

## تعداد نوروں‌های تولید کننده هورمون آزادکننده گونادوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش

محمد رضا جعفرزاده شیرازی<sup>۱</sup> و امین تمدن<sup>۲</sup>

۱- استادیار، دانشگاه شیراز

۲- استادیار، مرکز تحقیقات فناوری ترانسژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، (نویسنده مسول: amintamaddon@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳

### چکیده

در پژوهش کنونی تعداد نوروں‌های تولید کننده هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) در ناحیه پیش‌بینایی (POA) هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش مورد مقایسه قرار گرفت. هیپوتالاموس چهار گروه میش (n=۳) تخمدان‌برداری شده، پرواستروس، استروس و لوتئال بعد از پرفیوژن خارج شد. تعداد نوروں‌های تولید کننده GnRH در ناحیه POA با استفاده از روش ایمنونوهیستوشیمی بین چهار گروه مقایسه شد. نوروں‌های GnRH در ناحیه POA در هر چهار گروه وجود داشتند. میانگین تعداد نوروں‌های تولید کننده GnRH در گامه استروس در مقایسه با گروه تخمدان‌برداری شده به طور معنی‌داری بیشتر بود. در حالی که تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد نوروں‌های تولید کننده GnRH در سه گامه فحلی میش در ناحیه POA وجود نداشت. عدم تفاوت در تعداد نوروں‌های تولید کننده GnRH در ناحیه POA هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش می‌تواند نشانگر این موضوع باشد که این سلول‌ها در تعداد نسبتاً ثابت و احتمالاً تنها با کنترل آزادسازی GnRH و تغییر در میزان ترشح GnRH کنترل چرخه فحلی را انجام می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: هورمون آزاد کننده گونادوتروپین، ناحیه پیش‌بینایی، چرخه فحلی، میش

### مقدمه

پیش‌بینایی<sup>۲</sup> (POA) تولید می‌شود که آکسون‌های آنان به ناحیه برجستگی میانی<sup>۳</sup> کشیده می‌شوند (۱۶). تراوش پالسی GnRH به داخل خون پورتال هیپوفیزی، سبب تولید هورمون لوتئینیزه کننده<sup>۴</sup> (LH) و هورمون محرک فولیکول<sup>۵</sup> (FSH) در سلول‌های گونادوتروپ هیپوفیز می‌شود (۱۷).

تولیدمثل، نتیجه برهم‌کنش بین عوامل تنظیم کننده هیپوتالاموس، هیپوفیز قدامی و گنادها است. عامل اصلی در کنترل تولیدمثل، تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین<sup>۱</sup> (GnRH) است (۴). در بیشتر گونه‌های پستانداران، این پپتید در نوروں‌های هسته

1- Gonadotropin releasing hormone

2- Preoptic area

3- Median eminence

4- Luteinizing hormone

5- Follicle stimulating hormone

### مواد و روش‌ها

۱۲ راس میش نژاد کوریدال با وزن تقریبی ۴۰ کیلوگرم و سن ۳ سال، پس از انتخاب در فصل جفت‌گیری در شرایط مشابه محیطی و تغذیه‌ای نگهداری شدند. تخمدان سه راس از میش‌ها با جراحی برداشته شد و پس از بهبودی در پژوهش استفاده شد. ۹ راس دیگر از میش‌ها بر اساس غلظت پلاسمایی پروژسترون و LH خون (۱) در سه گروه سه تایی گامه‌های چرخه فحلی پرواستروس، استروس و لوتئال قرار گرفتند. از روش الیزا برای اندازه‌گیری LH (اندوکراین تکنولوژی، آمریکا) با حساسیت ۰/۳۳ نانوگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. غلظت پروژسترون سرم با روش رادیوایمیونواسی (ایمیونوتک، فرانسه) با حساسیت ۰/۰۵ نانوگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. به هر میش دو تزریق هیپارین به میزان ۲۵۰۰۰ واحد با فاصله ۱۰ دقیقه انجام شد تا در زمان تزریق درون رگی پارافرمالدهید احتمال انعقاد خون به حداقل برسد. بی‌درنگ بعد از تزریق هیپارین، میش‌ها با تزریق سدیم پنتوباریتال در سرخرگ کاروتید کشته شدند. سپس تزریق درون رگی سرهای آنها با ۶ لیتر پارافرمالدهاید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) دارای هیپارین (۱۰ واحد بر میلی‌لیتر) انجام شد. پس از خارج کردن مغزها، ناحیه داین‌سفالون (که دارای POA است) جدا شده و در بافر فرمالین ۱۰٪ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴

گوناودتروپین‌های فوق سبب رشد فولیکول‌ها و تحریک تخمک‌ریزی می‌شوند. در میش، الگوی تراوش GnRH و گوناودتروپین‌ها در خلال چرخه فحلی متغیر است و با اثر فیدبکی استروئیدهای تخمدان به هیپوتالاموس و هیپوفیز، کنترل می‌شود. در گامه لوتئال چرخه فحلی، غلظت بالای پروژسترون و در گامه فولیکولی، غلظت کم پروژسترون و افزایش در غلظت استرادیول به ترتیب سبب کاهش و افزایش بسامد تراوش GnRH می‌شود (۱۳). تراوش GnRH در موش صحرایی با فعال شدن جسم سلولی نوروهای تولید کننده GnRH در POA هیپوتالاموس، تغییرات ساختاری محل آزادسازی GnRH و ایجاد شرایط تماس مستقیم انتهای آکسون به فضای دور رگی کنترل می‌شود (۱۰، ۱۶). عوامل مختلفی نظیر استرس، تغذیه و فصل (در گونه‌های با الگوی تولیدمثل فصلی) بر عملکرد سلول‌های GnRH اثر دارند (۹). یکی از پرسش‌های مهم در عملکرد فیزیولوژی هورمون GnRH نحوه تولید GnRH و اثر آن بر ترشح یا سرژ این هورمون است. در این رابطه پژوهش‌های اندکی در مورد تعداد سلول‌های تراوش کننده GnRH در هیپوتالاموس میش در خلال چرخه فحلی وجود دارد. هدف این پژوهش بررسی تغییرات تعداد نوروهای تولید کننده GnRH در گامه‌های چرخه فحلی در POA هیپوتالاموس میش می‌باشد.

علیه بز که در سرم خرگوش (۱:۲۵۰، Alexa Jackson Immunoresearch، 568 Laboratories، آمریکا) تولید شده بود برای نمایان شدن GnRH به مدت یک ساعت اضافه شدند. بعد از این که نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شدند، در زیر میکروسکوپ کنترل شدند و سپس با محلول تثبیت کننده ضد کمرنگ شدگی (antifade) ماده فلورسنت (Dako، آمریکا) پوشانیده شدند. برای کنترل منفی مرحله انکوبه آنتی‌بادی اولیه حذف و کلیه مراحل ایمونوهیستوشیمی انجام شد که نوروں تولید کننده GnRH یافت نشد. مراحل نمونه‌برداری و آماده سازی در مزرعه وربی دانشگاه موناخ استرالیا و ارزیابی نمونه‌ها بعد از انتقال در دانشگاه شیراز انجام شد. کلیه مراحل پژوهش تحت نظارت کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه موناخ انجام شد.

در هر برش POA تعداد نوروں‌های واکنش دهنده ایمنی GnRH با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss، آلمان) در طول موج ۵۴۳ شمارش شدند (۱۵). تفاوت میانگین تعداد نوروں‌های دارای GnRH در هر چهار گروه با استفاده از آزمون من-ویتنی<sup>۱</sup> در نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شدند. تعداد نوروں‌های دارای GnRH به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار گزارش شد. از سطح معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

ساعت نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها در محلول سوکروز ۳۰٪ (Sigma-Aldrich، آمریکا) قرار داده شدند. بافت POA با روشی که توسط اسمیت و همکاران (۱۸) شرح داده شده است، جمع‌آوری و آماده شد. پس از ۲۴ ساعت، مغزها از محلول سوکروز خارج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قطعه‌های یخ زده به شیوه کورونال و به ضخامت ۵۰ میکرومتر با میکروتوم (Cryostat، Leica، آلمان) برش داده شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، در محلول بافر سوکروز ۳۰٪ نگهداری شدند.

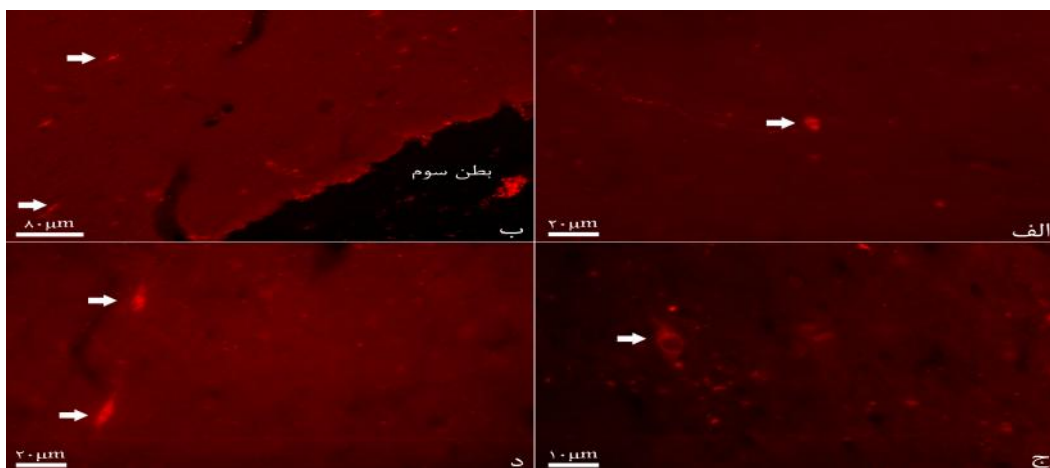
برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، از هر میش سه برش دارای نواحی قدامی، میانی و خلفی ناحیه POA انتخاب شده و روی اسلاید میکروسکوپی تثبیت شدند. برش‌های بافت به منظور بازیابی آنتی‌ژنی با محلول ۰/۰۵ مولار فسفات بافر سالین دو بار و به مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس شسته شدند. سپس برش‌ها در سرم بلوک کننده حاوی Triton X-100 ۰/۳٪ و سرم نرمال بز ۱۰٪ محلول در فسفات بافر سالین ۰/۱ مولار به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه GnRH (۱:۱۰۰۰) که در بز تولید شده بود (Vector Laboratories، آمریکا) اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. برش‌ها ابتدا با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه-الکسا ۵۶۸ بر

1- Mann-Whitney test

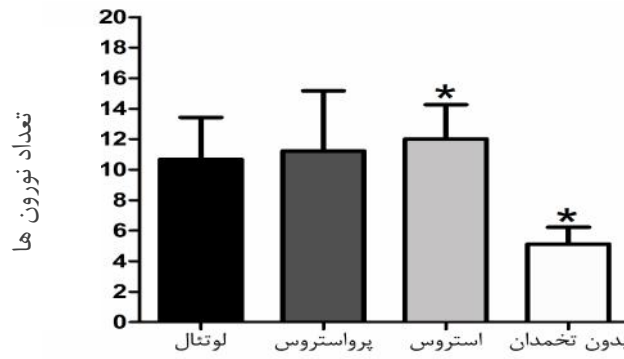
## نتایج و بحث

غلظت پروژسترون در گامه لوتئال ۳/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و غلظت LH در گامه‌های لوتئال، پرواستروس و استروس به ترتیب ۱/۰، ۱/۴ و ۵۱/۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. پس از انجام ایمونوهیستوشیمی برشهای حاوی POA، وجود نورون‌های تولید کننده GnRH مشخص و اثبات گردید. شکل ۱ حضور نورون‌های تولید کننده GnRH را در POA میش‌های تخمدان‌برداری شده و در گامه‌های پرواستروس، استروس و لوتئال چرخه فحلی نمایش می‌دهد که درخششی قرمز رنگ داشتند. میانگین و انحراف معیار تعداد نورون‌های تولید کننده GnRH در POA میش‌های استروس (۱۲±۲/۲۶ عدد) به طور معنی‌داری بیشتر از میش‌های تخمدان‌برداری شده (۵/۱۱±۱/۱۲ عدد) بود (شکل ۲). (P=۰/۰۱۴) در حالی که میانگین تعداد نورون‌های تولید کننده GnRH در

POA میش‌های پرواستروس (۱۱/۲۲±۳/۹۵ عدد) و لوتئال (۱۰/۶۷±۲/۷۵ عدد) با میش‌های تخمدان‌برداری شده تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین بین تعداد نورون‌های تولید کننده GnRH در POA میش در گامه‌های لوتئال، پرواستروس و استروس از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). این پژوهش نشان داد که در گامه‌های گوناگون چرخه فحلی میش میانگین تعداد نورون‌های موجود در POA که GnRH را تولید می‌کنند تغییر نمی‌کند. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که در طول چرخه طبیعی فحلی میش تمام نورون‌های GnRH در تولید این نوروپپتید مشارکت دارند. تغییرات فصل نیز تغییری در تعداد و موقعیت نورن‌های GnRH در مغز میش نشان نداد (۱۱). در میش افزایش غلظت استرادیول در گامه فولیکولی سبب سرژ GnRH می‌شود (۶، ۹).



شکل ۱- نمونه‌ای از نورون‌های (پیکان) تولید کننده هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی در هسته پیش‌بینایی هیپوتالاموس در گامه‌های لوتئال (الف)، استروس (ب) و پرواستروس (ج) چرخه فحلی میش و میش تخمدان‌برداری شده (د).



شکل ۲- اثر گامه‌های چرخه فحلی و حضور تخمدان بر میانگین  $\pm$  خطای معیار تعداد نورون‌های تولید کننده هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) در هسته پیش‌بینایی در چهار گروه مطالعه میش (n=۳). ستاره نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

ندارد. بنابراین در میش سایر روش‌های ذکر شده اثر استروژن بر GnRH ممکن است تاثیر کمتری داشته و ترشح یا سرژ GnRH به روش‌های دیگر کنترل شوند.

در پستانداران مختلف همچون موش صحرایی و انسان موقعیت نورون‌های GnRH در هیپوتالاموس نشان داده شده است (۱۲)، GnRH در هیپوتالاموس گاو محدود به ساقه هیپوفیز و قسمت پیشین هیپوتالاموس می‌باشد (۲). وجود ارتباط بین نورون‌های تولید کننده GnRH در POA گوسفند با پایانه‌های نورون‌های تولید کننده اورکسین (orexin) گزارش شده است (۷). همچنین تولید همزمان GnRH و کیس‌پپتین (kisspeptin) در سلول‌های POA گوسفند مشاهده شده است (۱۵). کیس‌پپتین نقش کلیدی در ترشح GnRH دارد و نشان داده شده است که میزان تولید ژن KiSS-1 در میش در گامه فولیکولی بیشتر از لوتئال است (۳). این در حالی است که در پژوهش قبلی (۸) نشان داده شد که تعداد نورون‌های تولید کننده پپتید کیس‌پپتین در گامه‌های گوناگون

در گامه‌های دیگر چرخه، استروژن مسئول اثر مهاری بر ترشح گونادوتروپین است (۶). استروژن می‌تواند در پستانداران به چهار روش در آزاد شدن GnRH از شبکه نورون‌های آن موثر باشد (۵، ۱۴). روش اول اثر مستقیم و غیرمستقیم استروژن در تولید گیرنده‌های استروژنی و اثر بر سنتز GnRH، روش دوم اثر بر سلول‌های گلیال و برهمکنش بر بدنه یا پایانه‌های نورون GnRH، روش سوم اثر غیرمستقیم توسط گیرنده‌های استروژنی نورون‌های آوران به سلول‌های GnRH و روش چهارم اثر غیرمستقیم بر اندوتلیوم عروقی که تنظیم کننده عملکرد پایانه‌های نورون GnRH هستند (۵، ۱۴). از آنجا که نتایج این مطالعه نشان داد که حذف اثر تخمدانی در میش سبب کاهش تعداد سلول‌های تولید کننده GnRH در POA می‌شود می‌توان این احتمال را مطرح کرد که حذف اثر استروژن تخمدانی در میش سبب کاهش تولید GnRH به روش اول در POA هیپوتالاموس می‌شود و در زمان حضور تخمدان تعداد نورون‌های تولید کننده GnRH در گامه‌های مختلف چرخه تفاوتی

سیستم پورتال هیپوتالاموس- هیپوفیز آزاد شده و با تاثیر بر سلول‌های گونادوتروپ سبب ترشح LH شوند.

عدم تفاوت در تعداد نورون‌های تولیدکننده GnRH در ناحیه POA هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش می‌تواند نشانگر این موضوع باشد که این سلول‌ها در تعداد ثابت و تنها با کنترل آزادسازی GnRH و تغییر در میزان ترشح GnRH کنترل چرخه فحلی را انجام می‌دهند. هم‌چنین می‌توان تخمین زد که نورون‌های تحریک کننده دیگری بر میزان ترشح GnRH در میش موثرند.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارمندان مزرعه وری‌بی دانشگاه موناخ استرالیا سپاسگزاری می‌کنند.

چرخه فحلی میش تفاوت معنی‌داری ندارد. ممکن است تغییر نکردن تعداد نورون‌های تولید کننده GnRH در گامه‌های گوناگون فحلی همچون تعداد نورون‌های کیس‌پتین (به عنوان عامل محرک ترشح GnRH) به این سبب باشد که نورون‌های کیس‌پتین در سنتز و ساخت این هورمون موثر نبوده و فقط بر آزاد سازی آن تاثیر بگذارند. در پژوهشی دیگر (۱۵) روشن شد که تاثیر کیس‌پتین بر آزادسازی هورمون آزاد کننده از راه برجستگی میانی است و بر تولید GnRH در ناحیه پیش‌بینایی اثری ندارد که با نتایج پژوهش کنونی همخوانی دارد. نورون‌های کیس‌پتین و GnRH در ناحیه برجستگی میانی با هم تولید می‌شوند (۱۵) که ممکن است اثر اتوکراین کیس‌پتین بر ترشح GnRH از پایانه نورون‌های آن در ناحیه برجستگی میانی را نشان دهد و یا این که این دو ترکیب با هم در

#### منابع

1. Cumming, I.A., J.M. Brown, J.R. Goding, G.D. Bryant and F.C. Greenwood. 1972. Secretion of prolactin and luteinizing hormone at oestrus in the ewe. *Journal of Endocrinology*, 54: 207-213.
2. Estes, K.S., V. Padmanabhan and E.M. Convey. 1977. Localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) within the bovine hypothalamus. *Biology of Reproduction*, 17: 706-711.
3. Estrada, K.M., C.M. Clay, S. Pompolo, J.T. Smith and I.J. Clarke. 2006. Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 806-809.
4. Foster, D.L. 1994. Puberty in the sheep. In: Knobil, E. and J.D. Neill, (eds.) *The Physiology of Reproduction*. 411-452 pp. Raven Press. New York.
5. Herbison, A.E. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Review*, 19: 302-330.

6. Herbison, A.E. 2006. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Neill, J.D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 1415-1482 pp, Academic Press USA.
7. Iqbal, J., S. Pompolo, T. Sakurai and I.J. Clarke. 2001. Evidence that orexin-containing neurones provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ovine hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 1033-1041.
8. Jafarzadeh Shirazi, M.R., H. Sepehri and H.R. Gheisari. 2008. Effect of different phases of estrous cycle on kisspeptin expression in the arcuate nucleus of the ewe. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 1101-1104.
9. Karsch, F.J., J.M. Bowen, A. Caraty, N.P. Evans and S.M. Moenter. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biology of Reproduction*, 56: 303-309.
10. King, J.C., P.M. Ronsheim and B.S. Rubin. 1995. Dynamic relationships between LHRH neuronal terminals and the end-feet of tanycytes in cycling rats revealed by confocal microscopy. *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*. San Diego, CA.
11. Lehman, M.N., J.E. Robinson, F.J. Karsch and A.J. Silverman. 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (lhrh) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *Journal of Comparative Neurology*, 244: 19-35.
12. Merchenthaler, I., T. Göres, G. Sétáló, P. Petrusz and B. Flerkó. 1984. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell and Tissue Research*, 237: 15-29.
13. Moenter, S.M., A. Caraty, A. Locatelli and F.J. Karsch. 1991. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129: 1175-1182.
14. Petersen, S.L., E.N. Ottem and C.D. Carpenter. 2003. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biology of Reproduction*, 69: 1771-1778.
15. Pompolo, S., A. Pereira, K.M. Estada and I.J. Clarke. 2006. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, 147: 804-810.
16. Prevot, V., D. Croix, C.M. Rialas, P. Poulain, G.L. Fricchione, G.B. Stefano and J.C. Beauvillain. 1999. Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology*, 140: 652-659.
17. Prevot, V., N. Bellefontaine, M. Baroncini, A. Sharif, N.K. Hanchate, J. Parkash, C. Campagne and S.D. Seranno. 2010. Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *Journal of Neuroendocrinology*, 22: 639-49.
18. Smith, J.T., Q. Li, A. Pereira and I.J. Clarke. 2009. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 150: 5530-5538.
19. Yahalom, D., A. Chen, N. Ben-Aroya, S. Rahimipour, E. Kaganovsky, E. Okon, M. Fridkin and Y. Koch. 1999. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS letters*, 463: 289-294.

## **Number of Neurons Expresses Gonadotropin Releasing Hormone in the Hypothalamic Preoptic Area During the Phases of Estrous Cycle of Ewe**

**Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi<sup>1</sup> and Amin Tamadon<sup>2</sup>**

---

1- Assistant Professor, University of Shiraz

2- Assistant Professor, Transgenic Technology Research Center, Medical Sciences of Shiraz University  
(Corresponding author: amintamaddon@yahoo.com)

Received: October 11, 2012

Accepted: September 25, 2013

---

### **Abstract**

In the present study number of neurons that express gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the ewe preoptic area (POA) of hypothalamus were compared between the phases of estrous cycle. Hypothalamus of four ewe groups (n=3) of ovariectomized, proestrus, estrus, and luteal were removed after perfusion. The number of GnRH neurons in the POA of four groups was compared, using immunohistochemistry method. GnRH neurons were present in the POA of four groups of ewe. The mean of number of GnRH neurons in estrus ewes was more than ovariectomized ewes. However, there was not significant difference between the numbers of GnRH neurons of POA in three estrous phases. No difference for the number of neurons that express GnRH in the POA of hypothalamus during estrous phases of ewes might indicate that these relatively fixed number cells may perform the estrous cycle control only by control of GnRH release and changing of the secretion of GnRH.

**Keywords:** Gonadotropin releasing hormone, Preoptic area, Estrous cycle, Ewe