

USE OF THE β -Carotene FOR TREATMENT OF REPRODUCTIVE DISORDERS IN COWS

Dovenski T., Mickovski G., Popovski K., Trojancanec P., Kocoski Lj., Petkov V., *Ickov R. Naletoski I.,
Mickov Lj., Ivkov V.** & Ivancev N.**

Veterinary Institute, Department of Reproduction, Skopje, Macedonia

* "Stocarstvo" Bogdanci, Macedonia

**Research Institute for Reproduction AI and ET, Temerin, Yugoslavia

ПРИМЕНА НА β -КАРОТИНОТ ЗА ЛЕКУВАЊЕ НА ПОРЕМЕТУВАЊА ВО ПЛОДНОСТА КАЈ КРАВИ

Довенски Т., Мицковски Г., Појовски К., Тројачанец П., Кочоски Љ., Пејков В.,
Налетоски И., Мицков Љ., Ичков Р., *Ивков В., **Иванчев Н. **

Ветеринарен институт, Оддел за репродукција, Скопје, Македонија

* "Сточарство" Богданци, Македонија

**Научен институт за репродукција, В.О. и Е.Т., Темерин, С.Р. Југославија

SUMMARY

In the last few years the importance of β -Carotene for regular reproductive functions was investigated more frequently. The results of these investigation have shown an obvious Vitamin A-independent efficacy of the β -Carotene on follicle maturation and steroid synthesis during this process. Positive influence on the functionality of the CL as well as on the regeneration of the genital epithelium during post partum period has been also demonstrated (Kramer 1992, Meyer 1975 and Schweigert F.J. and Zucker H.1988).

Objective of present study was to investigate efficiency of the β -Carotene for treatment of the cows with failures in fertility. For this purpose

INTRODUCTION

For better understanding of the acting pattern of β -carotene within the reproductive system, it is necessary to mention several facts about β -carotene and how it is administered into the animals' organism.

РЕЗИМЕ

Значењето на β -каротин за нормално одвивање на репродуктивните функции се повеќе се истражува. Познато е дека β -каротинот покажува витамин А независен ефект врз процесот на матурација на фоликулот и синтезата на стероидните фоликулински хормони. Докажано е и неговото позитивни дејство врз функцијата на жолтото тело, како и при регенерацијата на епителот на ендометриумот во постпартум периодот (Kramer 1992, Meyer 1975 and Schweigert F. J. and Zucker H.1988).

Цел на нашето истражување беше да го испитаме дејството на β -каротинот при лекувањето на крави со пореметување во плодноста.

Испитувањата ги направивме на вкупно 37 холштајн-фризиски крави, поделени во две групи: опитна (n=15) и контролна (n=22). Во опитната група 9 крави беа со воспалителни промени на матката, додека кај 6 крави дијагностициравме хипофункција на јајчниците. Тие примија по 200 мг β -каротин и/м (20 мл Carofertin- Werfft-Chemie, Austria) 1-4 дена пред еструсот во кој беа и осеменати. Резултатите покажаа дека третманот со β -каротинот

Namely, β -carotene belong to the group of carotinoids – yellow to red polyene lipo-soluble colors widely spread in the nature. They are synthesized by plants that have active photosynthesis and are responsible for the red and yellow colors of the leaves in autumn (Hank, 1991).

Generally β -carotene is administered into the animal organism through the food, since there is no synthesis within the organism. The highest level of β -carotene is found in the fresh grass. Therefore, the serum values of β -carotene have high seasonal variations. The highest serum levels are found during the spring grazing period and lowest values – at the beginning of the year when the food rations are only supplemented with small percentage of green food-stuff (Kirchessner, 1987).

Organism's β -carotene requirements

Daily requirement of β -carotene for cattle with normal food intake is about 100mg. During lactation, for each liter of produced milk there is additional need of 20mg. Generally, lactating animals should not have β -carotene intake less than 300mg from the food (Kolb, 1997).

Tab. 1. β -carotene and Vitamin A plasma levels after β -carotene-rich food intake in normal physiological status

Таб. 1. Содржината на β -каротин и витамин А во крвната плазма при исхрана богата со β -каротин, при физиолошки состојби (Kolb, Seehawer 1997).

Species	β -carotene	Vitamin A
Cattle	3-5 mg/l	20-40 μ g/100 ml
Swine	5-10 μ g/l	15-35 μ g/100 ml

доведе до зголемување на плодноста кај кравите, што резултираше со подобра концепција по 1. В.О. (53.9%) во споредба со нетретаните крави (31.8%).

ВОВЕД

За подобро да го разбереме начинот на кој β -каротинот влијае врз репродуктивните процеси, потребно е најнапред да дадеме некои воведни напомени.

Бетта каротиноид припаѓа на групата каротиноиди. Тоа се жолти до црвеновиолетови полиенски бои, растворливи во масти, кои се широко распространети во природата. Ги синтетизираат сите растенија кои вршат активна фотосинтеза и одговорни се за жолтото одн. црвеното обојување на лисјата во есен (Hank, 1991).

Снабдувањето со β -каротинот е можно исклучиво преку растителна храна, поради тоа што животните него не можат да го синтетизираат. Најголеми количини има во обичната млада трева. Од таа причина, серумските вредности на β -каротинот покажуваат јаки сезонски промени. Најголеми вредности можат да се утврдат по првото летно излегување, а најниските во почетокот на годината кога зелената храна се дава само како додаток. Тврдите крми, поради нивната ниска содржина на β -каротин, немаат никаква улога во снабдувањето на организмот со каротин (Kirchessner 1987).

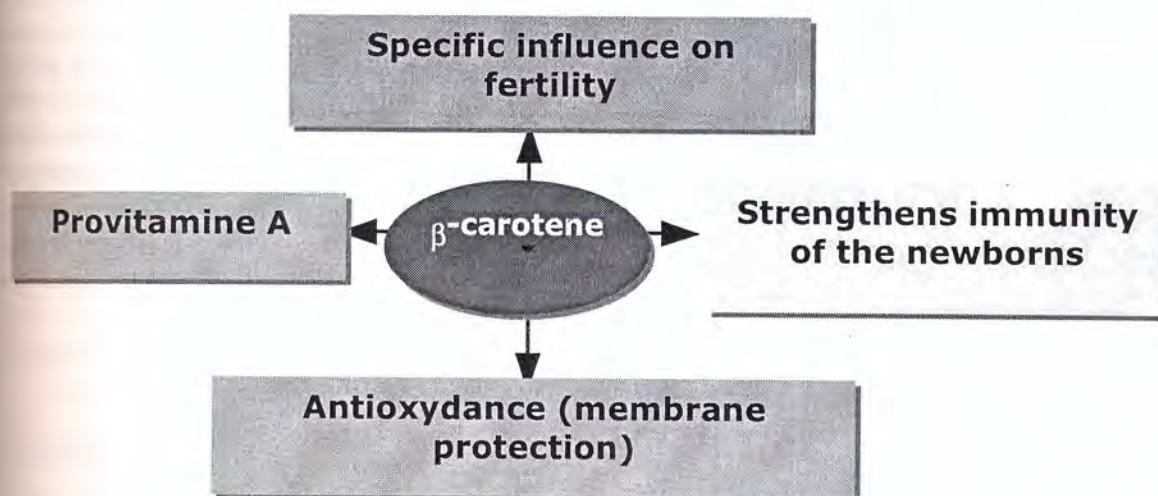
Потребни на организмот за β -каротин

Дневна потреба кај говедата, кај кои β -каротинот нормално се зема преку храната е околу 100 мг. При лактацијата, за секој литар млеко потребни се додатни 20 мг β -каротин. Животните во лактација не би требало да добиваат помалку од 300 мг β -каротин дневно преку храната (Kolb, 1997).

Importance of β -carotene intake for the organism

Значење на β -каротин за организмот

Неговото значење е повеќекратно и најдобро е прикажано на следнава шема:



β -carotene as precursor for Vitamin A

Vitamin A could not be found in the plants. Animals have its exclusivity in the nature. Herbivores satisfy their requirements for Vitamin A through its precursors – carotinoids. However, carnivores can absorb only retinol.

From total of 400 different carotinoids, about 40 can act as provitamins for Vitamin A. Only few of them (α , β and χ carotene) can be found in the normal foodstuff. However, β -carotene has the biggest practical value. Its transformation into Vitamin A normally occurs in the epithelium of the small intestines.

Functions of Vitamin A

After resorption through the intestines, Vitamin A is mainly transformed into Vitamin A-acid (retinoic acid). It binds to the cell receptors and enters the nucleus stimulating transcription of numerous genes responsible for the growth and development (Kolb, 1997).

β -каротин како прекурсор на витаминот А

Витаминот А во природата се сретнува само во организмот на животните. Во растенијата не може да се најде. Тревопасните животни ја задоволуваат својата потреба за витамин А преку земање на неговите прекурсори, каротиноидите. Наспроти нив, месојадите можат да го земат витаминот А само како ретинол.

Од над 400 природни каротиноиди, околу 40 се провитами на витаминот А. Во храната, по правило се наоѓаат 5-6 од нив. Практично значење имаат α , β и χ каротинот, како и криптоксантинот. Најзначаен и најзастапен од нив е β -каротинот. Најзначајното место каде доаѓа до претворање на β -каротинот во витамин А е епителот на тенкото црево.

Функции на витаминот А

При влегување во организмот, витаминот А главно се претвора во 9-цис или алл-транс витамин А-киселина (ретинска киселина). По врзувањето на рецепторите, тој влегува во јадрото на клетките и таму ја стимулира транскрипцијата на бројни гени одговорни за раст и развој (Колб, 1997).

Regarding fertility Vitamin A has important role in:

1. *Forming an enzyme complex for steroid hormones synthesis in the ovaries.* Minding the fact that β -carotene is the only source of Vitamin A in the granulosa cells, it has its role in the synthesis of sex hormones.

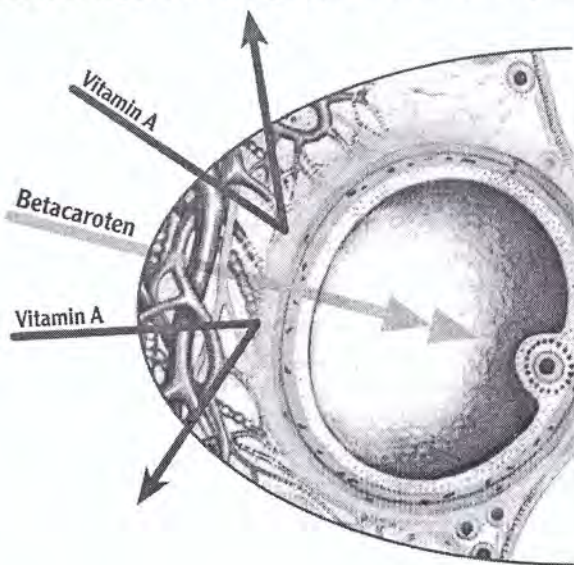
2. *Synthesis of proteolytic enzymes in the growing follicles.* Preovulatory follicle does not rupture due to the increased intrafollicular pressure but due to the proteolytic action of certain enzymes onto the follicular membrane.

β -carotene and the ovaries

The growing oocyte is surrounded with the follicular fluid. It consists different low-molecular substances originating from the blood as well as different metabolic products of the granulosa cells (e.g. steroids) and it is separated by a selective blood-follicular liquid space (Edwards, 1974). That space serves as a filter for molecules bigger than 850.000 Dalton, such as lipoprotein fractions VLDL and LDL (Shalgi, 1973).

β -carotene transits from the blood into the follicles after uptake from the HDL lipoprotein fraction (together with cholesterol that is essential for steroid synthesis). HDL has low molecular weight and is able to pass into the follicular antrum (Sweigert, 1988; Chew, 1984).

It is very important to emphasize that: **No transport mechanism in the blood, binding Vitamin A to a protein complex, has been found yet.**



Во однос на плодноста, витаминот А има голема улога при:

1. *Грабба на еден ензимски комплекс за синтеза на стероидните хормони во јајцникот.* Со оглед на тоа дека β -каротинот е единствен извор на витаминот А во гранулоза клетките, тој има многу важна улога во синтезата на овие хормони (O'Shaughnessy, 1990).

2. *Грабба на хормони во фоликулот.* Преовулаторниот фоликул не прска поради преголемиот притисок во него, туку поради разградба на фоликулинската мембрана со помош на посебни протеолитички ензими (Zerbin, 1987).

β -каротинот и овариумот

Растечката јајце клетка во јајцникот е опкружена со фоликулинска течност. Таа е составена од различни нискомолекуларни соединенија од крвта, како и од различни метаболити на гранулоза клетките (пр. стероиди) и е одделена со еден многу селективен крвно-фоликулински течен простор (Edwards, 1974). Тој простор служи како филтер за молекулите со молекулска маса поголема од 850.000 далтони, во кои припаѓаат липопротеинските фракции VLDL и LDL (Shalgi, 1973).

β -каротинот од крвта преоѓа во фоликулите со преземање од липопротеинската фракција HDL (заедно со холестеринот, кој е неопходен за синтеза на стероидните хормони). HDL има ниска молекулска тежина и може да ги помине фоликулинските простори (Schweigert, 1988; Chew, 1984).

Важно е да се напомене дека: **Сопствен транспортен механизам за Витаминот А, кој би бил во крвта поврзан на посебен протеински комплекс, досега не е докажан.**

Во гранулоза клетките на овариумот доаѓа до претворање на β -каротинот во витамин А. За тоа е потребна синтеза на различни протеини кои служат како ензими за синтеза на естрогени и прогестерон. Степенот на претворање во голема мерка е зависен од развојниот стадиум на фоликулот (со највисоки вредности кај преовулаторниот фоликул) и е во висока корелација со сите

β -carotene transforms into Vitamin A in the follicular granulosa cells, which consequently mediates the synthesis of different proteins acting as enzymes involved further in the synthesis of estrogen and progesterone.

The degree of transformation is greatly depended on the developmental phase of the follicle (with the higher values in the preovulatory follicle) and is strongly correlated to all parameters indicating follicular quality (e.g. intrafollicular concentration of 17- β -estradiol, or estradiol: progesterone ratio), (Schweigert, 1986).

In nonatretic follicles, Vitamin A concentration is twice as higher as the highly atretic follicles (Schweigert, 1986).

These investigations reveal the existence of an ingenious regulation of the Vitamin A concentration in the follicles, enabling optimal protection from both sufficit or deficit of Vitamin A, minding the fact that β -carotene has shown no toxic influence even in very high doses (Schweigert, 1988; Bondi and Sklan, 1984; Willhite and Dawson, 1990).

Role of b-carotene for the immunity of cows in the periparturient period

The deficiency of b-carotene, Vitamin A, E and Selenium during the periparturient period is manifested by depression of the immunity. This state is accentuated in the first days after the parturition and the beginning of lactation, regarding the fact that the colostrum contains 10 times more β -Carotene and 5 times more Vitamin A than the normal milk (Zucker, 1980).

In animals fed with insufficient amount of these substances blood levels are decreasing as a result of the higher secretion in the colostrum. The suppression of the immune system is manifested through lower activity of the neutrophils, lower division ability of the lymphocytes, higher percentage of fetal membrane retention, inflammatory changes of the uterus and the udder etc. (Kolb and Seehawer, 1998).

Numerous investigations in the last few years have shown that the insufficiency, beside the normal level of Vitamin A, leads to fertility disorders in the cattle.

Considering all facts, the aim of present study was to investigate efficiency of the β -Carotene

параметри кои го покажуваат квалитетот на фоликулот (пр. интрафоликуларната концентрација на 17- β естрадиолот, или количникот естрадиол: прогестерон) (Schweigert, 1986). Во неатретичните фоликули, концентрацијата на Витамин А е двојно поголема во споредба со силно атретичните (Schweigert, 1986).

Од овие истражувања произлегува една генијална регулација на концентрацијата на витаминот А во фоликулите, што на растечката јајце клетка и овозможува оптимална заштита, како од недостаток така и од суфици на витаминот А, бидејќи β -каротинот и во поголеми концентрации не покажува токсично дејство (Schweigert, 1988; Bondi, Sklan 1984; Willhite, Dawson, 1990).

Улога на β -каротинот за имуниџејот на кравите во џерипарџусниот џериод

Ако во периодот непосредно пред телењето кај кравите постои недостаток на β -каротин, витамин А, Е и селен, доаѓа до намалување имунитетот одн. на одбрамбената способност на организмот. Ова особено се потенцира во првите денови по породувањето и почетокот на лактацијата, со оглед на фактот што колострумот содржи 10 пати повеќе β -каротин и 5 пати повеќе витамин А во споредба со обичното млеко (Zucker, 1980).

Кај животните кои недоволно земале од овие супстанции, вредностите во крвта се намалуваат како последица на тоа што тие интензивно се излачуваат во колострумот. Се јавува една имуносупресија, која се манифестира со намалена активност на неутрофилите, намалена способност на лимфоцитите да се делат, зголемен процент на застојување на постелката, воспалителни промени на матката и вимето (Kolb, Seehawer 1998).

Од бројните досегашни истражувања во последниве неколку години, докажано е дека недостатокот на β -каротин и покрај добрата снабденост со витамин А, доведува до влошување на плодноста кај говедата.

Имајќи го сето ова во предвид, цел на ова наше истражување беше да го испитаме дејството на β -каротинот (Carofertin Werfft-

(Carofertin Werfft-Chemie, Austria) for treatment of the cows with failures in fertility, with emphases on the therapy of the Endometritis.

MATERIAL AND METHODS

Total of 37 Holstein-Friesian cows from 1 dairy farm were included in the experiment. Treated group was composed of 15 cows with fertility disorders. Nine of them were cows with endometritis grade 2., treated by antibiotics in previous estrous and in 6 animals with diagnosed hypofunction of the ovaries. They received single injection of Carofertin (Werfft-Chemie, Austria) in dose of 20 ml (200mg β -carotene) i/m, applied fractionated to two different sites, 1-4 days before estrus. Thirteen cows have shown distinct signs of estrus and were inseminated.

Non treated group was composed of 12 cows with endometritis (grade 2) treated with antibiotics in the previous estrus and 10 cows (inseminated more than 3 times) with suspected insufficient C.L. All these cows were inseminated in the next fertile estrus. Pregnancy diagnosis was done 35-40 days after AI using ultrasound scanner with 5MHz rectal probe.

RESULTS AND DISCUSSION

The use of β -Carotene for treatment of fertility disorders (Tab. 2.) improved the pregnancy rate of the treated animals in comparison to the non-treated (53.9% vs. 31.8%, respectively). β -Carotene had especially beneficial effect on cows with endometritis previously treated with intrauterine application of antibiotics (55.5% vs 25.0%) ($p < 0.05$). Lorin (1995) reports similarly regarding the beneficial influence of β -carotene on the endometrium and its resistance to infections influenced by the faster tissue regeneration. In his experiment Lorin managed to recuperate 85 % of the cows with vaginal discharge, using Carofertin in combination with antibiotic therapy. In the control group (treated only with antibiotics) the recuperation rate was only 50%. The

Chemie, Austria) при лекувањето на крави со пореметување во плодноста, со посебен осврт на лекувањето на ендометритисите.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во експериментот беа вклучени вкупно 37 холштајн-фризиски крави од една фарма на млечни крави во РМ. Опитната група ја сочинуваа 15 крави со пореметена плодност, од кои 9 беа лекувани антибиотски од ендометритис од 2. степен во претходниот еструс, додека кај 6 беше востановена хипофункција на јајчниците. На овие крави беше аплициран по 200 мг β -каротин (20 мл Carofertin - Werfft-Chemie, Austria) и/м, фракционирано на две места, 1-4 дена пред еструсот. Од нив, 13 крави покажаа задоволителни знаци на еструс и беа осеменети.

Во контролната група беа 22 грла, од кои 12 со ендометритис од 2 степен, третирани антибиотски во претходниот еструс и 10 крави "повторки" (осеменети повеќе од 3 пати), кај кои се сомневавме дека постои инсуфициентно жолто тело. Овие крави беа исто така осеменети во фертилен еструс. Дијагностиката на гравидитетот беше извршена 35-40 дена по В.О. со помош на ултразвучен скенер и ректална линеарна сонда од 5 MHz.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Добиените резултати од примената на β -каротинот за лекување на неплодноста кај кравите (таб. 2.) покажаа подобрување на процентот на гравидитет кај кравите третирани со β -каротин (53.9%), во споредба со нетретираниите грла (31.8%). Особено полезно дејство β -каротинот оствари при третман на крави со ендометритиси кои претходно биле лекувани со интраутерина апликација на антибиотици (55.5% наспроти 25.0%) ($p < 0.05$).

Лорин (1995) дава слично соопштение за позитивното влијание на β -каротинот врз зајакнување на гениталниот епител, одн. неговата отпорност кон инфекции условена со побрза регенерација на епителот. Во

	Carofertin treatment		Control (non-treated)	
	Endometr.	Ovar. Dysfunc.	Endometr.	Ovar. Dysfunc.
n	9	4	12	10
Pregnant (1 st AI)	5 (55.5%) ^a	2 (50.0%)	3 (25.0%) ^b	4 (40%)
Average	53.9%		31.8%	

a,b : (p<0,05)

Tab. 2. Pregnancy rate after β -Carotene treatment of cows with reproductive disorders

Таб. 2. Успешност од лекувањето на репродуктивните пореметувања кај кравите со β -каротин

investigation of Stolla et al. (1987) have shown improvement of the estrus signs as well as lower doses per pregnancy in cows treated with β -carotene.

Prolonged ovulation occurred similarly to the nontreated group as well as the progesterone level on day 13 after AI.

β -carotene has additional beneficial effect on the fertility expressed through its antioxydative property. Jointly with Vitamin E it is incorporated in the membranes of some cell organelles (nucleus, mitochondria). β -carotene most effectively binds free oxygen and acts on the disposal of peroxide anions and the hydroxylated radicals. Similarly, β -carotene has influence on the follicular cells and protects the production of steroid hormones (Bauer, 1992; Kolb, 1997; Bendich, 1993).

неговиот експеримент тој излекувал 85% од кравите со вагинален излив, користејќи карофертин во комбинација со антибиотска терапија. Во контролната група (третирана само со антибиотик) лекувањето било успешно само 50%. Испитувањата на Stolla et al. (1987) покажуваат дека кравите кои примале β -каротин имале подобро изразени знаци на еструс, како и тенденција за намалување на бројот на В.О. до успешната концепција. Продолжена овулација се јавувала во еднаков однос како кај нетретираниите, а не биле констатирани ниту разлики во концентрацијата на прогестерон 13. ден по В.О.

β -каротинот има еден дополнителен позитивен ефект врз плодноста преку неговото антиоксидантно дејство. Тој влегува во клетките преку специјални рецептори, врзан на липопотеини. Заедно со витаминот Е се вградува во мембраните на различни клеточни органели (јадро, митохондрии). Таму, β -каротинот најефективно го врзува слободниот кислород како антиоксиданс (отстранување на анионите на пероксидот и хидроксилираните радикали). На истиот начин тој дејствува и на клетките на терцијарните фоликули, а заштитно дејствува и на производството на стероидни хормони (Bauer, 1992; Kolb, 1997; Bendich, 1993). Ова дејство на β -каротинот би можело да биде одговорно и за подобрената инволуција на утерусот п.п., како и за успехот при лечењето на ендометритисите, при адекватно снабдување.

REFERENCES

1. **Bauer T.**, Paschma J., Sauen proliferen von β -carotin. Tier & Ernährung, Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen (1996).
 2. **Bendich A.**, Biological functions of dietary carotenoids. Ann New York Acad. Sci. 691, 61-67, 1993
 3. **Bondi A.**, Sclan D., Vitamin A and carotene in animal nutrition. Progr. Food Sci 8, 165-191, 1984
 4. **Chew B.P.**, Holpuch D.M., O'Fallon V.F., Vit A and b-carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea and follicular fluid. J. Dairy Sci. 67, 1316-1322, 1984
 5. **Edwards R.G.**, Follicular Fluid J. Reprod. Fert., 37, 189-219, 1974
 6. **Hanck A.B.**, Kuenzle C.C., Vitamin A. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg, 1991
 7. **Kirchgeßner M.**, Tierernährung. 7 Aufl. Frankfurt, 1987
 8. **Kramer H.K.** Der wirkungsmechanismus des b-carotins am ovar des rindes, Tierernährung 20, 123-134, (1992)
 9. **Kolb E.**, Sechawer J., Die Bedeutung der Carotine und des Vitamins A für die Fortpflanzung bei Rindern, Pferden und Schweinen – eine Übersicht. Pract. Tierarzt 78/79, 783-789, 1997
 10. **Lothammer K.H.**, Zur Bedeutung des b-carotins für die Fruchtbarkeit des Rindes, Tierzüchter 12, 520-529, 1978
 11. **Meyer H.**, Ahlswede L. and Lotthammer K.-H., Test on a specific Vitamin A-independent efficacy of the b-Carotene on the Fertility in Cattle; Dtsch, Tierärztl. 82, 429-472 Nr 11 (1975)
 12. **O'Shaughnessy P.J.**, Weber G.M., Effect of b-carotene, vitamin A and E on granulosa cells: progesterone production in newly isolated cell and during culture. J. unveröffentlicht 1990
 13. **Schweigert F.J.** and Zucker H., Concentration of vitamin A, b-Carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality, J. Reprod. Fert., 82, 575-579, (1988)
 14. **Schweigert F.J.**, β -Carotin – Stoffwechsel des Rindes und seine Bedeutung für die Fruchtbarkeit, Tierernährg, 16, 223-246, 1988
-