

## МОРФОМЕТРИЧНИ ПАРАМЕТРИ НА ЯЙЧНИКОВИ СТРУКТУРИ НА ЗАЙЦИ, ПРИЕМАЛИ ЕКСТРАКТ ОТ *TRIBULUS TERRESTRIS*<sup>+</sup>

ДЕСИСЛАВА АБАДЖИЕВА, СВЕТЛАНА ГРИГОРОВА\*,

[ГЕОРГИ ВЪЛЧЕВ\*], ЕЛЕНА КИСТАНОВА

Институт по биология и имунология на размножаването, БАН - София

\*Институт по животновъдни науки - Костинброд

Заякът е селскостопански вид, притежаващ специфични репродуктивни качества. Женските зайци са класифицирани като индуцирани или рефлекс овулаторни животни, т.е. овулацията им е в отговор на стимулиране след чифтосването (Friedman, 1929; Spies et al., 1997; Harkness et al., 2010). Във връзка с това за повишаване на плодовитостта при зайците важно е търсенето на възможности за увеличаване на общия брой овулаторни фоликули, съдържащи качествени и компетентни за последващо развитие яйцеклетки. Известно е, че развитието на фоликулите зависи от генотипа, възрастта на животното и хранителния статус (Nalbandov, 1976; Findly et al., 1996). Разпространената през последните години употреба на хранителни и билкови добавки води до повишаване на репродуктивния потенциал. Те могат да повлияват гаметогенезата и овулацията, като рефлектират върху функциите на оста хипоталамус - хипофиза - яйчник. Една от тези добавки е растителният екстракт от *Tribulus terrestris*, съдържащ редица биологично активни вещества (Томова, 1987).

*Tribulus terrestris* L. (TT) е лекарствено тревисто растение, което принадлежи към сем. *Zygophyllaceae*. То често се използва в народната медицина като афродизиак и за лечение на урогенитални заболявания (Kianbakht and Jahani, 2003; Neychev and Mitev, 2005). В състава му се включват гликозиди, флавоноиди, алкалоиди, ненаситени мастни киселини, фитостероли, витамини, танини, участващи в стимулирането на много физиологични функции (Бабушкина, 2010; Adaikan et al., 2000). Най-активните съставки на растението са сапонините от фураностанолов тип - протодиосцин и протограцилин, които са важни звена при превръщането на холестерола в полови хормони (Kostova and Dinchev, 2005; Nikolova and Penkov, 2011).

Въпреки доказаното широкоспектърно действие на *Tribulus terrestris* при редица физиологични процеси, експерименталните и клиничните изследвания с него относно репродуктивните функции до момента са съсредоточени предимно върху мъже (Brown et al., 2000; Neychev and Mitev, 2005) и мъжки животни (Gauthaman and Ganesan, 2008; Grigorova et al., 2008; Kistanova et al., 2005). Данните за ефекта на добавката върху женски индивиди са ограничени и често противоречиви (Бабушкина, 2010; Martino-Andrade et al., 2010), което налага необходимостта от разширяване на изследвания в тази насока.

Целта на настоящото проучване беше да се определят морфометричните параметри на яйчниковите структури (фоликули и яйцеклетки) на зайци, получавали добавка от българския продукт Вемохерб-Г (сух екстракт от *Tribulus terrestris*).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментът беше проведен с 45 зайкини от породата Новозеландска бяла на възраст 35-40 дни и средна жива маса 1 kg в опитната база на ИЖН – Костинброд. Опитът продължи 42 дни, по време на който отгледането на животните ставаше в едноетажни мрежести клетки.

Зайкините бяха разделени в три групи: контролна ( $n=15$ ), I опитна ( $n=15$ ) - получавали 2.5 mg/kg жива маса от екстракт на *Tribulus terrestris*, II опитна ( $n=15$ ) - получавали 10 mg/kg жива маса от добавката. Животните от опитните групи получаваша екстракта ежедневно чрез водата за пиене в продължение на целия опитен период. Поенето ставаше индивидуално за всяка клетка, като екстрактът се добавяше със сутрешното залагане на водата. Храненето бе *ad libitum* с една и съща стандартна смеска за всички групи през целия опитен период със следния химичен състав: суров протеин-18.31%, лизин-0.87%, метионин+цистин-0.77%, калций-1.16%, фосфор-0.62%, влакнини-16.24% и обменна енергия -2250 Kcal/kg.

След приключване на опита зайците от трите групи бяха хуманно умъртвени, съгласно изискванията на Етичната Комисия (доклад №: 2009-4-12/40). Изолираните яйчници бяха почистени от мазнини и фиксирани в 10% формалин за 24-48 h в хистологична лаборатория на ИБИР- БАН. Тъканите бяха дехидратирани през възходяща алкохолна редица и включени в парафинови блокчета. Серийни срезове с дебелина 5  $\mu$ m бяха получени с помощта на ръчен микротом, монтирани върху предметни стъкла и оцветени с хематоксилин – еозин по рутинен метод.

Фоликулите бяха класифицирани в три стандартни категории според броя на заобикалящите ги слоеве от гранулозни клетки, като:

- първични фоликули - с един слой кубични гранулозни клетки, заобикалящи яйцеклетката (фиг.1, А-1);
- вторични фоликули - с 2-9 слоя гранулозни клетки (фиг.1, А-2);

<sup>+</sup>Статията е докладвана на научна конференция "Новости в аграрната наука за ефективно земеделие", организирана със съдействието на Министерството на образованието и науката.

- третични фоликули - с  $\geq 9$  слоя от гранулозни клетки и оформен антрум (фиг. D);

Диаметрите ( $\mu\text{m}$ ) на фоликулите, както и на яйцеклетките в тях са измерени чрез системата за анализ на микроскопски образ Olympus BX51 (Токуо, Japan). Параметрите бяха калкулирани съгласно метода описан от **Van de Hurk et al.** (1994). Обемът на яйчниковите структури и съотношението на обемите (%) на гранулозните клетки към яйцеклетките във фоликулите от различни етапи на развитие бяха изчислени чрез математическата формула:

$$V = 4\pi.r^3/3, \text{ където}$$

-  $\pi$  - математическа константа пи = 3.14;

-  $r$  - радиус на сферата.

Данните бяха статистически обработени с помощта на компютърната програма Excel 2007. Стойностите са представени като средно  $\pm$  статистическа грешка за всяка променлива. Достоверността на получените резултати бе определена с  $t$ -теста на Стюdent.

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване беше проследен ефектът на сух екстракт от *Tribulus terrestris* L. върху морфометричните стойности на яйчниковите структури при зайци.

Данните за диаметъра на първични, вторични и третични фоликули и яйцеклетките в тях са представени в табл. 1. Наблюдавани бяха статистически достоверно ( $P < 0.01$ ) по-големи третични фоликули и яйцеклетки при II опитна група в сравнение с контролната. Диаметърът на яйцеклетките във вторичните и третичните фоликули във II опитна група е статистически доказано по-голям спрямо I опитна ( $P < 0.05$ ). И в трите групи на-

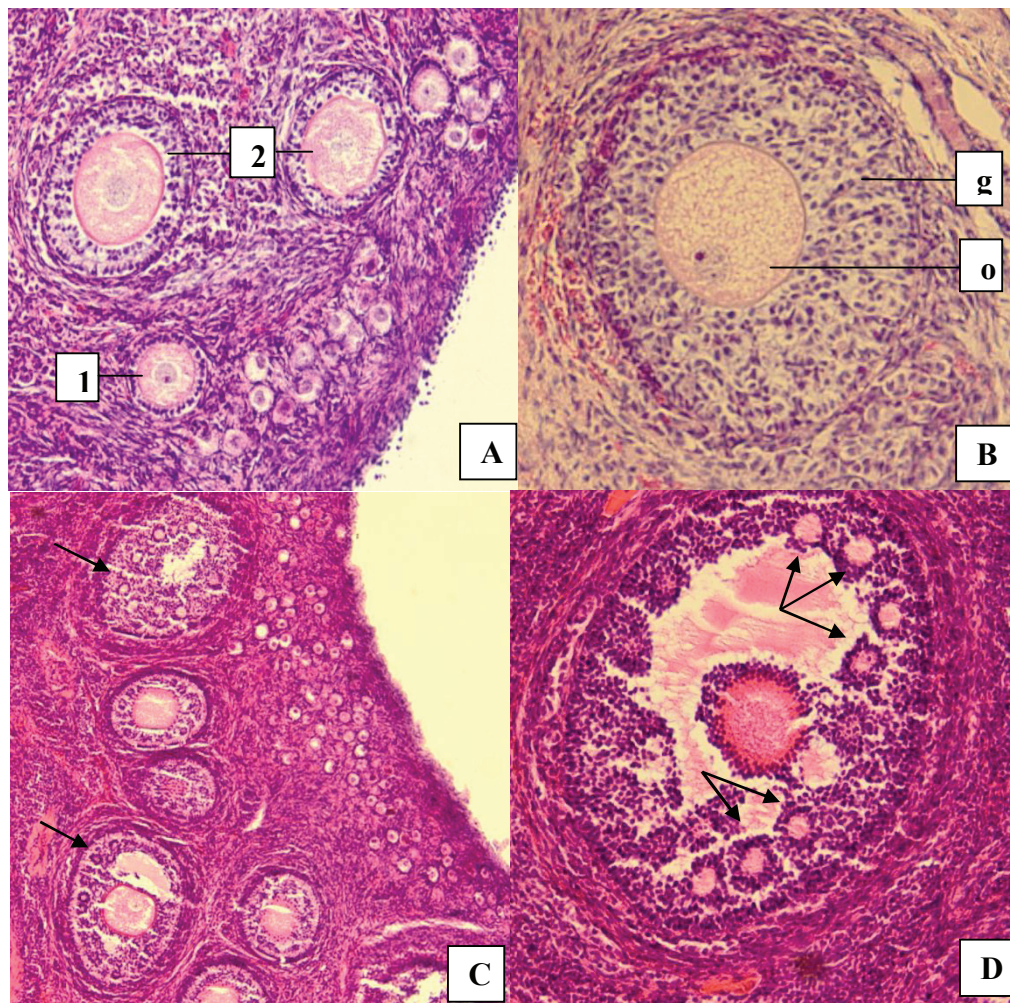
растването на фоликула при преминаването от стадий първичен към вторичен и третичен фоликул изпреварва нарастването на ооцита: диаметърът на фоликула се увеличава над 10 пъти, а на ооцита - над 4 пъти спрямо първоначалния си размер. Това показва, че растежът на фоликула от един етап към друг е прогресивен.

Нашите данни са в съответствие с резултатите от публикации за други видове, показващи полиномен растеж на фоликулите при бозайници като функция на времето (**Eppig and O'Brien**, 1996; **Hunter**, 2000). Не се отбелязват нарушения в закономерностите за нарастването на ооцити. Както в контролната, така и в опитните групи близо четирикратно нарастване на диаметра на ооцита се наблюдава при преминаването от стадий първичен към вторичен фоликул, след което този параметър не се променя съществено до стадий третичен фоликул. Подобни резултати съобщават **Zitny et al.** (2004) при изследване на яйчници от половозрели нетретирани зайкини. Диаметърът на яйцеклетката често служи като маркер за определяне на зрелостта ѝ. Въпреки че ооцитът при различни животински видове достига своето пълно развитие в началото на стадий третичен фоликул, стойността на този параметър е различна при всеки от тях (**Griffin et al.**, 2006). По данните на **Hebel and Stromberg** (1986) при зайци средният размер на ооцити в първични фоликули е 25 -30  $\mu\text{m}$ , във вторични фоликули е 40-60  $\mu\text{m}$ , а в третични фоликули достига до 80-90  $\mu\text{m}$ . По-големите размери на фоликулите и яйцеклетките, установени от нас в опитните групи, вероятно, се дължат на хормонално-подобното действие на протодиосцина в добавката TT. Съгласно литературните данни (**Martino-Andrade et al.**, 2010) стероидните сапонини, присъстващи в екстракта, засилват секрецията на

Таблица 1. Диаметър на фоликулите и яйцеклетките в яйчници на зайци ( $\mu\text{m}$ )  
Table 1. Diameter of the follicles and oocytes in the rabbits ovary ( $\mu\text{m}$ )

Групи/Groups	Структури/Structures (n = 15)					
	Първични Фоликули Primary follicles	Яйцеклетки Oocyte	Вторични фоликули Secondary follicles	Яйцеклетки Oocyte	Третични фоликули Tertiary follicles	Яйцеклетки Oocyte
Контролна група Contr. gr.	25.26	22.12	97.71	89.54	272.08	96.09
	$\pm$ 0.57	$\pm$ 0.55	$\pm$ 0.87	$\pm$ 1.03	$\pm$ 13.34 A	$\pm$ 0.79 B
I опитна група (2.5 mg)	26.16	21.72	98.35	86.26	297.25	98.23
	$\pm$ 0.93	$\pm$ 1.01	$\pm$ 1.88	$\pm$ 1.84 a	$\pm$ 17.66	$\pm$ 0.90 b
II опитна група (10 mg)	28.27	21.11	100.86	94.74	353.69	104.95
	$\pm$ 0.85	$\pm$ 0.55	$\pm$ 0.99	$\pm$ 1.04 a	$\pm$ 11.73 A	$\pm$ 1.57 B. b

\*Стойностите между групите, обозначени с еднакви букви са достоверни/ The value mark off the same letters is significant: a,b=\*=  $P < 0.05$ ; A, B=\*\*=  $P < 0.01$ ;



Фиг. 1. Хистологична структура на яйчници от зайци: А. Овариална секция на зайкиня от контролна група, x20; 1- първичен фоликул; 2- вторичен фоликул; В. Вторичен фоликул в яйчник на зайкиня от контролна група, x20; g- гранулозни клетки; o- яйцеклетка /ооцит/; С. Овариална секция на зайкиня от II опитна група, x20; D. Третичен фоликул от яйчник на зайкиня от II опитна група, x20; стрелките посочват атретичните тела;

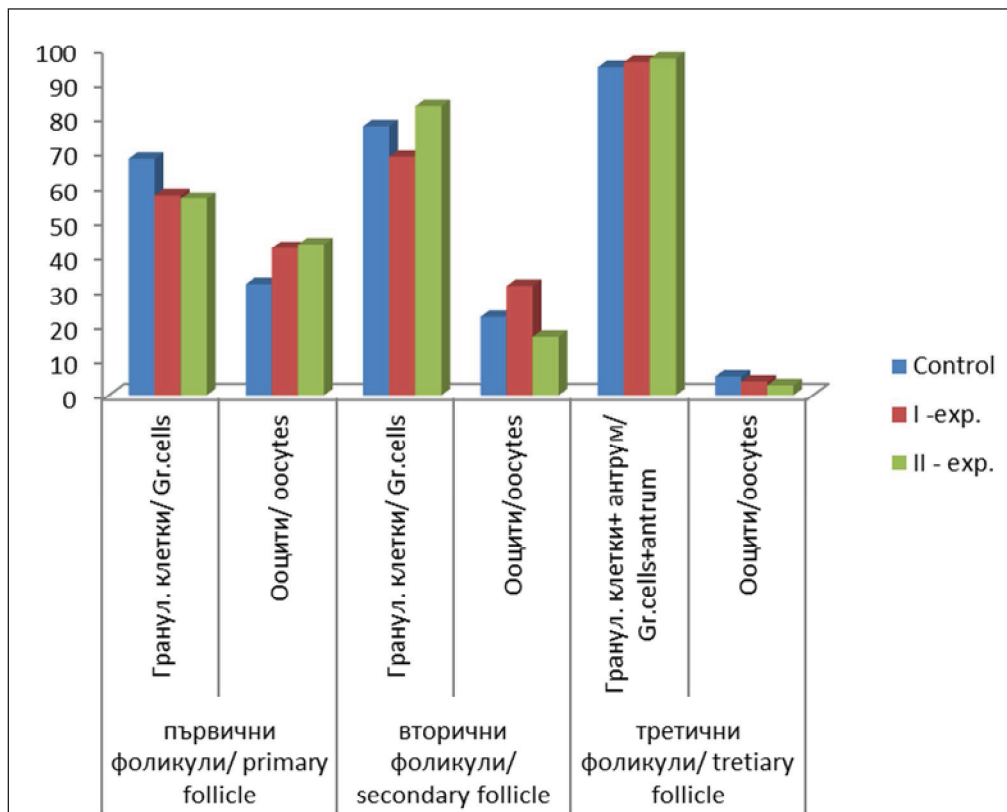
Fig.1. Histological structure of rabbits ovary: A. Ovarian section of doe from the control group, x20; 1- primary follicle; 2- secondary follicle; B. Secondary follicle in the doe ovary from control gr., x20; g- granulose cells; o- oocyte; C. Ovarian section of doe from II-nd exp. group, x20; D. Tertiary - Preovulatory follicle in the doe' ovary from II-nd exp. gr., x20; Arrows point out the atretic or call-exner bodies.

лутеинизиращия хормон (LH) в женския организъм на плъха, а при жените, приемащи Трибестан се повишават концентрациите на естрадиол и фоликулстимулиращия хормон (FSH) (Миланов и др., 1985).

Промяната в съотношението на обема на яйцеклетката към обема на заобикалящите я гранулозни клетки във фоликули от различни стадии на развитие са представени на фиг. 2.

Данните от нея показват, че в процеса на фоликулогенезата има нарастване на обемите на гранулозните структури, но обемът на ооцитите намалява. Изследвайки растежа на яйчникови структури при зайци, Zitny et al. (2004) съобщават, че относителният обем на гранулозните клетки във фоликули с два и повече слоя грану-

лозни клетки съставляват над 70% от обема. Нашите резултати кореспондират с тези данни, обаче, във вторичните фоликули на зайци от II опитна група обемът на гранулозните клетки е достоверно по-голям в сравнение с I опитна група ( $83.14 \pm 1.79$  и  $68.55 \pm 3.28$ ;  $P < 0.05$ ) и надвишава 70%. Съответно, обемът на ооцитите в тази група е по-малък ( $16.86 \pm 1.79$  и  $31.45 \pm 3.28$ ;  $P < 0.05$ ). В третичните фоликули при всички групи животни обемът на ооцита спада под 10%. Получените в нашето изследване стойности показват достоверно по-висок сумарен обем на заобикалящите яйцеклетката клетки и антрума във II опитна група в сравнение с контролната ( $94.60 \pm 0.73$ -  $97.13 \pm 0.27$ ;  $P < 0.05$ ), което е за сметка на намаляване на обема на самата яйцеклетка ( $5.40 \pm 0.73$  –  $2.87 \pm 0.27$ ;  $P < 0.05$ ). Освен това,



Фиг. 2. Съотношение между обемите на овариалните структури при зайци, %  
 Fig. 2. Ratio between the volumes of ovarian structures in rabbits, %

в третичните фоликули на зайците от II опитна група се наблюдават дегенеративни промени на гранулозните клетки - голям брой атретични телца (*call-exner bodies*), водещи до атрезия на фоликула (фиг.1, C и D). Високите нива на атрезирани гранулозни клетки се свързват със занижени качества на ооцита, защото фоликуларните клетки, заобикалящи ооцита, играят важна роля за определяне на неговото качество и потенциала му за последващо оплождане и развитие на ембриона (Revelli et al., 2009). Известно е, че патологичната атрезия 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 TT в по-високата доза – тази от 10 mg/kg жива маса, съдържаща стероидните сапонини, вероятно, първоначално води до увеличаване на екзогенните нива на тези хормони (Миланов и др., 1985; Martino-Andrade et al., 2010), рефлетиращо впоследствие на принципа на отрицателната обратна връзка в потискането на производството на ендогенните FSH и LH. Това е възможната причина за наблюдаваната от нас масова атрезия в третичните фоликули при зайкини, получавали 10 mg/ kg TT.

#### ИЗВОДИ

Съгласно получените от нас резултати добавката на екстракт от *Tribulus terrestris* L. в доза от 2.5 mg/ kg жива маса при растящи зайци не оказва съществено влияние върху морфометрията на структурите в яйчниците и не нарушава закономерностите на нормалната фоликулогенеза.

Добавката от 10 mg/ kg жива маса Вемохерб-Т води до увеличаване големината на яйчниковите структури - фоликули и ооцити при експерименталните животни, което започва още на стадий вторични фоликули. Въпреки това, данните показват, че големината на фоликулите и ооцитите не е маркер за тяхното качество, тъй като в повечето третични фоликули от тази група са установени дегенеративни промени на гранулозните клетки, водещи към влошаване качеството на ооцитите и нарушаване на овулацията.

**Благодарности:** Авторският колектив благодари на г-н Христо Златев и г-жа Нина Златева от фирма „Vemo-99“, ООД- София за безвъзмездното предоставяне на продукта Вемохерб-Т.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Бабушкина, А. В.**, 2010. Применение Трибестана в терапии эндокринного бесплодия у женщин. *Врач-практику*, № 2 (76), III-IV.
2. **Миланов, С., А. Малеева, М. Тасков**, 1985. Влияние на концентрацию некоторых гормонов в сыворотке здоровых лиц - МБИ, 4, 27-29.
3. **Томова, М.**, 1987. Трибестан, *Фармация*, 37(6), стр. 40-42.
4. **Adaikan, G. P., K. Gauthaman, R. N. Prasad, C. S. Ng**, 2000. Proerectile Pharmacological Effects Of Tr. Terrestris Extract On The Rabbit Corpus Carnosum. *Annals Academy Of Medicine*, 29/1/ :22-26.
5. **Brown, G. A., M. D. Vukovich, T. A. Reifenrath, N. L. Uhl, K. A. Parsons, R. L. Sharp, D. S. King**, 2000. Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. *Int.J. Sport Nutr. Exercise Metab.*, 10, 340-359.
6. **Eppig, J. J., O'Brien M. J.**, 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.*, 54: 197-207.
7. **Findlay, J. K., A. E. Drummond, R. C. Fry**, 1996. Intraovarian regulation of follicular development and ovulation. *Anim. Reprod.Sci.* 42:321-331.
8. **Friedman, M. H.**, 1929. The mechanism of ovulation in the rabbit: I. The demonstration of a humoral mechanism. *Am. J. Physiol.* 89(3), 438-442.
9. **Gauthaman, K. and A. P. Ganesan**, 2008. The hormonal effects of Tribulus terrestris and its role in the management of male erectile dysfunction-an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine*, 15: 44-54.
10. **Griffin J., B. Emery, I. Huang, C. M. Peterson, D. T. Carrell**, 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J.Exp. Clin. Assist. Reprod.*, 3: 2.
11. **Grigorova S., B. Kashamov, V. Sredkova, S. Surdjiiiska, H. Zlatev**, 2008. Effect of Tribulus terrestris extract on semen quality and serum total cholesterol content in White Plymouth Rock-mini cocks. *Biotech. Anim. Husb.*, 24(3-4): 139-146.
12. **Harkness, J. E., P. V. Turner, S. VandeWoude, C. L. Wheler**, 2010. *Biology and medicine of rabbits and rodents*. 5th edition, Wiley-Blackwell, Iowa.
13. **Hebel, R., Stromberg M. W.**, 1986. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Woerthsee: BioMed Verlag.
14. **Hunter, M. G.**, 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod.*, 5: 122-130.
15. **Kianbakht, S. and F. Jahaniani**, 2003. Evaluation of antibacterial activity of tribulus terrestris L. growing in Iran. *Iranian J. Pharmacol. Therapeutics*, 2: 22-24.
16. **Kistanova, E., H. Zlatev, V. Karcheva, A. Kolev**, 2005. Effect of plant Tr. Terrestris extract on reproductive performances of rams, *Biotechnology in Animal husbandry*, 21 (1-2): 55-63.
17. **Kostova, I., D. Dinchev**, 2005. Saponins in Tribulus terrestris — chemistry and bioactivity. *Phytochem. Rev.*, 4(2-3): 111-137.
18. **Martino-Andrade, A. J., R. N. Morais, K. M. Sperscoski, S. C. Rossi, M. F. Vecchi et al.**, 2010. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, 127: 165-170.
19. **Nalbandov, A.V.**, 1976. *Reproductive physiology of mammals and birds* (3<sup>rd</sup> ed.). W.H. Freeman and G. Publishers, San Francisco
20. **Neychev, V. K. and V. I. Mitev**, 2005. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. *J. Ethnopharmacol.*, 101: 319-323.
21. **Nikolova, M., D. Penkov**, 2011. Influence of Tribulus terrestris extract supplementation on laying productivity and eggs quality in Japanese quails. *JCEA*, vol. 11, No 4, p. 381-386.
22. **Revelli, A., L. D. Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo**, 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:40
23. **Spies, H. G., K. Y. F. Pau, S-P. Yang**, 1997. Coital and Estrogen Signals: A contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 56, 310-319.
24. **Van den Hurk, R., G. Dijkstra, S. C. Hulshof, P. L.Vos**, 1994. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to atypical granulosa cells. *J Reprod Fertil*, 100:137-142.
25. **Zinty, J., P. Massanyi, A. Trakovicka, J. Rafaj, R. Toman**, 2004. Quantification of the ovarian follicular growth in rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 48, 37-40.

MORPHOMETRIC PARAMETERS OF OVARIAN STRUCTURES IN RABBITS,  
FED WITH ADDITIVE *TRIBULUS TERRESTRIS* L. EXTRACT<sup>+</sup>

D. Abadjieva, Sv. Grigorova\*, G. Vulchev\*, E. Kistanova  
Institute of biology and immunology of reproduction - Sofia  
\*Institute of Animal Science - Kostinbord

## SUMMARY

The aim of this study was the determination of morphometric parameters of ovarian structures (follicles and oocytes) in rabbits treated with Bulgarian product VemoHerb-T (dry extract from *Tribulus terrestris* L.).

A total of 45 New Zealand White female growing rabbits were divided into three groups: control, I-st experimental group was treated with 2.5 mg/kg of Tribulus t. extract and II-nd experimental group - with 10 mg/kg of TT extract by drinking water, once daily for 42 days. After slaughter of animals, fixed in formalin ovaries were embedded in paraffin to obtain serial sections for light microscopy and developed by standard histological methods. The following morphometric parameters were examined: diameter ( $\mu\text{m}$ ) of the follicles and oocytes, and the ratio between volume of granulose cells and oocytes (%) in primary, secondary and preovulatory follicles.

The results showed that the dose 2.5 mg / kg body weight VemoHerb-T did not contribute to morphometric structural changes and did not disturb the normal follicleogenesis. The addition of 10 mg / kg body weight *Tribulus terrestris* L. extract lead to increasing the size of the follicles and oocytes in the rabbit ovarian since the stage of secondary follicles. However, in the preovulatory follicles of these experimental animals degenerative changes of granulose cells, leading to deterioration of oocytes quality and follicular atresia, were observed.

**Key words:** rabbits, oocyte, follicle, *Tribulus terrestris*

e\_mail: [dessi\\_l@abv.bg](mailto:dessi_l@abv.bg)

<sup>+</sup>AKNOWLEDGEMENTS: The publishing of the present scientific paper is financed by the Ministry of Education and Science.