الدراسات الى ان انخفاض هرمون النمو في اناث الفئران مسؤول عن انخفاض عدد الأجنة مع انخفاض عدد الجريبات الغارية وزيادة نسبة الجريبات الرتقية الى الصحية بينما تبدو عمليات الغرس اعتيادية، كما وجدت تلك الدراسات ان المعاملة مع العامل شبيه الأنسولين-1 في الفئران لايعوض انخفاض نسبة هرمون النمو ، كما ان الجريبات الفاقدة للعامل شبيه الأنسولين-1 توقف تطورها عند مرحلة الجريبات قبل الغارية وتفشل في الأستجابة للمعاملة بمحضرات القند لأستحثات الأباضة، هذه

النتائج دعمت بواسطة دراسات تشير الى ان المعاملة بمحرضات القند ليس لها تأثير على مستوى التعبير الجيني للحامض النووي المراسل للعامل شبيه الأنسولين-1 في مبيض الفئران مستأصلة النخامية، كما تقترح الدراسات ان العامل شبيهة الأنسولين-1 المبيضي لا يخضع بشكل صارم لسيطرة هرمون النمو بل هناك عوامل موقعية مثل α -Growth differentiation factor ربما تملك دور في خلل في نمو خلية البويضات وليس في محيط الرحم اي ان لخلية البويضات في المجموعات المعاملة بمضاد الأنهيين كفاءة تطويرية نسجية (Ishigame , 2004). بينما اشارت دراسات أخرى الى ان هرمون النمو ربما يسهل الإباضة من خلال زيادة الحساسية للكوندوتروبيينات ومن خلال الحد من الموت الخلوي المبرمج في الجريبات المبيضية قبل الإباضة، كما ان الانتاج العالي لهرمون النمو من الفص الأمامي للغدة النخامية يكون مرتبط مع زيادة عدد البويضات الجاهزة خلال كل عملية اباضة (Danilorich *et al.*, 2000).

من المعروف ان محرضات القند هي المنظم الرئيسي لوظيفة المناسل، الا ان هرمون النمو يشترك بشكل مباشر مع الهرمون محفز الجريب في تطور الجريبات ونضج البويضات خارج وداخل الجسم (Hull and Harvey, 2001; Kaise *et al.*, 2001; Bevers and Izadyar, 2002)، فقد تمت الاشارة الى أن هرمون النمو موجود في السائل الجريبي لمبايض الأبقار (Borromeo *et al.*, 1996; 1998) والنساء (Mendoza *et al.*, 1999)، حيث ان الكفاءة التطورية للبويضات تتأثر بشكل مباشر بمكونات السائل الجريبي (Nicholas *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2006).

اشار Stubbs *et al.* (2013) الى ان مستقبلات الحامض النووي المراسل للعامل شبيه الأنسولين-1 تعبر في الجريبات قبل الغاية في جميع مراحل التطور ، كما ان العامل شبيه الأنسولين-1 يحفز بدء النمو الجريبي في الأنسجة الطبيعية ، وتعتبر الجريبات المبيضية المصدر الرئيسي للعامل شبيه الأنسولين-1 خلال طور الشبق في الخيول ، كما يعد العامل شبيه الأنسولين-1 العامل الحاسم في تمايز ونضج الجريبات وله دور مهم بالتأزر مع هرمونات اخرى في اختيار وتمايز الجريبة الناضجة

المشرفة على الأباضة (Derar *et al.*, 2012) ، إذ ان العامل شبيه الأنسولين-1 له قابلية على تقليل الموت الخلوي المبرمج ، حيث يعمل على ادامة انتشار وتكاثر الخلايا في اللبائن وله فعالية توليد الأقسام الخيطي لذلك يعتبر Anti-apoptotic من خلال حماية المزارع من مختلف محفزات الموت (Piroozmand *et al.*, 2013).

من خلال دراسة اجراها Ishigame *et al.* (2004) على تأثيرات التمنيع السلبي للأنهيين الداخلي على نسبة الأباضة والتطور الجنيني داخل وخارج الجسم كطريقة جديدة لفرط الأباضة في اناث الجرذان البالغة بالمقارنة مع الطرق الهرمونية باستخدام الهرمون محرض القند الخيلي والهرمون محرض القند البشري، وجدوا ان اعداد الأجنة الطبيعية في المجموعة المعاملة بمضاد الأنهيين مرتفع معنوياً مقارنةً مع السيطرة والمجموعة المعاملة بالهرمونات كما ان عدد مواقع الغرس Implantation في اليوم الخامس من الحمل في المجموعة المعاملة بمضاد الأنهيين قد ارتفع معنوياً مقارنةً مع المجاميع الأخرى ، كما وجدوا ان هناك تطور ملحوظ لكيس البلاستولا Blastocyst خارج الجسم في المجموعة المعاملة بمضاد الأنهيين مقارنة مع المجاميع الأخرى ، هذه النتائج أكدت على ان معادلة الأنهيين الداخلي هي بديل عملي جديد لحث فرط الأباضة في اناث الجرذان البالغة ، وقد اجريت تجارب مماثلة على الفئران خارج الجسم من قبل Takeo and Nakagata (2015) ، والماعر (Cedden *et al.*, 2007) ، وربما هذه النتائج تفسر انخفاض عدد الأجنة وتردي نموها في المجموعة الرابعة والذي يرجع الى دور الأنهيين المثبط لنمو خلية البيضة وتطور الجريبات المبيضية ، وقد يعزى سبب المحافظة على أعداد الأجنة وتطور نموها في مجموعة السيطرة مقارنة بالمجموعة الأولى الى ان بطانة الرحم تكون طبيعية وملائمة لتطور الأجنة ،اضافة الى النمو الطبيعي لخلية البيضة وتطور الجريبات المبيضية.

6- الأستنتاجات والتوصيات

Conclusions نستنتج من

6-1- الأستنتاجات

الدراسة الحالية :-

- 1- التمنيع الميسر ضد الأنهبين والأكتفين الداخلي في نهاية طور Metestrus في اناث الجرذان الناضجة يزيد من نمو وتطو المبيض والرحم ومن ثم الكفاءة التناسلية.
- 2- التمنيع الميسر ضد الأنهبين والأكتفين الداخلي في طور Proestrus في اناث الجرذان الناضجة لم يحدث فرقا معنويا في نمو وتطور المبيض والرحم.
- 3- التمنيع الميسر ضد الأكتفين في طور Metestrus يسبب انخفاض في نمو وتطور المبيض والرحم وبالتالي تردي الكفاءة التناسلية.
- 4- التمنيع الميسر ضد الأنهبين ربما يكون له دور قوي في التطبيقات التكاثرية الحيوانية.

Recommendations

6-2- التوصيات

- 1- دراسة التغيرات الهرمونية والنسجية الوظيفية للمبايض والأرحام في كل طور من أطوار دورة الشبق من تأثير استخدام مضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات في اناث الجرذان الناضجة.
- 2- دراسة تأثير مضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والسائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهبين معا على تطور المبيض والرحم في اناث الجرذان قبل البلوغ.
- 3- دراسة تأثير مضاد السائل الجريبي منزوع الستيرويدات والسائل الجريبي منزوع الستيرويدات والأنهبين معا على الكفاءة التناسلية لذكور الجرذان البالغة.
- 4- دراسة امكانية تطبيق التمنيع السلبي ضد الأنهبين لأستحثات فرط الأباضة في الأنسان والحيوانات الحقلية.

References

- Abdulla**, WS, (2013). Sequential postnatal evaluation of pituitary, gonadal and extragonadal GnRH-r, IGF-1, and IGF-2 genes in inhibin-passive immunized female rats. *M.Sc. thesis, College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq.*
- Adamo**, M; Lowe WL; LeRoith, D; and Roberts, CT. (1989). Insulin like growth factor-1 messenger ribonucleic acids with alternative 5-untranslated regions are differentially expressed during development of the rat. *J. Endocrinol.*, 124: 2737-2744.
- Adamson**, AD; Friedrichsen, S; Semprini, S; Harper, CV; Mullins, JJ; White, MR; and Davis, JR. (2008). Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor-alpha signaling. *Endocrinol.*, 149: 687–694 .
- Adashi**, EY; Resnick, CE; Ercole, JD; Svoboda, ME; Van-Wyk, JJ. (1985). Insulin-like growth factor as intraovarian regulators of granulosa cells. *Endocr. Rev.*, 6(3): 400-420.
- Advis**, JP; White, SS; and Ojeda, SR. (1981). Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat. *Endocrinol*, 108(4): 1343-1352.
- Aguilar**, J; Woods, G; Miragaya, M; Olsen, L; and Vanderwall, D. (2001). Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. *J. Theriogenology*. 56: 745-748.
- Ahmed** Ebbiary, NA; Lenton, EA; and Cook, ID. (1994). Hypothalamic-pituitary aging: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women. *J. Clin. Endocrinol.*, 41: 199–206.
- Ahumada-Solórzano**, SM; Carranza ME; Pedernera, E; Rodríguez-Méndez, AJ; Luna, M; and Arámburo, C. (2012). Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken C. ovary: Effects of GH on steroid genesis in cultured follicular granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol*, 175(2): 297-310.
- Akagi**, S; Kaneko, H; Nakanishi, Y; Takedomi, T; Watanabe, G; and Taya, K. (1997). Ovarian response and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum. *J. Vet. Med. Sci.*, 59: 1129–1135.

Akagi, S; Shi, F; Kaneko, H; Watanabe, G; Tsonis, CG; and Taya, K. (2002). Ovarian response and hormonal profiles in heifers after immunization and re-immunization against inhibin α -subunit. *J. Reprod and Dev.*, 48: 599–605.

Alak, BM; Coskun, S; Friedman, CI; Kennard, EA; Kim, MH; Seifer, DB. (1998). Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertil. Steril.*, 70: 1126 - 1130.

Albuz, FK; Sasseville, M; Lane, M; Armstrong, DT; and Gilchrist, RB. (2010) .Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *J. Hum. Reprod.*, 73: 1- 13.

Algriany, O; Bevers, M; Schoevers, E; and Dieleman, S. (2004). Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complex. *J. Theriogen.*, 62: 1483-1497.

Al-Hassan, MJ; and Moussa, IA. (1998). Immunization of rats against inhibin using bovine follicular fluid. *J. King Saud Univ, Agric. Sci.*, 2: 109-119.

Ali, AB; Qin, GS; Guo, R; and Tsigkou, A. (2015). Endocrine and ovarian responses in water buffalo cows immunized against inhibin and subjected to the Ovsynch protocol. *J. Integrative Agriculture*, 15(6): 1827-1837.

Al-Obaidi, SAR; Bindon, BM; Hillard, MA; O'Shea, T. (1987). Reproductive characteristics of lambs actively immunized early in life with inhibin-enriched preparations from follicular fluid of cows. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 403-414.

Al-Sa'aidi, JAA; AL-Okaily, BN; AL-Shwilly, HAJ. (2016). Uterine implantations and litter size alternation in anti- inhibin and eCG-hCG treated virgin pregnant female rats. *O.I.I.R.J.*, VI(I): 36-46.

Al-Sa'aidi, JAA; Mohammed, BI; and Al-Greer, MAR. (2013). Role of neonatal inhibin- α immunoneutralization on pituitary and gonadal physiology during pre- and post-pubertal stages of male rat life. *Kufa Med. J.*, 16(2): 88-96.

Al-Saaidi, JAA; Samir, MS. (2010). Effect of passive immunization against inhibin alpha subunit on ovarian growth and development in immature female Wister rats. *14th Scientific Congress of Fac. Med., Assiut Univ., Egypt.*

AL-Shwilly, HAJ. (2016). Effect of passive immunoneutralization against endogenous inhibin on reproductive fecundity in virgin female rats and its application in iraqi awassi ewe lambs. *PhD thesis*, Collage of veterinary medicine, University of Baghdad, Iraq.

Amsterdam, A; Riesel, R; Mintz, Y; Shemesh, M and Salmon, Y. (1979). Inhibition of gonadotropin sensitive adenylate cyclase by ovarian follicular fluid. *Biochem. Biophy. Res. Commun.*, 87: 505- 512.

Andersen, CY; and Byskov, A. (2006). Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone inhibin-A and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 4064–4069.

Anderson, RA; Groome, NP; and Baird, DT. (1998). Inhibin A and inhibin B in women with polycystic ovarian syndrome during treatment with FSH to induce monoovulation. *Clin. Endocrinol.*, 48: 577-584.

Anderson, SB; Oldberg, AL; and Whitman, M. (2008). Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 283: 7027-7035.

Antenos, M; Stemler, M; Boime, I; and Woodruff, TK. (2007). N-linkedoligosaccharides direct the differential assembly and secretion of inhibin alpha- and beta A-subunit dimers. *Mol. Endocrinol.*, 21: 1670–1684.

Araki, KK; Arai, KY; Watanabe, G; and Taya, K, (2000). Involvement of inhibinin the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the young adult male Shiba goat. *J Androl.*, 21: 558-565.

Armstrong, DG; and Webb, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intra ovarian growth factors and novel proteins *.J. Rev.Reprod.*, 2: 139-146.

August, GP. (1990). Growth and development in the normal infant and child. In: Backer KL, ed. Principles and practice of endocrinology and metabolism. *Philadelphia, J.B. Lippincott*, pp: 72-80.

Bachelot, A; Monget, P; Imbert-Bollere, P; Coshigano, K; Kopchick, JJ; Kelly, PA; and Binart, N. (2002). Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinol.* 143: 4104–4112.

Baird, DT; Campbell, BK; and McNeilly, AS. (1990). Ovine follicular fluid suppresses the ovarian secretion of androgens, estradiol and inhibin. *J. Endocrinol.*, 127: 23-32.

Bakke, M; Zhao, L; Hanley, NA; Parker, KL. (2001). SF-1 a critical mediator of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*. 171: 5–7.

Baqir, SM. (2011). Effect of passive immunization against inhibin alpha subunit and non steroid bovine follicular fluid on mammary gland growth and development in primiparous female Wister rats. *M.Sc. thesis*, College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq.

Baumgarten, SC; Convissar, SM; Zamah, AM; Fierro, MA; and Stocco, C. (2015). FSH regulates IGF-2 expression in human granulosa cells in an AKT-dependent manner. *J. Clin. Endocrin. and Metabol.*, 100(8): 1504.

Berger, P; Untergasser, G; Hermann, M; Hittmair, A; Madersbacher, S and Dirnhofer, S. (1999). The testis-specific expression pattern of the Growth Hormone/Placental Lactogen (GH/PL) gene cluster changes with malignancy. *Hum Pathol.*, 30(109): 1201-1206.

Bevers, M; and Izadyar, F. (2002). Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *J. Mol. Cell. Endocrino.*, 197: 173-178.

Bhardwaj, AV; Nayan, P; Parvati; Mamta; Gupta, AK. (2012). Inhibin: A role for fecundity augmentation in farm animal. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 7: 771-789.

Bleach, EC; Glencross, RG; Feist, SA; Groome, NP; and Knight, PG. (2001). Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins and steroids during estrus cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *J. Biol. Reprod.* 64: 743-752.

Bley, MA; Simon, JC; Estevez, AG; de Asua, LJ; and Baranao, JL. (1992). Effect of follicle stimulating hormone on insulin-like growth factor- I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinol.* 131: 1223–1229.

- Bonilla**, AQS; Oliveira, LJ; Ozawa, M; Newsom, EM; Lucy, MC; and Hansen, PJ. (2011). Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 332: 170-179.
- Borromeo**, V; Bramani, S; Berrini, A; Sironi, G; Finazzi, M and Cremonesi, F. (1996). Growth hormone but not prolactin concentrations in the fluid of bovine ovarian cysts are related to the cystic stage of luteinization. *J. Theriogenol.*, 46: 481-490.
- Brevini**, TA; Vassena, R; Francisci, C; Gandolfi, F. (2005). Role of adenosine triphosphate, active mitochondria and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *J. Biol. Reprod.*, 72: 1218-1223.
- Brickell**, JS; Bourne, N; Cheng, Z; and Wathes, DC. (2007). Influence of plasma IGF-1 concentrations and body weight at 6 months on age at first calving in dairy heifers on commercial farms. *Reprod. Domest. Anim., Suppl.*, 2(42): 118.
- Bristol-Gould**, S; Kreeger, P; Selkirk, C; Kilen, S; Cook, R; Kipp, J; Shea, LD; Mayo, KE; and Woodruff, TK. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developm. Biol.*, 298: 132–148.
- Brown**, AL; Graham, DE; Nissley, SP; Hill, DJ; Strain, AJ; and Rechler, MM. (1986). Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.*, 261: 13144-13150.
- Burdette**, JF; Jeruss, JS; Kurley, SJ; Lee, EJ; and Woodruff, TK. (2006). Activin: A mediated growth inhibition and cell cycle arrest through Smad in human breast cancer cells. *J. Cancer Res.*, 65: 7968- 7975.
- Burger**, HG; and Igarashi, M. (1988). "Inhibin: definition and nomenclature, including related substances". *Endocrinol.*, 122(4): 1701–2.
- Buyalos**, R. (1995). Insulin-like growth factors: clinical experience in ovarian function. *Am. J. Med.*, 98: 55S–66S.
- Cecim**, M; Kerr, J; and Bartke, A. (1995). Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on reproductive functions in female mice. *Biol. Reprod.*, 52: 1144–1148.

Cedden, F; Daskiran, I; Cetin, Y; Bingol, M; Demir, AO; Yilmaz, A; and Aygun, T. (2007) Immunizing norduz goat against inhibin. *Biotechnology in Animal Husbandry. Belgrade-Zemun*, 23(5-6): 133-140.

Chang, MC. (1955). The maturation of rabbit oocytes in the culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J. Exp. Zool.*, 128: 379- 405.

Channing, CP. (1972). Comparison of number of gonadotropin receptors in granulosa cells harvested from small, medium and large pig follicles. *Biol. Reprod.*, 7: 127-131.

Chapman, SC; and Woodruff, TK. (2001). Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (InhBP). *Mol. Endocrinol.*, 15: 666-679.

Chellakooty, M; Schmidt, IM; Haavisto, AM; Boisen, KA; Damgaard, IN; Mau, C; Petersen, JH; Juul, A; Skakkebk, NE; Main, KM. (2003). Inhibin A, inhibinB, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin concentrations in 473 healthy infant girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(8): 3515-3520.

Chen, YG; Wang, Q; Lin, SL; Chang, CD; Chuang, J; and Ying, SY. (2006). Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.*, 231(5): 534-544.

Cheon, M; Park, D; Kim, K; Park, SD; and Ryu, K. (1999). Homologous up regulation of GnRH receptor mRNA by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. *Endocrinol.*, 11: 49–55.

Chong, H; Pangas, SA; Bernard, DJ; Wang, E; Gitch, J; Chen, W. et al. (2000). Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinol.*, 141: 2600-2607.

Ciarmela, P; Wiater, E; and Vale, W. (2008). Activin- A in myometrium: characterization of the actions on myometrial cells. *Endocrinol.*, 149 (5): 2506- 2516.

Clarke, IJ. (1989). The GNRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *J. Dom. Anim. Endocrinol.*, 6(1): 1-14.

- Colon, E;** Svechnikov, KV; Carlsson-Skwirut, C; Bang, P; and Soder, O. (2005). Stimulation of steroidogenesis in immature rat Leydig cell evoked by interleukin-1alpha is potentiated by growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinol.* 146: 221–230.
- Corrigan, M;** Bilezikjian, LM; and Carroll, BL. (1991). Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinol.*, 128, 1682-1686.
- Cossigny, DA;** Findlay, JK; and Drummond, AE. (2012). The effect of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Rprod.*, 143: 221-229.
- Counis, R;** Garrel, G; Laverriere, JN; Simon, V; Bleux, C; Magre, S; and Cohen-Tannoudji, J. (2009). The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 47: 581 587.
- Couse, JF;** and Korach, KS. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. *Endocr. Rev.*, 20: 358- 417.
- Crofton, PM;** Evans, AE; Groome, NP; Taylor, MR; Holland, CV; and Kelnar, CJ. (2002). Dimeric inhibins in girls from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and oestradiol. *Clin. Endocrinol.*, (Oxf) 56: 223–230.
- Cuiling, L;** Young, W; Chen, M; Liu, T; Yang, J; Tan, P; and Li, L. (2009). Inhibin-A inhibits follicle stimulating hormone (FSH) action by suppressing its receptor expression in cultured rat granulosa cell. *J. Mol. Cell. Endocrinol.*, 298: 48-56.
- Culler, MD;** and Negro-Vilar, A. (1988). Passive immunoneutralization of endogenous inhibin: sex-related differences in the role of inhibin during development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 58: 263-273.
- Cummins, LJ;** Shea, T; Bindon, B.M; Lee, VWK; Findlay, JK. (1983). Ovarian inhibin content and sensitivity to inhibin in Booroola and control strain Merino ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 67: 1-7.
- Danilovich, N;** Wernsing, D; Coschigano, KT; Kopchick, JJ; and Bartke, A. (2000). Deficits in female reproductive function in GH-R-KO mice: role of IGF-I. *Endocrinol.* 140: 2637–2640.

Dara, RC; Vejda, S; Erlach, N; Losert, A; Bursch, W; Berger, W; Schulte, HR; and Grusch, M. (2006). The activin axis in liver biology and disease. *Mutation Research*. 613: 123–137.

Daughaday, WH; and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr. Rev.*, 10: 68-91.

Davies, BJ; Lennard, DE; Lee, CA; Tiano, HF; and Langenbach, R. (1999). Anovulation in cyclooxygenase-2 deficient mice is restored by E2 and interleukin1b. *J. Endocrinol.*, 142: 3187- 3197.

De Chiara, TM; Efstratiadis, A; Robertson, EJ. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *J. Nature*, 345: 78–80.

De Jong, FH. (1988). Inhibin. *Physiol. Rev.*, 68: 555–607.

De Kretser, DM; Hedger, MP; Loveland, KL; Phillips, DJ. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 8: 529-41.

De Kretser, DM; Meinhardt, A; Meehan, T; Phillips, DJ; O'Bryan, MK; and Loveland, KA. (2000). The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 161: 43–46.

De Paolo, LV. (1997). Inhibins, activins, and follistatins: The saga continues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 214: 328–339.

De Paolo, TA; Bicsak, TA; Erickson, GF; and Shimasaki, S. (1991). Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 198: 500-515.

De Vos, AM; Ultsch, M; and Kossiakoff, AA. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science*. 255(5042): 306-312.

Deli, A; Kreidl, E; Santifaller, S; Trotter, B; Seir, K; Berger, W; Schulte, HR; Dara, RC; and Grusch, M. (2008). Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 14(11): 1699–709.

Demeestere, I; Gervy, C; Centner, J; Devreker, F; and Delbaera, A. (2004). Effect of insulin like growth factor-1 during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation and embryo development in mice. *Biol. Reprod.*, 70: 1664-1669.

Denkova, R; Bourneva, V; Staneva-Dobrovski, L; Zvetkova, E; Baleva, K; et al. (2004). In vitro effects of inhibin on apoptosis and apoptosis related proteins in human ovarian granulosa cells. *Endocr. Regul.*, 38: 51–5.

Derar, DR; Taya, K; Watanabe, G; and Miyake, Y-I. (2012). Characterization of immunoreactive IGF-1 during the pre-ovulatory period of the oestrus cycle of thoroughbred mares and its relation to other hormones. *J. Veterin. Med. Sci.*, 47(1): 151-156.

Derynck, R.; and Feng, XH. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1333: 105–150.

Dostal, J; Pavlok, A; and Flechon, JE. (1996). Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod. Nutr. Develop.*, 36:681-690.

Ducolomb, Y; Gonzalez–Marques, H; Fierro, R; Jimenez, I; Casas, E; and Bitancourt, M. (2013). Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on *in vitro* fertilization. *J. Theriogeno.*, 79: 896 – 904.

Duleba, AJ; Spaczynski, RZ; Olive, DL; and Behrman, HR. (1997). Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.*, 56: 891–897.

Dye, RB; Rabinovici, J; and Jaffe, RB. (1992). Inhibin and activin in reproductive biology. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 47: 173-85.

Echternkamp, SE; Roberts, J; Lunstra, DD; Wise, T; and Spicer, LJ. (2004). Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. *J. Anim. Sci.*, 82: 459-71.

Edmondson, SR; Thumiger, SP; Werther, GA; and Wraight, CJ. (2003). Epidermal homeostasis: The role of growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocr. Rev.* 24(6): 737-764.

Edwards, RG. (1974). Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 37: 189- 219.

El-Shahat, KH; Abo-El maaty, AM; and Moawad, AR. (2013). Follicular fluid composition in relation to follicular size in pregnant and non pregnant dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *J. Anim. Reprod.*, 10(1): 16-23.

Esbenshade, KL; Vogel, MJ; and Traywick, GB. (1986). Clearance rate of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone from peripheral circulation in the pig. *J. Anim. Sci.*, 62(6): 1649-1653.

Eshkol, A; Lunenfeld, B; and Peters, H. (1972). Ovarian development in infant mice. Dependence on gonadotrophic hormones. *In: Gonadotrophins and Ovarian Development*. Livingstone. Edinburgh. P: 249.

Fenwick, MA; Llewellyn, S; Fitzpatrick, R; Kenny, DA; Murphy, JJ; Patton J; and Wathes, DC. (2008a). Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF binding protein expression in the oviduct. *Reproduction*. 135: 63-75.

Fenwick, MA; Llewellyn, S; Fitzpatrick, R; Kenny, DA; Murphy, JJ; Patton J; and Wathes, DC. (2008b). Inter relationships between Negative Energy Balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 34: 31-44.

Findlay, JK. (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48: 15–23.

Findlay, JK; Drummond, AE; Dyson, M; Baillie, A; and Ethier, JF. (2001). Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *J. Mol. Cell. Endocrin.*, 180: 139-144.

Fisch, B; Goldberg, I; Ovadia, J; and Tadir, Y. (1990). Physicochemical properties of follicular fluid and their relation to *in vitro* fertilization (IVF) outcome. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transf.*, 7: 67-73.

Freeman, ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neill, J.D. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, pp. 2327–2388. Elsevier, Amsterdam.

Ganong, WF. (2012). Central regulation of visceral function. In: *Review of medical physiology*. 22th edition. New York: McGraw Hill. pp. 224–47.

Geng, LY; Ming, F; Jian-Ming, Y; Fei, J; Muhammad, M; and Li-Guo, Y. (2008). Effect of overexpression of inhibin α (1–32) fragment on bovine granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and development of co-cultured oocytes. *Theriogeno*. 70:35–43.

Goldenberg, RL; powell, RD; Rosen, SW; Marshallm, JR; and Ross, GT. (1976). Ovarian morphology in women with anosmia and hypogonadotropic hypogonadism. *J. Obstet. Gynecol.*, 126: 91-94.

Gomez, JM; Loir, M; and Le Gac, F. (1998). Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.*, 58(2): 483-491.

Griswold, MD; and McLean, D. (2006). The Sertoli cell. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed., by: Jimmy D. Neill (ed.), Elsevier, New York. Pp: 949-976.

Groome, NP; Illingworth, PJ; O'Brien, M; Pai, R; Rodger, FE; Mather, JP; McNeilly, AS. (1996). Measurement of dimeric inhibin-B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81: 1401–1405.

Grumbach, MM; and Styne, DM. (1992). Puberty: ontogeny, neuro-endocrinology, physiology, and disorders. In William's Textbook of Endocrinology, Eds JD Wilson & DM Foster. Philadelphia: Saunders. pp 1139–1221.

Gubbay, O; Guo, W; Rae, MT; Niven, D; Howie, AF; and Hillier, SG. (2004). Anti-inflammatory and proliferative responses in human and ovine ovarian surface epithelial cells. *J. Reproduction*, 128: 607-614.

Gupta, PSP; Ravindra, JP; Girish Kumar, V; Raghu, HM; and Nandi, S. (2005a). Stimulation of *in vitro* ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Rumin Res.*, 59: 33-40.

Gupta, PSP; Ravindra, JP; Nandi, S; Raghu, HM; and Ramesha, KP. (2005b). Isolation of an oocyte stimulatory peptide from the ovarian follicular fluid of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian Austr J Anim Sci*, 18:1557-1563.

Guthria, HD; Rohan, RM; Remyroad, JR; and Cooper, BS. (1992). Changes in concentration of follicular inhibin α and β A subunit messenger ribonucleic acids and inhibin immunoactivity during preovulatory maturation in the pig. *J. Biol. Reprod.*, 47(6): 1018-1025.

Gutierrez, CG; Ralph, JH; Telfer, EE; Wilmut, I; and Webb, R. (2000). Growth and antrum formation of preantral follicles in long-term culture in vitro. *J. Biol. Reprod.*, 62: 1322-1328.

Gwatkin, RBL; and Anderson, OF. (1976). Hamster oocyte maturation *in vitro*: Inhibition by follicular components. *Life Sci.*, 19: 527- 536.

Hakovirta, H; Kaipia, A; So`der, O; and Parvinen, M. (1993). Effects of activin-A, inhibin-A, and transforming growth factor- β 1 on stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis during rat seminiferous epithelial cycle. *Endocrinol.* 133: 1664–1668.

Harter, BT. (1948). Glycogen and carbohydrate-protein complexes in the ovary of the white rat during the estrus cycle. *J. Anat. Rec.*, 102: 349-356.

Harvey, S; Baudet, ML; Murphy, A; Luna, M; Hull, KL; and Aramburo, C. (2004). Testicular Growth Hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 139(2): 158-167.

Hashimoto, O; Nakamura, T; Shoji, H; Shimasaki, S; Hayashi, Y; and Sugino, H. (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparin sulfate. *J. Biol. Chem.*, 272: 13835–13842.

Hastie, PM; Onagbesan, OM; and Haresign, W. (2004). Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGFII, type I and II IGF-receptors and IGF binding proteins (IGFBP-1 to 6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 84: 93-105.

Havlock, JC; Raincy, WE; and Carr, BR. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *J. Mol. Cell. Endocrinol.*, 228: 67-78.

Hayashi, K; Carpenter, KD; Gray, CA; and Spencer TE.(2003). The activin-follistatin system in the neonatal ovine uterus. *Biol. Reprod.*, 69: 843–850.

Heckert, LL. (2001). Activation of the rat follicle-stimulating hormone receptor promoter by steroidogenic factor 1 is blocked by protein kinase and requires upstream stimulatory factor binding to a proximal E box element. *Mol. Endocrinol.*, 15: 704–715.

Heffner, LJ; and Schust, DJ. (2006). The reproductive system at a glance. 2nd ed., Black-Well publishers. Newyork.

Henderson, KM; Prisk, MD; Hudson, N; Ball, K; McNatty, KP; and Mc Diarmid, J. (1986). Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J. Repord. Fertil.*, 76: 623-635.

Herrington, J; and Carter-Su, C. (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends. Endocrinol. Metab.*, 12: 252–257.

Hillier, SG; Yong, E.; Illingworth, PJ; Baird, DT; Schwall, RH; and Mason, AJ. (1991). Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72: 1206 - 1211.

Höppener, JWM; de Pagter-Holthuisen, P; Geurts van Kessel, AH; Sussenbach, JS. (1985). The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum. Genetics*, 69(2): 157-60.

Hsueh, AJW; Billig, H; and Tsafriiri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinol. Rev.*, 15: 707–724.

Hsueh, AJW; Dahl, KD; Vaughan, J; Tucker, E; Rivier, J; Bardm, CW; and Vale, WW. (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of lutenizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 5082.

Hsueh, AJW; McGee, EA; Hayashi, M; and Hsu, SY. (2000). Hormonal regulation of early follicular development in the rat ovary. *J. Mol. Cell. Endocrinol.* 163(1-2): 95-100.

Hu, YC; Wang, PH; Wang, RS; Xie, C; Xu, Q; and Zhou, X. (2004). Subfertility and defective folliculogenesis mice lacking androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: 11209-11214.

Hull, KL; and Harvey, S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.*, 168: 1–23.

Humaidan, P; Bungum, L; Bungum, M; and Andersen, C. (2006). Rescue of corpus luteum function with peri-ovulatory HCG supplementation in IVF/ICSI GnRH antagonist cycles in which ovulation was triggered with a GnRH agonist: a pilot study. *Reprod. Biomed. Online* 13: 173–178.

Hunter, MG; Robinson, RS; Mann, GE; and Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.*, 82(83): 461-477.

Hussein, TS; Thompson, JG; and Gilchrist, RB. (2006). Oocyte secreted factors enhanced oocyte development competence. *J. Dev. Biol.*, 296: 514- 521.

Ishigame, H; Medan, MS; Wang, H; Watanabe, G; Kishi, H; and Arai, KY. (2005). Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin in immature rats. *J. Reprod. Dev.*, 51: 559-66.

Ishigma, H; Medan, MS; Watanabe, G; Shi, Z; Kishi, H; and Arai, KY. (2004). A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats. *Biol. Reprod.*, 71: 236-243.

Iwata, H; Inoue, J; Kimura, K; Kuge, T; Kuwayama, T; and Monji, Y. (2006). Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. *J. Anim. Reprod. Sci.*, 91: 215-223.

Jansen, M; van Schaik, FM; Ricker, AT; Bullock, B; Woods, DE; Gabbay, KH; Nussbaum, AL; Sussenbach, JS; and Van den Brande, JL. (1983). Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature*. 306: 609–11.

Janssens, RMJ; Brus, L; Cahill, DJ; Huirne, JA; Schoemaker, J; Lambalk, CB. (2000). Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod.*, 6: 505–518.

Jones, RE; and Lopes, KH. (2006). Human reproductive biology. 3rd edition. Academic press. New York.

Kadakia, R; Arraztoa, JA; Bondy, C; Zhou, J. (2001). Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. *Growth Horm. IGF Res.*, 11: 220-224.

Kadam, AL; and Koide, SS. (1990). Identification of hypoxanthine in bovine follicular fluid. *J. Pharm. Sci.*, 79: 1077-1082.

Kaise, GG; Sinowatz, F; and Palma, GA. (2001). Effects of growth hormone on female reproductive organs. *J. Anat. Histol. Embryol.*, 30: 265-271.

Kamada, S; Kubota, T; Taguchi, MWR; Ho, Sakamoto, S; Aso, T. (1992). Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Horm. Res.*, 37: 141-149.

Kaneko, H; Yoshida, M; Hara, Y; Taya, K; Araki, K; Watanabe, G; Sasamoto, S; Hasegawa, Y. (1993). Involvement of inhibin in the regulation of FSH secretion in prepubertal bulls. *J. Endocrinol.*, 137: 15–19.

Kaufman, JM; Kesner, JS; Wilson, RC; and Knobil, E. (1985). Electro-physiological manifestation of luteinizing hormone –releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *J. Endocrinol.*, 116: 1327-1333.

Kenny, HA; and Woodruff, TK. (2005). Follicle size class contributed to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrus cycle. *J. Endocrinol.*, 10: 1210-1242.

Khairy, MAZ; and Allam, AA. (2013). Effect of over expression of inhibin α (1-32) fragment on subsequent maturation of bovine preantral follicles. *Biochem. Bioinf.*, 1(1): 5-11.

Kipp, JL; Kilen, SM; Bristol-Gould, S; Woodruff, TK; and Mayo, KE. (2007). Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *J. Endocrinol.*, 148 (5): 1968–1976.

Kishi, H; Okada, T; Otsuka, M; Watanabe, G; Taya, K; and Sasamoto, S. (1996). Induction of superovulation by immune-neutralization of endogenous inhibin through the increase in the secretion of follicle-stimulating hormone in the cyclic golden hamster. *J. Endocrinol.*, 151: 65–75.

Klumpp, AM. (2004). The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development .*M.Sc. thesis*. Agricultural and Mechanical College, University of Louisiana. Louisiana State, U.S.A.

Knight, PG; and Glister, C. (2001). Potential local regulatory functions of inhibins , activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 121: 503-512.

Knight, PG; and Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132: 191–206.

Knight, PG; Wrathall, JHM; Glencross, RG; McLeod, BJ. (1991). Effect of bovine follicular fluid on the secretion of LH and FSH in inhibin immunized seasonally anoestrus ewes. *J. Endocrinol.*, 128: 403 - 410.

Ko, Y; Choi, I; Green, ML; Simmen, FA; and Simmen, RC. (1994). Transient expression of the cytochrome P450 aromatase gene in elongating porcine blastocysts is correlated with uterine insulin-like growth factor levels during peri-implantation development. *Mol. Reprod. Develop.*, 37: 1–11.

Kolibianakis, EM; Venetisk, CA; Diedrich, K; Tarlatzis, BC; and Griesinger, G. (2009). Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J. Human Reprod. and Embryol.*, 100(10): 1-10.

Kolle, S; Sinowatz, R; Bole, G; and Lincoln, D. (1998). Developmental changes in the expression of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*. 59: 836-842.

Krege, JH; Hodgin, JB; Couse, JF; Enmark, E; Warner, M; and Mahler, JF. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *J. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*.95: 15677-15682.

Kubo, T; Kim, H; and Erickson, G. (1998). Activin induced inhibin α -subunit production by rat granulosa cells requires endogenous insulin-like growth factor-1. *J. Biol. Reprod.*, 58(1): 712-718.

Kumar, H; Mogha, IV; and Yadav, MC. (1998).Effect of treatment with buffalo follicular fluid on ovarian function in goats. *J. Vet. Rec.*, 143: 252- 254.

Kwon, S; Stedman, D; Elswick, BA; Cattley, RC; and Welschm, F. (2000). Pubertal development and reproductive functions of Sprague-dawley rats exposed to biosphenol A during prenatal and postnatal development. *J. Toxicol. Sci.*, 55: 399-406.

Lalli, E; and Sassone-Corsi, P. (2003). DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Mol. Endocrinol.*, 17: 1445–1453.

Laron , Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 54: 311–316.

Laron, Z. (1999). Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome). *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 12: 231–249.

Le Roith, D; Adamo, M; Werner, H; and Roberts, CTJr. (1991). Insulin- like growth factors and their receptors as growth regulators in normal physiology and pathological states. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2: 134-9.

Le Roith, D; and Yakar, S. (2007). Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat. Clin. Pract. Endocr. Meta.*, 3: 302-310.

Le Roith, D; Bondy, C; Yakar, S; Liu, JL; and Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis. *Endocr. Rev.*, 22: 53-74.

Le Roith, D; Clemmons, D; Nissley, P; and Rechler, MM. (1992). Insulin- like growth factors in health and disease. *Ann. Intern. Med.*, 116: 854-62.

Lei, L; Jin, SL; Mayo, KE; and Woodruff, TK. (2010). The interactions between the stimulatory effect of follicle- stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, 82: 13-22.

Lenz, RW; Ax, RL; Grimek, HJ; and First, NL. (1982). Proteoglycan from bovine follicular fluid enhanced an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Biochem. Biophys. Res.*, 106: 1092- 1098.

Leung, PH; Salamonsen, LA; and Findlay, JK. (1998). Immunolocalization of inhibin and activin in human endometrium across the menstrual cycle. *Human Reprod.*, 13: 3469-3477.

Lewis, KA; Gray, PC; Blount, AL; MacConnel, LA; Wiater, E; and Bilezikjian, LM. et al. (2000). Bataglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*, 404: 411-414.

Li, C; Zhu, YL; Xue, JH; Zhang, SL; Ma, Z; and Shi, ZD. (2009). Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex sorted semen. *Theriogenology*, 71: 1011-1017.

Ling, N; De Paolo, L; and Bicsak, T. (1990). Novel ovarian regulatory peptides :inhibin, activin and follistatin. *Clin. Obstet. Gyn.*, 33(3): 690-702.

Liu, JP; Baker, J; Perkins, AS; Robertson, EJ; and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75 : 59–72.

Liu, JP; Koenigsfeld, AT; Cantley, TC; Boyd, CK; Kobayashi, Y; and Lucy, MC. (2000). Growth and the Initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, 63: 942-952.

Liu, L; Trimarchi, JR; Navarro, P; Blasco, MA; and Keefem, DI. (2003). Oxidative stress contributes to arsenic- induced telomere strition, chromosome instability and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278: 31998 - 32004.

Liu, X; Andoh, K; Yokota, H; Kobayashi, J; Abe, Y; Amada, K; Mizunuma, H; and Ibuki, Y. (1998). Effects of growth hormone ,activin and follistatine on the development of preantral follicle from immature female mice. *J. Endocrinol.*, 139: 2342-2347.

Liu, YP; Mao, XP; Wei, YM; and Chen, RA. (2013). Studies on enhancing embryo quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and associated endocrine mechanisms. *J. Anim. Reprod. Sci.*, 142(2): 10-18.

Livak, KJ; and Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-410.

Llewellyn, S; Fitzpatrick, R; Kenny, DA; Murphy, JJ; Scaramuzzi, RJ; and Wathes, DC. (2007). Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction*, 133(3): 627-639.

Long, JA; and Evans, HM. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, 6: 1-148.

Louhio, H; Hovata, O; Sjoberg, J; and Tuuri, T. (2000). The effects of insulin and insulin-like growth factors-1 and 11 on human ovarian follicles in long-term culture. *J. Mol. Human. Reprod.*, 6: 694-698.

Lucy, MC. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, 83:1635-1647.

Luisi, S; Florio, P; Reis, FM; Petraglia, F. (2005). Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Reprod. Update*, 11: 123-135.

Lukin-Jayes, FC; Britt. JH; and Esbenshade, KL. (1997). Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in differential regulation of gonadotropins in gilt. *Biol. Reorod.*, 56(4): 1012-1019.

Luna, LG. (1968). *Manual of Histologic staining methods*. 3rd ed. MC Graw Hill Book company, Sydney. Pp: 258.

Luna, M; Huerta, L; Berumen, L; Martínez-Coria, H; Harvey, S; and Arámburo, C. (2004). Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: Heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 137(1): 37-49.

Maeda, KI; Ohkura, S; and Tsukamura, H. (2000). Physiology of reproduction. In G. J. Krinke (ed.), *The Laboratory Rat*, pp. 145–176, New York: Academic Press.

Magalhaes-Padiha, DM; Duarte, AB; Araujo, VR; Saraiva, MV; Almeida, AP; and Figueiredo, JR. (2012). Steady state level of insulin-like growth factor -1(IGF-1) receptor mRNA and the effect of IGF-1 on the in vitro culture of caprine preantral follicles. *J. Theriogenol.*, 77(1): 206-213.

Makanji, Y. (2009). Inhibin B is a more potent suppressor of rat follicle-stimulating hormone release than inhibin A in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 150: 4784–4793.

Mandl, AM. (1951). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.*, 28: 576-584.

Mann, GF; Campbell, BK; McNeilly, AS; and Baird, DT. (1990). The effect on plasma FSH of passively immunizing ewes against inhibin and estradiol during the follicular phase of estrus cycle. *J. Endocrinol.*, 125: 417-424.

Mannaerts, B; De Leeuw, R; and Geelen, J. (1991) Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the biological characteristics of recombinant human follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, 129: 2623-30.

Marchetti, C; Hamdane, M; Mitchell, V; Mayo, K; Devisme, L; Rigot, JM; Beauvillain, JC; Hermand, Eand Defossez, A (2003) Immunolocalization of inhibin α and β subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. *Biol. Reprod.*, 68: 230–235

Massague, J; and Gomis, RR. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580: 2811-2820.

Massague, J; and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGFbeta/ Smad signaling system. *EMBO Journal*, 19: 1745–1754.

Mathews, LS. (1994). Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocrinol. Rev.*, 15: 310–325.

Matsuzaki, T; Hanai, S; Kishi, H; Liu, Z; Bao, Y; Kikuchi, A; Tsuchida, K; and Sugino, H. (2002). Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Ral/Ral-binding protein 1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 277: 19008–19018.

Matzuk, MM; Kumar, TR; and Bradley, A. (1995). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature*, 374: 356-360.

McGee, EA; and Hsueh, AJ. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *J. Endocrin. Rev.*, 21: 200-214.

Medan, MS; Nambo, Y; Nagamine, N; Shinbo, H; Watanabe, G; Groome, N; and Taya, K. (2004). Plasma concentrations of ir-inhibin, inhibin A, inhibin pro-alphaC, FSH, and estradiol-17beta during estrous cycle in mares and their relationship with follicular growth. *Endocrin. Rev.*, 25(1): 7-14.

Medan, MS; Watanabe, G; and Taya, K. (2007). Inhibin: Regulation of reproductive function and practical use in females. *Anim. Sci. J.*, 78: 16-27.

Medan, MS; Watanabe, G; Sasaki, K; Nagura, Y; and Taya, K. (2003). Effect of passive immunization of goats against inhibin on follicular development hormone profile and ovulation rate. *J. Reprod.*, 125: 751- 757.

Melamed, P. (2010). Hormonal signaling to follicle stimulation hormone β -subunit gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 314: 202-212.

Melmed, S. (2002). *The Pituitary*. Malden, MA: Blackwell Science.

Mendoza, C; Cremades, N; Ruiz-Requena, E; Martinez, F; Ortega, E; and Bernabeu, R. (1999). Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *J. Human. Reprod.*, 14: 628-635.

Meunier, H; Cajander, SB; Roberts, VJ; Rivier, C; Sawchenko, PE; Hsueh, AJ; and Vale, W. (1988). Rapid changes in the expression of inhibin α , β A, and β B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol. Endocrinol.*, 2: 1352–1363.

Meunier, H; Rivier, C; Evans, RM; and Vale, W. (1988). Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A and β B-subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 85: 247-251.

Miller, DW; and Martin, GB. (1993). Increases in ovulation rate and gonadotropin concentration in goats and merino sheep after treatment with bovine follicular fluid. *Anim. Reprod. Sci.*, 31: 25- 36.

Miller, KF; Critser, JK; and Ginther, OJ. (1982). Inhibin and subsequent rebound of FSH secretion following treatment with bovine follicular fluid in the ewe. *J. Therio.*, 18: 45-52.

- Miller, KF; Critser, JK; Rowe, R; FandGinther, OJ.** (1979). Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol. Reprod.*, 21: 537- 544.
- Milvae, RA; Murphy, BD; and Hansel, W.** (1984). Prolongation of the bovine estrous cycle with a gonadotropin releasing hormone analog. *Biol. Reprod.*, 31: 664–670.
- Miro, F; Smyth, CD; and Hillier, SG.** (1991). Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 129: 3388-3394.
- Mishra, OP; Pandey, JN; and Gawande, PG.** (2003). Study on biochemical constituents of caprine ovarian follicular fluid after superovulation. *J. Anim. Sci.*, 16: 1711-1715.
- Miyazono, K; Kamiya, Y; and Morikawa, M.** (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.*, 147: 35–51.
- Murphy, LJ; Bell, GI; and Friesen, HG.** (1987). Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology*, 120: 1279–1282.
- Murthy, RM.** (1997). Effect of *Allium cepa* extracts on the estrous cycle and ovarian activity in albino mice. *Planta. Med.* 20(5): 117-120.
- Nambo, Y; Kaneko, H; Nagata, S; Oikawa, M; Yoshihara, T; Nagamine, N; Watanabe, G; and Taya, K.** (1998). Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. *Theriogenol.*, 50: 545–557.
- Nandi, S; Gupta, PSP; Raghu, HM; and Sarma, PV.** (2006). In vitro growth of primordial, preantral and antralovarian follicles in buffalo. *In: Proceedings of the 5th Asian Buffalo Congress, Nanning, China, 2006.* Edited by Yang Bingzhuang Nanning City: Guangxi Buffalo Research Institute. pp.148.
- Nguyen, AP; Chandorkar, A; and Gupta, C.** (1996). The role of growth hormone in fetal mouse reproductive function. *Endocrinol.*, 137(9): 3659-3666.
- Nicholas, B; Alberio, R; Fouladi-Nashta, AA; and Webb, R.** (2005). Relationship between low-molecular- weight insulin like growth factor –binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biol Reprod.*, 72: 796-804.

Nielsen, FC. (1992). The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res.*, 4: 257–290.

Odum, J; Lefevre, PA; Tinwell, H; VanMiller, JP; Joiner, RL; and Ashby, J. (2002). Comparison of the developmental and reproductive toxicity of diethylstil bestrol administered to rats in utero lactotionally pre-weaning or post-weaning. *J. Toxicol. Sci.*, 68: 339-348.

Ohtsuki, T; Otsuki, M; Murakami, Y; Hirata, K; Takeushi, S; and Takahashi, S. (2007). Alternative leader-exon usage in mouse IGF-1 mRNA variants:class1 and class2 IGF-1mRNAs. *J. Zoology Sci.*, 24: 241-247.

Ojeda, SR; Urbanski, HF; Ahmed, CE. (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Recent Prog. Horm. Res.*, 42: 385–441.

Ono, T; Campeau, JD; Holmberg, EA; Nakamura, RM; and Dizerga, GS. (1986). Biochemical and physiological characterization of follicle regulatory protein: a paracrine regulator of folliculogenesis. *J. Obstet. Gyn.*, 154: 709-716.

Padilla, MA; Shriner, D; Vaughan, LK; and Tiwari, H.K. (2007). Problems with genome-wide association studies. *Science*, 316(5833): 1840–1842.

Palta, P; Prakash, BS; Manic, RS; and Madan, ML. (1996). Inhibin in individual buffalo ovarian follicles in relation to size. *Ind. J. Exp. Biol.*, 58: 606 - 608.

Patton, J; Kenny, DA; McNamara, S; Mee, JF; O'Mara, FP; Diskin, MG; and Murphy, JJ. (2007). Relationships among milk production, energy balance, plasma analysts, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy. Sci.*, 90: 649-658.

Piquette, GN; LaPolt, PS; Oikawa, M; and Hsueh, AJ. (1991). Regulation of luteinizing receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factor and gonadotropin releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Endocr.*, 128:2449-2456.

Piroozmand, S; Miroliaei, M; Atyabi, S; Kaghazian, H; Irani, S; and Norouzeyan, D. (2013). Effect of insulin-like growth factor-1 in Chinese hamster ovary cells for biopharmaceutical production. *J. Med. Sci.*, 22(4): 251-258.

Raivio, T; and Dunkel, L. (2002). Inhibins in childhood and puberty. *J. Endocrinol. Metabol.*, 16(1): 43-52.

Rath, R; Colenbrander, B; Stout, TA; Bevers, MM; and Gadella, BM. (2003). Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *J. Mol. Reprod. Dev.*, 64: 120- 128.

Reeves, JJ. (1987). Endocrinology of reproduction. In: Reproduction in farm animals. (5th edition). By Hafez, E. S. E., Lee, and Febiger. PP: 85-106.

Rivier, C; and Vale, W. (1989). Immunoneutralization of endogenous inhibin in modifies hormone secretion and ovulation rate in rat. *Endocrinol.*, 125: 152-157.

Rivier, C; Rivier, J; and Vale, W. (1986). Inhibin-mediated feedback control of follicle stimulating hormone secretion in the female rat. *Science*, 234: 205-208.

Roberts, VJ; Barth, S; El-Roeiy, A; and Yen, SSC. (1993) Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77: 1402-1410.

Robertson, DM; Foulds, LM; Leversha, L; Morgan, FI; Hearn, MT; Burger, HG; Wettenhall, RE; and De Kretser, DM. (1985). Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126: 220-226.

Robertson, DM; Hertan, R; and Farnworth, PG. (2000). Is the action of inhibin mediated via a unique receptor? *Rev. Reprod.*, 5: 131–135.

Roche, JF. (1996). Control and regulation of folliculogenesis: a symposium in perspective. *Rev. Reprod.*, 1: 19-27.

Romero-Arredondo, A; and Seidel, GE. (1994). Effects of follicular fluid during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *J. Theriogenol.*, 41: 383-394.

Ross, RJ; Borges, F; Grossman, A; Smith, R; Ngahfoong, L; Rees, LH; Savage, MO; and Besser, GM. (1987). Growth hormone pretreatment in man blocks the response to growth hormone-releasing hormone; evidence for a direct effect of growth hormone. *Clin. Endocrinol., (Oxf)*, 26(1): 117-123.

Samir, MS. (2010). Effect of passive immunization against inhibin-alpha subunit on puberty of immature female Wister rats. *M.Sc. thesis.* College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq.

Scheffler, W.C. (1980). Statistics for the biological sciences (2nd edition).Addison-Wesley.

Schoenle, E; Zapf, J; Hauri, C; Steiner, T; and Froesch, ER. (1985). Comparison of in vivo effects of insulin-like growth factor-I and -II and of growth hormone in hypophysectomized rats. *J. Acta Endocrinol.*, 108: 167–174.

Scott, RS; Burger, HC; and Quigg, H. (1980). A Simple and Rapid in Vitro Bioassay for Inhibin. *Endocrinology*, 107: 1536.

Seachrist, DD; Johnson, E; Magee, C; Colin, M; Clay, JK; Graham, DN; Veeramachaneni, R; and Keri, RA. (2012). Overexpression of follistatin in the mouse epididymis disrupts fluid resorption and sperm transit in testicular excurrent ducts. *Biol. Reprod.*, 87 (2): 41.

Sengupta, A; Baker, T; Chakrabarti, N; Whittaker, JA; and Sridaran, R. (2007). Localization of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and relative expression of its mRNA in the oviduct during pregnancy in rats. *J. Histochem Cytochem*, 55:525–534.

Sharara, FI; and Giudice, LC. (1997). Role of growth hormone in ovarian physiology and onset of puberty. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 4(1): 2-7.

Shemesh, M. (1979). Inhibitory action of follicular fluid on progesterone and prostaglandin synthesis in bovine follicles. *J. Endocrinol.*, 82: 27- 31.

Shi, F; Mochida, K; Suzuki, O; Matsuda, J; Ogura, A; Tsonis, C; Watanabe, G; Suzuki, A; and Taya, K. (2000). Development of embryos in superovulated guinea pigs following active immunization against the inhibin alpha-subunit. *Endocrinol.* 47: 451–459.

Shimasaki, S; Moore, RK; Otsuka, F; and Erickson, GF. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.*, 25: 72–101.

Sidis, Y; Fujiwara, T; Leykin, L; Isaacson, K; Toth, T; and Schneyer, AL. (1998). Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol. Reprod.* 59: 807-812.

Silva, CC; and Knight, PG. (1998). Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 58:558–565.

Silva, CC; Groome, NP; and Knight, PG. (1999) Demonstration of a suppressive effect of inhibin α -subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 115: 381–388.

Simmons, JG; Van, JJ; Hoyt, EC; and Lund, PK. (1993). Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-1 gene give rise to IGF-1 mRNAs that encode different IGF-1 precursors and are processed differently *in vitro*. *Growth Factors.*, 9: 205-221.

Singh, J; Paul, A; Yadav, VP; Panda, RP; Bhure, SK; and Sarkar, M. (2015). Localization of IGF proteins in various stages of ovarian follicular development and modulatory role of IGF-1 on granulosa cell steroid production in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Reprod. Sci.*, 158: 31-52.

Sirard, MA; Coenen, K; and Bilodeau, S. (1992). Effect fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *J. Therio.*, 37: 777-783.

Sirard, MA; Desrosier, S; and Assidi, M. (2007). *In vitro* and *in vivo* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *J. Therio.*, 68: 71- 76.

Skinner, M; McLachlan, R; and Bremner, W. (1989). Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 66(2): 239–49.

Skinner, MK; and Coffey, RJ. (1988). Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- α by theca cells. *J. Endocrinol.*, 123: 2632-2638.

Smyth, CD; Gosden, RG; McNeilly, AS; and Hillier, SG. (1994) Effect of inhibin immunoneutralization on steroidogenesis in rat ovarian follicles in vitro. *J. Endocrinol.*, 140: 437- 443.

Somfai, T; Inaba, 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. *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 24: 743-752.

Sridaran, R; Lee, MA; Haynes, L; Srivastava, RK; Ghose, M; Sridaran, G; and Smith, CJ. (1999). GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy. *Steroids* 64: 618–623.

Stephen, RH; and Jamnongjit, M. (2006). Ovarian steroid production and signaling. *J. Cell Cycle*, 5(11): 1178-1183.

Stewart, CEH; and Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.*, 76: 1005-1026.

Stubbs, SA; Webber, LJ; Stark, J; Rice, S; Margara, R; Lavery, SandFranks, S. (2013). Role of insulin-like growth factors in initiation of follicle growth in normal and polycystic human ovaries. *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 98(8): 1-8.

Sudo, N; Shimizu, T; Kawashima, C; Kaneko, E; Tetsuka, M.; and Miyamoto, A. (2007). Insulin-like Growth Factor-i (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol. Cell. Endocrinol.*, 264(1-2): 197-203.

Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular biology. *Springer Lab. Manual*

Suszko, MI; Antenos, M; Balkin, DM; and Woodruff, TK. (2008). Smad3 and Pitx2 cooperate in stimulation of FSHbeta gene transcription. *Mol. Cell. Endocr.*, 281: 27–36.

Syed, V; Ulinski, G; Mok, SC; Yin, GK; and Ho, SM. (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *J. Cancer Res.*, 61: 6768- 6776.

Sylvia, C; John, F; and Kenneth, S. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation estrogen receptor knockout mice- what their phenol types about mechanism of estrogen action. *Breast Cancer Res.*, 2(5): 345-352.

Takedomi, TH; Kaneko, Y; Aoyagi, K; Konishi, H; Kishi, Watanabe, G; and Taya, K. (1997). Effects of passive immunization against inhibin on ovulation rate and embryo recovery in Holstein heifers. *Theriogenology*, 47: 1507-1518.

Takeo, T; and Nakagata, N. (2015). Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine \chorionic gonadotropin increases the number of ovulated Oocytes in C57BL/6 female mice. *J. PLOS ONE.*, 10(5): 1-11.

Tamura, N; Irahara, M; Kuwahara, A; Ushigoe, K; Sugino, H; and Aono, T. (2000). Effect of activin on production and secretion of prolactin and growth hormone in cultured rat GH cells. *Eur. J. Endocrinol.*, 142(5): 506-517.

Tapanainen, JS; LaPolt, PS; Perlas, E; and Hsueh, AJW. (1993). Induction of ovarian follicle luteinization by recombinant follicle stimulating hormone. *J. Endocrinol.*, 133: 2875-80.

Taylor, KM; Chen, C; Gray, AG; Bazer, FW; and Spencer, TE. (2001). Expression of messenger ribonucleic acids for fibroblast growth factors 7 and 10, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus. *Biol. Reprod.*, 64: 1236-1246.

Thanoon, HB. (2013). Hypothalamic GHRH and pituitary GH genes expression levels in sequential neonatal inhibin-immunoneutralized female rats. *M.Sc. thesis.* College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq.

Thomas, MJ; Kikuchi, K; Bichell, DP; and Rotwein, P. (1994). Rapid activation of rat insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone reveals no alterations in deoxyribonucleic acid protein interactions within the major promoter. *Endocrinol.*, 135: 1584–1592.

Toneta, SA; and diZerga, GS. (1989). Intraovarian regulation of follicular maturation. *J. Endocrin. Rev.*, 10: 205-229.

Tortora, GJ; and Derrickson, B. (2009). Principles of Anatomy and Physiology. 12th ed., John Wiley and Sons Inc.

Tsafri, A; Channing, CP; Pomerantz; and Linder, HR. (1977). Inhibition of maturation of isolated rat oocyte by porcine follicular fluid. *J. Endocrinol.*, 75: 285- 291.

Tsuchida, K; Nakatani, M; Hitachi, K; Uezumi, A; YoshihideSunada, Y; Ageta, H; and Inokuchi, K. (2009). Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Sign.*, 7: 15.

Tsuchida, K; Nakatani, M; Uezumi, A; Murakami, T; and Cui, X. (2008). Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocrine J.*, 55: 11–21.

Tsuchida, K; Nakatani, M; Yamakawa, N; Hashimoto, O; Hasegawa, Y; and Sugino, H. (2004). Activin isoforms signal through type I receptor serine/ threonine kinase ALK7. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 220: 59–65.

Vale, W; Bilezikjian, L; and Rivier, C. (1994). Reproductive and other roles of inhibins and activin in the physiology reproduction. Raven press .Newyork.1861-1878.

Vale, W; Rivier, C; Hsueh, A; Campen, C; Meunier, H; and Bicsak, T; *et al.* (1988). Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog. Horm. Res.*, 44: 1–34.

Van de Weil, DR; Erkens, J; Koops, W; Vos, E; and Van Landeghem, .A. (1981). Periostous and midluteal time courses of circulating LH,FSH,Prolactin,estradiol-17 β and progesterone in the domestic pig. *Biol. Reprod.*, 24(2): 223-233.

Van Lier, E; Meikle, A; Eriksson H; and Sahlin, L. (2006). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and thioredoxin are differentially expressed along the reproductive tract of the ewe during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Acta Vet. Scand.*, 48(1): 5.

Velazquez, MA; Newman, M; Christie, MF; Cripps, PJ; Crowe, MA; Smith, RF; and Dobson, H. (2005). The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenol.*, 64: 1977–1994.

Vitale, AM; Gonzalez, OM; Parborell, F; Irusta, G; Campo, S; et al. (2002). Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol. Reprod.*, 67: 1989–95.

Voge, JL; and Wheaton, JE. (2007). Effect of immunization against two inhibin antigens on daily sperm production and hormone concentration in ram lambs. *J. Anim. Sci.*, 85: 3249-3255.

Voutilainen, R. (1998).Adrenocortical cells are the site of secretion and action of insulin-like growth factors and TNF-alpha. *Horm. Metab. Res.*, 30: 432-435.

Wallace, JM; and McNeilly, AS. (1985). Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine follicular fluid in the luteal phase of the estrus cycle .*J. Reprod. Fertil.*, 73: 505-515.

Walters, KA; Binnie, JP; Campbel, BK; Armstrong, DG; and Telfer, EE. (2006). The effect of IGF1 on bovine follicular development and IGBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reprod.*, 131: 515-523.

Wang, G; and Hardy, MP. (2004). Development of Leydig cells in the insulin- like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol. Reprod.*, 70: 632–639.

Wang, H; Herath, CB; Xia, G; Watanabe, G; and Taya, K. (2001). Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reprod.*, 122: 809–816.

Welschen, R; Dullaart, J; and Jong, F. (1979). Interrelationships between circulating levels of estradiol-17 β , progesterone, FSH and LH immediately after unilateral ovariectomy in the cyclic rat. *J. Biol.Repord.*, 18: 421-427.

Welt, CK; Harris, PE; Halvorson, LM; Crowley, WF; and Jameson, JL. (2003). Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: Critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. *J. Clin. Endocr.Metab.* 88: 1766–1771.

Welt, CK; Sidis, Y; Keutmann, H; and Schneyer, A. (2002). Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp. Biol. Med.*, 227: 724–752.

Werner, H; Woloschak, M; Stannard, B; Shen-Orr, Z; Roberts, JrCT; and LeRoith, D. (1991). The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. In *Insulin-Like Growth Factors. Molecular and Cellular Aspects*, edited by Le Roith D, CRC press pp :17–47.

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 estrus cycle. *J. Anim. Sci.*, 64: 1153-1169.

Wood; AW; Duan, C; and Bern, HA. (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.*, 243: 215-285.

Woodruff, TK; D'Agostino, J; Schwartz, NB; and Mayo, KE. (1989). Decreased inhibin gene expression in preovulatory follicles requires primary gonadotropin surges. *Endocrinology*, 124: 2193-2199.

Woodruff, TK; Krummen, L; McCray, G; Mather, J. (1993). In situ ligand binding of 125I-rh-activin A and 125I-rh-inhibin A to the adult rat ovary. *Endocrinology*, 133: 2998–3006.

Woodruff, TK; Lyon, RJ; Hansen, SE; Rice, GC; and Mather, JP. (1990). Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology*, 127: 3196-3205.

Xia, Y; and Schneyer, AL. (2009). The biology of activin: Recent advances in structure, regulation and function. *J. Endocrinol.*, 202: 1–12.

Xu, P; and Hall, AK. (2006). The role of activin in neuropeptide induction and pain sensation. *Dev. Biol.*, 299(2): 303–9.

Xue, Y; Chu, MX; and Zhou, ZX. (2004). Advances on inhibin genes. *Yi Chuan*, 26(5): 749-55.

Yakar, S; Liu, J-L; Stannard, B; and LeRoth, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 96(13): 7324-7329.

Yilmaz, A; Davis, ME; Simmen, RCM. (2006). Analyses of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulin like growth factor I concentration. *Theriogenology*. 65: 1180-1190.

Young, JM; and Mc Neilly, AS. (2012). Inhibin removes the inhibitory effects of activin on steroid enzyme expression and androgen production by normal ovarian thecal cells. *J. Mol. Endocrin.*, 48: 49-60.

Young, JM; McNeilly, AS. (2010). Theca is the forgotten cell of the ovarian follicle. *J. Reprod.*, 140: 489-504.

Zaczek, D; Hammond, J; Suen, L; Wandji, S; Service, D; Bartke, A; Chandrashekar, V; Coschigano, K; and Kopchick, J. (2002). Impact of growth hormone resistance on female

reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol. Reprod.*, 67: 1115–1124.

Zhao, J; Taverni, MA; vanderWeijden, GC; Bevers, MM; and vanden Hurk, R. (2001). Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor 11. *J. Biol. Reprod.*, 65: 967-977.

Zhao, YC; Jones, RL; Salamonsen, LA; Ethier, JF; Drummond, AE; and Findlay, JK. (2002). Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activin during decidualization. *Mol. Hum. Reprod.*, 8: 363–374.

Zhou, H; and Zhang, Y. (2005). Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes . *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 265-272.

Zhou, J; Chin, E; and Bondy, C. (1991). Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology*, 129: 3281–3288.

Zhou, J; Kumar, TR; Matzuk, MM; and Bondy, C. (1997). Insulin-like growth factor-I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol. Endocr.*, 11: 1924–1933.

Zoheir, KM; and Allam, AA. (2013). Effect of inhibin α (1-32) fragment on subsequent maturation of bovine preantral follicles. *J. Biochem. Bioinform.*, 1(1): 005-011.

Summary

The present study was carried out, at the department of Biology, Collage of Education, University of AL-Qadisiyah, Iraq, to determine the effect of inhibin-free and/or steroid-free bovine follicular fluid (IS-FBFF and S-FBFF) antisera on ovarian folliculogenesis and fecundity of mature cycling female rats.

Follicular fluid was aspirated from bovine Graffian follicles (>15 mm in diameter). After centrifugation, to remove cellular debris, S-FBFF was prepared by treatment of BFF with activated charcoal. S-FBFF was divided into 2 parts: first part was used for immunization of 10 adult male rabbits against S-FBFF (for obtaining inhibin antiserum; S-FBFF antiserum), and second part was treated with anti-inhibin before immunization of 10 adult male rabbits against S-FBFF (for obtaining activin antiserum; IS-FBFF antiserum). One month after the last of 4 injections (a week interval), blood was collected, centrifuged and antiserum was obtained and kept at -20 °C until use.

Virgin cycling female rats of Wistar strain (aged 65 days and weighted 150-170g) were used in the present study. Daily vaginal smear, for all females, was monitored to detect the phases of estrus cycle. One hundred cycling females were randomly assigned to five equal groups (control and four treatments). Control females were injected with normal saline (100µl, ip) at proestrus. Treated groups were injected with 100 µl, ip of S-FBFF antiserum at proestrus (T1), IS-FBFF antiserum at proestrus (T2), S-FBFF antiserum at metestrus (T3), and IS-FBFF antiserum at metestrus (T4), respectively. At the estrus phase, 10 females from each group were anesthetized, by injection of 0.3 ml ketamine and 0.1 ml xylazine/ kg, bw), and blood samples were obtained for assessment of FSH, estradiol, IGF1, IGF2 and GH concentrations. After dissection, samples of pituitaries and ovaries were obtained for evaluation the expression levels of pituitary FSH β and GH genes, and ovarian IGF1, IGF2 and GH-r genes. Ovaries and uteri were weighted and fixed in neutral formalin 10% for histophysiological examination. The remained females were mated with males. On day 8 of pregnancy, the females from each

group were injected with 1% (w/v) pontamine blue solution (500 μ l, iv). After 15 min., the females were sacrificed for counting the uteri implantation sites.

The present results confirmed the potency of anti-inhibin injection (S-FBFF antiserum) in immunoneutralization of endogenous inhibin, particularly when used at metestrus phase, which accompanied by elevation of FSH, E₂, GH, IGF-1 and IGF-2, whereas using the same antiserum at proestrus phase had no effect on the levels of these hormones. On the other hand, anti-activin injection (IS-FBFF antiserum) had a negative effect at both proestrus and metestrus phases. In T3 group female rats, the concentration of serum FSH elevated ($p < 0.05$) after injection of S-FBFF antiserum, at metestrus phase, and declined ($p < 0.05$) in T4 group female rats, after injection of IS-FBFF antiserum, at the same stage of estrus cycle, whereas injection of S-FBFF or IS-FBFF antiserum at proestrus phase, in T1 or T2 group female rats, respectively, had no effects ($p > 0.05$) on the concentrations of serum FSH in comparison with control group female rats.

Molecular examination revealed significant elevation ($p < 0.05$) of both FSH β and GH gene expression levels in pituitaries of T3 group female rats increased significantly ($p < 0.05$) after injection of S-FBFF antiserum at metestrus phase, whereas the expression levels T4 groups female rats, which immunized against IS-FBFF at metestrus, showed insignificant ($p > 0.05$) changes compared with control group female rats. Ovarian IGF1, IGF2 and GHR gene expression levels in T3 group female rats showed significant elevation ($p < 0.05$) after injection of S-FBFF antiserum at metestrus phase, whereas the levels in T1, T2 and T4 groups female rats, which immunized against S-FBFF at prophase, IS-FBFF at prophase or IS-FBFF at metestrus, respectively, showed insignificant ($p > 0.05$) changes between each other and with that of control group female rats.

In comparison with control female rats, the results of morphometric and histophysiological examination, in T3 group female rats, revealed that injection of S-FBFF antiserum at metestrus phase, caused significant ($p < 0.05$) elevation of ovaries and uteri weights, the number of primary and Graffian follicles, ovarian

diameters, as well as growth and development of ovarian follicles and uteri endometrium. In T4 group female rats, the results revealed negative results after injection of IS-FBFF antiserum at metestrus, whereas T1 and T2 group female rats showed either insignificant changes or fluctuated changes compared with that of control female rats.

At 8th day of gestation, the number of uterine implantation sites recorded significant increase in T3 female rats, injected with S-FBFF antiserum at metestrus phase, and significant decrease in T1, T2 and T4 female rats, injected with S-FBFF at proestrus, IS-FBFF at proestrus and IS-FBFF antiserum at metestrus phase, respectively, among experimental groups.

It can be concluded that S-FBFF antiserum, when supplemented at metestrus, has immunoneutralization effect against endogenous inhibin, which causes increased ovarian growth and development, elevation of serum FSH, estradiol, GH, IGF-1 and IGF-2 levels and ovarian FSH and GH as well as pituitary IGF-1 IGF-2 and GH gene expression levels. Thus passive immunization against follicular inhibin can be applicable for improvement of ovarian functions and reproductive fecundity. The present result might have an application approach in the future studies.