



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА
РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. К. БРАТАНОВ”**

Секция „Ембриобиотехнологии при животните”

Десислава Василева Абаджиева

**ОЦЕНКА НА ЕФЕКТА ОТ БИОЛОГИЧНО
АКТИВНИТЕ ХРАНИТЕЛНИ ДОБАВКИ
SPIRULINA PLATENSIS И ВЕМОХЕРЪ-Т ВЪРХУ
РЕПРОДУКЦИЯТА НА ЖЕНСКИ ЗАЙЦИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
научно-образователна степен „Доктор”

научна специалност: “Развъждане на селскостопанските животни,
биология и биотехника на размножаването”,

шифър 04.02.01

Научен ръководител: Доц. Елена Кистанова

София, 2015 г.

Дисертационният труд е написан на 177 страници. Онагледен е с 44 фигури и 39 таблици. Библиографията включва 225 литературни източника, от които 6 на кирилица и 219 на латиница.

Изследванията по дисертационния труд са проведени в лабораториите на ИБИР-БАН и лаборатория на Група по човешка и животинска физиология, при Катедра по животновъдство във Вагенинген, Холандия.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2015 г. от часа в заседателна зала при ИБИР-БАН, гр. София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред **Научно жури в състав:**

Доц. Елена Кистанова – вътрешен член и научен ръководител
Доц. Павел Рашев – вътрешен член
Проф. д-р Нина Атанасова, дбн – външен член
Проф. Лазар Козелов – външен член
Проф. Димо Пенков – външен член

Експертно становище на външен член от Холандия: assoc. prof. dr Katja Teerds – Department of human and animal physiology, Wageningen University (NL)

Резервни членове:

Доц. д-р Росен Г. Стефанов – вътрешен член
Проф. Д-р Емилия Т. Райчева – външен член

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, гр. София, бул. „Цариградско шосе”, №73, както и на интернет страницата на ИБИР.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Експериментите са извършени с финансовата подкрепа на проект № DKOF7RP02 /17

Отпечатването на автореферата е осъществено с финансовата подкрепа на проект BG051OP001-3.3.06-0059 по ОПЧР на ЕСФ

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА
РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. К. БРАТАНОВ”**

Секция „Ембриобиотехнологии при животните”

Десислава Василева Абаджиева

**ОЦЕНКА НА ЕФЕКТА ОТ БИОЛОГИЧНО
АКТИВНИТЕ ХРАНИТЕЛНИ ДОБАВКИ
SPIRULINA PLATENSIS И ВЕМОХЕРЬ-Т ВЪРХУ
РЕПРОДУКЦИЯТА НА ЖЕНСКИ ЗАЙЦИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
научно-образователна степен „Доктор”

научна специалност: “Развъждане на селскостопанските животни,
биология и биотехника на размножаването”,
шифър 04.02.01

Научен ръководител: Доц. Елена Кистанова

София, 2015 г.

ABSTRACT

Estimation of the *Spirulina platensis* and Vemoherb-T supplementation effect on the reproductive parameters of female rabbits

Background: During the last decades the new class of growth promoters - phytogetic feed additives is used in animal husbandry instead of antibiotics and hormones. The phytogetic feed additives (plant extracts, spices, microalgae and products derived thereof) are valuable protein source and content the vitality important compounds such vitamins, minerals and phytochemicals with antioxidant and hormone stimulating activity. The data about its positive effect on animal health and productivity increases, while the information about its influence on the reproductive performances is very scanty. Importance of properly nutrition for reproductive status of human and animals is undisputed, but the exactly mechanism of nutritional effect on folliculogenesis and maturation of good quality oocytes, resulted in healthy offspring, is not known. More and more evidences appear about epigenetic effects of nutrition on healthy state as well on reproductive properties of next generations, but which genes, related to the reproductive success, should be involved in this process is not clear.

The aim of this thesis was to estimate the effect of bioactive supplements *Spirulina platensis* (SP) and *VemoHerb-T* (VHT) on the reproductive performances of female rabbits during the two generations.

Material and methods: The investigations was conducted with 56 (28 – I-st generation and 28 – II-nd generation) female white New Zealand rabbits in main experiment and 28 growing female rabbits in pilot experiment due to definition of the appropriate dose of VHT, that was applied at first time in rabbit. Taking into account the different chemical content and pathways of additives action, the animals were treated in following schemes: SP was applied in does during the period of sex maturation - 120 days prior to insemination in dose 350 mg/kg individually; VHT was applied in mature does for the 45 days prior to insemination. The number and survivability of offspring was estimated. The female newborns were reared under the same nutritional conditions without additives treatment till puberty unset (6 months old). After slaughtering of animals the ovaries was collected and investigated by different methods. The routine histology for the morphological and morphometrically estimation of folliculogenesis on the one ovary from each animal was done. From the second ovary the oocytes and cumulus cells was isolated. The expression of *gdf-9* and *bmp15* genes in oocytes and cumulus cells from I-st and II-nd generations by RT-PCR was analyzed. The localization of growth factors *BMP15* and *GDF-9* and intensity of its secretion by immunohistochemical method were characterized.

Results:

Spirulina platensis

Application of SP leads to increase of the ovaries weight in I-st and II-nd generations. The survivability of newborns was higher in the experimental groups as well as the live weight till 20 day of post born. SP impacts the folliculogenesis in both generations, resulted in higher density of the primary and secondary follicles, as well as in the larger diameter of the secondary and antral follicles. Additionally the diameter of oocytes in secondary, preantral and antral follicles in II generation was higher compared to the control group.

The increase of *bmp15* expression in oocytes and cumulus cells of I-st generation was observed. The expression of *gdf-9* enhanced in the oocytes of experimental doe only. The enhanced expression of *bmp15* in oocytes was stable and inherited in the II-nd generation of female rabbits. The effect of additive on the changes in genes expression was higher in the “mothers” ovary compared to the “daughters” one. The data from immunohistochemical analysis corresponds with the gene expression results: there was confirmed the presence of the *BMP15* and *GDF9* in oocytes and cumulus cells at all stages of folliculogenesis. The higher intensity of immunoreactions, estimated by software of computer program Image J, in the experimental group was observed. Additionally, in both groups the localization of these proteins was observed also in follicular fluid of antral follicles, theca, interstitial cells and yellow bodies.

VemoHerb-T

Application of VemoHerb-T leads to lose of body weight in I-st, but to increase of ovaries weight in both generations of female rabbits. Similar to SP effect, the survivability and live weight of

newborns till 20 day was higher in the treated group. VHT reflected on the density increase of primary and secondary follicles in I-st generation does, and on the density of preantral follicles in II-nd generation. Also the higher diameter of secondary and preantral follicles in I-st generation was defined. VHT clearly stimulated the enhancement of *gdf-9* expression in oocytes as well as in cumulus cells, while *bmp15* expression increased only in cumulus cells. The trend to decrease of *bmp15* expression in oocytes of I-st generation appeared as a significant suppression in the oocytes of II-nd generation does. The immunohistochemical analysis showed the high intensity signals of *GDF-9* in oocytes, cumulus cells, theca and interstitial cells in ovary of experimental animals. Despite the decreased level of *bmp15* and *gdf-9* expression in II-nd generation of treated with VHT does, the proteins *BMP15* and *GDF-9* were detected in oocytes and cumulus cells at all stages of follicleogenesis.

Conclusions: The supplementation of diet with biological active feed additives affects the folliculogenesis in two generation of female rabbits. At first time in vivo was investigated the *bmp15* and *gdf-9* expression in both rabbit's oocytes and cumulus cells and was proved its sensitivity to nutritional influence resulted in changes of expression level. The changes in the expression level of *bmp15* in oocytes inherited in II-nd generation. The detection of the *BMP15* and *GDF-9* at all stages of folliculogenesis in rabbit' ovary convinces of big importance these growth factors for fertility of rabbits. The results show strong evidence that the including the biological active substances in rabbit feed during the sexual maturation or around the mating can affect the reproductive performances not only in I-st generation but in II-nd generation, too.

Използвани съкращения:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

мРНК – матрична рибонуклеинова киселина

СОС - кумулус-ооцитен комплект

ЛН - лутеинизиращ хормон

FSH - фоликулостимулиращ хормон

GDF-9/ gdf-9 – растежен диференциационен фактор 9 протеин / ген

BMP-15/bmp15 – костен морфогенетичен фактор 15 протеин / ген

GAPDH - глицералдеhid 3-фосфат дехидрогеназа

FC - промяна на експресията (fold change)

RT-PCR – reverse transcriptase-polymerase chain reaction / обратна транскрипция на иРНК до кДНК и полимеразно-верижна амплификация на кДНК/

БАД – биологично активни добавки

СП – *Spirulina platensis* (водорасло)

ВХТ – Вемохерб-Т

ТТ – *Tribulus terrestris* (растение)

Н&Е – хематоксилин и еозин

PAS – периодична киселина

Se - селен

Fe – желязо

АВ – антитяло

h- час

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Възпроизвеждането е от съществено значение за всички видове, тъй като това е ключът към оцеляването и развитието. Процесите на половото размножаване са резултат на координирани функции на много клетки, тъкани и регулаторни системи, които се осъществяват само когато животните са снабдени с достатъчно количества хранителни вещества. Въпреки че, репродуктивните неуспехи може да се дължат на редица причини, важен допринасящ фактор за това често е нездравословният хранителен режим. Храненето, като част от наложените от околната среда условия, се използва за подобряване на репродуктивното здраве и повишаване на репродуктивния потенциал, чрез умишлената му промяна при животните и човека, специално, чрез добавянето на биологично активни субстанции към храната, които се явяват модерни заместители на досега използваните антибиотици и хормони. Подходящи естествени добавки се явяват растителни екстракти или микроводорасли, поради високата си хранителна стойност и богат на минерали, витамини, пигменти и други биологично активни компоненти състав. Натурални продукти, способни да подсилят функцията на репродуктивната система се явяват водораслото *Spirulina platensis*, "коктейл" от елементи и комерсиалният продукт Вемохерб-Т, съдържащ сух екстракт на *Tribulus terrestris*, източник на сапонини (по-специално протодиосцин).

Един от най-важните репродуктивни параметри е количеството и качеството на ооцитите, формиращи се в резултат на фоликулогенезата. Яйцеклетката при бозайниците е единствената известна клетка, чиято качествена характеристика включва способността ѝ /компетенцията/ да узрее, да се оплоди, да препрограмира хроматина на сперматозоидите във функционални пронуклеуси, както и да даде тласък за развитието на зиготата. Биологично активните вещества подбуждат множество молекулярни цели, чрез въздействие върху генната експресия и сигнални пътища, или чрез директно взаимодействие. Тези субстанции могат да регулират както растежни фактори и ензими, така и молекули, свързани с апоптозни промени в клетките (Jump, 2002).

Гените *gdf-9* и *bmp15*, както и техните протеини - растежните фактори *GDF-9* и *BMP15*, са незаменими за критичните функции на яйчниците, като образуване на яйцеклетка и развитието ѝ. Експресията на тези сигнални молекули регулира фоликулогенезата, а спецификата им определя чувствителността на различните овариални клетки за всеки стимул на точно място и в определено време.

Натрупани са достатъчно научни доказателства за двупосочната комуникация между яйцеклетката и заобикалящите я клетки. Яйцеклетката регулира пролиферацията и диференциацията на гранулозните клетки, а в замяна те отделят фактори, които контролират нейния растеж. Съответно, всяка промяна в тази сигнализация на клетъчно ниво може да повлияе оплодителната ѝ способност.

Има научни данни за позитивното влияние на храненето върху репродукцията, но дали външни фактори като биологично активни хранителни вещества биха рефлектирали на ооцит-специфичните гени при зайкини, следователно върху зрелостта и компетенцията на развитие на яйцеклетките и с каква тежест, все още не е установено и стои сред задачите на настоящата теза.

Придобиването и задълбочаване на знания, водещи към разбиране на тези процеси ще бъдат от съществено значение за репродуктивната биология и усъвършенстване на асистираните репродуктивни биотехнологии. Тези знания ще открият и възможности за корекция на репродуктивните проблеми, чрез насочено хранене с биологично активни вещества.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационната работа е да се проучат възможностите за стимулиране на репродуктивната система при женски зайци, чрез биологично активните добавки - водораслото *Spirulina platensis* (с високо протеиново и витаминно съдържание) и растителният препарат ВемоХерб-Т, съдържащ екстракт от *Tribulus terrestris* (афродизиак с високо съдържание на сапонини).

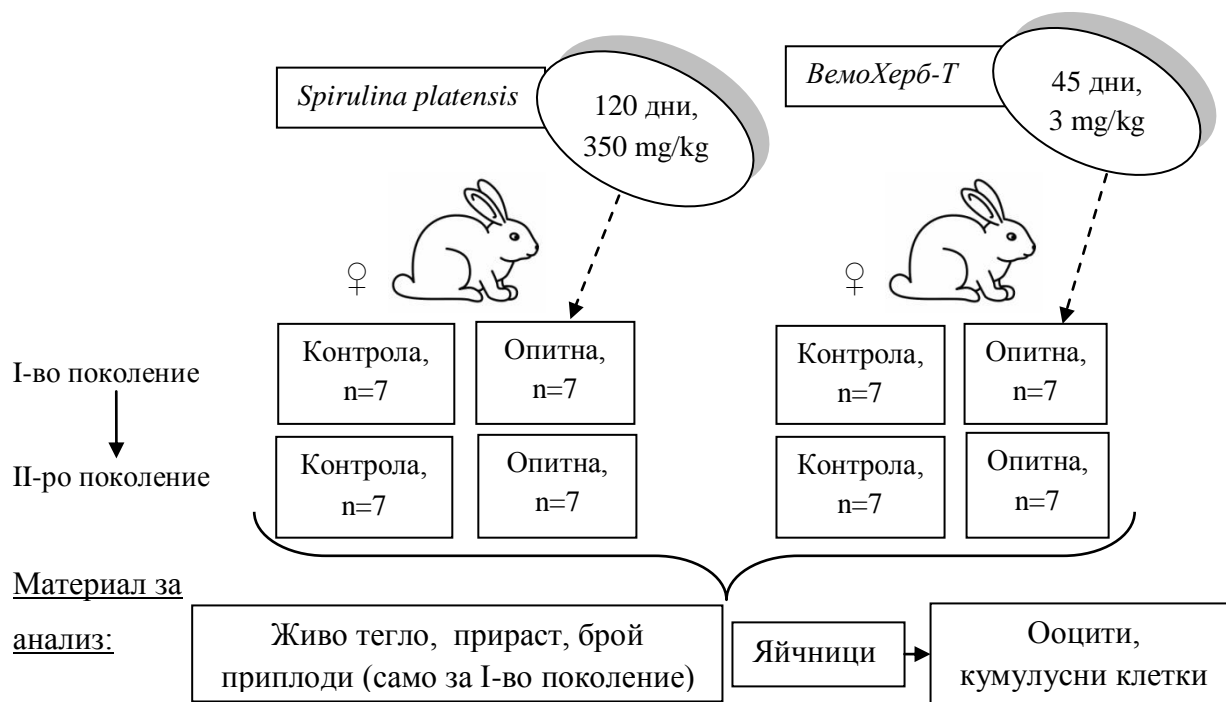
За постигане на така дефинираната цел бяха поставени следните задачи:

- 1/. да се проследи въздействието на добавката *Spirulina platensis* върху заплодяемостта и плодовитостта на зайкини-майки, I^{Bo} поколение;
- 2/. да се анализира състоянието на фоликулогенезата в яйчниците
 - на зайкини-майки, I^{Bo} поколение, приемали добавката *Spirulina platensis*;
 - на техните дъщери (зайкините II^{po} поколение), които не са приемали добавката;
- 3/. да се проучи ефектът от добавката *Spirulina platensis*
 - върху експресията на ооцит-специфичните гени *gdf-9* и *bmp-15*;
 - върху локализацията на кодираните от посочените гени белтъци в оварии на зайкините от I^{Bo} и II^{po} поколение;
- 4/. да се разработи приложението на добавката *Вемохерб-Т* към храната на зайци и да се определи оптималната доза с позитивен ефект върху продуктивни и репродуктивни показатели в процеса на половото им съзряване;
- 5/. да се проследи въздействието на оптималната доза от добавката *Вемохерб-Т*, върху заплодяемостта и плодовитостта на зайкини-майки, I^{Bo} поколение;
- 6/. да се анализира фоликулогенезата в яйчниците
 - на зайкини-майки, I^{Bo} поколение, приемали оптималната доза от добавката *Вемохерб-Т*;
 - на техните дъщери (зайкините II^{po} поколение), които не са приемали добавката;
- 7/. да се проучи ефектът от добавката *Вемохерб-Т*
 - върху експресията на ооцит-специфичните гени *gdf-9* и *bmp-15*;
 - върху локализацията на кодираните от посочените гени белтъци в оварии на зайкините от I^{Bo} и II^{po} поколение;

Работната хипотеза на дисертацията се основава на факта, че биоактивните съставки, включени в храната биха могли да повлияят метаболитните процеси в половите жлези на женските зайци (като усилена обмяна на веществата, повишен антиоксидантен статус), което от своя страна води до промяна във фоликулогенезата, в качеството и количеството на яйцеклетките, също и върху фертилните им способности. Един от възможните механизми на повлияване е индиректно, чрез растежните фактори *GDF-9* и *BMP15*, определящи развитието на фоликулите още от най-ранен фоликуларен стадий – примордиалният. Изследване на второ поколение женски зайци се базира на проследяване на косвения ефект на изпитваните биологични добавки, по време на тяхното ембрионално развитие. Формирането на първите герминални клетки при зайци става към 9-я ден, а примордиалните пулове към 21-вия ден от феталното им развитие. Храната на майката, преди заплодяване и по време на бремеността, като част от условията на живот, определящи метаболизма, може да повлияе върху хода на развитие на половите жлези при новородените.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Методологията на дисертационната разработка се базира върху основните принципи, характеризиращи научното изследване: обективност, комплексна оценка на изследваните параметри и статистическа достоверност на получените резултати. Тя включва научно-практични експерименти с 84 броя женски зайци, I-во и II-ро поколения от породата Новозеландска бяла (фиг. 1) и лабораторни изследвания.



Фиг. 1. Методологичен подход за оценка на ефекта от биологично активните хранителни добавки върху репродуктивните параметри на зайкини

Експериментите бяха проведени във вивариума на ИБИР, БАН и опитната база на ИЖН - Костинброд, ССА. Спазени са всички нормативни документи, свързани с използването на опитни животни в експерименталната работа.

Лабораторните изследвания са осъществени, чрез прилагане на широк набор от съвременни методи:

- хистологичен (с Н&Е и с PAS) - за оценка състоянието на фоликулогенезата,
- морфометричен:
 - диаметър на фоликули и яйцеклетки в тях;
 - обем на яйчникови структури и съотношения помежду им - по математически метод на Van denHurk et al., (1994);
 - брой фоликули на единица площ - чрез фракционен метод по Gundersen et al., (1988);
- имунохистохимични, за определяне локализацията на протеините *GDF-9* и *BMP15*; използвани са 10% блокиращ магарешки серум, I-во АВ (1:100) - поликлонално козе анти-човешко антитяло – overnight; II-ро АВ (1:200) - магарешко анти-козе антитяло-1h/ room t°, авидин-биотин комплекс (1:1000);

- имунореактивността по отношение на *GDF-9* и *BMP15* се оцени по интензитета на оцветяване в кафяво (%) на единица площ (μm^2), чрез използване на софтуерната програма Image J;
- микроманипулационни техники за получаване на ооцити и микроскопски анализ за първична преценка на качеството им;
- генно - експресионен анализ на базата на количествена полимеразна верижна реакция (RT-PCR), извършен в кумулусни клетки и в яйцеклетки (triplicate); използвано бе флуоресцентно багрило – EvaGreen и ендогенна контрола (house-keeping ген) – GAPDH; Данните са изчислени по $\Delta\Delta\text{Ct}$ метода;
- статистически методи;

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Пилотен експеримент с Вемохерб-Т, свързан с изпитване на добавката за първи път при растящи зайци, в три различни дози: 2,5; 5,0; 10,0 mg/kg, с цел изясняване оптималната доза при тези животни. Дозата от 2,5 mg/kg жива маса при растящи зайци, осигури най-висок дневен прираст при подрастващите зайкини, и по-големи популации на вторични и преовулаторни фоликули спрямо контролата, без съществени нарушения в закономерностите на нормалната фоликулогенеза. При дозата от 5 mg/kg се наблюдаваше подтискане на развитието на фоликулите в яйчниците на животните. Дозата от 10 mg/kg жива маса доведе до достоверно увеличаване големината на фоликулите, но се установиха дегенеративни промени на гранулозните клетки при вторични, третични и антрални фоликули, водещи към атрезия на фоликулите и нарушаване на овулацията. В заключение, като оптимална бе определена доза от 3 mg/kg жива маса, да се използва в основния опит с половозрели зайкини в продължителност на 45 дни.

II. Влияние на биологично активните добавки *Spirulina platensis* и Вемохерб-Т върху продуктивни и репродуктивни параметри на зайкини от породата Новозеландска бяла

Приемът на 350mg/kg *Spirulina platensis* (СП) в нова форма, обогатена със Se, Fe и фикоцианин, не повлиява живото тегло, но увеличава достоверно средният дневен прираст и в двете поколения зайкини (табл.1).

Включването на СП в дажба на зайкини се явява полезна хранителна добавка, която им осигурява оптимални темпове на растеж. Balasubramanian et al. (2013), потвърждават понижена жива маса при женски плъхове след 30 дневен прием на добавката. Фитохимичните ѝ съставки, вероятно, способстват за запазване на по-ниско тегло и предотвратяване на затлъстяване, въпреки начинът на отглеждане на зайкините. Стойностите за тегло на яйчниците при опитните групи зайкини са достоверно по-високи, вероятно в резултат на подобрена дейност на овариите. Повишеният прием на аминокиселини, е свързан с клетъчния растеж, регулиране на липолизата, съответно повлияване на метаболитния път, което води до стимулиране секрецията на някои растежни фактори (Couchman and Hammond, 1999). Kistanova et al. (2009) откриват тенденция към увеличаване теглото на яйчниците в опит с мишки, приемали СП. Освен това и броят на получените ембриони в опитната група бил по-голям (22 срещу 17 в контролната група).

Таблица 1. Жива маса и тегло на яйчници на опитни (приемали СП) и контролни зайкини майки, и техните дъщери (без добавки)

I поколение (зайкини-майки)			
Параметри	Опитна (n=7)	контрола (n=7)	P
Жива маса, (g)	1657±15.55	1899±44.11	0.160
- в началото			
- в края	3387±107.80	3457±133.0	0.692
- ср. дневен прираст, (g)	14.42±0.77	12.98±0.74	0.04 *
Тегло на яйчници, (g)	0.199±0.0016	0.181±0.002	0.0001 ***
II поколение (женски зайци, дъщери на майките)			
	опитна (от опитни зайкини) (n=7)	контрола (от контролни зайкини) (n=7)	P
Жива маса, (g)	1121±17.71	1126±17.27	0.839
- в началото			
- в края	3614±85.40	3473±70.15	0.226
- ср. дневен прираст, (g)	13.85±0.38	13.04±0.29	0.007 *
Тегло на яйчници, (g)	0.137±0.0017	0.117±0.0015	0.0001 ***

достоверност: *- P<0.05; ** - P<0.01; *** - P<0.001;

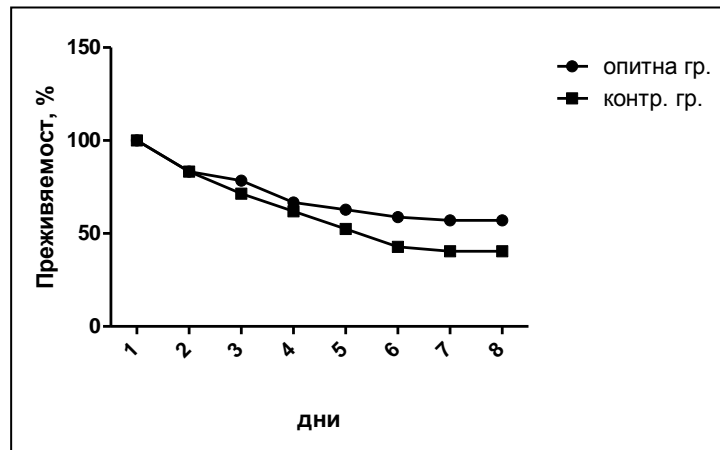
Гестационният период на зайкините бе с еднаква продължителност при двете анализирани групи, като поведението на родилките бе нормално. Приемът на добавката, 120 дни преди заплождане на зайкините, доведе и до по-висок брой живородени зайчета, с достоверно по-висока жива маса от контролните (табл.2). Тези резултати са в съгласие с Кароог & Mehta (1993), които изследват пет различни протеинови диети при плъхове и установяват значително по-висок брой новородени от майки, диетата на които е включвала СП.

Таблица 2. Брой новородени зайчета и тяхната жива маса на 20-ти ден

Параметри	опитна (n=7)	контрола (n=7)	P
бр. новородени/ зайкиня	7.43±0.78	5.57±0.99	0.168
Жива маса 20 дена след раждане, (g)	281.30±13.53	218.80±4.67	0.001 ***

достоверност: *** - P<0.001;

Доказана е по-висока преживяемост на новородените от опитните зайкини в сравнение контролата (фиг. 1). Това е свързано с хранителните компоненти, съдържащи се в СП, по-специално гама линоленова и арахидонова мастни киселини. Отговорен може да е и повишеният приток на аминокиселини в женската полова система на майките, които са строителен и енергиен субстрат за ембрионите (Bavister, 1995).



Фигура 1. Каплан-Майер анализ на преживяемост на новородени зайчета

При анализа на хистологичните препарати от яйчници на зайкини-майки и в яйчници на техните дъщери под светлинен микроскоп, не се наблюдаваха морфологични деформации на структурите или различия между контролни и опитни групи. Развита е пълна дивизия на фоликулите, което се потвърждава с микрофотографии на хистологичните препарати на яйчници от същите животни (фиг. 2 и фиг. 3). Морфометричният анализ показва, че и в двете поколения зайкини има прогресивно нарастване в размера на фоликулите при преминаване от стадий примордиален към преовулаторен. Диаметърът на ооцитите се увеличава по време на развитието на фоликулите на два етапа: в прехода от първични към вторични фоликули, и при образуването на антрума - в прехода от вторични към преантрални и ранни антрални, след което не се наблюдава съществена промяна в размера на ооцита (табл. 3). Това предполага наличието на две вълни на растежа на ооцити. Тези резултати са в съгласие с данните на от Zinty et al., (2004) при изследване на зайкини, както и на Ariyaratna and Gunawardana (1997) при изследване на кози.

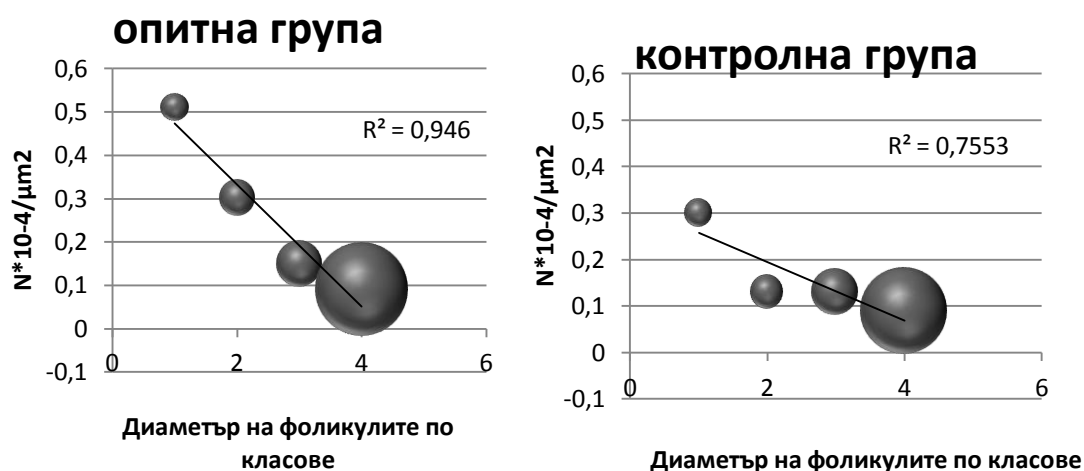
Ефектът на СП се отразява на стадии вторични и антрални фоликули, където диаметрите им са достоверно по-големи при опитните от тези в контролата. Различието е наблюдавано както при зайкини майки, така и при дъщерите им. При зайкините – майки обаче, данните показват достоверна промяна в обема на яйцеклетката и съотношението му към обема на фоликула само в преантрален стадий на развитие при приемалите СП.

Таблица 3. Диметър на фоликули и оцити в яйчници на опитни (приемали СП) и контролни зайкини майки, и техните дъщери (без добавки)

групи	Диаметър на овариални структури, μm (n=30/за структура)							
	първ. ф-ли (I)	яйц-ки	вторич. ф-ли (II)	яйц-ки	преантр. ф-ли(III)	яйц-ки	антр. ф-ли(IV)	яйц-ки
I поколение (зайкини майки)								
контр. гр.	49.85 ± 4.91	24.64 ± 2.62	70.09 ± 1.97	50.34 ± 3.61	135.10 ± 14.50	94.03 ± 20.07	473.50 ±62.89	96.80 ± 13.61
опитна гр.	48.05 ±3.31	23.56 ±2.35	84.39 ±5.70	49.54 ±2.28	140.10 ±10.12	99.75 ±20.44	558.20 ±64.91	97.73 ±11.76
P ст-ст	0.101	0.10	0.0001 ***	0.63	0.47	0.28	0.03 *	0.78
II поколение (женски зайци, дъщери на майките)								
контр. гр.	43.78 ± 2.24	27.34 ± 1.41	73.02 ± 2.03	37.40 ± 3.76	108.5 ± 4.63	89.29 ± 4.32	600.9 ±21.81	107.2 ± 5.91
опитна гр.	46.12 ±1.98	24.64 ±2.62	76.85 ±4.02	50.34 ±3.60	129.20 ±13.36	94.03 ±2.07	473.50 ±62.89	116.80 ±3.61
P ст-ст	0.06	0.03 *	0.04 *	0.0001 ***	0.002 **	0.02 *	0.0003 ***	0.003 **

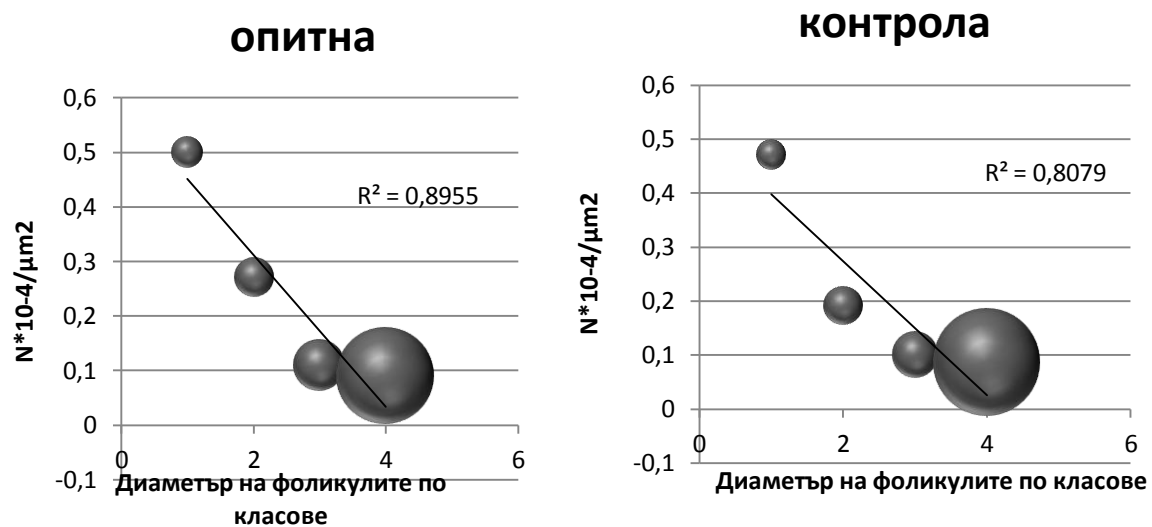
достоверност: * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$; *** - $P < 0.001$;

Плътността на първичните и вторичните фоликули е достоверно по-висока при опитните в сравнение с контролните яйчници (фиг. 4).



Фигура 4. Корелационна връзка между диаметър на фоликулите (μm) и плътността на разпределение ($N \cdot 10^{-4} / \mu\text{m}^2$) в яйчници на опитни (приемали СП) и контролни зайкини - майки

Вероятно резултатът се дължи на активизирани процеси на клетъчното делене, след засилена обмяна и богат спектър на вещества в кръвния поток, в резултат на приема на СП.



Фигура 5. Корелационна връзка между диаметър на фоликулите (μm) и плътността на разпределение ($N \cdot 10^{-4} / \mu\text{m}^2$) в яйчници на опитни и контролни зайкини, дъщери на майките от опита със СП

Достоверно по-висока плътност на вторичните фоликули се запазва при опитните зайкини, дъщери на майки приемали СП (фиг. 5). Това показва, че и в двете поколения се наблюдава по-активно включване на примордиалните фоликули в процеса на фоликулогенезата. Резултати, отнасящи се до по-висока активност на фоликулогенезата в яйчниците на животни, приемали СП са получени в експерименти с ремонтни женски свине (Марчева, 2014). Допълнително, към антиоксидантния потенциал на СП, е възможно токоферола, съдържащ се в нея да функционира като биологичен модификатор. Той влияе върху производството на вторични посредници и продукти от каскадата на арахидоновата киселина, а те от своя страна имат силен ефект върху клетъчната пролиферация (Manju et al., 2002).

В основния експеримент с Вехерб-Г (ВХТ) бе установено достоверно понижаване в живата маса на опитните зайкини-майки спрямо контролните (табл. 4). Действието на тази добавка, съдържаща ТТ се свързва с повишена секреция на LH, който стимулира превръщането на холестерола в стероиди, и преди всичко, увеличава производството на тестостерон (Gauthaman et al., 2002, 2003). Последният от своя страна активира метаболизма и отделянето на мазнини от мастните клетки, като намалява отлагането им. В контраст са резултатите на Abid, (2010), който съобщава за значително увеличаване на телесното тегло на женски мишки, третирани с воден екстракт на ТТ, обосновавайки го с повишена секреция на инсулинови фактори на растеж. Теглото на репродуктивните органи яйчници, яйцепроводи и матка обаче, нарастват при същите женски мишки, което е индикатор за увеличаване на нивото на естрогените. Тези данни съвпадат с резултата от нашето проучване за достоверно по-тежки яйчници на опитните животни в сравнение с контролните и при двете поколения зайкини.

Таблица 4. Жива маса и тегло на яйчници на опитни (приемали ВХТ) и контролни зайкини майки, и техните дъщери (без добавки)

I поколение (зайкини-майки)			
Параметри	Опитна (n=7)	контрола (n=7)	P
Жива маса, (g)	3480±76.11	3569±65.90	0.390
- в началото			
- в края	4107±125.40	4528±58.55	0.01 *
- ср. дневен прираст, (g)	13.93±1.09	21.31±0.16	0.001 ***
Тегло на яйчници, (g)	0.211±0.007	0.182±0.004	0.002 **
II поколение (женски зайци, дъщери на майките)			
	опитна (от опитни зайкини) (n=7)	контрола (от контролни зайкини) (n=7)	P
Жива маса, (g)	1125±21.61	1121±13.87	0.870
- в началото			
- в края	2504±99.04	2498±41.54	0.956
- ср. дневен прираст, (g)	30.64±1.72	30.60±2.99	0.98
Тегло на яйчници, (g)	0.137±0.0017	0.117±0.0015	0.0001 ***

достоверност: *- P<0.05; ** - P<0.01; *** - P<0.001;

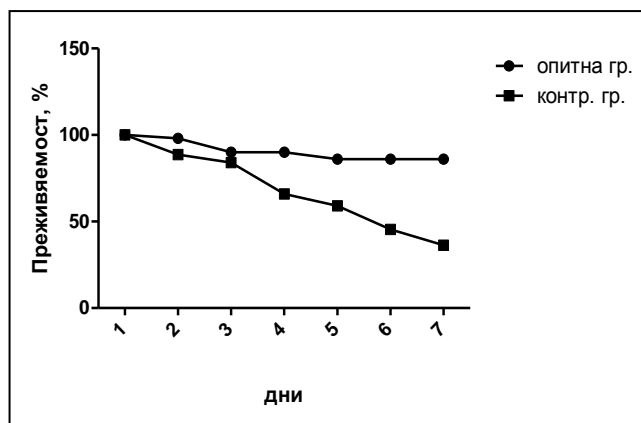
Гестационният период на зайкините бе с еднаква продължителност при двете анализирани групи, като поведението на родилките бе нормално. Друг ефект на ВХТ се изразява в по-висок брой новородени (табл. 5). Тези на опитните зайкини се запазват с достоверно по-висока преживяемост, която е свързана с наблюдаваното положително отношение от страна на майките. Съгласно Lieberman (1996), подобни поведенчески реакции се свързват с естрогенния ефект върху централната нервна система.

Таблица 5. Брой новородени зайчета и тяхната жива маса на 20-ти ден

Параметри	опитна (n=7)	контрола (n=7)	P
бр. новородени/ зайкиня	7.14±0.86	6.29±0.84	0.488
Жива маса 20 дена след раждане, (g)	314.90±20.31	254.40±15.70	0.036 *

достоверност: *** - P<0.001;

Доказана е по-висока преживяемост на новородените от опитните зайкини в сравнение с контролата (фиг. 6).



Фигура 6. Каплан-Майер анализ на преживяемост на новородени зайчета

Морфологичната структура на яйчниците на зайкините и от двете поколения, показва наличие на множество фоликули, в различни етапи на развитие, както и жълти тела (фиг. 7 и фиг. 8). Получените от нас резултати са в съгласие с данните на Hebel and Stromberg (1986) по отношение средният размер на яйцеклетките в първични, вторични и третични фоликули. Характерно и за двете групи, е закономерното за фоликулогенезата прогресивно (с около 5 пъти) нарастване на диаметъра на ооцитите. Подобни резултати съобщават Zitny et al. (2004) при изследване на яйчници от половозрели нетретирани зайкини.

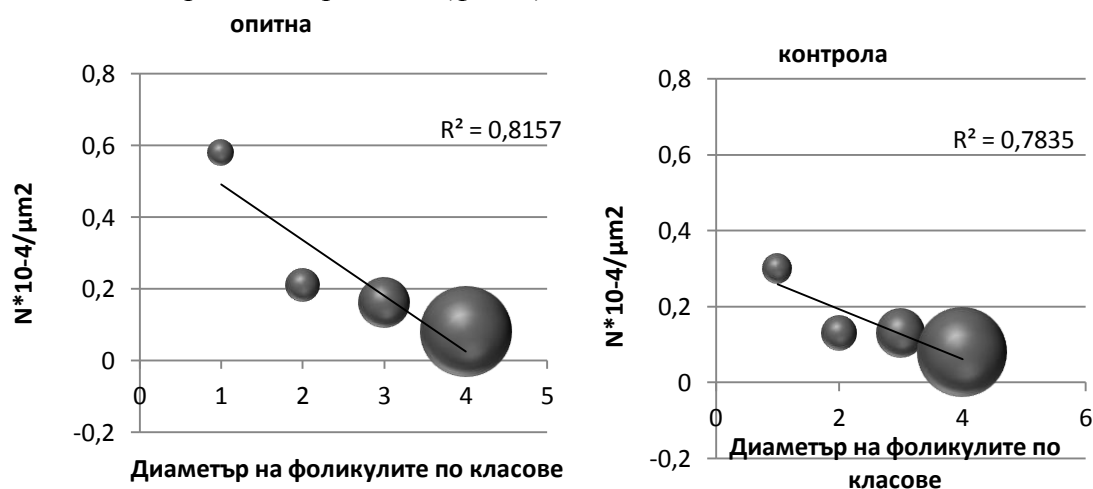
В яйчниците на зайкини, получавали *BXT* се наблюдават по-големи по диаметър вторични и преантрални фоликули спрямо контролната група, подобно на пилотния ни опит (табл. 6). Увеличаване на диаметъра на фоликулите, вероятно е отговор на повишена секреция на LH, след приемът на добавката. По данни на Martino-Andrade et al. (2010), стероидните сапонини, намиращи се в екстракт от ТТ водят до пряко увеличаване на LH в организма на женския плъх. Този хормон има много рецептори в тека клетките на яйчниковите фоликули и действайки, чрез активиране на ензима ароматаза /сAMP/ стимулира преобразуването на холестерола до андростендион, част от последния се превръща в естроген, който влиза в кръвообращението (Martino-Andrade et al., 2010). В отделни преантрални и антрални фоликули на зайкините-майки, приемали *BXT*, се наблюдават дегенеративни промени на гранулозните клетки – наличие на атретични телца (*call-exner bodies*), показателни за атрезия на самия фоликул. По-слабо проявени, като единични структури, същите се забелязват в антрални фоликули в яйчници на зайкини от II-ро поколение. Това предполага, че тази хранителна добавка приемана от майката е повлияла върху формирането на половите жлези в поколението. Подобни гранулозни клетки се свързват със занижени качества на яйцеклетката, защото заобикалящите я фоликуларни клетки, играят важна роля за определяне на качеството и потенциала ѝ за последващо оплождане и развитие в ембрион (Revelli et al., 2009). Известно е, че атрезията е свързана с недостатъчни нива на хормоните FSH и LH, водещи или до спукване на фоликула преди узряването на яйцеклетката, или до спиране на овулацията. Добавянето на *BXT*, съдържаща в състава си стероидни сапонини, вероятно, първоначално води до увеличаване на екзогенните нива на тези хормони (Миланов и др., 1985; Martino-Andrade et al., 2010), рефлектиращо в следствие на принципа на отрицателната обратна връзка, в подтискане на производството на ендогенните FSH и LH.

Таблица 6. Диаметър на фоликули и ооцити в яйчници на опитни (приемали ВХТ) и контролни зайкини майки, и техните дъщери (без добавки)

групи	Диаметър на овариални структури, μm (n=30/за структура)							
	първ. ф-ли (I)	яйц-ки	вторич. ф-ли (II)	яйц-ки	преантр. ф-ли(III)	яйц-ки	антр. ф-ли(IV)	яйц-ки
I поколение (зайкини майки)								
контр. гр.	49.85 ± 4.91	24.64 ± 2.62	70.09 ± 1.97	50.34 ± 3.61	135.10 ± 14.50	94.03 ± 20.07	473.5 ± 62.89	96.80 ± 13.61
опитна гр.	51.40 ± 3.65	29.56 ± 2.32	84.91 ± 2.37	50.69 ± 2.43	196.00 ± 20.96	92.0 ± 21.00	660.8 ± 68.84	97.70 ± 15.67
P ст-ст	0.80	0.182	0.032 *	0.84	0.0001 ***	0.86	0.064	0.81
II поколение (женски зайци, дъщери на майките)								
контр. гр.	41.05 ± 5.48	23.77 ± 4.29	68.27 ± 2.19	43.83 ± 4.63	135.2 ± 9.85	98.96 ± 3.65	375.0 ± 47.63	99.70 ± 2.65
опитна гр.	48.08 ± 2.80	28.38 ± 2.97	71.69 ± 3.89	42.05 ± 3.25	113.30 ± 5.33	91.12 ± 1.39	566.90 ± 81.53	100.70 ± 4.08
P ст-ст	0.28	0.39	0.46	0.76	0.07	0.068	0.06	0.543

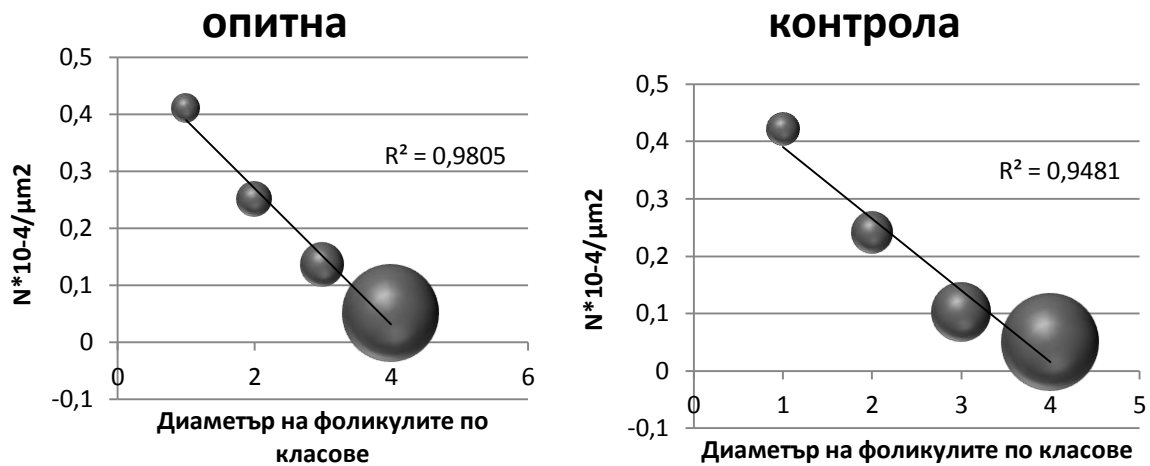
достоверност: * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$; *** - $P < 0.001$;

Ефектът на добавката се изразява в значително увеличен брой зрещи фоликули при жени след лечението им с екстракт от ТТ за период от 28 дни (Zarkova, 1982). Подобни са и нашите наблюдения за достоверно по-гъста плътност на разпределение на първични и вторични фоликули на единица площ в яйчници от опитни зайкини I-во поколение спрямо контролните (фиг. 9).



Фигура 9. Корелационна връзка между диаметър на фоликулите (μm) и плътността на разпределение ($N \cdot 10^{-4} / \mu\text{m}^2$) в яйчници на опитни и контролни зайкини –майки от опита с ВХТ

При техните дъщери, зайкини от II-ро поколение се наблюдава достоверно по-висока плътност на преантралните фоликули в яйчници от опитната група в сравнение с контролата (фиг. 10). Esfandiari et al. (2011), също съобщават за увеличен брой вторични, както и граафови фоликули в яйчници на пълхове, приемали 10 mg на животно пречистен екстракт от ТТ за 14 дни. Допълнително, авторите откриват нарастване на тека интерна и увеличен брой жълти тела, като го обясняват с LH-подобният ефект на добавката.



Фигура 10. Корелационна връзка между диаметър на фоликулите (μm) и плътността на разпределение ($N \cdot 10^{-4}/\mu\text{m}^2$) в яйчници на опитни и контролни зайкини, дъщери на майките от опита с ВХТ

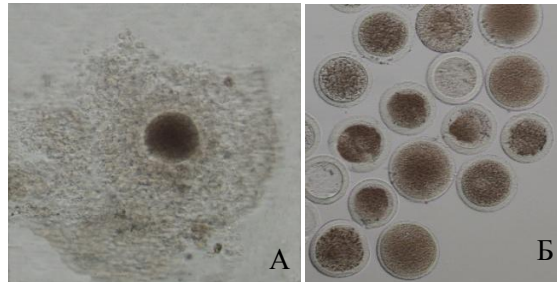
Нашите резултати, които са в съгласие с данните на Esfandiari et al. (2011), и Zarkova (1982), показват, че изпитваната хранителна добавка активира яйчниковият резерв и стимулира развитието на фоликули при зайкините. Приемът на ВХТ засилва майчиният инстинкт при женските животни, което обезпечава по-висока преживяемост на новородените. Вземайки предвид, обаче наблюдаваните дегенеративни промени на гранулозните клетки, трябва много внимателно да се подбира дозата за използване на тази добавка при женските животни.

- **Влияние на биологично активните добавки *Spirulina platensis* и *Вемохерб-Т* и дългосрочният им ефект върху експресията на гените *bmp15* и *gdf-9* в ооцити и кумулусни клетки от яйчници на зайкини-майки и техните дъщери**

Броят на факторите, участващи в регулацията на фоликулогенезата непрекъснато се увеличава с напредване на техниките за молекулярни изследвания. Проведените през последните години изследвания, върху нокаут мишки изведоха на „сцена“ нови регулатори на този процес - интраовариални растежни фактори от семейството на TGF- β трансформиращи растежни фактори, а именно *BMP15* (костен морфогенетичен протеин-15) и *GDF-9* (растежен диференциационен фактор-9), кодирани от съответните гени *bmp15* и *gdf-9*. Тези ооцит-специфични гени експресират в периода, когато по-голяма част от мРНК е относително стабилна в яйцеклетката и са от първостепенно значение за фоликулогенезата, оогенезата и ранната ембриогенеза. Това определи нашия избор на гените *bmp15* и *gdf-9* като подходящи кандидати за изследвания,

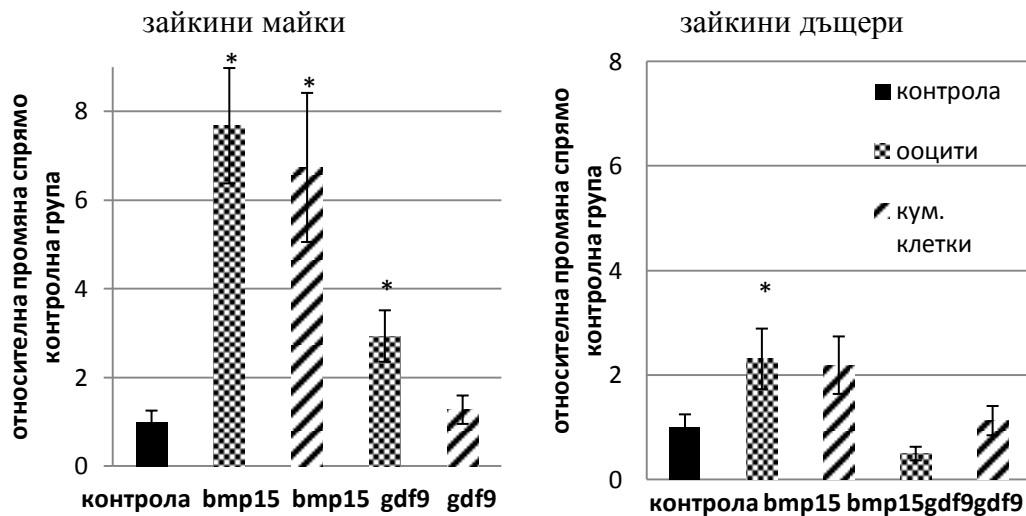
свързани с оценка влиянието на външни фактори, каквито са хранителните добавки, върху фоликулогенезата и качеството на ооцити.

Обща РНК беше екстрахирана от проби от кумулусни клетки и проби от яйцеклетки събрани (фиг. 11) от яйчници на всяка женска - и майки, и дъщери. Проведен бе RT-PCR за определяне нивата на мРНК на *bmp15* и *gdf-9*. Данните са нормализирани спрямо GAPDH в контролните и третираните групи и са представени като относителна промяна в експресията на тези гени спрямо контролата.



Фигура 11. Микрофотографии на изолирани от заешки яйчници: А. кумулус-ооцитен комплекс; Б. пречистени ооцити;

Съгласно получените резултати, подхранването на зайкини със СП в периода на половото съзряване, достоверно променя експресията на гена *bmp15* в кумулусните клетки и ооцити в посока засилване (фиг. 12).



Фигура 12. Промяна в генната експресия в овариални клетки, при зайкини-майки, участвали в опита със СП и техните дъщери

Тази тенденция се запазва и при зайкини II-ро поколение, дъщери на майки, получавали добавката, въпреки, че силата на ефекта се намалява няколко пъти в сравнение с първото поколение (фиг.12). Това е първото съобщение за експресия на ген *bmp15* от кумулусни клетки при зайкини. Досега е проведено едно изследване със заешки яйцеклетки при *in vitro* условия, където е установено експресията на *bmp15*, минимално при незрелите ооцити, а максимума му при настъпване на кумулусната експанзия (Ping et al., 2008).

Гените *bmp15* и *gdf-9* се включват в редица физиологични събития, протичащи в яйчниците по време на развитието на фоликулите и във времето на овулацията. През

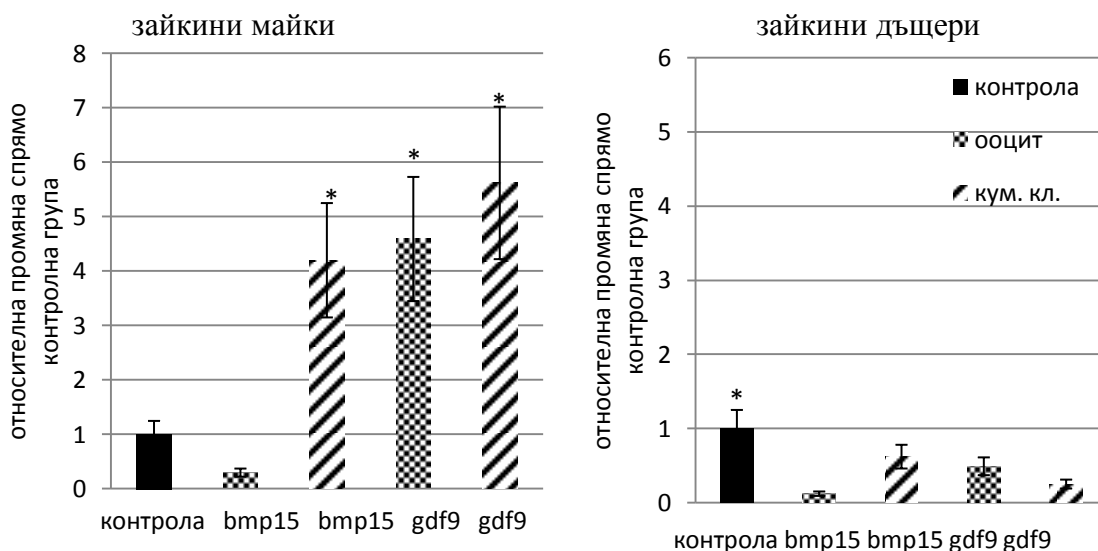
периода на растеж продуцираните от тях растежни фактори регулират функциите на фоликуларните клетки (McNatty, 2004), насърчават пролиферацията на гранулозните клетки (Pasquale et al., 2004), предотвратяват преждевременната лутеинизация (Vitt et al., 2000). Данните относно съотношението между промяната в експресията (FC_{майки}) на съответния ген при майките към промяната в експресията (FC_{дъщери}) на съответния ген при зайкини II-ро поколение (табл. 7), показват няколко пъти по-висока експресия на изследваните гени при майките в сравнение с дъщерите им.

Таблица 7. Относителна степен на промяна в генната експресия в ооцити и кумулусни клетки при зайкини - майки, получавали СП спрямо техните дъщери

показател	ооцити	кумулусни клетки
<i>bmp15</i>	3.30	3.01
<i>gdf-9</i>	5.80	1.50

Третирането с добавката ВХТ, увеличава експресията на *bmp15* само в кумулусните клетки, а в ооцитите се наблюдава тенденция за потискане на неговата експресия. В същото време, тази добавка стимулира експресията на ген *gdf-9* и в ооцитите, и в кумулусните клетки (фиг. 13), противоположно на ефекта от СП.

Daoud et al. (2012b) открива, че кратка хранителна рестрикция, последвана от повторно захранване довела до повишаване процента на зрели ооцити. Експресията на *gdf-9* в зрели яйцеклетки е намаляла значително с ограничаване на храната и се повишила след повторното захранване. Обратно, в незрели ооцити нивата на *gdf-9* са се увеличили еднакво и с ограничаване на храната, и след повторното захранване (Daoud, 2012a). Хранителната рестрикция има пряк ефект върху секрецията на LH, което косвено активира ген *gdf-9*, който в последствие отговаря за пролиферацията на кумулусните клетки и повишаване на тяхната чувствителност към LH, следователно за съзряването на ооцитите и овулирането (Darryl, 2002.).



Фигура 13. Промяна в генната експресия в овариални клетки, при зайкини-майки, участвали в опита с Вемохерб-Т и техните дъщери

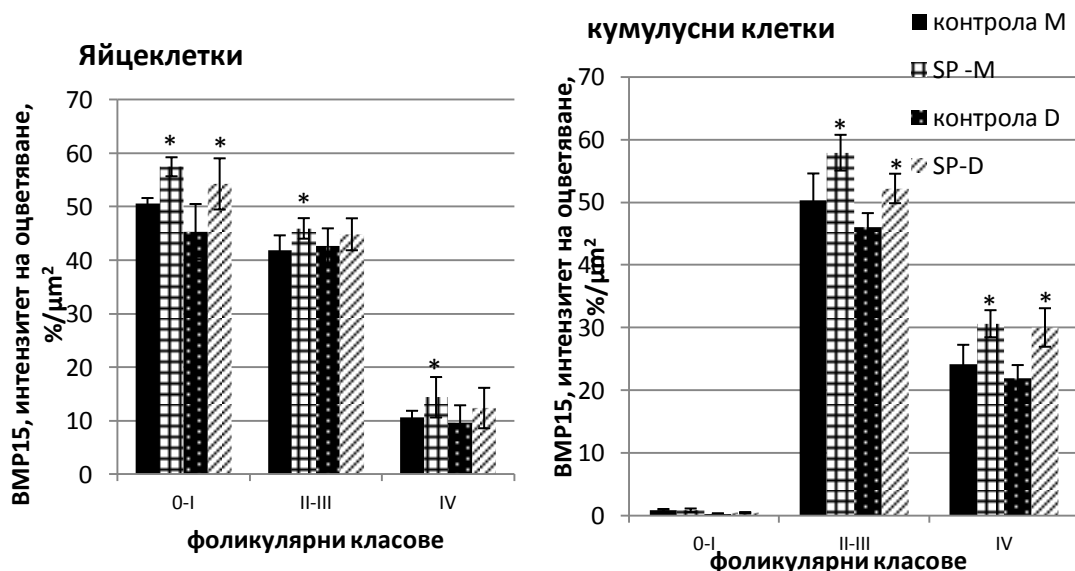
Важността на експресията на *gdf-9* във финалните стадии на развитието на фоликула е потвърдена от изследванията на Yan et al. (2001), които установяват, че

експресията на гена предизвиква експанзията на *cumulus oophorus*, чрез ускоряване секрецията на хиалуронова киселина. Стимулираната от *BXT* експресия на ген *gdf-9* при зайкини-майки не се наследява във II-ро поколение, дори има тенденция за понижаване на експресията (фиг. 13). По всяка вероятност, *BXT* в този случай въздейства върху някои фактори, които регулират експресията на този ген, а не върху гена непосредствено. Спирането на третирането с добавката прекъсва този регулаторен механизъм, което води до връщането на нивото на експресията до контролните стойности. Възможно е, това да са гонадотропните хормони, нивото на които по литературни данни се повишава от *TT*, активната съставка съдържаща се в *BXT*. Данните относно съотношението между промяната в експресията ($FC_{\text{майки}}$) на съответния ген при майките към промяната в експресията ($FC_{\text{дъщери}}$) на съответния ген при зайкини II-ро поколение (табл. 8), показват няколко пъти по-висока експресия на изследваните гени при майките в сравнение с дъщерите им.

Таблица 8. Относителна степен на промяна в генната експресия в ооцити и кумулусни клетки при зайкини - майки, получавали Вемохерб-Т спрямо техните дъщери

показател	ооцити	кумулусни клетки
<i>bmp15</i>	2.50	6.80
<i>gdf-9</i>	9.30	22.40

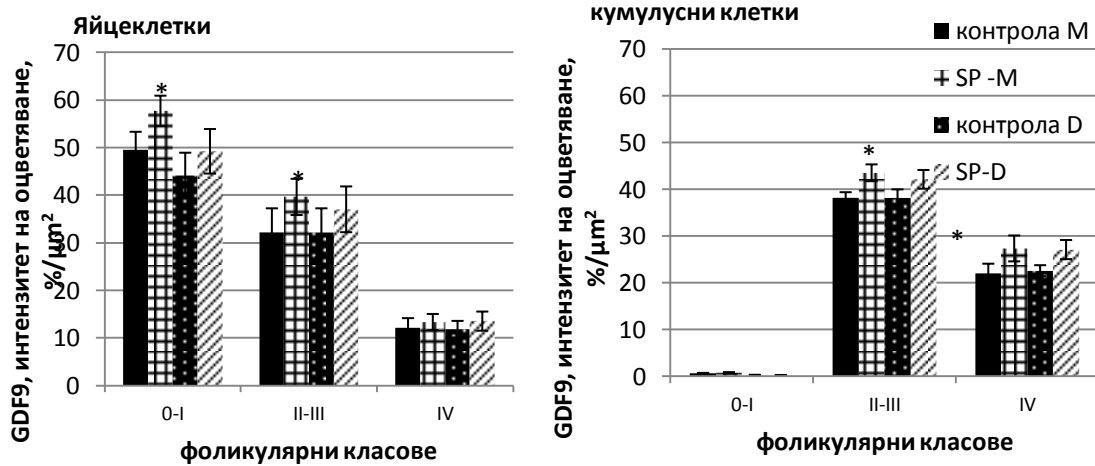
Данните от генноекспресионния анализ в голяма степен кореспондират с резултатите от имунохистохимичното изследване за локализацията и интензитета на секрецията на белтъците - *GDF-9* и *BMP15*, кодирани от тези гени. Той свидетелства за по-интензивна секреция на протеините *BMP15* и *GDF-9* в кумулусни клетки и ооцити при животните, получавали хранителните добавки, като по-интензивно оцветяване се наблюдава в ооцитите спрямо кумулусните клетки (фиг.14).



Фигура 14. Интензитет на оцветяване на *BMP15* в ооцити и кумулусни клетки през различните фолликуларни фази, при зайкини-майки (от опита със СП) и техните дъщери

Най-интензивна имунореактивност проявяват *BMP15* и *GDF-9* в цитоплазмата на яйцеклетки в примордиални и първични фолликули, а най-ниски - в яйцеклетки на

антрални фоликули. Значително по-висок сигнал се определя в структурите на яйчници от зайкини майки, приемали СП (фиг. 15 и фиг. 16, респективно за *BMP15* и *GDF-9*). В кумулусни клетки интензивността на *BMP15* и *GDF-9* се увеличава във вторични и преантрални фоликули и отново намалява в антрални фоликули. Значителни разлики се оценяват между контролните и опитни групи и за *GDF-9* (фиг. 17). Освен това са открити и двата растежни фактори в тека клетки, в интестициалните клетки и клетки на жълтото тяло, което предполага, че тези фактори имат значение за функциите на яйчниците също и след овулацията.

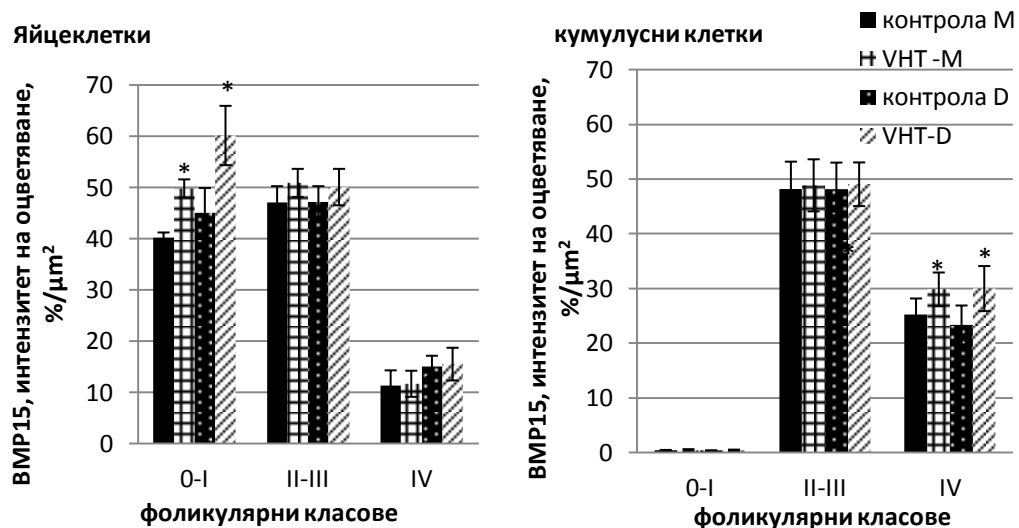


Фигура 17. Интензитет на оцветяване на *GDF-9* в ооцити и кумулусни клетки през различните фоликулярни фази, при зайкини-майки (със СП) и техните дъщери

Ниската експресия на *BMP15* се обяснява с инхибиращи фактори, които са свързани с атрезията на заешките фоликули. Количеството на тези протеини нараства при преантрални до антрални фоликули в свински яйчници, а след това постепенно се изместват към кумулусни и/или гранулозни клетки (Li et al., 2008.), което съвпада с нашите резултати. Дори ние отбелязваме ясно изразена локализация на тези белтъци в интерстициалните клетки на овариите и в жълтите тела. Механизмът на действие не е напълно ясен, но се предполага наличието на потенциален лутеинизиращ ефект от страна на растежните фактори, които участват в регулирането на чувствителността на фоликулярните клетки към гонадотропини, чрез намаляване експресията на *FSH-R* и *LH-R*, съответно (Elvin et al. 1999; Vitt et al., 2000.).

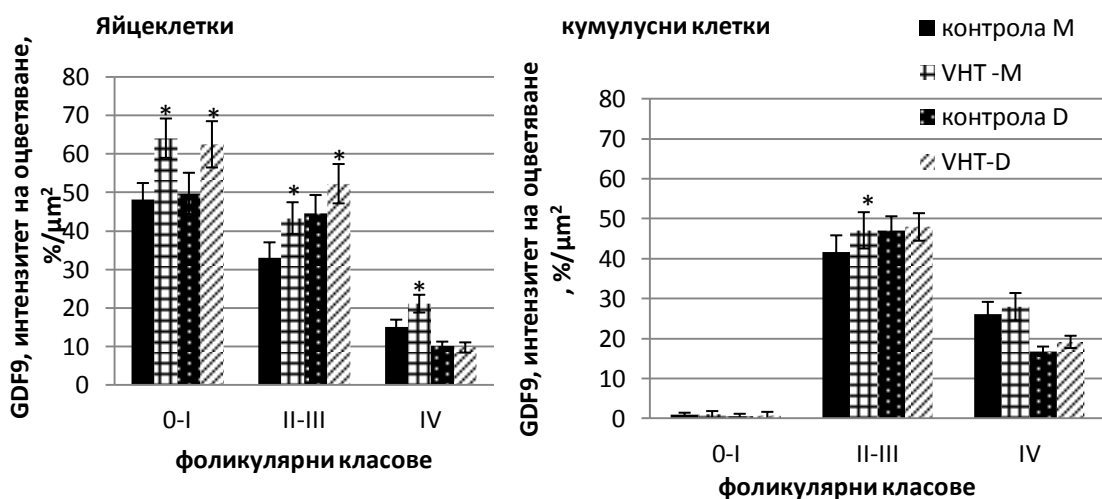
След като фоликула достигне овулационен етап и яйцеклетката придобие компетентност на развитието си, антилутеинизационните и митогенни ефекти на *BMP15* и *GDF-9* вече не се изискват. След овулационния скок на *LH*, експресията на *bmp15* и *gdf-9* се понижават в яйцеклетката. Това се потвърждава и при дъщерите, на майките приемали добавката (фиг. 18 и фиг 19, респективно за *BMP15* и *GDF-9*).

При всички животни се наблюдава понижаване на интензитета на секрецията на тези белтъци в яйцеклетките в прогреса от примордиален до антрален стадий. Подобна е локализацията на *BMP15* и *GDF-9* в яйчниците на зайкините- майки в опита с *VXT* (фиг. 19 и фиг 23, респективно).



Фигура 20. Интензитет на оцветяване на BMP15 в оцити и кумулусни клетки през различните фолликуларни фази, при зайкини I-во поколение (с ВХТ) и техните дъщери

Значително по-висок сигнал е определен в яйцеклетките на първични и вторични фоликули в яйчниците на майки (фиг. 21), приемали ВХТ, както и от яйчници на дъщерите, родени от тези майки в сравнение с контролите (фиг. 22). Интензивността на *GDF-9* е по-висока в оцити от антрални фоликули в яйчниците на опитните майки. В кумулусни клетки интензивността на *BMP15* и *GDF-9* се увеличава във вторични и преантрални фоликули и отново намалява в антралните. Относно *BMP15* бяха дефинирани значителни различия между контрола и експериментални групи и при майки и при дъщери в антралните фоликули. Локализацията на *GDF-9* бе засилена в кумулусни клетки на вторични и преантрални фоликули в опитната група зайкини-майки в сравнение с контролата (фиг. 23 и фиг. 24).



Фигура 23. Интензитет на оцветяване на GDF-9 в оцити и кумулусни клетки през различните фолликуларни фази, при зайкини I-во поколение (с ВХТ) и техните дъщери

Експресията на *GDF-9* в оцитите на зайкини дъщери на майки, приемали ВХТ бе достоверно по-висока в опитната спрямо контролата при първични, вторични и преантрални фоликули (фиг. 23 и фиг. 25). Въпреки данните за намаляване на генната

експресия на *bmp15* в ооцити и кумулусни клетки при опитните животни, имунохистохимичният анализ показва, че има по-голямо количеството белтък *BMP15* в кумулусните клетки на антрални фоликули и в ооцитите на примордиални и първични фоликули в опитната група спрямо контролната. Същото се наблюдава и относно *GDF-9*, въпреки данните за понижена генна експресия в опитната група, наблюдава се по-голямо количество белтък в ооцитите на ранни стадии от развитието на фоликула и в кумулусните клетки при късен (антрален) фоликулярен стадий.

Като ефект от страна на хранителните добавки върху изследваните гени, настоящата теза се явява първото подобно изследване със зайкини. То затвърждава, че *bmp15* и *gdf-9* имат важна роля за фертилността на женските индивиди, като опровергава съществуващата хипотеза до момента, че не са от съществено значение за плодовитостта на женски гризачи. Наличието на производните от тях белтъци във фазите примордиални и първични фоликули, отразява участието им във важната реорганизация на фоликулярната структура още със започване на растежа. Наличието им във вторични фоликули ги определя като сигнални молекули, свързани с развитието освен на ооцита, и на обкръжаващите го клетки. Присъствието им в преантрални и антрални фоликули потвърждава тяхната значимост за диференциация на кумулусните клетки и повишаване на чувствителността им към LH, както и предотвратяване на апоптични промени. Интересен е фактът на локализацията на тези белтъци в тека клетките на антралните фоликули, също така и в интестициалните клетки на яйчника и в клетките на жълтите тела, което потвърждава тяхната значимост за овариалните процеси и след овулацията. Промените в експресията им в резултат на включването в диетата на БАД показва високата им чувствителност към метаболитните промени в яйчниците. Нашите резултати показваха, че ооцитите на зайкини в периода на половото съзряване са възприемчиви към епигенитичните модуляции и, че биологично активните добавки СП и ВХТ могат да бъдат един от факторите, предизвикващи тези промени. През последните години все повече се натрупват данни за епигенетичния ефект на хранителните вещества и специално, на биологично активните компоненти на храната, които или директно повлияват ензимите, участващи в метилирането на ДНК и модификацията на хистоните, или индиректно, чрез промяна на субстратите за тези ензими (Choi and Friso, 2010). Идентифициране на такива добавки, които са способни да индуцират, модулират или премахват епигенетичните белези на гени, свързани с фертилитета, ще имат голямо значение за селскостопанската практика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана е работната хипотеза, че влиянието на биоактивните добавки върху метаболитните процеси в яйчниците на женските зайци води до промени във фоликулогенезата. Промяната в приема на хранителни вещества в периода преди чифтосване, регулира динамиката на генната експресия на *gdf-9* и *bmp15* и в яйцеклетки, и в кумулусни клетки. Доказано е, че храната на майката, преди заплождане е била един от определящи фактори за развитието на половите жлези и качеството на ооцитите при техните дъщери.

Разработката открива перспективи за нови изследвания относно епигенетичните промени на ооцит-специфичните гени.

ИЗВОДИ

Въз основа на поставените цел и задачи са направени следните изводи:

➤ *Spirulina platensis*

1. Прилагането на хранителната добавка СП при зайкини в продължение на 120 дни преди заплождането не оказва съществено влияние върху живата маса, но увеличава теглото на яйчниците и обезпечава по-висока преживяемост и по-голямо тегло на новородените към 20-я ден.
2. За яйчниците на зайкините, приемали СП е характерна по-голяма плътност на първичните и вторичните фоликули, както и по-голям диаметър на вторичните и антралните фоликули.
3. Включването на СП в хранителната дажба води до увеличена експресия на ген *bmp15* в ооцитите и кумулусните клетки, а на ген *gdf-9* само в ооцитите.
4. Теглото на яйчници на зайкини от II-ро поколение, дъщери на майки, получавали СП е по-високо; в тях се наблюдават по-голяма плътност на вторичните фоликули, по-голям диаметър на вторични и антрални фоликули и по-голям диаметър на яйцеклетката във вторични, преантрални и антрални фоликули.
5. В ооцитите на зайкини от II-ро поколение, дъщери на майки, получавали СП, се запазва достоверно по-висока експресия на ген *bmp15*.
6. По-висок интензитет на имунореактивността на протеините *BMP15* и *GDF-9* се проявява в яйцеклетки и в кумулусни клетки в яйчниците на опитни зайкини- майки и при техните дъщери.

➤ *Вемохерб-Т*

7. Прилагането на хранителната добавка *Вемохерб-Т* при половозрели зайкини в доза 3.0 mg/kg в продължение на 45 дни преди заплождането, доведе до понижаването на живата маса, но увеличаване на теглото на яйчниците, по-висока преживяемост и по-голямо тегло на новородените към 20-я ден.
8. За яйчниците на третирани с *Вемохерб-Т* животни е характерна по-голяма плътност на първични и вторични фоликули, както и по-голям диаметър на вторичните и преантралните фоликули.
9. Включването на *Вемохерб-Т* в хранителната дажба води до увеличена експресия на ген *gdf-9* в ооцитите и в кумулусните клетки, а на ген *bmp15* само в кумулусните клетки. В ооцитите на опитните животни се наблюдава тенденция за понижаване експресията на ген *bmp15*.
10. Теглото на яйчниците на зайкини от II-ро поколение, дъщери на майки, получавали *Вемохерб-Т*, е по-високо; в тях се наблюдават по-голяма плътност на преантрални фоликули, и по-голям %-тен дял на яйцеклетките в тях.
11. В ооцитите на зайкини от II-ро поколение, дъщери на майки, получавали *Вемохерб-Т*, се наблюдава достоверно подтискане на експресията на ген *bmp15* в ооцитите, както и подтискането на експресията на ген *gdf-9* в кумулусните клетки.
12. По-висок интензитет на имунореактивността на протеините *BMP15* и *GDF-9* се проявява в яйцеклетки от примордиални и първични фоликули при опитни зайкини и при техните дъщери, докато в кумулусните клетки имунореактивността е силно проявена във вторични и антрални фоликули.

ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер:

- Доказано е положителното влияние на добавката на *Spirulina platensis* върху репродуктивните параметри при женски зайци, което рефлектира в по-голямо тегло на яйчници, по-активно въвличане на примордиалните фоликули в процеса на фоликулогенезата и по-висока преживяемост на новородените.
- Установена е оптималната доза на Вемохерб-Т за зайкини с позитивен ефект върху прираста и репродуктивните параметри - теглото на оварии, преживяемост на новородените и тяхното живо тегло към 20-ти ден след раждането.
- За първи път в световен план е проследено въздействието на биологично активните субстанции *Spirulina platensis* и *Вемохерб-Т* (консумирани само от майките), и е доказан ефектът им върху репродуктивните параметри на второ поколение женски зайци. Подобни изследвания са ограничени и за други биологични видове.
- За първи път в България се докладват данни за комплексна морфометрична оценка на фоликулите при зайкини от породата Новозеландска бяла.
- За първи път в България е изследвана експресията на ооцит-специфичните гени, кодиращи растежните фактори *GDF-9* и *BMP15* при женски зайци *in vivo* в две поколения (няма български литературни източници дори за друг вид).
- Доказана е чувствителността на гените *gdf-9* и *bmp15* в ооцитите и кумулсните клетки към фитогенните хранителни добавки с различна насоченост на действието, която се изразява в промяна на експресията. Най-чувствителен е генът *bmp15* в ооцитите, промяната на неговата експресия се наследява във второ поколение.
- Доказано е, че изпитаните добавки по различен начин повлияват експресията на ген *bmp15* в ооцитите. Повишава се експресията на *bmp15* в ооцитите на майки, хранени със СП, и се запазва по-високото ниво в ооцитите на техните дъщери. В ооцитите на майки, хранени с Вемохерб-Т, експресията на *bmp15* се подтиска и това се запазва и в ооцитите на техните дъщери.
- Доказан е стимулиращ ефект на добавката Вемохерб-Т върху експресията на ген *gdf-9* в ооцитите и кумулсните клетки в оварии на третираните зайкини от първото поколение.
- Доказана е локализация на *GDF-9* и *BMP15* в интестициалните клетки и в клетките на жълтото тяло в яйчниците на зайкини.

Приноси с потвърдителен характер:

- При морфометричен анализ на яйчниците на зайкини от породата Новозеландска бяла се потвърдиха основните закономерности на фоликулогенезата при бозайниците – прогресивно нарастване на фоликулите от стадий първичен до антрален; двустъпково нарастване на диаметъра на яйцеклетките до стадий преантрален фоликул; намаляване на процентния дял на обема на ооцита спрямо обема на фоликула при развитие от стадий примордиален до антрален фоликул.
- Чрез RT-PCR е потвърдена експресията на гените *gdf-9* и *bmp15* в ооцитите и кумулсните клетки във всички стадии на фоликулогенезата *in vivo* при женски зайци.
- Чрез имунохистохимичен анализ е потвърдена локализацията на растежните фактори *GDF-9* и *BMP15* в ооцити и кумулсни клетки във всички стадии на фоликулогенезата *in vivo* при женски зайци.

- Подтвърждава се, че заекът се явява полезен животински модел за проследяване взаимодействията яйцеклетка-кумулусни клетки, който може да се използва за усъвършенстване на репродуктивни биотехнологии.

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията:

1. **Абаджиева Д., С. Григорова, Д. Качева, Е. Кистанова, 2013.** Характеристика на преантрални фоликули на зайци от породата Новозеландска бяла. Жив. науки, L, 4-5, стр. 66-73.
2. **Абаджиева Д., С. Григорова, Г. Вълчев, Е. Кистанова, 2013.** Морфометрични параметри на яйчникови структури на зайци, приемали екстракт от *Tribulus terrestris*. Жив. науки, L, 6, 82-88.
3. **Abadjieva D., M. Chervenkov, K. Shumkov, A. Shimkus, A. Shimkiene, E. Kistanova, 2013.** Improving of productive and reproductive performances in rabbits by biologically active feed additives. *Biotechnology in Animal Husbandry*, ISBN 978-86-82431-69-5, p. 288-298.

Списък на участията в научни конференции във връзка с дисертацията:

1. **Абаджиева Д., С. Григорова, Г. Вълчев, Е. Кистанова, 2013.** “МОРФОМЕТРИЧНИ ПАРАМЕТРИ НА ЯЙЧНИКОВИ СТРУКТУРИ НА ЗАЙЦИ, ПРИЕМАЛИ ЕКСТРАКТ ОТ *TRIBULUS TERRESTRIS*”- „Новости в аграрната наука за ефективно земеделие”, Научна конференция с международно участие при Земеделски институт - гр. Шумен, 26.09.2013г.;
2. **Abadjieva D., M. Chervenkov, K. Shumkov, A. Shimkus, A. Shimkiene, E. Kistanova, 2013.** IMPROVING OF PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCES IN RABBITS BY BIOLOGICALLY ACTIVE FEED ADDITIVES. *Proceedings of 10 INTERNATIONAL SYMPOSIUM*” 10 INTERNATIONAL SYMPOSIUM „MODERN TRENDS IN LIVESTOCK PRODUCTION”, Белград, Сърбия, 02-04.10.2013;

Участие в проекти:

1. **Проект BG051PO001-3.3.06-0059** за фундаментално и приложно обучение на докторанти и млади учени в биологични направления и иновационни биотехнологии, с ръководител доц. М. Мурджева (ИБИР);
2. **Проект BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес”**, към оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” (2007-2013), със съдействието на МОН на РБългария и съфинансирани от Европейския социален фонд към Европейския съюз, с ръководител гл. ас. Д. Абаджиева (ИБИР);
3. **Проект № DKOF7RP02 /17** под патронажа на МОН на РБългария – съфинансиране на проект ReProForce, с ръководител доц. Е. Кистанова (ИБИР);

Благодарности

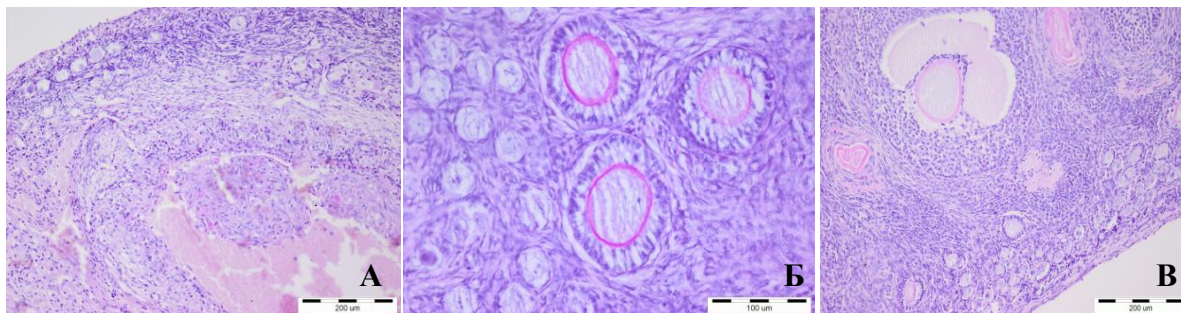
Бих искала да изразя своята признателност към научния ми ръководител доц. Елена Кистанова, за насърчаването и помощта, за търпението, за всички шансове, които ми предостави, за вярата в мен, дори когато имах съмнения. Често се чувствах като птица с едно крило, особено когато не вървеше по план, но моят ръководител винаги ме учеше да упорствам, да продължа и да търся възможности. Благодаря за това, че съградихме доверие и екипност, и съхранихме уважението! Благодаря за всичко!

Благодаря на доц. П. Рашев, за това че ме въведе по първите стъпки на имунохистохимията, за ентузиазма му и помощта - без значение ден и час. Бе удоволствие за мен да работя с него и момичетата в секцията му, където открих и истински приятели. Благодаря на Ники и Боби за въведението в приложната генетика из „Проген“! Благодаря на колегите от секция „Ембриобиотехнологии на животните“, специално на проф. Д. Качева, доц. К. Тодорова, доц. С. Хайрабемян, доц. Р. Стефанов, гл. ас. М. Червенков, д-р К. Шумков, д-р Л. Димова, Марияна, Силва, Ваня, Милена. Дълбоко съм задължена на доц. М. Мурджева и доц. Цв. Орешкова, за това че отделяхте от времето си и научих толкова много от вас.

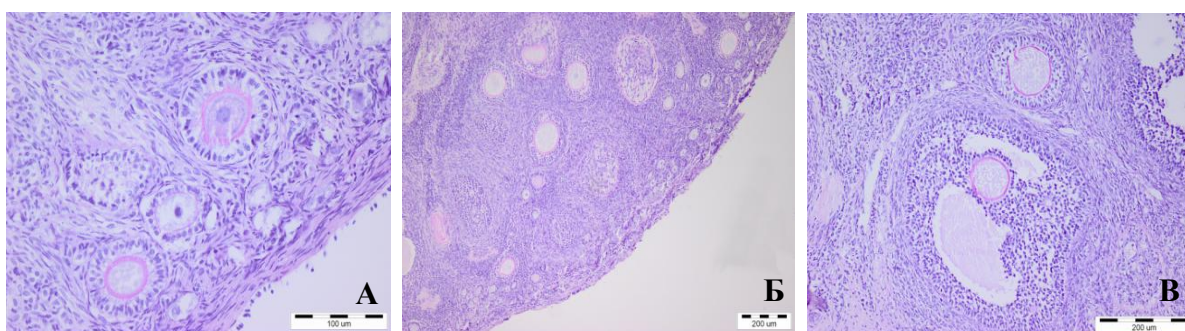
Благодаря на колегите от ИЖН-Костинброд за добрата съвместна работа и приятелството запазило се в годините. Не на последно място, благодарна съм на проф. Катя Търдс и Групата по физиология на човека и животните, Университет Вагенинген, Холандия! Благодаря на онези приятели, които през целия този период не спираха да ми показват пътя: напред - с доверие и любов, а назад – с подкрепа и кураж!

Благодаря на семейството ми, за това че насаждаха в мен увереността - да стрелям към луната и вярата, че мога да я оцелея!

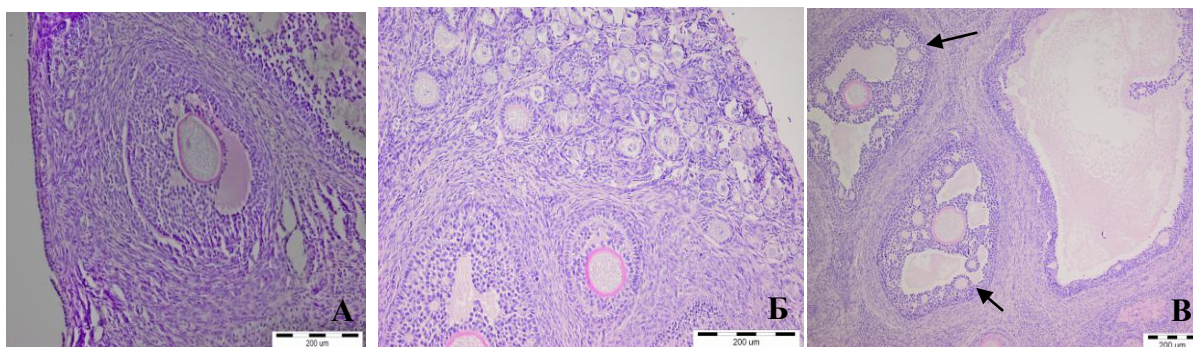
Благодаря на всички, които пряко или косвено допринесоха за тази работа!



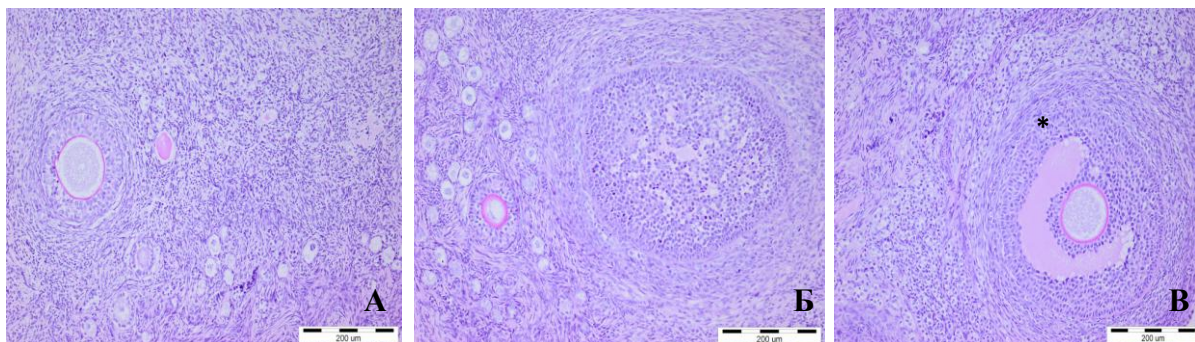
Фигура 2. Хистологични секции от яйчници на зайкини-майки (от опита със СП), (PAS): А. Контрола (x20); Б. Примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x40); В. Първични и антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x20);



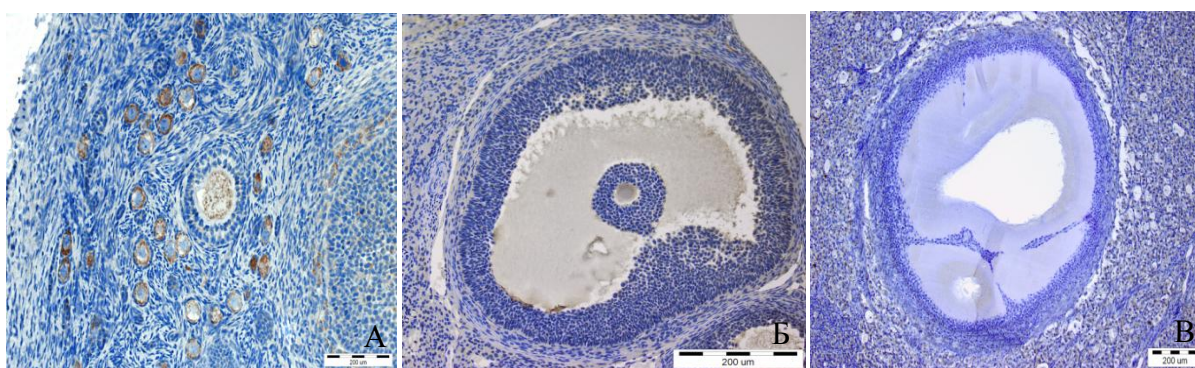
Фигура 3. Хистологични секции от яйчници на зайкини, дъщери на зайкини - майки от опита със СП, (PAS): А. Контрола (x40); Б. Примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x10); В. вторичен и ранен антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x10);



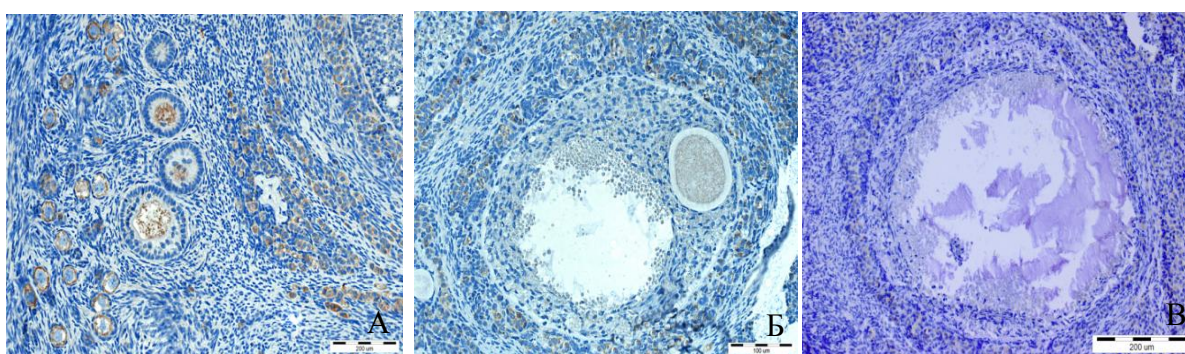
Фигура 7. Хистологични секции от яйчници на зайкини-майки (от опита с ВХТ), (PAS): А. Контрола (x20); Б. Примордиални, първични и преантрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x20); В. антрални фоликули с атретични телца (стрелки) в яйчник от опитна гр. (x10);



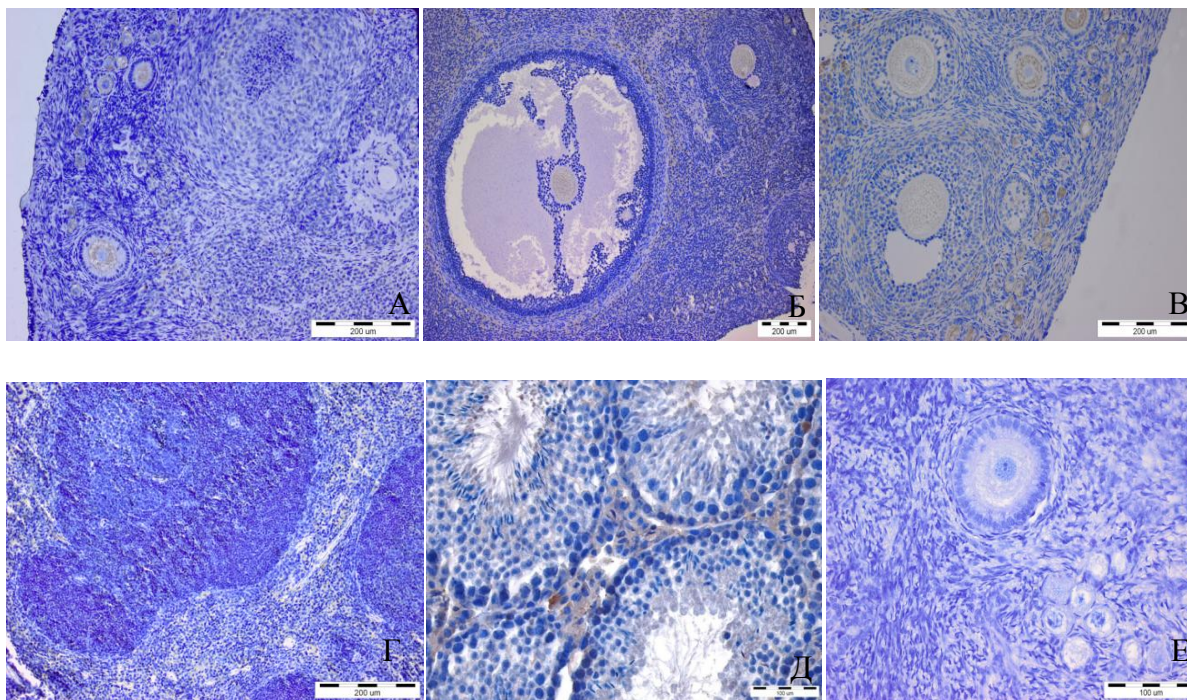
Фигура 8. Хистологични секции от яйчници на зайкини, дъщери на зайкини - майки от опита с ВХТ, (PAS): А. Контрола (x20); Б. Примордиални, първични и вторични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); В. единични атретични телца (*) в ранен антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x20);



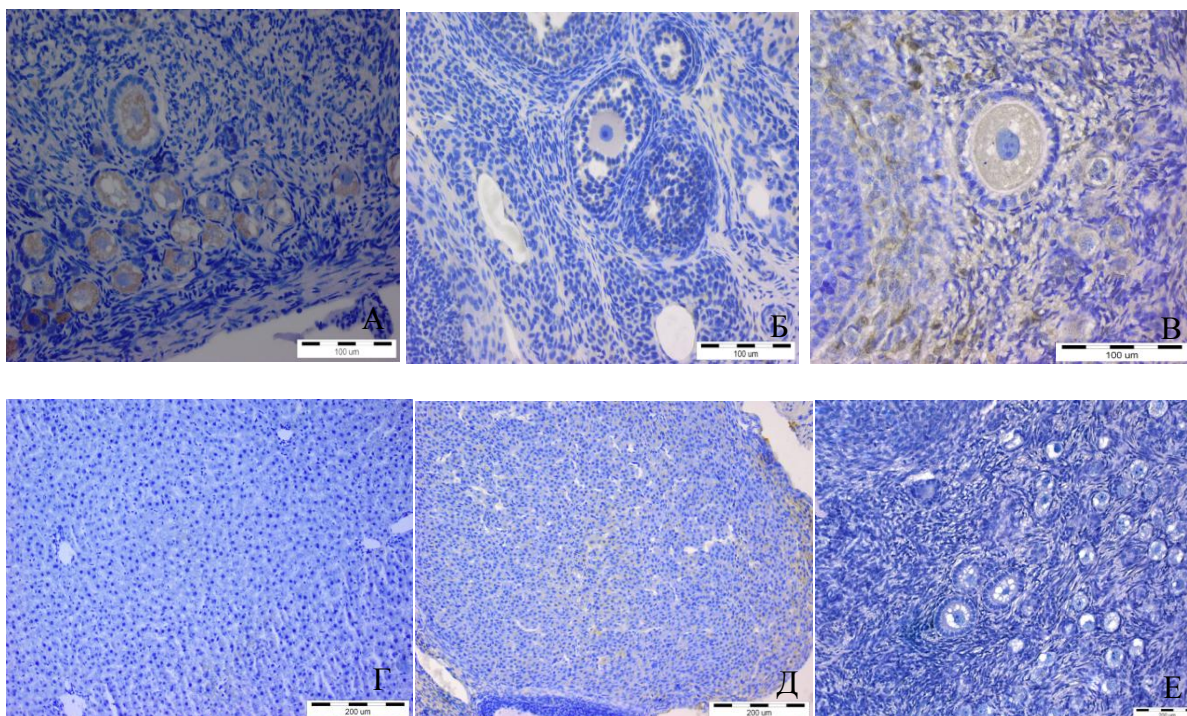
Фигура 15. Локализация на протеин BMP15 в яйчници на зайкини-майки от опита със СП: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. в антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x20); В. в антрален фоликул в яйчник от контролна група (x10);



Фигура 16. Локализация на протеин GDF-9 в яйчници на зайкини-майки от опита със СП: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. в антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x20); В. в антрален фоликул в яйчник от контролна група (x20);

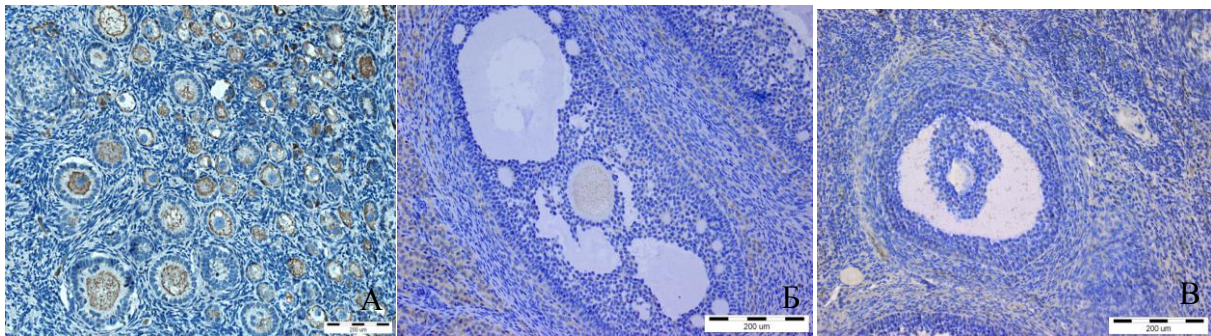


Фигура 18. Локализация на протеин BMP15 в яйчници на зайкини, дъщери на зайкини-майки от опита със СП: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. антрален фоликул в яйчник от опитна гр. (x10); В. примордиални, първични и преантрален фоликул в яйчник от контролна гр. (x20); Г. негативна контрола (миши далак, x20); Д. позитивна контрола (миши тестис, x40); Е. BMP15 негативна (ПАВ, x40);

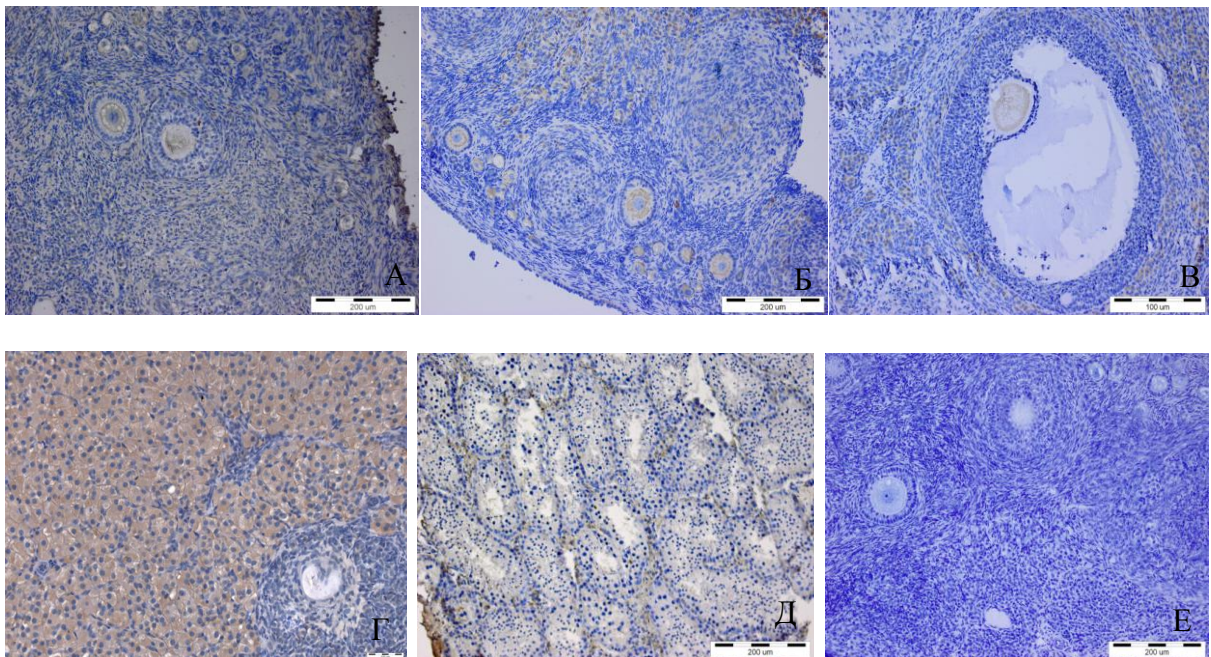


Фигура 19. Локализация на протеин GDF-9 в яйчници на зайкини, дъщери на зайкини-майки от опита със СП: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x40); Б. в ооцити и кумулусни клетки на преантрални фоликули в яйчник от опитна гр. (x40); В. негативна контрола (миши далак, x20); Г. негативна контрола (ПАВ, x20); Д. негативна контрола (ПАВ, x20); Е. негативна контрола (ПАВ, x40);

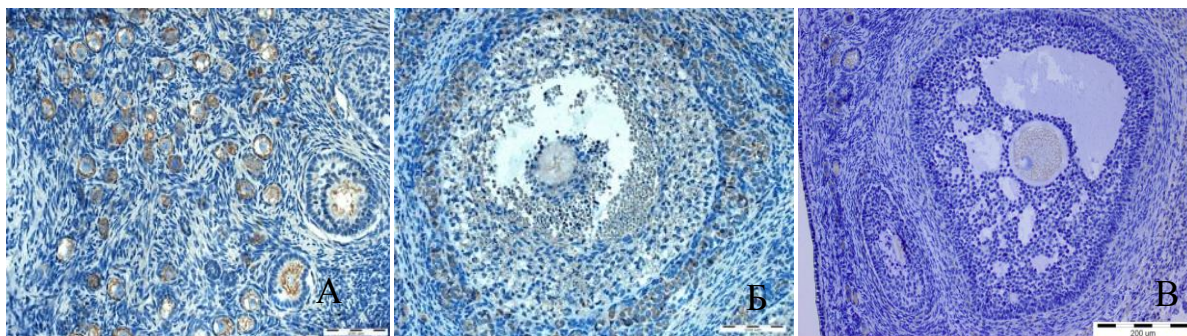
от опитна гр. (x40); В. в ооцит на първични фоликули и интестициални клетки в яйчник от контролна гр. (x40); Г. негативна контрола (миши черен дроб, x20); Д. позитивна контрола (corpus luteum в миши яйчник, x20); Е. GDF-9- негативна (IIAB, x40);



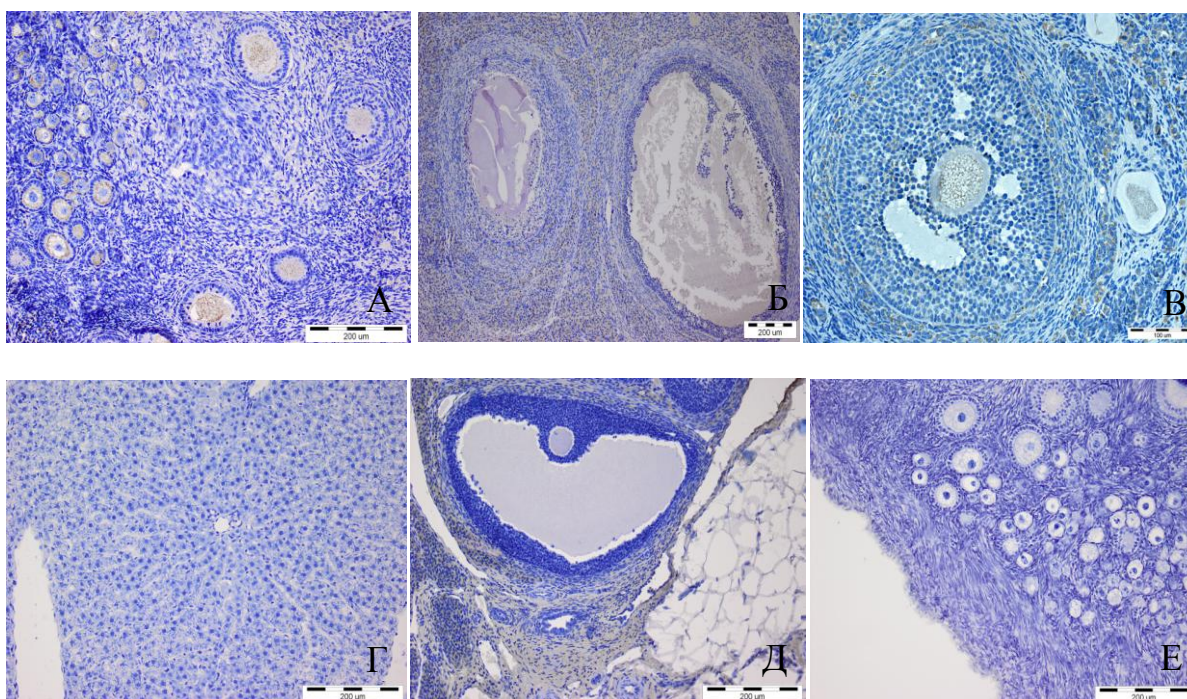
Фигура 21. Локализация на протеин BMP15 в яйчници на зайкини-майки, участвали в опита с ВХТ: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. в ооцит, кумулусни и тека клетки на антрален фоликул от яйчник в опитна гр. (x20); В. в тека клетки на антрален фоликул и интестициални клетки в яйчник от контролна гр. (x20);



Фигура 22. Локализация на протеин BMP15 в яйчници на зайкини, дъщери на зайкини-майки, участвали в опита с ВХТ: А. в ооцит на примордиални и първични фоликули и по кората на яйчник от контролна гр. (x20); Б. в ооцит на примордиални и първични фоликули, интестициални клетки в яйчник от опитна гр. (x20); В. в ооцит на антрален фоликул и тека клетки в яйчник от опитна гр. (x40); Г. в клетки на жълто тяло в яйчник от опитна гр. (x40); Д. позитивна контрола (котешки тестис, x20); Е. BMP15-негативна (IIAB, x20);



Фигура 24. Локализация на протеин GDF-9 в яйчници на зайкини майки, участвали в опита с ВХТ: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. в ооцити, кумулусни и тека клетки в ранни антрални фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); В. в ооцит на антрален фоликул в яйчник от контролната гр. (x 10);



Фигура 25. Локализация на протеин GDF-9 в яйчници на зайкини, дъщери на зайкини-майки, участвали в опита с ВХТ: А. в ооцити на примордиални и първични фоликули в яйчник от опитна гр. (x20); Б. в тека клетки на антрален фоликул и интестициални клетки в яйчник от контролната група (x10); В. в ооцит, кумулусни и тека клетки на антрален фоликул в опитен яйчник (x40); Г. негативна контрола (миши черен дроб, x20); Д. позитивна контрола (миши яйчник, x20); Е. GDF-9- негативна (ПАВ; x20);

