Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 2, 2016, (1-8)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Млечна продуктивност на крави и хематологични параметри при хранене със смеска „Биолеккс“ и бентонитна глина

Олга Иванова[1]*, Евгени Иванов[2], Микхаил Филипиев[3], Любов Гордиенко[4]

[1]Директор на Федерален държавен бюджетен институт “Красноярски изследователски институт по животновъдство“, Красноярск, Руска федерация
[2] Научен сътрудник към Федерален държавен бюджетен институт “Красноярски изследователски институт по животновъдство“, Красноярск, Руска федерация
[3] Старши научен сътрудник към Федерален държавен бюджетен институт “Красноярски изследователски институт по животновъдство“, Красноярск, Руска федерация
[4] Директор на Федерален държавен бюджетен научен институт "Всерусийски изследователски институт по бруцелоза и туберкулоза при животните", кандидат на ветеринарните науки, Омск, Руска федерация

**E-mail: o.v.ivanova@bk.ru*

Milk productivity and hematological parameters of cows while feeding them premix «Biolekks» and bentonite clay

Olga Ivanova[1*], Evgeny Ivanov[2], Mikhail Filipjev[3], Lyubov Gordienko[4]

[1] *Director of Federal State Budget Institution “Krasnoyarsk Scientific Research Institute of Animal Husbandry”, Krasnoyarsk, the Russian Federation*
[2] Research associate of Federal State Budget Institution “Krasnoyarsk Scientific Research Institute of Animal Husbandry”, Krasnoyarsk, the Russian Federation
[3] Senior research associate of Federal State Budget Institution “Krasnoyarsk Scientific Research Institute of Animal Husbandry”, Krasnoyarsk, the Russian Federation
[4] Director of Federal State Budget Scientific Institution “All-Russian Research Institute of brucellosis and tuberculosis of animals”, candidate of veterinary sciences, Omsk, the Russian Federation

РЕЗЮМЕ

Приложението на смеска „Биолеккс“, в съчетание с бентонитна глина (300 g/h) към фуражната дажба на крави има благоприятно въздействие върху млечната продуктивност, нейния състав и хематологичните параметри. Установено е, че млечността се пови-

SUMMARY

Using of premix «Biolekks» (14g/h) in combination with bentonite clay (300 g/h) in cows feeding ration has a positive effect on milk productivity, its chemical composition and hematological parameters. It is defined that milk yield increased by 9.2 % (P≤0,999), outcome of

шава с 9.2 % (P>0,999), млечните мазнини с 21,5 (P>0,999), и млечният протеин с 11.5 % (P>0,999).

Ключови думи: смеска „Биолеккс“, бентонитна глина, крави, млечност, фуражна дажба, теглово отношение на мазнини, теглово отношение на протеини

milk fat by 21,5 (P≤0,999), milk protein by 11.5 % (P≤0,999).

Key words: premix «Biolekks», bentonite clay, cows, milk yield, feeding ration, mass fraction of fat, mass fraction of protein

УВОД

При производството на здравословна дажба е необходимо да се използват нетрадиционни сурови суровини, най-вече с местен произход. Опитът придобит в Русия, както и в други страни, потвърждава високата ефективност при използването на природни минерални ресурси в дажбата на селскостопанските животни (Karmatskikh, 2009). Като източник на минерали, заедно с традиционния creep feed при отглеждането на животни, се препоръчва употребата на природни минерали, като например бентонити. Освен богатия минерален състав, те имат добри характеристики на поглъщане (Yarmots, 2014).

Люспите от семена на шишарки от корейски бор съдържа тритерпенови сапунини, редица катехинови танини, фитостероли, мастни киселини, включително линолова, олеинова, палмитинова, и макро и микроелементи (Prikhodko,2004).

Смеската "Биолеккс" съдържа смляни люспи от семена от шишарки на корейски бор, от която е отстранена вредната борова смола. Въпреки това е запа-

INTRODUCTION

In production of wholesome ration is necessary to use non-traditional raw materials especially of local origin. The experience gained in Russia as well as in other countries confirms a high efficiency of implementing natural mineral recourses in ration of farm cattle. (Karmatskikh, 2009).

As a source of minerals along with the traditional creep feed in animal breeding it is recommended to use natural minerals, such as bentonites. In addition to their rich mineral composition, they have good sorption characteristics (Yarmots, 2014).

The husk of Korean pine-cones contains triterpenoid saponins, tannins catechin number, phospholipids, phytosterols, fatty acids, including linoleic, oleic, palmitic, and macro - and micro nutrients (Prikhodko, 2004).

Premix “Biolekks” includes shredded husk of Korea pine-cones from which harmful pine pitch is removed. However a great amount of balanced mineral

зено голямо количество от балансирани минерални природни и жизненоважни съставки (Golubkov, Shishlenin, Krivonosov, 2014).

Целта на изследването е да се проучи млечната продуктивност и хематологичните параметри при крави хранени със смеска "Биолеккс" и бентонитна глина.

natural and vital ingredients are saved in (Golubkov, Shishlenin, Krivonosov, 2014).

The purpose of investigation is studying milk productivity and hematological parameters of cows while feeding premix «Biolekks» and bentonite clay.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е извършено върху крави от черно-шарена порода отглеждани във развъдна ферма "Таежни" ООД, в Сухобузимски район, Красноярска област.

Смеската "Биолеккс" е произведена в Научна и производствена асоциация "Биолеккс", в Хабаровск. Тя съдържа ектракт от люспа от семена от корейски бор, пшенично брашно, минерали (железен сулфат, цинков сулфат, магнезиев сулфат, калиев йодид, кобалтов хлорид), мастноразтворими витамини (A, D3, E, K), водоразтворими витамини (C, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B12, BC, N), аминокиселини (метионин и лизин).

Бентонитната глина се добива в Република Хакасия. Безопасната употреба е гарантирана със сертификат за съответствие според системата за управление на качеството GOST R ISO 9001-2001.

Планът на експеримента е представен в Таблица 1.

MATERIAL AND METHODS

The research has been held on cows of black and motley breed in breeding Farm «Taezhny» Ltd, In Sukhobuzimsky region of Krasnoyarsk krai.

The premix «Biolekks» is produced in Khabarovsk, Science and production Association (SPA) «Biolekks». It consists of the extract of the husk of cones of the Korean pine, wheat flour, minerals (sulfate iron, zinc sulfate, manganese sulfate, sodium Selenite, potassium iodide, cobalt chloride), fat soluble vitamins (A, D_3, E, K) water soluble vitamins (C, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_{12}, BC, N), amino acids (methionine and lysine).

Bentonite clay is mined in Khakass Republic. Safety of use is confirmed with the certificate of conformity of quality management system GOST R ISO 9001-2001.

The scheme of experiment is presented in the Table 1.

Таблица 1. План на експеримент за хранене с бентонитна глина и смеска „Биолеккс“
Table 1. The scheme of experiment feeding bentonite clay and premix «Biolekks»

Група/Group №	Количество/глава Quantity/head	Продължителност на експеримента/дни Duration of experiment/days	Схема на хранене/Feeding schedule
Контролна група Testing group	20	100	Основна дажба (ОД): силаж от люцерна – 25 kg, зърнена меласа – 5 ltr, пшенична слама – 0,5 kg, ечемик – 3,5 kg, овес - 2,6 kg, пшенични трици – 2,6 kg Basic Ration (BR): Medick heylage – 25 kg, grain molasses – 5 ltr, wheat straw – 0,5 kg, barley – 3,5 kg, oats - 2,6 kg, wheat middling – 2,6 kg
1ва експеримен-тална 1st experimental	20	100	ОД + смеска „Биолеккс“ 14 g/глава BR+ premix «Biolekks» 14g/head
2ра експеримен-тална 2nd experimental	20	100	ОД + смеска „Биолеккс“ 14 g/глава + бентонит 300 g/глава / BR+ premix «Biolekks» 14g/head + bentonite 300g/head)

Към основната дажба е добавена смеска "Биолеккс" за крави от първата експериментална група (14 g/глава/24-часа), както и смеска "Биолексс" (14g/глава) + бентонитна глина (300 g/глава/24-часа) за крави от втората експериментална група.

To the basic ration was added premix «Biolekks» for the cows of the first experimental group (14 g/head/24-hours) and premix «Biolekss» (14g/head) + bentonite clay (300 g/head/24-hours) for the cows of the second experimental group.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Млечната продуктивност на кравите се счита като основен критерий за балансирания хранителен режим. Резултатите от млечната продуктивност при експериментите с крави за въздействието на смеска "Биолеккс" и бентонитна глина са представени в Таблица 2.

В първите сто дни от лактационния период на кравите, първата и втора експериментална група показва по-висок млечен добив в сравнение със същите параметри на контролната група съответно с 4,3

RESULTS AND DISCUSSION

Milk productivity of cows is considered as main criteria of balanced diet. The results of milk productivity of experimental cows under the influence of premix «Biolekks» and bentonite clay are presented in the Table 2.

For the first hundred days lactation period the cows of the first and the second experimental groups had higher milk-yield compare to the same parameters of testing group correspondingly to 4,3 ($P \leq 0,999$) and 9,2 %

(P≤0,999) и 9,2 % (P≤0,999), млечни мазнини – 13,5 (P≤0,999) и 21,5 % (P≤0,999), млечен протеин с 7,4 (P≤0,999) и 11,5 % (P≤0,999).

(P≤0,999), milk fat– by 13,5 (P≤0,999) and 21,5 % (P≤0,999),milk protein by 7,4 (P≤0,999) and 11,5 % (P≤0,999).

Таблица 2. Млечна продуктивност на крави по време на хранене със смеска „Биолеккс“ и бентонитна глина
Table 2. Milk productivity of cows while feeding them premix «Biolekks» and bentonite clay

Показател Indicator	Група / Group		
	Контролна testing	1ва експериментална 1st experimental	2ра експериментална 2nd experimental
Млечност за 100 дни лактация, kg Milk-yield for 100 days of lactation, kg	2288,05±11,21	2386,85±19,09***	2497,45±28,81***
Среден дневен добив, kg Average daily yield, kg	22,2±0,21	23,17±0,24**	24,25±0,27***
Теглово отношение на мазнини, % Mass fraction of fat,%	3,54±0,08	3,83±0,08*	3,91±0,07**
Теглово отношение на мазнини за 24-часа, kg Mass fraction of fat per 24-hours, kg	0,90±0,04	1,01±0,04*	1,09±0,04**
Млечни мазнини, kg Milk fat, kg	82,93±0,56	94,12±0,97***	100,80±0,71***
Теглово отношение на протеин, % Mass fraction of protein, %	2,91±0,01	2,98±0,02**	2,95±0,02
Теглово отношение на протеин за 24-часа, kg Mass fraction of protein per 24-hours, kg	0,74±0,04	0,78±0,04	0,82±0,04
Млечен протеин, kg Milk protein, kg	68,26±0,66	73,29±0,64***	76,10±0,81***

Освен това, млечният добив е по-висок при втората експериментална група в сравнение с първата с 4,4%, млечни мазнини с 6,6%, млечен протеин с 3,7%.

Кръвта е тъкан, в която се отразяват всички най-жизненоважни функции за всеки организъм. Тя предоставя хранителни вещества на всички органи и отнася всички ненужни отпадни продукти от метаболизма. Тя изпълнява сложни функции за защита на организма от вредни последици. Ендокринните жлези също оказват влияние върху организма чрез кръвта.

Along with this, the milk-yield was more in the second experimental group compare to the first one by 4,4%, milk fat by 6,6%, milk protein by 3,7%

Blood is a tissue, in which is reflected all the most vital and important functions of any organism. It provides all organs and tissues with nutrients and carries away all unnecessary waste products of metabolism. It performs complex functions to protect the organism from harmful consequences. Endocrine glands influence on organism through the blood as well.

В Таблица 3 са представени хематологичните параметри на крави при въздействието на смеската "Биолеккс" и бентонитна глина в началото на експеримента.

In the Table 3 the hematological parameters of cows under the influence of premix «Biolekks» and bentonite clay at the beginning of experiment are presented.

Таблица 3. Хематологични параметри на крави при въздействието на смеска „Биолеккс“ и бентонитна глина в началото на експеримента
Table 3. Hematological parameters of cows under the influence of premix «Biolekks» and bentonite clay at the beginning of experiment

Показател Indicator	Група / Group		
	Контрола / Testing	1ва експериментална 1st experimental	2ра експериментална 2nd experimental
Калций / Calcium, mmol/L	2,2±0,10	2,4±0,06	2,5±0,11
Фосфор / Phosphorus, mmol/L	2,2±0,14	2,1±0,16	2,2±0,11
Суров протеин / Crude protein, g/l	75,9±0,91	75,2±1,19	76,5±3,19
Каротин / Carotene, mg%	0,1±0,03	0,1±0,02	0,1±0,01
Алкални резерви Alkali reserve, mg%	41,1±2,96	38,3±6,78	47,3±4,79
Глюкоза / Glucose, mmol/L	1,9±0,08	1,9±0,12	1,9±0,10
Цинк/Zink, mcg%	94,5±2,41	91,5±8,47	103,5±37,73
Магнезий / Magnezium, mmol/L	1,1±0,09	1,1±0,06	1,1±0,07
Калий / Potassium, mmol/L	5,1±0,32	5,7±0,17	5,2±0,28
Желязо / Ferrum, mmol/L	18,7±0,74	20,9±0,73	19,8±2,27
Холестерол / Cholesterol, mmol/L	5,7±0,27	6,9±0,88	5,4±0,79
Албумин/Albumin, g/l	27,2±1,04	27,0±1,16	25,3±1,11
Натрий/Sodium, mmol/L	134,7±3,48	136,2±3,50	133,9±4,3
Креатинин / Creatinin, mcmol/L	124,9±2,16	121,8±3,91	122,9±6,24
Мед/Cuprum, mcg%	48,8±0,71	52,5±4,73	44,8±6,95
КЕТ	Не е установен/Not found		

Според данните във втората таблица, биохимичните параметри на кръвта не оказват никакви значими разлики във всички три групи в началото на експеримента. Концентрацията на глюкоза е в нормите като се колебае в рамките на 2,3-4,4 mmol/L. Въпреки това, във всички три групи концентрацията на глюкоза е сходна (1,9 mmol/L), под нормата от 17,4%; при цинка с 8,5%. Нивото на холестерол надвишава нормите с 8-38%.

According to the data in the second table the biochemical parameters of blood didn’t have any significant differences in all three groups at the beginning of experiment. The concentration of glucose was in norm and fluctuated within 2,3-4,4 mmol/L. However, in all groups the glucose concentration was identical (1,9 mmol/L) which was below the norm by 17,4%; Zink by 8,5%. The level of cholesterol exceeded the norms by 8-38%

В Таблица 4 са представени хематологичните параметри

In the Table 4 the hematological parameters of cows

на крави при въздействието на смеската "Биолеккс" и бентонитна глина в края на експеримента.

under the influence of premix «Biolekks» and bentonite clay at the end of experiment are presented.

Таблица 4. Хематологични параметри на крави при въздействието на смеска „Биолеккс“ и бентонитна глина в края на експеримента
Table 4. Hematological parameters of cows under the influence of premix «Biolekks» and bentonite clay at the end of experiment

Показател Indicator	Група / Group		
	Контрола/Testing	1ва експериментална 1st experimental	2ра експериментална 2nd experimental
Калций / Calcium, mmol/L	2,2±0,10	2,4±0,06	2,5±0,11
Фосфор / Phosphorus, mmol/L	2,2±0,14	2,1±0,16	2,2±0,11
Суров протеин / Crude protein, g/l	75,9±0,91	75,2±1,19	76,5±3,19
Каронтин / Carotene, mg%	0,1±0,03	0,1±0,02	0,1±0,01
Алкални резерви / Alkali reserve, mg%	41,1±2,96	38,3±6,78	47,3±4,79
Глюкоза / Glucose, mmol/L	1,9±0,08	1,9±0,12	1,9±0,10
Цинк / Zink, mcg%	94,5±2,41	91,5±8,47	103,5±37,73
Магнезий / Magnezium, mmol/L	1,1±0,09	1,1±0,06	1,1±0,07
Калий / Potassium, mmol/L	5,1±0,32	5,7±0,17	5,2±0,28
Желязо / Ferrum, mmol/L	18,7±0,74	20,9±0,73	19,8±2,27
Холестерол / Cholesterol, mmol/L	5,7±0,27	6,9±0,88	5,4±0,79
Албумин / Albumin, g/l	27,2±1,04	27,0±1,16	25,3±1,11
Натрий / Sodium, mmol/L	134,7±3,48	136,2±3,50	133,9±4,3
Креатинин / Creatinin, mcmol/L	124,9±2,16	121,8±3,91	122,9±6,24
Мед / Cuprum, mcg%	48,8±0,71	52,5±4,73	44,8±6,95
КЕТ	Не е установен/Not found		

Крави, които се хранят със смеска "Биолеккс" в съчетание с бентонитна глина имат по-засилен метаболизъм. В кръвта на втората експериментална група от крави, съдържанието на калций е по-високо, отколкото в контролната група, като при първата експериментална група е с 18,8-16,8%; желязото е с 31,9-45,2%, холестеролът с 6,1-7,0%; албуминът с 19,3-7,2; натрият с 8,9-15,0%.

Концентрацията на фосфор в кръвта на кравите от първата експериментална група е по-голямо, отколкото в контролната група и втората експериментална група съответно с 34,7 и 25,0%.

The cows eating premix «Biolekks» in combination with bentonite clay has more intensive metabolism. In the blood of the second experimental group cows the calcium content was higher than in testing group and in the first experimental one by 18,8-16,8%; ferrum by 31,9-45,2%' cholesterol by 6,1-7,0%; albumin by 19,3-7,2; sodium by 8,9-15,0%

In the blood of cows of the first experimental group the concentration of phosphorus was more than in the testing group and the second experimental group accordingly by 34,7 and 25,0%.

ИЗВОДИ

Така, кравите хранени със смеска "Биолеккс" в съчетание с бентонитна глина в тяхната хранителна дажба имат по-засилен метаболитен процес, което повлиява благоприятно биохимичните параметри на кръвта и млечната продуктивност. Млечността се повишава с 9,2% (P>0,999), млечните мазнини с 21,5 (P>0,999), млечният протеин с 11,5% (P>0,999).

CONCLUSIONS

Thus, the cows had been fed with premix «Biolekks» in combination with bentonite clay in their food ration had more intensive metabolism process and it influenced positively on biochemical parameters of blood and milk productivity. The milk yield increased by 9,2% (P>0,999), milk fat by 21,5 (P>0,999), milk protein by 11,5% (P>0,999).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Karmatskikh Yu. A**. Bentonite of Zyryansk mining in cattle and poultry ration. *Kurgan: Kurgan State Agricultural Academy*, 2009, 226.
2. **Yarmots G. A.** Scientific and practical basis of mineral nutrition of high producing dairy cattle in the Northern Transurals: *synopsis of a thesis of Doctor of Agriculture science,* 2014, Kurgan, 35.
3. Pr**ikhod'ko A. N.** The influence of the husk of Korean pine-cones on productive and reproductive functions of heifers: *synopsis of a thesis of Cand. of agricultural Sciences,* 2004, Ussuriysk, 107.
4. **Golubkov A. I., Krivonosov, A. D Shishlenin A. A.** Available energy of microbes of rumen and bacterial protein as a main source of increasing milk yield of dairy cows Agrosibir, 2014, 89, 18-21.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 2, 2016, (9-22)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Иновативни подходи при криоконсервация на сперма от биволи

Мария Иванова, Ирина Кирилова, Десислава Градинарска*, Деница Даскалова

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ Българска академия на науките, бул. Цариградско шосе 73, 1113 София, България
**E-mail: dessi_gr@abv.bg*

Innovative approaches in the cryopreservation of semen from buffalo bulls

Maria Ivanova, Irina Kirilova, Desislava Gradinarska*, Denica Daskalova

Institute of Biology and Immunology of Reproduction “Acad. Kiril Bratanov” Bulgarian Academy of Sciences, 73 Tzarigradsko shoes Blvd, 1113 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

С настоящите изследвания е направен анализ на спермално плазмени протеини от гледна точка на съхранение на спермалната плазмена мембрана и протекция на сперматозоиди от биволски бици от породата Българска Мурра. Чрез компютърно-асистиран спермоанализ са проследени мотилитета и скоростните параметри на сперматозоиди с доказана добра и ниска криотолерантност. Доказани са спермално плазмени протеини, които имат отношение към криотолерантността на сперматозоидите. Хроматографските профили на анализираните проби и криопротективната среда доказват сформиране на нови биокомплексни структури, специфични за еякулати с добра криотолерантност. Тези пикове се наблюдават между 9.193 минута и 11.015 минута и не присъстват в хроматограмите на спермалната плазма и на криопротективната среда. Това са гру-

SUMMARY

The aim of this research was to analyze seminal plasma proteins in terms of preservation of sperm plasma membrane and protection of spermatozoa from Bulgarian Murrah Buffalo bulls. Computer-assisted sperm analysis was used to determine the motility and velocity parameters of spermatozoa with proven good and poor cryotolerance. Seminal plasma proteins related to the cryotolerance of the spermatozoa were proven. The chromatographic profiles of the analyzed samples and the cryoprotective medium demonstrate formation of new biocomplex structures that are specific to the ejaculates with good cryotolerance. These peaks are observed between 9.193 minute and 11.015 minute and are not present in the chromatogram of the seminal plasma, or in the chromatogram of the cryoprotective medium. These are a group of proteins with molecular weights between 150 and

па протеини с молекулна маса между 150 и 200 kDa. Вероятно тези нови структури представляват някой BSP протеини от спермалната плазма, които са влезли във физикохимични взаимодействия с LDL липопротеини от криопротективната среда. Механизмът на протекция на тези нови биокомплексни структури е чрез вероятна адсорбция по повърхността на плазмената мембрана и участие в клетъчната сигнализация и активацията на сигнални пътища, предизвикващи декапацитация на гаметите. По този начин се осигурява добра протекция на сперматозоидите. Това е иновативен подход за успешно замразяване на сперма от биволски бици.

Ключови думи: бивол, сперматозоиди, криоконсервация, спермална плазма, биокомплекси

200 kDa. It can be assumed that these new structures represent some of the BSP proteins from the seminal plasma entering into physicochemical interactions with the LDL lipoproteins from the cryoprotective medium.

The mechanism of protection of these new biocomplex structures is likely by adsorption on the surface of the plasma membrane and participation in cell signaling and activation of signaling pathways, inducing gamete decapacitation. Thereby good sperm preservation is provided. This represents an innovative approach to successful freezing of semen from Buffalo bulls.

Keywords: Buffalo bull, spermatozoa, cryopreservation, seminal plasma, biocomplexes

УВОД

През последното десетилетие постепенно нараства интересът към отглеждане, размножаване и селекция на биволи. Това се обосновава от факта, че производството на биволско мляко в света нараства с много по-високи темпове, в сравнение с производството на краве мляко. Очевидно е преустройството на биволовъдството в направление за производство на мляко и месо. В България това преустройство е изразено със замяната на аборигенния Български бивол, който се използва предимно за работа, мляко и месо, с новата порода Българска Мурра. Тази порода притежава високи продуктивни качества за мляко и месо и се използва като генетичен източник за подобряване на

INTRODUCTION

Over the last decade, the interest in livestock farming, breeding and selection of buffaloes is gradually increasing. That is based on the fact that worldwide production of buffalo milk is growing at a much higher rate, comparing to the production of cow milk. It is obvious that a reorganization of buffalo breeding towards milk and meat production is occurring. In Bulgaria this reorganization is expressed with the substitution of the aboriginal Bulgarian Buffalo, which is used primarily for work, milk and meat, with the new breed of Bulgarian Murrah Buffalo. This breed possesses high productive qualities for milk and meat production, and is used as genetic source for improving milk

млечната продуктивност в десетки страни от четири континента в света. Може да се каже, че в следващите години в националното стопанство на Република България, като член на ЕС, ще настъпят значителни промени. Тези промени ще се отразят позитивно на аграрното производство и респективно на биволовъдството. Затова погледът в бъдещето на този перспективен отрасъл изисква задълбочен анализ, както на самото биволовъдство, така и на бизнес средата, в която то ще се развива. Не по-маловажно е да се акцентира и върху биотехнологиите за получаване, оценка и съхранение на генетичен материал, като сперматозоиди, яйцеклетки и ембриони. Така ще се подпомогне производството на висококачествен племенен материал и провеждането на качествена селекция, както за вътрешните потребности, така и за нуждите на външните пазари.

Интересът към замразяване на сперма от биволи винаги е стоял на дневен ред. Причината е, че все още няма масово прилагане на изкуствено осеменяване със замразена сперма. Причините са многостранни, но една от тях е свързана с биотехнологията за замразяване на сперма. Днес може да се твърди, че има нужда досега прилаганите биотехнологии за замразяване на сперма да бъдат оптимизирани и усъвършенствани.

productivity in dozens of countries from four continents in the world. It can be said that in the coming years there will be significant changes in the national economy of the Republic of Bulgaria, as a member of the EU. These changes will impact positively on agricultural production and on buffalo breeding respectively. So a view in the future of this promising sector requires an in-depth analysis of the buffalo breeding, as well as the business environment in which it will develop.

Not less important is to highlight the biotechnology for collection, assessment and preservation of genetic material, such as spermatozoa, oocytes and embryos. This will also assist in the production of high-quality breeding material and conduct quality selection both for internal needs and for the needs of foreign markets.

The interest in freezing of semen from buffalo bulls has always been on the agenda. The reason is that there is still no mass application of artificial insemination with frozen semen. The reasons are various, but one of them is related to the semen freezing biotechnology. Today, it can be argued that there is a need for optimization and improvement of the so far applied biotechnology for semen freezing.

Нашите интереси са насочени към анализ на спермално плазмени протеини (СПП) от гледна точка на съхранение на спермалната плазмена мембрана (ПМ) и протекция на сперматозоидите. ПМ претърпява непрекъснато ремоделиране по време на преминаването на сперматозоидите през епидидимиса и в последствие в женската репродуктивна система. Тези промени правят сперматозоидите годни да оплодят яйцеклетката (Austin, 1985; Yanagimachi, 1994). С изследвания в последните години се доказа, че протеините на спермалната плазма (СП) участват активно в процесите, свързани с оцеляването на сперматозоидите и процеса на инхибиране на капацитацията. Това като резултат води до съхраняване на техния оплодителен потенциал (Mendoza et al., 2013). Едни от важните СПП са протеините от групата на BSP. Това са най-изучаваната група протеини, тъй като те представляват до 60% от общите СПП в спермата на говеда (Manjunath et al., 1988; Nauc et Manjunath, 2000). Общата характеристика на тези BSP протеини е, че те имат силно изразена прикрепяща способност към глюкозаминогликани (Therien et al., 2005; Lefebvre et al., 2009; Plante et al., 2014), холин фосфолипиди (Desnoyers et Manjunath, 1992), липопротеини с висока и с ниска плътност (Manjunath et al., 1989; Manjunath

Our interest is focused on analysis of the seminal plasma proteins (SPPs) from the viewpoint of sperm plasma membrane (PM) preservation and protection of the spermatozoa. PM undergoes continuous remodeling during the passage of the spermatozoa through the epididymis and subsequently in the female reproductive system.

These changes make the spermatozoa capable of fertilizing the oocyte (Austin, 1985; Yanagimachi, 1994). Research in recent years has proved that SPPs actively participate in the processes related to the survival of spermatozoa and the process of capacitation inhibition. As a result this leads to preservation of their fertilization potential (Mendoza et al., 2013).

Some of the important SPPs are the BSP proteins. These are the most studied group of proteins, as they represent up to 60% of the total SPPs in the semen from bulls (Manjunath et al., 1988; Nauc et Manjunath, 2000). The common characteristic of the BSP proteins is that they have a pronounced ability to bind to glycosaminoglycans (Therien et al., 2005; Lefebvre et al., 2009; Plante et al., 2014), choline phospholipids (Desnoyers et Manjunath, 1992), high and low density lipoproteins (Manjunath et al., 1989; Manjunath et al., 2002) and gelatin (Plante et al., 2014;

et al., 2002) и желатин (Plante et al., 2014; Manjunath et al., 1987). Вероятно такива СПП имат отношение към протекцията на ПМ чрез механизъм на адсорбция по нейната повърхност. Това прикрепяне към повърхността на ПМ вероятно води до участие в клетъчната сигнализация и активацията на сигнали предизвикващи декапацитация на гаметите.

Целта на настоящите изследвания е да се направи компютърно-асистиран спермоанализ (CASA) на еякулати с добра и ниска криотолерантност на сперматозоидите и да се проведе високоефективна течна хроматография (HPLC) на СП; да се анализират новосформирани биокомплексни структури между специфични протеини от еякулати с доказана добра криотолерантност и липопротеините от жълтъка, във връзка с иновативен подход за замразяване на сперма от биволски бици.

Manjunath et al., 1987).

Probably such SPPs are relevant to the protection of the PM through mechanism of adsorption on its surface. This binding to the PM surface probably leads to participation in cellular signaling and activation of pathways causing gamete decapacitation.

The aim of this study is to perform Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) on ejaculates with good and poor cryotolerance of the spermatozoa and to conduct High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) on seminal plasma (SP); to analyze newly formed biocomplex structures between specific proteins from ejaculates with proven good cryotolerance and lipoproteins from egg yolk, in relation to an innovative approach for freezing semen from buffalo bulls.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитите са проведени с еякулати от биволи – свежа и замразена сперма, предоставени от Изпълнителна агенцията по селекция и репродукция в животновъдството гр. София и гр. Сливен. След получаване и преценка, спермата се разрежда до 1:15 с криопротективна среда. Целта на това разреждане е в 1 доза да се съдържат 5×10^6 подвижни сперматозоида, които гарантират добри резултати от

MATERIAL AND METHODS

The analyses were conducted with ejaculates from buffalo bulls – fresh and frozen semen, delivered by the Executive Agency form Selection and Reproduction in Animal Breeding in Sofia and Sliven. After collection and evaluation, semen was diluted up to 1:15 with cryoprotective medium. The purpose of this dilution is to provide 5×10^6 motile spermatozoa per semen dose, which guarantees good artificial

изкуственото осеменяване. Спермата е замразена под фор-мата на пайети от 0.250 ml в среда за криоконсервация (2.32 натриев цитрат дихидрат, 2.42 Tris, 1.34 лимонена киселина монохидрат, 1.0 глюкоза или фруктоза, 7 ml глицерин, 20 ml яйчен жълтък, 100 UI пеницилин, дестилирана вода до 100 ml).

Изолиране на спермална плазма

От свежи еякулати е изолирана СП чрез двукратно центрофугиране на спермата. Първото центрофугиране е на 2500 rpm, за 10 минути на 4°C (центрофуга K24D). За второто центрофугиране се използва супернатантата, при 12000 rpm за 5 минути Получената СП се филтрира през 0.22 µm мембрана (Milipore®) и се съхранява на -80°C.

Хроматографско сепариране на протеини от спермална плазма и липопротеини от яйчен жълтък

Опитите са проведени на течна хроматографска система при високо налягане – HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Използвана е полупрепаративна колона (TSK gel G3000SW, 21.5 mm x 300 mm, TOSOH BIOSCIENCE®) за молекулно-ситова хроматография с разделителна способност от 10 до 500 kDa. В апарата са инжектирани проби с обем 1000 µl. Предварително са зададени оптималните параметри за работа: време (20 min), налягане (1700 psi) и скорост на потока (6 ml/min).

insemination outcome. Semen is frozen in straws of 0.250 ml in a cryopreservation medium (2.32 Sodium citrate dihydrate, 2.42 Tris, 1.34 Citric acid monohydrate, 1.0 Glucose or Fructose, 7 ml Glycerin, 20 ml Egg yolk, 100 UI Penicillin, distilled water to 100 ml).

Isolation of seminal plasma

SP was isolated from fresh ejaculates by double centrifugation. The first centrifugation is performed at 2500 rpm for 10 min at 4°C (K24D centrifuge). For the second centrifugation, the supernatant is used at 12000 rpm for 5 min. The SP obtained was filtered through a 0.22 µm membrane (Milipore®) and stored at -80°C.

Chromatographic separation of proteins from SP and lipoproteins from egg yolk

The experiments were carried out on a liquid chromatography system under high pressure – HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). A semi-preparative column (TSK gel G3000SW, 21.5 mm x 300 mm, TOSOH BIOSCIENCE®) for size exclusion chromatography with a resolution of 10 to 500 kDa was used. The sample injection volume used was 1000 µl. The optimal system parameters were set as follows: time (20 min), pressure (1700 psi) and flow rate (6 ml/min).

Изследвани са проби:

- СП от бивол с добра (Група А) и ниска (Група Б) криотолерантност на сперматозоидите;
- яйчен жълтък;
- СП от еякулати с доказана добра криотолерантност с прибавен към тях жълтък.

Спектрофотометрично е определено съдържанието на всяка от получените протеинови фракции след HPLC.

Компютърно-асистиран спермоанализ на сперматозоиди от бивол

Бяха оценени общата подвижност, прогресивната подвижност и скоростта на сперматозоидите посредством използването на CASA System Sperm Class Analyzer® (Microptic®, Spain), софтуерен аналитичен модул „Motility and concentration“. От всяка проба се накапва сперма с обем 8 µl и върху нея се поставя покривно стъкло с размери 18 x 18 mm. Анализът се прави на минимум 1000 сперматозоида в 3-5 полета. Анализирани са следните показатели:

- Общата подвижност на сперматозоидите;
- Прогресивната подвижност на сперматозоидите;
- Бавно, средно и бързо подвижните сперматозоиди;
- Линеарност на движението на сперматозоидите;
- Честота на ударите на опашката;
- Амплитуда на латерално-

The samples analyzed were:

- SP from buffaloes with good (Group A) and poor (Group B) cryotolerance of the spermatozoa;
- egg yolk;
- SP from ejaculates with proven good cryotolerance with supplemented egg yolk.

The protein concentration of each protein fraction obtained through HPLC was determined spectrophotometrically.

Computer-assisted sperm analysis of buffalo bull spermatozoa

Total motility, progressive motility and velocity of the spermatozoa were assessed using CASA System Sperm Class Analyzer® (Microptic®, Spain), analytical software module "Motility and concentration". From each ejaculate, an 8-µl drop of semen was covered with an 18 x 18 mm cover slide.

The analysis was made on at least 1000 sperm cells on 3-5 fields. The following parameters were analyzed:

- Total motility of the spermatozoa;
- Progressive motility;
- Slow, medium and rapid moving spermatozoa;
- Linearity of the movement;
- Beat/Cross frequency;
- Amplitude of lateral head

то отклонение на главичката;

- Скоростни параметри

displacement;

- Velocity parameters

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Оценката на мотилитета преди и след размразяване е направена на 6 еякулата (Таблица 1). Еякулатите са разделени в две групи (А и Б) на основание на данните от мотилитета. Не са регистрирани статистически значими различия в мотилитета на сперматозоидите преди замразяване между 6^{те} изследвани еякулата. Наблюдават се тенденции за по-нисък начален мотилитет на сперматозоидите от група Б след размразяване.

RESULTS AND DISCUSSION

The motility assessment before and after thawing was made on 6 ejaculates (Table 1). The ejaculates were divided into two groups (A and B) based on the motility data. No statistically significant differences were registered in motility before freezing between the 6 studied ejaculates. Trends for a lower initial motility after thawing of the spermatozoa from group B were observed.

Таблица 1. Сравнителни данни от микроскопски анализ на мотилитета на сперматозоидите преди и след замразяване на сперма от биволи. Разликите между a и b са с достоверност $p < 0.05$

Table 1. Comparative data from the microscopic analysis of motility before and after freezing of semen from buffalo bulls. Values with different superscript differ significantly ($p < 0.05$)

Група Group	Номер на проби Number of samples	Мотилитет преди замразяване (%) Motility prior to freezing (%)	Мотилитет след замразяване (%) Motility after freezing (%)
А (n=9)	1	75.5 ± 1.5	49.3 ± 1.54
	2	69.4 ± 1.73	42.5 ± 1.20
	3	74.8 ± 1.64	46.1 ± 1.64
	Средно/Average	73.23± 1.62	45.97 ± 1.64^{a}
Б (n=9)	4	76.87 ± 1.01	31.10 ± 1.50
	5	75.25 ± 1.22	29.02 ± 1.72
	6	67.33 ± 1.54	31.11 ± 1.46
	Средно/Average	73.15 ± 1.25	30.41 ± 1.56^{b}

За прецизиране на данните беше направен CASA анализ на сперматозоидите от двете групи. Сравнителната оценка на мотилитета и скоростните параметри на сперматозоидите след размразяване са представени на Таблица 2.

To specify the data observed, analysis of the spermatozoa from the two groups was made by CASA. Comparative evaluation of motility and velocity parameters of the spermatozoa after thawing are presented in Table 2.

Таблица 2. Сравнителни средно-статистически данни от CASA на сперматозоиди от биволи от група А и група Б след размразяване. Разликите между a и b по хоризонтала са с достоверност $p < 0.05$
Table 2. Comparative average data from CASA of buffalo bull spermatozoa from group A and group B after thawing. Values with different superscript within row differ significantly ($p < 0.05$)

Параметри Parameters	Група А Group A	Група Б Group B
Total motility (%)	52.18 ± 2.53	41.48 ± 1.23
Progressive motility (%)	30.25 ± 1.25	26.50 ± 1.05
Rapid motility (%)	36.20 ± 2.20^{a}	25.40 ± 1.08^{b}
VAP (μm/s)	82.59 ± 1.29^{a}	62.31 ± 1.22^{b}
VSL(μm/s)	69.39 ± 2.28^{a}	57.55 ± 1.24^{b}
VCL(μm/s)	143.08 ± 2.26^{a}	127.27 ± 2.18^{b}
ALH(μm)	6.55 ± 0.35	4.99 ± 0.23
BCF (Hz)	37.05 ± 0.15^{a}	29.55 ± 0.25^{b}
STR (%)	84.01 ± 0.05^{a}	75.40 ± 0.70^{b}
LIN (%)	47.77 ± 0.55	49.12 ± 0.75
Elongation (%)	54.14 ± 0.96	53.23 ± 1.09
Size (μm sq)	8.26 ± 0.73	7.22 ± 0.24
Viability (%)	65.65 ± 1.74	60.66 ± 0.89

Очевидни са различията, касаещи процента на клетки с прогресивно-настъпателно движение, който при еякулатите с добра криотолерантност е в пъти по-голям (почти 1.5 пъти), за сметка на тези, които са статични или имат непрогресивно движение.

Резултатите от анализа показват интересни достоверни различия при сравняване на данните между двете групи в отделните параметри. При еякулатите от група А е очевидно, че има достоверно по-голям брой на бързо подвижните сперматозоиди, в сравнение с група Б (p<0.05). Също така, особено впечатление правят статистически значимите различия в скоростни-

There are apparent differences regarding the percentage of cells with progressive motility, which in ejaculates with good cryotolerance is at times higher (near 1.5 times), at the expense of the static and non-progressive spermatozoa.

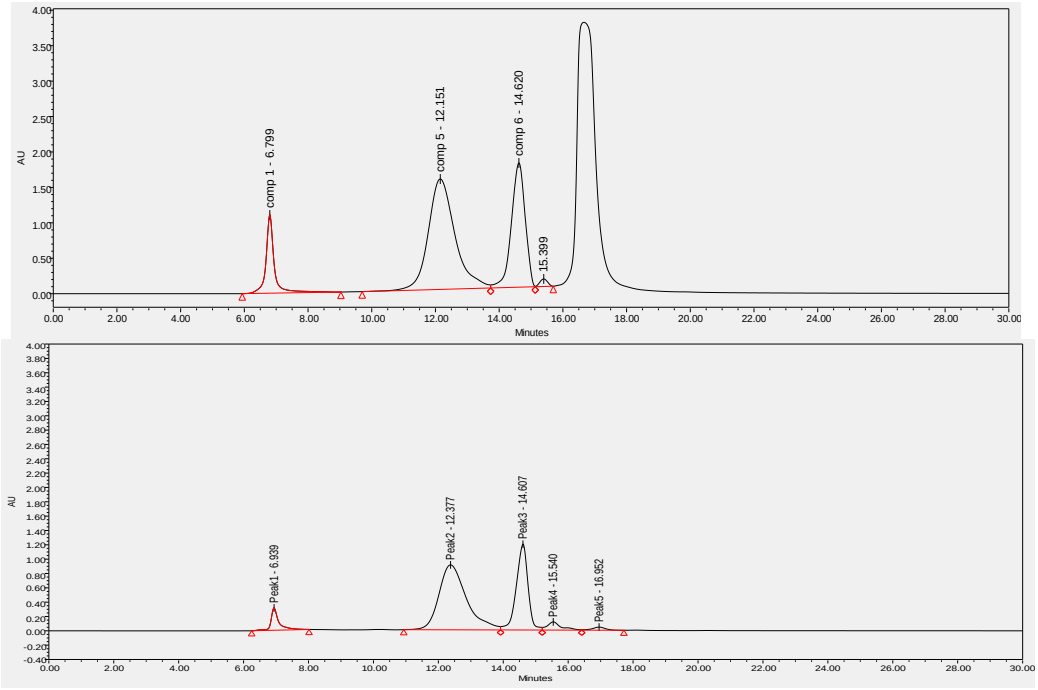
The results of the analysis demonstrated interesting significant differences in the separate parameters between the two groups. In ejaculates from group A it is evident that there is significantly higher number of rapid spermatozoa, compared to group B (p<0.05). Also, the statistical significant differences in the velocity parameters are noteworthy, which are in favor of

те параметри, които са в полза на еякулатите с добра криотолерантност на сперматозоидите.

От направения анализ на хроматографските профили на протеините, съдържащи се в СП на двете групи, се установиха специфични различия в количеството и вида на протеините при група А и Б. Хроматографските профили на изследваните проби диференцират 5 ясно обособени пика. Протеините в тях варират от 10 kDa до 500 kDa (Фигура 1).

the ejaculates with good cryotolerance of the spermatozoa.

From the analysis of the chromatographic profiles of the proteins contained in the SP of both groups, specific differences in the quantity and type of proteins in group A and B were observed. The chromatographic profiles of the samples analyzed demonstrate 5 distinct peaks. The proteins in those peaks vary from 10 kDa up to 500 kDa (Figure 1).

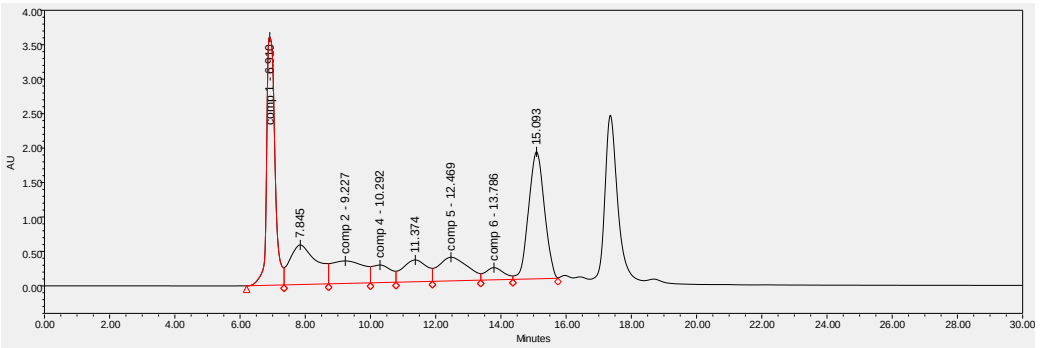


Фиг. 1. Хроматографски профил на сепарирани СПП от бивол, λ = 280 nm: (горе) еякулат с добра криотолерантност на сперматозоидите; (долу) еякулат с понижена криотолерантност на сперматозоидите

Fig. 1. Chromatographic profile of separated SPPs from buffalo bull λ = 280 nm: ejaculate with good cryotolerance of the spermatozoa (above); ejaculate with poor cryotolerance of the spermatozoa (below)

Хроматограмата на протективната среда показва 9 добре обособени пика (Фигура 2). Считаме, че преобладаващите протеини в протективната среда са от групата на липопротеините, които се съдържат в жълтъка.

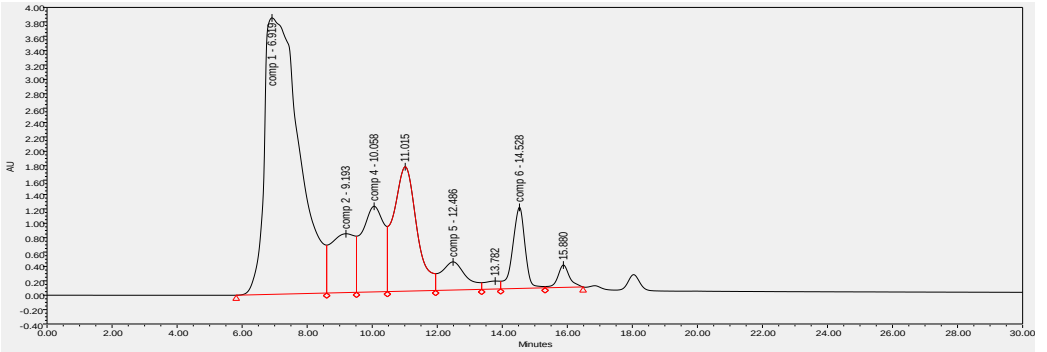
The chromatogram of the protective medium shows 9 well-defined peaks (Figure 2). We believe that the predominant proteins in the protective medium are lipoproteins, which are contained in the egg yolk.



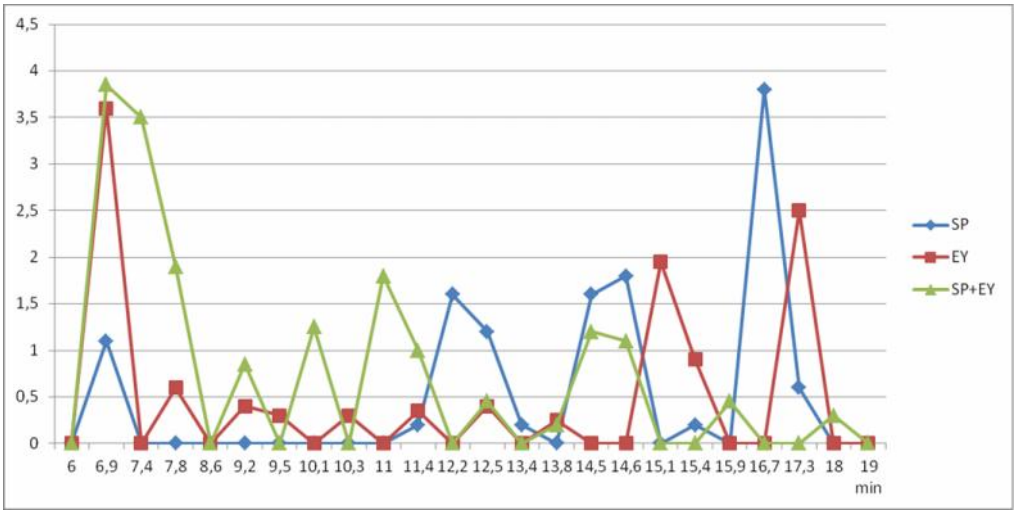
Фиг. 2. Хроматографски профил на протективната среда
Fig. 2. Chromatographic profile of the protective medium

Комбинирането на СПП и протеини от криопротективната среда дава нов хроматографски профил (Фигура 3), визуализиращ специфично и много различно преразпределение на протеините. При сравняването на профилите от двете хроматограми (СПП и протеини от протективната среда) се очертават нови пикове на 10.058 минута и на 11.015 минута, които не присъстват в нито една от двете проби (Фигура 4).

Combining the SPPs with proteins from the protective medium gives a new chromatographic profile (Figure 3), visualizing a specific and very different redistribution of proteins. When comparing profiles of the two chromatograms - SPPs and proteins from the protective medium, new peaks on 10.058 min and on 11.015 min are defined. These peaks are not present in either of the two samples (Figure 4).



Фиг. 3. Хроматографски профил на СПП и протективна среда
Fig. 3. Chromatographic profile of SPPs combined with protective medium



Фиг. 4. Хроматограми от сепарирани СПП, протеини от протективната среда и комбинацията между тях
Fig. 4. Chromatograms of the separated SPPs, the protective medium and the combination between them

Анализът на резултатите позволява да се предположи, че сформирането на нови протеинови пикове е следствие на преразпределение на протеините от СП и протеините, съдържащи се в протективната среда, най-вече липопротеините от жълтъка. Предполагаме, че това преразпределение вероятно става чрез механизъм на слож-

The analysis of the results obtained suggests that the formation of new protein peaks is a consequence of the redistribution of the proteins from the SP and the proteins contained in the protective medium, mostly the yolk lipoproteins. We assume that this redistribution probably occurs through mechanism of complex physicochemical

ни физико-химични взаимодействия между фосфолипиди, аминофосфолипиди и белтъци и образуване на нови сложни структури. В бъдещи изследвания предстои допълнително анализиране на новосформираните структури, съдържащи се в тези пикове.

interactions between phospholipids, amino phospholipids and proteins, leading to formation of new complex structures. Further analysis of this newly formed structures contained in these peaks is to be performed in future research.

ИЗВОДИ

- Хроматографският анализ на протеини от СП от биволи показа различия в протеиновия профил, изразени в хроматограмите на еякулати с добра и с ниска криотолерантност на сперматозоидите.
- HPLC резултатът от комбинирането на СП и протективна среда с жълтък, показа сформиране на пикове (на 10.058 и 11.015 минута), съставени от нови биокомплексни структури. Тези пикове вероятно са белег, специфичен за еякулати от биволи с добра криотолерантност.

CONCLUSIONS

- The chromatography analysis of proteins from buffalo bull SP showed differences in protein profile, expressed in the chromatograms of ejaculates with good and poor cryotolerance of the spermatozoa.
- The HPLC results after combining SP with yolk-based protective medium showed peaks (on 10.058 min and on 11.015 min) containing new biocomplex structures. Probably these peaks are a trait, specific to ejaculates from buffalo bulls with good gamete cryotolerance.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Austin CR.** Sperm maturation in the male and female genital tracts*. In: Monroy A, editor. Biol Fertil. New York: Academic Press,* 1985, pp. 121-155.
2. **Desnoyers L., Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem,* 1992, 267: 10149-10155, PMID: 1577785.
3. **Lefebvre J., Boileau G., Manjunath P.** Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15: 105-114, doi: 10.1093/molehr/gan077, PMID: 19091820.
4. **Manjunath P., Baillargeon L., Marcel YL., Seidah NG., Chretien M., Chapdelaine A.** Diversity of novel proteins of gonadal fluids. *In: McKerns KW, Chretien M, editors. Mol Biol Brain End Sys. New York: Plenum Press*, 1988, pp. 259-273.
5. **Manjunath P., Marcel YL., Uma J., Seidah NG., Chretien M., Chapdelaine A.** Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem*, 1989, 264: 16853-16857, PMID: 2506184.

6. **Manjunath P., Nauc V., Bergeron A., Menard M.** Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, 2002, 67: 1250-1258, PMID: 12297543.
7. **Manjunath P., Sairam MR., Uma J.** Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep*, 1987, 7: 231-238, PMID: 3663888.
8. **Mendoza N., Casao A., Perez-Pe R., Cebrian-Perez JA., Muino-Blanco T.** New Insights into the mechanisms of ram sperm protection by seminal plasma proteins. *Biol Reprod*, 2013, 88(6): 149, doi: 10.1095/biolreprod.112.105650.
9. **Nauc V., Manjunath P.** Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSPA3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1058-1066, PMID: 10993827.
10. **Plante G., Fan JJ., Manjunath P.** Murine binder of Sperm Homolog 2 (BSPH2): the black sheep of the BSP superfamily. *Biol Reprod*, 2014, 90(1): 20, doi: 10.1095/biolreprod.113.114272.
11. **Therien I., Bergeron A., Bousquet D., Manjunath P.** Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71: 97-106, PMID: 15736127.
12. **Yanagimachi R.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 1994, 3:371-372.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 2, 2016, (23-36)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Хистологично проучване на суперовулирани оварии на мишки, приемали биодобавка

Ваня Младенова*, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова

Институт по Биология и Имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов"-БАН, бул. „Цариградско шосе" 73, 1113 София, България
**E-mail: vanya_mladenova@abv.bg*

Histological study of the ovaries from the superovulated mouse supplemented by bioactive feed additive

Vanya Mladenova*, Desislava Abadjieva, Elena Kistanova

Institute of Biology and Immunology of Reproduction "Acad. Kiril Bratanov", BAS
73 "Tzarigradsko shose" Blvd., 1113 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Суперовулацията е важна стъпка от биотехнологията ембриотрансфер, която основно се прилага в хуманната и ветеринарна медицина за получаване на потомство при нарушен фертилитет. Добиване на по-голямо количество качествени ооцити, обезпечава по-сигурен успех за ембриотрансфер. Важно значение има получаване на добър овулаторен отговор при еднократно третиране, защото, многократното хормонално стимулиране представлява сериозна заплаха за здравето. Ограничени са данните по отношение влиянието на биодобавки върху успеха на суперовулация. Целта на проучването е да се проследят промените във фоликулогенезата на приемали биодобавката Provite E10% Super суперовулирали мишки. Опитът бе проведен във вивариума на ИБИР-БАН с 20 броя женски лабораторни мишки, разделени и изравнени по тегло в две групи (n=10): контролна – само суперовулирана, и опитна, при която ефектът от суперовулация бе съчетан с

SUMMARY

Superovulation is an important step of the embryotransfer biotechnology widely applied in the human and veterinary medicine to produce the offspring, when the parents' fertility is impaired. Obtaining a large amount of qualitative oocytes ensures a high success rate of embryotransfer. The big importance is to get a good ovulatory response to a single treatment, because a multiple hormonal stimulation possesses the strong threat for health. There are limited scientific data regarding the influence of the bioactive feed additives on the success rate of superovulation. The purpose of the present study was to investigate the changes in the folliculogenesis of superovulated mouse supplemented by feed additive Provit E10% Super. Experiment with 20 number of female laboratory mice took place in the vivarium of the IBIR-BAS. The animals were balanced by weight and divided in the two groups (n = 10): control – the animals were routinely superovulated and experimental, where the effect of

индивидуалния прием на добавката в продължение на 30 дни. Хистологичното проучване бе извършено върху парафинови срезове от яйчниците на всички животни, оцветени с H&E по рутинен метод. Морфометричната характеристика на овариалните структури бе направена чрез микроскопска система Olympus BX51 (Japan). Резултатите показаха, че експерименталната група има по-активна фоликулогенеза, изразяваща се в по-голям брой жълти тела (Corpus luteum) и по-голям брой третични фоликули, при сравнението ú с контролната група. В заключение, настоящото изследване доказва, че приема на биодобавка Provite E10% Super оказва въздействие върху фоликулогенезата, което предполага положителен ефект и върху овулаторния отговор при хормоналната стимулация.

Ключови думи: мишки, биодобавка, хистология, суперовулация, оварии

superovulation was combined with individual intake of the additive for 30 days. For the histological study the paraffin sections from the ovaries of all animals were prepared and stained with H&E. Morphometric characterization of ovarian structures was made by microscope system Olympus BX51 (Japan). The results showed that the experimental group had a more active folliculogenesis, expressed as a greater number of tertiary follicles and as a larger number of corpora lutea compared with the control group.

In conclusion, the present investigation proved that the supplementation by Provit E10% Super provokes a positive effect on the ovulatory response to hormonal stimulation due to affecting on the folliculogenesis activity.

Key words: mice, bioactive feed additive, histology, superovulation, ovary

УВОД

Ембриобиотехнологията е един от основните методи прилагани в хуманната и ветеринарната медицина с цел получаване на потомство при репродуктивните проблеми. Една от най-важните ú стъпки е суперовулацията. Добиване на по-голямо количество качествени ооцити обезпечава по-сигурен успех за последващите процедури – "ин витро фертилизация" и "ембриотрансфер". Въпреки дългогодишните проучвания в това направление, не са ясни всички механизми и пътища, водещи до повишаване чувствителността на зреещите фоликули към гонадотропните хормони, с които се предизвиква суперовулацията, и

INTRODUCTION

The embryotransfer biotechnology is widely applied in the human and veterinary medicine to produce the offspring of the parents with impaired fertility. One of the most important steps of this biotechnology is a superovulation. Obtaining a large amount of qualitative oocytes ensures more success for the subsequent procedures of the embryo biotechnology – "in vitro fertilization" and "embryo transfer". Although providing long-term research in this field, there are not clear all mechanisms and pathways providing the increased sensitivity of the growing follicles to gonadotropins, used for the superovulation, and as a result,

като резултат на това, повишаване на нейния успех. Сериозен проблем представляват и дългосрочните негативни ефекти от хормоналната стимулация и, поспециално, от многократното стимулиране. Това са хиперстимулацията на оварии, кръвоизливите и хормонално зависимите тумори (Macklon et al., 2006). Затова продължава да бъде актуален проблемът насочен към търсене на подходи за получаване на добър добив от ооцити при еднократно стимулиране.

Трябва да се обърне внимание и върху важността на хранителния фактор в протичане на фоликулогенезата, за което през последните години се натрупаха не малко данни. Храненето модулира репродуктивната функция преди всичко чрез циркулиращите метаболитни хормони като инсулин, инсулин-подобен рас-тежен фактор-I, растежен хор-мон, лептин и грелин (Scaramuzzi et al., 2015; Tena-Sempere et al., 2013). Тези хормони, вероятно, са медиатори на въздействието на храната върху фоликулярния растеж и скоростта на овулация (Somchit-Assavacheep, 2011). Стероидите на яйчниците също могат да повлияят действието на метаболитните хормони, което да води до промени във фоликулогенезата. Scaramuzzi et al. (2010) считат, че храната действа като сигнален механизъм отключващ метаболитните пътища, активи-

increased success rate of superovulation. There are many problems related to the long-term negative effects of hormonal stimulation, especially, of repeated stimulation such an ovarian hyperstimulation, bleeding and the hormone dependent tumors (Macklon et al., 2006).

Therefore the research topics, aimed to discover the approaches for getting a good yield of oocytes after single stimulation, remains actual till now.

The recently accumulated scientific data shows that the nutrition is one of the important factors affecting many aspects of the reproductiion in animals.

Nutrition can alter the reproductive function at various levels by circulating metabolic hormones such as insulin, insulin-like growth factor-I, growth hormone, leptin and ghrelin.

These hormones mediate an effect of food on the follicular growth and ovulation rate (Somchit-Assavacheep, 2011).

Also ovarian steroids modulate the action of metabolic hormones, leading to changes in the folliculogenesis.

Scaramuzzi et al. (2010) consider that the food acts as a signaling mechanism to force the metabolic pathways, activating

ращи фоликулогенезата.

Данните относно влиянието на хранителния режим върху успеха на суперовулацията са не еднозначни, а често и противоречиви. Например, при крави е показано, че както недохранването, така и висококалорийната диета имат негативен ефект върху степента на овулацията (Sartori et al., 2007; Santos et al., 2008; 2010). Допълнителната добавка на мастни киселини и протеини към добре балансирана дажба също не води до повишен добив на ембриони от суперовулирали животни (Velazquez, 2011). От друга страна, изследванията на Sales et al. (2008) и Evangelista et al. (2011) демонстрират, че добавки, съдържащи витамини, макро или микроелементи, повишават успеха на суперовулацията при селскостопанските животни. Има единични данни показващи, че включване към диетата на фитогенни добавки (в частност *Spirulina platensis*) води до увеличаване броя на получените ооцити и ембриони след суперовулация (Kistanova et al. , 2009).

В настоящото проучване ние поставихме за цел да проследим ефекта на включената в основната дажба хранителна добавка Provite E10% Super върху фоликулогенезата и успеха на последващата суперовулация при бели лабораторни мишки.

folliculogenesis.

Data about the diet' effect on the success rate of superovulation are scanty, and often contradictory.

There was shown in cows that the malnutrition as well as the high-caloric diet had a negative effect on the ovulation rate (Sartori et al., 2007; Santos et al., 2008, 2010).

Also a further addition of fatty acids and proteins to well-balanced ration didn't lead to an increase of embryos yield from the superovulated animals (Velazquez, 2011). On the other hand, studies of Sales et al.(2008) and Evangelista et al. (2011) demonstrated that supplementation of vitamins, macro- or micronutrients increase the success rate of the superovulation in domestic livestock. There are single data showing that supplementation of diet with phytogenic additives (particularly, Spirulina platensis) provide an increase of the oocytes and embryos recovering after superovulation (Kistanova et.al, 2009).

In the present study we set the goal to analyze the effect of the feed additive ProviteE10% Super, supplemented to the basic ration, on the folliculogenesis and subsequent success rate of the superovulation in white lab mice.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът беше проведен в експерименталната база на ИБИР-БАН. Обект на изследването бяха 20 броя женски лабораторни мишки от вида *Swiss white* в половозряла възраст, разделени в две групи (n=10) и изравнени по тегло, със средно тегло от 34.4 g. Контролната група бе подложена на процедура за индуциране на суперовулация, а при опитната група ефектът от суперовулация бе съчетан с индивидуалния прием на хранителна добавка Провит Е10% Супер (Profeed – Animals, Полша) в доза 1.5 μg/g към основната диета. Provite E10% Super е хранителна био добавка, съдържаща витамино-минерален комплекс (витамин Е, Ca, Mg) и екстракт от растение артишок. Животните бяха стимулирани по стандартния протокол за суперовулация, който включваше първоначално инжектиране с FSH (фоликулостимулиращ хормон) в доза 6.00 IU и след 48 часа повторно инжектиране с LH (лутеинизиращ хормон) в доза 6.00 IU. Животните са получавали стандартна храна за лабораторни мишки и вода без ограничения. Общия здравен статус на животните беше проверяван ежедневно. След приключване на опита (14 часа след прилагане на втората стъпка на протокола за суперовулация) мишките бяха хуманно умъртвени, съг-

MATERIAL AND METHODS

The experience was conducted in the vivarium of the IBIR-BAS. The object of the study were 20 female Swiss white mice at pubertal age, divided and aligned by weight into two groups (n = 10), with an average weight of 34.4 g: control group, which was subjected to superovulation procedure and experimental group, in which the effect of superovulation was combined with an individual intake of dietary supplement Provite E10% Super in dose 1.5μg/g to the main diet.

The feed additive Provite E10% Super contents minerals (Ca, Mg), vitamin E and plant extract artichoke.

The animals were treated by the standard protocol for superovulation, which included an initial injection of 6 IU FSH (follicle stimulating hormone) and a re-injection with 6 IU LH (luteinizing hormone) 48 hours thereafter.

Animals received standard laboratory mice feed and water “ad libitum”. The health status of the animals was checked daily.

At the end of the experiment (14 hours after the second hormonal injection by the superovulation protocol) mice were humanely killed, according to the Ethics

ласно изискванията на Етичната комисия (доклад №: 2009-4-12/40). Изолираните яйчници бя-ха почистени от всички мазнини и фиксирани в 10% формалин за 48 часа. След дехидратиране през възходяща алкохолна редица, тъканите бяха включени в парафинови блокчета. В последствие с помощта на микротом бяха получени серийни срезове с дебелина от 5µm, монтирани върху предметни стъкла и оцветени с хематоксилин-еозин (H&E) по рутинен протокол. Препаратите се документираха чрез микроскопска система Olympus BX51 (Tokyo, Japan). На базата на същата се проведе и морфометричен анализ на овариалните структури, изразяващ се в преброяване на яйчниковите фоликули разделени в 3 основни категории, съгласно фоликулярната класификация на Pedersen & Peters (1968) при гризачи. В допълнение, бе отчетен и броят на жълтите тела (CL – corpora lutea) във всички анализирани яйчници.

Данните са обработени със статистически методи, разликите се считаха за достоверни при $P<0.05$.

Commission requirements (report №: 2009-4-12/40). Isolated ovaries were cleaned and fixed in 10% formalin for 48 hours.

After that tissues were dehydrated through an ascending alcohol series and included in paraffin blocks. Subsequently serial sections with a thickness of 5 µm were obtained using a microtome, mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin by a routine protocol.

Morphometric characterization of the ovarian structures was made by microscope system Olympus BX51 (Japan).

The ovarian follicles were counted and classified in accordance with Pedersen & Peters (1968) classification for the rodent.

Additionally the corpora lutea were counted in all analyzed ovaries.

The data were processed with statistical methods, the differences were considered significant at $P<0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Лабораторната мишка е често използван животински модел в репродуктивните изследвания. При нормална овулация при мишките се получават от 8 до 12 ооцита с зависимост

RESULTS AND DISCUSSION

Laboratory mouse is a commonly used animal model in the reproductive studies. The ovulation rate in mouse is depended on the breed line and varies between 2 to 12 oocytes.

от линията на мишките. Физиологичният брой на добивани яйцеклетки може да бъде увеличен чрез прилагане на различни методи, преди всичко, извънредно хормонално стимулиране (Legge et al., 1994), а тези яйцеклетки да бъдат използвани за бъдещи процедури като "ин витро фертилизация" или "ембриотрансфер".

В настоящото изследване, оценяваме суперовулаторния отговор по хистологичните промени в яйчниците като резултат на хормоналното третиране (при контролната група), сравнени с промени получени по същата стимулираща схема, но допълнително повлияни от хранителна добавка (при опитна група). Съгласно литературните данни се наблюдават различия в овариалния отговор на хормоналната стимулация при различни линии мишки (Martín-Coello et al., 2008; Nagy et al., 2002). Получените от нас резултати показват, че яйчниците и при двете групи животни реагираха на хормоналното третиране в границите характерни за линия мишки Swiss white.

Данните от биологичните изследвания (Таблица 1), показват че приемът на 1.5µg/g биодобавка Provite E10% Super, води до намаляване живата маса (g) при сравнение с контролните мишки, но разликите не са достоверни (P>0.05). Не бе намерена статистическа разлика (P>0.05) между показателите общо тегло на репродуктивният

The physiological number of ovulated oocytes can be increased by applying the different methods, particularly, by hormonal stimulation (Legge et al, 1994), and the obtained eggs can be used for the future procedures as "in vitro fertilization" or "embryo transfer".

In the present study we evaluate a superovulatory response to the hormonal treatment in the control group by the histological changes in the ovaries. These results were compared to the changes in the ovaries of the experimental group, which was stimulated by the same hormonal scheme combined with the nutritional supplement. In accordance with literature data the ovulatory response to the hormonal treatment is depended on the mouse strains (Martín-Coello et al., 2008; Nagy et al., 2002). In our experiment the ovary response to the gonadotropin stimulation in both groups was typical for Swiss white mouse.

Data from biological studies (Table 1) show that the intake of 1.5µg/g supplement Provite E10% Super leads to a trend for reduction of the live weight compared to the control mice, but differences were not significant (P>0.05).

The hormonal treatment did not influence on the total weight of the

тракт (g) и чифтно тегло на яйчниците (g), което показва, че хормоналното третиране не повлиява тези параметри.

reproductive tract (g) and on the ovarian weight (g) (Table 1, P>0.05).

Таблица 1. Жива маса, общо тегло на репродуктивен тракт и тегло на яйчници при контролни и опитни мишки
Table 1. Body weight, total weight of the reproductive tract and ovaries weight of control and experimental mice

Групи / Groups Параметри / Parameters	Контролна група Control group	Опитна група Experimental group
Жива маса / Live body weight, (g)	32.95±1.83	31.70±1.34
Общо тегло на репродуктивен тракт Weight of the reproductive tract, (g)	0.28±0.017	0.27±0.03
Тегло на яйчници / Ovaries weight, (g)	0.057±0.009	0.057±0.009

По време на еструс цикъла, развитието на овариалните фоликули е тясно свързано с липидния метаболизъм. Именно мастните киселини предоставят енергията за узряването на яйцеклетките и ранното развитие на ембриона. Гонадотропините могат да регулират стероидогенезиса и новосинтезирането на мастни киселини, но без това да рефлектира върху теглото на половите жлези (Liu et al., 2009). Противоположно, Wang et al. (2015) докладват за статистически по-тежки яйчници на третираните мишки, което е резултат от отключване на холестерол-зависими гени да новосинтезират холестерол или да активират наличните липопротеини по време на лутеинизацията. Намерената от Wang et al. (2015) разлика в теглото на овариите, вероятно, се дължи на стимулирането им с по-висока доза гонадотропини (10 IU PMSG и hCG) в сравнение с

The development of the ovarian follicles during the estrus cycle is closely connected to the lipid metabolism. The fatty acids provide energy for the oocytes maturation and early embryo development. Gonadotropins are able to regulate the steroidogenesis and the new synthesis of fatty acids, but without reflection on the gonads' weight (Liu et al, 2009).

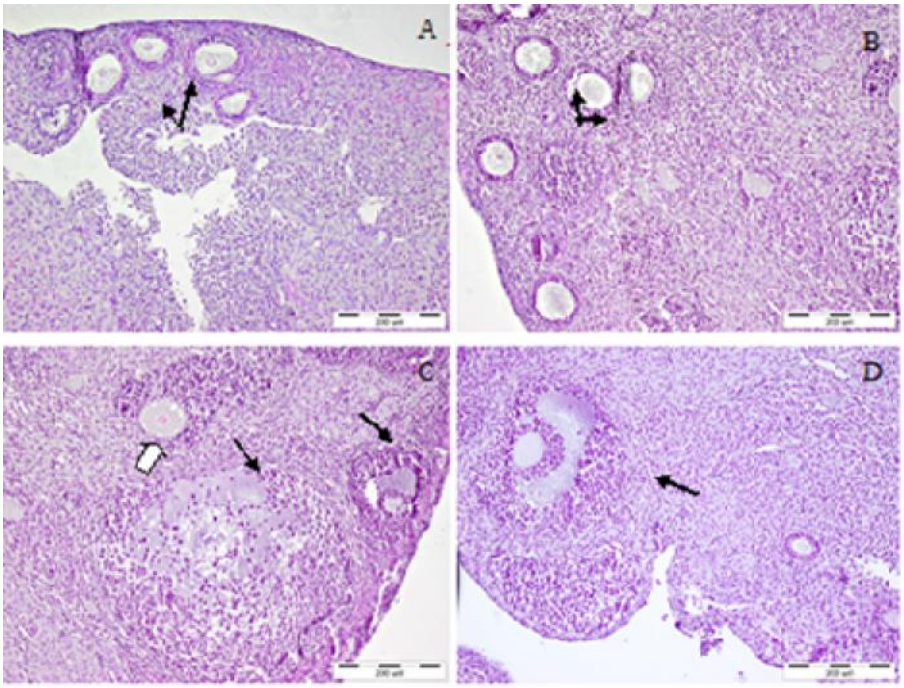
Conversely, Wang et al. (2015) report the significantly higher ovaries weight in the treated mice, which is a result of the unlocking the cholesterol-dependent genes to synthesize a newly cholesterol or to activate the lipoproteins available during the luteinization.

Found by Wang et al. (2015) increased weight of ovaries, probably, is due to stimulating with higher dose of the gonadotropins (10 IU PMSG and hCG) in comparison with our protocol. The

нашия протокол. Показателна за нормална фоликулогенеза в настоящия експеримент е и липсата на нарушения в закономерностите на развитие на яйчниците, установена при анализ на хистологичните препарати под светлинен микроскоп. Развита е пълна дивизия на фоликулите, което се потвърждава с микрофотографии на яйчници от опитни и контролни животни (Фигура 1).

lack of the disturbances in the ovaries development, observed at histological samples by light microscope in the current experiment, is the indication of the normal folliculogenesis.

There was a full division of follicles, which is illustrated by microphotographs of ovaries from the experimental and control animals (Figure 1).



Фиг. 1. Микрофотографии на хистологични препарати от яйчници на мишки (20X, H&E): A. секция от контролен яйчник с вторични фоликули (стрелки); B. секция от яйчник на мишка от оп. гр., с фоликули в преход от вторични към третични (стрелки); C. и D. секции от яйчник на мишка от оп. гр., с преантрални (бяла стрелка) и антрални фоликули (черни стрелки)

Fig. 1. Microphotographs of histological preparations of mouse ovaries (x20, H & E): A. Section of control group with secondary ovarian follicles (arrows); B. section of the experimental mouse ovary, with follicles in the transition from secondary to tertiary (arrows); C. and D. sections of the experimental mouse ovary, with preantral (white arrow) and antral follicles (black arrows)

В настоящото проучване бе направена морфометричната оценка на оварии относно броя на фоликулите и жълтите тела (*Corpora lutea*) върху десет последователни среза от яйчниците на всички 20 женски мишки. Популациите на отделните фоликулярни класове се изявяват с намаляваща тенденция от вторични към антрални фоликули и в двете групи. Установено е статистически недостоверно увеличаване броя на антралните фоликули в опитната група (P>0.05) спрямо контролата. Предполагаме, че в опитната група добавката е повлияла някои метаболитни пътища и е дала тласък за развитието на по-голям брой третични фоликули, които да прерастнат в антрални. Тази предпоставка не нарушава пропорционалността в предходните фоликулярни класове, както се забелязва от Таблица 2.

In the present investigation the morphometric evaluation of the ovaries was done concerning the number of follicles and corpora lutea on the consecutive slices (n=10) from the ovaries of 20 female mice.

In both groups was observed a decrease of the follicles number from secondary to antral class.

It has been found non-significant trend to increase the antral follicles number in the experimental group (P>0.05) compared to the control (Table 2). We assume that in the experimental group the feed additive has affected some metabolic pathways and forced the development of higher number of the tertiary follicles, which developed into antral. This prerequisite does not affect proportionality of the previous follicular classes, as seen in Table 2.

Таблица 2. Популации на отделните фоликулярни класове и брой жълти тела в миши яйчници от контролна и опитна групи
Table 2. **Populations of different follicular classes and Corpora lutea in the ovaries of control and experimental mouse**

Групи / Groups (n=10)	Стадии на развитие на фоликулите Stages of the follicular development			
	Първични Primary	*Вторични+третични Secondary+tertiary*	*Антрални Antral*	*Жълти тела Corpora lutea*
Контролна група Control group	5.1±1.45	5.20±1.66	0.8±0.75	8.5±2.7
Опитна група Experimental group	4.70±1.67	5.40±1.70	0.90±0.54	10.11±4.20

Резултатите сочат, че една част от антралните фоликули не

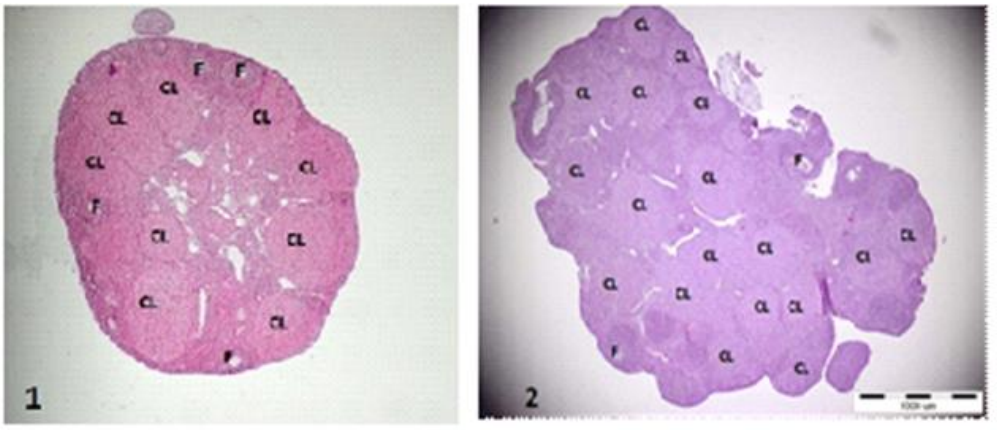
The results indicate that, despite the hormonal treatment,

овулират въпреки хормоналното третиране. Наличието на третични и антрални фоликули в оварии на суперовулирани мишки, наблюдавано в нашето изследване, вероятно, отразява различните функционални състояния на фоликулите, които по различен начин се повлияват от екзогенните гонадотропини в съответствие с техния етап на развитие, което е в съгласие с твърдението на McNatty et al. (2010).

not all antral follicles were ovulated. The tertiary and antral follicles, observed in the ovaries of our superovulated mice, probably reflect differences in their functional states that influenced by exogenous gonadotropins in different ways according to the developmental stage, which is in agreement with the statement of McNatty et al. (2010).

По отношение броя на жълти тела, морфометричният анализ показа по-голям брой жълти тела в опитната група (P>0.05) спрямо контролата, което е документирано на Фигура 2.

Also morphometric analysis showed a larger number of corpora lutea in the experimental group (P> 0.05) compared to control, as it is documented on Figure 2.



Фиг. 2. Микрофотографии на миши яйчници (H&E; 4X): (1) от контролна група с наличие на 9 жълти тела; (2) от опитна група с наличието на 18 жълти тела;
Fig. 2. Microphotographs of mouse ovary (H&E; 4X): (1) the presence of 9 Corpora lutea in control ovary; (2) the presence of 18 Corpora lutea in experimental ovary;

Нашите резултати съвпадат с тези на Swann (2014), който съобщава за значително

Our results are match those of Swann (2014), who reported a significant increase of the corpora

увеличаване броя на Corpora lutea (P<0.001) и почти двукратно увеличение на диаметъра на жълтите тела при мишки стимулирани с 5IU hMG при сравнение нестимулирани, контролни яйчници.

lutea number (P<0.001) and almost double size of its diameter in mice, stimulated with 5IU hMG, compared to the unstimulated control ovaries.

ИЗВОДИ

В контекста на асистираната репродукция, успеваемостта на суперовулацията е от решаващо значение за успеваемост на биотехнологията ембриотрансфер. Допълването диетата на мишки с биодобавката Provite E10% Super подпомага овулаторния отговор на хормоналната стимулация, като оказва стимулиращо въздействие на фоликулогенезата, водещо до развитие на по-голям брой антрални фоликули, и като следствие от това по-голям брой жълти тела в опитната група. Вероятно, включването на достатъчен брой гранулозни клетки при развитието на фоликулите и нормалната им лутеинизация, може да се приеме като резултат от ефекта на биодобавката върху секрецията на хормони и редица растежни фактори съществени за фоликулогенезата. Витаминно-минералното подхранване преди прилагането на хормоналното третиране може да се препоръча като подобрение на протокола за суперовулация на лабораторни животни, а след по-задълбочени проучвания в бъдеще ще бъде предложено за подобряване на

CONCLUSIONS

In the context of assisted reproductive technologies, the success of superovulation is a crucial for the success of the embryo transfer biotechnology. Supplementation of the mice diet with Provite E10% Super additive supports good ovulatory response to hormonal stimulation due to stimulating effect on the folliculogenesis leaded to the development of higher number antral follicles, and as a result, a larger number of corpora lutea in the experimental group. Probably, the sufficient number of granulosa cells was included in the follicular development and their normal luteinisation, which can be assumed as the feed additive effect on the secretion of the hormones and growth factors essential for properly folliculogenesis.

Vitamins and minerals supplementation before the application of hormonal treatment can be recommended as an improvement of the superovulation protocol for the laboratory animals and after the future studies in-depth should be proposed for improving the success rate of

успеваемостта на суперовулацията и при други животински видове.

superovulation in other animal species.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящите проучвания са осъществени с подкрепа на КОСТ Акциите FA1201, FA1403 и съответните проекти от ФНИ-МОН (вх. № 0903/11 от 21.01.2016 г. и вх. № 0903/57 от 24.11.2015 г.).

ACKNOWLEDGEMENTS

The current research is developed under COST Actions FA1201 and 1403 and corresponding projects under NSF-MES Bulgaria (№ 0903/11 from 21.01.2016 and 0903/57 from 24.11.2015).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Evangelista J.J.F., Souza C.E.A., Moraes M.E.A., Moura A.A.A.Treatment with vitamins A and E improve oocyte quality and in vitro embryo development in Bos indicus cows. *Reprod. Fertil. Dev*., 2011, 23, 175.

2. Kistanova E., Kacheva D., Shumkov K., Abadjieva D., Borjaev G., Nevitov M., Shimkus A. Effect of biological active substances on the mouse embryo production in vivo. *Доклади на Българската академия на науките, Comptes rendus de l'Acad´emie bulgare des Sciences*, 2009, 62, 4, 499-506.

3. Legge M, Sellens M.H. Optimization of superovulation in the reproductively mature mouse. *J Assist Reprod Genet*., 1994, 11, 312-8.

4. Liu Z, Rudd MD, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Fan HY, Zeleznik AJ, Richards JS FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. *MolEndocrinol.*, 2009, 23, 649-661. doi:10.1210/me.2008-0412.

5. Macklon Nick S, Stouffer Richard L., Giudice Linda C., and Fauser Bart C. J. M. The Science behind 25 Years of Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization, *Endocrine Reviews*, 2006, 27(2), 170-207.

6. MartIn-Coello J., Gonzaleza R., Crespoa C., Gomendioa M., Roldan E.R.S. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (Mus musculus, Mus spretus and Mus spicilegus). *Theriogenology*, 2008, 70, 1004-1013.

7. McNatty K., Heath D., Hudson N., Reader K., Quirke L., Lun S., Juengel J.,. The conflict between hierarchical ovarian follicular development and superovulation treatment*. Reproduction*, 2010,140, 287-294.

8. Nagy A., Gersenstein M., Vintersten K & Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, *3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.*, 2003, 359-397, 453-506, 687-690.

9. Pedersen T., Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary*. J.Reprod. Fertil*., 1968, 17, 3, 555-557.

10. Sales, J.N.S., Dias, L.M.K., Viveiros, A.T.M., Pereira, M.N., Souza, J.C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with ß-carotene and tocopherol. *Anim. Reprod. Sci*. 2008,106, 77-89.

11. Santos J, Cerri R, Sartori R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology,* 2008, 69, 88-97.

12. Santos Margarida Avo, Kuijk Ewart W and Macklon Nick S. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*,, 2010,139, 23-34.

13. Sartori R., Bastos, M.R., Mollo, M.R., Martins, A.C. Influence of feed intake on embryo production in cattle. *Acta Sci. Vet.,* 2007, 35 (Suppl. 3), 874-878.
14. Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A perspective. *Reprod Dom Anim.,* 2010, 45, Suppl 3, 32-41.
15. Scaramuzzi RJ, Zouaïdi N., Menassol JP, Dupont J. The effects of intravenous, glucose versus saline on ovarian follicles and their levels of some mediators of insulin signalling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015, 13, 6. doi:10.1186/1477-7827-13-6.
16. Somchit-Assavacheep A. Influence of Nutritional Management on Folliculogenesis in Ewes. *Thai J Vet Med Suppl*., 2011, 41, 25-29.
17. Swann Kimberley,. Effects of ovarian stimulation on oocyte development and embryo quality. *Thesis, University of Nottingham*. 2014
18. Tena-Sempere M., Benso A., Casanueva F.F., Ghigo E., Granata A. The Ghrelin System. *Endocr Dev. Basel, Karger,* 2013, 25, 69-82, DOI: 10.1159/000346055.
19. Velazquez M.A. The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle. *Animal Reproduction Science,* 2011, 126, 1-10.
20. Wang Li-Ya, Wang N., Le F., Li L., H.-Y.Lou, X.-Z.Liu, Y.-M.Zheng, Y.-Q.Qian, Y.-L. Chen, X.-H. Jiang, H.-F.Huang, Jin F. Superovulation Induced Changes of Lipid Metabolism in Ovaries and Embryos and Its Probable Mechanism. *PlosOne*, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0132638.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 2, 2016, (37-45)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Проучване майчиното поведение на кози към яретата родени като тризнаци

Светослава Стойчева*, Пенко Зунев, Цветомира Христова, Цветелина Димитрова

Институт по планинско животновъдство и земеделие, 5600 Троян, България
**E-mail: s_vetla@abv.bg*

Study on maternal behaviors of goats to their kids born as triplets

Svetoslava Stoycheva*, Penko Zunev, Tsvetomira Hristova, Tsvetelina Dimitrova

Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 5600 Troyan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Изследвано е развитието на майчиното поведение при кози от породата Българска бяла млечна и нейни кръстоски с породите Англонубийска и Тогенбургска, родили тризнаци. Козите са отглеждани оборно и хранени с дажба съдържаща – 2.00 kg ливадно сено и 0.600 kg концентриран фураж. Проследено е окозването на животните през месеците февруари и март. Майчинските качества на козите са оценени въз основа скоростта на реализиране на поведенческите реакции в течение на първия час след раждането.

Установено е, че по време на контролирания период, козите-майки подушват и облизват яретата тризнаци в рамките на първите три минути след раждането, като отделеното време в грижа за тях през първия час от постнаталния им живот е тридесет минути. Периодът до първото подушване и облизване е по-кратък при мъжките ярета, но общото време прекарано в грижи е по-продължително при женските ярета.

Резултатите показват, че полът на новородените не оказва достоверен

SUMMARY

The development of maternal behavior was studied in goats of Bulgarian White Dairy (BWD) breed and its crossbreeds with Anglo-Nubian (AN) and Togenburg (TG), which had given birth to triplets. Goats were bred in a shed and fed with a ration consisting of 2.00 kg meadow hay and 0.600 kg concentrate fodder. Kidding of goats took place in February and March. Maternal characteristics of goats were assessed on the basis of realization speed of behavioural reactions during the first hour after kidding.

It was found that during the control period, mothers sniffed and licked the triplets within the first three minutes after kidding, as they spent thirty minutes in cares for the newborns in their first postpartum life.

The period to the first sniffing and licking was shorter for the male kids, but the total time spent in care for female kids was longer.

The results suggest that the gender of the newborn kids did not have a reliable

ефект върху проявлението на майчината грижа към отделните ярета родени като тризнаци.

Ключови думи: кози, новородени ярета, майчино поведение, тризнаци

effect on the expression of maternal care to the different kids, which were born as triplets.

Key words: goats, newborn kids, maternal behavior, triplets

УВОД

Майчиното поведение при козите се определя от създаването на селективна връзка между майката и малкото през първия час след раждането. Формирането на връзката между майката и новороденото включва изграждането на сложни взаимодействия между тях и може да бъде повлияно от редица фактори сред които и броя на родените животни. Нарушенията при формиране на тази връзка са причина за повишаване честотата на смъртните случаи през първите часове след раждането (Addae et al., 2000).

Проучванията върху майчиното поведение показват, че е налице тенденция към лимитиране на грижата при раждането на повече от един приплод. Така например, въпреки че овцете родили близнаци показват по-висока активност при обгрижването на новородените (облизване, кърмене) от родилите единаци, те всъщност не обезпечават „два пъти" повече грижа. Следователно всеки отделен близнак получава по-малко стимули от единаците, което може да забави свързването с майката. При пасищно отглеждане, високата смъртност сред новородените от многоплодните агнила е след-

INTRODUCTION

Maternal behaviour of goats is determined by the establishment of a selective connection between the mother and the newborn within the first hour after kidding. The formation of the connection between the mother and the new born involves the establishment of complex interactions between them and could be influenced by a number of factors, including the number of newborn animals. The violations in formation of the connection are a reason for the increase in number of deaths within the first hours after kidding (Addae et al., 2000)

The studies on maternal behaviour indicate that there is a tendency for limitation of cares in kidding of more than one offspring. Thus for example, although the sheep, which give birth to twins, indicate a higher activity in their cares for the newborn kids (licking, suckling) than those, which give birth to a single lamb, they in fact do not ensure "twice" more care.

Consequently, each of the twins receives fewer stimuli than the single-born ones, which could slow down the connection with the mother. In grazing, the high infant mortality, in litter of large size, is a result of the separation of some of

ствие от отделянето на някой от близнаците и нарушаване контакта между майката и всички агнета от агнилото, особено през първия ден след раждането (Stevens et al., 1982).

Целта на настоящето изследване бе да се проучи проявата на майчиното поведението на козите към яретата родени като тризнаци, както и наличието на съществени различия в проявлението на майчината грижа при козите родили единаци или близнаци.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Данните са получени от стадото на Експерименталната база към Института по планинско животновъдство и земеделие в гр. Троян, като наблюденията обхващат период от 1 година. Проследени са раждания-та и поведението на кози-майки от породата Българска бяла млечна (ББМ) и кръстоските и с Англонубийска и Тогенбургска порода кози родили тризнаци, в течение на първия час след раждането. Окозването е през месеците февруари и март.

През зимния период животните са отглеждани оборно и хранени с дажба съдържаща 2kg сено и 0,6kg концентриран фураж на глава. Осигурен е свободен достъп до вода и сол. През летните месеци (май-ноември) козите са на паша.

Оценката на майчинските качества е извършена въз осно-

the twins and violating the contact between the mother and all of the lambs, especially in the first day after birth (Stevens et al., 1982)

The aim of present research was to study the maternal behaviour of goats to their kids, born as triplets, as well as the presence of essential differences in the manifestation of maternal care of goats, which gave birth to a single-born kid or twins.

MATERIAL AND METHODS

Data were obtained from the herd raised in the Experimental Station of the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture in the town of Troyan, as the observations spanned a period of 1 year. The kidding and behaviour of mothers of Bulgarian White Dairy goat breed (BWD) were observed, along with its crossbreeds with Anglo-Nubian and Toggenburg goat breed, which gave birth to triplets, in the course of the first hour after kidding. Kidding occurred in February and March.

In the winter period animals were bred in a cattle-shed and fed with ration of 2 kg of hay and 0.6 kg concentrated fodder per head. There was a free access to water and salt. During summer months (May-November), goats were grazing.

The assessment of maternal characteristics was done on the

ва на следните показатели, регистрирани през първия час след раждането, по метода на директно наблюдение и хронометриране. Продължителност на периода между раждането и първото подушване на новороденото, продължителност на периода между раждането и първото облизване на ярето и време посветено на грижи за потомството – общото време посветено на душене и облизване през първия час след раждането.

Данните са представени като средна аритметична стойност и грешка на средното. Резултатите от всички задачи са обработвани с пакет инструменти на статистическа програма Windows (Microsoft Excel, 2003), а достоверността е изчислена по метода ANOVA посредством еднофакторен анализ.

basis of the following indicators, which were registered within the first hour after kidding, according to the method of direct observation and timing. Duration of the period between kidding and the first sniffing of the newborn, duration of the period between the kidding and first licking on the kid and time spent on cares for the offspring – the total time spent on sniffing and licking within the first hour after kidding.

Data are represented as average arithmetic value and mean error. Results of all tasks were processed by a tool package of Windows statistical program (Microsoft Excel, 2003), and reliability was calculated according to the method of ANOVA by means of Single Factor analysis.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Козите-майки подушват и облизват яретата тризнаци за първи път на 2,57±0,84 min след раждането, а времето което отделят за грижа към тях през първия час след раждането е почти 30 min. Обгрижването на яретата винаги започва от областта на главата (освобождават се дихателните пътища на ярето) и продължава към задната част на тялото (стимулира се дишането), като е съпроводено с тихо блеене от страна на майката. Тези поведения на козата съвпадат с описаните в литера-

RESULTS AND DISCUSSION

The mothers sniffed and licked their triplets for the first time in 2,57±0,84 min after kidding, and the time spent on cares for them within the first hour after kidding was almost 30 min. The cares for kids always started in the sphere of the head (airways of kid were cleaned) and continued to the hind quarters of the body (breathing was stimulated), as it was accompanied by a quiet bleating by the mother. That behaviour of the goat coincides with what is described in the literature and illustrates the process of

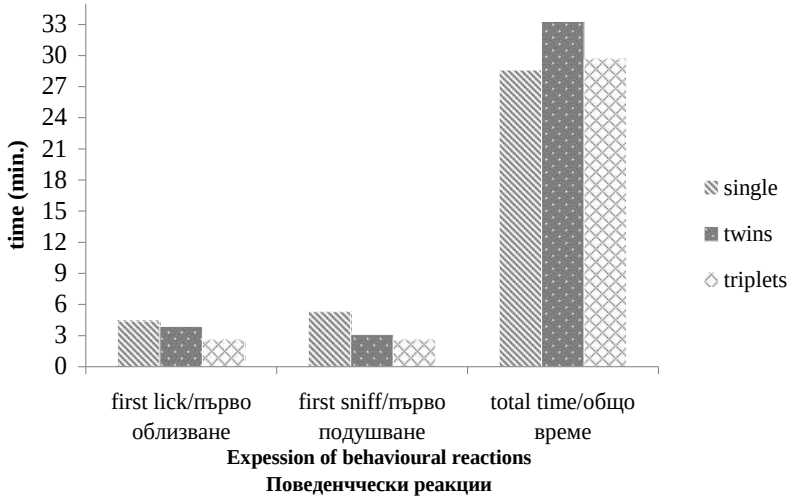
турата и илюстрират процеса на изграждане на връзката между нея и новороденото яре (Ylmaz et al., 2012).

В предходни наши изследвания установихме, че времето за което козите-майки реализират поведенческите реакции подушване и облизване за първи път след раждането е по-кратко при яретата близнаци сравнено с единаците (Стойчева, 2014) Това което прави впечатление при сравнението според типа на раждане на яретата (единаци, близнаци и тризнаци) е, че яретата родени като тризнаци получават най-бързо внимание от майката веднага след раждането, следвани от близнаците и единаците (Фигура 1).

establishment of the connection between the mother and the newborn kid (Ylmaz et al., 2012).

In our previous researches, we have found that the time for the realization of behavioural reactions, such as sniffing and licking for the first time after kidding, was shorter for twin kids in comparison with single-born ones (Stoycheva, 2014).

If the type of kidding is compared (single-born, twins, triplets), it is obvious that triplets receive the attention of the mother faster immediately after kidding, followed by the twins and single-born ones (Figure 1).



Фиг. 1. Влияние на типа на раждането върху времето до подушване, облизване и общото време прекарано в грижи за ярето през първия час след раждането

Fig. 1. Influence of type of kidding over the time till the first sniffing, licking and total time spent on cares for the kid within the first hour after kidding

По отношение на общото време прекарано в грижа за новороденото яре, тризнаците получават по-малко внимание от яретата близнаци, но повече от единаците.

Не се наблюдава статистически достоверна разлика в поведението на козата-майка в зависимост от броя на родените от нея ярета.

При раждането развитието на връзката майка-новородено първоначално се осъществява чрез миризмата затова активното облизване при раждането е от съществено значение (Dwyer and Lawrence, 1998).

Въпреки че, козите подушват и облизват по-рано мъжките тризнаци в сравнение с настъпването на тези поведенчески реакции спрямо женските (Фигура 2) разликата във времето по-малко от минута е недоказана и минимална.

Общото време, прекарано в грижа за новородените през първия час от постналалния им живот е по-продължително при женските тризнаци с почти 9 минути.

Проявата на тази поведенческа реакция вероятно се дължи на по-продължителното време през което женските ярета стоят изправени през първия час след раждането, следствие от по-ниското им тегло при раждане (Таблица 1).

In terms of total time spent on cares for the newborn kid, triplets receive less attention than twin kids, but more than the single-born ones.

There was no statistically proven difference in the behaviour of mother depending on the number of her kids.

The development of the connection between the mother and the new born kid was initially established at the time of kidding through scent, and therefore the active licking is essentially important (Dwyer and Lawrence, 1998).

Although, goats sniff and lick earlier the male triplets in comparison with the realization of these behavioural reactions compared to female ones (Figure 2), the difference in time less than a minute was not proven and minimal.

Total time spent on cares for the newborn kids within the first hour of the postpartum life was more prolonged for the female triplets with almost 9 minutes.

Manifestation of that behavioural reaction probably was due to the more prolonged time during which female kids stood upright within the first hour after kidding as a result of their lower birth weight (Table 1).

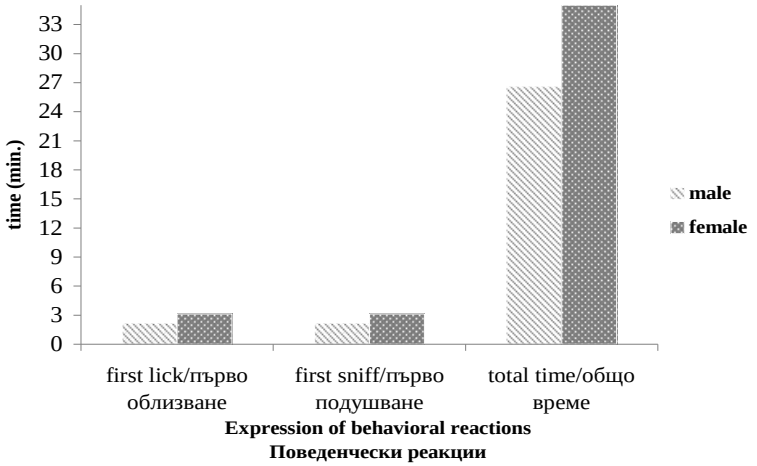


Fig. 2. Effect of sex of the new-born triplets over time spent till the first sniffing and licking and total time spent on cares for kids within the first hour after kidding
Фиг. 2. Ефект на пола на новородените тризнаци върху времето до първото подушване и облизване и общото време прекарано в грижи за тях през първия час след раждането

Таблица1. Тегло при раждане на яретата родени като тризнаци
Table 1. Birth weight of triplets

	Общо за стадото / Total for the herd	Мъжки / Male	Женски / Female
kg	2,82±0,13	2,99±0,16	2,59±0,21

Установеното от нас е в съгласие с Otal et al. (2010) При наблюдения на ярета на кози раждащи за пръв път от породата Murciano-Granadina, те установяват, че времето на обгрижване при женските ярета е по-дълго в сравнение с мъжките. За разлика от нас обаче в тяхното изследване козите-майки подушват и облизват по-рано женските ярета в сравнение с мъжките но тези разлики също са несъществени като установените от нас. Според авторите майчиния инстинкт при

Otal et al. (2010) report similar results to ours. In observations on kids of goats of Murciano-Granadina breed, which gave birth for the first time, the authors have found out that the time spent on cares for female kids was longer than for male ones. Unlike our results, however, in their research the mothers sniffed and licked earlier the female kids in comparison with the male ones, but these differences were also insignificant as ours. According to the authors, the maternal instinct in female animals

първескините е по-силен от трудностите при раждането и козите веднага обръщат внимание на яретата си. Poindron et al. (2007a, b) приписват тези различия в поведението на някои все още неизвестни невро – физиологични механизми, модулирани от опита на майката.

Според нас козите от изследваното стадо, родили тризнаци нямат предпочитания към пола на ярето за да стартират майчината грижа към него. Същото се установява и при яретата родени като единаци и близнаци в предходни наши изследвания при при същите породи кози (Стойчева, 2014).

giving birth for the first time is stronger because of the difficulties during delivery and the goats pay attention to their kids immediately. Poindron et al. (2007a, b) attribute the differences in behaviour to some still unknown neuro-physiological mechanisms, which are modulated by the experience of the mother.

According to us, goats of the herd, which give birth to triplets, do not have any preferences to the gender of the kid in order to start their maternal cares for it. It was the same for single-born and twin kids in previous our researches with the same goat breeds (Stoycheva, 2014).

ИЗВОДИ

1. Полът и типът на раждане не оказват достоверен ефект върху времето до подушване, времето до облизване и общото време посветено от майката на грижа за новородените ярета.
2. Размерът на агнилото не оказва съществен ефект върху установяване на връзката майка-яре при оборно отглеждане на козите.

CONCLUSIONS

1. Sex and type of birth do not have a reliable effect over time spent till the first sniffing, time till the first licking and total time spent from the mother in cares for the new-born kids.
2. The litter size did not have a significant effect over the establishment of the connection between the mother and kid in breeding of goats in a cattle-shed.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Стойчева С.** Етологични и физиологични аспекти на взаимовръзката „майка – новородено" при кози от породата ББМ и техни кръстоски. *Дисертация*, 2014.
2. **Addae P.C., Awotwi E.K., Oppong-Anane K., Oddoye E.O.K.** Behavioural interactions between West African dwarf nanny goats and their

REFERENCES

1. **Addae P.C., Awotwi E.K., Oppong-Anane K., Oddoye E.O.K.** Behavioural interactions between West African dwarf nanny goats and their single-born kids during the first 48 hours post-partum. *Applied Animal Behaviour Science*, 2000, 67, pp.77-88.
2. **Otal J., Martınez M., Quiles A., Hevia M.L. and Ramırez A.** Effect of litter

single-born kids during the first 48 hours post-partum. *Applied Animal Behaviour Science*, 2000, 67, pp.77-88.
3. **Ylmaz A., Karaca S., Kor A.and Bingől M.** Determination of Pre-parturition and Post-parturition Behaviors of Norduz Goats. Kafkas. *Univ Vet Fak Derg*, 2012, 18, (2), pp. 215-219.
4. **Otal J., Martınez M., Quiles A., Hevia M.L. and Ramırez A.** Effect of litter size and sex on the birth weight of newborn kids and in the behaviour of primiparous goats before, during and after the parturition. *Can. J. Anim. Sci*. 2010, 90, pp. 483-490.
5. **Poindron P., Keller M., Lévy F.** Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: The two facets of maternal attachment. *Developmental Psychobiology*, 2007a, 49, pp. 54-70.
6. **Poindron P., Tarrazas A., Navarro M.L., Seratin N. and Hernandes H.** Sensory and physiological determinants of maternal behaviour in goat (Capra hircus). *Horm. Behav*., 2007b. 52, pp. 99-105.
7. **Stevens D., Alexander G. and Lynch J.J.** Lamb mortality due to inadequate care of twins by merino ewes. *Applied Animal Ethology*, 1982, 8, pp. 243-252.

size and sex on the birth weight of newborn kids and in the behaviour of primiparous goats before, during and after the parturition. *Can. J. Anim. Sci*. 2010, 90, pp. 483-490.
3. **Poindron P., Keller M., Lévy F.** Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: The two facets of maternal attachment. *Developmental Psychobiology*, 2007a, 49, pp. 54-70.
4. **Poindron P., Tarrazas A., Navarro M.L., Seratin N. and Hernandes H.** Sensory and physiological determinants of maternal behaviour in goat (Capra hircus). *Horm. Behav*., 2007b. 52, pp. 99-105.
5. Stevens D., Alexander G. and Lynch J.J. Lamb mortality due to inadequate care of twins by merino ewes. *Applied Animal Ethology*, 1982, 8, pp. 243-252.
6. **Stoycheva S.** Ethological and physiological aspects of the relationship “mother – newborn” for goats of BWD and their crossbreeds. *Dissertation*, 2014. (in Bulgarian)
7. **Ylmaz A., Karaca S., Kor A.and Bingől M.** Determination of Pre-parturition and Post-parturition Behaviors of Norduz Goats. Kafkas. *Univ Vet Fak Derg*, 2012, 18, (2), pp. 215-219.