

Свідоцтво про державну реєстрацію: № KB 21158-10958ПР від 23.01.2015.

**Проблематика:** фізіологія і біохімія, ветеринарна медицина, живлення та годівля, розведення і селекція тварин, морфологія, клітинна та молекулярна біологія, імунологія, генетика, екологія і токсикологія, цитологія, мікробіологія та біотехнологія; огляди актуальних проблем біології; методичні роботи, в яких описано нові або вдосконалені методи досліджень; статті з історії біологічної, ветеринарної та сільськогосподарської наук, що висвітлюють еволюцію ідей, виникнення і розвиток наукових шкіл або присвячені творчим портретам учених; дискусійні статті рецензій на нові книги та на журнальні публікації; наукова хроніка.

**Засновник:** Інститут біології тварин НААН.

**Рік заснування:** 1998. **Періодичність:** 4 рази на рік.

**Мова видання:** українська, англійська.

Науковий журнал «Біологія тварин» індексується у *The Index Copernicus International*, *Google Scholar*, *Cross Ref*, *WorldCat*, *DOAJ*.

**Головний редактор:** Салига Ю. Т., д. біол. н.

**Науковий редактор:** Вудмаска І. В., д. с.-г. н.

**Відповідальний секретар:** Грабовська О. С., к. біол. н.

**Комп'ютерна верстка:** Судин К. Ю.

Certificate of print media State registration: No. KB 21158-10958ПР of 23.01.2015.

**Aims and Scope:** physiology and biochemistry, veterinary medicine, nutrition and feeding animals, breeding and selection, morphology, cellular and molecular biology, immunology, genetics, ecology and toxicology, cytology, microbiology, biotechnology; reviews on actual problems of biology; methodical works describing new or improved research methods; articles about the history of biological, agricultural and veterinary sciences highlighting the evolution of ideas, the conception and development of scientific schools or dedicated to creative portraits of scientists; discussion reviews of the new books and the journal publications; scientific chronicle.

**Founder:** Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine.

**Published since:** 1998. **Periodicity:** 4 times per year.

**Language:** Ukrainian, English.

"The Animal Biology" scientific journal is included in: *The Index Copernicus International*, *Google Scholar*, *CrossRef*, *WorldCat*, *DOAJ*.

**Editor-in-chief:** Yuriy Salyha, Dr. Sc.

**Scientific Editor:** Ihor Vudmaska, Dr. Sc.

**Editorial secretary:** Olexandra Grabovska, PhD.

**Page layout:** Kateryna Sudyn.

## РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Салига Юрій Тарасович, Інститут біології тварин НААН (Україна) — Голова колегії, головний редактор  
Вудмаска Ігор Васильович, Інститут біології тварин НААН (Україна) — заступник головного редактора

Антоняк Галина Леонідівна, Львівський національний університет імені І. Франка (Україна)

Бартлевські Павел, Ветеринарний коледж Онтаріо, Університет Гвельфа (Канада)

Білий Ростислав Олександрович, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (Україна)

Віщур Олег Іванович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Войтюк Олександр, Уппсальський університет (Швеція)

Гавриляк Вікторія Василівна, Національний університет «Львівська політехніка» (Україна)

Гладій Михайло Васильович, Національна академія аграрних наук України (Україна)

Гунчак Алла Володимирівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Гжегоцький Мечислав Романович, Львівський національний медичний університет ім Данила Галицького (Україна)

Доліба Микола, Пенсильванський університет (США)

Жукорський Остап Мирославович, Національна академія аграрних наук України (Україна)

Заячківська Оксана Станіславівна, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (Україна)

Іскра Руслана Ярославівна, Львівський національний університет імені І. Франка (Україна)

Калачнюк Лілія Григорівна, Національний університет біоресурсів і природокористування України (Україна)

Кльоцек Чеслав, Сільськогосподарський університет імені Гуго Коллонтая у Кракові (Польща)

Ковальські Зигмунд, Сільськогосподарський університет імені Гуго Коллонтая у Кракові (Польща)

Ковальчук Ірина Іванівна, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (Україна)

Корпан Ярослав Ізидорович, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України (Україна)

Коцюмбас Ігор Ярославович, Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок (Україна)

Кришталь Олег Олександрович, Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (Україна)

Кулік Джордж, Медичний центр Університету Вейк Форест (США)

Лесик Ярослав Васильович, Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка (Україна)

Луговий Богдан, Університет Маунт Сент Вінсент (Канада)

Лушак Володимир Іванович, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника (Україна)

Мадіч Алла Всеволодівна, Кембриджський університет (Великобританія)

Мароунек Мілан, Інститут тваринництва (Чехія)

Медина Ігор, Середземноморський інститут нейробиології (Франція)

Мудронь Павол, Університет ветеринарної медицини та фармації в Кошице (Словаччина)

Муравські Мацей, Сільськогосподарський університет імені Гуго Коллонтая у Кракові (Польща)

Остапів Дмитро Дмитрович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Півнева Тетяна Андріївна, Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (Україна)

Снітинський Володимир Васильович, Львівський національний університет природокористування (Україна)

Стапай Петро Васильович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Стибель Володимир Володимирович, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (Україна)

Стойка Ростислав Степанович, Інститут біології клітини НАН України (Україна)

Тизьо Роман, Середземноморський інститут нейробиології (Франція)

Федорович Єлизавета Іллівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Шаран Микола Михайлович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

**Адреса редакції:** Інститут біології тварин НААН,  
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна.  
**Тел./ Факс:** (+38 032) 260-07-95, (+38 032) 270-23-89.  
**Електронна скринька:** editor.animbiol@gmail.com  
**Веб-сторінка:** <http://aminbiol.com.ua>

**Editorial Office:** Institute of Animal Biology NAAS,  
38 Stus str., Lviv, 79034, Ukraine.  
**Tel. / Fax:** (+38 032) 260-07-95, (+38 032) 270-23-89.  
**E-mail:** editor.animbiol@gmail.com  
**Website:** <http://aminbiol.com.ua>



ІНСТИТУТ  
БІОЛОГІЇ  
ТВАРИН  
НААН

ISSN 1681-0015 (print)

ISSN 2313-2191 (online)

DOI: 10.15407/animbiol

# БІОЛОГІЯ ТВАРИН

---

---

## The ANIMAL BIOLOGY

2023 ▪ Volume 25 ▪ Issue 3 ▪ Issue DOI: 10.15407/animbiol25.03

---

### EDITORIAL COUNCIL

**Yuriy Salyha**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine) — Head of the council, editor-in-chief  
**Ihor Vudmaska**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine) — deputy chief editor

**Halyna Antonyak**, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)  
**Paweł Mieczysław Bartlewski**, Ontario Veterinary College, University of Guelph (Canada)  
**Rostyslav Bilyy**, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)  
**Nicolai M. Doliba**, University of Pennsylvania (United States)  
**Yelyzaveta Fedorovych**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Mykhailo Gladij**, The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Ukraine)  
**Mechyslav Gzhegotzkyi**, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)  
**Viktoriia Havryliak**, Lviv Polytechnic National University (Ukraine)  
**Alla Hunchak**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Ruslana Iskra**, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)  
**Liliia Kalachniuk**, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (Ukraine)  
**Czesław Klocek**, University of Agriculture in Kraków (Poland)  
**Yaroslav Korpan**, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Ukraine)  
**Igor Kotsyumbas**, State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives (Ukraine)  
**Iryna Kovalchuk**, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv (Ukraine)  
**Zygmunt Maciej Kowalski**, University of Agriculture in Kraków (Poland)  
**Oleg Krishtal**, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine (Ukraine)  
**George Kulik**, Wake Forest University (United States)  
**Yaroslav Lesyk**, Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University (Ukraine)  
**Bohdan Luhovyy**, Mount Saint Vincent University (Canada)  
**Volodymyr Lushchak**, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University (Ukraine)  
**Alla Madich**, University of Cambridge (United Kingdom)  
**Milan Marounek**, Institute of Animal Science (Czech Republic)  
**Igor Medina**, Mediterranean Institute of Neurobiology (France)  
**Pavol Mudroň**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice (Slovak Republic)  
**Maciej Murawski**, University of Agriculture in Kraków (Poland)  
**Dmytro Ostapiv**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Tatyana Pivneva**, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine (Ukraine)  
**Mykola Sharan**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Volodymyr Snityns'kyi**, Lviv National Environmental University (Ukraine)  
**Petro Stapay**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Rostyslav Stoika**, Institute of Cell Biology NAS of Ukraine (Ukraine)  
**Volodymyr Stybel**, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv (Ukraine)  
**Roman Tyzio**, Mediterranean Institute of Neurobiology (France)  
**Oleg Vishchur**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**Oleksandr Voytyuk**, Uppsala University (Sweden)  
**Oksana Zayachkivska**, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)  
**Ostap Zhukorskyi**, The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Ukraine)

---

## ЗМІСТ

<i>Омельюх Б., Шалай Я., Бура М., Ільків М., Остап'юк Ю. М., Мітіна Н., Заїченко О., Бабський А.</i> Активність антиоксидантних ензимів у гепатоцитах мишей з лімфомою за дії похідного тіазолу в комплексі з полімерним наноносієм.....	3
<i>Почерняєва Є. О., Почерняєв К. Ф., Баньковська І. Б.</i> Асоціація поліморфізму Asp298Asn гена MC4R з відгодівельною продуктивністю в імунологічно кастрованих та нативних свинок.....	8
<i>Любас Н. М., Олійник І. Я.</i> Роль олійних розчинів тиосульфатів у модуляції антиоксидантних показників у нирках щурів.....	13
<i>Богданюк А. О., Гаркавий В. В., Петрушко М. П.</i> Репродуктивні характеристики цапів зааненської та альпійської порід.....	19
<i>Шаран О. М.</i> Кінематичні показники та дихальна активність деконсервованих спермій баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для криоконсервування.....	23
<i>Андрішшин Б. О.</i> Репродуктивна динаміка ропухи сірої <i>Bufo bufo</i> (Linnaeus, 1758) і жаби трав'яної <i>Rana temporaria</i> (Linnaeus, 1758) як один з ключових етапів їх сезонного циклу.....	31
<i>Данкович Р. С., Чулюк В. І.</i> Патоморфологічні зміни нирок, печінки та біохімічні показники сироватки крові червоновухих прісноводних черепах ( <i>Trachemys scripta elegans</i> ) за парентерального введення гентаміцину.....	36
<b><u>Наукова хроніка</u></b>	
<i>Ковальчук І. І., Лесик Я. В., Каплінський В. В., Цап М. М., Пилипець А. З.</i> Життя в науці і для науки (пам'яті Р. С. Федорука).....	42

---

## CONTENTS

<i>Omeliukh B., Shalai Ya., Bura M., Ilkiv M., Ostapiuk Yu., Mitina N., Zaichenko O., Babsky A.</i> Activity of antioxidant enzymes in hepatocytes of mice with lymphoma under the action of thiazole derivative in complex with polymeric nanocarrier.....	3
<i>Pocherniaieva Y., Pochernyayev K., Bankovska I.</i> Association of the Asp298Asn polymorphism in the MC4R gene with fattening productivity of immunologically castrated and uncastrated gilts.....	8
<i>Liubas N. M., Oliynyk I. Ya.</i> The role of oil solutions of thiosulfonates in the modulation of antioxidant parameters in rat kidneys.....	13
<i>Bogdaniuk A., Garkavii V., Petrushko M.</i> Reproductive characteristics of Saanen and Alpine bucks.....	19
<i>Sharan O. M.</i> Kinematic parameters and redox state of thawed ram sperm after adding nanocitrate of Mn, Zn, and Cu to the medium for cryopreservation.....	23
<i>Andriishyn B. O.</i> Reproductive dynamics of the common toad ( <i>Bufo bufo</i> ) and the grass frog ( <i>Rana temporaria</i> ) as one of the key species of their seasonal cycle.....	31
<i>Dankovych R. S., Chuliuk V. I.</i> Pathomorphological changes of kidneys, liver and blood serum biochemical parameters in red-eared sliders ( <i>Trachemys scripta elegans</i> Wied, 1839) as a result of gentamicin parenteral injection.....	36
<b><u>Scientific Chronicle</u></b>	
<i>Kovalchuk I., Lesyk Ya., Kaplinskyi V., Tsap M., Pylypets A.</i> Living in science and for science (in memory of Rostyslav Fedoruk).....	42



## Activity of antioxidant enzymes in hepatocytes of mice with lymphoma under the action of thiazole derivative in complex with polymeric nanocarrier

B. Omeliukh<sup>1</sup>, Ya. Shalai<sup>1</sup>, M. Bura<sup>1</sup>, M. Ilkiv<sup>1</sup>, Yu. Ostapiuk<sup>1</sup>,  
N. Mitina<sup>2</sup>, O. Zaichenko<sup>2</sup>, A. Babsky<sup>1</sup>

Yaryna.Shalay@lnu.edu.ua



<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevsky str., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Lviv Polytechnic National University, 9 St. Yura sq., Lviv 79013, Ukraine

### ORCID:

B. Omeliukh <https://orcid.org/0009-0005-2820-6267>

Ya. Shalai <https://orcid.org/0000-0003-3205-9085>

M. Bura <https://orcid.org/0000-0001-7259-204X>

M. Ilkiv <https://orcid.org/0000-0003-4019-9854>

Yu. Ostapiuk <https://orcid.org/0000-0001-7335-211X>

N. Mitina <https://orcid.org/0000-0002-9120-2091>

O. Zaichenko <https://orcid.org/0000-0002-7742-1984>

A. Babsky <https://orcid.org/0000-0001-5559-0456>

### Authors' Contributions:

**OB:** investigation, writing — original draft.

**YS:** conceptualization, investigation, writing — original draft, methodology, validation, formal analysis, writing — review and editing.

**MB:** statistics.

**MI:** investigation, writing — original draft, methodology, visualization.

**YO:** resources.

**NM:** resources.

**OS:** resources.

**AB:** data curation, writing — review and editing, supervision, project administration.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

All institutional, national and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Many chemotherapeutics drugs have low water solubility, which potentially can decrease their anticancer potential. The use of drug delivery systems has proven to be highly effective in addressing the challenges associated with delivering hydrophobic chemotherapy drugs to tumor tissues. However, two major issues that arise in the clinical nanoparticle-based treatment of cancer are hepatotoxicity and suppression of the hematopoietic system, which can limit their medical applicability. As previously established, thiazole derivative N-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-3,5-dimethyl-1-benzofuran-2-carboxamide in complex with polymeric nanocarriers (nanomicelles) based on polyethylene glycol exhibited a greater level of cytotoxicity towards specific tumor cell lines melanoma, glioblastoma, hepatocarcinoma, leukemia, etc. This compound and its complexes with polymeric nanomicelle significantly changed the activity of antioxidant enzymes in lymphoma cells. Therefore, the purpose of this study was to examine the impact of a thiazole derivative with polymeric nanomicelles based on polyethylene glycol on the hepatocytes (liver cells) of mice that had been implanted with Nemet-Kelner lymphoma. The investigated compounds thiazole derivative, polymeric nanomicelle, and combination of thiazole derivative with nanomicelle at a final concentration of 10  $\mu$ M were added to the liver samples and incubated for 10 min. The activity of antioxidant defense system enzymes such as superoxidismutase, catalase, glutathionperoxidase was determined in liver homogenate under the action of studied compounds *in vitro*. It was reported that neither thiazole derivative, nanomicelle, nor their complex changed the activity of antioxidant enzymes in hepatocytes from mice with lymphoma. Thiazole derivative and its complex with nanomicelle had limited negative side effects in the mice with lymphoma. The investigated compounds were not hepatotoxic toward murine liver cells.

**Key words:** antitumor drugs, nanomicelle, hepatotoxicity, antioxidant system

## Introduction

In the ever-evolving battle against cancer, the development of powerful chemotherapeutics anticancer drugs has been an instrument for extending survival rates and

improving the life quality for countless patients. While these potential anticancer agents hold potential in targeting malignant cells, their impact on healthy tissues cannot be overlooked. Among the vital organs affected, the liver, the central organ in both metabolism and detoxification,

stands particularly vulnerable [10, 18]. Understanding the complicated interaction between anticancer drugs and liver cells is crucial for optimizing treatment strategies and minimizing potential side effects. Different chemotherapeutic anticancer drugs can have varying effects on healthy liver cells. Anthracycline drugs, such as *Doxorubicin* and *Daunorubicin*, are widely used in cancer treatment but can lead to hepatocellular injury, causing hepatocyte damage and impairing liver function [18, 21]. The mechanism of toxicity involves the generation of reactive oxygen species (ROS) and interference with mitochondrial function. Taxanes, such as *Paclitaxel* and *Docetaxel*, can lead to hepatocellular injury, resulting in liver enzyme elevations and hepatotoxicity [14, 21]. The underlying mechanisms involve interference with microtubule function and disruption of cell division. Tyrosine kinase inhibitors, such as *Sorafenib* and *Imatinib*, have a more selective mechanism of action compared to traditional chemotherapy, but they also can cause hepatotoxicity, including elevated liver enzymes activity and hepatic steatosis [1, 21]. Overall, the impact of chemotherapeutic anticancer drugs on healthy liver cells can vary depending on the specific drug and individual factors. Understanding these effects is crucial for oncology to optimize treatment regimens, manage potential liver toxicity, and provide supportive care to patients undergoing cancer treatment.

Previous studies have demonstrated that thiazole N-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-3,5-dimethyl-1-benzofuran-2-carboxamide (BF1) possesses a significant level of toxicity towards some tumor cell lines, while exhibiting no destructive effects on pseudonormal cell lines and hepatocytes in NK/Ly mice [8, 19]. The possible anticancer mechanism of action of the thiazole derivative based on the generation of a large number of ROS, which triggers a cascade of reactions in tumor cells that lead to their apoptosis [11].

However, BF1, like many chemotherapeutic drugs, has low water solubility, which potentially can decrease its anticancer potential. Nanomicelles, also known as polymeric micelles, are self-assembled nanostructures composed of amphiphilic block copolymers. These nanoscale structures have a hydrophilic outer shell and a hydrophobic core [2]. The unique structure of nanomicelles enables them to encapsulate hydrophobic anticancer drugs within their hydrophobic core, thereby increasing the solubility of these drugs. Thus, nanomicelles serve as effective drug delivery vehicles by encapsulating hydrophobic anticancer drugs, improving their solubility, stability, and targeted delivery to tumor tissues [16, 20]. This approach holds great promise for enhancing the therapeutic efficacy of anticancer drugs and reducing their side effects.

As previously established, thiazole derivative BF1 in complex with polymeric nanomicelles based on polyethylene glycol (PEG) poly(PEGMA) (Th3) exhibited a greater level of cytotoxicity towards specific tumor cell lines compare to unconjugated BF1 or/and chemotherapeutic drug *Doxorubicin* and lead to apoptotic-like changes in lymphoma cells [9].

It is important to note that nanomicelles can interact with liver cells through several mechanisms, which can impact their function and overall cellular response [4]. Nanomicelles can be internalized by liver cells through endocytosis or receptor-mediated pathways. The nanomicelles can influence the intracellular environment and signaling pathways within liver cells. On the other hand, nanomicelles can trigger cellular responses in liver cells. Depending on their composition and properties, they can activate signaling pathways, induce inflammatory responses, or affect gene expression within the cells [5]. These responses can influence cellular functions and may have implications for liver health and toxicity.

The aim this work was to study the effect of thiazole derivative BF1 in complex with PEG-based nanomicelles (Th3) on the prooxidant-antioxidant balance in hepatocytes of mice with grafted NK/Ly.

## Materials and methods

All experiments were performed on white wild-type male mice with a grafted NK/Ly lymphoma (n=10; body weight 20–30 g). Manipulations with animals were carried out under the principles of the “General Ethical Principles of Experimentation on Animals” approved by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001) and “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, France, 1985) as well as approved by the Ethics Committee of Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine at the beginning of the research (Protocol no. 17-02-2021 from 09.02.2021) and after the completion of the study (Protocol no. 12-05-2023 from 5.05.2023). Mice were housed in a standard vivarium under typical laboratory conditions with constant temperature on a mixed ration.

To initiate the mouse lymphoma tumor 0.15–0.2 mL of ascite of ( $15\text{--}20 \times 10^6$  of NK/Ly cells) were injected intraperitoneally. To extirpate the liver, the animals were decapitated under ether anesthesia, after which the organ was quickly excised. After removal, the liver was weighed and washed from blood with a cooled solution of the following composition (in mM): NaCl — 140, KCl — 4.7, MgCl<sub>2</sub> — 1, glucose — 5, HEPES — 10; pH 7.4. The liver was crushed using a metal press, solution was added in the ratio of 8 ml of solution per 1 g of tissue, and cells were destroyed in a Potter-Evelheim homogenizer at 800 rpm. The initial 10 μM solution of thiazole derivative BF1 was synthesized at the Department of Organic Chemistry of Ivan Franko National University of Lviv and the homopolymer of PEG-methacrylate with a molecular weight of the PEG-unit 475 kDa (poly(PEGMA) (Th3)) were synthesized at the Department of Organic Chemistry of the Lviv Polytechnic National University, as described earlier [8, 15]. Water dispersions of polymeric nanomicelle (PN) — Th3 and its complex with the BF1 (Th4) derivative was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the solutions were subsequently transferred in water.

Catalase (CAT) activity was measured by the method of Hamza et al. [7] with an absorption wavelength of 410 nm and was expressed in nmoles of  $H_2O_2$ /min×mg of protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the method of Paoletti et al. [17] and was expressed as unit active/min×mg protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the method of Hadwan et al. [6] with an absorption wave length of 412 nm and was expressed in G-SH/min×mg of protein. Protein concentration in every sample was determined by the method of O. Lowry et al. [13].

The statistical analysis of the results was made and illustrated using *MS Excel-2013* and *Statistica* programs. All experiments were repeated 5 times in each variant. All data are presented as a mean±SD. To determine statistically significant differences between the means of independent investigation groups, the one-way analysis of variance (ANOVA) was used. Statistical analyses were performed using *t*-test. P values below 0.05 were considered as statistically significant.

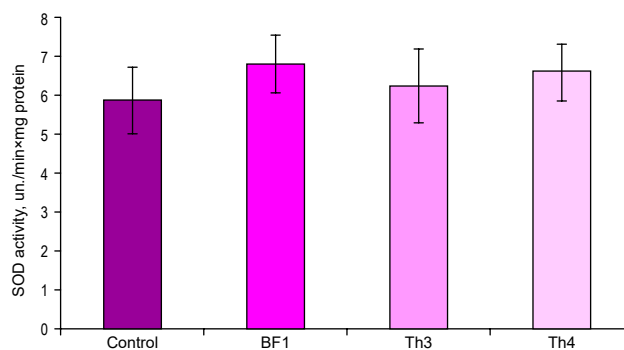
## Results and Discussion

Since the redox balance in the cells of the body significantly changes during the development of a tumor, a change in the antioxidant enzymes activity should be expected. Therefore, the superoxide dismutase in the liver cells of a tumor-bearing mouse was investigated. Fig. 1 shows the changes in the SOD activity under the action of BF1, nanomicelle Th3 and complex Th3 with BF1 (Th4). Control levels of the enzyme activity in the liver of tumor-bearing mice were  $5.9 \pm 0.85$  units active/min×mg protein. Under the action of tested compounds, the enzyme activity in the liver of tumor-bearing mice did not change.

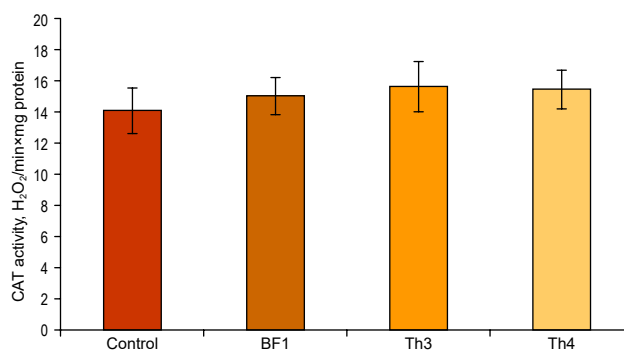
Because  $H_2O_2$  is the product of SOD activity, the normal functioning of other enzymes that neutralize hydrogen peroxide is important. Therefore, we tested the effect of the studied compounds on the activity of CAT and GPO. Fig. 2 shows the changes in catalase activity under the action of BF1, nanomicelle Th3 and complex Th3 with BF1 (Th4). Control levels of enzyme activity in the liver of tumor-bearing mice were  $14 \pm 1.4$  nmol  $H_2O_2$ /min×mg protein. Tested compounds did not change the activity of the enzyme.

Disposing of the increased amount of  $H_2O_2$ , in addition to the CAT, is also carried out by the GPx. This enzyme has a greater affinity for hydrogen peroxide than CAT. GPx functions more efficiently at low  $H_2O_2$  concentrations, while CAT is more efficient at high substrate concentrations during the development of oxidative stress.

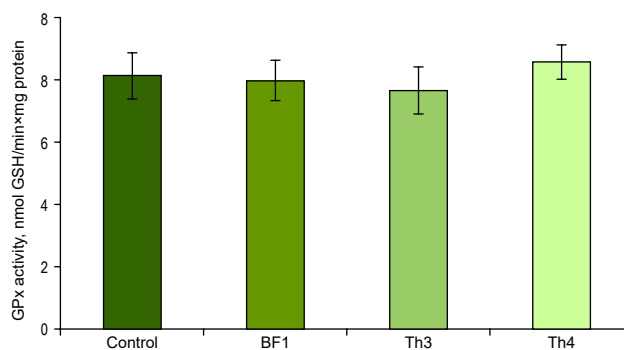
Fig. 3 shows the changes in GPx activity under the action of BF1, nanomicelle Th3 and complex Th3 with BF1 (Th4). Control levels of GPx activity in the liver of tumor-bearing mice were  $8.1 \pm 0.7$  nmol GSH/min×mg protein. Under the action of both tested compounds, the activity of the enzyme in the liver of tumor-bearing mice did not change.



**Fig. 1.** The level of SOD activity in the liver of tumor-bearing mice under the action of thiazole derivative BF1, polymeric nanomicelle Th3 and complex of BF1 with Th3 (Th4) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )



**Fig. 2.** The level of CAT activity in the liver of tumor-bearing mice under the action of thiazole derivative BF1, polymeric nanomicelle Th3 and complex of BF1 with Th3 (Th4) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )



**Fig. 3.** The level of GPx activity in the liver of tumor-bearing mice under the action of thiazole derivative BF1, polymeric nanomicelle Th3 and complex of BF1 with Th3 (Th4) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

One of the main problems of chemotherapy treatment is side effects, when anticancer drugs negatively affect healthy cells, in particular, hepatocytes. Since the liver is the main detoxifying organ in humans and animals and plays an important role in the elimination of drugs from the body, changes in the antioxidant processes of in liver cells due to the action of newly synthesized antitumor substances may indicate negative side effects that often occur due to use of such substances.

Many chemotherapeutic drugs have a low selective effect and therefore provoke significant side effects.

Side effects of cytostatics, such as cardiotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, nephrotoxicity, and effects on the immune system are especially dangerous. The effect on the liver of antitumor substances can significantly damage the functioning of the organ and the body.

It was previously established that thiazole derivative BF1 and its complexes with PNs significantly changed the activity of antioxidant enzymes in lymphoma cells [11]. In particular, the activity of SOD increased, while the activity of CAT and GPx decreased. Such changes indicate an imbalance of enzyme activity in cancer cells under the action of antitumor substances. Therefore, antioxidant processes are involved in the mechanism of action of BF1 in a complex with polymer carriers. Interestingly, it was the complex Th4 that demonstrated the greatest effect. Therefore, it was important to investigate the effect of the studied compounds on the antioxidant enzymes activity in liver cells.

Hepatotoxicity, a commonly observed clinical manifestation associated with various anticancer treatments such as chemotherapy [10], is often accompanied by the accumulation of certain nanomaterials in the liver, leading to liver injury [21]. The primary manifestation of toxicity observed in cells or animal models exposed to different therapeutic drugs and nanomaterials is the induction of oxidative stress, which disrupts the balance between prooxidants and antioxidants [21].

A study conducted on murine hepatocytes revealed that the thiazole derivative BF1 did not induce oxidative stress or alter the levels of primary and secondary lipid peroxidation (LPO) products, namely hydroperoxides and TBA-positive products [21]. Similarly, the administration of unconjugated PN Th3 or its complex with BF1 (Th4) did not affect the levels of LPO products in hepatocytes of mice with grafted NK/Ly tumors (data not shown). However, a decline in the activity of antioxidant enzymes such as GPx, SOD, and CAT is associated with an altered oxidative status and reduced oxidative defenses [2]. Nevertheless, it was observed that neither BF1, PN, nor their complex Th4 altered the levels of antioxidant enzymes in hepatocyte cells derived from mice with NK/Ly tumors.

Based on our data, it can be inferred that significant hepatotoxicity is unlikely to occur with the administration of the BF1+PN complex, which exhibits a more pronounced therapeutic effect compared to unconjugated BF1.

Therefore, the BF1 complex with a polymer nanomicelle, which shows toxicity to cancer cells, did not affect the activity of antioxidant enzymes in the liver cells of tumor-bearing mice *in vitro*. It is also known that these complexes were not toxic to non-tumor human kidney cell lines and keratinocytes [9]. However, further research is needed to ensure the safety of these substances. It is important to examine additional parameters, including the activity of other antioxidant enzymes and levels of peroxidation products *in vivo*, to obtain a comprehensive assessment of their effects.

## References

1. AlAsmari AF, Ali N, AlAsmari F, AlAnazi WA, Alqahtani F, Alharbi M, Alotaibi FM, Aldossari AA, AlSwayyed M, Alanazi MM, Alshamrani AA. Elucidation of the molecular mechanisms underlying sorafenib-induced hepatotoxicity. *Ox. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 7453406. DOI: 10.1155/2020/7453406.
2. Bose A, Roy Burman D, Sikdar B, Patra P. Nanomicelles: Types, properties and applications in drug delivery. *IET Nanobiotechnol.* 2021; 15 (1): 19–27. DOI: 10.1049/nbt.12018.
3. Chmielewski PP, Strzelec B. Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review. *Folia Morphologica.* 2018; 77 (2): 171–178. DOI: 10.5603/FM.a2017.0101.
4. Cornu R, Béduneau A, Martin H. Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: A review. *Toxicol.* 2020; 430: 152344. DOI: 10.1016/j.tox.2019.152344.
5. Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X, Hu R, Hong M, Hong F. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mat. Res. A.* 2010; 96A (1): 221–229. DOI: 10.1002/jbm.a.32976.
6. Hadwan MH, Ahmed AY. A validated method to assess glutathione peroxidase enzyme activity. *Preprint.* 2021; v. 1. DOI: 10.21203/rs.3.rs-526347/v1.
7. Hamza TA, Hadwan MH. New spectrophotometric method for the assessment of catalase enzyme activity in biological tissues. *Preprint.* 2019; v. 1. DOI: 10.20944/preprints201910.0323.v1.
8. Finiuk NS, Hreniuh VP, Ostapiuk YV, Matychuk VS, Frolov DA, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Antineoplastic activity of novel thiazole derivatives. *Biopolymer. Cell.* 2017; 33 (2): 135–146. DOI: 10.7124/bc.00094B.
9. Finiuk NS, Popovych MV, Shalai YR, Mandzynets SM, Hreniuh VP, Ostapiuk YV, Obushak MD, Mitina NE, Zaichenko OS, Stoika RS, Babsky AM. Antineoplastic activity *in vitro* of 2-amino-5-benzylthiazole derivative in the complex with nanoscale polymeric carriers. *Cytol. Gen.* 2021; 55 (1): 19–27. DOI: 10.3103/S0095452721010084.
10. Harrington KJ. Chemotherapy and targeted agents. *Maxillofac. Surg.* 2017; 1: 339–354. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6056-4.00022-8.
11. Ilkiv MV, Shalai YR, Manko BO, Ostapiuk YV, Mitina NE, Zaichenko AS, Babsky AM. Generation of ROS under the influence of thiazole derivative and its complexes with PEG-based polymeric nanoparticles. *Biopolymer. Cell.* 2022; 38 (3): 158–168. DOI: 10.7124/bc.000A7D.
12. Kiss M, Caro AA, Raes G, Laoui D. Systemic reprogramming of monocytes in cancer. *Front. Oncol.* 2020; 10: 1399. DOI: 10.3389/fonc.2020.01399.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193 (1): 265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
14. Mandaliya H, Baghi P, Prawira A, George MK. A Rare case of paclitaxel and/or trastuzumab induced acute hepatic necrosis. *Case Rep. Oncol. Med.* 2015; 2015: 825603. DOI: 10.1155/2015/825603.
15. Mitina NY, Riabtseva AO, Garamus VM, Lesyk RB, Volyanyuk KA, Izhyk OM, Zaichenko OS. Morphology of the micelles formed by a comb-like PEG-containing copolymer loaded with antitumor substances with different water solubilities. *Ukr. J. Phys.* 2020; 65 (8): 670. DOI: 10.15407/ujpe65.8.670.
16. Navya PN, Kaphle A, Srinivas SP, Bhargava SK, Rotello VM, Daima HK. Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Converg.* 2019; 6 (1): 23. DOI: 10.1186/s40580-019-0193-2.
17. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 1986; 154 (2): 536–541. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90026-6.

18. Ramadori G, Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Annal. Hepatol.* 2010; 9 (2): 133–143. DOI: 10.1016/S1665-2681(19)31651-5.
19. Shalai YR, Popovych MV, Mandzynets SM, Hreniukh VP, Finiuk NS, Babsky AM. Prooxidant and antioxidant processes in the liver homogenate of healthy and tumor-bearing mice under the action of thiazole derivatives. *Ukr. Biochem. J.* 2021; 93 (3): 61–67. DOI: 10.15407/ubj93.03.061.
20. Tawfik SM, Azizov S, Elmasry MR, Sharipov M, Lee YI. Recent advances in nanomicelles delivery systems. *Nanomaterials.* 2020; 11 (1): 70. <https://doi.org/10.3390/nano11010070>.
21. Vincenzi B, Armento G, Spalato Ceruso M, Catania G, Lealos M, Santini D, Minotti G, Tonini G. Drug-induced hepatotoxicity in cancer patients — implication for treatment. *Expert Opin. Drug Saf.* 2016; 15 (9): 1219–1238. DOI: 10.1080/14740338.2016.1194824.

## Активність антиоксидантних ензимів у гепатоцитах мишей з лімфомою за дії похідного тіазолу в комплексі з полімерним наноносієм

Б. Омелюх<sup>1</sup>, Я. Шалай<sup>1</sup>, М. Бура<sup>1</sup>, М. Ільків<sup>1</sup>, Ю. М. Остап'юк<sup>1</sup>, Н. Мітіна<sup>2</sup>, О. Заїченко<sup>2</sup>, А. Бабський<sup>1</sup>  
Yaryna.Shalay@lnu.edu.ua

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

<sup>2</sup>Національний університет «Львівська політехніка», пл. Св. Юра, 9, м. Львів, 79013, Україна

Багато хіміотерапевтичних препаратів мають низьку розчинність у воді, що потенційно може знизити їхній протипухлинний потенціал. Використання систем доставки ліків виявилось високоефективним у вирішенні проблем, пов'язаних із постачанням гідрофобних хіміотерапевтичних препаратів до пухлинних тканин. Однак двома основними проблемами, які виникають за клінічного лікування раку з використанням наночастинок, є гепатотоксичність і пригнічення кровотворної системи, що може обмежити їх медичне застосування. Раніше встановлено, що похідне тіазолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід у комплексі з полімерними наноносіями (наноміцелами) на основі поліетиленгліколю демонструвало підвищений рівень цитотоксичності щодо специфічних ліній пухлинних клітин меланоми, гліобластоми, гепатокарциноми, лейкозу тощо. Ця сполука та її комплекси з полімерними наноміцелами істотно змінювали активність антиоксидантних ензимів у клітинах лімфоми. Тому метою цього дослідження було вивчити вплив похідного тіазолу у комплексі з полімерними наноміцелами на основі поліетиленгліколю на гепатоцити (клітини печінки) мишей, яким було імплантовано лімфому Немет-Келнера. Клітини лімфоми Немет-Келнера прищеплювали методом внутрішньочеревної інюкуляції. На 14–16-й день розвитку пухлини мишей наркотизували діетиловим ефіром, декапітували, видаляли печінку та гомогенізували. Досліджувані сполуки — похідне тіазолу, полімерна наноміцела на основі поліетиленгліколю та комплекс похідного тіазолу з наноміцелюю в кінцевій концентрації 10 мкМ — додавали до зразків печінки та інкубували протягом 10 хв. У гомогенаті печінки під дією досліджуваних сполук *in vitro* визначали активність таких ензимів системи антиоксидантного захисту, як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза. Встановлено, що ні похідне тіазолу, ні наноміцела, ні їхній комплекс не змінили активності антиоксидантних ензимів у гепатоцитах мишей з лімфомою. Похідне тіазолу та його комплекс з наноміцелами мали обмежені негативні побічні ефекти у мишей з лімфомою. Досліджувані сполуки не були гепатотоксичними щодо клітин печінки мишей.

**Ключові слова:** протипухлинні препарати, наноміцели, гепатотоксичність, антиоксидантна система





## Association of the AspP298Asn polymorphism in the MC4R gene with fattening productivity of immunologically castrated and uncastrated gilts

Y. Pocherniaieva, K. Pochernyayev, I. Bankovska  
yelyzavetapocherniaieva@gmail.com



Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production NAAS, 1 Shvedska Mohyla str., Poltava, 36013, Ukraine

### ORCID:

Y. Pocherniaieva <https://orcid.org/0000-0001-5941-1953>  
K. Pochernyayev <https://orcid.org/0000-0001-9973-6429>  
I. Bankovska <https://orcid.org/0000-0002-0104-5003>

### Authors' Contributions:

**PYO:** project administration, conceptualization, methodology, funding acquisition, investigation, writing — original draft, review and editing, formal analysis.  
**PKF:** data curation, project administration, methodology, funding acquisition, formal analysis.  
**BIB:** conceptualization, writing — review and editing, formal analysis.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

During the scientific and experimental study, all international, national and/or institutional principles of animal care and use were followed, in particular: "Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes".

### Acknowledgements:

The research was carried out with the support of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine 31.01.00.07.F "To investigate the pleiotropic effect of genes which SNP is used in marker-associated pig breeding". DR No. 0121U109838 and also according to the topic of the PhD thesis "Association of DNA markers of productivity among native and immunologically castrated gilts".

The study was aimed at establishing the presence of MC4R (c.1426 A>G) gene polymorphism among the population of immunologically castrated and native gilts (Large White × Landrace) × Maxgro. Asp298Asn polymorphism affects the economic rate of growth and fattening productivity of commercial lines of pigs. Since the polymorphism of the MC4R gene correlates with the concentration of androstenone, skatole, and indole, the possible use of polymorphism as a molecular DNA marker MC4R for genetic selection in order to reduce the level of boar odor in gilts meat and fat. This will establish which alleles and genotypes in general will be determined as desirable in the marker dilution of hybrid pigs. With this in mind, the purpose of the study was to determine the effect of the MC4R genotype on fattening performance indicators and correlation with boar odor in hybrid gilts based on population-genetic variability. Genomic DNA was isolated from the ear hair follicle of native gilts (n=42) and epithelial tissue from the ear of immunologically castrated ones (n=52). Genotyping was performed using polymorphism of the lengths of restrictive fragments (RFLP). Genetic-correlation parameters for native and immunologically castrated gilts were evaluated by ADG/AGE30 and ADG/AGE100. However, the polymorphism of the c.1426 A>G gene did not significantly affect the ADG/AGE100 performance of hybrid gilts. The predominance of the frequency of allele A (0.55) is established above the frequency of the allele G (0.45). Analysis of the frequency distribution of genotypes showed the saturation of micropopulation with heterozygotes AG (0.51) with a small proportion of GG carriers (0.19). Immunologically castrated and uncastrated gilts with an MC4R<sup>A</sup> allele are characterized by a sufficiently high ADG/AGE100 and are probably characterized by a high level of boar-specific odor compared to gilts with lower ADG/AGE100 with an MC4R<sup>G</sup> allele. According to the data obtained, the desired genotype for an equilibrium of the concentration of boar odor without compromising physiological development, growth rate, and productivity formation is heterozygous offspring with the MC4R<sup>AG</sup> genotype.

**Key words:** hybrid gilts, (Large White × Landrace) × Maxgro, native gilts, immunologically castrated gilts, polymorphism, MC4R, Asp298Asn, ADG, AGE30, AGE100, boar smell, genotype, allele, PCR-RFLP analysis



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

## Introduction

The melanocortin-4 receptor (MC4R) gene encodes a membrane-bound receptor protein and is a member of the melanocortin receptor family of genes [6, 13]. One of the popular drawbacks of raising gilts is the presence of boar taint, an off-odor present in heated meat or fat. The main compounds of this odor are androstenone, skatole, and indole [1, 8, 14]. In addition to management strategies of the genetics selection toward lower boar taint incidence could help pig farmers to shift toward raising gilts and boars. An important candidate polymorphism that could serve as the molecular marker is the Asp298Asn polymorphism of the MC4R (c.1426 A>G) gene. The Asp298Asn polymorphism of the melanocortin-4 receptor (c.1426 A>G) in pigs to affect economically important traits such as AGE100. this missense mutation Asp298Asn is associated with increased ADFI, increased ADG, and decreased lean meat percentage [14]. Breeds of pigs with a low lean meat percentage, to have high levels of boar taint and back fat thickness is correlated with androstenone and skatole levels in fat [4, 9, 14]. Therefore, I assume that the Asp298Asn polymorphism of the MC4R gene could serve as a possible marker for boar taint. Allele c.1426 A>G<sup>A</sup> is characteristic of pigs with lower lean meat percentages and possibly have higher levels of boar taint compared to pigs (allele c.1426 A>G<sup>G</sup>) with higher lean meat percentages. The interest of the study was the search for associations of the MC4R polymorphism, especially when one genotype is overrepresented in the population of hybrid pigs. Ascertain assess of genetic selection toward lower boar taint levels is possible in the meat and lard of female pigs by using the MC4R marker in commercial pigs, without compromising growth. Scientists assessed the main effects and possible interactions between sex and MC4R genotype in homozygous boars and gilts of the AA and GG genotype. The concentrations of the 3 boar taint compounds androstenone ( $P=0.044$ ), skatole ( $P=0.049$ ), and indole ( $P=0.006$ ) were significantly higher in the fat of boars with the MC4R<sup>AA</sup> genotype compared to boars with the MC4R<sup>GG</sup> genotype. An interaction between genotype and sex was evaluated for the parameter ADG ( $P=0.044$ ): boars with MC4R<sup>AA</sup> genotype had a significantly higher ADG than MC4R<sup>GG</sup> boars but there was no significant difference between the gilts. Daily lean meat gain was higher in boars compared to gilts ( $P=0.051$ ), independent of genotype. Genotype and sex affected the quality parameters of the carcass. It is established that the compound causes the smell of boar, and meat quality was not affected by genotype. The results of the study show that pork of gilts was darker ( $P=0.014$ ) and less exudative during cooking ( $P<0.001$ ) and contained more intramuscular fat ( $P=0.013$ ) [11, 14]. In this regard, the interest was to assess if genetic selection toward lower boar taint levels is possible by using this marker in hybrid gilts and assess the correlation of productivity indicators with the smell of boar.

According to the analyzed scientific sources, world scientists, we concluded that the productivity of pigs is determined by the genotype inherited from the parents. It was analyzed, according to world literary sources, that pigs with the desired genotype under certain conditions are characterized by unexpectedly worse productivity compared to parents carriers of genotypes with lower or higher productivity [3, 7, 10, 12].

The objective of the present study was to examine if there were any associations between variations in the MC4R gene with signs of fattening productivity in a commercial native and immunologically castrated gilts population in Ukraine based on population-genetic variability.

## Materials and Methods

The hair follicle and epithelial tissue samples were collected from hybrid pigs of the (Large White × Landrace) of ages (10–12 months) and of different groups: immunologically castrated ( $n=52$ ) and uncastrated ( $n=42$ ) kept at the Globyno Pig Complex. Hair follicle samples from the ear of pigs were collected using tweezers or simple plucking by hand. Appropriate measures were observed to avoid contamination of the hair samples. The hair samples were placed in an “Eppendorf”-type test tube, carefully labeled, and stored at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  in a laboratory of genetics, at the Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production NAAS. 120–150  $\mu\text{L}$  of 20% *Chelex-100* suspension was added to the contents of the test tubes and incubated for 6 hours at  $56^{\circ}\text{C}$ . After shaking the test tubes on *Vortex*, they were placed in a solid-state thermostat and incubated for 8 min at a temperature of  $98^{\circ}\text{C}$ . DNA solution samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  [5]. Isolation of DNA from epithelial tissue was carried out using a set for the isolation of nucleic acids DNA-sorb-B of the manufacturer *InterLab Service-Ukraine* LLC [2].

### *PCR amplification of porcine MC4R gene fragment*

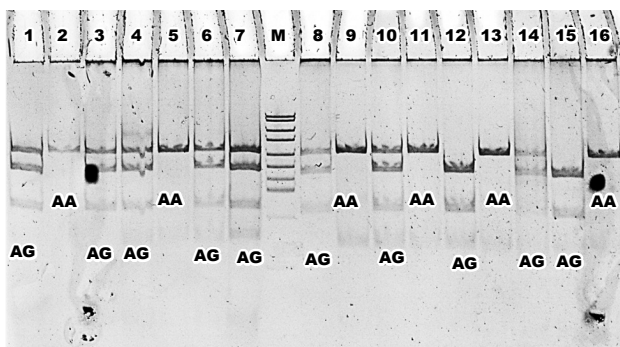
The PCR components include 12.5 ng of genomic DNA, 1.25  $\mu\text{L}$  of 1x PCR buffer, 1.0  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 1.25  $\mu\text{L}$  dNTPs, 0.25  $\mu\text{L}$  of each primer, and 0.4  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase (*ThermoFisherScientific*<sup>TM</sup>), ultrapure sterile water — 5.0  $\mu\text{L}$  and the final volume of the template DNA 7.6  $\mu\text{L}$ . The total volume of PCR mixture with genomic DNA is 17  $\mu\text{L}$ /1 sample. For the amplification of specific MC4R gene fragments, the following primers by were used: Forward: 5' — *TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG-3'*, 157.4  $\mu\text{g}$ , 26.0 nmol and Reverse: 5' — *ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G-3'*, 171.8  $\mu\text{g}$ , 25.5 nmol. The components were subjected to the following cycling profile: 3 min at  $94^{\circ}\text{C}$ ; 31 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  — 25 min;  $64^{\circ}\text{C}$  — 26 sec; 40 sec at  $72^{\circ}\text{C}$ ; and a final 2-minute extension at  $72^{\circ}\text{C}$  in a thermal cycler (*TERTSYK*, DNA Technology). Gel documentation was done after subjecting the amplicons to electrophoresis on 2% agarose gels.

*Analyses of SNPs in the MC4R gene*

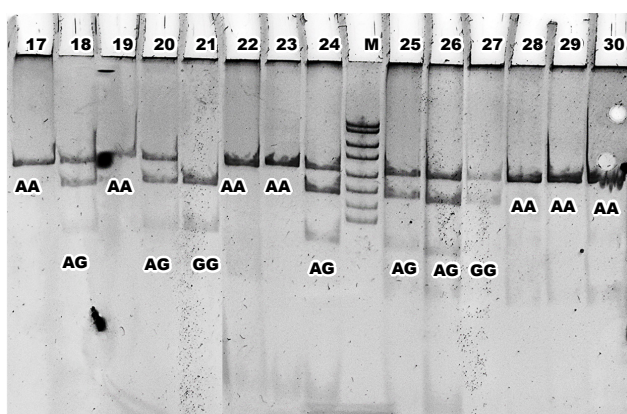
The restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method was used to detect polymorphisms in the MC4R (rs81219178) gene, using endonuclease TaqI (*ThermoFisherScientific™*) as the restriction enzyme. Enzymatic digestion was performed in a final volume of 15 µL, including 5 µL (~0.1–0.5 µg of DNA) of the PCR product, 0.2 µL of TaqI endonuclease (*ThermoFisherScientific™*), and 2.8 µL Buffer 10x, together with nuclease-free water to reach final volume 7.0 µL. Samples were incubated at 65°C, time — 1 h 50 min for MC4R (TaqI). Electrophoretic separation of DNA fragments was carried out in 8% polyacrylamide gel in 1x TBE buffer, at current strength (5V/cm) gel length. Visualization of restriction products was carried out by dyeing bromide ethidium and viewing on the transilluminator in UV light (*MicroDOC Gel Documentation Digital camera with UV Transilluminator, Cleaver Scientific*).

**Results and discussion**

DNA typing of the studied groups was carried out on the uncastrated (n=42) and immunologically castrated hybrid pigs (n=52) for SNP MC4R (c.1426 A>G).



**Fig. 1.** Electrophoregram of Taq I restriction products of MC4R (c.1426 A>G) locus DNA in 8% PAAG. Molecular marker: pUC19 DNA/MspI (*HpaII*) Marker, 23



**Fig. 2.** Electrophoregram of Taq I restriction products of MC4R (c.1426 A>G) locus DNA in 8% PAAG. Molecular marker: pUC19 DNA/MspI (*HpaII*) Marker, 23

DNA typing involves identifying allele gene variants alleles of which are characterized by restriction fragments the size of base pairs (bp). Fragments of the resulting electrophoregram (fig. 1–2): Track — 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 18, 20, 24–26 with genotype c.1426AG (70 bp.); 2, 5, 9, 11, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 28–30 with genotype c.1426AA (220 bp); 21, 27 with genotype c.1426GG (150 bp.). Size of DNA fragments in (bp) major allele MC4R c.1426G (150+70); DNA fragment size in (bp) of the MC4R c.1426A minor allele (220).

According to the results of the electrophoregram (fig. 1–2) it is observed that the studied hybrid piglets are predominantly heterozygous in genotype MC4R<sup>AG</sup>.

Homozygous AA and homozygous GG boars and gilts were produced by crossing hybrid sows (genotype AG; Genetics, Hermitage) with Maxgro terminal boars (also genotype AG).

The analysis of fattening productivity was carried out according to the results of control cultivation up to 100 kg according to the following indicators: the age the birth weight, adjusted 30-day weaning weight (AGE 30), average daily gain (ADG), and growth rate (AGE 100) of gilts; time spent in the rearing group, days; time spent in the fattening group, days (table 1).

Genetic correlations for native gilts by ADG/AGE30 parameters with MC4R<sup>AA</sup> genotype are +0.67 in relation to MC4R<sup>AG</sup> genotype and +0.101 in relation to MC4R<sup>GG</sup> genotype. Immunologically castrated gilts are evaluated according to the same parameters: with MC4R<sup>AA</sup> genotype are +0.47 in relation to MC4R<sup>AG</sup> genotype and +0.138 in relation to MC4R<sup>GG</sup> genotype. In relation to the ADG/AGE100 parameters, the correlation in immunologically castrated gilts with respect to native gilts with genotype MC4R<sup>AA</sup> is ADG +0.77 and for AGE100 –5 days; for pigs with MC4R<sup>AG</sup> genotype are ADG +0.85

**Table 1.** Effect of MC4R genotype on fattening productivity parameters in gilts

Trait	Locus genotype		
	MC4R <sup>AA</sup> (n=11)	MC4R <sup>AG</sup> (n=22)	MC4R <sup>GG</sup> (n=9)
<b>I. Native gilts</b>			
ADG, g/day	0.748	0.681	0.647
AGE30, day	30	30	30
ADG, g/day	0.940	0.845	0.774
AGE100, day	142	151	159
Time spent in the rearing group, days	44	44	44
Time spent in the fattening group, days	107	107	107
RL, %	1,287	1,262	1,255
<b>II. Immunologically castrated gilts</b>			
ADG, g/day	0.797	0.750	0.659
AGE30, day	30	30	30
ADG, g/day	1.017	0.930	0.753
AGE100, day	137	143	154
Time spent in the rearing group, days	44	44	44
Time spent in the fattening group, days	107	107	107
RL, %	1.342	1.312	1.199

*Note.* ADG — average daily gain; AGE — average daily gain; RL — relative gain.

and for AGE100 –8 days; for MC4R<sup>GG</sup> genotype are ADG –0.21 and for AGE100 +5 days. Immunologically castrated and uncastrated gilts with the MC4R<sup>A</sup> allele are characterized by a sufficiently high ADG/AGE100 and could possibly have higher levels of boar taint compared to gilts with lower ADG/AGE100 (MC4R<sup>G</sup> allele).

Genotyping of micropopulation of hybrid gilts (Large White × Landrace) × Maxgro SPE “Globinsky pig complex” LLC showed that the MC4R (c.1426A>G) locus is polymorphic, the level of which turned out to be sufficient to be able to search for the connection of individual genotypes with performance indicators and for associative research. This is indicated by the value of the calculated index of the polymorphic information content of the locus (0.37) (table 2). The predominance of frequency of allele A (0.55) over allele G (0.45) was established.

Analysis of the distribution of frequencies of genotypes showed the saturation of micropopulation with heterozygotes AG (0.51) with a small proportion of GG carriers (0.19). Animals with the homozygous genotype AA (0.30) accounted for almost a third of the sample analyzed. The resulting spectra frequency genotypes indicate that animals behind this locus are not subject to both targeted and situational selection in this farm, and therefore the herd is not consolidated according to the marker under study, which creates favorable opportunities for marker-auxiliary selection according to MC4R (c.1426A>G). No probable difference was found in the distribution of actual frequencies genotypes from the theoretically possible  $\chi^2$  method according to Hardy-Weinberg. There is a slight advantage of the actual heterozygosity value (0.509) over the expected (0.495).

To test the working hypothesis about the existence of a significant effect of individual genotypes of the locus c.1426A>G on the formation of fattening characteristics of gilts (Large White × Landrace) × Maxgro dispersion

analysis of the obtained experimental results was applied (table 3).

For the sample of pigs (Large White × Landrace) × Maxgro, a probable association of genotypes according to the studied polymorphism of the melanocortin receptor gene with an indicator of average daily gain ( $P \leq 0.05$ ) is shown, and the breeding index of fattening qualities ( $P \leq 0.01$ ), and the parameters of the influence of the genetic factor on the studied trait were 32.14%, 67.69%, and 8.81%. The lowest ADG score was observed in homozygous pigs on the G allele, while the highest average daily gains were characterized by pigs of heterozygous genotypes. By ranking the selection index of fattening qualities, in which the indicators of average daily weight gain are laid, the group of carrier animals of the AA genotype had a significant advantage over each of the other groups. No statistically significant effect of MC4R (c.1426A>G) on age gain of 100 kg and ADG in the studied micropopulation of pigs (Large White × Landrace) × Maxgro was found.

An experiment was designed to study the effect of MC4R genotype, on the parameters of fattening productivity and boar taint levels in commercial female pigs. The data obtained will form the basis for the development of a methodology for assessing the projected efficacy of SNP MC4R in the population of commercial pigs.

The studied herd of native and immunologically castrated gilts was successfully genotyped for the c.892A>G (p. Asp298Asn) single nucleotide polymorphism (SNP) by using TaqI PCR-RFLP methods. This SNP was significantly associated with ( $P < 0.00017^{***}$ ), ( $P < 0.017^{**}$ ).

The results indicate that genetic selection against boar taint is possible using the MC4R marker. Perhaps this will lead also result in lower feed intake and ADG and, consequently, better carcass quality.

**Table 2.** The gene frequency of MC4R (c.1426 A>G) in the transboundary breed of gilts (Large White × Landrace) × Maxgro

Genotypes			Gene frequency		Ho	He	PIC	$\chi^2$	Fis
AA	GG	AG	A	G					
0.30/0.30	0.19/0.20	0.51/0.49	0.55	0.45	0.509	0.495	0.37	0.092	-0.029

Note. Ho — actual heterozygosity; He — expected heterozygosity;  $\chi^2$  — deviations between empirical and theoretical frequencies of genotypes relative to the Hardy–Weinberg law; PIC (polymorphic information content) — index of the polymorphic information content of the locus; Fis — Wright fixation index.

**Table 3.** Association of individual genotypes of the MC4R (c.1426A>G) locus with the productive performance of gilts

Performance indicators	X±Sx	X±Sx	X±Sx	D <sup>2</sup> , %	P
	GG	AG	AA		
Age of reaching live weight of 100 kg, days	156.5±5,04	146,96±2.51	139.5±2.91	32.14	0.07
Average daily gain, g	763.5±10.68	887.5±7.43	978.5±7.26	67.69	0.00017***
Breeding index of fattening qualities	96.84±2,16	96.95±2,44	104.84±1,85	8.81	0.017**

Note. D<sup>2</sup> — impact strength indicator; P — significance indicator; \*\*\* —  $P \leq 0,01$ , \*\* —  $P \leq 0,01$ , \* —  $P \leq 0,05$  by the criterion of Fisher’s significance; X — average for intra-breed type; ±Sx — arithmetic mean error.

## References

1. Aluwé M, Tuytens FAM, Bekaert KM, De Smet S, De Bra-bander DL, Millet S. Evaluation of various boar taint detection methods. *Animal*. 2012; 6 (11): 1868–1877. DOI: 10.1017/S1751731112000821.
2. Budakva YO, Pochernyaev AK. Validation of the results of genotyping of pigs using markers of mitochondrial DNA. *Bull. Sumy Nat. Agr. Univer*. 2022; 3: 3–10. DOI: 10.32845/bsnau.lvst.2022.3.1. (in Ukrainian)
3. Burrow HM. Importance of adaptation and genotype × environment interactions in tropical beef breeding systems. *Animal*. 2012; 6 (5): 729–740. DOI: 10.1017/S175173111200002X.
4. Kim KS, Larsen N, Short T, Plastow G, Rothschild MF. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammal. Genome*. 2000; 11: 131–135. DOI: 10.1007/s003350010025.
5. Korinnyi SM, Pochernyaev KF, Balatsky VM. Animal hair is a convenient object of DNA excretion for analysis using PCR. *Veterinary biotechnology: Bull. IWM UAAN*. 2005; 7: 80–83. (in Ukrainian)
6. Kwon K, Cahyadi M, Park HB, Seo DW, Jin S, Kim SW, Choi YI, Kim KS, Gotoh T, Lee JH. Association of variation in the MC4R gene with meat quality traits in a commercial pig population. *J. Faculty Agricult. Kyushu Univer*. 2015; 60 (1): 113–118. DOI: 10.5109/1526302.
7. Martins JM, Fialho R, Albuquerque A, Neves J, Freitas A, Tirapicos Nunes J, Charneca R. Portuguese local pig breeds: Genotype effects on meat and fat quality traits. *Animals*. 2020; 10 (5): 905. DOI: 10.3390/ani10050905.
8. Meinert L, Lund B, Bejerholm C, Aaslyng MD. Distribution of skatole and androstenone in the pig carcass correlated to sensory characteristics. *Meat Sci*. 2017; 127: 51–56. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.01.010.
9. Oskam IC, Lervik S, Tajet H, Dahl E, Ropstad E, Andresen Ø. Differences in testosterone, androstenone, and skatole levels in plasma and fat between pubertal purebred Duroc and Landrace boars in response to human chorionic gonadotrophin stimulation. *Theriogenol*. 2010; 74 (6): 1088–1098. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.006.
10. Óvilo C, Trakooljul N, Núñez Y, Hadlich F, Murani E, Ayuso M, García-Contreras C, Vázquez-Gómez M, Rey AI, García F, García-Casco JM, López-Bote C, Isabel B, González-Bulnes A, Wimmers K, Muñoz M. SNP discovery and association study for growth, fatness and meat quality traits in Iberian crossbred pigs. *Sci. Rep*. 2022; 12: 16361. DOI: 10.1038/s41598-022-20817-0.
11. Schroyen M, Janssens S, Stinckens A, Brebels M, Bertolini F, Lamberigts C, Bekaert K, Vanhaecke L, Aluwé M, Tuytens FAM, Millet S, Buys N. The MC4R c.893G>A mutation: A marker for growth and leanness associated with boar taint odour in Belgian pig breeds. *Meat Science*. 2015; 101: 1–4. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.08.009.
12. Suzuki K, Shinkai H, Yoshioka G, Matsumoto T, Tanaka J, Hayashi N, Kitazawa H, Uenishi H. NOD2 genotypes affect the symptoms and mortality in the porcine circovirus 2-spreading pig population. *Genes*. 2021; 12 (9): 1424. DOI: 10.3390/genes12091424.
13. Tao YX. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr. Rev*. 2010; 31 (4): 506–543. DOI: 10.1210/er.2009-0037.
14. Van den Broeke A, Aluwé M, Tuytens FAM, Ampe B, Vanhaecke L, Wauters J, Janssens S, Coussé A, Buys N, Millet S. An intervention study demonstrates effects of MC4R genotype on boar taint and performances of growing–finishing pigs. *J. Anim. Sci*. 2015; 93 (3): 934–943. DOI: 10.2527/jas.2014-8184.

## Асоціація поліморфізму Asp298Asn гена MC4R з відгодівельною продуктивністю в імунологічно кастрованих та нативних свинок

Є. О. Почерняєва, К. Ф. Почерняєв, І. Б. Баньковська  
yelyzavetapocherniaieva@gmail.com

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,  
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

Дослідження було спрямоване на встановлення наявності поліморфізму гена MC4R (с.1426 A>G) серед популяції імунологічно кастрованих та нативних підсвинків (велика біла × ландрас) × Махго. Поліморфізм Asp298Asn впливає на економічний показник швидкості росту та відгодівельну продуктивність комерційних ліній свиней. Оскільки поліморфізм гена MC4R корелює з концентрацією андростенону, скатолу та індолу, то можливе використання поліморфізму як молекулярного ДНК-маркера для генетичного відбору з метою зниження рівня запаху кнура у м'ясі та салі свинок дозволить встановити, які алелі та генотипи загалом будуть визначені як бажані у маркерному розведенні гібридних свиней. З огляду на це, метою проведеного дослідження було визначити вплив генотипу MC4R на показники відгодівельної продуктивності та кореляцію із запахом кнура у гібридних підсвинків на основі популяційно-генетичної мінливості. Геномну ДНК виділили з волоссяного фолікула вуха нативних (n=42) та епітеліальної тканини з вуха імунологічно кастрованих підсвинків (n=52). Генотипування проводили за допомогою поліморфізму довжин рестриктивних фрагментів (ПЛР). Генетико-кореляційні параметри для нативних та імунологічно кастрованих підсвинків оцінювали за показниками ADG/AGE30 та ADG/AGE100. Проте поліморфізм гена с.1426 A>G не вплинув суттєво на показники ADG/AGE100 гібридних підсвинків. Встановлено переважання частоти алеля А (0,55) над частотою алеля G (0,45). Аналіз розподілу частот генотипів показав насиченість мікропопуляції гетерозиготами AG (0,51) з невеликою часткою носіїв GG (0,19). Імунологічно кастровані та некастровані підсвинки з алелем MC4R<sup>A</sup> характеризуються достатньо високим ADG/AGE100 і, ймовірно, мають високий рівень специфічного запаху кнура порівняно з підсвинками з нижчим ADG/AGE100 з алелем MC4R<sup>G</sup>. Згідно з отриманими даними, бажаним генотипом для рівноваги концентрації запаху кнура без шкоди фізіологічного розвитку, швидкості росту та формування продуктивності є гетерозиготне потомство з генотипом MC4R<sup>AG</sup>.

**Ключові слова:** гібридні свинки, (велика біла × ландрас) × Махго, нативні підсвинки, імунологічно кастровані підсвинки, поліморфізм, MC4R, Asp298Asn, ADG, AGE30, AGE100, запах кнура, генотип, алель, аналіз ПЛР-ПДРФ



## The role of oil solutions of thiosulfonates in the modulation of antioxidant parameters in rat kidneys

N. M. Liubas, I. Ya. Oliynyk  
n\_lubas@ukr.net, lakmus3041@gmail.com



Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine

### ORCID:

N. M. Liubas <https://orcid.org/0000-0002-2342-5250>  
I. Ya. Oliynyk <https://orcid.org/0000-0003-2487-1022>

### Authors' Contributions:

**LNM:** conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration, supervision, writing — original draft, review & editing.

**OIY:** conceptualization, visualisation, formal analysis, writing — original draft, review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Bioethics of the Institute of Animal Biology NAAS (Protocol no. 135 from 20.06.2023, Lviv, Ukraine).

### Acknowledgements:

The authors wish to thank Prof. R. Iskra (Department of Human and Animal Physiology at Lviv National University named after Ivan Franko) for help in organizing the experiment, and Prof. V. I. Lubenets (Department of Technology of Biologically Active Compounds, Pharmacy, and Biotechnology at Lviv Polytechnic National University) for the synthesis of thiosulfonate ester.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

This study investigated the influence of thiosulfonate esters, specifically S-ethyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ETS), S-allyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ATS), and S-allyl-4-acetylaminobenzenethiosulfonate (AATS), at a dose of 50 mg/kg body weight on the antioxidant defense system in rat kidneys. The kidneys are essential organs involved in maintaining metabolic homeostasis and they are constantly exposed to reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. The effectiveness of the antioxidant defense system was evaluated by measuring oxidative stress markers, including lipid peroxidation (LPO), as well as the activity of key antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), and the level of reduced glutathione (GSH). Dysfunction of oxidant protection was observed with an oily diet, characterized by an increase in lipid hydroperoxide levels, a decrease in the SOD and catalase activity, and a decrease in the antioxidant activity of the entire glutathione chain. Administration of thiosulfonates, especially ETS and AATS, helped stabilize antioxidant protection. The beneficial antioxidant effects of thiosulfonates can be partially explained by their ability to prevent the formation of free radicals, can intercept, neutralize reactive oxygen species and other harmful substances that can damage body cells.

**Key words:** S-ethyl-4-aminobenzenethiosulfonate, S-allyl-4-aminobenzenethiosulfonate, S-allyl-4-acetylaminobenzenethiosulfonate, kidneys, antioxidant system

## Introduction

Organosulfur compounds (OSCs) are natural compounds found in various *Allium* species, known for their diverse biological activities such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, anticarcinogenic, and antispasmodic effects. These compounds have gained attention in the agri-food industry as potential alternatives to synthetic preservatives. However, before their widespread use in the food industry, it is essential to assess their safety according to the guidelines provided by the European Food Safety Authority (EFSA).

Thiosulfonates are a class of chemical compounds that contain a sulfonate group ( $-SO_3$ ) and a thiosulfon-

ate group ( $-S-SO_3$ ). These compounds have potential applications in various fields, including:

- **Industry.** Thiosulfonates are used in industrial processes as stabilizers, antioxidants, pH regulators, corrosion inhibitors, and more. They can be employed in the production of plastics, paints, detergents, pharmaceuticals, and other products [24].

- **Agrochemistry.** Some thiosulfonates have potential applications in agriculture as fungicides, insecticides, and herbicides. They can be used to control harmful organisms such as fungi, insects, and weeds, and improve crop yield [12].

- **Medicine.** Certain studies have indicated potential medical applications of thiosulfonates. For instance,

some thiosulfonates are being investigated as antitumor agents due to their ability to impact the growth and proliferation of cancer cells. Additionally, some thiosulfonates have demonstrated anti-inflammatory and antioxidant activities, which could be beneficial in treating oxidative stress-related diseases [2, 22].

• **Electrochemistry.** Thiosulfonates can also find applications in the field of electrochemistry. They are used as electrolytes in batteries, electrolytic processes, and other electrochemical applications [7].

Considering the potential applications of thiosulfonates, it is important to also consider their toxicity, environmental impact, and safety of use [14, 23].

The kidneys play a crucial role in toxin elimination and are involved in the regulation of water and electrolyte balance, as well as blood filtration. Studying the antioxidant system of the kidneys in the context of thiosulfonate research is essential because the antioxidant system is a key defense mechanism against oxidative stress, which can be induced by certain chemical substances, including thiosulfonates [8, 16].

Oxidative stress occurs when the level of free radicals and other reactive oxygen species exceeds the capacity of the antioxidant system to neutralize them. This can lead to cell and tissue damage, including in the kidneys. Thiosulfonates not only inhibit oxidative processes within cells but also stimulate the expression of genes that produce enzymes involved in the antioxidant defense system. One important target within cells for these compounds is redox-sensitive transcription factors, specifically antioxidant-responsive elements (ARE). By modulating the expression of genes regulated by ARE, thiosulfonic acid esters can exert cytoprotective effects.

In thiosulfonate studies, investigating the antioxidant system of the kidneys and spleen allows for an assessment of whether these compounds can induce oxidative stress and cellular damage in these organs. Research may involve measuring the levels of antioxidants such as glutathione, superoxide dismutase (SOD), catalase, and other antioxidant enzymes, as well as evaluating the levels of oxidative markers such as malondialdehyde (MDA) [17] or reactive oxygen species (ROS). In our study, we investigated the radical scavenging and antiradical activities of S-ethyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ETS), S-allyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ATS), and S-allyl-4-acetylaminobenzenethiosulfonate (AATS) *in vivo* to establish the relationship between their structure and activity.

Based on the aforementioned information, the objective of our study was to investigate the impact of various sulfur-containing compounds, specifically ETS, ATS, and AATS, on the antioxidant defense system in the kidneys of rats.

## Materials and Methods

Our study focused on investigating the biological effects of S-ethyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ETS),

S-allyl-4-aminobenzenethiosulfonate (ATS), and S-allyl-4-acetylaminobenzenethiosulfonate (AATS). These compounds were synthesized at the Department of Technology of Biologically Active Compounds, Pharmacy, and Biotechnology of the Lviv Polytechnic National University following a previously described protocol. The dosage and duration of administration were determined based on our previous studies [12]. The selected doses of thiosulfonates was 50mg/kg of body weight, administered orally for a period of 21 days to white male Wistar rats weighing between 190 and 210 g. The research was conducted at the Laboratory of Biochemistry of Animal Adaptation and Ontogeny, Institute of Animal Biology NAAS (Lviv, Ukraine). The study was conducted following the general ethical principles of animal experiments established by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001) and in accordance with the provisions of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, France, 1986). Permission to conduct the study was obtained from the Bioethics Committee of the Institute of Animal Biology NAAS (Protocol no. 128 from February 27, 2023). The animals were housed in a vivarium with suitable lighting and temperature conditions.

Each experiment involved dividing the animals into four groups, each consisting of 5 rats: I group served as the control; II, III, IV, and V groups were experimental. The control group (I) did not receive any substances, while the experimental groups (II, III, IV, and V) were administered either oil or an oil solution of thiosulfonates.

Both the control and experimental groups were provided with standard pelleted food for laboratory rats. The animals in the experimental groups were given 500  $\mu$ L of either oil or an oil solution of thiosulfonates.

The activity of superoxide dismutase (SOD) was measured by the reduction of nitrotetrazolium blue by superoxide radicals. The results were expressed in arbitrary units per 1 mg of protein.

To determine the activity of catalase (CAT), the ability of hydrogen peroxide to form a stable colored complex with molybdenum salts was utilized. The CAT activity was expressed as the reduction in hydrogen peroxide content.

The activity of glutathione peroxidase (GP) was determined by the rate of glutathione oxidation during its interaction with tert-butyl hydroperoxide. The GP activity was expressed in nmol of glutathione per minute per 1 mg of protein.

The activity of glutathione reductase (GR) was measured by the decrease in oxidized glutathione content during its interaction with NADPH. The GR activity was expressed in  $\mu$ mol of oxidized NADP per min per 1 mg of protein.

To determine the level of free glutathione (GSH), the reaction of GSH with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid was employed, resulting in the formation of a colored product. The GSH content was expressed in millimoles per gram of tissue [11].

After conducting the experiments, the data were statistically analyzed using the *Microsoft Excel* software, employing the one-way method.

The statistical analysis was performed using *Microsoft Excel 2013*. The results were presented as the Mean±Standard Error of the Mean (M±SEM). To assess the significance of the differences between groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted, followed by the Tukey-Kramer test. Significance levels were categorized into three gradations: \* or # for P≤0.1, \*\* or ## for P≤0.05, and \*\*\* or ### for P≤0.01. Differences were considered statistically significant at a significance level of P≤0.1, which spoke about the existence of a 10% probability that the relationship found between the variables in the samples is just a random feature of the given samples.

## Results and Discussion

Lipid peroxidation and oxidative stress play a significant role in the pathophysiology of kidney damage. Reactive oxygen species (ROS) can induce oxidative damage to cellular components, including lipids, proteins, and DNA, leading to dysfunction and injury of renal cells [8].

One of the key mechanisms involved in lipid peroxidation is the generation of lipid hydroperoxides, which are highly reactive and can initiate a chain reaction of oxidative damage in the kidneys [15]. The accumulation of lipid hydroperoxides can lead to cellular dysfunction and contribute to the development of kidney diseases.

The antioxidant defense system in the kidneys plays a crucial role in maintaining the redox balance and protecting against oxidative stress. This system involves various antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), as well as non-enzymatic antioxidants like reduced glutathione (GSH) [1, 9].

Studies have shown that increased ROS production and impaired antioxidant defense mechanisms can disrupt the pro/antioxidant balance in the kidneys, leading to oxidative stress and tissue damage [5, 9].

The results of the research show that the level of lipid hydroperoxides in the kidney homogenate of rats in IV and V groups likely increased under the influence of thiosulfonates compared to the control (table), by 61.4%

and 29.5%, respectively, with a probability of 1 and 10 percent. However, it should be noted that the relationship between the variables observed in the samples may be a random feature of the specific sample (table, fig. 1). This increasing trend is also observed when comparing with the group of rats that received oil. Therefore, the thiosulfonates ATS and AATS may contribute to the elevation of lipid hydroperoxide levels in the rat kidney homogenate, indicating a potential induction of oxidative stress in the animal's body. Lipid hydroperoxides are products of lipid peroxidation, which occurs when there is an excessive presence of free oxygen radicals or insufficient activity of antioxidant systems.

On the contrary, a probable decrease in the content of TBC (thiobarbituric acid reactive substances)-active products was observed in the kidney homogenate of rats that received both oil and thiosulfonates compared to the control group. This suggests that the oil, as a solvent, may also provide protection against free radical damage to the kidneys (table, fig. 2).

When there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defense system, oxidative stress can occur, leading to lipid peroxidation. Lipid peroxidation is a process in which reactive oxygen species attack polyunsaturated fatty acids in cell membranes, resulting in the formation of lipid hydroperoxides. These hydroperoxides can then decompose into various byproducts, including TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Therefore, increased levels of TBARS indicate higher levels of lipid peroxidation and oxidative damage to cellular membranes [6].

Reducing oxidative stress would be expected to lead to a decrease in lipid peroxidation and consequently lower levels of TBARS. By maintaining a balance between ROS production and antioxidant defenses, it is possible to mitigate the harmful consequences of oxidative stress on cellular structures and functions.

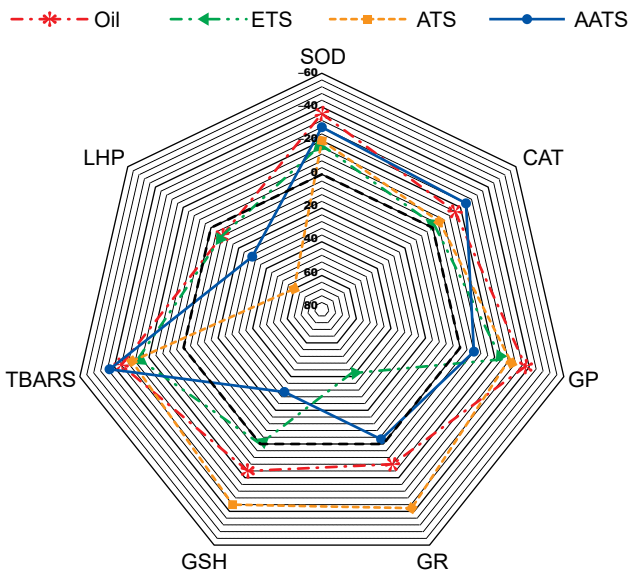
In contrast to the level of lipid hydroperoxides in the kidney homogenate of rats that received both oil and thiosulfonates, a significant decrease in the content of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)-active products was observed compared to the control group.

**Table.** Indicators of antioxidant parameters of rat kidney homogenate (M±S.E.M., n=5)

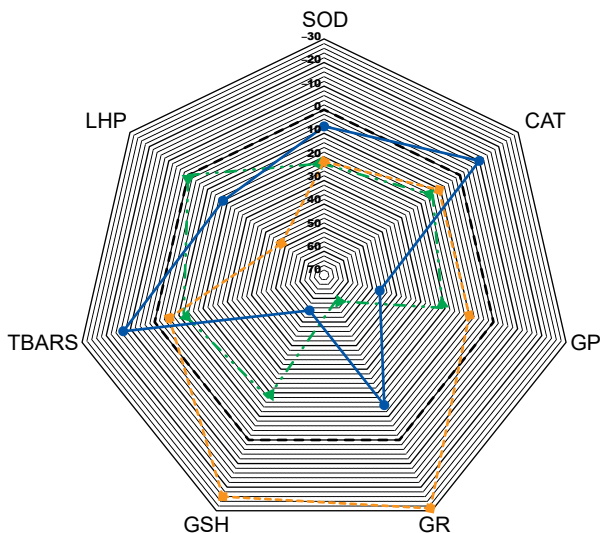
Indicator	I — Control	II — oil	III — ETS	IV — ATS	V — AATS
SOD, U/mg of protein	28,00±0,61	18,55±0,23↓***	22,82±0,60↓**↑###	22,57±0,60↓**↑###	19,89±1,26↓***
CAT, mmol/min×mg of protein	17,76±0,27	15,18±1,32↓	17,34±0,22↑#	16,86±0,48↓*	13,56±0,84↓**
GPx, nmol GSH/min×mg of protein	83,46±2,51	52,97±3,95↓***	64,20±3,78↓**↑#	58,44±4,27↓***	77,78±2,91↑**↑###
GR, nmol NADPH/min×mg of protein	1,40±0,06	1,25±0,31	2,00±0,48↑**↑#	0,88±0,11↓**↓#	1,44±0,03
GSH (*10 <sup>-1</sup> ), mmol/g	3,36±0,11	2,83±0,15↓**	3,36±0,21↑###	2,15±0,10↓***↓###	4,39±0,07↑*↑###
TBARS, nmol/g tissue	6,34±0,81	4,18±0,21↓**	4,72±0,13↓**↑#	4,46±0,23↓**↑	3,63±0,22↓***↓#
LHP, CU/g tissue	0,44±0,02	0,48±0,04	0,48±0,05	0,71±0,05↑***↑###	0,57±0,04↑*↑#

Note. here and further \*—\*\*\* — P ≤, 1; 0,05; 0,001 — the statistically significant difference in III, IV, V, VI, VII groups compared to I group (control); #—### — P ≤ 0, 1; 0,05; 0,001 — the statistically significant difference in III, IV, V groups compared to II group.





**Fig. 1.** Relative percentage deviation of the experimental groups relative to the control, which we took as the zero reference



**Fig. 2.** The relative percentage deviation of the experimental groups relative to the group that was fed pure oil, which we took as the zero reference

This suggests that the oil, as a solvent, may introduce and reduce the content of TBARS by 34% compared to the control (see fig. 1). However, when comparing the effects of esters on the kidney homogenate relative to the oil group, it was found that feeding rats ATS resulted in a statistically insignificant increase in TBARS, while feeding rats ETS led to a statistically significant increase. On the other hand, feeding rats AATS resulted in a statistically significant reduction of 13.16% compared to the oil group, with a significance level of  $P \leq 0.1$ . This suggests that despite the increase in the level of lipid hydroperoxides in the rat kidney homogenate after the introduction of thiosulfonates into the diet, the antioxidant system neutralizes the appearance of free radicals and subsequent oxidation, thereby minimizing oxidative stress and reducing the TBARS level. By maintaining a balance between the production of reactive

oxygen species (ROS) and antioxidant defences, it is possible to mitigate the harmful consequences of oxidative stress on cellular structures and functions.

Interesting patterns were also observed in the glutathione antioxidant chain of free radical oxidation. Specifically, a decrease in the activity of superoxide dismutase (SOD) was observed in all experimental groups compared to the control group (see table, fig. 1). This reduction in SOD activity can disrupt the balance between ROS production and antioxidant defences, resulting in an accumulation of superoxide radicals and subsequent oxidative damage to cellular structures. The reduction in SOD activity was 33.75% in the oil group, 18.5% in the ETS group, 19.39% in the ATS group, and 28.96% in the AATS group. However, comparing the effects of thiosulfonates with oil, it can be observed that all thiosulfonates mitigate the reduction in SOD activity (see fig. 2) and enhance antioxidant protection compared to the oil group. Specifically, SOD activity increases by 23% in the ETS group, by 21.67% in the ATS group, and by 7.22% in the AATS group. This is consistent with other studies, as thiosulfonates have been reported to have varied effects on SOD activity. Some studies suggest that thiosulfonates can enhance SOD activity, while others indicate a decrease in SOD levels. The specific impact may depend on the experimental conditions, dosage, and the specific system being investigated [4, 6].

A decrease or increase in catalase levels can provide insights into the oxidative status and the efficiency of the antioxidant defence system in the body. Catalase is an enzyme that plays a crucial role in breaking down hydrogen peroxide into water and oxygen, thereby protecting cells from oxidative damage. Changes in catalase levels can indicate alterations in oxidative stress levels and the overall balance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defence.

In this case, all groups showed decreased catalase levels compared to the control. The largest decrease of 23.64% was observed in the AATS group, while the use of oil led to a decrease of 14.52% in catalase levels. The use of ETS and ATS resulted in a decrease of approximately 5% in catalase levels. These reductions in catalase levels suggest a potential disruption in the antioxidant defence system and an imbalance between ROS production and antioxidant protection in the kidney homogenate of rats treated with thiosulfonates or oil [1, 18].

A decrease in catalase levels can indicate a compromised antioxidant defense system, which may lead to an accumulation of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species (ROS). This reduction in catalase activity can result in an impaired ability to neutralize oxidative stress and may suggest an imbalance between ROS production and antioxidant capacity. Additionally, decreased catalase levels may indicate a higher susceptibility to oxidative damage and an increased risk of oxidative stress-related diseases [3, 10]. Since oil and oil solutions reduce the level of catalase, we can conclude that the main influence on this indicator is exerted by oil as an independent substance and a solvent for thiosulfonates.

At the same time, thiosulfonates such as ETS and ATS neutralize this oil effect, and an increase in catalase levels when using these ethers relative to the oil group can indicate an upregulation of the antioxidant defense system in response to oxidative stress [13]. This upregulation of catalase activity serves as a protective mechanism to mitigate the harmful effects of reactive oxygen species (ROS) and maintain redox balance within cells, which is caused by thiosulfonates compared to oil (see fig. 2).

A decrease in glutathione peroxidase (includes both catalase and glutathione links) levels can indicate a compromised antioxidant defense system, particularly in the context of the cellular antioxidant enzyme network. Glutathione peroxidase is responsible for the reduction of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides, utilizing glutathione as a co-substrate. Therefore, a reduction in its levels may suggest an impaired ability to neutralize peroxides and mitigate oxidative stress.

Oil solutions led to a decrease in the level of glutathione peroxidase in all groups (see fig. 1) compared to the control group. A decrease in glutathione peroxidase was observed by 36.5% in the oil group ( $P < 0.001$ ), 29.97% in the ATS group ( $P < 0.001$ ), 23.07% in the ETS group ( $P < 0.05$ ), and 6.8% in the AATS group ( $P < 0.05$ ).

A decrease in glutathione peroxidase activity can lead to an accumulation of peroxides and reactive oxygen species (ROS), which can contribute to oxidative damage and disrupt cellular redox balance. This reduction may also indicate a decreased capacity to protect against oxidative stress-related diseases and conditions. However, a direct comparison with the oil group allows us to draw conclusions about the antioxidant protection caused by thiosulfonates. All thiosulfonates increase the glutathione peroxidase level relative to the oil group by 10.32% (ETS), 21.2% (ATS), and 46.83% (AATS) (see fig. 2).

Glutathione reductase is a key enzyme involved in maintaining the reduced form of glutathione, which is crucial for neutralizing reactive oxygen species (ROS) and detoxifying harmful substances. In the oil group, there is an insignificant decrease by 10.31% in the level of this enzyme relative to the control, but unlike the previous results, ATS does not exhibit antioxidant properties. On the contrary, it further enhances the effect of oxidative damage relative to the control group. The decrease in the level of glutathione reductase in ATS is 37.4% relative to the control group, which is 29.6% relative to the oil group (see fig. 1). A reduction in glutathione reductase levels can lead to an accumulation of oxidized glutathione and a diminished capacity to regenerate reduced glutathione. This imbalance can disrupt the antioxidant capacity of cells, resulting in increased oxidative stress and heightened vulnerability to oxidative damage.

Other thiosulfonates showed an antioxidant effect, and this effect was so great that it completely compensated for the oxidizing effect of the oil, increasing the content of glutathione reductase by 2.8% in the AATS group and by 42.87% in the ETS group relative to the control group, which was an increase of 15.2% and 60% compared to the oil group, respectively.

The last of the glutathione chain is reduced glutathione. In the groups of animals that consumed oil and ATS in the kidney homogenate, the level of GSH was reduced relative to the control group by 15.77% and 36.01%, respectively. A decrease in the content of reduced glutathione (GSH) can indicate a disruption in the antioxidant defense system and redox balance within cells. Here are some characteristics associated with a decrease in GSH levels.

*Impaired antioxidant capacity:* GSH plays a crucial role in cellular antioxidant defense by taking part in the reactive oxygen species (ROS) reduction and neutralizing free radicals. A decrease in GSH content can result in reduced antioxidant capacity, making cells more susceptible to oxidative damage.

*Oxidative stress:* Decreased GSH levels are often associated with increased oxidative stress. GSH acts as a critical cellular redox buffer, and its depletion can disrupt the balance between pro-oxidants and antioxidants, leading to an ROS accumulation and oxidative damage to cellular components.

*Imbalanced redox status:* GSH serves as a critical regulator of the cellular redox status, maintaining a reducing environment inside cells. A decrease in GSH content can disturb the redox balance and affect cellular signaling pathways and redox-sensitive processes.

*Impaired detoxification:* GSH is involved in the detoxification of xenobiotics and harmful substances. Reduced GSH levels can hinder proper detoxification processes, leading to the accumulation of toxic compounds and increased susceptibility to cellular damage.

It should be noted that ETS and AATS stabilized the level of GSH. We did not observe differences in the level of GSH between the ETS group and the control group. The indicators in these groups differed only by mathematical expectation. However, AATS led to an increase in the GSH indicator by 30% relative to the control group and by 55.12% relative to the oil group [20].

Our data are consistent with the results of research by other authors and indicate that oil, as a solvent, causes a decrease in GSH content and may be the cause of disturbances in the functioning of the glutathione link of antioxidant protection. At the same time, thiosulfonates at different stages, depending on the type, act as antioxidants, restore antioxidant protection, and normalize oxidative processes.

Studies have reported a decrease in activity of the antioxidant system following an oil diet. This reduction in activity of the antioxidant system may be associated with oxidative stress and the generation of ROS. It is important to note that excessive consumption of certain types of oils, particularly those high in omega-6 fatty acids, can lead to an imbalance between pro-oxidants and antioxidants, thereby affecting the activity of the antioxidant system and other antioxidant enzymes. At the same time, thiosulfonates to varying degrees improved antioxidant indicators. Thiosulfonates can react with reactive oxygen species, donating their electrons and forming stable, less reactive compounds. This reduces oxidative stress and prevents cell damage. In addition, some thiosulfonates can activate enzymatic antioxidant defense systems, particularly glutathione-S-transferase, which plays an important role in the detoxification of harmful compounds.

## References

- Amaral EP, Foreman TW, Namasiyayam S, Hilligan KL, Kauffman KD, Bomfim CCB, Costa DL, Barreto-Duarte B, Gurgel-Rocha C, Santana MF, Cordeiro-Santos M, Du Bruyn E, Riou C, Aberman K, Wilkinson RJ, Barber DL, Mayer-Barber KD, Andrade BB, Sher A. GPX4 regulates cellular necrosis and host resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 2022; 219 (11): e20220504. DOI: 10.1084/jem.20220504.
- Ayepola OR, Cerf ME, Brooks NL, Oguntibeju OO. Kolaviron, a biflavonoid complex of *Garcinia kola* seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. *Phytomedicine.* 2014; 21 (14): 1785–1793. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.09.006.
- Bijarnia RK, Bachtler M, Chandak PG, van Goor H, Pasch A. Sodium thiosulfate ameliorates oxidative stress and preserves renal function in hyperoxaluric rats. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0124881. DOI: 10.1371/journal.pone.0124881.
- Brittebo EB, Eriksson C, Brandt I. Effects of glutathione-modulating agents on the covalent binding and toxicity of dichlobenil in the mouse olfactory mucosa. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 114 (1): 31–40. DOI: 10.1016/0041-008X(92)90093-8.
- Cui X, Yu X, Wu X, Huang L, Tian Y, Huang X, Zhang Z, Cheng Z, Guo Q, Zhang Y, Cai Y, Zhan Q. Acute kidney injury in patients with the coronavirus disease 2019: A multicenter study. *Kidney Blood Press Res.* 2020; 45 (4): 612–622. DOI: 10.1159/000509517.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 1991; 11 (1): 81–128. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90192-6.
- Guillamón E, Mut-Salud N, Rodríguez-Sojo MJ, Ruiz-Malagón AJ, Cuberos-Escobar A, Martínez-Férez A, Rodríguez-Nogales A, Gálvez J, Baños A. *In vitro* antitumor and anti-inflammatory activities of allium-derived compounds propyl propano thiosulfonate (PTSO) and propyl propano thiosulfinate (PTS). *Nutrients.* 2023; 15 (6): 1363. DOI: 10.3390/nu15061363.
- Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthová L. Oxidative stress in the pathophysiology of kidney disease: Implications for noninvasive monitoring and identification of biomarkers. *Ox. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 5478708. DOI: 10.1155/2020/5478708.
- Hallan SI, Rifkin DE, Potok OA, Katz R, Langlo KA, Bansal N, Ix JH. Implementing the European renal best practice guidelines suggests that prediction equations work well to differentiate risk of end-stage renal disease vs. death in older patients with low estimated glomerular filtration rate. *Clin. Invest.* 2019; 96 (3): 728–737. DOI: 10.1016/j.kint.2019.04.022.
- Ho HJ, Shirakawa H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Cells.* 2022; 12 (1): 88. DOI: 10.3390/cells12010088.
- Liubas N, Iskra R, Lubenets V. Antioxidant defense system of rat liver under the influence of thiosulfonate esters. *Stud. Biol.* 2023; 17 (2): 43–56. DOI: 10.30970/sbi.1702.709.
- Liubas N, Iskra R, Stadnytska N, Monka N, Havryliak V, Lubenets V. Antioxidant activity of thiosulfonate compounds in experiments *in vitro* and *in vivo*. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2022; 12 (3): 3106–3116. DOI: 10.33263/BRIAC123.31063116.
- Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: Causes and therapeutic strategies. *Metab. Syndrome Rel. Disord.* 2015; 13 (10): 423–444. DOI: 10.1089/met.2015.0095.
- Pal A, Mondal PP, Niloofar F, Sahoo B. Synthetic strategies for versatile thioester building blocks. *Eur. J. Organ. Chem.* 2022; 2022 (48): e202201159. DOI: 10.1002/ejoc.202201159.
- Pavlaou P, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Mitsis M, Dounousi E. Oxidative stress and acute kidney injury in critical illness: pathophysiologic mechanisms-biomarkers-interventions, and future perspectives. *Ox. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017: 6193694. DOI: 10.1155/2017/6193694.
- Peng T, Zhuo L, Wang Y, Jun M, Li G, Wang L, Hong D. Systematic review of sodium thiosulfate in treating calciphylaxis in chronic kidney disease patients. *Nephrology (Carlton).* 2018; 23 (7): 669–675. DOI: 10.1111/nep.13081.
- Qiao J, Zheng K, Lin Z, Jin H, Yu W, Shen C, Jia A, Zhang Q. Heterogeneous Chitosan@copper catalyzed selective C(sp<sup>3</sup>)-H sulfonylation of ketone hydrazones with sodium sulfonates: Direct access to  $\beta$ -keto-sulfones. *Catalysts.* 2023; 13 (4): 726. DOI: 10.3390/catal13040726.
- Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 2011; 51 (2): 327–336. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010.
- Serra V, Castrica M, Agradi S, Curone G, Vigo D, Di Giancamillo A, Modena SC, Riva F, Balzaretto CM, De Bellis R, Brecchia G, Pastorelli G. Antioxidant activity of different tissues from rabbits fed dietary bovine colostrum supplementation. *Animals.* 2023; 13 (5): 850. DOI: 10.3390/ani13050850.
- Serra-Majem L, Román-Viñas B, Sanchez-Villegas A, Guasch-Ferré M, Corella D, La Vecchia C. Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. *Mol. Aspect. Med.* 2019; 67: 1–55. DOI: 10.1016/j.mam.2019.06.001.
- Shiwei Y, Zhaohua C, Qi C, Shuting L, Jinping H, Guanshen T, Zhaoyang W. Research progress in synthesis and application of thiosulfonates. *Chin. J. Organ. Chem.* 2022; 42 (8): 2322–2330. DOI: 10.6023/cjoc202203036.
- Stanisavljević N, Soković Bajić S, Jovanović Ž, Matic I, Tolinački M, Popović D, Popović N, Terzić-Vidojević A, Golić N, Beškoski V, Samardžić J. Antioxidant and antiproliferative activity of *Allium ursinum* and their associated microbiota during simulated *in vitro* digestion in the presence of food matrix. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 601616. DOI: 10.3389/fmicb.2020.601616.
- Sun M, Liu T, Li M, Tan J, Tian P, Wang H, Chen G, Jiang D, Liu X. A deep supercooling eutectic phase change material for low-temperature battery thermal management. *J. Energy Stor.* 2022; 50: 104240. DOI: 10.1016/j.est.2022.104240.
- Zhao Y, Zhang H, Hao D, Wang J, Zhang D, Sun Z, Liu C. Selenium alleviates chromium(VI)-induced ileum damage and cecal microbial disturbances in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2022; 200: 4750–4761. DOI: 10.1007/s12011-021-03061-x.

## Роль олійних розчинів тіосульфонатів у модуляції антиоксидантних показників у нирках щурів

Н. М. Любас, І. Я. Олійник

n\_lubas@ukr.net, lakmus3041@gmail.com

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Досліджували вплив естерів тіосульфонатів, зокрема S-етил-4-амінобензентіосульфонату (ETC), S-аліл-4-амінобензентіосульфонату (ATC) та S-аліл-4-ацетил-амінобензентіосульфонату (AATS), у дозі 50 мг/кг маси тіла на систему антиоксидантного захисту в нирках щурів. Нирки є важливим органом у підтримці метаболічного гомеостазу і постійно зазнають впливу активних форм кисню (АФК) та оксидативного стресу. Ефективність системи антиоксидантного захисту оцінювали вимірюванням маркерів оксидативного стресу, зокрема показників пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активності ключових ферментів антиоксидантної системи — таких, як каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), та рівень відновленого глутатіону (ВГ). Дисфункцію системи антиоксидантного захисту спостерігали в нирках тварин, які споживали з кормом олію, про що свідчать показники підвищеного вмісту гідропероксидів ліпідів, зниження активності СОД і каталази, ферментів глутатіонової ланки та знижений вміст відновленого глутатіону. Споживання тіосульфонатів, особливо ETC та AATS, сприяло стабілізації системи антиоксидантного захисту. Позитивний антиоксидантний ефект тіосульфонатів можна частково пояснити їхньою здатністю запобігати утворенню вільних радикалів, перехоплювати і нейтралізувати активні форми кисню та інші шкідливі речовини, здатні пошкоджувати клітини організму.

**Ключові слова:** S-етил-4-амінобензентіосульфонат, S-аліл-4-амінобензентіосульфонат, S-аліл-4-ацетиламіно-бензентіосульфонат, нирки, антиоксидантна система



## Reproductive characteristics of Saanen and Alpine bucks

A. Bogdaniuk<sup>1,2</sup>, V. Garkavii<sup>3</sup>, M. Petrushko<sup>1</sup>  
baa1995ua@gmail.com



<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavka str., Kharkiv 61016, Ukraine

<sup>2</sup>"Institute of Contemporary Veterinary Technologies" LLC, 27 Shevchenka str., Cherevki, Brovary district, Kyiv region, 07624, Ukraine

<sup>3</sup>"Tatyana 2011" farm, 1M Shevchenka str., Cherevki, Brovary district, Kyiv region, 07624, Ukraine

### ORCID:

A. Bogdaniuk <https://orcid.org/0000-0003-1184-5431>

M. Petrushko <https://orcid.org/0000-0001-8331-5419>

### Authors' Contributions:

**BA:** conceptualization, formal analysis, methodology, investigation, resources, project administration, supervision, writing — original draft.

**GV:** methodology, investigation, writing — review & editing.

**PM:** conceptualization, supervision, writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

The permission of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine (Protocol no. 1 from 28.01.2021).

### Acknowledgements:

The research was conducted within the program "Support for the development of priority directions of scientific research" (the code of program classification of expenses and crediting 6541230). Authors express their gratitude to "Institute of Contemporary Veterinary Technologies" LLC and "Tatyana 2011" farm for cooperation, support, and supply of the biological material for the study.

Genetic variations among breeds within a species can impact not only productivity traits, such as milk yield and quality, but also animal health, including fertility. This study aimed to compare the reproductive characteristics of bucks from the Saanen and Alpine breeds. Sperm concentration and motility were assessed using light microscopy, viability was determined using eosin-nigrosin staining, and morphological parameters were evaluated using the *Spermac Stain* method. DNA fragmentation was measured using the *Halosperm* kit. Artificial insemination of goats was conducted with fresh semen during natural estrus. Statistical analysis was performed using the *Graph Pad Prism* software. The results revealed that Alpine bucks exhibited significantly higher semen volume, sperm concentration, viability, and motility ( $P < 0.05$ ). No significant differences ( $P \geq 0.05$ ) were observed between the breeds regarding the number of spermatozoa with normal morphology and the rate of DNA fragmentation. Cryobiological analysis of spermatozoa from Saanen bucks suggested a higher cryoresistance compared to the Alpine breed. Following artificial insemination of goats, the pregnancy rate for the Saanen breed was 61.8%, which was twice as high as that observed in Alpine goats — 28.8% ( $P < 0.05$ ). These findings demonstrate significant differences in reproductive characteristics between Saanen and Alpine goats. Despite superior sperm characteristics, the pregnancy rate after artificial insemination was significantly lower in the Alpine breed compared to the Saanen breed. Consequently, it is crucial to consider these variations in essential reproductive characteristics when implementing breeding programs and employing reproductive biotechnology in animal husbandry to ensure their successful application and effectiveness.

**Key words:** sperm, reproductive characteristics, cryopreservation, pregnancy, goats, bucks, Saanen breed, Alpine breed



## Introduction

Breeding in livestock makes it possible to develop breeds of domestic animals that have high productive characteristics and allows to improve their genetic value through breeding programs and reproductive biotechnology [5, 16]. Intraspecies genetic differences between

breeds can affect not only productivity characteristics, such as milk yield and its quality [8], but also animal health, particularly fertility [15]. Saanen and Alpine breeds of goats belong to the same species *Capra aegagrus hircus* [1]. The Saanen goat breed is a Swiss breed and is widely used in dairy farming due to its ability to produce large quantities of high-quality milk.

A common feature of this breed is its adaptability to different environmental conditions. The Alpine goat breed, also known as the French Alpine or Alpine Chamois, is originated from the French Alps. Alpine goats are known for their milk production, adaptability, and endurance [17].

Sperm cryopreservation is widely used in animal breeding as one of the methods of assisted reproduction, because it allows for more efficient animal reproduction [7, 18]. Cryotolerance of spermatozoa depends on their initial morphological characteristics, such as size and shape, and functional characteristics, such as motility, DNA integrity, and membrane lipid composition, which are seasonally dependent [3; 11].

Considering the importance of these characteristics when applying assisted reproductive technologies and choosing the most promising ones for further breeding, the study of reproductive peculiarities of different goat breeds is an essential task. Therefore, the aim of our study was to compare the sperm reproductive characteristics of Saanen and Alpine breeds of bucks.

## Materials and methods

All manipulations with animals and their biological material were carried out according to the permission of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine (Protocol no. 1 from 28.01.2021) and in compliance with the main provisions of the Law of Ukraine “On Protection of Animals from Cruelty” (no. 3447-IV from 21.02.2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Ejaculates were obtained using an artificial vagina and a goat in estrus for attraction from four mature Saanen bucks (n=48) and three Alpine bucks (n=36) once a week during the breeding season (September-December) at the “Tetyana 2011” farm (Cherevky village, Kyiv region, Ukraine). All animals were kept under the same conditions and had the same nutrition [13].

The volume of semen was determined. The concentration and motility of spermatozoa were counted using a Makler chamber (*Sefi medical instrument*, Israel). Sperm viability was assessed in smears stained with eosin-nigrosin *VitalScreen (FertiPro)*, Belgium) smears under a light microscope ( $\times 400$ ). The number of spermatozoa with normal morphological parameters was counted under a light microscope with a magnification  $\times 1000$  in the smears, which were fixed and stained using the *Spermac Stain* kit (*FeriPro*, Belgium) according to the manufacturer's protocol. The level of DNA fragmentation was determined using the *Halosperm* kit (*Halotech*, Spain) according to the protocol provided by the manufacturer.

For the cryopreservation, sperm were isolated from the seminal plasma by centrifugation for 10 min at 200g, diluted with HEPES-based medium (*WASH, IVF Bioscience*, United Kingdom) supplemented with 10% glycerol

and 20% egg yolk to reach a final concentration of  $200 \times 10^6$  sperm/ml. The sperm suspension was equilibrated for 15 min at room temperature (25°C), loaded into 0.25 ml straws (*Minitube*, Germany), and equilibrated again for 2 h at 5°C, placed horizontally 4 cm above the level of liquid nitrogen for 15 min, and then plunged into liquid nitrogen. Thawing was performed on a water bath at 37°C for 30 sec. The supernatant containing the cryoprotectant was removed after centrifugation at 200g for 5 min with 2 ml of washing medium (*WASH, IVF Bioscience*, United Kingdom). Sperm motility and viability, morphological characteristics, and DNA fragmentation level were evaluated after cryopreservation.

To perform artificial insemination of Saanen (n=131) and Alpine (n=78) goats aged 2–3 years in natural estrus, the obtained fresh sperm after analysis mentioned above was diluted with *Andromed* diluent (*Minitube*, Germany) to achieve a final concentration of  $200 \times 10^6$  sperm/ml, loaded into 0.25 ml straws, and artificial insemination was performed using the cervical method. After 60 days, ultrasound diagnostics was performed to detect pregnancy.

Statistical analysis was performed using *Graph Pad Prism* software (*GraphPad Software*, USA). The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation for all parameters except those related to pregnancy after artificial insemination. The data were tested for normality of distribution using the Shapiro-Wilk test. To compare two samples, a non-parametric test was used to compare samples with non-normal distribution — the Mann-Whitney U-test, the difference was considered significant at  $P \leq 0.05$ . Fisher's exact test was used to compare the parameters related to pregnancy, the difference was considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results and discussion

Comparing the parameters of the fresh semen of the studied breeds, we found a significant difference between the following reproductive characteristics: sperm volume, concentration, sperm motility and viability (table 1).

Thus, the Alpine bucks had a significantly higher semen volume, sperm concentration, sperm motility and viability compared to the Saanen bucks ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the breeds in the normal morphology rate of spermatozoa and the sperm DNA fragmentation rate.

It is considered that semen volume and sperm concentration are not affected by season and feeding [20]. Sperm motility also does not depend on the diet of the bucks, but varies in different breeding seasons. Our results may indicate that despite the similar physiological functioning of the reproductive system of different breeds, the genetic characteristics of the breed have an impact on some semen characteristics. This is confirmed by a study conducted with three different breeds, which demonstrated that Alpine bucks had higher quantitative sperm parameters (sperm volume, sperm concentration) but lower

qualitative characteristics (sperm motility) compared to the same parameters for Saanen and Damascus breeds [6]. Similar to the results of our study, there was found no difference in sperm DNA fragmentation rate between the Zaraibi and Baladi goat breeds [19].

Analyzing the morphofunctional parameters of spermatozoa after cryopreservation, no significant difference was found between the two breeds as for the motility and viability of spermatozoa, the amount of morphologically normal spermatozoa, and the number of spermatozoa with fragmented DNA. However, considering the parameters of sperm before cryopreservation, it can be concluded that the cryotolerance of spermatozoa of the Saanen goats is higher, although the difference is not significant (table 2).

In this study, conducted during the breeding season, fresh semen was used to inseminate goats. However, during the non-breeding season, it is planned to use cryopreserved biomaterial.

To ensure a high fertilization rate after cryopreservation, spermatozoa must have a high cryotolerance. Our previous studies have shown that to achieve higher fertilization rate using cryopreserved sperm of Saanen goats, it is recommended to collect semen during the breeding season [2]. In general, sperm resistance to cryodamage is associated with seminal plasma proteins that provide protection against oxidative stress during cryopreservation [18]. In addition, better sperm cryotolerance is demonstrated when the translation of aquaporin proteins (AQP3, AQP7, AQP11) is upregulated, as they presumably facilitate the penetration of cryoprotectants into the cell during equilibration [14].

After the artificial insemination of goats, the pregnancy rate was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in Saanen goats and twice as high as in Alpine goats. There was no significant difference in the occurrence of pseudopregnancy, singleton and multifetal pregnancy between the studied breeds (table 3).

The pregnancy rate in small ruminants depends on both the male factor, i.e. semen parameters, and the female factor, i.e. follicular development, egg maturation, and hormonal regulation of endometrial development. It has been shown that the expression of genes responsible for follicular development and atresia differs in different goat breeds, and thus is genetically determined [21]. However, the results of other groups of scientists also highlight the influence of environmental conditions, such as husbandry, climate, and feeding, on the pregnancy rate [10]. The incidence of pseudo-pregnancy in our study was much lower (approx. 7%) than in a study conducted on Saanen goats in northeastern Brazil (approx. 30%) [9]. This may indicate that environmental conditions have a considerable impact on this parameter. This is confirmed by a study conducted on three breeds of goats, which found no correlation between the pseudopregnancy rate and genetic or phenotypic traits of goats, but revealed a link with out-of-season reproduction, when estrus stimulation is performed by administering hormones [4]. Regarding the occurrence of singleton and multifetal pregnancies, the results of our study are consistent with the research of a group of scientists who

**Table 1.** Fresh semen parameters of Saanen and Alpine bucks

Semen parameters	Breed	
	Saanen	Alpine
Semen volume, $\mu\text{l}$	850 $\pm$ 375	1575 $\pm$ 275*
Sperm concentration, $\times 10^9/\text{ml}$	1.7 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.2*
Sperm motility, %	80.4 $\pm$ 4.1	91.1 $\pm$ 3.1*
Sperm viability, %	88.3 $\pm$ 2.9	95.9 $\pm$ 3.9*
Sperm with normal morphology, %	93.4 $\pm$ 1.1	95.1 $\pm$ 0.9
Sperm DNA fragmentation rate, %	2.8 $\pm$ 0.16	3.1 $\pm$ 0.2

Note. Here and further \* — the difference is significant ( $P < 0.05$ ) compared to Saanen goats.

**Table 2.** Sperm parameters of Saanen and Alpine bucks after cryopreservation

Sperm parameters after cryopreservation	Breed	
	Saanen	Alpine
Sperm motility, %	65.5 $\pm$ 5.8	67.2 $\pm$ 6.8
Sperm viability, %	85.2 $\pm$ 5.1	83.2 $\pm$ 4.8
Sperm with normal morphology, %	86.9 $\pm$ 2.4	89.5 $\pm$ 3.4
Sperm DNA fragmentation rate, %	6.2 $\pm$ 1.9	7.1 $\pm$ 2.4

**Table 3.** Parameters related to pregnancy after artificial insemination of goats in natural estrus with fresh semen of Saanen and Alpine bucks

Parameter	Breed	
	Saanen	Alpine
Pregnancy rate, % (n)	61.8 (81/131)	28.2 (22/78)*
Pseudopregnancy rate, % (n)	6.9 (9/131)	7.7 (6/78)
Singleton pregnancy rate, % (n)	46.9 (38/81)	40.9 (9/22)
Multifetal pregnancy rate, % (n)	53.1 (43/81)	59.1 (13/22)

showed the effect of hormonal stimulation on increasing the frequency of multifetal pregnancies, but did not find any difference for this parameter between the three breeds after artificial insemination in natural estrus [12].

Thus, the study of breed-specific reproductive characteristics allows us to identify specific genetic features of breeds that affect the effectiveness of reproductive biotechnology in livestock. This provides an opportunity to select males and females for further breeding, improve the genetic potential of the herd, and develop effective breeding programs.

The reproductive characteristics of spermatozoa of Saanen and Alpine goats differ significantly. Despite the better characteristics of the semen, the pregnancy rate for Alpine breed after artificial insemination was significantly lower than for Saanen. The spermatozoa of Saanen goats are characterized by a higher survival rate after cryopreservation compared to the same characteristic of the Alpine breed, which may have an impact on the effectiveness of artificial insemination with cryopreserved sperm. For the successful implementation of breeding programs and the effective use of reproductive biotechnology in animal husbandry, it is important to take into account the breed-specific differences in the main reproductive characteristics.

## References

1. Amills M, Capote J, Tosser-Klopp G. Goat domestication and breeding: a jigsaw of historical, biological and molecular data with missing pieces. *Anim. Genet.* 2017; 48 (6): 631–644. DOI: 10.1111/age.12598.
2. Bogdaniuk A, Garkavii V, Petrushko M. Seasonal variability in cryoresistance of Saanen goats spermatozoa and reproductive characteristics. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2022; 32 (1): 34–43. DOI: 10.15407/cryo32.01.034. (in Ukrainian)
3. Bogdaniuk AO, Yurchuk TO, Petrushko MP. Seasonal differences in sperm characteristics and the level of DNA fragmentation in fresh and cryopreserved sperm of Saanen goats. *Cytol. Genet.* 2022; 56 (5): 410–416. DOI: 10.3103/S0095452722050036.
4. Desire S, Mucha S, Coffey M, Mrode R, Broadbent J, Conington J. Pseudopregnancy and aseasone breeding in dairy goats: genetic basis of fertility and impact on lifetime productivity. *Anim.* 2018; 12 (9): 1799–1806. DOI: 10.1017/S1751731117003056.
5. Harris DL, Newman S. Breeding for profit: synergism between genetic improvement and livestock production (a review). *J. Anim. Sci.* 1994; 72 (8): 2178–2200. DOI: 10.2527/1994.7282178x.
6. Karagiannidis A, Varsakeli S, Karatzas G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenol.* 2000; 53 (6): 1285–1293. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00272-7.
7. Kopeika EF, Petrushko MP, Piniayev VI, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Mikson KB, Butskiy KI, Hapon HO, Puhovkin AY. Cryopreservation of reproductive cells and embryos of laboratory, agricultural and wild animals. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2019; 29 (1): 3–18. DOI: 10.15407/cryo29.01.003.
8. Lim DH, Mayakrishnan V, Lee HJ, Ki KS, Kim TI, Kim Y. A comparative study on milk composition of Jersey and Holstein dairy cows during the early lactation. *J. Anim. Sci. Technol.* 2020; 62 (4): 565–576. DOI: 10.5187/jast.2020.62.4.565.
9. Lopes Júnior ES, Cruz JF, Teixeira DIA, Lima Verde JB, Paula NRO, Rondina D, Freitas VJF. Pseudopregnancy in Saanen goats (*Capra hircus*) raised in Northeast Brazil. *Vet. Res. Commun.* 2004; 28 (2): 119–125. DOI: 10.1023/B:VERC.0000012112.79820.e0.
10. Luo J, Wang W, Sun S. Research advances in reproduction for dairy goats. *As. Australas. J. Anim. Sci.* 2019; 32 (8): 1284–1295. DOI: 10.5713/ajas.19.0486.
11. Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants. *Biopreserv. Biobank.* 2019; 17 (2): 171–182. DOI: 10.1089/bio.2018.0113.
12. Mohammed Muayad TA, Haniza MZH, Husni I. Reproductive performance of different goat breeds in Malaysia. *Indian J. Anim. Res.* 2017; 53 (1): 24–27. DOI: 10.18805/ijar.v0i01OF.7002.
13. Pirova L, Syvyk T. Technology of production of small ruminants products: methodical recommendations and workbook for practical classes of students of the Faculty of Biology and Technology of full-time and part-time forms of study of the Bachelor educational degree in speciality 204 "Technology of production and processing of livestock products" under the credit transfer system of educational process organization. Bila Tserkva, 2018: 58–59. Available at: <https://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/1389>. (in Ukrainian)
14. Prieto-Martínez N, Vilagran I, Morató R, Rivera del Álamo MM, Rodríguez-Gil JE, Bonet S, Yeste M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology.* 2017; 5 (6): 1153–1164. DOI: 10.1111/andr.12410.
15. Rhone JA, Waldron DF, Herring AD. Performance of Boer-Spanish and Spanish goats in Texas I: Body weights, fertility, prolificacy, and number of kids weaned. *J. Anim. Sci.* 2013; 91 (10): 4679–4683. DOI: 10.2527/jas.2013-6227.
16. Sharan MM, Salyha YT. The status and prospects of reproductive biotechnology application to increase productivity in cattle breeding. *Biol. Tvarin.* 2022; 24 (3): 44–50. DOI: 10.15407/animbiol24.03.044. (in Ukrainian)
17. Shelton M. Reproduction and breeding of goats. *J. Dairy Sci.* 1978; 61 (7): 994–1010. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7.
18. Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 2022; 246: 106904. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904.
19. Zaghoul HK, El-Maghraby MM, El badawy AA, Yousif AIA. Characteristics, yield, flow cytometer, DNA fragmentation, and comet assay parameters of goat spermatozoa in semen of Zaraibi and Baladi bucks at young and old ages. *J. Anim. Poultry Prod.* 2021; 12 (9): 305–314. DOI: 10.21608/jappmu.2021.95942.1021.
20. Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenol.* 2009; 71 (8): 1316–1325. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.007.
21. Zi XD, Hu L, Lu JY, Liu S, Zheng YC. Comparison of the sequences and expression levels of genes related to follicular development and atresia between prolific and nonprolific goat breeds. *Vet. Med. Sci.* 2020; 6 (2): 187–195. DOI: 10.1002/vms3.225.

## Репродуктивні характеристики ців зааненської та альпійської порід

А. О. Богданюк<sup>1,2</sup>, В. В. Гаркавий<sup>3</sup>, М. П. Петрушко<sup>1</sup>  
baa1995ua@gmail.com

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна

<sup>2</sup>ТОВ «Інститут Сучасних Ветеринарних Технологій», вул. Шевченка, 27, с. Черевки, Броварський р-н, Київська обл., 07624, Україна

<sup>3</sup>ФГ «Тетяна 2011», вул. Шевченка, 1М, с. Черевки, Броварський р-н, Київська обл., Україна, 07624

Внутрішньовидова генетична різниця між породами може впливати не тільки на характеристики продуктивності — наприклад, на кількість та якість надою, але й на здоров'я тварин, зокрема їхню фертильність. Мета дослідження — порівняти репродуктивні характеристики зааненської та альпійської порід. Концентрацію та рухливість сперматозоїдів визначали за допомогою світлової мікроскопії; життєздатність — у забарвлених еозин-нігрозином; морфологічні параметри — методом *Spermac Stain*, визначення рівня фрагментації ДНК проводили з використанням набору *Halosperm*. Штучне осіменіння кіз проводили нативним еякулятом в еструсі самиць. Статистичну обробку даних виконували у програмі *Graph Pad Prism*. Встановлено, що ців альпійської породи мали статистично більший об'єм еякуляту, концентрацію сперматозоїдів, життєздатність та рухливість ( $P < 0,05$ ). Не було виявлено статистично вірогідної різниці ( $P \geq 0,05$ ) між породами у кількості сперматозоїдів з нормальними морфологічними характеристиками та рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів. Кріобіологічні характеристики сперматозоїдів ців зааненської породи мали тенденцію до більшої кріорезистентності. Після штучного осіменіння кіз частота вагітностей у самок зааненської породи склала 61,8%, що вдвічі перевищувало частоту настання вагітності у кіз альпійської породи — 28,8% ( $P < 0,05$ ). Репродуктивні характеристики сперматозоїдів ців зааненської та альпійської порід статистично відрізняються. Незважаючи на кращі характеристики еякуляту, частота настання вагітності самиць альпійської породи після штучного осіменіння була вірогідно нижчою, ніж зааненської породи. Для успішного впровадження програм розмноження та ефективного використання біотехнологій у тваринництві важливим є комплексне врахування внутрішньовидової різниці основних репродуктивних характеристик.

**Ключові слова:** сперматозоїди, репродуктивні характеристики, кріоконсервування, вагітність, кози, ців, зааненська порода, альпійська порода



## Кінематичні показники та дихальна активність деконсервованих сперміїв баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування

О. М. Шаран  
oshaom737@gmail.com



Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького,  
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

### ORCID:

O.M. Sharan <https://orcid.org/0000-0002-6193-8727>

### Authors' Contributions:

**SOM:** conceptualization, investigation, methodology, statistics, formal analysis, visualization, writing — original draft, review and editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

During the scientific and experimental study, all international, national and/or institutional principles of animal care and use, in particular "Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes" were followed.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Метою роботи було з'ясувати вплив додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів на кінематичні показники та дихальну активність деконсервованих сперміїв. Експеримент проводили на шести клінічно здорових баранах-плідниках породи тексель віком 2–4 роки. Після отримання еякуляти баранів оцінювали за об'ємом, концентрацією та рухливістю сперміїв і ділили на контрольну і дослідні групи. Контрольні зразки сперми розбавляли лактозо-жовтково-тріс-цитратогліцериним середовищем (ЛЖТЦГС). У дослідних зразках сперми баранів до середовища додавали наноцитрати мікроелементів у дозах: Zn і Mn — 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л, Cu — 1,25, 2,5, і 3,75 мкг/л. Розріджену сперму фасували в соломинки, еквілібрували впродовж 2,5 год і заморожували. Після розморожування сперми визначали рухливість, морфологічні ушкодження сперміїв, кінематичні параметри руху сперміїв (CASA), дихальну та відновну активність сперми. Встановлено дозозалежну дію наноцитратів Mn, Zn та Cu за додавання їх до ЛЖТЦГС. За додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,05-0,01$ ) підвищується активність деконсервованих сперміїв баранів, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність сперміїв у розмороженій спермі баранів. Додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,05-0,01$ ) зменшує кількість дегенерованих сперміїв та з ушкодженими акросомами, а за додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно збільшуються морфологічні порушення статевих клітин. Додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,01-0,001$ ) підвищує кінематичні параметри деконсервованих сперміїв баранів, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує показники руху статевих клітин. За додавання наноцитратів Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищується дихальна та інгібується відновна активність деконсервованої сперми. Додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС у зростаючих дозах знижує дихальну та підвищує відновну активність розмороженої сперми баранів.

**Ключові слова:** баран, сперма, наноцитрат Mn, Zn, Cu, кінематичні показники, рухливість, дихальна активність



## Вступ

Штучне осіменіння є одним із сучасних методів репродуктивної біотехнології, здатним суттєво підвищити генетичну цінність та адаптаційні властивості овець за постійної наявності кріоконсервованої сперми плідників [23]. У зв'язку з цим, в останні роки кріоконсервацію сперми баранів розглядають як один із методів підвищення продуктивності овець [1].

Експериментально встановлено, що технологічний процес кріоконсервування сперми провокує ультраструктурні, біохімічні та функціональні зміни сперматозоїдів [32]. Водночас плазма і акросома спермія мають високу криочутливість, що призводить до збільшення проникності клітинних мембран і виникнення порушень рухливості статевих клітин та їхньої морфології [33, 8]. Ушкодження плазматичних мембран супроводжується витоком ензимів, зокрема тих, які беруть безпосередню участь у процесах запліднення. Крім того, руйнуються мітохондрії — основні енергогенеруючі органели статевих клітин [30].

З метою забезпечення надійного захисту спермій від несприятливих чинників за дії наднизьких температур використовують різні синтетичні середовища для кріоконсервування, склад яких визначає ефективність заморожування [41].

Мікроелементи Zn, Mn та Cu відіграють важливу роль у регулюванні метаболічних процесів у сперміях, оскільки є кофакторами ензимів гліколізу, дихального ланцюга мітохондрій та антиоксидантного захисту, а також забезпечують енергетичні потреби й утилізацію цитотоксичних метаболітів клітин [27]. Зокрема, Цинк входить до активних центрів багатьох ензимів гліколізу й пентозофосфатного шляху окиснення глюкози, Купрум забезпечує активність ензимів дихального ланцюга і протеїназ, а Манган — ензимів циклу Кребса. Крім того, вказані мікроелементи входять до складу першої ланки ензиматичного антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази (СОД), тобто є кофакторами ензиму, що перетворює  $O_2^-$  і гальмує утворення активних форм Оксигену (АФО) [5, 19]. Встановлено, що СОД у сперміях наявна у трьох генетично зумовлених ізоформах, які містять у каталітичному центрі йони: Mn — мітохондріальній; Zn і Cu — цитоплазматичній і екзоцелюлярній [37, 20]. У цих дослідженнях доведено, що від активності вказаного ензиму та співвідношення його ізоформ, вмісту Купруму залежить виживання і, відповідно, запліднювальна здатність статевих клітин.

У процесі підготовки еякулятів до кріоконсервування зменшується концентрація вказаних йонів, що призводить до зниження активності ензимів та, як наслідок, порушує процес трансформації субстратів і ресинтез АТФ. Тому для збереження високих фізіологічних характеристик і запліднювальної здатності спермій до складу розріджувачів еякулятів додають мікроелементи. Проте використання неорганічних солей мікроелементів у складі розріджувачів мало-

ефективне, що зумовлено нетривалим їх контактом зі статевими клітинами після розрідження сперми, низькою проникливістю через мембрани та здатністю залучатись у метаболізм [31].

Недоліки використання неорганічних солей мікроелементів у розріджувачах еякулятів можна усунути застосуванням органічних форм металів, зокрема наноцитратів, що дозволить забезпечити їх залучення в обмінні процеси спермій [17, 22].

Нещодавно в Україні за допомогою нанотехнології дослідниками отримано надчисті карбоксилати основних харчових кислот і біотичних елементів (Zn, Mg, S, Mn, Fe, Cu, Co, Mo, Cr, I, Se), що стало основою для розроблення нового напрямку збагачення кормових добавок мікроелементами у вигляді цитратів біотичних елементів, одержаних за допомогою аквананотехнології [14, 35]. В Інституті біології тварин НААН проведено дослідження із з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів дії наноаквацитратів мікроелементів в організмі тварин і визначено їх токсичні дози, які виявились у 6–8 разів нижчими від їхніх мінеральних солей [44, 13]. Також проведено експерименти з вивчення впливу додавання наносукцинату Zn, Mn та Cu до розріджувачів сперми бугаїв, що допомогло з'ясувати позитивну дію наносукцинату мангану та цинку на якісні параметри спермій [16, 49]. У зв'язку з наведеним вище, доцільно дослідити вплив наносукцинату та наноцитрату Mn, Zn та Cu у складі розріджувачів сперми на якісні показники спермій баранів. Тому метою дослідження було з'ясувати вплив додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування сперми на кінетичні показники та дихальну активність деконсервованих спермій баранів.

## Матеріали і методи

Дослідження проведено на шести клінічно здорових баранах породи тексель віком 2–4 роки, які утримували у трьох клітках по два самці у кожній. Сперму від баранів отримували за допомогою штучної вагіни *Minitube* і кожний еякулят оцінювали окремо. Свіжотримані еякуляти оцінювали за об'ємом, концентрацією спермій, загальною кількістю спермій у еякуляті, їхньою рухливістю, відсотком спермій з прямолінійно-поступальним рухом за загальноприйнятими методиками. Кожен еякулят ділили на контрольну і дослідні групи. Для розбавлення використовували сперму баранів з рухливістю не нижче 8 балів і концентрацією не менше 2,5 млрд/мл. Після оцінювання сперму витримували за кімнатної температури 15 хв, потім контрольні зразки одномоментно розбавляли лактозо-жовтково-тріс-цитрато-гліцериним середовищем (ЛЖТЦГС) у співвідношенні 1:2–1:3, впливаючи середовище у сперму з розрахунком одержати у дозі деконсервованої сперми не менше 60–80 млн. спермій з прямолінійно-поступальним рухом.

ЛЖТЦГС готували у два етапи. Спочатку 13 г лактози розчиняли в 100 мл дистильованої води за температури 90°C, а після охолодження до 40°C до розчину додавали 30 мл яєчного жовтка. Далі суміш ретельно перемішували за допомогою магнітної мішалки до отримання однорідної суспензії. Потім у 100 мл цієї суспензії по чергово розчиняли трис (0,6 г), лимонну кислоту (0,3 г) і насамкінець додавали 9 мл гліцерину.

У дослідних зразках сперми баранів до ЛЖТЦГС додавали наноцитрати мікроелементів у дозах: Zn і Mn — 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л, Cu — 1,25, 2,5 і 3,75 мкг/л. Наноцитрати Mn, Zn та Cu отримані методом ерозійно-вибухової аквананотехнології від ТОВ «Нанотехнології та наноматеріали» (м. Київ) [18].

Розбавлену сперму за допомогою спеціального обладнання (*Minitube*, Німеччина) фасували у соломинки і охолоджували протягом 2,5 год за температури +2...+4°C. Після цього соломинки зі спермою поміщали в пари азоту на 30 хв, потім опускали в рідкий азот. Після заморожування у кожній серії сперми контролювали рухливість спермійів. Для цього розморожували 1–2 соломинки на водяній бані за температури 40–42°C впродовж 20 сек. Сперму вважали придатною для зберігання і використання за наявності у ній не менше 40% спермійів з прямолінійно-поступальним рухом.

Після розморожування визначали рухливість, морфологічні порушення, дихальну та відновну активність спермійів. Життєздатність статевих клітин, морфологічні порушення та відсоток дегенеративних спермійів визначали комп'ютеризованою системою CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) з активуванням модуля *Sperm Vision* [48].

Інтенсивність поглинання кисню спермою (нгатом  $O \div 0,1$  мл сперми  $\times$  хв) визначали полярографічно з використанням електрода Кларка, вмонтованого у термостатовану комірку (38,5°C) об'ємом 1 мл, з автоматичною реєстрацією перебігу процесу, а відновну здатність — теж потенціометрично (mV/хв  $\times$  0,1 мл сперми) за методикою, описаною у довіднику (2012) [45].

Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і середньоквадратичну помилку ( $M \pm m$ ). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакету програм *Microsoft Office Excel 2010*.

## Результати

Експериментально встановлено, що дія наноцитратів мікроелементів у складі середовища для кріоконсервування сперми на якісні показники деконсервованої сперми баранів значно залежала від дози елемента. Додавання наноцитрату Mn у дозі 2,5 мкг/л підвищило активність деконсервованих спермійів баранів лише на 5,6% порівняно з контролем (табл. 1). Водночас за додавання наноцитрату Mn у дозі 5,0 мкг/л активність спермійів підвищилася на 22,2% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози нано-

**Таблиця 1.** Активність та морфологічні порушення спермійів баранів за додавання наноцитрату мікроелементів ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 1.** Activity and morphological disorders of rams' sperm after the addition of trace elements nanocitrate ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л Micronutrient nanocitrate, dose, $\mu\text{g/l}$	Активність спермійів, % Sperm motility, %	Дегенеровані спермійів, % Degenerate sperm, %	Спермійів з ушкодженою акросомою, % Sperm with damaged acrosome, %	
Mn <sup>2+</sup>	2,5	47,5 $\pm$ 1,12	12,0 $\pm$ 1,41	20,5 $\pm$ 1,54
	5,0	55,0 $\pm$ 1,83*	10,3 $\pm$ 0,88*	16,5 $\pm$ 1,26*
	7,5	44,2 $\pm$ 1,54	14,2 $\pm$ 1,35	21,0 $\pm$ 1,24
Zn <sup>2+</sup>	2,5	50,8 $\pm$ 1,54*	12,5 $\pm$ 1,12	19,5 $\pm$ 0,99*
	5,0	56,7 $\pm$ 1,67**	9,5 $\pm$ 0,67**	15,5 $\pm$ 1,26*
	7,5	46,7 $\pm$ 2,11	12,8 $\pm$ 0,79	20,7 $\pm$ 1,28
Cu <sup>2+</sup>	1,25	47,3 $\pm$ 2,67	14,5 $\pm$ 1,12	20,3 $\pm$ 1,67*
	2,5	39,2 $\pm$ 3,01	19,0 $\pm$ 1,24*	27,5 $\pm$ 1,26
	3,75	35,0 $\pm$ 1,83*	18,2 $\pm$ 0,65*	28,5 $\pm$ 2,24**
Контроль Control		45,0 $\pm$ 1,83	15,0 $\pm$ 1,07	23,3 $\pm$ 1,54

*Примітка.* У цій і наступних таблицях \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

*Note.* In this and the following tables \* —  $P < 0.05$ , \*\* —  $P < 0.01$ , \*\*\* —  $P < 0.001$  compared with the control group.

цитрату мангану до 7,5 мкг/л призвело до зниження активності спермійів баранів до рівня контролю.

Додавання наноцитрату Mn до середовища для кріоконсервування сперми баранів дозозалежно впливало на ушкодження спермійів після розморожування. Якщо у контрольній групі деконсервованої сперми виявлено 13,2% дегенерованих спермійів та 25,3% спермійів з ушкодженою акросомою, то додавання до ЛЖТЦГС наноцитрату Mn у дозі 2,5 мкг/л знизило відсоток дегенерованих спермійів у розмороженій спермі на 20,0%, а в дозі 5,0 мкг/л — на 31,4% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Вища доза наноцитрату мангану (7,5 мкг/л) знизила відсоток денерованих спермійів лише на 5,3%.

Подібні зміни встановлено і за кількістю спермійів з ушкодженою акросомою у деконсервованій спермі баранів. Додавання до середовища для кріоконсервування сперми баранів 2,5 мкг/л наноцитрату Mn знизило відсоток спермійів з ушкодженою акросомою на 12,0%, збільшення дози елемента до 5,0 мкг/л призвело до зниження кількості спермійів з ушкодженою акросомою на 29,2% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози наноцитрату Mn до 7,5 мкг/л знизило ушкодження акросом лише на 9,9% порівняно з контролем.

Більш виражені зміни активності та морфологічних порушень розморожених спермійів баранів встановлено і за додавання наноцитрату цинку до ЛЖТЦГС (табл. 1). Зокрема, активність спермійів за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn зросла, відповідно, на 12,9% ( $P < 0,05$ ), 26,0% ( $P < 0,01$ ) та 3,8% порівняно з контролем. Водночас відсоток спермійів дегенеративних та з ушкодженням акросоми у деконсервованій спермі баранів суттєво знижувалися за додавання наноцитрату цинку до середовища для кріоконсервування. За додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn відсоток

дегенерованих спермійв зменшився, відповідно, на 16,7%, 36,7% ( $P < 0,01$ ) та 14,7% порівняно з контролем. Аналогічно, додавання наноцитрату цинку до ЛЖТЦГС у дозах 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л знизив відсоток спермійв баранів з ушкодженою акросомою на 16,3% ( $P < 0,05$ ), 33,5% ( $P < 0,05$ ) та 11,2% відповідно порівняно з контролем.

Додавання наноцитрату купруму до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило дещо інші зміни активності та морфологічних порушень спермійв (табл. 1). Зокрема, зі збільшенням дози наноцитрату Cu активність спермійв у деконсервованій спермі баранів знижувалася. Додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму призвело до підвищення активності спермійв у розмороженій спермі на 5,1%. Подальше підвищення дози наноцитрату Cu до 2,5 та 3,75 мкг/л спричинило зниження активності спермійв баранів, відповідно, на 12,9 та 35,0% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Водночас зі збільшенням дози наноцитрату купруму збільшується кількість морфологічних порушень статевих клітин — додавання 2,5 і 3,75 мкг/л наноцитрату Cu збільшило відсоток дегенерованих спермійв у деконсервованій спермі баранів, відповідно, на 26,7% ( $P < 0,05$ ) та 21,3% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Додавання наноцитрату купруму у найнижчій дозі 1,25 мкг/л призвело до незначного зменшення кількості дегенерованих спермійв — на 3,4% порівняно з контролем. Аналогічно, відсоток спермійв з ушкодженням акросоми за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату Cu знизився на 12,9%, а за вищих доз 2,5 і 3,75 мкг/л наноцитрату купруму — навпаки, підвищився на 18,0 і 22,3% ( $P < 0,01$ ) відповідно порівняно з контролем.

**Таблиця 2.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату мангану, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 2.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of manganese nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату мангану, мкг/л Dose of manganese nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	2,5	5,0	7,5	
VCL	149,8±4,54**	157,8±4,41**	145,2,8±2,37	138,5±4,27
VAP	74,2±2,12**	80,5±2,01**	64,2±2,39	64,5±2,81
VSL	62,5±1,57**	71,2±2,89***	58,3±2,95	54,2±2,04
LIN, %	41,9±1,39	51,1±1,25***	44,6±2,72	39,2±1,58
STR, %	84,4±2,12	88,5±3,45	91,0±3,68*	84,4±3,11
WOB, %	49,7±2,03	51,1±1,25*	44,6±2,72	46,8±2,37

**Таблиця 4.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату купруму, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 4.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of cuprum nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату купруму, мкг/л Dose of cuprum nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	1,25	2,5	3,75	
VCL	142,2±4,26	135,5±5,95	124,2±4,37**	138,5±4,27
VAP	69,2±2,12*	60,2±2,15	51,3±1,71**	64,5±2,81
VSL	54,0±2,27	46,3±3,58**	40,2±3,15**	54,2±2,04
LIN, %	38,1±1,63	34,3±2,65*	32,5±2,45*	39,2±1,58
STR, %	78,2±3,11	77,1±5,88	78,2±5,24	84,4±3,11
WOB, %	52,5 ± 1,02	52,9±2,26	47,9±2,64	46,8±2,37

Дослідженням рухливості спермійв комп'ютеризованою системою CASA встановлено зміни кінематичних показників спермійв за використання наноцитратів Mn, Zn і Cu у складі середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату мангану підвищило швидкість спермія при криволінійному русі (VCL) на 8,2% ( $P < 0,01$ ), швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (VAP) — на 15,0% ( $P < 0,01$ ), а швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) — на 15,3% ( $P < 0,01$ ) (табл. 2).

Збільшення дози наноцитрату Mn до 5,0 мкг/л забезпечило найбільше зростання кінематичних показників деконсервованих спермійв: VCL — на 13,9% ( $P < 0,01$ ), VAP — на 24,8% ( $P < 0,01$ ) і VSL — на 31,4% ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем. За додавання до ЛЖТЦГС наноцитрату Mn у найвищій дозі 7,5 мкг/л зростання кінематичних показників розморожених спермійв баранів було незначним: VCL — на 4,8%, VAP — на 0,5% і VSL — на 7,6% порівняно з контролем.

Вищі значення динамічних показників спермійв баранів за дії наноцитрату Mn призвели до підвищення коефіцієнтів їхнього руху, проте абсолютні їх значення були незначними. Зокрема, ступінь лінійності (LIN) спермійв баранів за додавання наноцитрату мангану у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л мав вищі значення від контролю, відповідно, на 6,9%, 30,4 ( $P < 0,001$ ) та 13,8%. Зростання ступеня відхилення (WOB) руху деконсервованих спермійв баранів було незначним — відповідно, на 3,5%, 4,1 та 4,2% порівняно з контролем.

**Таблиця 3.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату цинку, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 3.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of zinc nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату цинку, мкг/л Dose of zinc nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	2,5	5,0	7,5	
VCL	150,2±4,67	162,5±5,95**	145,5±4,40	138,5±4,27
VAP	74,3±2,12**	80,2±1,92**	65,7±1,82	64,5±2,81
VSL	64,7±2,11***	71,7±3,58***	58,5 ± 2,55	54,2±2,04
LIN, %	43,1±1,27	44,5±2,84	40,3±1,86	39,2±1,58
STR, %	87,2±3,08	89,2±3,81	89,1±2,79	84,4±3,11
WOB, %	49,6±1,21	49,6±1,73	45,4±2,04	46,8±2,37

*Примітка.* У табл. 2–4 VCL — швидкість спермія при криволінійному русі, VAP — швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху, VSL — швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії, LIN — ступінь лінійності спермійв, STR — ступінь прямолінійності руху спермійв, WOB — ступінь відхилення руху спермійв.  
*Note.* In tables 2–4 VCL means sperm velocity during curvilinear movement, VAP — sperm head advancement velocity along the average trajectory, VSL — rectilinear movement velocity of the sperm head along the straight line between the trajectory initial and final points, LIN — sperm linearity level, STR — sperm movement rectilinearity level, WOB — sperm movement deviation level.

Ступінь прямолинійності руху сперміїв баранів (STR) за додавання 2,5 і 5,0 мкг/л наноцитрату Mn був вищий, відповідно, на 4,9 та 7,8% порівняно з контролем, а за дози 7,5 мкг/л мав аналогічне значення з контролем.

Таку ж закономірність встановлено і за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату цинку спричинило зростання кінематичних показників розморожених сперміїв: VCL — на 8,3%, VAP — на 13,8% ( $P < 0,01$ ) та VSL — на 19,4% ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем (табл. 3).

Найбільшу різницю кінематичних показників сперміїв баранів дослідних груп порівняно з контролем встановлено за додавання 5,0 мкг/л наноцитрату Zn: VCL — на 17,3% ( $P < 0,01$ ), VAP — на 24,3% ( $P < 0,01$ ) та VSL — на 32,3% ( $P < 0,001$ ). Збільшення дози наноцитрату цинку до 7,5 мкг/л спричинило зниження кінематичних показників сперміїв у деконсервованій спермі баранів. Значення криволінійної швидкості (VCL), середньої швидкості (VAP) та прямолинійної швидкості (VSL) руху сперміїв баранів були вищими від контролю, відповідно, на 5,1%, 1,9 та 7,9%.

Зростання кінематичних показників руху деконсервованих сперміїв баранів під впливом наноцитрату Zn спричинило збільшення коефіцієнтів рухливості. Зокрема, ступінь лінійності (LIN) сперміїв баранів за додавання наноцитрату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л був вищим від контролю на 9,9%, 13,5% та 2,8% відповідно.

Зростання ступеня прямолинійності руху сперміїв баранів (STR) було незначним — відповідно, на 3,3%, 5,7 та 5,6% порівняно з контролем. Аналогічно, ступінь відхилення (WOB) руху деконсервованих сперміїв баранів за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn був вищим на 6,0%, 6,0 і 3,0% відповідно порівняно з контролем.

Додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС призвело до інших змін динамічних показників сперміїв баранів після розморожування. За додавання 2,5 мкг/л наноцитрату купруму кінематичні показники сперміїв були на рівні контролю або дещо його перевищували: VCL і VAP були вищими, відповідно, на 2,7 і 10,3% ( $P < 0,05$ ), а VSL майже не відрізнявся від контрольного значення (табл. 4).

Додавання вищих доз наноцитрату Cu призвело до зниження динамічних параметрів сперміїв баранів після деконсервування. За додавання 2,5 мкг/л наноцитрату купруму показники руху сперміїв VCL, VAP і VSL були нижчими від контролю на 2,2%, 6,7 та 14,6% відповідно ( $P < 0,01$ ). Подальше збільшення дози наноцитрату Cu до 3,75 мкг/л призвело до вірогідного зниження всіх досліджуваних параметрів руху сперміїв: VCL, VAP і VSL — відповідно, на 10,3%, 20,5 та 25,8% ( $P < 0,01-0,001$ ).

Зменшення значень кінематичних параметрів деконсервованих сперміїв під впливом наноцитрату Cu спричинило зниження коефіцієнтів рухливості. Ступінь лінійності (LIN) сперміїв баранів за додавання

**Таблиця 5.** Дихальна і відновна активність розмороженої сперми баранів за додавання наноцитратів мікроелементів ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 5.** Oxidation and reduction activity of thawed ram sperm after the addition of nanocitrates of trace elements ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л Micronutrient nanocitrate, dose, $\mu\text{g/l}$	Дихальна активність, нг-атом $\text{O}_2/0,1 \text{ мл} \times \text{хв}$ Oxidation processes, ng-atom $\text{O}_2/0,1 \text{ ml} \times \text{min}$	Відновна активність, мВ/0,1 мл×хв Reduction processes, mV/0.1 ml×min	
Mn <sup>2+</sup>	2,5	2,30±0,13	0,18±0,012
	5,0	2,60±0,11*	0,16±0,009*
	7,5	2,40±0,12	0,20±0,012
Zn <sup>2+</sup>	2,5	2,38±0,12	0,19±0,009
	5,0	2,93±0,13*	0,15±0,014*
	7,5	2,50±0,14	0,18±0,011
Cu <sup>2+</sup>	1,25	2,42±0,11	0,19 ±0,010
	2,5	2,03±0,13	0,23±0,02*
	3,75	1,80±0,13*	0,38±0,024***
Контроль Control		2,20±0,15	0,20±0,013

наноцитрату купруму в дозах 1,25, 2,5 та 3,75 мкг/л був нижчим від контролю на 2,8%, 12,5% ( $P < 0,05$ ) та 17,1% ( $P < 0,05$ ) відповідно.

Зниження ступеня прямолинійності руху сперміїв баранів (STR) було дещо меншим — відповідно, на 7,3%, 8,7 та 7,3% порівняно з контролем. За ступенем відхилення (WOB) руху деконсервованих сперміїв баранів зменшення становило, порівняно з контролем, 12,2%, 13,0 та 2,4% відповідно.

У дослідженні інтенсивності споживання кисню сперміями встановлено зміни дихальної та відновної активності деконсервованої сперми баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до ЛЖТЦГС. Додавання наноцитрату мангану у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л призвело до незначного зростання дихальної активності сперми баранів — відповідно, на 4,5 і 9,1% порівняно з контролем (табл. 5). Водночас за додавання 5 мкг/л наноцитрату Mn дихальна активність сперми баранів була максимально вищою від контролю — на 18,2% ( $P < 0,05$ ).

Протилежну закономірність спостерігали за відновною активністю деконсервованої сперми баранів під впливом наноцитрату мангану. Зокрема, за додавання наноцитрату Mn спостерігали зниження відновної активності сперми порівняно з контролем: у дозі 2,5 мкг/л — на 10,0%, 5,0 мкг/л — 20,0% ( $P < 0,05$ ), а в дозі 7,5 мкг/л вона не відрізнялася від контрольного значення.

Подібну тенденцію щодо змін дихальної та відновної активності розмороженої сперми баранів встановлено і за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування. Додавання 5,0 мкг/л наноцитрату цинку спричинило найбільше зростання дихальної активності сперми — на 33,2% ( $P < 0,001$ ) з одночасним зниженням відновної активності на 25,0% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. За додавання наноцитрату Zn у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л встановлено підвищення дихальної активності сперми баранів, відповідно, на 8,2% та 13,6% і зниження відновної активності, відповідно, на 5,0% та 10,0%.

Додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС спричинило дещо інші зміни споживання кисню у деконсервованій спермі баранів — збільшення дози знижує дихальну активність та підвищує відновну активність. Зокрема, за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму дихальна активність сперми баранів була вищою на 10,0%, а відновна активність — нижчою на 5,0%, ніж контрольні значення. Додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Cu призводить до зниження дихальної та підвищення відновної активності розмороженої сперми баранів, відповідно, на 7,7% та 50,0% ( $P < 0,01$ ), а в дозі 3,75 мкг/л дихальна активність була меншою на 18,2% ( $P < 0,01$ ), а відновна активність — більшою на 90,0% ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем.

## Обговорення

Використання заморожено-відталого сперми баранів має важливе значення в сучасних методах розмноження овець, тому кріоконсервування є важливим інструментом для репродуктивних технологій [2]. Відомо, що розріджувачі, методи розведення-охолодження-заморожування та розморожування відіграють важливу роль в успіху кріоконсервації сперми баранів [40]. Для підтримання високих фізіологічних характеристик спермій до складу розріджувачів еякулятів додають мікроелементи. Водночас літературні дані вказують на негативний вплив надлишку мікроелементів на фізіологічні характеристики і запліднювальну здатність спермій [34, 46]. За надмірної кількості окремих елементів можливе порушення функцій мітохондрій, що призводить до зниження фізіологічних характеристик і запліднювальної здатності спермій [24].

З огляду на вказане вище, багато авторів проводять дослідження з впливу на якість спермій ссавців металів у вигляді нанорозмірних форм або наночастинок [6, 15, 12]. Нещодавно в Україні розроблено нову технологію одержання нанокарбоксилатів макро- і мікроелементів, зокрема наносукцинату та наноцитрату мангану, цинку та купруму [3, 11, 18]. У дослідженнях з використанням сперми бугаїв встановлено ефективність середовища для кріоконсервування сперми бугаїв-плідників з додаванням до складу наносукцинату Mn, Zn і Cu, а також визначено їх оптимальні дози, здатні позитивно впливати на рухливість, виживання та запліднювальну здатність спермій [49, 16].

Зважаючи на вищезазначене, ми провели експеримент з вивчення впливу додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до складу середовища для кріоконсервування сперми баранів на кінематичні показники та дихальну активність деконсервованих спермій. Експериментально з'ясовано, що додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує активність розморожених спермій баранів, а також знижує відсоток спермій з морфологічними порушеннями. Натомість додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність спермій

у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних спермій та ушкодження акросом. Це підтверджує дослідження T. Leahy et al., у яких встановлено, що надлишок  $Cu^{2+}$  в розрідженій спермі барана спричиняє аглютинацію спермій внаслідок окиснення вільних сульфгідрильних груп до дисульфідних [21].

Рухливість спермій є важливим компонентом репродуктивної здатності самців, оскільки вона є важливою для міграції в статевому тракті та взаємодії гамет для запліднення [28]. Саме здатність чоловічих клітин активно рухатись дозволяє їм подолати анатомо-фізіологічні бар'єри жіночих статевих органів і запліднити яйцеклітину [39]. Оцінка рухливості спермій традиційним мікроскопічним методом є досить суб'єктивною [36] і не завжди корелює зі здатністю до запліднення [29]. Розроблений наприкінці XX ст. комп'ютерний аналіз спермій (CASA — *Computer Assisted Sperm Analysis*) дозволив отримати об'єктивний і точний підхід до оцінки рухливості статевих клітин. Технологія комп'ютерного аналізу сперми (CASA) точно й об'єктивно вимірює рухливість спермій за допомогою двовимірного відстеження руху головки сперми, що робить її популярним методом перевірки якості сперми в лабораторіях племінних центрів [42].

Дослідження взаємозв'язку між параметрами руху спермій, отриманими за допомогою системи CASA, і репродуктивною здатністю проводили у багатьох видів, зокрема баранів [47]. Кореляція між аналізом рухливості CASA та запліднювальною здатністю спермій на баранах досліджена менше, порівняно з іншими видами тварин, і має різні результати. O'Meara et al. повідомили [25] про відсутність зв'язку між аналізом CASA спермій барана та репродуктивною здатністю статевих клітин. Проте більшість авторів вказують на значну кореляцію параметрів рухливості CASA (зокрема відсоток рухомих спермій, VAP, VCL), а також зміни цих параметрів впродовж 6 год інкубації з репродуктивною здатністю статевих клітин [38, 4, 43].

У нашому експерименті додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищувало кінематичні показники спермій VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання ж наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижувало динамічні параметри спермій у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Оскільки технологія CASA забезпечує об'єктивну оцінку рухливості спермій, а багато параметрів рухливості, які вона вимірює, за численними літературними даними пов'язані з високою фертильністю в баранів, то можна стверджувати, що додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС підвищує репродуктивну здатність статевих клітин баранів.

Для оцінки якості сперми важливо оцінити енергетичний обмін, оскільки рухливість спермій залежить від наявності енергії. Відомо, що аденозинтрифосфат

(АТФ) слугує основним джерелом енергії, що використовується аксонемальними динеїновими АТФазами всередині хвостика спермія для індукції його руху [7]. АТФ у сперміях утворюється за допомогою комбінації метаболічних шляхів, охоплюючи окисне фосфорилування і цикл Кребса в мітохондріях середньої частини та гліколізу у головній частині джгутика. У процесі заморожування сперми виникають кріопошкодження, які знижують рухливість сперміїв, що окремі автори [26] пояснюють порушенням функції мітохондрій.

Експериментально доведено, що спермії барана залежать насамперед від окисного фосфорилування для виробництва АТФ [9, 10]. У зв'язку з цим, важливо оцінити стан окисного фосфорилування у сперміях як важливого фактора для оцінки якості сперми баранів після кріоконсервування.

У результаті наших досліджень встановлено, що додавання наноцитрату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищує дихальну та інгібує відновну активність деконсервованої сперми з найбільшою вірогідністю за дози обох мікроелементів 5,0 мкг/л, що вказує на підвищення активності сперміїв. Додавання ж наноцитрату Cu проявляє протилежну дію на споживання кисню спермою баранів, знижуючи тим самим її якість. Подібні результати отримано авторами в експерименті з додаванням наносукцинатів Zn, Mn і Cu до лактозо-жовтково-гліцеринового середовища для кріоконсервування сперми бугаїв-плідників [49], що вказує на відсутність міжвидової різниці у дії наносполук досліджуваних металів.

Додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів (ЛЖТЦГС) вірогідно ( $P < 0,05 - 0,01$ ) підвищує активність деконсервованих сперміїв, одночасно знижуючи морфологічні пошкодження статевих клітин, зменшує кількість дегенерованих сперміїв та з ушкодженими акросомами, збільшує кінематичні параметри (CASA), а також підвищує дихальну та інгібує відновну активність сперміїв. Водночас додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах до ЛЖТЦГС знижує перелічені вище показники (крім ушкоджень сперміїв), підвищує відсоток дегенеративних сперміїв, збільшує морфологічні порушення статевих клітин, що вказує на негативний вплив наночастинок цього мікроелемента.

## Джерела

- Alvarez M, Anel-Lopez L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R, de Paz P, Anel L. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reprod. Domest. Anim.* 2019; 54 (S4): 32–40. DOI: 10.1111/rda.13523.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenol.* 2012; 78 (8): 1682–1699. DOI: 10.1016/j.theriogenol.2012.06.007.
- Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov MV. *Nanomaterials in Biology. Fundamentals of nanoveterinary medicine.* Kyiv, Avicenna. 2010: 416 p. (in Ukrainian)
- Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernandez-Santos MR. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 138 (1–2): 102–109. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.007.
- Eghbali M, Alavi-Shoushtari SM, Asri Rezaii S. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008; 11 (15): 1964–1968. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1964.1968.
- Falchi L, Khalil WA, Hassan M, Marei WFA. Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6 (2): 265–269. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.09.001.
- Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod.* 2016; 96 (1): 2–12. DOI: 10.1095/biolreprod.116.144337.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tiss. Bank.* 2006; 7: 91–98. DOI: 10.1007/s10561-005-0275-8.
- Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Lullis GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2020; 220: 106456. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106456.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod.* 2014; 91 (3): 77. DOI: 10.1095/biolreprod.114.118539.
- Gulich MP, Yemchenko NL, Kharchenko OO, Yashchenko OV, Tomashevskaya LA, Antomonov MI. *Nanotechnology Products: Citrates of Bioelements (Chemical Characteristics, Biological Action, Scope).* Kyiv, Medinform, 2018: 202 p. (in Ukrainian)
- Iftikhar M, Noureen A, Uzair M, Jabeen F, Daim MA, Cappello T. Perspectives of nanoparticles in male infertility: evidence for induced abnormalities in sperm production. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2021; 18 (4): 1758. DOI: 10.3390/ijerph18041758.
- Iskra RY, Vlizlo VV, Fedoruk RS, Antonyak GL. *Chromium in Animal Nutrition.* A monograph. Kyiv, Agrarian Science. 2014: 312 p. (in Ukrainian)
- Kaplunenko VG, Avdosjeva IK, Pashchenko AG. The real prospects of drawing on accomplishments of nanotechnologies in veterinary practice. *Sci. Tech. Bull. SSRICVMPFA IAB.* 2014; 15 (4): 252–260. Available at: <https://www.scivp.lviv.ua/wp-content/uploads/2021/09/51-3.pdf> (in Ukrainian)
- Khalil W, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. Impact of selenium nanoparticles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenol.* 2019; 126: 121–127. DOI: 10.1016/j.theriogenol.2018.12.017.
- Kornyat S, Sharan M, Ostapiv D, Korbeckij A, Jaremchuk I, Andrushko O. Quality of deconserved bull sperm for the action of nanosuccinates Zn, Cu and Mn in the diluents. *Biol. Tvarin.* 2021; 23 (1): 23–29. DOI: 10.15407/animbiol23.01.023. (in Ukrainian)
- Kornyat S, Yaremchuk I, Andrushko O, Ostapiv D, Sharan M, Chajkovska O. The intensity of the oxidation processes in the sperm of the boar at the add of metal nanosuccinates to the ecosperm medium. *Sci. Tech. Bull. SSRICVMPFA.* 2019; 20 (2): 352–357. DOI: 10.36359/scivp.2019-20-2.46. (in Ukrainian)
- Kosinov MV, Kaplunenko VG. Method for metal carboxylates obtaining "Nanotechnology of obtaining metal carboxylates". Patent of Ukraine no. 38391. publ. 12.01.2009. Bull. No 1, 2009. Available at: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=128062> (in Ukrainian)
- Kuzmina N, Ostapiv D, Huleuk N, Gumeneckiy I. The activity and content of SOD isoforms in mail ejaculates and survival of spermatozoa. *Mess. IFNUL Biol. Ser.* 2012; 59: 44–51. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8506> (in Ukrainian)
- Kuzmina NV, Ostapiv DD. Isoferments SOD in diluted bull ejaculates. *Anim. Breed. Gen.* 2010; 44: 107–108. (in Ukrainian)
- Leahy T, Rickard JP, Aitken RJ, de Graaf SP. D-penicillamine prevents ram sperm agglutination by reducing the disulphide bonds of a copper-binding sperm protein. *Reprod.* 2016; 151 (5): 491–500. DOI: 10.1530/REP-15-0596.
- Maulana T, Said S. Kinematics motility of frozen-thawed X and Y sperm of Sumba Ongole bull. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019; 387: 012030. DOI: 10.1088/1755-1315/387/1/012030.
- Nagata MPB, Egashira J, Katafuchi N, Endo K, Ogata K, Yamanaoka K, Yamanouchi T, Matsuda H, Hashiyada Y, Yamashita K. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2019; 10: 1–14. DOI: 10.1186/s40104-019-0395-9.

24. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, Yonekawa H, Hayashi JI. Mitochondria-related male infertility. *PNAS*. 2006; 103 (41): 15148–15153. DOI: 10.1073/pnas.0604641103.
25. O'Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, Ward F, Wade M, Evans ACO, Lonergan P. Relationship between *in vitro* sperm functional tests and *in vivo* fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenol*. 2008; 69 (4): 513–522. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.003.
26. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod*. 2002; 17 (3): 704–709. DOI: 10.1093/humrep/17.3.704.
27. Pal RP, Mani V, Mir SH, Singh RK, Sharma R. Importance of trace minerals in the ration of breeding bull — a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2017; 6 (11): 218–224. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.6.11.026.
28. Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Rum. Res*. 2012; 112 (1–3): 128–135. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.12.014.
29. Piddubna L, Zakharchuk D, Bratushka R, Ivanytska V. Interrelation of kinetic parameters of sperm of servicing bulls of the Holstein breed with its fertilising ability. *Sci. Horizons*. 2022; 25 (8): 67–74. DOI: 10.48077/scihor.25(8).2022.67-74.
30. Rokotianska VO. The effect of nanoacquelates on the biological usefulness of spermatozoons. *Bull. Agr. Sci. Black Sea Reg*. 2018; 3: 56–60. DOI: 10.31521/2313-092X/2018-3(99)-9. (in Ukrainian)
31. Rowe MP, Powell JG, Kegley EB, Lester TD, Rorie RW. Effect of supplemental tracemineral source on bull semen quality. *Appl. Anim. Sci*. 2014; 30 (1): 68–73. DOI: 10.15232/S1080-7446(15)30085-1.
32. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci*. 1995; 34 (3–4): 185–249. DOI: 10.1016/0378-4320(94)01327-1.
33. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*. 2000; 62 (1–3): 77–111. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
34. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem. Toxicol*. 2013; 36 (3): 353–368. DOI: 10.3109/01480545.2012.710631.
35. Serdyuk AM, Gulich MP, Kaplunenkov VG, Kosinov MV. Nanotechnologies of micronutrients: problems, prospects and ways to eliminate the deficiency of macro- and microelements. *J. Acad. Med. Sci. Ukraine*. 2010; 16 (1): 107–114. (in Ukrainian)
36. Singh A, Kumar A, Bisla A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *Indian J. Anim. Sci*. 2021; 91 (6): 419–429. DOI: 10.56093/ijans.v91i6.115435.
37. Skrzycki M, Czczot H. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) — structure, properties and functions. *Postępy Hig. Med. Dośw*. 2004; 58: 301–311. PMID: 15280800. (in Polish)
38. Smith JF, Parr J, Murray GR, Clarke A, McDonald RM, Duganzich DM. Relationships between laboratory measures of ram sperm competence and field fertility. *New Zealand Soc. Anim. Prod*. 1998; 58: 181–185. Available at: <https://www.nzsap.org/proceedings/1998/relationships-between-laboratory-measures-ram-sperm-competence-and-field-fertility>
39. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Upd*. 2006; 12 (1): 23–37. DOI: 10.1093/humupd/dmi047.
40. Tekin N, Uysal O, Akçay E, Yavaş İ. Effects of different taurine doses and freezing rate on freezing of row semen. *Ankara Üniver. Vet. Fakült. Dergisi*. 2006; 53 (3): 179–184 DOI: 10.1501/Vetfak\_00000000085. (in Turkish)
41. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet. Brno*. 2007; 76 (3): 383–390. DOI: 10.2754/avb200776030383.
42. Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. Motility assessment of ram spermatozoa. *Biology*. 2022; 11 (12): 1715. DOI: 10.3390/biology11121715.
43. Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Fantova E, Quintín-Casorrán FJ, Sevilla-Mur E, Yániz JL. *In vitro* assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim. Reprod. Sci*. 2014; 146 (1–2): 15–20. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.005.
44. Vlizlo VV, Iskra RY, Fedoruk RS. Nanobiotechnologies. Present state and future prospectes. *Biol. Tvarin*. 2015; 17 (4): 18–29. Available at: <http://aminbiol.com.ua/index.php/106-archive/bt-17-4-2015/1386> (in Ukrainian)
45. Vlizlo VV. (ed.). *Laboratory Methods in Biology, Stockbreeding and Veterinary Medicine*. Lviv, Spolom Publ., 2012: 764 p. (in Ukrainian)
46. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst. Biol. Reprod. Med*. 2010; 56 (2): 147–167. DOI: 10.3109/19396360903582216.
47. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P, Soler C. CASA-Mot in mammals: An update. *Reprod. Fertil. Dev*. 2018; 30 (6): 799–809. DOI: 10.1071/RD17432.
48. Yaremchuk IM, Sharan MM. Modern opportunities of sperm quality analysis and sperm dose calculation. *Biol. Tvarin*. 2012; 14 (1–2): 697–703. Available at: <http://aminbiol.com.ua/index.php/archive?catid=1:2013-02-15-09-09-13&id=203:2013-03-09-12-31-38> (in Ukrainian)
49. Yaremchuk I, Kuzmina N, Ostapiv D, Sharan M, Kava S. Oxidative processes intensity and quality of bull semen when adding microelements nanosuccinate compounds. *Sci. Mess. LNUVMBT Ser. Vet. Sci*. 2017; 19 (77): 185–189. DOI: 10.15421/nlvvet7740. (in Ukrainian)

## Kinematic parameters and redox state of thawed ram sperm after adding nanocitrate of Mn, Zn, and Cu to the medium for cryopreservation

O. M. Sharan  
oshaom737@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv, 50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

The aim of the work was to find out the effect of adding nanocitrate of Mn, Zn and Cu to the medium for cryopreservation of ram sperm on kinematic indicators and respiratory activity of thawed sperm. The experiment was conducted on six clinically healthy breeder rams of the Texel breed aged 2–4 years. After receiving the ejaculates of the rams, they were evaluated for the volume, concentration and motility of the sperm and were divided into control and experimental groups. Control sperm samples were diluted with lactose-yolk-tris-citrate-glycerol medium (LYTCGM). Nanocitrates of trace elements were added to the medium in experimental samples of ram sperm in the following doses: Zn and Mn — 2.5, 5.0 and 7.5 µg/l, Cu — 1.25, 2.5 and 3.75 µg/l. Diluted sperm was packaged in straws, equilibrated for 2.5 hours and frozen. After thawing of sperm, motility, morphological damage of sperm, kinematic parameters of sperm motility (CASA), oxidation and reduction activity of sperm were determined. A dose-dependent effect of Mn, Zn, and Cu nanocitrates upon their addition to LYTCGM was established. The addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.05–0.01$ ) increases the activity of thawed ram sperm, while the addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the motility of sperm in thawed ram sperm. Addition of Mn and Zn nanocitrate in an optimal dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.05–0.01$ ) reduces the number of spermatozoa degenerated and with damaged acrosomes, and with the addition of Cu nanocitrate in increasing doses, morphological disorders of germ cell significantly increase cells. The addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.01–0.001$ ) increases the kinematic parameters of thawed ram sperm, and the addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the indicators of germ cell motility. The addition of Mn and Zn nanocitrates to the medium for cryopreservation of ram sperm increases the oxidation and inhibits the reduction activity of thawed sperm. Addition of Cu nanocitrate to LYTCGM in increasing doses reduces the oxidation and increases the reduction activity of thawed ram sperm.

**Key words:** ram, sperm, Mn, Zn, Cu nanocitrate, kinematic parameters, motility, respiratory activity



## Репродуктивна динаміка ропухи сірої *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) і жаби трав'яної *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758) як один з ключових етапів їх сезонного циклу

Б. О. Андрішун  
bohdanoksalat@gmail.com



Національний науково-дослідний реставраційний центр України (Львівська філія), вул. Лесі Українки, 10, Львів, 79008, Україна

### ORCID:

Б. О. Andriishyn <https://orcid.org/0000-0002-7405-4576>

### Authors' Contributions:

ABO: conceptualization, project administration, investigation, methodology, statistics, formal analysis, visualization, writing — original draft, review and editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

Not applicable.

### Acknowledgements:

The part of the investigation was conducted within the project "Mortality of amphibians on the roads of Lviv region (West of Ukraine)" supported by the Rufford Foundation.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Представлені результати досліджень репродуктивної динаміки ключових видів амфібій Українського Розточчя. Оскільки розмноження належить до найважливіших та ключових етапів сезонного циклу земноводних, саме цьому періоду було присвячено особливу увагу. Ми використали класичні і типові методи обліку статевонасильних представників амфібій: маршрутні обліки, пошук загиблих земноводних на автошляхах, вокалізаційні методи та встановлення тимчасових захисних бар'єрів, які унеможливають перехід амфібій через дорожнє полотно. Отож, до видів з рапто-вим типом розмноження належать земноводні родів *Rana* та *Bufo*. До видів тривалого розмноження ми внесли представників родів *Lissotriton*, *Triturus*, *Bombina*, *Hyla*, *Pelophylax*. Зокрема, тимчасові захисні бар'єри дали нам показові і чіткі поняття стосовно часових піків і спадів репродуктивних міграцій досліджуваних видів амфібій, а також напрям руху до репродуктивних та трофічних оселищ. Порівнюючи початок статевої активності та її перебіг впродовж сезону, бачимо певні відмінності між модельними видами *B. bufo* та *R. temporaria*, зокрема це вибір репродуктивних водойм, час відкладання ікри та період активності статевонасильних особин. Статева активність жаби трав'яної припадає на першу половину березня — середину квітня. В другій половині квітня ми відловлювали жаб трав'яних з обох боків бар'єрів, що свідчить про «переломний» момент статевої активності цього виду. Хоча ропуха сіра першою з'являється після гібернації, нерест відбувається орієнтовно на декаду пізніше, ніж у жаби трав'яної, але триває дещо довше. Вважаємо, що такі дослідження потрібно проводити регулярно і що одержані результати спонукають герпетологів до подальших і тривалих досліджень.

**Ключові слова:** сезонний цикл, земноводні, Українське Розточчя, репродуктивна динаміка, розмноження

### Вступ

Сезонний цикл — це сукупність та характер перебігу усіх життєво важливих процесів живих організмів під час періоду їх активності. Розмноження вважають

одним із найважливіших етапів сезонного циклу земноводних. Під терміном «репродуктивна динаміка» розуміємо всі процеси у репродуктивних локалітетах упродовж сезону розмноження земноводних,



які пов'язані з імовірністю вдалого розмноження та залежать від тривалості й інтенсивності шлюбного періоду. Зі свого боку, ці явища охоплюють широкий діапазон поведінкових моделей разом із морфологічними і фізіологічними змінами особин впродовж репродуктивного періоду [5].

К. D. Wells пропонує два репродуктивних типи у безхвостих земноводних: вибухового (раптового) і тривалого розмноження [14]. Ці дві категорії репрезентують два можливі закінчення континууму (процесу), починаючи від розмноження, що триває одну ніч у деяких видів, і закінчуючи розмноженням тривалістю декілька місяців в інших [14, 15].

*Раптовий (вибуховий) тип розмноження* характеризується значним скупченням особин у певних відповідних локалітетах і коротким репродуктивним періодом — від кількох днів до кількох тижнів. Раптове розмноження характерне для багатьох безхвостих амфібій помірних широт: *Bufo*idae, *Rana*idae, *Pelobatidae* [3, 4, 13]. Самці земноводних такого типу розмноження формують хори у репродуктивних локалітетах.

Пререпродуктивний період, тобто період між першою вокалізацією і першими масово відкладеними яйцями, є відносно коротким у європейських видів земноводних [5]. G. Strömberg в результаті семирічних досліджень шведської популяції жаби прудкої *Rana dalmatina* встановив, що перша маса відкладених яєць з'являлася в інтервалі від чотирьох до 11 днів після початку вокалізації [11]. J. Elmberg встановив серединний переднерестовий період у 5,4 дня для жаби трав'яної *R. temporaria* протягом 10-річних досліджень (Швеція) [2, 3]. Інші тривалі дослідження показали, що у *R. temporaria* вокалізаційна поведінка залежить від енергетичних запасів, які залишаються після періоду гібернації. Таким чином, співи самців можуть бути цілком відсутніми, якщо енергетичні резерви вичерпалися після дуже довгої зими [2, 3]. Самці багатьох видів раптового типу розмноження демонструють нерозбірливу поведінку щодо пошуку пари для нересту під час репродуктивного сезону. Типовими представниками такої поведінки є ропуха сіра *B. bufo* і жаба трав'яна *R. temporaria*, самці яких захоплюють будь-який об'єкт у воді, який за розмірами відповідний самиці, — самиць інших видів та навіть супутніх самців [8, 14, 15]. У випадку помилкового «парування» з іншими самцями свого ж виду вокалізація ввідіграє роль внутрішньо-видового розпізнавання [12].

На жаль, немає конкретних відомостей щодо зв'язку між часом прибуття (рано чи пізно під час шлюбного періоду) і розміром самців ропух. Деякі роботи вказують, що більші (старші) самці прибувають на розмноження раніше [7], тоді як інші свідчать про ранні міграції менших за розмірами самців [4]. Розмір тіла різних особин [1] і попередній репродуктивний досвід [9] є важливим детермінантом для самців ропухи сірої під час амплексусу. Самці можуть тимчасово відступати з репродуктивної водойми у пошуках

можливостей для копуляції в навколишніх наземних оселищах. Такі приклади щодо ропухи сірої показують, що репродуктивна система амфібій раптового типу розмноження може бути досить гнучкою.

*Тривалий тип розмноження* характеризується важкими репродуктивними періодами. На відміну від амфібій з раптовим типом розмноження, представники тривалого розмноження вокалізують ефективно для розмежування територій і приваблення самиць до репродуктивних оселищ. В такому випадку самиці готові виявити і обрати самців на основі саме характеристик вокалізації.

Hartel et al. (2004) [6], досліджуючи репродуктивні характеристики кумки жовточеревої *Bombina variegata*, демонструє, що самці також використовують різноманітні стратегії для утворення пари. Ці стратегії часто корелюють з вибором самицями водойм для розмноження, що пов'язане з їх тимчасовою доступністю. В сухі сезони кількість доступних для репродукції водойм є мізерною, тому самиці проявляють схильність до постійності перебування у водоймі. У вологі сезони самиці населяють більшу кількість репродуктивних водойм [5]. Встановлено, що в такому випадку самці частіше мігрують з однієї водойми в іншу під час сухих сезонів, тоді як співвідношення немігруючих кумок у водоймі є більшим у вологі сезони. Автори припускають, що такий підхід збільшує ймовірність знайти самицю для розмноження, адже залишатися у водоймі, коли більшість самиць, власне, і шукає водойми під час вологого сезону, може виявитись більш вигідним та ефективним.

## Матеріали і методи

Дослідження проводили на території Українського Розточчя протягом 2017–2021 рр. Відомо, що дослідження репродуктивної динаміки земноводних часто поєднують з фауністичними та міграційними дослідженнями. Тому після встановлення захисних бар'єрів у сезони міграційної активності навесні та вилітати туди земноводних є можливість встановити їхні міграційні піки в час репродуктивного етапу сезонного циклу, а також після розмноження, міграційні піки під час переміщення з водойм до харчових оселищ влітку тощо. Ми встановили тимчасові захисні бар'єри, які унеможливають перехід амфібій через дорожнє полотно; окрім цього, такі бар'єри контролюють співробітники природоохоронних територій і волонтери (рис. 1). Обліки загиблих амфібій на автошляхах також допомагають у розумінні початків, піків та завершення репродуктивних міграцій [10]. Не менш важливою є вокалізаційна компонента, особливо для таких представників, як бурі та зелені жаби, квакші, ропухи й кумки. Тож дослідження вокалізації земноводних у сезон їхньої активності є невід'ємним компонентом як фауністичних, так і популяційних досліджень. Такий аспект дозволяє нам провести інвентаризацію



**Рис. 1.** Загальний вигляд фрагменту захисного бар'єру на узбіччі дороги Т-1425

видового складу амфібій, відстежити їхню сезонну і репродуктивну динаміку. Сезонна вокалізація амфібій дозволяє також, окрім якісного складу, оцінити відносну чисельність та співвідношення видів, які входять до складу батрахоценозів.

Усі взаємодія та маніпуляції з досліджуваними тваринами виконувалися згідно з нормами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються у наукових цілях (Страсбург, 1986).

Протягом досліджень використовували методи маршрутних обліків. Маршрути були обрані так, щоб охоплювати максимальну кількість репродуктивних оселищ земноводних. Репродуктивні водойми обстежували регулярно, проводили облік та обрахунок особин земноводних, а також їхньої ікри, личинок та метаморфів. Брало до уваги і погодні умови як рушійний та ключовий чинник у проходженні етапів репродуктивного періоду.

## Результати й обговорення

За результатами досліджень, опираючись на біотичні і фенологічні особливості видів земноводних, роди *Rana* та *Bufo* належать до типу «раптового» розмноження, на відміну від решти земноводних, до яких належать види родів *Lissotriton*, *Triturus*, *Bombina*, *Hyla*, *Pelophylax*.

*Rana temporaria* протягом досліджень проявила типову статеву динаміку. Перші появи жаби трав'яної реєстрували в останній декаді березня — першій декаді квітня. Варто зазначити, що, на відміну від ропухи сірої, жаба трав'яна виявилася більш пізнім мігрантом. За результатами досліджень перебігу міграції земноводних на модельній ділянці дороги Т-1425, де були встановлені захисні бар'єри, весняні сезони активності земноводних тривали з 03.04.2018 по 01.05.2018 і з 15.03.2019 по 20.05.2019. У першій половині квітня 2018 і 2019 рр. у відрах-пастках з боку лісу (у напрямку до репродуктивних водойм) ми обліковували вже нечисленних (до 10 особин) представників *Rana temporaria*, в другій половині квітня їхня кількість зросла приблизно вдвічі, однак уже в той час ми прослідкували велику кількість особин у відрах-пастках з боку

репродуктивних водойм — у напрямку до лісу, який, очевидно, слугує трофічним оселищем земноводних на цій модельній ділянці. В другій половині квітня 2018 р. ми зафіксували понад 400 особин жаби трав'яної, які вже покидали репродуктивні водойми. Їхня кількість різко знизилася до 30-ти особин на третьому тижні квітня, а на четвертому ми вже не виявили особин жаби трав'яної, впійманих у відра-пастки. Такий розподіл свідчить про те, що статева активність жаби трав'яної припадає на другу половину березня — другу половину квітня (рис. 2), що є типовим для виду в умовах України. Малу кількість мігруючих особин у бік репродуктивних водойм (див. рис. 2) можемо пояснити тим, що захисні бар'єри встановили вже після того, як відбувся масовий перехід цих земноводних до місць розмноження (час встановлення — початок квітня 2018 р.).

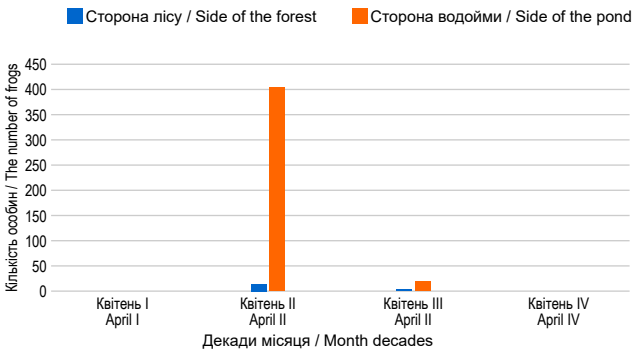
Навесні 2019 р. бар'єри були встановлені на два тижні швидше для перевірки гіпотези, що з початком міграції земноводні мігрують з боку лісових масивів до водойми, а орієнтовно з середини квітня — навпаки (рис. 3). І така тенденція підтвердилась: з березня по другу половину квітня всі виявлені амфібії були у відрах-пастках з боку лісу, потім — з боку ставу. Натомість останні обліковані амфібії були у відрах-пастках у перший тиждень травня, далі пастки були пустими. Варто зазначити, що протягом травня ми спостерігали також незначну кількість розчавлених земноводних на всій модельній ділянці — загалом 27 представників ропухи сірої і жаби трав'яної разом. Тим не менше, загальна динаміка потрапляння амфібій у відра-пастки щодо напрямків ставу і лісу збігається.

Таким чином, ми підтвердили швидкий перебіг статевої активності жаби трав'яної, хоча в різні роки їхня чисельність дещо різниться.

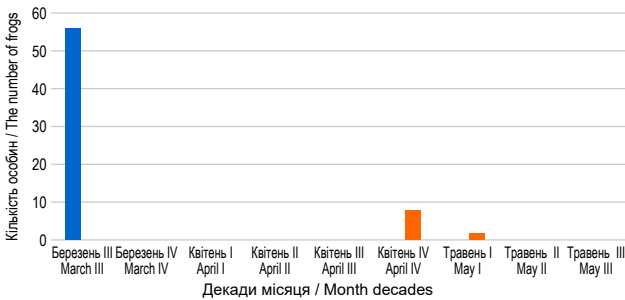
*Bufo bufo* також проявила ранньовесняну і швидкоплинну статеву активність, але перші весняні міграції ропуха сіра здійснює на тиждень швидше, ніж жаба трав'яна. Впродовж 2018–2020 рр. вже в другій половині березня кількість мігруючих особин становила приблизно 140.

За результатами підрахунку *B. bufo* у відрах-пастках на захисних бар'єрах доходимо висновку, що в них динаміка і часові стратегії подібні. На початку квітня 2018 р. кількість особин, які прямували від лісу до ставу, була більшою — 18 особин, а в другій декаді квітня напрям руху особин ропухи сірої змінився від водойми до лісу. Відтак було відловлено більше 160 особин у відра-пастки, розташовані з боку ставу, а це свідчить, що в другій декаді квітня значна частина популяції ропухи сірої вже завершила нерест. Натомість до кінця квітня ми вилловлювали особин *B. bufo* як з боку лісу, так і з боку репродуктивної водойми (рис. 4).

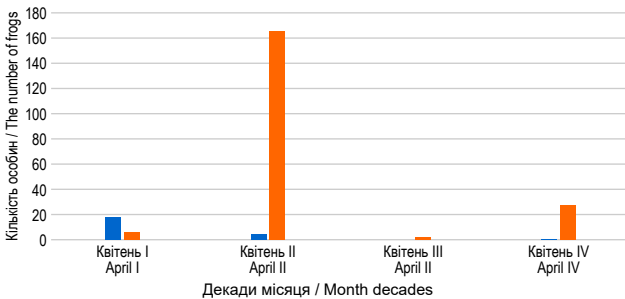
Протягом весни 2019 р. прослідковуємо чіткішу зміну напрямів руху ропухи сірої. З третього тижня березня по перший тиждень квітня кількість ропух з боку лісу невинно зростала — від 12 до 57 особин, до четвертого тижня квітня рух ропухи був незначним,



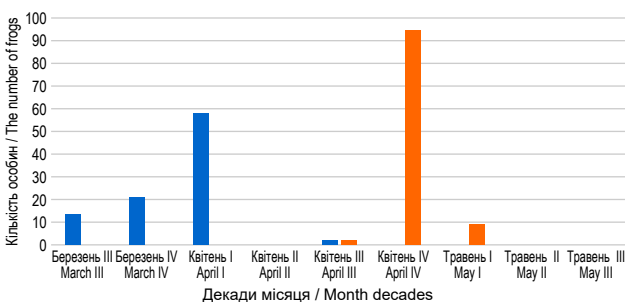
**Рис. 2.** Загальна кількість особин *R. temporaria*, виловлених захисними бар'єрами на модельній ділянці дороги Т-1425 на території Українського Розточчя протягом квітня 2018 р.



**Рис. 3.** Загальна кількість особин *R. temporaria*, виловлених захисними бар'єрами на модельній ділянці дороги Т-1425 на території Українського Розточчя протягом весни 2019 р.



**Рис. 4.** Загальна кількість особин *B. bufo*, виловлених у відра-пастки захисними бар'єрами на модельній ділянці дороги Т-1425 на території Українського Розточчя протягом квітня 2018 р.



**Рис. 5.** Загальна кількість особин *B. bufo*, виловлених захисними бар'єрами на модельній ділянці дороги Т-1425 на території Українського Розточчя протягом весни 2019 р.

а протягом четвертого тижня квітня виловили понад 90 особин, але вже з боку репродуктивної водойми. На початку травня кількість мігруючих земноводних суттєво знизилась до >10 ос. і після цього масових появ на захисних бар'єрах ми не реєстрували (рис. 5).

Ропуха сіра проявила також швидкий тип розмноження, хоча, на відміну від жаби трав'яної, в хронологічному плані протяжність нересту у ропухи дещо більша, особливо у 2019 р. Проте кількість статевих особин у 2019 р. виявилась нижчою, ніж у 2018 р.

Такі міграційні процеси для модельних видів земноводних «вибухового типу розмноження» підкреслюють необхідність охорони репродуктивних оселищ, особливо на початкових етапах їхнього сезонного циклу, оскільки саме в цей час імунна система земноводних після гібернації і під час нестабільних кліматичних умов порівняно слабка [6]. Тим паче, цей початковий етап сезонного циклу вбачаємо за доцільне вважати одним із вирішальних, оскільки від нього залежить кількість потомства та стан популяції назагал.

Отож, перші реєстрації особин досліджуваних видів після гібернації ми реєстрували на початку березня протягом усіх років дослідження. Проте *B. bufo*, *R. temporaria* і *R. arvalis* проявили найбільш ранню статеву активність. Інші представники, зокрема жаби роду *Pelophylax*, з'являлися пізніше, але були активними протягом тривалішого періоду часу. Масову появу ікри зафіксували наприкінці березня — на початку квітня, тут же й було обліковано масові скупчення і хори самців жаби трав'яної у репродуктивних водоймах. Наприкінці першої декади квітня ми реєстрували велику кількість ікри трав'яної та гостромордої жаб на досліджуваній ділянці у водоймах на території с. Дубровиця Яворівського р-ну. В цих же стаціях було зафіксовано 14 пар ропухи сірої (амплексус) та чотири поодинокі самці. Назагал, кількість активних самців у водоймах суттєво перевищує кількість самиць — одна самиця на 33 самці. Кінець розмноження жаби трав'яної та гостромордої припадає на 10–13 квітня, а ропухи сірої — на 20–25 квітня.

Під час досліджень репродуктивної динаміки амфібій Українського Розточчя ми підтвердили, що до видів з раптовим типом розмноження належать земноводні родів *Rana* та *Bufo*. До видів тривалого розмноження належать роди *Lissotriton*, *Triturus*, *Bombina*, *Hyla*, *Pelophylax*. Порівнюючи початок статевої активності та її перебіг впродовж сезону, бачимо певні відмінності між модельними видами *B. bufo* та *R. temporaria*: зокрема вибір репродуктивних водойм, час відкладання ікри та період активності метаморфів. Хоча ропуха сіра першою з'являється після гібернації, нерест відбувається орієнтовно на декаду пізніше, ніж у жаби трав'яної, але триває дещо довше. Впродовж 2018–2020 рр., вже в другій половині березня кількість мігруючих особин становила приблизно 140 особин. Статева активність жаби трав'яної припадає на першу половину березня — середину квітня. В другій половині квітня ми відловлювали жаб трав'яних з обох боків бар'єрів, що свідчить про «переломний» момент статевої активності цього виду.

## Джерела

1. Davies NB, Halliday TR. Competitive mate searching in male common toads, *Bufo bufo*. *Anim. Behav.* 1979; 27 (4): 1253–1267. DOI: 10.1016/0003-3472(79)90070-8.
2. Elmberg J, Lundberg P. Intraspecific variation in calling, time allocation and energy reserves in breeding male common frogs *Rana temporaria*. *Ann. Zool. Fennici.* 1991; 28 (1): 23–29. Available at: <https://www.sekj.org/PDF/anzf28/anz28-023-029.pdf>
3. Elmberg J. Long-term survival, length of breeding season, and operational sex ratio in a boreal population of common frogs, *Rana temporaria* L. *Canad. J. Zool.* 1990; 68 (1): 121–127. DOI: 10.1139/z90-017.
4. Gittins SP, Parker AG, Slater FM. Mate assortment in the common toad (*Bufo bufo*). *J. Nat. Hist.* 1980; 14 (5): 663–668. DOI: 10.1080/00222938000770561.
5. Hartel T, Demeter L. The breeding migration and population characteristics of a common toad (*Bufo bufo*, Linnaeus 1758) population visiting a seminatural pond in Sighișoara. *Transylvan. Rev. Syst. Ecol. Res.* 2005; 2: 145–154. Available at: <https://magazines.ulbsibiu.ro/trser/trser2/145-154.pdf>
6. Hartel T. The long-term trend and the distribution of amphibian populations in a semi-natural pond in the middle section of the Târnava-Mare Valley (Romania). *Biota.* 2004; 5 (1): 25–36.
7. Loman J, Madsen T. Reproductive tactics of large and small male toads *Bufo bufo*. *Oikos.* 1986; 46 (1): 57–61. DOI: 10.2307/3565380.
8. Reading CJ. Interspecific spawning between common frogs (*Rana temporaria*) and common toads (*Bufo bufo*). *J. Zool.* 1984; 203 (1): 95–101. DOI: 10.1111/j.1469-7998.1984.tb06046.x.
9. Reading CJ. Non-random pairing with respect to past breeding experience in the common toad (*Bufo bufo*). *J. Zool.* 2001; 255 (4): 511–518. DOI: 10.1017/S0952836901001595.
10. Reshetylo O, Rizun E, Rizun V. The problem of amphibian mortality on highways and ways to solve it. *Visnyk Lviv Univ. Biol. Ser.* 2006; 42: 70–78.
11. Strömberg G. The yearly cycle of the jumping frog (*Rana dalmatina*) in Sweden. A 12-year study. In: Llorente GA. *Scientia Herpetologica*. Asociacion Herpetologica Española, 1995: 185–186. ISBN 84-605-3526-6.
12. Tada D., Martino A, Sinsch U. Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): ecological constraints and phylogenetic implications. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2001; 39 (1–2): 13–23. DOI: 10.1046/j.1439-0469.2001.00147.x.
13. Van Gelder JJ, Hoedemaekers HCM. Sound activity and migration during the breeding period of *Rana temporaria* L., *R. arvalis* Nilsson, *Pelobates fuscus* Laur. and *Rana esculenta* L. *J. Anim. Ecol.* 1971; 40 (3): 559–568. DOI: 10.2307/3437.
14. Wells KD. Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). *Ecology.* 1977; 58 (4): 750–762. DOI: 10.2307/1936211.
15. Wells KD. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim. Behav.* 1977; 25 (3): 666–693. DOI: 10.1016/0003-3472(77)90118-X.

## Reproductive dynamics of the common toad (*Bufo bufo*) and the grass frog (*Rana temporaria*) as one of the key species of their seasonal cycle

B. O. Andriishyn  
bohnanoksalat@gmail.com

National Research and Development Restoration Center of Ukraine (Lviv branch), 10 Lesi Ukrainky str., Lviv, 79008, Ukraine

The results of research on the reproductive dynamics of the key amphibian species of the Ukrainian Roztochchia are presented. Since reproduction is one of the most important and key stages of the seasonal cycle of amphibians, special attention was paid to this period. We used classic and typical methods of recording reproductive activity of amphibians: route records, searching for dead amphibians on the roads, vocalization methods and installation of temporary protective barriers that prevent amphibians from crossing the road. Therefore, amphibians of the genera *Rana* and *Bufo* belong to the species with a sudden type of reproduction. We included representatives of the genera *Lissotriton*, *Triturus*, *Bombina*, *Hyla*, and *Pelophylax* to the long-term breeding species. In particular, temporary protective barriers gave us indicative and clear concepts regarding the temporal peaks and troughs of reproductive migrations of the studied amphibian species, as well as the direction of movement to reproductive and trophic habitats. Comparing the beginning of reproductive activity and its course throughout the season, we can see certain differences between the model species *B. bufo* and *R. temporaria*, in particular, the choice of breeding ponds, the time of spawning and the period of activity of sexually active individuals. Reproductive activity of the common frog occurs in the first half of March — mid-April. In the second half of April, we caught common frogs on both sides of the barriers, which indicates a “turning point” in the sexual activity of this species. Although the common toad is the first to appear after hibernation, spawning occurs approximately a decade later than that of the common frog but takes a little longer. We believe that such research should be continued regularly and our results will encourage herpetologists to further and long-term research.

**Key words:** seasonal cycle, amphibians, Ukrainian Roztochchia, reproductive dynamics, reproduction



## Патоморфологічні зміни нирок, печінки та біохімічні показники сироватки крові червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*) за парентерального введення гентаміцину

Р. С. Данкович, В. І. Чулюк  
danco1802@gmail.com, Slawakill96@gmail.com



Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

### ORCID:

R. S. Dankovych <https://orcid.org/0000-0003-3254-0506>  
V. I. Chuliuk <https://orcid.org/0000-0002-3082-7215>

### Authors' Contributions:

**DRS:** supervision, project administration, conceptualization, methodology, data curation, writing — original draft, review and editing, visualization.  
**CVI:** methodology, formal analysis, writing — original draft, investigation, visualization.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

The experiments were conducted in accordance to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes (Strasbourg, March 18, 1986, European Treaty Series/123)

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Принципи лікування плазунів значно відрізняються від медикаментозної терапії у ссавців та птахів, що насамперед пов'язано з анатомічними та фізіологічними особливостями рептилій. Під час лікування інфекційних хвороб рептилій використовується гентаміцин, який має нефротоксичну дію. З метою вивчення впливу на організм плазунів гентаміцину проведено біохімічне дослідження сироватки крові з визначенням активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази, концентрації сечовини та сечової кислоти, а також гістологічне та ультраструктурне дослідження нирок і печінки. Для дослідження сформовано дві дослідні групи червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*), яким кожні 48 годин у м'язи грудної кінцівки вводили гентаміцин в дозі 10 мг/кг. Тварин першої дослідної групи виводили з експерименту на 7-у добу, а тварин другої групи — на 14-у добу досліді. Внаслідок парентерального введення гентаміцину в черепах відзначали зростання концентрації сечової кислоти та сечовини, а також активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази сироватки крові. В нирках виявили структурні зміни ниркових клубочків: альтеративні зміни подоцитів, а також дистрофічні та некротичні зміни епітелію ниркових канальців. Дегенеративні зміни нефроцитів супроводжувались розширенням канальців гладкої ендоплазматичної сітки, деструкцією крист мітохондрій, нагромадженням в цитоплазмі автофаголізосом, цитосом та лізосом. Також виявили ознаки апоптозу нефроцитів, з формуванням апоптичних тілець. За дослідження печінки реєстрували дистрофічні та некротичні зміни гепатоцитів, розширення та переповнення судин венозного русла.

**Ключові слова:** рептилії, гентаміцин, черепахи, нирки, печінка, сечовина, сечова кислота, АсАТ, АлАТ, патоморфологія

### Вступ

На сьогодні ветеринарні спеціалісти дедалі частіше досліджують представників різних класів тваринного світу, в тому числі рептилій. Плазуни — це

представники окремого традиційного класу хребетних пойкилотермних тварин, які успішно колонізували більшу частину нашої планети [13]. Еволюційна роль рептилій відіграла вирішальну роль у походженні та подальшому розвитку птахів та ссавців [20]. Морфо-

функціональні особливості організму рептилій, розвиток патологічних станів та хвороби плазунів на сьогодні вивчено недостатньо [7, 17, 21].

У рептилій, яких утримують в умовах неволі, внаслідок неадекватної годівлі, невідповідності температурного режиму та параметрів вологості, недостатнього ультрафіолетового опромінення, досить часто виникає інфекційна та незаразна патологія [1, 11, 19]. Принципи лікування хвороб рептилій значно відрізняються від медикаментозної терапії у ссавців і птахів, що пов'язане насамперед з анатомічними та фізіологічними характеристиками плазунів, низьким рівнем метаболізму пойкилотермних тварин. Під час комплексної терапії бактеріальних та грибкових хвороб рептилій протимікробна терапія є важливим та основним компонентом [9]. Гентаміцин, який досить часто використовується за лікування інфекційних хвороб різних видів тварин, проявляє нефротоксичну дію [3, 10, 14, 15]. Вплив парентерального введення антибіотиків, у тому числі гентаміцину, на організм рептилій вивчено недостатньо. У зв'язку з цим, актуальним питанням сучасної ветеринарної медицини та герпетології є дослідження біохімічних показників сироватки крові та структурних змін внутрішніх органів плазунів за дії антибіотиків.

## Матеріали і методи досліджень

Дослідження провели на статевозрілих червоновухих прісноводних черепахах (*Trachemys scripta elegans*). Дослід проведено в весняно-осінній період року. Дослідних та контрольних тварин утримували в оптимальних умовах мікроклімату. Годівля була збалансованою, відповідає критеріям, рекомендованим для цього виду рептилій. Дослідним тваринам кожні 48 год. вводили гентаміцин в дозі 10 мг/кг в м'язи грудної кінцівки. Тварин першої дослідної групи (n=4) виводили з експерименту на 7 добу, а тварин другої групи (n=4) — на 14 добу. Для контролю (n=4) підбирали клінічно здорових тварин за принципом аналогів. Під час проведення досліджень дотримувались рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.)» [16].

Біохімічне дослідження сироватки крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора *Cobas Integra 400 plus*. Евтаназію черепах здійснювали за допомогою ін'єкції тіопенталу натрію в грудно-черевну порожнину в дозі 100 мг/кг. Для гістологічного дослідження шматочки органів фіксували в 10% забуференому розчині нейтрального формаліну. Виготовлення гістозрізів проводили за допомогою санного мікротома та мікротома-кріостата. Гістозрізи фарбували гематоксиліном та еозином, суданом III [6]. Мікропрепарати фотографували з використанням мікроскопа *Leica DM-2500* (Швейцарія), фотокамери *Leica DFC450C* і програмного забезпечення *Leica Application Suite Version*.

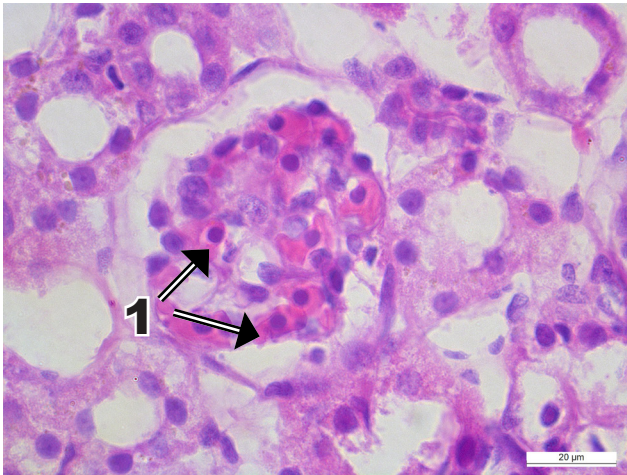
Для проведення трансмісійної електронної мікроскопії фрагменти нирок та печінки фіксували у 2% розчині OsO<sub>4</sub> у фосфатному буфері (рН 7,36). Ультратонкі зрізи виготовляли за допомогою ультрамикротома УМП-3М, монтували на опорні сітки та контрастували у 2% розчині уранілацетату [2, 18]. Електронномікроскопічне дослідження проводили за допомогою електронного мікроскопа ПЭМ-100-01.

Одержані цифрові дані опрацьовували статистично з визначенням середньої арифметичної величини (M) та її помилки (m), середнього квадратичного відхилення (s). Вірогідність різниць середніх значень встановлювали за критерієм Стюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною за P<0,05; P<0,01; P<0,001 [12]. Під час роботи з цифровим матеріалом використовували програмне забезпечення *Microsoft Office Excel 2016*.

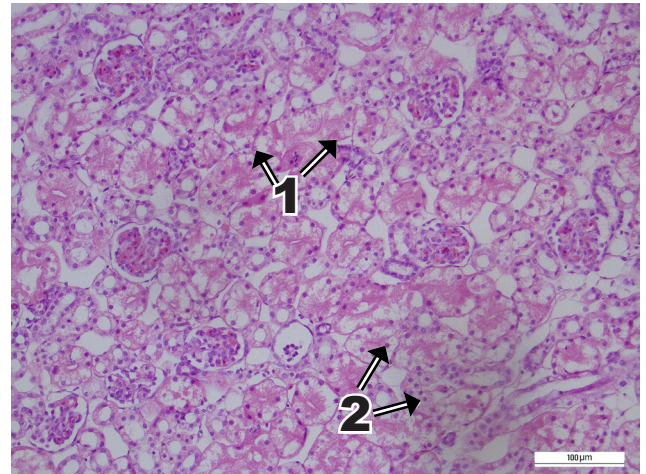
## Результати й обговорення

У результаті проведеного дослідження встановлено, що парентеральне введення гентаміцину червоновухим прісноводним черепахам (*Trachemys scripta elegans*) в дозі 10 мг/кг спричиняє розвиток структурних змін в ниркових клубочках та каналцевою сегменті нефрона. У черепах першої дослідної групи (7-а доба експерименту) гемокапіляри ниркових тілець були розширені, переповнені еритроцитами (рис. 1). Цитоплазма подоцитів неоднорідно набухала, подекуди просвітлювалась. Також відзначали деформацію петель окремих ниркових клубочків.

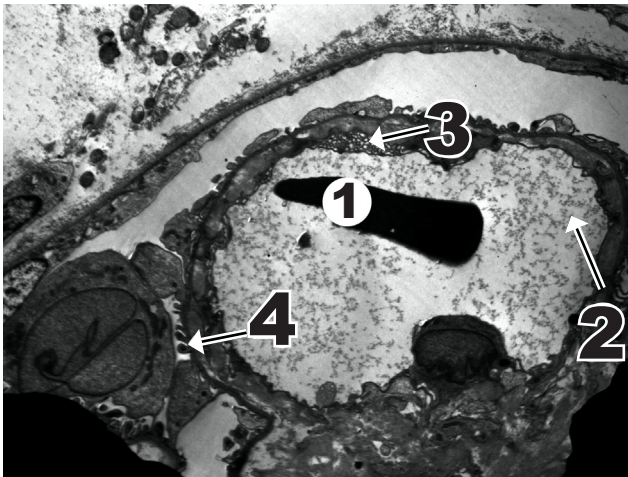
За проведення трансмісійної електронної мікроскопії нирок дослідних тварин виявили зміни структурних компонентів фільтраційного бар'єру (рис. 2). Фільтраційний бар'єр охоплює фенестрований ендотелій капілярів ниркового клубочка, тришарову базальну мембрану, фільтраційні щілини та цитоплазматичні відростки подоцитів. У просвіті гемокапілярів ниркових клубочків локалізувались еритроцити та маси плазми крові. В окремих ниркових тільцях дослідних тварин гломерулярна базальна мембрана була потовщеною, контури її нечіткі. Подекуди відзначали порушення фенестрації ендотеліоцитів. Зокрема, фенестри в ендотелії капілярів ниркових клубочків були неоднорідної ширини: подекуди значно звужені, а в окремих ділянках — розширені. Цитоплазма первинних відростків (цитотрабекул) подоцитів неоднорідно набухала. Цитопедикли подоцитів щільно контактували з гломерулярною базальною мембраною. Деякі цитопедикли були неоднорідно потовщеними, деформованими. Внаслідок зміни конфігурації та розміру цитопедикул відзначали зміну ширини фільтраційних щілин, що свідчить про порушення процесу клубочкової фільтрації. Також спостерігали набухання та злиття окремих дрібних відростків подоцитів. Внаслідок цього формувались ділянки суцільної цитоплазми подоцитів. Щілинні діафрагми в окремих фільтраційних щілинах мали неоднорідну електронну щільність.



**Рис. 1.** I дослідна група: переповнення еритроцитами (1) гемокапілярів ниркового клубочка. Гематоксилін та еозин, ×1000  
**Fig. 1.** The 1<sup>st</sup> experimental group: the overflow of the renal glomerulus hemocapillaries with erythrocytes (1). Hematoxylin and eosin, ×1000



**Рис. 3.** Друга дослідна група: дистрофічні (1) та некротичні (2) зміни епітелію ниркових канальців, окремі ядра нефроцитів у стані пікнозу (2). Гематоксилін та еозин, ×200  
**Fig. 3.** The 2<sup>nd</sup> experimental group: dystrophic (1) and necrotic (2) changes in the renal tubules epithelium, individual nephrocyte nuclei in pyknosis (2). Hematoxylin and eosin, ×200



**Рис. 2.** I дослідна група: еритроцит (1) та маси плазми крові (2) у просвіті гемокапіляра ниркового клубочка, фенестри в цитоплазмі ендотелію (3), фільтраційні щілини (4). Електронограма, ×1900  
**Fig. 2.** The 1<sup>st</sup> experimental group: the erythrocyte (1) and blood plasma mass (2) in the renal glomerulus hemocapillary lumen, fenestrae in the endothelium cytoplasm (3), filtration slits (4). Electronogram, ×1900

У тварин другої дослідної групи (14-а доба експерименту), окрім структурних змін в ниркових тільцях, які були виявлені в черепах на 7-у добу експерименту, також відзначали виразне потовщення строми ниркових тілець. В окремих ниркових тільцях спостерігали деструктивні зміни капілярних петель та запустіння ниркових клубочків.

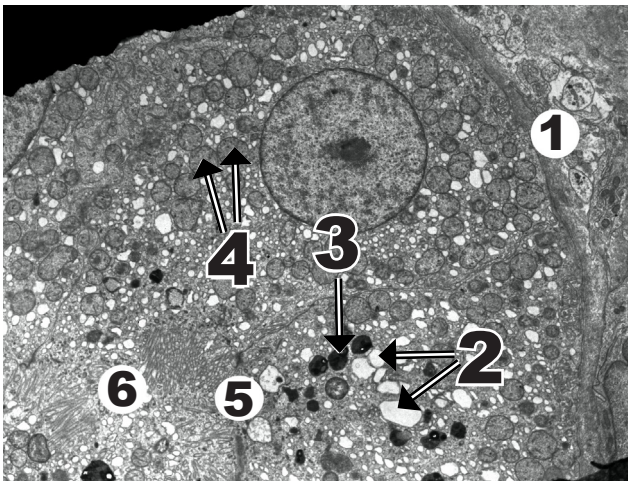
За гістологічного дослідження канальцевої частини нефрона виявили розвиток альтеративних змін нефроцитів (рис. 3), які були найбільш вираженими у проксимальних та дистальних сегментах нефрона. Зазначені структурні зміни реєстрували у тварин першої та другої дослідних груп. У цитоплазмі окремих епітеліоцитів проксимальних канальців нагро-

маджувалась надмірна кількість ацидофільних округлих крапель. В просвіті ниркових канальців візуалізувались гомогенні ацидофільні циліндри. В епітелії окремих дистальних канальців локалізувались вакуолі, заповнені оптичносвітлою цитоплазматичною рідиною. За фарбування гістопрепаратів суданом III відкладання нейтральних жирів в таких ділянках цитоплазми нефроцитів не виявили. Також відзначали некротичні зміни окремих нефроцитів, внаслідок розвитку яких зустрічались ядра нефроцитів у стані пікнозу (рис. 3).

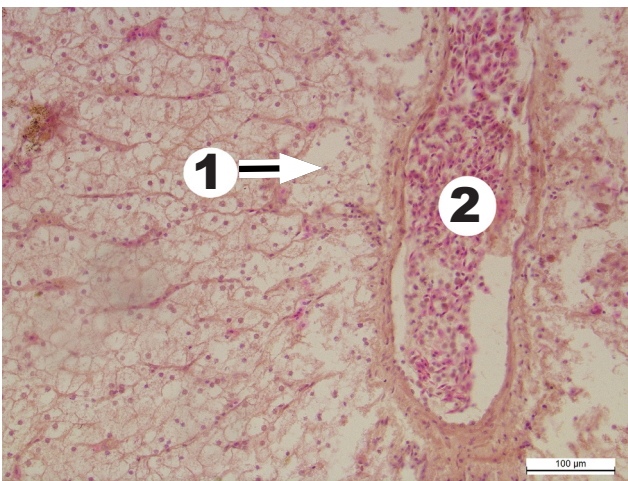
За електронномікроскопічного дослідження проксимальних канальців виявили дегенеративні зміни, які супроводжувались розширенням канальців гладкої ендоплазматичної сітки, нагромадженням цитососом, заповнених вмістом високої електронної щільності, лізосом з гетероморфним вмістом (рис. 4). Також спостерігали набухання мітохондрій, деструкцію їх крист. Базальна мембрана в проксимальних канальцях потовщувалась. Окрім цього, в цитоплазмі проксимальних канальців траплялися автофаголізосоми, заповнені інтенсивносіюфільним вмістом. Також реєстрували вогнищеву деструкцію щітчасткової облямівки проксимальних звивистих канальців. За розвитку некротичних змін нефроцитів ядро епітеліоцита зменшувалось в об'ємі, переповнювалось інтенсивноконденсованим хроматином, а цитоплазматичні органи зазнавали вираженої деструкції, візуалізувались лише їхні фрагменти.

Окрім дистрофічних та некротичних змін нефроцитів, реєстрували появу апоптичних тілець, що свідчить про розвиток апоптозу окремих клітин епітелію ниркових канальців.

За гістологічного дослідження печінки виявили дистрофічні та некротичні зміни гепатоцитів, а також гіперемію судин венозного русла печінки (рис. 5).

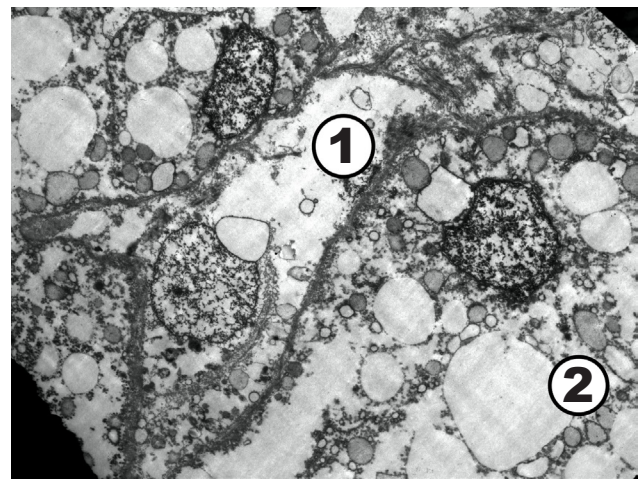


**Рис. 4.** Друга дослідна група: неоднорідне потовщення базальної мембрани епітелію проксимального каналця (1), розширені каналці гладкої ендоплазматичної сітки (2), цитосоми овальної форми (3), деструкція крист мітохондрій (4), автофаголізосоми в апікальній частині цитоплазми (5), вогнищева деструкція щіточкової облямівки (6). Електронограма,  $\times 2200$   
**Fig. 4.** The 2<sup>nd</sup> experimental group: heterogeneous thickening of the proximal tubule epithelium basal membrane (1), dilated tubules of the smooth endoplasmic reticulum (2), oval-shaped cytosomes (3), destruction of mitochondrial cristae (4), autophagolysosomes in the apical part of the cytoplasm (5), focal destruction of the brush border (6). Electrogram,  $\times 2200$



**Рис. 5.** Друга дослідна група: ядра некротизованих гепатоцитів у стані пікнозу (1), розширення та переповнення кров'ю міжчасточкової вени (2)  
**Fig. 5.** The 2<sup>nd</sup> experimental group: nuclei of necrotized hepatocytes in pyknosis (1), expansion and overflow of interlobular vein with blood (2)

Окрім цього, в дослідних тварин зменшувалась щільність меланомакрофагальних комплексів у печінці. За дослідження гістопрепаратів, пофарбованих суданом III, встановили неоднорідне зменшення вмісту ліпідних вакуолей в цитоплазмі гепатоцитів у тварин першої та другої дослідних груп. Треба зазначити, що у черепах фізіологічним явищем є наявність значної кількості нейтральних жирів в цитоплазмі гепатоцитів, що ми також виявили за дослідження тварин контрольної групи.



**Рис. 6.** Друга дослідна група: ультраструктурні зміни гепатоцитів; ділянки деструкції цитоплазматичних органел (1), ліпідні вакуолі неправильної округлої форми (2). Електронограма,  $\times 1900$   
**Fig. 6.** The 2<sup>nd</sup> experimental group: ultrastructural changes of hepatocytes; sites of cytoplasmic organelles destruction (1), lipid vacuoles of irregular rounded shape (2). Electrogram,  $\times 1900$

За проведення трансмісійної електронної мікроскопії печінки дослідних черепах реєстрували деструкцію цитоплазматичних органел (рис. 6). Ліпідні вакуолі були неоднакового розміру, неправильної округлої форми. Кількість гранул глікогену в цитоплазмі гепатоцитів в дослідних тварин знижувалась.

Варто зазначити, що біохімічні показники сироватки крові рептилій в нормі і за патологічних станів на сьогодні вивчені недостатньо. Оцінка біохімічних показників сироватки крові відображає метаболічний статус тканин та клінічний стан організму, дозволяє оцінити альтерацію та порушення функцій внутрішніх органів, розвиток адаптивних реакцій тощо. Біохімічні показники сироватки крові червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*), яким парентерально вводили гентаміцин в дозі 10 мг/кг, наведено в табл.

**Таблиця.** Біохімічні показники сироватки крові червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*) за парентерального введення гентаміцину (M $\pm$ m)  
**Table.** Biochemical indicators of blood serum in red-eared freshwater sliders (*Trachemys scripta elegans*) under parenteral gentamicin administration (M $\pm$ m)

Показник Indicator	Перша дослідна група 1 <sup>st</sup> group	Друга дослідна група 2 <sup>nd</sup> group	Контроль-на група Control group
Активність АсАТ, од./л AST activity, un./L	351,25 $\pm$ $\pm 26,54^{***}$	163,75 $\pm$ $\pm 3,14^{***}$	55,5 $\pm$ $\pm 2,66$
Активність АлАТ, од./л ALT activity, un./L	14,9 $\pm$ $\pm 0,95^*$	18,68 $\pm$ $\pm 1,11^{**}$	13,76 $\pm$ $\pm 0,33$
Сечова кислота, ммоль/л Uric acid, mmol/l	0,055 $\pm$ $\pm 0,00339^{***}$	0,048 $\pm$ $\pm 0,0032$	0,024 $\pm$ $\pm 0,0357$
Сечовина, ммоль/л Urea, mmol/l	11,14 $\pm$ $\pm 0,43^{***}$	10,45 $\pm$ $\pm 0,84^{***}$	4,28 $\pm$ $\pm 0,54$

**Примітка.** Різниця із показниками контрольних тварин вірогідна за \* — P<0,05, \*\* — P<0,01, \*\*\* — P<0,001.  
**Note.** The difference with the control indicators is significant by \* — P<0.05, \*\* — P<0.01, \*\*\* — P<0.001.



У результаті проведеного нами дослідження встановлено зростання активності амінотрансфераз у дослідних черепах. Треба зазначити, що літературні дані щодо клінічного значення показників аланінамінотрансферази в плазунів досить обмежені. Аспартат-амінотрансфераза (АсАТ) в плазунів є неспецифічним ферментом, локалізується в багатьох органах, проте його концентрація найвища в печінці та м'язах, а підвищення активності АсАТ в рептилій може перш за все вказувати на ураження печінки [8, 23]. Виявлені нами некротичні зміни гепатоцитів могли спричинити підвищення активності амінотрансфераз у черепах, яким парентерально вводили гентаміцин.

Оцінка рівня сечовини та сечової кислоти сироватки крові у рептилій є важливою складовою діагностики захворювань нирок [5]. У результаті проведеного дослідження встановлено зростання концентрації сечовини та сечової кислоти сироватки крові червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*) за парентерального введення гентаміцину (табл.). На нашу думку, зростання концентрації сечовини та сечової кислоти сироватки крові в дослідних черепах розвивалось унаслідок пошкодження структурних компонентів фільтраційного бар'єру та альтерації епітелію каналцевої частини нефрона.

Сечовина є одним з основних кінцевих продуктів метаболізму азоту в більшості прісноводних черепах [22]. Зазвичай в сухопутних видів плазунів концентрація сечової кислоти сироватки крові є вищою, ніж у рептилій з водяним або напівводяним способом життя. Сечова кислота у ящірок та змій переважно є основним азотистим метаболітом, який виводиться з сечею, утворюючи від 54,55% до 67,51% загального екскреторного азоту. Виділення нерозчинної сечової кислоти як основного азотистого кінцевого продукту метаболізму допомагає сухопутним рептиліям заощаджувати воду, що особливо важливо для тварин, які населяють засушливі природні ареали [4]. Однак в сухопутних плазунів рівень сечової кислоти виразно зростає за багатьох патологічних станів, особливо за ураження органів сечової системи, індукуючи розвиток вісцеральної форми сечокиислої діатезу. Розвиток вісцеральної подагри відзначається нагромадженням уратів у внутрішніх органах, з появою в таких ділянках некротичних змін та гранулематозного запалення — формування подагричних тофусів [10].

У попередніх експериментальних дослідженнях, проведених на ховрахових зміях (*Pitophis melanoleucus catenifer*), за внутрішньом'язового введення гентаміцину в дозі 50 мг/кг отримали виражену нефропатію з розвитком тубулярного некрозу та вісцеральної подагри [10]. У наших дослідженнях ми не спостерігали макроскопічних ознак вісцеральної подагри в червоновухих прісноводних черепах (*Trachemys scripta elegans*), яким внутрішньом'язово вводили гентаміцин в дозі 10 мг/кг. На нашу думку, це пов'язано з тим, що у прісноводних черепах, зокрема в червоновухій прісноводній черепахи (*Trachemys scripta elegans*), основним

продуктом азотистого метаболізму є сечовина, а не сечова кислота, а також із використанням різних доз гентаміцину.

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено, що парентеральне введення червоновухим черепахам гентаміцину в дозі 10 мг/кг спричиняє пошкодження структурних компонентів фільтраційного бар'єру, альтеративні зміни епітелію проксимальних і дистальних ниркових каналців, а також збільшення концентрації сечовини та сечової кислоти, підвищення активності амінотрансфераз сироватки крові.

Перспективи подальших досліджень полягають у комплексному вивченні впливу різних груп антибіотиків на організм рептилій. Потребують уточнення оптимальні дози та способи введення антибіотиків в організм плазунів. Також необхідно вивчати особливості розвитку патологічних процесів у рептилій за дії антибактеріальних препаратів.

## Джерела

1. Garner MM, Jacobson ER. *Noninfectious Diseases and Pathology of Reptiles*. Volume 2. Boca Raton, CRC Press, 2021: 534 p. ISBN 9781498771580. DOI: 10.1201/9780429154317.
2. Glauert AM. *Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens*. Practical methods in electron microscopy. North-Holland, Elsevier, 1975: 256 p. ISBN 9780720442571.
3. Gumber S, Bhardwaj S, Mehan S, Khan Z, Narula AS, Kalfin R, Tabrez S, Zughaibi TA, Wasi S. Renal mitochondrial restoration by gymnemic acid in gentamicin-mediated experimental nephrotoxicity: evidence from serum, kidney and histopathological alterations. *Front. Pharmacol.* 2023; 4: 1–16 DOI: 10.3389/fphar.2023.1218506.
4. Haggag G, Hassan R. Main excretory end-products of protein and purine metabolism in lizards and snakes. *Z. Vergl. Physiol.* 1968; 57: 423–427. DOI: 10.1007/BF00303065.
5. Halán M, Kottferová L, Račka K, Lam A. The amount of food ingested and its impact on the level of uric acid in the blood. *Animals.* 2022; 12 (21): 2959. DOI: 10.3390/ani12212959.
6. Horalsky LP, Khomych VT, Kononskyi OI. *Basics of Histological Technique and Morphofunctional Research Methods in Normal and Pathological Conditions*. Zhytomyr, Polissya Publ., 2015: 286 p. (in Ukrainian)
7. Kotsymbas GI, Dankovych RS, Stronskyi YS, Shchebentovska OM, Zaitsev OO. *Diseases of Reptiles*. Lviv, Poster Publ., 2012: 240 p. (in Ukrainian)
8. Mader DR. *Clinical Pathology of Reptiles*. In: Campbell TW. *Reptile Medicine and Surgery*. Elsevier, 2006: 248–225. ISBN 9780721693279.
9. Mader DR, Divers J. *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*. Elsevier, 2014: 462 p. ISBN 978-1-4557-0893-2. DOI: 10.1016/C2010-0-67117-3.
10. Montali RJ, Bush M, Smeller JM. The pathology of nephrotoxicity of gentamicin in snakes. A model for reptilian gout. *Vet. Pathol.* 1979; 16 (1): 108–115. DOI: 10.1177/030098587901600111.
11. Origi FC, Jacobson ER. Diseases of the respiratory tract of chelonians. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 2000; 3 (2): 537–549. DOI: 10.1016/S1094-9194(17)30088-9.
12. Petrovska I, Salyha Y, Vudmaska I. *Statistical Methods in Biological Research*. An educational and methodological manual. Kyiv, Agrarian Science Publ., 2022: 172 p. (in Ukrainian)
13. Pincheira-Donoso D, Bauer AM, Meiri S, Uetz P. Global taxonomic diversity of living reptiles. *PLoS ONE.* 2013; 8 (3): e59741. DOI: 10.1371/journal.pone.0059741.

14. Randjelović P, Veljković S, Stojiljković N, Sokolović D, Ilić I. Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI J.* 2017; 24 (16): 388–399. DOI: 10.17179/excli2017-165.
15. Raphael B, Clark CH, Hudson R. Plasma concentration of gentamicin in turtles. *J. Zoo Anim. Med.* 1985; 16 (4): 136–139. DOI: 10.2307/20094769.
16. Reznikov O. Ethical problems in conducting experimental medical and biological research on animals. *Messenger NAS Ukraine.* 2001; 11: 30–33. Available at: <https://visnyk-nanu.org.ua/ojs/index.php/v/article/view/4483> (in Ukrainian)
17. Rodríguez PS, Stewart KM, Picknell A, Pemberton L, Tepedino A, Capaldo D, Dennis MM. Pathology of hatchling hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) mortalities occurring while under rehabilitative care, 2015–21. *J. Wildlife Diseases.* 2023; 59 (1): 109–120. DOI: 10.7589/JWD-D-22-00013.
18. Salyha YT, Snitynskyi VV. *The Electron Microscopy of Biological Objects.* Lviv, Svit Publ., 1999: 152 p. (in Ukrainian)
19. Schilliger L, Paillusseau C, François C, Bonwitt J. Major emerging fungal diseases of reptiles and amphibians. *Pathogens.* 2023; 12 (3): 429. DOI: 10.3390/pathogens12030429.
20. Shine R. Reptiles. *Curr. Biol.* 2013; 23 (6): 227–231. DOI: 10.1016/j.cub.2013.02.024.
21. Skripka MV, Panikar II, Kyrychko BP, Tul OI. The morphological features of the digestive tube in sand lizards, *Lacerta agilis* (*Sauria, Lacertidae*). *Zoodyversity.* 2020; 54 (5): 375–382. DOI: 10.15407/zoo2020.05.375.
22. Uchiyama M, Kikuchi R, Konno N, Wakasugi T, Matsuda K. Localization and regulation of a facilitative urea transporter in the kidney of the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *J. Exp. Biol.* 2009; 212 (2): 249–256. DOI: 10.1242/jeb.019703.
23. Wright K. Feeling green: Diagnosing and managing liver disease in reptiles. *Proc. Assoc. Reptil. Amphib. Veterinar.* Dallas, Texas, USA, 2012: 31–36.

## Pathomorphological changes of kidneys, liver and blood serum biochemical parameters in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans* Wied, 1839) as a result of gentamicin parenteral injection

R. S. Dankovych, V. I. Chuliuk

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

Principles of reptile treatment are significantly different from the drug therapy for mammals and birds, which is primarily due to anatomical and physiological peculiarities of reptiles. Gentamicin, which has a nephrotoxic effect, is used for the treatment of reptile infectious diseases. For the purpose of studying the effects of gentamicin on reptiles a serum biochemical analysis was conducted determining aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activity, urea and uric acid concentration. Two research groups of red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) were formed for the study; every 48 hours they received an injection of gentamicin in a dose 10 mg/kg into thoracic limb muscles. The animals of the first research group were withdrawn from the experiment on the 7<sup>th</sup> day, and the animals of the second group were withdrawn on the 14<sup>th</sup> day of the research. As a result of parenteral administration of gentamicin in turtles, there is an increase in the concentration of uric acid and urea, as well as the activity of aspartate aminotransferases and alanine aminotransferases in blood serum. In the kidneys, structural changes of the glomeruli were found: alternative changes in podocytes, as well as degenerative and necrotic changes in the renal tubule epithelium. Degenerative changes of nephrocytes were accompanied by the dilation of smooth endoplasmic reticulum tubules, mitochondrial crista destruction, accumulation of autophagolysosomes, cytosomes and lysosomes in the cytoplasm. Furthermore, signs of nephrocyte apoptosis with the formation of apoptotic bodies were detected. A liver examination revealed dystrophic and necrotic changes in hepatocytes, expansion and overflow of the vessels of the venous beds.

**Key words:** reptile, gentamicin, turtles, kidneys, liver, urea, uric acid, ASAT, ALAT, pathomorphology



## Життя в науці і для науки (пам'яті Р. С. Федорука)

I. I. Ковальчук, Я. В. Лесик, В. В. Каплінський,  
М. М. Цап, А. З. Пилипець  
irena.kovalchuk@ukr.net



Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

### ORCID:

I. I. Kovalchuk <https://orcid.org/0000-0001-9932-6315>  
Y. V. Lesyk <https://orcid.org/0000-0002-7845-7006>  
V. V. Kaplinskyi <https://orcid.org/0000-0002-0138-9957>  
M. M. Tsap <https://orcid.org/0000-0002-1446-0409>  
A. Z. Pylypets <https://orcid.org/0000-0002-4730-7339>

У статті проаналізовано життєвий і творчий шлях відомого фізіолога, вченого, доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Федорука Ростислава Степановича. Відображено наукову, педагогічну, організаційну та громадську діяльність професора. Представлено результати фундаментальних досліджень і прикладних розробок, одержаних Р. С. Федоруком під час виконання завдань, які входили до наукових програм Національної академії аграрних наук і Науково-методичного центру «Фізіологія тварин». Висвітлено основні результати проведених теоретичних та прикладних досліджень під керівництвом Р. С. Федорука щодо впливу нових ефективних кормових добавок і біологічно активних речовин, що апробовані та впроваджені на виробництві, зокрема в галузі скотарства, вівчарства, кролівництва, птахівництва та бджільництва, обґрунтовано пропозиції та способи щодо їх використання. Ростислав Степанович Федорук — автор понад 500 наукових праць, зокрема монографій, навчальних посібників, довідників тощо. Тривалий час був заступником головного редактора і членом редколегій численних наукових видань, членом Українського біохімічного та фізіологічного товариств, наукового товариства імені Т. Г. Шевченка. З 2015 р. обраний віце-президентом Українського фізіологічного товариства імені П. Г. Костюка. Наукова діяльність Р. С. Федорука і його учнів присвячена вивченню процесів адаптації тварин до агроекологічних умов утримання, з'ясуванню фізіолого-біохімічних механізмів впливу біологічно активних добавок на основний та проміжний обміни, функцію розмноження і продуктивність сільськогосподарських тварин, оцінку біологічної цінності продукції тваринництва. За період наполегливої творчої та науково-педагогічної діяльності Р. С. Федорук здобув вагомий авторитет науковця та вченого і користувався глибоким шануванням серед колег, впливав на формування української аграрної науки та сформував свою наукову школу дослідників.

**Ключові слова:** наука, освіта, фізіологія, екологія, нанотехнології



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Кожна людина залишає після себе більш або менш помітний слід на землі. Саме згадування залежить від індивідуальних особливостей людини. Такою особистістю, яка залишила помітний слід у спогадах людей, був Ростислав Степанович Федорук — ми знали його

упродовж багатьох років, глибоко поважали і шанували. Бачились щоденно у різних життєвих ситуаціях як громадського, так і особистого характеру. Ростислав Степанович — особистість з великої літери, мав завжди свою думку і був українцем в душі. Дуже любив

Україну, її землю, рідну мову. Крім того, умів милуватися її природою, був уважним спостерігачем і дуже тонко сприймав усе красиве навколо, а воно часто знаходило відповідне відчуття у його серці. Волею долі йому був даний особливий талант повторитися у своїх учнях, володіти, по суті, справді безцінним даром педагога і постійно зцілювати втомлених духом, додавати силу й здоров'я, розум й насагу.

Ростислав Степанович Федорук народився 11 серпня 1949 р. в с. Старий Почаїв Кременецького р-ну Тернопільської обл. Висока духовність середовища, в якому він зростав, доброта, яка дісталася від мами, працьовитість — від батька, людяність, уміння бути вище від усього дріб'язкового і повсякденного, інтелектуальна культура — це ті якості, які були притаманні Ростиславу Степановичу.

Закінчивши у 1967 р. Почаївську середню школу, у 1968–1970 рр. відбував строкову службу в Радянській армії. Демобілізувавшись 1970 р., вступив до Львівського зооветеринарного інституту на ветеринарний факультет, який у 1975 р. закінчив з відзнакою за фахом «ветеринарія». Наполегливість, працелюбність, готовність у будь-яку мить узяти на себе відповідальність знадобилися не тільки у навчанні, але й стали у пригоді на виробництві. Згідно з розподілом, працював у 1975 р. старшим ветеринарним лікарем Пустомитівської птахофабрики Львівської обл.

Ростислав Степанович проявляв свої здібності до науки ще в інституті, будучи цікавим експериментатором, вмів системно мислити та мав широкий спектр знань. Це дало можливість продовжити навчання та розвиватися у науковій сфері як аспірант. У 1975–1978 рр. навчався в аспірантурі з відривом від виробництва за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» у лабораторії фізіології лактації Українського науково-дослідного інституту фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Південного відділення ВАСГНІЛ (м. Львів), науковий керівник — доктор біологічних наук В. І. Третевич.



**Фото 1.** Студентські роки Р. С. Федорука у Львівському зооветеринарному університеті (1972 р.)  
**Photo 1.** Student years of R. Fedoruk in Lviv Zooveterinary Institute (1972)



**Фото 2.** Студентські роки у Львівському зооветеринарному університеті (1972 р.)  
**Photo 2.** Student years in Lviv Zooveterinary Institute (1972)



**Фото 3.** Р. С. Федорук — аспірант Українського науково-дослідного інституту фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин  
**Photo 3.** Rostyslav Fedoruk as a PhD student in Ukrainian Scientific and Research Institute of Physiology and Biochemistry of Farm Animals

Трудову діяльність розпочав молодшим науковим співробітником (1979–1980), а з 1980 по 1981 р. працював науковим співробітником лабораторії фізіології лактації Українського науково-дослідного інституту фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин. У листопаді 1981 р. захистив кандидатську дисертацію на тему: «Вивчення ролі глікопротеїнів в утворенні молока у корів» за спеціальністю 03.00.13 «фізіологія людини і тварин». У дисертаційній роботі

з використанням методу артеріовенозної різниці по молочній залозі з'ясовано фізіологічну роль окремих моноцукрів (гексоз, фукози, гексозамінів) вуглеводних компонентів глікопротеїнів у процесах секреції молока в корів залежно від технології доїння й аліментарних чинників. Доведено фізіологічну здатність тканин альвеолярного відділу молочної залози лактуючих корів



**Фото 4.** Засідання вченої ради Інституту біології тварин УААН (2004 р.)

**Photo 4.** Meeting of the Scientific council of the Institute of Animal Biology UAAS (2004)



**Фото 5.** Р. С. Федорук — заступник директора з наукової роботи Інституту біології тварин НААН за робочим столом

**Photo 5.** R. S. Fedoruk as a the deputy director for scientific work of the Institute of Animal Biology NAAS at his workplace



**Фото 6.** Колектив створеної у 2000 році лабораторії екологічної фізіології та біохімії (2002 р.)

**Photo 6.** The staff of the Laboratory of environmental physiology and biochemistry established in 2000 (2002)

до біосинтезу сіалових кислот і гексозамінів, використання глікопротеїнів крові у синтезі вуглевод-білкових комплексів молока [25, 26, 27, 46, 47].

З 1982 по 1989 р. Р. С. Федорук працював на посаді старшого наукового співробітника у лабораторії фізіології лактації Українського науково-дослідного інституту фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин. Вчене звання старшого наукового співробітника Р. С. Федорука присвоєне у 1984 р. Наказом УААН у 1989 р. Р. С. Федорука переведено в Науково-дослідний Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН на посаду заступника директора Інституту з наукової роботи з питань тваринництва.

Після об'єднання двох наукових установ в Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН у 1997–1998 рр. Р. С. Федорук був завідувачем лабораторії екології і токсикології Інституту землеробства і біології тварин УААН, у 1998–2000 рр. — заступником директора з наукової роботи з питань тваринництва цього ж інституту, з 2000 р. — заступником директора з наукової роботи Інституту біології тварин УААН й одночасно за сумісництвом завідувачем лабораторії екологічної фізіології та якості продукції.

За сприяння Ростислава Степановича зміцнено матеріально-технічну базу Інституту, підвищено результативність наукових досліджень, покращено підготовку наукових кадрів, розширено наукові зв'язки з провідними науковими центрами та установами, навчальними закладами й іноземними вченими. Як член Відділення зоотехнії НААН, Р. С. Федорук проводив значну роботу щодо визначення пріоритетних фундаментальних і прикладних напрямів досліджень в галузі тваринництва, формування програм наукових досліджень та завдань.

Основними напрямками наукової діяльності Р. С. Федорука були: вивчення процесів адаптації тварин до агроекологічних і технологічних умов утримання, з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів впливу біологічно активних добавок на основний та проміжний обміни, функцію розмноження і продуктивність тварин, а також еколого-біохімічна оцінка продукції тваринництва за дії техногенних та аліментарних чинників; науково-організаційної діяльності — забезпечення планування і виконання науково-дослідних робіт з фундаментальних і прикладних напрямів досліджень Інституту та НМЦ «Фізіологія та біохімія сільськогосподарських тварин», методичного рівня проведення, результативності та ефективності завершення, організація контролю наукового рівня досліджень.

Як заступник директора з наукової роботи, голова методичної комісії та заступник голови вченої ради, професор Р. С. Федорук плідно працював над формуванням і виконанням фундаментальних та прикладних завдань Інституту. Ростислав Степанович був досвідченим, ініціативним, високої наукової ерудиції вченим, мав особливі організаторські здібності та користувався заслуженим авторитетом серед вчених і науковців. У 2001–2005 рр. був керівником підпрограми 02. «До-

слідити фізіолого-біохімічні механізми і розробити біологічні основи підвищення продуктивності, адапційної та репродуктивної здатності тварин» НТП «Біологічні основи високої продуктивності тварин».

Наукову діяльність успішно поєднував з педагогічною. У 1998–1999 рр. працював на посаді старшого викладача, у 2000–2005 рр. — доцента, а в 2006–2014 рр. — професор кафедри технології молока і молочних продуктів Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького за сумісництвом. Як науковий керівник дипломних і магістерських робіт, підготував п'ять фахівців за напрямом «технологія молока і молочних продуктів».

За період наукової діяльності під керівництвом Ростислава Степановича сформовано нові напрями фундаментальних і прикладних досліджень щодо впливу техногенних й агроекологічних чинників різної інтенсивності на перебіг фізіолого-біохімічних процесів в організмі тварин, їхнього впливу на біологічну цінність та якість продукції. Вивчено вплив агроекологічних умов низинної, передгірної та гірської зон Прикарпаття на обмінні процеси в організмі великої рогатої худоби та овець, морфоструктурні та фізіологічні особливості функціонування окремих органів і систем у бджіл за цих умов [30, 31, 32, 33, 48].

В очолюваній Ростиславом Степановичем Федоруком лабораторії вперше започатковано вивчення біологічної дії та впливу нових органічних сполук Se, отриманих методом біотехнології, та їх поєднання із солями Cr(III), вітаміну E на організм корів, телят і бугаїв-плідників. Методом артеріовенозної різниці у молочній залозі з'ясовано окремі механізми фізіологічного впливу Cd в організмі телиць і лактуючих корів за умов експериментального навантаження водорозчинними його солями різної концентрації, рівень біотрансформації цього токсиканта у молоко [1, 8, 10, 12, 15, 29, 34, 54].

У 2005 р. Ростислав Степанович захистив докторську дисертацію на тему: «Адаптація корів до умов утримання і доїння та її корекція біологічно активними речовинами і фармакологічними препаратами» за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин», науковий консультант — доктор біологічних наук, професор, академік НААН Р. Й. Кравців. Основні положення — вивчення фізіолого-біохімічних закономірностей процесів молокоутворення у корів та компонентів молока за дії різних технологічних і кормових чинників. Обґрунтовано можливість корекції адапційної здатності організму та підвищення інтенсивності секреції молока у корів різної продуктивності з використанням фармакологічних адаптогенів, ферментних й антистресових препаратів. Установлено, що у високопродуктивних корів адаптаційні реакції до технологічних умов доїння формуються з більшим напруженням обмінних процесів, ніж у середньопроодуктивних. Доведено, що адаптаційна та детоксикаційна функції організму в умовах інтенсивного техногенного навантаження формуються на вищому рівні у корів 2–3 лактацій, і така здатність



**Фото 7.** Зустріч вчених Інституту біології тварин НААН та Інституту землеробства і тваринництва НААН з керівником Відділення зоотехнії НААН, академіком НААН Г. О. Богдановим (2004 р.). Справа наліво: В. В. Влізло; Г. О. Богданов, В. В. Гуменюк, Р. С. Федорук

**Photo 7.** The meeting of the scientists from the Institute of Animal Biology NAAS and the Institute of Agriculture and Animal Husbandry NAAS with the head of Department of zootechnics NAAS, Academician G. Bogdanov (2004). Right to left: V. Vlizlo, G. Bogdanov, V. Humeniuk, R. Fedoruk

більше виражена у пасовищний період. Показано, що до техногенного впливу метаболічно чутливіші тканини печінки і нирок, ніж інших органів. Обґрунтовано застосування у живленні корів за умов підвищеного техногенного навантаження розробленої мінерально-вітамінної добавки, яка містить мікроелементи, вітамін D, глутамат натрію і підвищує інтенсивність основного обміну, резистентність організму та секреторну функцію молочної залози. Досліджені особливості впливу окремих адаптогенів (кватерину, аміназину, феназепаму) і ферментних препаратів (целотерину) на інтенсивність сорбції і адсорбції молочною залозою корів метаболітів білкового, вуглеводного та ліпідного обміну. Розроблено методи і способи підвищення молочної продуктивності корів і біологічної цінності молока, які захищено чотирма авторськими свідоцтвами [7, 9, 18, 19, 50].

Після захисту дисертації започатковані нові напрями досліджень з впливу ГМО на формування адаптаційних реакцій та функціонування окремих органів і систем у лабораторних і продуктивних тварин. З'ясовано окремі фізіологічні механізми впливу тривалого згодовування бобів сої та випоювання «соєвого молока», отриманого з трансгенної сої, самицям тварин у різні вікові періоди. Доведено відсутність вираженого негативного впливу трансгенної сої на ріст і розвиток організму та його репродуктивну здатність у самиць тварин [20, 43, 44].

Учене звання професора Р. С. Федоруку присвоєно у 2007 р. За рішенням Президії УААН цього ж року Р. С. Федорука обрано членом-кореспондентом УААН по Відділенню ветеринарної медицини та зоотехнії за спеціальністю «фізіологія та біохімія тварин».

У 2006–2010 рр., як співавтор НТП 28 «Фізіолого-біохімічні основи збереження здоров'я та високої

продуктивності тварин НМЦ «Фізіологія тварин», Р. С. Федорук брав активну участь у формуванні завдань 1- і 2-го рівня програми, будучи заступником голови координаційно-методичної ради цього центру, забезпечував контроль науково-методичного рівня їх виконання [45, 51, 52].

Лабораторія екологічної фізіології та якості продукції під керівництвом завідувача Р. С. Федорука вивчала особливості формування резистентності, адаптації та продуктивної здатності організму сільськогосподарських тварин, розробляла і вдосконалювала методи екологічної й біохімічної оцінки сировини та продукції тваринництва з врахуванням агроекологічних умов виробництва і впливу абіотичних чинників. Пріоритетними напрями наукової діяльності лабораторії були: визначення моніторингу важких металів у системі корми — тварина — сировина — продукція тваринництва в умовах інтенсивного техногенного навантаження; дослідження імунобіологічної реактивності організму тварин залежно від агроекологічних умов довкілля та фізіологічних механізмів впливу БАД на організм продуктивних тварин за різних екологічних умов; екологічна і біохімічна оцінка сировини і продукції тваринництва з використанням сертифікованих аналітичних і випробувальних методів досліджень [14, 36, 37, 42].

Р. С. Федорук забезпечував формування нових напрямів та виконання тематики наукових досліджень лабораторії екологічної фізіології та якості продукції, зокрема щодо ведення органічного скотарства і бджільництва, застосування у живленні тварин цитратів мікроелементів, отриманих на основі нанотехнології. Результати досліджень дали змогу одержати принципово нові дані щодо впливу цих чинників на організм великої рогатої худоби, кролів, бджіл і лабораторних тварин. З'ясовано механізми впливу цитратів мікроелементів (Cr, Se, Co, Ge, Fe, Cu та ін.) на біологічну цінність і якість продукції скотарства, кролівництва та бджільництва за умов органічного сільськогосподарського виробництва. Проведено порівняльні дослідження біологічної дії нанотехнологічного германію



**Фото 8.** Колектив реорганізованої лабораторії екологічної фізіології та якості продукції (2010 р.)

**Photo 8.** The staff of the reorganized Laboratory of environmental physiology and product quality (2010)

цитрату та хімічно синтезованого за умов тривалого випоювання його різних доз тваринам трьох поколінь, що дало змогу з'ясувати окремі фізіологічні механізми впливу цих сполук на імунну, детоксикаційну, антиоксидантну та репродуктивну здатність організму тварин і визначити їх оптимальні кількості [2, 3, 4, 6, 38, 39, 40, 41].

Ростислав Степанович був заступником голови спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 із захисту докторських дисертацій за спеціальністю «Біохімія та фізіологія людини і тварин» в Інституті біології тварин НААН, членом Координаційно-методичної ради з виконання ПНД 35 «Фізіологія і біохімія живлення, високої резистентності та продуктивності тварин».

З 2015 по 2023 р. Р. С. Федорук працював головним науковим співробітником лабораторії екологічної фізіології та якості продукції. Основними напрямками його наукової діяльності було вивчення процесів адаптації тварин до агроекологічних і технологічних умов утримання, з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів впливу біологічно активних добавок на процеси обміну, функцію розмноження, продуктивність сільськогосподарських тварин і біологічну цінність продукції, дослідження фізіологічних механізмів дії органічних солей маловивчених мікроелементів — Cr, Se, Ge, Ni, Co, Cu, отриманих методами нанотехнології та хімічного синтезу, у сільськогосподарських тварин [5, 11, 21].

За період роботи отримано у співавторстві три авторські свідоцтва з питань адаптації та живлення корів, 14 патентів України щодо застосування біологічно активних добавок у великій рогатій худобі, кролів, бджіл. Р. С. Федорук був співавтором трьох книг, зокрема з історії науки Західного регіону України, двох підручників, чотирьох навчальних посібників, п'ятьох «Технічних умов України». За період наукової і науково-педагогічної діяльності опублікував понад 600 наукових праць, з них 50 — в іноземних наукових виданнях.

Під керівництвом Р. С. Федорука підготовлено і захищено вісім кандидатських (І. І. Ковальчук, Я. В. Лесик, О. П. Долайчук, І. О. Матюха, Ю. В. Потапчук, О. І. Колещук, Л. І. Романів, М. І. Храбко) і три докторські дисертації (І. І. Ковальчук, Я. В. Лесик, У. І. Тесарівська). Р. С. Федорук сформував наукову школу «Екологічна фізіологія високої продуктивності тварин». Учні професора продовжують вивчати механізми впливу агроекологічних, сезонних і техногенних факторів на біологічну цінність корму і продукції скотарства та бджільництва, розробляти способи і методи зниження негативного впливу важких металів на організм тварин і якість їх продукції, досліджувати механізми впливу важких металів в системі рослина — тварина — продукція для удосконалення технологічних елементів годівлі худоби та бджіл в умовах інтенсивного техногенного навантаження. Досліджено введення різних кількостей наноаквацитратів мікроелементів (Se, Cr, Co, Zn, Fe) до раціонів тварин, встановлено мінімальні фізіологічно активні та оптимальні їх дози для великої рогатої худоби

та кролів. Досліджено вплив цих сполук на: формування імунобіологічної реактивності в організмі, вміст у тканинах і рідинах макро- і мікроелементів, стан антиоксидантної, дезінтоксикаційної, репродуктивної та імунної систем, їхній вплив на ріст і розвиток телят, кроленят, а також роль у лікуванні та профілактиці мікроелементозів у тварин [13, 16, 17, 22, 36].

Вивчено вплив наноаквахелатів на біологічну цінність продукції тваринництва за показниками хімічного складу молока, м'яса, вмісту жирних кислот, мікроелементів і протеїнів. Отримано результати досліджень, які забезпечили розроблення методології вивчення біологічної дії наноаквахелатів в організмі тварин, а також їхнього впливу на біологічну цінність та якість продукції тваринництва. Встановлено певні відмінності дії наноаквацитратів Se, Cr, Fe в організмі тварин порівняно з іншими сполуками цих мікроелементів, що зумовлено їхньою підвищеною фізіологічною активністю та інтенсивністю всмоктування у травному каналі [23, 24, 28, 49, 50, 51, 53].

Отримано нові наукові дані щодо біологічної і продуктивної дії розроблених білково-мінеральних добавок на організмі кролів за різних способів утримання та годівлі, з'ясовано фізіологічні та біохімічні механізми впливу строків відлучення молодняку кролів, їхній вплив на імунобіологічну реактивність організму. Отримані результати експериментальних досліджень та апробація їх на виробництві були використані для розроблення патенту, практичних рекомендацій і технічних умов з питань ефективного ведення сучасного кролівництва та одержання екологічного і дієтичного м'яса.

За багаторічну сумлінну працю в наукових установах НААН Ростислав Степанович Федорук нагороджений: Почесною грамотою Кабінету Міністрів України (2004), Почесною грамотою Президії УААН (2004) та Почесною відзнакою УААН (2007), Почесною відзнакою Мінагрополітики України «Знак Пошани» (2009), Премією імені С. З. Гжицького (2012), Подякою Міністерства аграрної політики та продовольства України (2014), грамотами Академії наук вищої освіти України (2014, 2019), Національної академії аграрних наук України (2014), Українського фізіологічного товариства імені П. Г. Костюка (2015), Почесною грамотою Верховної Ради України (2019). Указом Президента України № 4/2020 від 13 січня 2020 р. за роботу «Створення нових мінеральних сполук і поліфункціональних наноматеріалів та їх використання у тваринництві та ветеринарній медицині» присуджено високу державну нагороду — Державну премію в галузі науки і техніки (2019).

Ростислав Степанович був членом Українського біохімічного та фізіологічного товариства, Наукового товариства імені Т. Г. Шевченка. З 2015 р. обраний віце-президентом Українського фізіологічного товариства імені П. Г. Костюка. Входив до редколегії Науково-технічного бюлетеня Інституту, наукових журналів «Біологія тварин», «Бджільництво України», «Тваринництво України». Очолював Державну кваліфікаційну



Фото 9. Члени спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01

Photo 9. The members of the specialized scientific council Д 35.368.01

комісію на біологічному факультеті Львівського національного університету імені І. Франка у 2013–2016 рр.

Під керівництвом Р. С. Федорука очолювана ним лабораторія багато років тісно співпрацювала з вищими навчальними закладами, зокрема Львівським національним університетом ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, Львівським університетом імені І. Франка, Національним університетом біоресурсів і природокористування України, Інститутом фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Дніпровським державним аграрно-економічним університетом, Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Окрім цього, за ініціативи Ростислава Степановича були підписані угоди про співпрацю зі Словацьким аграрним університетом, Краківським аграрним університетом і Люблінським природничим університетом. У рамках цих угод співробітники лабораторії проходили стажування в університетах Польщі та Словаччини і отримали гранти — *Travel Grants and Workshop* (2018, Польща) і *SaveBees — Save endangered bees to improve nutrition, health and quality of life — Vishegrad Fund Agency* (2019, Словаччина).

За роки сумлінної праці Ростислав Степанович Федорук здобув беззаперечний авторитет компетентного та досвідченого фахівця, мудрого і розсудливого керівника та щирого патріота своєї держави. Не виникає жодних сумнівів, що Р. С. Федорук достоту реалізувався як плідний науковець та професійний керівник. На кожній з цих нив у нього накопичився по-справжньому вражаючий перелік здобутків, якими можна і потрібно пишатись.

У різні часи, на різних посадах Ростислав Степанович неодноразово доводив свій професіоналізм та відданість своїй справі. Внесок ученого у становлення та розбудову української науки є справді неоціненним. Досвід та значний науковий доробок сьогодні слугують як теоретичним, так і практичним орієнтиром для нових поколінь. Професіоналізм, талант, безмежна відданість справі, працьовитість і наполегливість у досягненні поставлених цілей дали змогу досягти значних успіхів у професійній та науковій діяльності, здобути шану та повагу серед колег.





**Фото 10.** Наукова школа «Екологічна фізіологія високої продуктивності тварин»  
**Photo 10.** Scientific school "Ecological Physiology of High Productivity of Animals"



**Фото 11.** Вручення Почесної грамоти Верховної Ради України (2019 р.)  
**Photo 11.** Presentation of the Certificate of Honor of the Verkhovna Rada of Ukraine (2019)



**Фото 12.** Р. С. Федорук за написанням наукової публікації  
**Photo 12.** R. Fedoruk writing a scientific publication

Життєвий і творчий шлях Ростислава Степановича був наповнений щоденною і копіткою роботою, здебільшого непротими турботами, згідно з принципом: «Тільки той досягає мети, хто іде, вчиться жити в гармонії з людьми і природою, активно використовуючи для цього можливості науки». Своєю працею професор створив себе сам і своїм життєвим доробком гідно доповнював надбання і цінності національної еліти України.

Ростислав Степанович — приклад самовідданої праці, самовдосконалення і щирого служіння святому — своєму народу, Україні і науці. Стиль його життя: бути у постійному пошуку наукових рішень, які прискорили б економічний розвиток держави, а відповідно, благополуччя народу. У досягненні цього Ростиславу Степановичу були притаманні не тільки сила творчих ідей, а й потужність їх виконання та реалізації у практику життя. Досвід ученого переконує: щоб досягати окупних наукових рішень, потрібно мобілізувати свої бажання, талант, можливості й уміння. І допомагають цьому людська простота, доступність, увага до всіх і всього, притаманні професору.

Ростислав Степанович мав неймовірну харизму, був закоханий у свою справу. Його незмінними рисами завжди були: природний аристократизм, здатність тонко відчувати глибинну сутність актуальних питань науки, вміння бути вище від усього дріб'язкового і повсякденного, інтелігентність та висока інтелектуальна культура — якості, які одразу зачаровували всіх, хто був із ним знайомий. Професор був надзвичайно доброю, щирою людиною. Завжди доброзичливо ставився до підлеглих. У Ростислава Степановича була прекрасна риса — завжди робити людям добро, не пам'ятаючи зла, він характеризувався надзвичайним хистом спілкування й переконання у своїй слушності. Ростислав Степанович завжди уважно вислуховував, довго розмірковував, а тоді приймав рішення — і воно завжди було найоптимальнішим. Ростислав Степанович Федорук — справжній лідер, талановитий учений, мудрий наставник, душевна і щира людина. Україні справді пощастило мати такого досвідченого професіонала і відданого сина!

Відійшов у потойбічні засвіти і залишив земне життя Р. С. Федорук 21 червня 2023 р. Похований у містечку Пустомити Львівської обл.

Важко знайти слова віти, коли зупиняється серце людини, яка була важливою у житті не лише для родини, а й для учнів та колективу. Світлі спогади про тих, хто залишив по собі добрі справи та чесно прожив своє життя, завжди будуть у пам'яті. Адже відомо, що людина живе доти, поки про неї пам'ятають... Нехай добрий, світлий спомин про Ростислава Степановича, науковця з великої літери, педагога, наставника, вірного товариша назавжди залишиться у серцях рідних, учнів та колег, усіх, хто його знав, любив та шанував. Вічна та світла пам'ять...

## Література

- Bogdanov GO, Sologub LI, Yanovych VG, Fedoruk RS. Metanogenesis in the rumen of ruminants (ecological, microbiological, biochemical aspects). *Biol. Tvarin.* 2001; 3 (1): 7–21. (in Ukrainian)
- Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Khrabko MI, Tsap MM. Indicators of physiological status of the replacement heifers fed with diet containing genetically modified components. *Int. Sci. Conf. "Aktualne wyzwania naukowe w chowie i hodowli zwierząt"*. Kraków, 2011: 68–69.
- Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kovalchuk II, Kropivka SY. Physiological activity of germanium, chromium and selenium nano-aquacitrates in rats. *Biol. Tvarin.* 2014; 16 (3): 172.
- Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kovalchuk II. Immunological and reproductive functions of the female rats fed by natural and genetically modified soybeans. *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* 2014; 5 (1): 49–55. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i1.50.
- Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kropyvka SY. Physiological reactivity and antioxidant defense system of the animal organism induced by Germanium, Chromium, and Selenium "nano-aquacitrates". *Agricul. Sci. Pract.* 2015; 2 (2): 50–55. DOI: 10.15407/agrisp2.02.050.
- Dolaychuk OP, Matuykha OI, Fedoruk RS. Glycoproteins content and fatty acid composition of heifers blood plasma under condition of feeding "soy milk". *VII Conf. Young Res. "Fiziologia i biochemia w zewieniu zwierząt"*, Institute of Animal Physiology and Feeding nd. After Jan Kielanowski PAN in Jablonna. Krakow, 2010; 120–123.
- Fedoruk R, Kravtsiv R. The content of heavy metals in milk and tissues of cows at the area of technogenical contamination and children teeth dysphasia. *Ann. Univer. Mariae Curie-Skłodowska DDD.* 2005; XV (7): 258–263.
- Fedoruk R. Blood hormones and their arterio-venous difference by mammary gland in cows during administration of aminazin and phenazepam. *Ann. Univer. Mariae Curie-Skłodowska DDD.* 2002; XV (7): 303–306.
- Fedoruk R. Blood hormones and their arterio-venous differences in the mammary gland in cows when using aminazine II *Lviv-Lyubin Conf. Exp. Clin. Biochem.* 2004: 350–352.
- Fedoruk R., Treteviv V. The increase of adaptability of cows to the conditions of the industrial milk production technology. *Pol. Ukr. Sci. Conf. "Nauki o zwierzętach w XXI wieku"*, Krakow, 2001: 37–40.
- Fedoruk RS, Dolaychuk OP, Kovalchuk II, Tsap MM. Reactions of physiological systems rats' organism by watering them low and high doses Germanium "nano-aquacitrate". *Agricul. Sci. Pract.* 2015; 2 (3): 15–21. DOI: 10.15407/agrisp2.03.015. (in Ukrainian)
- Fedoruk RS, Khomyn MM, Vronska OT, Tsap OF, Kolisnyk GV, Kropyvka SY, Pylypiv II, Tokarchuk ZB. Physiological and biochemical status of the body of sheep in the conditions of the third zone of radioactive contamination. *Sci. Bull. LNUVMBT.* 2003; 5 (3): 97–103. (in Ukrainian)
- Fedoruk RS, Khrabko MI, Kaplunenko VG, Tesariwska UI, Denys GG. Microelements of female tissues of F<sub>1</sub> rats for the long-term effects of various doses of nano-germanium citrate 33. *Joint Annual Meeting of the German Society for Minerals and Trace Elements (GMS) with Zinc-UK. Zinc and other Transition Metals in Health and Disease, Aachen, Germany, 28–30 September 2017*: 30.
- Fedoruk RS, Kolechuk OI. Immunobiological and antioxidant status of bulls-sires organism at feeding selenium and chrome. *Int. Sci. Conf. "Osiagniecia naukowe a praktyka zootechniczna"*, Kraków, 2009: 23–27.
- Fedoruk RS, Kolisnyk GV, Humenyuk VV, Tsap OF, Khomyn MM, Kropyvka SY. Some features of phenol detoxification in the body of bulls from different ecological zones of the Carpathians *Physiol. J.* 2002; 48 (2):193. (in Ukrainian)
- Fedoruk RS, Kovalchuk II, Tsap MM, Kropivka SY. Metabolic processes in blood and quality of cows' milk in the period of feeding nano-co citrate. *Int. Conf. Biotechnol. Welfare Anim. Sci. Sess. "Perspectives for Cattle Breeding and Production"*, Kraków, 2017; 62.
- Fedoruk RS, Kovalchuk II. Biological effect nano-Co citrate in lactating cows. *XVII Middle Eur. Buiatr. Congr. Slovakia*, 2017: 96.
- Fedoruk RS, Kravtsiv RY, Kolisnyk GV, Ravis YF. Detoxification ability of the body and fatty acid composition of blood and milk lipids of cows under the conditions of technogenic load on the environment of varying intensity. *Sci. Techn. Bull. IAB.* 2004; 5 (1–2): 135–139. (in Ukrainian)
- Fedoruk RS, Kravtsiv RY. Physiological mechanisms of adaptation of animals to environmental conditions. *Biol. Tvarin.* 2003; 5 (1–2): 75–82. (in Ukrainian)

20. Fedoruk RS, Matyuha IO. Promising technologies for the production of "soymilk" for the needs of agriculture. *Sci. Tech. Bull. SSR-CIVMPFA IAB*. 2008; 9 (1/2): 138–143. (in Ukrainian)
21. Fedoruk RS, Romaniv LI, Kovalchuk II. The content of certain heavy metals in tissues and products of honeybees under the condition of their feeding with native soy flour adding chloride and aquanano chrome citrate. *Biol. Tvarin*. 2015; 17 (1): 140–148. DOI: 10.15407/animbiol17.01.140. (in Ukrainian)
22. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Khrabko MI, Tsap MM. Growth and development of the organism and immunophysiological indices of blood of male F<sub>2</sub> rats, affected by different doses of nanogermanium citrate. *Agr. Sci. Pract.* 2017; 4 (2): 14–22. DOI: 10.15407/agrisp4.02.014. (in Ukrainian)
23. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Kovalchuk II, Iskra RJ, Tsap MM, Khrabko MI, Koleschchuk OI. The indices of thyroid system and metabolism of rats under the influence of nanocomposition based on iodine and citrate. *Ukr. Biochem. J.* 2021; 93 (3): 92–100. DOI: 10.15407/ubj93.03.092.
24. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Kovalchuk II, Tsap MM, Kaplunenko VH, Koleschchuk OI, Khrabko MI. Biological effects of iodine, selenium, sulfur citrates in broiler chickens. *Reg. Mech. Biosys.* 2021; 12 (3): 113–120. DOI: 10.15421/022172.
25. Fedoruk RS, Treteviv VI, Melnyk JS. Sorption of certain precursors of milk depending on the physiological state of cows. *IV Ukr. Biochem Cong.* Kyiv, Naukova dumka Publ., 1982: 209 p. (in Ukrainian)
26. Fedoruk RS, Treteviv VI. Absorption of carbohydrate-protein compounds by the mammary gland of lactating cows. *3<sup>rd</sup> Ukr. Biochem. Cong.* 1977: 346. (in Ukrainian)
27. Fedoruk RS, Treteviv VI. Glycoprotein components of colostrum and milk of cows in different periods of lactation. *Bull. Agricult. Sci.* 1988; 6: 54–56. (in Ukrainian)
28. Fedoruk RS, Vlizlo VV, Kovalchuk II, Koleschchuk OI. Macro- and microelements of blood and its antioxidant activity in lactating cows under the action of iodine citrate in different doses. *Biol. Tvarin*. 2019; 21 (2): 96.
29. Fedoruk RS, Vronska OT, Kolisnyk GV, Rivis YF, Khomyn MM, Tsap OF, Kropyvka SY, Pylypiv II. Physiological and biochemical reactions of the body of cows to dietary loading with cadmium and zinc sulfate. *Ukr. Biochem. J.* 2002; 74 (4b): 109–110.
30. Fedoruk RS. Effect of phenazepam on the organism of first-born cows. *Herald Agr. Sci.* 1998; 8: 33–35. (in Ukrainian)
31. Fedoruk RS. Formation of adaptation in first-borns during the period of getting used to machine milking and the use of tranquilizers. *Sci. Tech. Bull. Inst. Anim. Physiol. Biochem.* 1997; 19 (1): 59–62. (in Ukrainian)
32. Fedoruk RS. Some blood metabolites and their arterio-venous difference in the mammary gland of cows during the period of use of tranquilizers. *Biol. Tvarin*. 1999; 1: 83–88. (in Ukrainian)
33. Fedoruk RS. The use of drugs of adaptive action during the period of transfer of cows to pasture maintenance. *Anim. Husb. Ukr.* 1998; 8–9: 5–6. (in Ukrainian)
34. Humenyuk VV, Fedoruk RS, Kolisnyk GV. Biochemical characteristics of some tissues of cows in the zone of environmental pollution. *Sci. Bull. LNUVMBT*. 2000; 2 (2): 52–54. (in Ukrainian)
35. Iskra RY, Vlislo VV, Fedoruk RS. Biological efficiency of citrates of microelements in animal breeding. *Agricult. Sci. Pract.* 2017; 4 (3): 28–34. DOI: 10.15407/agrisp4.03.028. (in Ukrainian)
36. Khomyn MM, Fedoruk RS, Koleschchuk OI. Antioxidant profile of the body of cows after feeding chromium and selenium supplements in the initial period of lactation. *Sci. Bull. LNUVMBT*. 2010; 12, 2 (44): 258–262. (in Ukrainian)
37. Kropyvka SY, Fedoruk RS, Khomyn MM, Kovalchuk II. Products of lipid peroxidation and immunobiological indicators of the body of cows at different levels of chromium in the diet. *Sci. Bull. LNUVMBT*. 2010; 12, 2 (44): 143–147. (in Ukrainian)
38. Lesyk YV, Fedoruk RS, Kropyvka SY. Influence of applying *Chlorella* suspension, sodium sulfate, chromium chloride and chromium citrate in rabbits' ration on antioxidant status of their organism. *X Young Sci. Meet. "Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition"*. Kraków, 2013: 159–162.
39. Lesyk YV, Fedoruk RS. Effects of dietary supplementation of lysine-protein and chromium chloride on lipid peroxidation and vitamin A and E content in the blood of rabbits. *VII Conf. Young. Sci. "Fiziologia i biochemia w zewieniu zwierzat"*. Kraków, 2010; 97–100.
40. Lesyk YV, Fedoruk RS, Dolaiuchuk OP. Immunobiological status of the organism of rabbits after feeding chromium chloride and lysine-protein supplement. *Sci. Tech. Bull. SSR-CIVMPFA IAB*. 2011; 12 (3, 4): 24–28. (in Ukrainian)
41. Lesyk YV, Fedoruk RS, Kyrychuk AP. Physiological-biochemical processes in the body and productivity of young rabbits after feeding chromium chloride. *Collect. Sci. Works Kharkiv State Zoovet. Acad. "Problems of zoengineering and veterinary medicine"*. 2011; 23 (2): 105–109.
42. Lesyk YV, Fedoruk RS. Growth intensity and slaughter performance of rabbits fed lysine-protein supplement and chromium chloride. *Sci. Bull. LNUVMBT* 2010; 12, 2 (44): 169–173. (in Ukrainian)
43. Matyuha IO, Fedoruk RS, Tsap MM, Koleschchuk OI, Kropyvka SY. Age-related dynamics of the intensity of lipoperoxidation processes and the activity of antioxidant defense enzymes in calves after the introduction of "soy milk" into the diet. *Sci. Tech. Bull. SSR-CIVMPFA IAB*. 2009; 10 (1–2): 181–184. (in Ukrainian)
44. Matyukha IO, Fedoruk RS. Current issues of using soybeans and products of its processing in animal husbandry: prospects and problems *Proc. Int. Sci. Pract. Conf. "Scientific support for innovative development of agricultural production in the Carpathian region"*. 2007: 247–256. (in Ukrainian)
45. Mazurkevich AY, Karpovskiy VI, Kambur MD, Trokoz VO, Fedoruk RS. *Physiology of Animals*. Vinnytsia, Nova Knyga, 2012: 424 p. (in Ukrainian)
46. Slobodianyk KF, Treteviv VI, Fedoruk RS. Reactivity of cows. *Anim. Husb. Ukraine*. 1983; 5: 20–21. (in Ukrainian)
47. Slobodianyk KF, Treteviv VI, Fedoruk RS. Influence of methods of maintenance on the physiological state and productivity of cows. *Bull. Agricult. Sci.* 1981; 12: 52–54. (in Ukrainian)
48. Treteviv VI, Fedoruk RS. Indicators of metabolic processes and further milk productivity of cows when feeding cattle in the dry season. *Sci. Tech. Bull. Ukr. Res. Inst. Physiol. Biochem. Agricult. Anim.* 1991; 13 (2): 9–12. (in Ukrainian)
49. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Kovalchuk II. The biological effect of citrates of microelements in lactating cows XVII. *Middle European Buiatrics Congress PROCEEDINGS BOOK*, Slovakia, May 3–6, 2017: 97.
50. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Makar IA. *Physiological and Biochemical Research Methods in Biology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. A handbook. Lviv, 2004: 399 p. (in Ukrainian)
51. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB. *Laboratory Research Methods in Biology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. Lviv, Spolom Publ., 2012: 764 p. (in Ukrainian)
52. Vlizlo VV, Fedoruk RS. *Science of the Western region of Ukraine (1990–2010)*. Section "Animal Husbandry and Veterinary Medicine". Lviv: PAIS Publ., 2011: 672. (in Ukrainian)
53. Vlizlo VV, Kovalchuk II, Koleschchuk OI, Tsap MM, Khrabko MI. The intensity of protein exchange and the content of glucoproteins in the blood of cows under the condition of feeding iodine citrate. *Biol. Tvarin*. 2019; 21 (2): 147.
54. Vronska OT, Fedoruk RS, Kolisnyk GV, Rivis YF, Khomyn MM, Tsap OF, Kropyvka SY, Pylypiv II. The influence of heavy metal compounds on indicators of immunobiological reactivity of the body of cows. *Mess. Lviv University. Biol. Ser.* 2003; 32: 178–185. (in Ukrainian)

## Living in science and for science (in memory of Rostyslav Fedoruk)

I. Kovalchuk, Ya. Lesyk, V. Kaplinskyi, M. Tsap, A. Pylypets  
irenakovalchuk@ukr.net

Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine

The article shows the life and scientific career of the famous physiologist, scientist, doctor of veterinary sciences, professor, corresponding member of the National Academy of Sciences Rostyslav Fedoruk. It describes the scientific, pedagogical, organizational and public activities of the professor. The results of fundamental research and applied developments obtained by R. Fedoruk during the performance of tasks that were part of the scientific programs of the NAAS and the Scientific and Methodological Center "Animal Physiology" are presented. The main results of the theoretical and applied research conducted under the leadership of R. Fedoruk regarding the influence of new effective feed additives and biologically active substances tested and implemented in production, in particular in cattle breeding, sheep breeding, rabbit breeding, poultry farming and beekeeping, and proposals and methods about their use are substantiated. Rostyslav Fedoruk is the author of more than 500 scientific works, including monographs, textbooks, reference books, etc. For a long time he was the deputy editor-in-chief and a member of the editorial boards of numerous scientific publications, a member of the Ukrainian Biochemical and Physiological Societies, the T. Shevchenko Scientific Society. Since 2015, he has been elected vice-president of the Ukrainian Physiological Society named after P. Kostyuk. The scientific activity of R. Fedoruk and his students is devoted to studying the processes of adaptation in animals to agroecological conditions of keeping, elucidating the physiological and biochemical mechanisms of the influence of biologically active additives on the main and intermediate exchanges, the reproductive function and productivity of farm animals, and the assessment of the biological value of animal husbandry products. During the period of persistent creative and scientific-pedagogical activity, R. Fedoruk gained a strong authority as a scientist and enjoyed deep respect among his colleagues, influenced the formation of Ukrainian agricultural science and formed his scientific school of researchers.

**Key words:** science, education, physiology, ecology, nanotechnology

# КОНКУРС НА ЗДОБУТТЯ ПРЕМІЇ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО



Інститут біології тварин НААН оголошує конкурс на здобуття Премії імені С. З. Гжицького. Премію імені С. З. Гжицького присуджують за наукові праці (цикл наукових праць) з фізіології і біохімії, живлення тварин, розроблення та впровадження нових біотехнологічних методів, препаратів, біологічно активних добавок, діагностикумів, створення нових порід, тилів і ліній сільсько-господарських тварин та птиці, а також за наукові роботи, які є значущими у розв'язанні актуальних проблем біології, агроекології, ветеринарної медицини.

Премію присуджують раз на два роки за результатами конкурсу, до участі в якому приймають роботи, виконані окремими науковцями або колективами авторів. Висунення робіт на здобуття Премії імені С. З. Гжицького проводять через вчену (науково-технічну) раду наукової установи чи закладу вищої освіти. Претендентом на отримання Премії може бути колектив до п'яти осіб. Кожен учасник може бути автором чи співавтором лише однієї з представлених на конкурс роботи або циклу робіт. Участь у конкурсі беруть наукові праці, від дня публікації яких минуло не менше шести місяців, але не більше п'яти років, а також винаходи після їх впровадження. Роботи, які вже отримали Державні або інші премії України, до конкурсу не приймають.

На розгляд конкурсного комітету Інституту біології тварин НААН претендентам необхідно подати такі документи:

- заява про участь у конкурсі з переліком членів авторського колективу;
  - анкета з вказаними особистими даними претендента(тів): ім'я, ПРІЗВИЩЕ, дата народження, місце роботи (адреса), посада, вчене звання, науковий ступінь, контактний телефон, e-mail, фото 3×4;
  - робота, яку рекомендують (цикл робіт, публікацій тощо);
  - анотація роботи з коротким викладом її змісту і значення для розвитку науки;
  - довідка про творчий внесок кожного з претендентів, підписана кожним з авторів роботи;
  - протокол вченої (науково-технічної) ради щодо рекомендації роботи на здобуття Премії;
  - за наявності — додаткові матеріали (рекомендаційні листи від відомих учених, акти апробації, акти впровадження, копії патентів, відгуки громадськості тощо);
  - претенденти відповідальні за академічну доброчесність.
- За результатами конкурсу буде видано диплом лауреата і пам'ятну відзнаку.

**Термін подання конкурсних матеріалів продовжено до 31 жовтня 2023 року.**

Адреса: Інститут біології тварин НААН, вул. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна.

Контактний тел.: (032) 260-07-95, факс (032) 270-23-89.

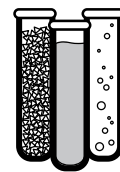
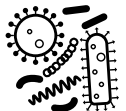
## ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН ПРОВОДИТЬ:

- Дослідження біохімічних показників (аналізатор *Humalyzer 2000*, Німеччина)
- Гематологічний аналіз (аналізатор *Mythic-18Vet*, Швейцарія)
- Мікробіологічні дослідження (посів на стерильність, антибіотикограма, склад мікрофлори кишечника тварин, мікробіологічний аналіз кормів, води, повітря)
- Імуноферментні дослідження (аналізатор *Stat Fax 3000*, Німеччина)
- Оцінка репродуктивної здатності тварин, штучне осіменіння, трансплантація ембріонів
- Селекційно-генетичні дослідження
- Дослідження яєць
- Дослідження кормів
- Визначення показників якості меду
- Дослідження молока
- Дослідження вовни і волосся
- Атомно-абсорбційний і атомно-емісійний аналіз концентрації хімічних елементів
- Аналіз органічних добрив

Організовує проведення досліджень на лабораторних тваринах і надає кваліфіковану інтерпретацію отриманих результатів.

\* можливе проведення інших досліджень

\*\* всі лабораторії інституту акредитовані для проведення досліджень



**Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса 38, м. Львів, 79034, Україна.**  
Тел.: (+38 032) 270-23-89, (+38 096) 858-37-76. e-mail: [markinfo@inenbiol.com.ua](mailto:markinfo@inenbiol.com.ua)  
**Завжди раді співпраці з Вами!**

**Запрошуємо розмістити рекламу Вашої компанії на сторінках наукового журналу «Біологія тварин»!**

Ми готові співпрацювати з Вами для створення ефективної рекламної стратегії, яка відповідає Вашим потребам і бюджету. Пропонуємо різні варіанти розміщення реклами, зокрема банери, оголошення або статейно-рекламні матеріали.

Реклама в нашому журналі дозволить Вам:

- залучити увагу науковців і фахівців до Вашої компанії та продукції;
- підвищити впізнаваність бренду та позиціонування Вашої компанії на ринку;
- залучити нових клієнтів і розширити Вашу клієнтську базу.

Пропозиції до співпраці на 2023 рік:

- **рекламний блок ½ сторінки** — 1000 грн в одному номері журналу, 2500 грн у трьох номерах журналу.
- **рекламний блок 1 сторінка** — 2000 грн в одному номері журналу, 5000 грн у трьох номерах журналу.

Контакти: (+38 096) 814-78-15, [inenbiol@gmail.com](mailto:inenbiol@gmail.com)

# ІММУНІТІ СТІМ

ЗАХИСТИТИ І ПЕРЕМОГТИ

Зміцнює організм тварин та птахів, захищаючи кишковий бар'єр

**Склад:** 1 л містить: Вітамін Е (олл-рац-альфатокоферилацетат), 25000 мг; Вітамін С, 2100 мг; Гліцин 10000 мг; Селен - Se (селеніт натрію), 0,5 мг; Марганець - Mn (Сульфат марганцю моногідрат), 500 мг; Ефірна олія розмарину 10000 мг; Ефірна олія чебрецю 10000 мг; Ефірна олія евкалипта 10000 мг; Натрію хлорид 1250 мг; Калію хлорид 500 мг; Дріжджовий екстракт 50000 мг; Полісахариди 20000 мг; Гліцерил поліетиленгліколь рицинолеат і Демінералізована вода до 1 л. **Застосування:** до і після вакцинації. ІММУНІТІ СТИМ розроблено для: контролю спалахів вірусних захворювань, контролю всіх видів стресу, покращення титрів вакцинації, прискорюють ріст, покращують конверсію корму, підвищують загальну опірність організму та покращують виводимість у несучок і покращує відтворну функцію. **Показання та цільові види тварин:** сільськогосподарські тварини, птиця, собаки та коти - посилення імунного статусу організму. **Протипоказання, побічні реакції та взаємодії:** Не описано. **Дозування та спосіб застосування:** перорально з питною водою. Ретельно розмішати 1 мл в 1-2 л питної води. **Зберігання.** Зберігати в недоступному для дітей місці. Зберігати в прохолодному, сухому місці, подалі від джерел тепла і прямих сонячних променів. **Для застосування у ветеринарній медицині.**

**Industrial Veterinaria, S.A.**  
a LIVISTO company  
Україна, 03040, м.Київ,  
вул. Васильківська, 14, оф. 422  
тел.: +38 044 206 24 30 | тел.: +38 067 238 33 77  
livisto.ua@gmail.com | livisto.com

