

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.*

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

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)

Бартлевський Павел, Ветеринарний коледж Онтаріо, Гуелфський університет (Канада)

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

Войтюк Олександр, Уппсальський університет (Швеція)

Віщур Олег Іванович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

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

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

Гунчак Алла Володимирівна, Інститут біології тварин НААН (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, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

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

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

Ковальчук Ірина Іванівна, Інститут біології тварин НААН (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 нейробіології (Франція)

Мудрон Павел, 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 аграрний університет (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 нейробіології (Франція)

Федорович Єлизавета Іллівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Федорук Ростислав Степанович, 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_j@inenbiol.com.ua.
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_j@inenbiol.com.ua.
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

2022 ▪ Volume 24 ▪ Issue 1 ▪ Issue DOI: 10.15407/animbiol24.01

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)

Pawel 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)

Rostyslav Fedoruk, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Mykhailo Gladij, The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Ukraine)

Mechyslav Gzhegotskyi, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)

Viktoriia Havryliak, Lviv Polytechnic National University (Ukraine)

Alla Hunchak, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Ruslana Iskra, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Liliia Kalachniuk, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (Ukraine)

Czesław Kłoczek, 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, Institute of Animal Biology NAAS (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 Agrarian 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 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>Символічний авторський колектив українських вчених, докторантів і аспірантів</i> Ненаписана стаття	3
<i>Berezenko A., Vabishchevych F., Godovskyi O., Nedosekov V.</i> Investigation of bovine coronavirus strain CV-315 cultural properties	6
<i>Kurhaluk N., Tkachenko H., Partyka T.</i> Photoperiod-induced alterations in biomarkers of oxidative stress in rats of different ages and individual physiological reactivity.....	11
<i>Мохначова Н. Б.</i> Генетична структура української популяції водяних буйволів за ISSR-PCR маркерами	19
<i>Козир В. С., Петренко В. І., Дімчя Г. Г., Майстренко А. Н.</i> Розчинність протеїну кормів як індикатор перетравності і доступності поживних речовин в раціонах бугайців.....	25
<i>Халак В. І., Жуковський О. М., Церенюк О. М.</i> Критерії відбору високопродуктивних кнурів-плідників і свиноматок за відгодівельними і м'ясними якостями їх потомства з використанням деяких оціночних індексів	34
<i>Рик Т. М.</i> Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1.....	40
<i>Лизогуб О. Ю.</i> Використання полівінілалкоголю та полівінілпіролідону для підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до запліднення методом ICSI	44
<u>Оглядова стаття</u>	
<i>Федорук Р. С., Ковальчук І. І., Мезенцева Л. М., Тесарівська У. І., Пилипець А. З., Каплуненко В. Г.</i> Сполуки Германію та їхня роль в організмі тварин	50

CONTENTS

<i>Symbolic author's team of Ukrainian scientists, doctoral students and graduate students</i> Unwritten paper	3
<i>Berezenko A., Vabishchevych F., Godovskyi O., Nedosekov V.</i> Investigation of bovine coronavirus strain CV-315 cultural properties	6
<i>Kurhaluk N., Tkachenko H., Partyka T.</i> Photoperiod-induced alterations in biomarkers of oxidative stress in rats of different ages and individual physiological reactivity.....	11
<i>Mokhnachova N. B.</i> Genetic structure of the Ukrainian water buffalo population by ISSR-PCR markers	19
<i>Kozyr V. S., Petrenko V. I., Dimchya G. G., Maistrenko A. N.</i> Feed protein solubility as an indicator of digestibility and availability of nutrients in the diets of bulls	25
<i>Khalak V. I., Zhukorsky O. M., Tserenyuk O. M.</i> Selection criteria for highly productive breeding boars and sows by fattening and meat qualities of their offspring using some evaluation indexes	34
<i>Ryk T. M.</i> Genotypic structure of micropopulations of domestic pigs at the locus of the ryanodine RYR1 receptor.....	40
<i>Lyzohub O. Ju.</i> Usage of polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone for preparation of thawed ejaculated boar sperm for fertilization by ICSI	44
<u>Review article</u>	
<i>Fedoruk R. S., Kovalchuk I. I., Mezentseva L. M., Tesarivska U. I., Pylypets A. Z., Kaplunenko V. H.</i> Germanium compounds and their role in animal body.....	50



Ненаписана стаття

Символічний авторський колектив українських вчених, докторантів і аспірантів

Університети, інститути, інші навчальні та наукові установи України

У цій статті відсутній текст, проте кілька чистих аркушів є символічною реакцією тисяч українських вчених на вимушене і суттєве обмеження, а часом і повне припинення їхньої наукової діяльності через російську військову агресію. Це, по суті, приклад не-написаної статті чи, правильніше, багатьох статей, демонстрація раптово перерваних війною наукових досліджень, проєктів, дисертацій. Зараз в Україні порушені наукові та навчально-освітні процеси, нищиться наукова інфраструктура, зазнали і продовжують зазнавати непоправних руйнувань наукові та освітні установи. На жаль, від початку війни в Україні загинули (в тому числі зі зброєю в руках) уже десятки українських науковців, докторантів, аспірантів, студентів. Для них ці сторінки є не білими, а назавжди залишаться скорботно-чорними.

Хоча представлена стаття є безслівною, вона покликана акцентувати увагу на злочинних діях російського агресора стосовно України і української науки зокрема. Також цією символічною публікацією вшановуємо пам'ять українських вчених, загиблих у війні, яка, на превеликий жаль, триває.

Ключові слова: російсько-українська війна, агресія, окупація, жертви, воєнні злочини, руйнування, наукова інфраструктура України

Unwritten paper

Symbolic author's team of Ukrainian scientists, doctoral students and graduate students

Universities, Institutes, other educational and scientific institutions of Ukraine

This article contains no text. However, the empty pages within this article symbolize the reaction of thousands of Ukrainian scientists toward the forced restriction and, in some cases, complete cessation of their scientific activities due to Russian military aggression. This is, in fact, an example of an unwritten paper, or rather many papers, demonstrations of research, projects, and dissertations that were abruptly interrupted by the war. Currently, scientific and educational processes in Ukraine are violated, scientific infrastructure is being destroyed, and scientific and educational institutions have suffered and continue to suffer an irreparable damage. Unfortunately, since the beginning of the war dozens of Ukrainian scientists, doctoral students, graduate students and students have died (including those who protected us with weapons in their hands). For them these pages are not white but will forever remain mournfully black.

Although the presented article is wordless, it is designed to focus attention on the criminal actions of the Russian aggressor against Ukraine, and in particular, the Ukrainian science. This symbolic publication also honors the memory of Ukrainian scientists who died during this war which unfortunately continues.

Key words: Russian-Ukrainian war, aggression, occupation, victims, war crimes, destruction, scientific infrastructure of Ukraine



Investigation of bovine coronavirus strain CV-315 cultural properties

A. Berezenko^{1,2}, F. Vabishchevych², O. Godovskyi², V. Nedosekov¹

Nastia4477@gmail.com

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
15 Heroyiv oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

²Biotestlab LLC,
57a Volodymyrska str., Vasylkiv, Obukhiv district, Kyiv region, 08601, Ukraine

The purpose of this study was to investigate the features of cultivation of bovine coronavirus strain CV-315 isolated in Ukraine from a calf with coronavirus infection and to select optimal methods of virus cultivation to obtain viral material with the highest possible titers of infectious activity in order to develop manufacturing technology of means of immunoprophylaxis and specific diagnostics. During the study, the influence of a number of factors on the accumulation of strain CV-315 was studied: the presence and concentration of trypsin in the nutrient medium, the effect of fetal bovine serum, the degree of cell culture monolayer during virus infection, also the virus dose, temperature and the term of cultivation. According to the results, it was established that bovine coronavirus strain CV-315 has the highest infectious activity when cultured for 72 hours before the manifestation of CPE of 70–80%, without the addition of trypsin and fetal bovine serum content of 2% at 37±0.5°C. It was also found that the optimal infective dose is 0.1–0.01 viral particles per cell for infection of the fully formed monolayer of MDBK cell culture. The obtained results will be used in the development of veterinary vaccines against bovine coronavirus.

Key words: bovine coronavirus, virus cultivation, cell culture, infectious activity of viruses, culture regimens

Coronaviruses are widespread in the environment and cause acute diseases not only in livestock and poultry, but also in humans. That is why studying the biological properties of coronaviruses and ascertainment of the conditions and modes of its cultivation should help solve global problems that arise in the world and are associated with the spread of dangerous socio-economic trends and also for a deeper understanding of epizootic processes.

Bovine coronavirus (BCoV) is a virus that causes disease in domestic and wild cows. BCoV belongs to the family *Coronaviridae*, an order of *Nidovirales* and a subfamily of *Orthocoronavirinae*, which is divided into 3 groups, which are formed depending on natural hosts, serological reactions (epitopes present in the glycoprotein shell) and nucleotide sequence of positive single-stranded RNA. BCoV belongs to 2nd group [3].

BCoV was first isolated in a primary trypsinized culture of bovine kidney cells [9], and then propagated in various cell lines, in particular: BEK-1 (bovine embryonic kidney) [7], VERO (African green monkey kidney) [6], MDBK (Madin-Darby bovine kidney), PK-15 (pig kidney), HRT-18 (human rectal tumor) [12] with trypsin in a nutrient medium useful for enhancing replication.

Kapil et al. noted that the age of HRT-18 cells after reseeding affected the accumulation of the BCoV in the monolayer and the manifestation of the cytopathic effect (CPE). It was found that the best time to infect cell culture HRT-18 by BCoV is 24 hours after the monolayer of cells formation, because in such circumstances, cytopathic changes caused by bovine coronavirus, according to the authors, were most severe [8].

Conditions necessary for optimal accumulation of cell culture-adapted strains of BCoV have been repeatedly described by Dea et al. [4]. In their work, they showed that a weakly acidic inoculum (pH 6.5 to 7.0), cultivation in basic medium (pH 8.0 to 8.5) with trypsin (5 µg/cm³) and treatment of cells with DEAE-dextran (25 µg/cm³) are important factors influencing the increase in the accumulation of bovine coronavirus and the manifestation of CPE in Vero cells.

Storz et al. [13] also emphasized the importance of using trypsin for virus replication and manifestation of the cytopathic action of cell culture-adapted BCoV strain L9. Addition of trypsin (10 µg/cm³) accelerated the appearance of CPE and plaques, promoted cell fusion, increased the amount of hemagglutinin released by cells and in-

creased the accumulation of virus in cultures of thyroid cells and brain of embryonic calves using the Minimum Essential Medium Eagle (MEM) antibiotics and 10% of fetal serum of calf or lamb, inactivated by heating. In this case, when the virus was pre-treated with trypsin or trypsin was present only during the adsorption of the virus, the increase in plaque formation was not observed.

Treatment of cells with trypsin may facilitate the attachment of virions to otherwise inaccessible receptor sites. Treatment of the virus with trypsin can change the configuration of protein molecules in the envelope of the virus, making them more compatible with the receptor sites of cells. It has been suggested that trypsin may neutralize the active inhibitor of the virus, which is produced by cell culture, and cause multiple replications of the virus [5].

Okulova et al. [10] highlighted the possibility of obtaining a double 'harvest' of bovine coronavirus in cultures of MDBK and Vero cells at 34°C.

Given the conflicting results of other researchers regarding different strains of coronavirus, we decided to determine the features of culturing of bovine coronavirus strain CV-315 and select the optimal methods of culturing the virus in order to obtain viral material with the highest possible titers of infectious activity to develop technology for monoprophylaxis and specific diagnostic means production.

Materials and Methods

Cell culture

MDBK cell culture (CC) obtained from the collection of cell cultures of *Biotechlab* LLC was used for these studies. Cell culture was adapted to Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM — manufactured by *Sigma-Aldrich*®) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS — manufactured by *Sigma-Aldrich*®). Cell culture was incubated in culture flasks with a ventilated lid (manufactured by *SARSTEDT AG & Co. KG*®, Germany) at a temperature of 37±0.5°C and a CO₂ content of 5±0.1%.

Virus

Bovine coronavirus strain CV-315, obtained in Ukraine from a calf with diarrhea caused by coronavirus [1, 2], which was confirmed by Real-Time PCR (*VetMAX® Ruminant Respiratory Screening Kit, Thermo Fisher Scientific*®, USA) was used in our work. While determining antigenic affinity and dominance, strain CV-315 dominated the standard KL-2 and other field isolates, so it was selected for study and further development of vaccines.

Material with an infectious activity titer of 6.2 lg TCID₅₀/cm³ and a hemagglutinating activity titer of 10,3 log₂/cm³ was used for the studies.

Infection of cell culture

In accordance with this goal, we evaluated the impact on the cultivation of bovine coronavirus of the following parameters:

- the presence and concentration of trypsin in the nutrient medium;
- the presence and concentration of FBS in the nutrient medium;
- temperature of virus cultivation;
- the degree of cell culture monolayer formation during virus infection;
- term of culturing the virus;
- the dose of virus to infect cell culture.

In order to adequately assess the effect of these parameters, 3 consecutive passages of virus were performed on MDBK cell culture in T25 culture flasks. Prior to the infection, cell culture with 90–100% formed monolayer (except for experiments where another degree of monolayer formation is indicated) was washed with Hanks' solution (HBSS, pH 7.2 — *Sigma-Aldrich*®) from growth media with fetal serum. The virus was introduced in a pre-calculated volume (infection dose (ID) was 0.1 VP/cell (1 virus particle per 10 cells), except for experiments where another ID is indicated) in the maintenance medium — Minimum Essential Medium Eagle (MEM — *Sigma-Aldrich*®). Cultivation was performed at a temperature of 37±0.5°C (except for experiments where another temperature is indicated). Infected cell cultures were examined daily visually under a light microscope to detect CPE (cytopathic effect) of the virus and to record the time of its manifestation by 80–90% (except for experiments where the fixation of another % of CPE manifestations is indicated).

The CPE of bovine coronavirus manifested itself as vacuolation and accumulation of cells, which subsequently led to the formation of syncytia and exfoliation of most cells from the surface of the culture vessel.

After the manifestation of CPE culture flasks with infected cells were frozen at a temperature minus 20±2°C, then thawed to collect virus-containing suspension and sampling for research. Until the results of the studies, all samples were stored at a temperature minus 20±2°C.

Determination of infectious activity of the virus

Infectious activity of the virus was determined by titration of the virus in the CC MDBK with the formed monolayer in a 96-well culture plate for 7 days (taking into account the results from the 3rd day after titration). The virus titer was calculated by the Reed and Mench method [11].

Results and Discussion

In this work, a study of the cultural properties of bovine coronavirus, strain CV-315 and evaluation of the influence of a number of factors on the level of accumulation of this virus in MDBK cell culture was performed.

The effect of trypsin on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315

Trypsin was added in a pre-calculated amount to the maintenance medium. During the study, the characteristic CPE was observed in all experimental samples.

The data presented in fig. 1 indicate that the addition of trypsin at concentrations of 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in the maintenance medium does not increase the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315. The increase in trypsin concentration, in contrast, directly proportionally contributed to the reduction of the level of accumulation of the obtained viral material during 3 consecutive passages. Therefore, further cultivation of bovine coronavirus CV-315 was performed without the addition of trypsin solution.

The effect of FBS on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315

FBS was added to the maintenance medium in a pre-calculated amount of the total volume. During the study, the characteristic CPE was observed in all experimental samples. The results shown in fig. 2 indicate that the cultivation of bovine coronavirus strain CV-315 in cell culture MDBK with a maintenance medium and 2% of fetal bovine serum content receive the highest titers of infectious activity of the virus — 6,64–6,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ for 3 consecutive passages. The difference in titers for virus cultivation without fetal bovine serum and with a content of 2 and 5% was $\pm 0.3 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ at the level of the 3rd passage. That is why the feasibility of using fetal bovine serum in the cultivation of bovine coronavirus strain CV-315 in the culture of MDBK cells requires further discussion.

The effect of cultivation temperature on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315

After inoculation of the virus, cultivation of the virus in the CC was performed at a temperature of $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and at a temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The data in table 1 indicates that the temperature of coronavirus cultivation $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ does not lead to the manifestation of cytopathic effect of the virus for 168 hours (observation period) while at a temperature $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ CPE of the virus was manifested after 71–74 hours of culturing the virus in cell culture.

The infectious activity of the virus did not differ significantly during three consecutive passages at a temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Infectious activity of the virus cultured at a temperature of $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ was not detected, indicating the absence of accumulation of the virus at this temperature. Therefore, further studies were performed only by culturing the virus at a temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Table 1. The effect of cultivation temperature on the bovine coronavirus infectious activity titer

Temperature, $^\circ\text{C}$	Passage no.	The virus CPE presence	Cultivation period, h	Infectious activity, $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
34 ± 0.5	1	—	168	0
	2	—	168	0
	3	—	168	0
37 ± 0.5	1	+	71	6.2 ± 0
	2	+	74	6.45 ± 0.25
	3	+	72	6.45 ± 0.25

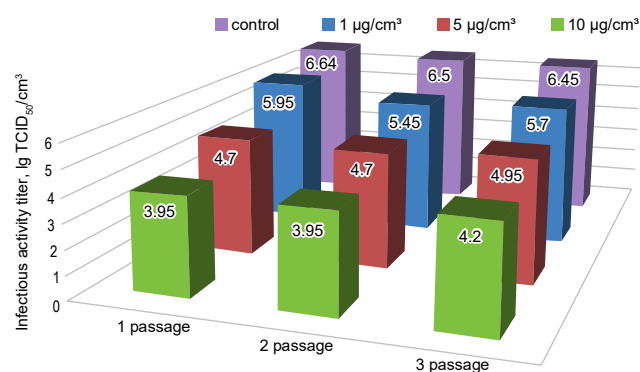


Fig. 1. The effect of trypsin concentration on the accumulation of bovine coronavirus strain CV-315

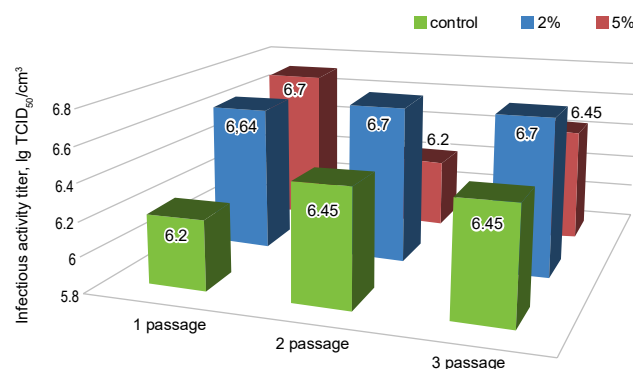


Fig. 2. The effect of FBS concentration on the accumulation of bovine coronavirus strain CV-315

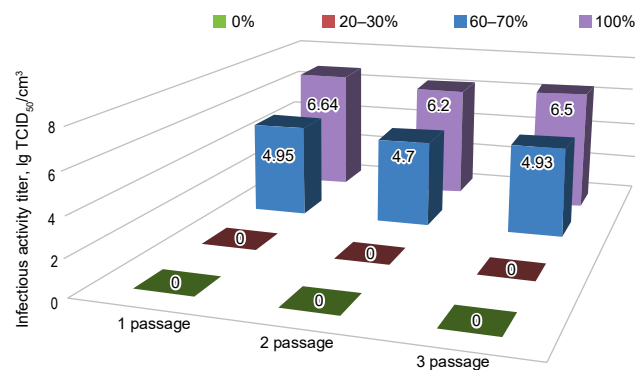


Fig. 3. The influence of the monolayer formation degree on the accumulation of bovine coronavirus strain CV-315

Influence of the degree of cell culture monolayer formation during virus infection on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315.

The results of the study are presented in fig. 3. The diagram shows that infection of MDBK cell culture in the early stages of cell monolayer formation (up to 30%) does not allow the accumulation of virus for three consecutive passages — these experiments did not reveal the cytopathic effect of the virus. Infection of cells of the monolayer formed by 60–70% revealed cytopathic activity of the virus in titers of 4.7–4.95 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The highest activity of the virus in CC were obtained

when the virus was introduced into a 100% formed monolayer of cells — the titer of infectious activity of the virus was 6.2–6.64 lg TCID₅₀/cm³, which confirms the data of other researchers.

Subsequent studies used a method of infecting cell culture into a completely formed monolayer of cells.

Influence of the cultivation term in cell culture on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315

During the study, the characteristic CPE of the virus was observed in all experimental samples. Presented in fig. 4 results show that the cultivation of bovine coronavirus strain CV-315 in the culture of MDBK cells at a dose of 0.1 VP/cell for 72 hours had the highest titers of infectious activity — 6.36±0.41 lg TCID₅₀/cm³ for 3 passages. During 48 hours of cultivation, the titers of infectious activity were only 5.11±0.1 lg TCID₅₀/cm³, and for 96 hours — 5.5±0.2 lg TCID₅₀/cm³.

The obtained results prove that the optimal time for culturing bovine coronavirus strain CV-315 in the culture of MDBK cells at a dose of 0.1 VP/cell is 72 hours of cultivation.

The effect of the infectious dose on the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315

During the study, the characteristic CPE was observed in all experimental samples (fig. 5). The diagram

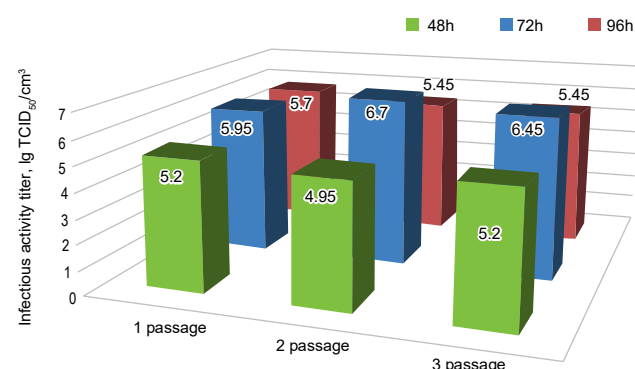


Fig. 4. The effect of the cultivation term on the accumulation of bovine coronavirus strain CV-315

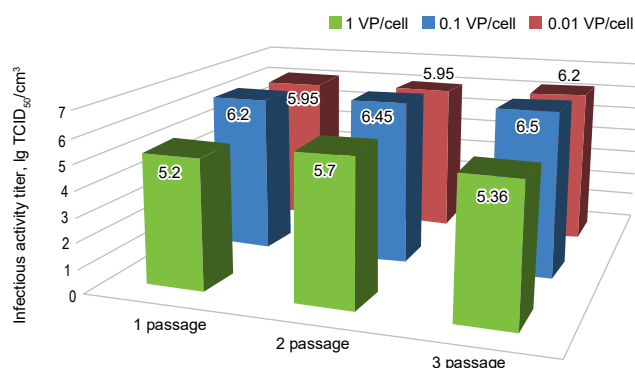


Fig. 5. The effect of the infective dose on the accumulation of bovine coronavirus strain CV-315

Note. *VP/cell — viral particles per cell

shows that the cultivation of bovine coronavirus strain CV-315 with a dose of 0.01 VP/cell had titers of infectious activity of 6.1±0.1 lg TCID₅₀/cm³, with a dose of infection of 0.1 VP/cell — 6.38±0.2 lg TCID₅₀/cm³, and with a dose of 1.0 VP/cell — 5.42±0.3 lg TCID₅₀/cm³. The infectious activity of the virus increased during 3 consecutive passages. Bovine coronavirus had the highest activity when cultured with an infection dose of 0.1 VP/cell.

Therefore, further studies and production of bovine coronavirus strain CV-315 were performed with a dose of 0.1 VP/cell.

As a result of the research, the optimal temperature for culturing bovine coronavirus strain CV-315, the required degree of formation of a monolayer of cell culture during inoculation of the virus and also the time of CPE manifestation in compliance with certain parameters were determined.

Research results were summarized and optimal conditions for bovine coronavirus strain CV-315 culturing were determined. These data are presented in table 2.

Most researchers have studied the effects of proteolytic enzymes, including trypsin, on the accumulation of bovine coronavirus. According to studies by [4], trypsin concentration of 5 µg/cm³ in the nutrient medium increased the accumulation of bovine coronavirus in Vero cell culture, and in the studies of [13], trypsin concentration of 10 µg/cm³ in the nutrient medium increased plaque formation of bovine coronavirus strain L9. However, our results indicate that the addition of trypsin to the nutrient medium, on the contrary, does not increase the titer of infectious activity of bovine coronavirus strain CV-315 in MDBK cell culture.

Kapil et al. also investigated the effect of the degree of monolayer formation on the level of accumulation of bovine coronavirus. According to their results, 24 hours after the formation of a monolayer of HRT-18 cell culture is the optimal time for infection of bovine coronavirus, which coincides with the results obtained in this study [8].

Table 2. The results of evaluation of the culture conditions influence on the degree of bovine coronavirus accumulation in MDBK cell culture

Parameter		The result obtained after 3 passages on the cell culture, lg TCD ₅₀ /1.0 cm ³
Trypsin influence	Without trypsin	6.45±0.25
Fetal bovine serum influence	2%	6.7±0.46
Infective dose	0.1 VP/cell*	6.5±0.32
Cultivation temperature influence	37±0.5 °C	6.45±0.25
Degree of monolayer formation	100 %	6.5±0.3
The cultivation term and the degree of the virus CPE manifestation	72 h	6.45±0.38

Note. *VP/cell — viral particles per cell.

Conclusions

As a result of the research it was found that the highest infectious activity — $6.45 \pm 0.3 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ bovine coronavirus strain CV-315 has with cultivation within 72 hours before the manifestation of CPE by 70–80% without addition trypsin and fetal bovine serum content of 2% at a temperature of $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Also founded that the optimal dose of infection is 0.1–0.01 VP/cell for infection of the fully formed monolayer of MDBK cell culture allows to obtain material with the highest titers of infectious activity in this cell culture.

Selected cultivation regimes allow to optimize the bovine coronavirus cultivation conditions for the prophylactic and diagnostic drugs production.

Prospects for further research

The obtained results are further planned to be used in the development of veterinary immunobiological means against bovine coronavirus.

Strain CV-315 is deposited in the collection of the State Research and Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms of Ukraine in Kyiv.

1. Berezenko A, Nedosekov V, Godovskiy O. Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in cell cultures. *Sci. Rep. NULES Ukraine*. 2021; 4 (92). DOI: 10.31548/dopovid2021.04.001.
2. Berezenko AS, Nedosekov VV, Vabishchevych FS, Godovskiy OV. Selection of candidate strain for vaccine against bovine coronavirus production. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Fodder Add. Inst. Anim. Biol.* 2021; 22 (2): 41–47. DOI: 10.36359/scivp.2021-22-2.04.
3. Brandão PE, Gregori F, Heinemann MB, Lima CHA, Rosales CAR, Ruiz VLA, Jerez JA. Animal coronaviruses. *Virus Rev. Res.* 2001; 6 (1): 7–13. DOI: 10.17525/vrrjournal.v6i1.186.
4. Dea S, Roy RS, Begin ME. Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Amer. J. Vet. Res.* 1980; 41 (1): 30–38. PMID: 6767425.
5. Debiaggi M, Perduca M, Romero E, Cereda PM. Phosphatidylserine inhibition of OC₄₃ and NCDCV coronavirus infectivity. *Microbiologica*. 1985; 8 (4): 313–317. PMID: 6767425.
6. Hansa A, Rai RB, Dhama K, Wani MY, Saminathan M, Ranganath GJ. Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in Vero cell line and its confirmation by direct FAT and RT-PCR. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2013; 16 (21): 1342–1347. DOI: 10.3923/pjbs.2013.1342.1347.
7. Inaba Y, Sato K, Kurogi H, Takahashi E, Ito Y, Omori T, Goto Y, and Matumoto M. Replication of Bovine Coronaviruses in Cell Line BEK-I Culture. *Archives of Virology*. 1976; 50: 339–42.
8. Kapil S, Richardson KL, Radi C, Chard-Bergstrom C. Factors affecting isolation and propagation of bovine coronavirus in Human Rectal Tumor-18 cell line. *J. Vet. Diagnost. Invest.* 1996; 8 (1): 96–99. DOI: 10.1177/104063879600800115.
9. Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Amer. J. Vet. Res.* 1973; 34 (2): 145–150. PMID: 4568246.
10. Okulova ON, Dumova VV, Mishchenko VA, Ponomarev AP. Bovine coronavirus reproduction in the continuous cell cultures at a temperature of 34 degrees C. *Viol. Issues*. 2007; 52 (4): 37–40. PMID: 17722610.
11. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Epidemiol.* 1938; 27 (3): 493–497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
12. Saif LJ, Heckert RA, Miller KL, Tarek MM. Cell culture propagation of bovine coronavirus. *J. Tissue Cult. Method.* 1988; 11 (3): 139–145. DOI: 10.1007/BF01404267.
13. Storz J, Rott R, Kaluza G. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. *Infect. Immun.* 1981; 31 (3): 1214–1222. DOI: 10.1128/iai.31.3.1214-1222.1981.

Дослідження культуральних властивостей коронавірусу ВРХ штаму CV-315

А. С. Березенко^{1,2}, Ф. С. Вабищевич², О. В. Годовський², В. В. Недосеков¹
Nastia4477@gmail.com

¹Національний університет біоресурсів та природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

²ТОВ «Біотестлаб»,

вул. Володимирська, 57а, м. Васильків, Обухівський р-н, Київська обл., 08601, Україна

Метою дослідження було вивчити особливості культивування коронавірусу ВРХ штаму CV-315, виділеного на території України від хворого на коронавірусну інфекцію теляти, та підібрати оптимальні способи культивування вірусу з метою отримання вірусного матеріалу з високими титрами інфекційної активності і для розроблення технології виробництва засобів імунізації та специфічної діагностики. Під час проведення досліджень було вивчено вплив на накопичення вірусу низки факторів: наявність та концентрація трипсину в поживному середовищі, фетальної бичачої сироватки, ступеня формування моношару культури клітин за проведення зараження вірусом, а також вплив дози вірусу, температури та терміну культивування. Відповідно до отриманих результатів, було встановлено, що найбільш високу інфекційну активність штам CV-315 має за культивування впродовж 72 год. до прояву цитопатичного ефекту на 70–80% без додавання трипсину та вмістом фетальної бичачої сироватки 2% за температури $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Також встановлено, що оптимальною дозою зараження є 0,1–0,01 вірусних частинок на клітину для інфікування повністю сформованого моношару культури клітин MDBK. Отримані результати буде використано для розроблення ветеринарних вакцин проти коронавірусу ВРХ.

Ключові слова: коронавірус ВРХ, культивування вірусів, культура клітин, інфекційна активність вірусів, режими культивування



Photoperiod-induced alterations in biomarkers of oxidative stress in rats of different ages and individual physiological reactivity

N. Kurhaluk¹, H. Tkachenko¹, T. Partyka²

natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl, halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

¹Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk,
22b Arciszewskiego str., Słupsk, 76-200, Poland

²Institute of Agriculture of the Carpathian Region NAAS,
5 Hrushevskoho str., Obroshyne, Lviv district, 81115, Ukraine

This study was undertaken to investigate the photoperiod- and age-related variability between the activity of oxidative stress biomarkers in rats with different physiological reactivity estimated by different resistance to hypoxia. The study was carried out on 96 male *Wistar* rats divided into 16 groups based on resistance to hypoxia (LR, low resistance, HR, high resistance) and age, i.e. 6 and 21 months. The studies were conducted at four photoperiod points: winter (January), spring (March), summer (July), and autumn (October). Lower levels of oxidative stress biomarkers ($P < 0.05$) were observed in the younger rats when compared to older rats, as well as in HR rats compared to LR rats. The levels of lipid peroxidation end product, 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as the major indicator of oxidative stress, were found to increase with age, and summer resulted in further elevation compared to other seasons. Also, oxidative stress biomarkers were lower ($P < 0.05$) in winter than in other seasons, especially in the HR rats. TAC level in the hepatic tissue of the 6 months aged rats was significantly higher ($P < 0.05$) elevated when compared to older rats. A similar higher TAC level was in the hepatic tissue of HR rats compared to the LR rats. The adult rats with HR maintained TAC with minimal fluctuations throughout the year. It should be noted that the difference in TAC was higher for the groups of the adult animals with HR in winter, spring, and summer, which may indicate effective mechanisms preventing the formation of reactive oxygen species and systems of elimination thereof.

Key words: rats, resistance to hypoxia, liver, seasons, lipid hydroperoxides, 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total antioxidant capacity (TAC)

The mechanisms of the diurnal and seasonal periodicity of the rhythmic functions of the body are targeted at adaptation to environmental conditions on the one hand and at preservation of the relative constancy of its internal environments on the other hand [8]. For example, the diurnal dynamics of ovulation and oviposition in meat chickens are controlled through endocrine pathways that are modulated by both environmental and internal factors [50]. Environmental factors control seasonal breeding in birds when there are natural photoperiodic cues, i.e. the availability of food for the hatchlings, availability of nesting sites, predation pressure, and climate factors [48]. Special interesting changes in the rhythmic-induced functions of the systems of organisms at the influence of sex, age, season, and individual physiological reactivity [11, 47, 51]. Seasonality refers to season-dependent fluctuations in sleep length, social activity, mood, weight, appetite, and

energy level [17, 41]. The underlying mechanism responsible for synchronizing internal biochemical processes with circadian environmental cues in mammals has been comprised of three major components. Firstly, photoreception by the retina and transmission of neural signals along the retinohypothalamic tract; secondly, integration of photoperiodic information with an internal reference circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus, and thirdly, dissemination of circadian information to target organs, via the autonomic nervous system and through humoral pathways [49].

Effects of hypoxia can be regulated by circadian patterns, and the possible differences in such effects may have biological and clinical implications for the organism [2, 23, 32, 34, 35]. Recent investigations have identified a connection between the circadian rhythm protein Period 2 (PER2) and hypoxia-inducible factor (HIF1A) that

may elucidate an evolutionarily conserved cellular network that can be targeted to manipulate metabolic function in stressed conditions like hypoxia or ischemia [3]. The fact that hypoxia modifies the circadian oscillations of variables as important as body temperature and metabolism leads to the expectation that the daily rhythms of many other functions are perturbed by hypoxia, according to their link to the primary variables. It is contemplated that the alterations of the normal circadian oscillations can contribute to many common symptoms of sustained hypoxia, e.g., from sleep fragmentation to malaise and loss of appetite [35]. Circadian clock interaction with HIF1 α mediates oxygenic metabolism and anaerobic glycolysis in skeletal muscle [38]. Genetic disruption of the clock activator BMAL1 in skeletal myotubes and fibroblasts increased levels of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) under hypoxic conditions. The results of these researchers revealed bidirectional interactions between circadian and HIF pathways that influence metabolic adaptation to hypoxia.

There are many studies showing that individuals within each animal species and humans differ significantly in their reactions to oxygen deficiency [19, 20, 28, 39]. Analyses of animal reactions to oxygen deficiency have demonstrated that, in any group of intact animals (in particular, white rats) of the same age and sex reared in the same conditions and placed at a critical altitude (11,000–12,000 m), it is possible to identify individuals that remain viable at the 95% death rate in experimental animals [10]. Such naturally hypoxia-resistant individuals can survive for a long time in gas environments containing only 2–3% of O₂. These animals maintain rhythmic breathing movements in acute hypoxic conditions (equivalent to the height of 12,000 m above sea level) for 5–6 minutes, and some even more than 10 minutes, while most animals display agonal breathing and convulsions that end in death after 5–60 seconds. Animals with high resistance (HR) to acute hypobaric hypoxia were identified among laboratory mice, rats, rabbits, and guinea pigs [37, 43, 44]. Intra-species differences in the reaction of individuals to acute hypoxia also vary significantly, and they are related to both genotypic and phenotypic characteristics of individuals [10, 14].

Aging is one of the main risk factors for various diseases. On the other hand, oxidative stress is a key element responsible for the development of age-related pathologies [1]. In addition, the alteration of circadian rhythms also contributes to cardiovascular pathology [3]. Aging modifies the temporal organization of antioxidant defenses and blood pressure, probably, as a consequence of a disruption in the circadian rhythm of the clock's transcriptional regulator, BMAL1, in the heart [1]. The loss of temporal organization of the activity of the antioxidant enzymes, the oxidative status, and the cellular clock machinery could result in a temporally altered antioxidant defense system also in the aging brain [26]. Rhythmic changes in oxidative damage of protein and lipid molecules have been also reported [16].

The present study was focused on photoperiod- and age-related variability between the activity of oxidative stress biomarkers in rats with different physiological reac-

tivity estimated by different resistance to hypoxia. Thus, the aim of our study was the assessment of levels of lipid hydroperoxides, 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and total antioxidant capacity (TAC) in the hepatic tissue of male rats of different ages (adult — 3-month-old, old — 21-month-old) and physiological reactivity (LR, low resistance to hypoxia and HR, high resistance to hypoxia) in different photoperiods (winter, spring, summer, autumn). This study was carried out during the Scholarship Program supported by The Visegrad Fund in the Department of Zoology and Animal Physiology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk (Poland), and we are grateful to The Visegrad Fund the supporting our study.

Materials and Methods

Animals and experimental design

The study was carried out on 96 male *Wistar* rats divided into 16 groups based on resistance to hypoxia (LR — low resistance, HR — high resistance) and age, i.e. 6 and 21 months. The rats were randomly assigned to sixteen groups. There were six animals in each group. The studies were conducted at four photoperiod points: winter (January), spring (March), summer (July), and autumn (October). The day/night ratio in the different photoperiod points was as follows: winter — 8:16, spring — 12:12, summer — 16:8, and autumn — 10:14.

Group I and group II — adult 6-month-old males with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in winter; group III and group IV — old males (21-month-old) with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in winter; group V and group VI — adult 6-month-old males with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in spring; group VII and group VIII — old males (21-month-old) with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in spring; group IX and group X — adult 6-month-old males with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in summer; group XI and group XII — old males (21-month-old) with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in summer; group XIII and group XIV — adult 6-month-old males with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in autumn; group XV and group XVI — old males (21-month-old) with low (n=6) and high (n=6) resistance to hypoxia studied in autumn.

Prior to the experiments, the animals were divided into 2 groups: LR and HR. The hypoxia resistance of the rats was evaluated as survival time (min) in an altitude chamber 11,000 m above sea level. The survival time was measured after achieving the 'altitude'. Cessation of breathing served as a criterion for hypoxia resistance [9, 25, 29]. Animals with a maximum survival time after the second agonistic breath were classified as high-resistance animals, and those with a minimal survival time were regarded as low-resistance animals. After the survival assessment, the animals were housed for at least 3 weeks in vivarium conditions to adapt.

The male rats were housed at a constant temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The animals had free access to feed and water throughout the experiments. During the study, the animals were kept on a standard diet and temperature conditions under natural lighting. The influence of artificial light sources was prevented. Blood was sampled at the peak secretion of melatonin, i.e. from 2:00 to 4:00 AM.

Tissue isolation

Tissues were removed from rats after decapitation. One rat was used for each homogenate sample. Briefly, the liver was excised, weighed, and washed in an ice-cold buffer. The minced tissue was rinsed clear of blood with cold isolation buffer and homogenized in a glass Potter-Elvehjem homogenizing vessel with a motor-driven Teflon pestle on ice. The isolation buffer consisted of 120 mM KCl, 2 mM K_2CO_3 , 10 mM HEPES, and 1 mM EDTA; pH was adjusted to 7.2 with KOH. The hepatic homogenate was used for the determination of the levels of lipid hydroperoxide (LHPO), 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and total antioxidant capacity (TAC). The Bradford method [6] with bovine serum albumin as a standard was used for the quantification of proteins. Absorbance was recorded at 595 nm.

Assay of the lipid hydroperoxide (LHPO) level

The acyl hydroperoxide level was assessed in the tissue samples with the method proposed by Buege and Aust [7]. 4 mL of a 'heptane-isopropanol' mixture was added to 0.2 mL of homogenate and vortexed vigorously. Then, 1 mL of HCl (pH 2.0) and 2 mL of heptane reagent were added, vortexed, and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The lipid hydroperoxide level was read spectrophotometrically at 233 nm and expressed as nmol per mg of protein. A mixture of distilled water was used in the blank samples.

Assay of 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The level of lipid peroxidation was determined by quantifying the concentration of 2-thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) with the method developed by Buege and Aust [7]. This method is based on the reaction of the degradation of the lipid peroxidation product, i.e. malonic dialdehyde (MDA), with 2-thiobarbituric acid (TBA) at high temperature and acidity to generate a colored adduct that can be measured spectrophotometrically. The nmol of MDA per mg protein was calculated using $1.56 \cdot 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as the extinction coefficient.

Measurement of total antioxidant capacity (TAC)

The TAC level in the samples was estimated by measuring the 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level after Tween 80 oxidation. This level was determined spectrophotometrically at 532 nm [13]. Sample inhibits the Fe^{2+} /ascorbate-induced oxidation of Tween 80, resulting in a decrease in the TBARS level. The absorbance of the obtained solution was measured

at 532 nm. The absorbance of the blank was defined as 100%. The TAC level in the sample (%) was calculated with respect to the absorbance of the blank samples.

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ S.D. Before the analysis, all variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test ($P > 0.05$), and homogeneity of variance was assessed using Levene's test. The significance of differences in the level of lipid peroxidation processes, amino acid carbonyl derivatives, total antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity, and energy metabolism biomarkers between all examined groups was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) and multifactorial analysis of variance (MANOVA) [52]. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Also, the relationships between data of all individuals were evaluated using Pearson's correlation analysis. All statistical calculations were performed on separate data from each individual with *Statistica 13.3* software (*StatSoft Inc.*, Poland). We used Bonferroni's post-test for the analysis of inequality. The statistical analysis was carried out in a triple way: the levels of biomarkers of oxidative stress and aerobic and anaerobic pathways in the groups were compared in relation to age, resistance to hypoxia, and photoperiods. The combined effects of age, individual physiological reactivity, and photoperiods and their significance (main effects) were compared with the biomarkers of lipid peroxidation and total antioxidant capacity, separately. The correlation and regression analysis comprised the correlation coefficient (r), regression equation, and significance of these dependencies (P). We used the coefficients of multiple correlation analysis (R), the coefficient of determination (R^2), and its corrected form reduced by random errors (R^2 adjusted) in the data analysis for the description of the full statistical model.

Results and Discussion

Lipid hydroperoxides are formed in lipid systems in the process of lipid peroxidation, a complex multi-stage chain process of oxygen oxidation in lipid substrates (mainly polyunsaturated fatty acids), including stages with the participation and formation of free radicals [33]. Lipid hydroperoxides are formed as a result of enzymatic or non-enzymatic reactions involving chemically activated products, such as reactive oxygen species (ROS), possessing a toxic effect on the body and causing various tissue damage. In addition, ROS include oxidized forms of lipids or peroxide radicals, singlet oxygen, and peroxynitrites, which are formed from nitrogen oxides (NO). These groups of atoms behave as a whole and are known as free radicals. These chemical forms contain one or more unpaired electrons and are capable of independent existence. They are formed either by loss or by adding one electron to a non-radical and can easily be formed when a covalent bond is broken as a result of a homolytic cleavage [12].

The level of lipid hydroperoxides in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity in different photoperiods (winter, spring, summer, autumn) is presented in fig. 1.

Fig. 1 and 2 show the biomarkers of lipid peroxidation at the initial stage (lipid hydroperoxides, LHPO) associated with the initiation of this process, and the content of TBARS, i.e. the end product of lipid peroxidation, in the hepatic tissue of male rats of different ages and resistance to hypoxia in the different photoperiods of the year. Significant differences depending on age, resistance to hypoxia, and photoperiods were observed in three groups of animals. Adult animals, as well as individuals with HR, were mainly less exposed to lipid peroxidation at the initial (fig. 1) and final stages of this process (fig. 2). However, the temporal photoperiodical activity of these processes is as follows. In the group of the adult rats with LR, the minimum level of LHPO was noted in spring, while the maximum value was recorded in autumn, respectively. A similar trend in LHPO was also observed in the group of adult rats with HR. In the group of adult rats with LR, the minimum level of TBARS was observed in winter, while the maximum level was noted in summer. The trend in these changes was similar in the group of the adult animals with HR, i.e. the minimum TBARS level was observed in winter, but there were no statistically significant changes during the other photoperiods.

Lipid peroxidation (LPO) is the process of oxidative destruction (oxidative degradation) of lipids at the action of free radicals. It is known that under normal conditions of cell activity, a certain level of lipid peroxidation is constantly present, induced by the formation of ROS [40]. Lipid peroxidation in the cell is maintained at a constant level due to the multilevel antioxidant defense system. Thus, the balance between both parts of this system, i.e. peroxidation on the one hand and antioxidant activity on the other, is a necessity for maintaining normal cell activity. Given the need to maintain the prooxidant-antioxidant balance in a stationary regime, it can be assumed that its shift is one of the first nonspecific links in the development of stress response and can serve as a biologically important change in the internal environment of the cell that triggers other defense mechanisms [15, 36, 40].

The level of TBARS as biomarkers of lipid peroxidation in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity in different photoperiods (winter, spring, summer, autumn) is presented in fig. 2.

In the groups of the old rats with LR, the minimum level of LHPO was noted in winter, while the maximum values were recorded in spring. The trends in these processes in the groups of the old animals with HR were similar, i.e. the minimum and maximum TBARS levels were observed in winter and summer, respectively. Aging in the rats with LR was accompanied by the intensification of lipid peroxidation and formation of highly toxic products, e.g. malonic dialdehyde, compared to both the adult animals and the individuals with HR. The minimum level of TBARS in the hepatic tissue of this group was observed

in winter, and the maximum value was recorded in summer. Aging in the animals with HR was accompanied by a less pronounced level of TBARS as end products of lipid peroxidation, i.e. the lowest level was shown in summer, and the highest value was noted in autumn.

The next step in our research consisted of the determination of the total antioxidant capacity (TAC) in the liver (fig. 3) for effective antioxidative protection at the level of both enzymes and other cell components. Currently, to assess the functional state of the antioxidant defense system, along with the determination of the content of individual antioxidants in samples, an indicator is designated as total antioxidant capacity (TAC). TAC is an integral indicator that reflects its ability to counteract the development of free radical reactions in any model system. The main components of such model systems are a radical generation system and a substrate (or target molecule) that undergoes free radical oxidation [4].

The level of TAC in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity in different photoperiods (winter, spring, summer, autumn) is presented in fig. 3. It was shown that the adult animals with LR had a minimum level of TAC in spring and a maximum value in autumn. The adult rats with HR maintained TAC with minimal fluctuations throughout the year. It should be noted that the difference in TAC was higher for the groups of the adult animals with HR in winter, spring, and summer, which may indicate effective mechanisms preventing the formation of reactive oxygen species and systems of elimination thereof.

Our earlier investigations demonstrated that the ability of HR animals to endure physical training better than LR rats depends on the initial physiological state of the organism. It is determined by the predominance of the cholinergic (in animals with high resistance to hypoxia) or adrenergic (in animals with a low resistance to hypoxia) regulatory mechanisms of physiological functions [22]. Some extreme influences are accompanied by the modulation of the NO-ergic mode of physiological regulation. Thus, treatment with L-arginine, i.e. the precursor of NO production, before swimming to exhaustion, as shown in our data, can be an important factor for correction of stress-induced reactions and increasing the animal's resistance [22]. It is important that NO is regarded as a regulating signaling factor in hypoxia states [19–25]. Recent data have shown that resistance to hypoxia is also associated with antioxidant defenses [24, 46]. In the heart of highly-resistant Sprague Dowley rats, the level of such enzymes as superoxide dismutase and catalase that protect cells from oxidative stress is elevated [18].

The effect of single hypoxic preconditioning exposure (hypobaric hypoxia, 5000 m, 60 min) on free radical processes, glutathione system, and antioxidant defense enzymes in tissues of rats with different resistance to acute hypoxia was demonstrated [27]. The intensity of free radical processes was shown to increase or decrease on day 1 after hypoxic preconditioning. These changes were tissue-specific and opposite in animals with genetically

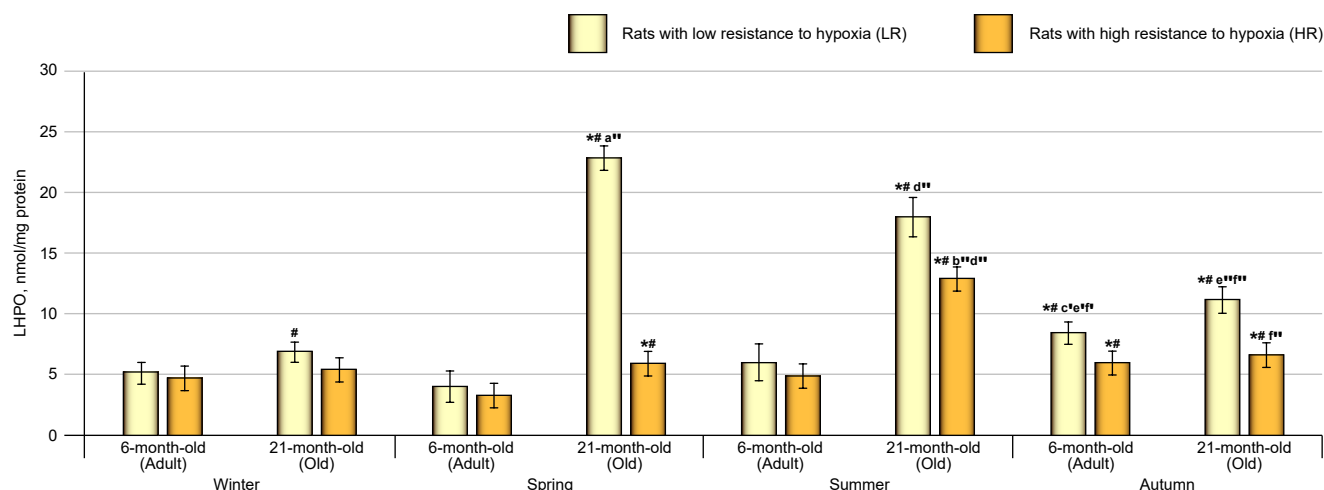


Fig. 1. Level of lipid hydroperoxides (LHPO) in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity (low and high resistance to hypoxia) in different photoperiods (winter, spring, summer and autumn)

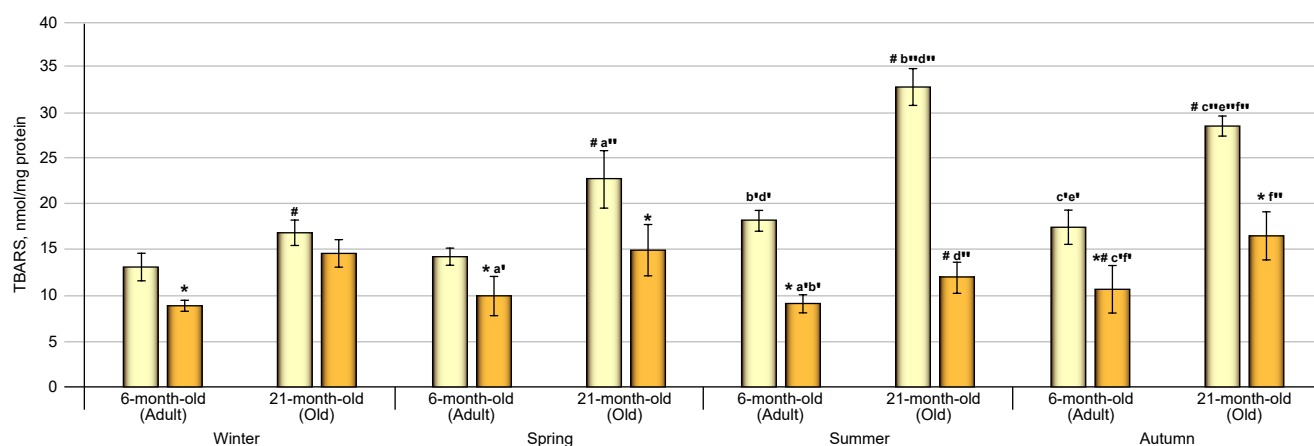


Fig. 2. TBARS level in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity (low and high resistance to hypoxia) in different photoperiods (winter, spring, summer and autumn)

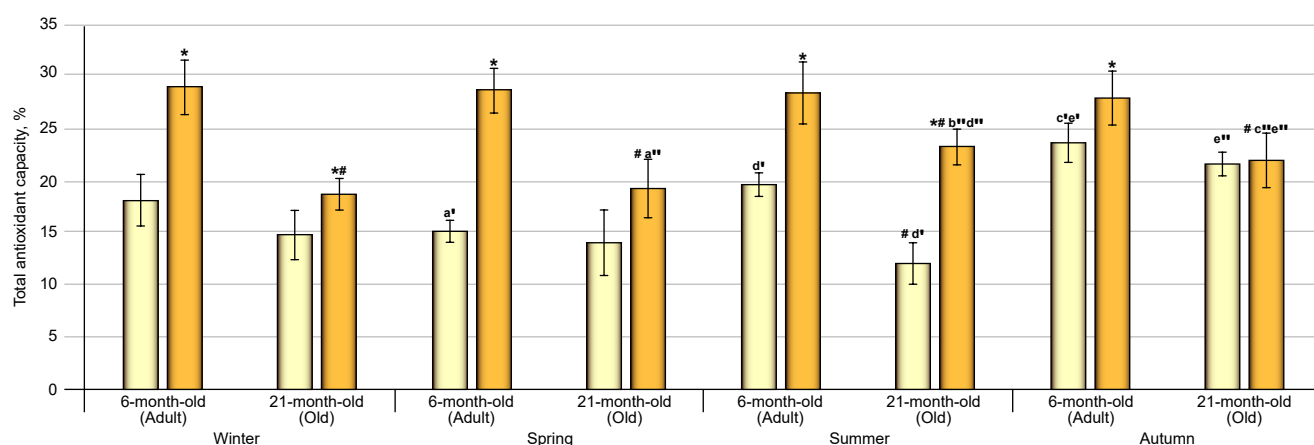


Fig. 3. TAC level in the hepatic tissue of male rats of different ages and physiological reactivity (low and high resistance to hypoxia) in different photoperiods (winter, spring, summer and autumn)

The results are expressed as mean±S.D. The differences between groups were analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Significant differences between groups are designated as follows: * — Low resistant group vs. High resistant group in one photoperiod; # — Adult group vs. Old group in one photoperiod. In the Adult groups: a' — Winter group vs. Spring group; b' — Winter group vs. Summer group; c' — Winter group vs. Autumn group; d' — Spring group vs. Summer group; e' — Spring group vs. Autumn group; f' — Summer group vs. Autumn group. Into the Old groups: a'' — Winter group vs. Spring group; b'' — Winter group vs. Summer group; c'' — Winter group vs. Autumn group; d'' — Spring group vs. Summer group; e'' — Spring group vs. Autumn group; f'' — Summer group vs. Autumn group.

determined differences in the resistance to hypoxia. Hypoxic preconditioning contributes to the immediate resistance. The effect was more pronounced in low resistant animals, who did not exhibit signs of oxidative stress in tissues during the early post-hypoxic period. By contrast, hypoxic preconditioning was followed by activation of free radical processes in tissues of highly resistant animals. These rats were characterized by low ability for the development of immediate resistance. Activation of free radical processes in the early period of adaptation (first hours after hypoxic preconditioning) does not play a role in the induction of immediate adaptive mechanisms for hypoxia [27].

Sympathetic regulation is predominant in LR rats while parasympathetic tone predominates in HR animals [24]. It is believed that LR animals have a weak type of nervous system, less developed internal inhibition, increased excitability, and emotional reactivity. They respond to hypoxia with excitement and high locomotor activity. LR animals are more prone to the development of diseases such as diabetes, obesity, thyrotoxicosis, atherosclerosis, etc. [28, 39]. On the contrary, in HR animals, excitability and anxiety are reduced, and moderate aggressiveness, more pronounced internal inhibition, low sensitivity to any provoking factors, and a tendency to social domination are manifested, and they are more resistant to anesthesia. They react to acute hypoxia, cerebral ischemia, and carbon monoxide poisoning with an inhibitory reaction [28, 39].

The liver is one of the most complex organs in the body and is involved in a variety of functions. Liver regeneration is the body's protection mechanism against loss of functional liver tissue. Biondo-Simões Mde and co-workers (2006) have evaluated the effect of aging on liver regeneration in rats and revealed that age is related to delay in liver regeneration in rats [5].

Aging in male *Wistar* rats is associated with changes in intestinal microbiota, gut structure, and cholecystokinin-mediated gut-brain axis function. Several mechanisms have been proposed by Rubio and co-workers such as the presence of low-grade chronic inflammation in different tissues, as well as leptin and insulin resistance, but the primary alteration is not fully elucidated. The gut microbiota has recently emerged as a key player in a variety of metabolic and neurological disorders. The gut-brain axis refers to alterations in the gut that mediate effects in the central nervous system, including those related to the control of energy balance [42].

Mármol and co-workers [31] have studied the response of several parameters related to oxidative stress in the liver of aging rats. Male *Wistar* rats aged 1.5, 3, 18, and 24 months were used. Livers showed an increase in superoxide anion concentration at 1.5 and 18 months of age compared to the 3-month-old group; a decrease in superoxide dismutase (SOD) was seen at 1.5 months and catalase concentrations remained unaltered throughout the aging process. Nitric oxide (NO) progressively declined with age; a significant decrease was particularly apparent at 18 and 24 months of age. TBARS level was decreased significantly at 1.5 months,

whereas it increased at 18 and 24 months of age. Concentrations of prostaglandin E2, adenine nucleotides, and their metabolites, remained unchanged throughout the aging process. Although the mitochondrial damage caused by oxidative stress can result in reduced ATP production and compromised cell function, results obtained by Mármol and co-workers [31] on adenosine nucleotides and their metabolites support the notion that the integrity of mitochondria and enzymatic activity remain mostly unchanged with aging. These researchers have observed a significant decrease in the levels of NO in the older groups of rats and hence in its antioxidant activity. This could explain the observed increase in lipid peroxides which suggests an important role for NO in oxidative stress in the liver of older rats [31].

Also, Mármol and co-workers have evaluated the presence of oxidative stress and alterations in the levels of two cytoprotective agents, prostaglandin E2 and nitric oxide, in the gastrointestinal tract of aging rats. The absence of macroscopic gastric injury throughout the gastrointestinal tract indicates that the oxidative stress in the stomach and the significant decrease of nitric oxide in the duodenum in the old rats are not sufficient to disrupt the mucosal defense network. The results support the notion that the disruption of the mucosal network is essentially regulated by the cytoprotective agent's prostaglandin E2 and nitric oxide, and that injury appears only when both substances are concurrently reduced [30].

Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. Older organisms showed extensive hepatic damage, along with increased morbidity and mortality, after environmental heating [53].

Conclusions

Lower levels of oxidative stress biomarkers ($P < 0.05$) were observed in the younger rats when compared to older rats, as well as in HR rats compared to LR rats. The levels of lipid peroxidation end product, TBARS as the major indicator of oxidative stress, were found to increase with age, and summer resulted in further elevation compared to other seasons. Also, oxidative stress biomarkers were lower ($P < 0.05$) in winter than in other seasons, especially in the HR rats. TAC level in the hepatic tissue of the 6 months aged rats was significantly higher ($P < 0.05$) elevated when compared to older rats. A similar higher TAC level was in the hepatic tissue of HR rats compared to the LR rats. It was shown that the adult animals with LR had a minimum level of TAC in spring and a maximum value in autumn. The adult rats with HR maintained TAC with minimal fluctuations throughout the year. It should be noted that the difference in TAC was higher for the groups of the adult animals with HR in winter, spring, and summer, which may indicate effective mechanisms preventing the formation of reactive oxygen species and systems of elimination thereof.

Acknowledgments

This study was carried out during the Scholarship Program supported by The Visegrad Fund in the Department of Zoology and Animal Physiology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk (Poland), and we are grateful to The Visegrad Fund for supporting our study.

- Altamirano FG, Castro-Pascual IC, Ferramola ML, Tula ML, Delgado SM, Anzulovich AC, Lacoste MG. Aging disrupts the temporal organization of antioxidant defenses in the heart of male rats and phase shifts circadian rhythms of systolic blood pressure. *Biogerontol.* 2021; 22 (6): 603–621. DOI: 10.1007/s10522-021-09938-7.
- Bartke A, Amador AG, Chandrashekar V, Klemcke HG. Seasonal differences in testicular receptors and steroidogenesis. *J. Steroid Biochem.* 1987; 27 (1–3): 581–587. DOI: 10.1016/0022-4731(87)90357-8.
- Bartman CM, Eckle T. Circadian-hypoxia link and its potential for treatment of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Design.* 2019; 25 (10): 1075–1090. DOI: 10.2174/1381612825666190516081612.
- Bartos G. Total antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.* 2003; 37: 219–292. DOI: 10.1016/S0065-2423(03)37010-6.
- Biondo-Simões MLP, Matias JEF, Montibeller GR, Siqueira LC, Nunes ES, Grassi CA. Effect of aging on liver regeneration in rats. *Acta Cir. Bras.* 2006; 21 (4): 197–202. DOI: 10.1590/S0102-86502006000400002.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72 (1–2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302–310. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- Buijs RM, Scheer FA, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog. Brain Res.* 2006; 153: 341–360. DOI: 10.1016/S0079-6123(06)53020-1.
- Dzhililova DS, Diatropov ME, Tsvetkov IS, Makarova OV, Kuznetsov SL. Expression of *Hif-1α*, *Nf-kb*, and *Vegf* genes in the liver and blood serum levels of HIF-1α, erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-isoprostane, and corticosterone in Wistar rats with high and low resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 165 (6): 781–785. DOI: 10.1007/s10517-018-4264-x.
- Dzhililova D, Makarova O. Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics. *Biomed.* 2020; 8 (10): 428. DOI: 10.3390/biomedicines8100428.
- Emens JS, Burgess HJ. Effect of light and melatonin and other melatonin receptor agonists on human circadian physiology. *Sleep Med. Clin.* 2015; 10 (4): 435–453. DOI: 10.1016/j.jsmc.2015.08.001.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutr.* 2002; 18 (10): 872–879. DOI: 10.1016/S0899-9007(02)00916-4.
- Ghani MA, Barril C, Bedgood DR Jr, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* 2017; 230: 195–207. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.127.
- Grek OR, Pupyshev AB, Tikhonova EV. Effect of transitory ischemia on liver lysosomal apparatus in rats with different resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003; 136 (1): 11–13. DOI: 10.1023/A:1026016224694.
- Halliwel B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993; 57 (5): 715S–724S. DOI: 10.1093/ajcn/57.5.715S.
- Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 2003; 20 (6): 921–962. DOI: 10.1081/CBI-120025245.
- Höller Y, Gudjónsdóttir BE, Valgeirsdóttir SK, Heimisson GT. The effect of age and chronotype on seasonality, sleep problems, and mood. *Psychiatry Res.* 2021; 297: 113722. DOI: 10.1016/j.psychres.2021.113722.
- Jain K, Suryakumar G, Prasad R, Ganju L. Differential activation of myocardial ER stress response: a possible role in hypoxic tolerance. *Int. J. Cardiol.* 2013; 168 (5): 4667–4677. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.07.180.
- Jeffrey Man HS, Tsui AK, Marsden PA. Nitric oxide and hypoxia signaling. *Vit. Horm.* 2014; 96: 161–192. DOI: 10.1016/B978-0-12-800254-4.00007-6.
- Kurhaluk N, Lukash O, Nosar V, Portnychenko A, Portnychenko V, Wszedybyl-Winkowska M, Winkowski PJ. Liver mitochondrial respiratory plasticity and oxygen uptake evoked by cobalt chloride in rats with low and high resistance to extreme hypobaric hypoxia. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 2019; 97 (5): 392–399. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0642.
- Kurhalyuk NM, Serebrovskaya TV, Kolesnikova EE. Role of choline- and adrenoreceptors in regulation of rat antioxidant defense system and lipid peroxidation during adaptation to intermittent hypoxia. *Probl. Ecol. Med. Genet. Cell Immunol.* 2001; 7: 126–137. (in Ukrainian)
- Kurhalyuk N, Tkachenko H. L-arginine modulates mitochondrial function in rat liver during physical training. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2007; 51 (4): 641–647. Available at: <https://jvetres.piwet.pulawy.pl/files/archive/20074/20074641648.pdf>
- Kurhaluk N, Tkachenko H. Melatonin and alcohol-related disorders. *Chronobiol. Int.* 2020; 37 (6): 781–803. DOI: 10.1080/07420528.2020.1761372.
- Kurhaluk N, Tkachenko H, Lukash O. Melatonin modulates oxidative phosphorylation, hepatic and kidney autophagy-caused subclinical endotoxemia and acute ethanol-induced oxidative stress. *Chronobiol. Int.* 2020; 37 (12): 1709–1724. DOI: 10.1080/07420528.2020.1830792.
- Kurhaluk N, Zaitseva OV, Sliuta A, Kyriienko S, Winkowski PJ. Melatonin diminishes oxidative stress in plasma, retains erythrocyte resistance and restores white blood cell count after low dose lipopolysaccharide exposure in mice. *Gen. Physiol. Biophys.* 2018; 37 (5): 571–580. DOI: 10.4149/gpb_2018010.
- Lacoste MG, Ponce IT, Golini RL, Delgado SM, Anzulovich AC. Aging modifies daily variation of antioxidant enzymes and oxidative status in the hippocampus. *Exp. Gerontol.* 2017; 88: 42–50. DOI: 10.1016/j.exger.2016.12.002.
- Lukyanova LD, Kirova YI. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 151 (3): 292–296. DOI: 10.1007/s10517-011-1312-1.
- Lukyanova LD, Kirova YI. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front. Neurosci.* 2015; 9: 320. DOI: 10.3389/fnins.2015.00320.
- Lukyanova LD, Kirova YI, Germanova EL. The role of succinate in regulation of immediate HIF-1α expression in hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 164 (3): 298–303. DOI: 10.1007/s10517-018-3976-2.
- Mármol F, Sánchez J, López D, Martínez N, Mitjavila MT, Puig-Parellada P. Oxidative stress, nitric oxide and prostaglandin E2 levels in the gastrointestinal tract of aging rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 61 (2): 201–206. DOI: 10.1211/jpp/61.02.0009.
- Mármol F, Sánchez J, López D, Martínez N, Xaus C, Peralta C, Roselló-Catafau J, Mitjavila MT, Puig-Parellada P. Role of oxidative stress and adenosine nucleotides in the liver of aging rats. *Physiol. Res.* 2010; 59 (4): 553–560. DOI: 10.33549/physiolres.931768.
- McClung CA. Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre-clinical models. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011; 21 (4): S683–S693. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.008.
- Miyazawa T. Lipid hydroperoxides in nutrition, health, and diseases. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2021; 97 (4): 161–196. DOI: 10.2183/pjab.97.010.

34. Mortola JP. Gender and the circadian pattern of body temperature in normoxia and hypoxia. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 2017; 245: 4–12. DOI: 10.1016/j.resp.2016.11.002.
35. Mortola JP. Hypoxia and circadian patterns. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 2007; 158 (2–3): 274–279. DOI: 10.1016/j.resp.2007.02.005.
36. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors.* 2008; 34 (2): 171–180. DOI: 10.1002/biof.5520340208.
37. Padhy G, Sethy NK, Ganju L, Bhargava K. Abundance of plasma antioxidant proteins confers tolerance to acute hypobaric hypoxia exposure. *High Alt. Med. Biol.* 2013; 14 (3): 289–297. DOI: 10.1089/ham.2012.1095.
38. Peek CB, Levine DC, Cedernaes J, Taguchi A, Kobayashi Y, Tsai SJ, Bonar NA, McNulty MR, Ramsey KM, Bass J. Circadian clock interaction with HIF1 α mediates oxygenic metabolism and anaerobic glycolysis in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2017; 25 (1): 86–92. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.09.010.
39. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardio-respiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 2012; 92 (3): 967–1003. DOI: 10.1152/physrev.00030.2011.
40. Pré J. Lipid peroxidation. *Pathol. Biol.* 1991; 39 (7): 716–736. PMID: 1758725. (in French)
41. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim. Pol.* 2007; 54 (1): 1–9. DOI: 10.18388/abp.2007_3264.
42. Rubio C, Lizárraga E, Álvarez-Cillerós D, Pérez-Pardo P, Sanmartín-Salinas P, Toledo-Lobo MV, Alvarez C, Escrivá F, Fernández-Lobato M, Guijarro LG, Valverde AM, Carrascosa JM. Aging in male *Wistar* rats associates with changes in intestinal microbiota, gut structure, and cholecystokinin-mediated gut-brain axis function. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2021; 76 (11): 1915–1921. DOI: 10.1093/gerona/glaa313.
43. Serebrovskaya TV, Xi L. Individualized intermittent hypoxia training: principles and practices. In: *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*. Ed. by L. Xi, T. Serebrovskaya. London, UK: Springer, 2012: 281–289. DOI: 10.1007/978-1-4471-2906-6_23.
44. Strauss E, Waliszewski K, Oszkinis G, Staniszewski R. Polymorphisms of genes involved in the hypoxia signaling pathway and the development of abdominal aortic aneurysms or large-artery atherosclerosis. *J. Vasc. Surg.* 2015; 61 (5): 1105–1113. DOI: 10.1016/j.jvs.2014.02.007.
45. Tiana L, Caib Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24 (9): 1477–1484. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00025-2.
46. Tkachenko H, Kurhalyuk N, Khabrovska L, Kamiński P. Effect of L-arginine on lead induced oxidative stress in the blood of rats with different resistance to hypoxia. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2007; 57 (3): 387–394. Available at: <http://journal.pan.olsztyn.pl/EFFECT-OF-L-ARGININE-ON-LEAD-INDUCED-OXIDATIVE-STRESS-IN-THE-BLOOD-OF-RATS-WITH-DIFFERENT>,98080,0,2.html
47. Travaglio M, Ebling FJP. Role of hypothalamic tanycytes in nutrient sensing and energy balance. *Proc. Nutr. Soc.* 2019; 78 (3): 272–278. DOI: 10.1017/S0029665118002665.
48. Ubuka T, Bentley GE. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: Norris DO, Lopez KH (eds.). *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. London, Academic Press, 2011: 1–25. DOI: 10.1016/B978-0-12-374929-1.10001-0.
49. Urbanski HF, Sorwell KG. Age-related changes in neuroendocrine rhythmic function in the rhesus macaque. *Age.* 2012; 34 (5): 1111–1121. DOI: 10.1007/s11357-011-9352-z.
50. Van der Klein SAS, Zuidhof MJ, Bédécarrats GY. Diurnal and seasonal dynamics affecting egg production in meat chickens: A review of mechanisms associated with reproductive dysregulation. *Anim. Reprod. Sci.* 2020; 213: 106257. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106257.
51. Yan L, Lonstein JS, Nunez AA. Light as a modulator of emotion and cognition: Lessons learned from studying a diurnal rodent. *Horm. Behav.* 2019; 111: 78–86. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2018.09.003.
52. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 4th ed., New Jersey, Englewood Cliffs, Prentice-Hall Inc., 1999: 663 p. Available at: https://books.google.com.ua/books/about/Biostatistical_Analysis.html?id=edqxAAAAMAAJ&redir_esc=y
53. Zhang HJ, Xu L, Drake VJ, Xie L, Oberley LW, Kregel KC. Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. *FASEB J.* 2003; 17 (15): 2293–2295. DOI: 10.1096/fj.03-0139je.

Фотоперіод-індуковані зміни біомаркерів оксидативного стресу у щурів різного віку та індивідуальної фізіологічної реактивності

Н. Кургалюк¹, Г. Ткаченко¹, Т. Партика²

natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl; halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

¹Інститут біології та наук про Землю, Поморська академія в Слупську, вул. К. Арцішевського 226, м. Слупськ, 76-200, Республіка Польща

²Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН, вул. Грушевського, 5, с. Оброшине, Львівська обл., 81115, Україна

Дослідження виконано для вивчення індукованих фотоперіодом змін біомаркерів окиснювального стресу у щурів різного віку та різної фізіологічної реактивності, що оцінюється за різною стійкістю до гіпоксії. Дослідження проведено на 96 щурах-самцях лінії Вістар, розділених на 16 груп залежно від стійкості до гіпоксії (НР — низькорезистентні, ВР — високорезистентні) та віку (6 і 21 місяць). Дослідження проводили в чотири фотоперіоди: зима (січень), весна (березень), літо (липень) та осінь (жовтень). Нижчі рівні біомаркерів окиснювального стресу ($P < 0,05$) спостерігали у молодших щурів порівняно зі старшими, а також у високорезистентних порівняно з низькорезистентними. Було виявлено, що рівні кінцевого продукту перекисного окиснення ліпідів — ТБК-продуктів як основних індикаторів окиснювального стресу — збільшуються з віком, а влітку це призводить до подальшого підвищення порівняно з іншими сезонами. Крім того, біомаркери окиснювального стресу були нижчими ($P < 0,05$) взимку, ніж в інші сезони, особливо у високорезистентних щурів. Рівень загальної антиокиснювальної активності (ОАА) у тканині печінки 6-місячних щурів був вірогідно вищим ($P < 0,05$) порівняно зі значеннями у щурів старшого віку. Подібно, вищий рівень ОАА було виявлено у тканині печінки високорезистентних щурів порівняно з низькорезистентними. У дорослих високорезистентних щурів зберігався високий рівень ОАА із мінімальними змінами впродовж року. Варто зазначити, що різниця в ОАА була вищою для груп дорослих тварин з високою резистентністю до гіпоксії взимку, навесні та влітку, що може вказувати на ефективні механізми, що перешкоджають утворенню активних форм кисню та системи їх елімінації.

Ключові слова: щурі, стійкість до гіпоксії, печінка, сезони року, гідроперекиси ліпідів, ТБК-продукти, загальна антиоксидантна активність (ОАА)



Генетична структура української популяції водяних буйволів за ISSR-PCR маркерами

Н. Б. Мохначова

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна

Вивчення внутрішньовидової генетичної різноманітності великої рогатої худоби, зокрема і видів роду *Bubalus* із підродини Бикові, має важливе значення через скорочення біорізноманітності сільськогосподарських тварин. Основою генетичної різноманітності є її генетична складова. Втрата місцевих видів та порід великої рогатої худоби — реальна загроза для біосфери, бо стійкість відтворення природних екосистем і агроекосистем безпосередньо пов'язана з їхньою генетичною здатністю пристосовуватися до умов зовнішнього середовища. Проаналізовано поліморфізм ISSR-маркерів української популяції водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) з господарства ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.). Для дослідження було відібрано 66 тварин. Зразки геномної ДНК виділено з венозної крові за допомогою стандартного набору реагентів «ДНК-сорб-В». Генотипування проводили з використанням специфічних ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG і (GA)₆CC. Кожен амплікон розглядали як один локус ДНК. Різницю спектрів визначали як за кількістю ампліконів, їх довжинами (кількість нуклеотидів), так і за їх поліморфізмом. У результаті дослідження всі праймери показали поліморфізм ділянок ДНК буйволів. Амплікони визначали в діапазоні від 200 до 4000 п.н. Аналіз ISSR-спектрів виявив 87 локусів, з яких 71 поліморфний. (AG)₈CA-маркер виявився найменш поліморфним (PIC=0,234), а (CTC)₆C — найбільш поліморфним (PIC=0,389). Консервативні локуси знайдено у чотирьох ISSR-маркерів: шість — у (AG)₈CA-маркера, п'ять — у (AG)₈CG, чотири — у (GA)₆CC та один — у (AG)₉C. Для української популяції водяних буйволів виявлено 67 видоспецифічних локусів: 10 — для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 — для (AG)₈CA і по 14 — у (AG)₈CG і (GA)₆CC. Використані ISSR-праймери рекомендовані для молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму ДНК буйволів.

Ключові слова: буйволи, генетична структура, ДНК, поліморфізм, маркери, ISSR, локуси, молекулярно-генетичний аналіз

Моніторинг генетичного поліморфізму популяцій є надважливим для збереження та відтворення сільськогосподарських тварин, оскільки за інформацією ФАО в середньому за місяць людство втрачає одну породу. Під загрозою зникнення опинились місцеві породи сільськогосподарських видів тварин, які мають у своєму геномі рідкісні алелі, асоційовані з пристосуванням до умов навколишнього середовища [4]. Скорочення біорізноманітності сільськогосподарських тварин відбувається через неконтрольовану заміну місцевих порід невеликою кількістю транснаціональних [12]. Основною причиною збереження місцевих порід є унікальність їх генетичної структури [5]. Тому необхідною умовою для запобі-

гання втрати генетичної різноманітності є проведення генетичного моніторингу сільськогосподарських видів на молекулярному рівні.

Вивчення генетичної структури відбувається переважно за мікросателітними локусами та QTL-маркерами [5]. Проте одним зі зручних методів вирішення цієї проблеми є ампліфікація міжмікросателітних фрагментів ДНК, розташованих між двома інвертованими SSR-локусами геному (ISSR-PCR). Цей метод почав розвиватися у 1994 р. і отримав широке розповсюдження в наш час [13]. Як праймери для ISSR-аналізу поліморфізму ДНК використовують короткі ди- і тринуклеотидні мікросателітні повтори. Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти

ДНК, розміщені між двома близько розташованими інвертованими мікросателітами (переважно це унікальна ДНК). У результаті ампліфікується велика кількість фрагментів, які виявляються на електрофореграмі дискретними смужками (ISSR-фінгерпринтинг). Отримані патерни ПЛР-продуктів видоспецифічні і належать до маркерів домінантного типу успадкування, поліморфізм яких визначається за наявністю чи відсутністю смужки. Для створення ISSR-маркерів не потрібне знання нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК. У геномах тварин є велика кількість мікросателітних повторів, що робить цей метод зручним для генетичного аналізу [2, 8]. Також метод ISSR-аналізу гарно відтворюється і може бути використаний для визначення міжвидової та внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації груп рослин і тварин різного таксономічного рангу, а інколи й для індивідуального генотипування [1, 3, 9, 10].

За кордоном із використанням молекулярних методів аналізу досліджують переважно європейські види тварин. Більша частина місцевих аборигенних порід і видів на молекулярно-генетичному рівні практично не досліджена. Серед них — і українська популяція водяних буйволів.

В Україні буйволівництво — давня традиційна галузь тваринництва кримських татар та русинів Закарпаття. Переважно «українські» буйволи належать до буйвола річкового (*river buffalo*), розводять їх молочного та м'ясного напрямку продуктивності. Буйволи — древні тварини, які належать до роду биків (*Bos*), виокремлені у самостійний рід буйволів (*Bubalus*) та розділені на три окремих роди: аноа, азійські та африканські буйволи. Одомашнені форми буйволів належать до азійських. Останнім часом за кордоном стали присвячувати більше уваги цим тваринам. Це особливо помітно у таких країнах, як Індія, Єгипет та Італія. В Україні ж існує екологічна ініціатива «Збереження агробіорізноманіття Карпатських гір», спрямована на відновлення популяції карпатських буйволів [6, 7].

Метою цього дослідження є аналіз поліморфізму ISSR-маркерів і генетичного різноманіття української популяції водяних буйволів.

Матеріали і методи

Було досліджено зразки венозної крові ($n=66$) від водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) з господарства ТОВ «ТАСБІО», Чернігівська обл. (рис. 1). Товариство спеціалізується на розведенні буйволів і виготовленні продуктів харчування з молока буйволиць.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. Геномну ДНК з цільної крові виділяли із використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб-В» (виробництво АмпліСенс, ЦНІІ епідеміології МЗ РФ,



Рис. 1. Фото водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.)

Fig. 1. Photo of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) TASBIO LLC (Chernihiv region)

РФ). Концентрацію отриманої ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі, порівнюючи яскравість смужок аналізованих фрагментів і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага λ).

Суміш для проведення ПЛР містила: 2 мкл загального буфера для ДНК-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів (АмпліСенс, РФ), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази (*Fermentas*, Литва). Геномну ДНК додавали у кількості 1,5, об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію сумарної ДНК з праймерами проводили на програмованому чотириканальному термоциклі «Терцик» (ДНК-технологія, РФ).

Дослідження поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-PCR маркери), виконували стандартним методом [13]. Як праймери використовували мікросателітні послідовності: $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(AG)_9C$, $(CTC)_6C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$ і $(GA)_6CC$, які вважають найбільш інформативними (табл. 1).

Таблиця 1. Послідовності праймерів, використаних у дослідженні
Table 1. The primers sequences used in the study

Послідовність праймера Primer sequence	Мотив Motive	t випалу t of firing
5'-ACCACCACCACCACCACCG-3'	$(ACC)_6G$	64°C
5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3'	$(GAG)_6C$	64°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	$(AG)_9C$	57°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCG-3'	$(AG)_8CG$	56°C
5'-GAGAGAGAGAGAGACC-3'	$(GA)_6CC$	54°C
5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTCC-3'	$(CTC)_6C$	64°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCA-3'	$(AG)_8CA$	54°C

Фракціонування продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі в 1×TBE-буфері за напруги 90 В (тривалість фореузу 2 год.). Для оцінки довжини продуктів ПЛР використовували ДНК-маркер молекулярних мас 1 Kb *Ready-to-Use* (Fermentas, Литва). Інтерпретацію продуктів ампліфікації здійснювали, фотографуючи гелі цифровою камерою під короткохвильовим ультрафіолетовим випромінюванням на транслюмінаторі після фарбування гелю бромистим етидієм.

Кожен амплікон розглядали як один локус ДНК. Параметри генетичного різноманіття визначали за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel*.

Результати й обговорення

Виконано аналіз генетичної структури водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) за використанням семи ISSR-систем на основі таких мікросателітів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC (рис. 2).

У дослідженій популяції буйволів спектри продуктів ампліфікації за використання ISSR-праймерів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC суттєво відрізнялися один від одного. Різницю спектрів визначали як за кількістю ампліконів, їх довжинами (кількість нуклеотидів), так і за поліморфізмом.

За допомогою мікросателітних праймерів (ACC)₆G, (GAG)₆C та (CTC)₆C було виявлено відповідно сім, п'ять та 10 локусів, які виявились поліморфними. Решта праймерів дали такі результати: за (AG)₉C

та (AG)₈CA — 15 та 20 локусів (по 14 поліморфних), за (AG)₈CG — 16 локусів (11 поліморфних) і (GA)₆CC дав 14 локусів, з яких поліморфними виявились 10 фрагментів. Амплікони виявлені в діапазоні від 200 до 4000 п.н. (табл. 2).

Частота фрагментів суттєво залежала від ISSR-праймера, який брав участь у полімеразній ланцюговій реакції. Так, у продуктах ампліфікації, отриманих за допомогою (AG)₈CA праймера, фрагмент 530–550 п.н. виявляли у всіх досліджених тварин. З високою частотою (0,8) цей амплікон виявлено за ампліфікації з (ACC)₆G та (GA)₆CC. За використання (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CG та (GA)₆CC цей фрагмент не трапляється. До ампліконів з найбільшою частотою належить також 380–400 п.н. Цей фрагмент є у всіх тварин за використання (AG)₈CG та (GA)₆CC. Значно рідше (0,1) він трапляється у (CTC)₆C (0,6), (ACC)₆G (0,5), (AG)₈CA. Поширеними також є фрагменти 520–500 та 870–820 п.н. У спектрах ампліфікації з (AG)₈CA ці амплікони є у всіх тварин. Також 100% тварин мали амплікон 520–500 п.н. за (AG)₉C і (AG)₈CG.

Для визначення генетичної різноманітності популяції водяних буйволів було використано методи оцінки на популяційному рівні. У табл. 3 наведено показники генетичної мінливості дослідженої популяції водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) ТОВ «ТАСБІО» (n=66) за (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC.

Загалом за сімома праймерами у спектрах ампліфікації було отримано 87 локусів, з яких 71 виявився поліморфним. Загальна частка поліморфних локусів становила 81,6%, середнє значення індексу PIC за сімома праймерами — 0,321.

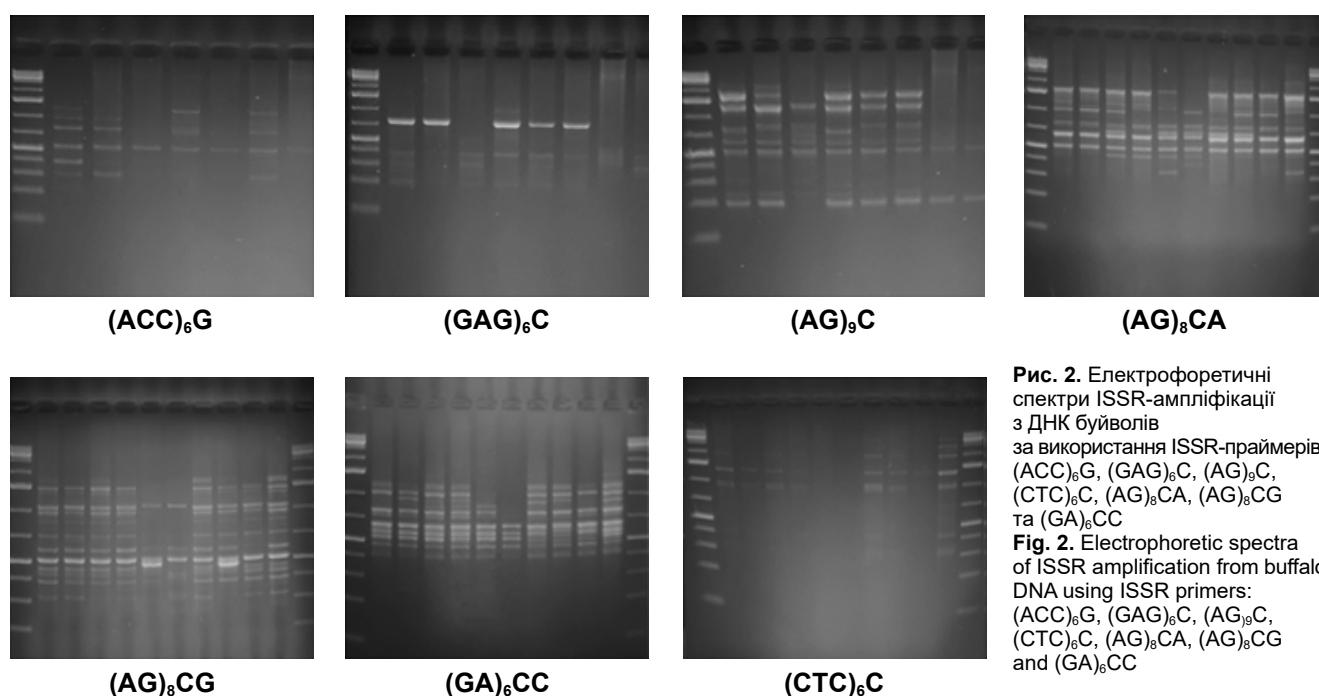


Рис. 2. Електрофоретичні спектри ISSR-ампліфікації з ДНК буйволів за використання ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC
Fig. 2. Electrophoretic spectra of ISSR amplification from buffalo DNA using ISSR primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC

Таблиця 2. Частоти фрагментів для ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC для популяції водяних буйволів**Table 2.** Slice frequencies for ISSR-primers (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC for the water buffalo population

Розміри фрагментів Fragments dimensions	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(AG) ₉ C	(CTC) ₆ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC
3100–4000				0,20			
3000–2600				0,10			
2500–2300					0,10		
2100–2000			0,30	0,70			
1900–1800			0,10				
1750–1700						0,70	
1650–1600			0,50				
1550–1500			0,60		0,90	0,80	
1450–1400					0,90	0,80	0,40
1350–1300	0,30				0,90		
1290–1240			0,60	0,80			0,80
1230–1180					0,80		0,80
1170–1120			0,60				
1110–1060					1,00	1,00	
1050–1000		0,10		0,70	0,60	0,80	0,90
990–940	0,20			0,70	0,20		
930–880						0,80	0,50
870–820			0,40	0,10	1,00		0,50
810–760	0,40		0,40		0,80		0,90
750–720		0,50	0,20		0,50		0,90
710–680					1,00	0,80	
670–640					0,90	0,20	1,00
630–600			0,70			0,90	
590–560							1,00
550–530	0,80				1,00		0,80
520–500			1,00		1,00	1,00	0,70
490–470			0,30		1,00	0,90	1,00
460–440					0,50		
430–410				0,60	0,10	1,00	
400–380	0,50			0,60	0,10	1,00	1,00
370–360		0,80					
350–340						0,30	
330–320				0,70	0,20	1,00	
310–300	0,30		0,50	0,70			
290–280		0,50				0,40	
270–260							
250–240	0,10						
230–220			0,60				
210–200		0,50	0,80				
180–160							

Таблиця 3. Популяційно-генетична характеристика буйволів української популяції з використанням ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC**Table 3.** Population-genetic characteristics of water buffaloes of the Ukrainian population using ISSR-primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC

ISSR-система ISSR system	n	Локусів / Loci		H _e	N _a	I	PIC	K
		виявлених detected	% поліморфних % polymorphic					
(ACC) ₆ G	66	7	100	0,817	0,371	0,309	0,299	—
(GAG) ₆ C	66	5	100	0,720	0,48	0,290	0,367	—
(AG) ₉ C	66	15	93,33	0,692	0,507	0,290	0,347	1
(CTC) ₆ C	66	10	100	0,648	0,536	0,256	0,389	—
(AG) ₈ CA	66	20	70	0,425	0,675	0,153	0,234	6
(AG) ₈ CG	66	16	68,75	0,337	0,775	0,149	0,290	5
(GA) ₆ CC	66	14	71,43	0,321	0,800	0,152	0,318	4

Примітка. H_e — очікувана гетерозиготність, N_a — середня кількість алелів на локус, I — індекс гетерогенності Шеннона, PIC — індекс поліморфізму локусу, K — кількість консервативних локусів

Note. H_e — expected heterozygosity, N_a — average number of alleles per locus, I — Shannon heterogeneity index, PIC — locus polymorphism index, K — number of conservative loci

Найменш поліморфним був (AG)₈CA-маркер — індекс поліморфності за ним становив 0,234. Саме за цим праймером було виявлено найбільшу кількість (K=6) консервативних локусів, які перебували в межах 470–490, 500–520, 530–550, 680–710, 820–870, 1060–1110 п.н. Загалом консервативні локуси знайдено ще в трьох ISSR-маркерів: п'ять — у (AG)₈CG, чотири — у (GA)₆CC та один — у (AG)₉C.

Разом із загальними локусами, в нашому дослідженні виявлені і видоспецифічні фрагменти. Для визначення видоспецифічного патерну в одомашнених видів було запропоновано використовувати лише фрагменти, які трапляються з частотою >0,4 [11]. Тому для української популяції водяних буйволів виявлено 10 видоспецифічних локусів для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 для (AG)₈CA, та по 14 у (AG)₈CG і (GA)₆CC (рис. 3).

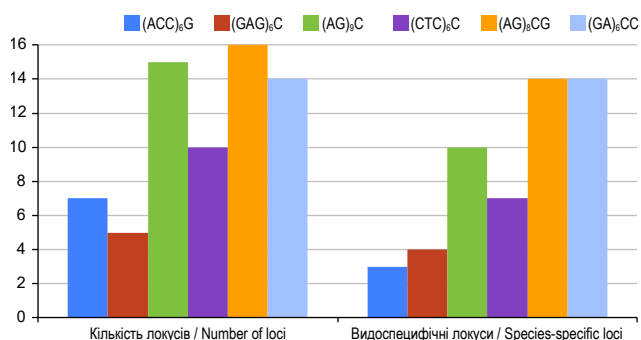


Рис. 3. Розподіл ISSR-фрагментів за вивченими праймерами української популяції водяних буйволів
Fig. 3. Distribution of ISSR fragments according to the studied primers of the Ukrainian water buffalo population

Висновки

1. Використання ISSR-систем досить вагомо збільшує можливості генетичного аналізу популяцій та дозволяє встановити внутрішньопопуляційну мінливість окремих ділянок геному.

2. ISSR-системи (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC виявили достатній рівень поліморфізму для вивчення внутрішньовидової мінливості української популяції водяних буйволів.

3. Загалом за сімома праймерами в спектрах ампліфікації було отримано 87 локусів, з яких 71 виявився поліморфним. Загальна частка поліморфних локусів становила 81,6%, середнє значення індексу PIC за сімома праймерами — 0,321.

4. Найменш поліморфним виявився (AG)₈CA-маркер (PIC=0,234), в (ACC)₆G були найвищі показники рівня гетерозиготності (0,817) та генетичної біорізноманітності (I=0,309).

5. Для української популяції водяних буйволів виявлено 10 породоспецифічних локусів для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 — для (AG)₈CA і по 14 — у (AG)₈CG і (GA)₆CC.

Перспективи подальших досліджень

Заплановано дослідити аналіз каріотипу української популяції водяних буйволів з господарства ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.) та дослідження генів, асоційованих з господарсько-корисними ознаками.

1. Bakkappa S, Talebi E, Subramanya G. Role of molecular markers (RAPD and ISSR) in silkworm conservation. *Intern. J. Adv. Biol. Res.* 2011; 1 (1): 1–7. Available at: [http://www.scienceandnature.org/IJABR/IJABR_Vol1\(1\)2011/IJABR_V1\(1\)1.pdf](http://www.scienceandnature.org/IJABR/IJABR_Vol1(1)2011/IJABR_V1(1)1.pdf)
2. Bekmanov BO, Amirgalieva AS, Mussayeva AS, Tulekei MD, Dosibayev KZ, Orasimbetova ZS, Khussainova EM, Zhabbasov RZ, Zhomartov AM. Molecular and genetic analysis of Edilbay sheep breeds. *News Nat. Acad. Sci. Rep. Kazakhstan.* 2015; 3 (309): 27–33. Available at: <http://biological-medical.kz/images/pdf/b20153/b2733.pdf>
3. Chen DX, Li LY, Zhang X, Wang Y, Zhang Z. Genetic diversity and population structure of wild *Dipsacus asperoides* in China as indicated by ISSR markers. *Genet. Mol. Res.*, 2014; 13 (3): 6340–6349. DOI: 10.4238/2014.February.14.12.
4. Glazko VI, Erkenov TA, Glazko TT, Dzatoev KM. Genetic structure of Karachai horses on ISSR-PCR markers. *Biogeosys. Tech.* 2016; 9 (3): 195–204. DOI: 10.13187/bgt.2016.9.195.
5. Golik TV, Erkenov TF, Glazko TT, Glazko VI. Spectra of ISSR-PCR markers in the evaluation of population-genetic differentiation of the Karachai horse on farms of the Karachai-Cherkess republic. *Mess. TSKHA*, 2018; 3: 61–77. DOI: 10.26897/0021-342X-2018-3-61-77.
6. Guseev YV, Melnyk OV, Gladyr EA, Zinovieva NA. The polymorphism of the population of the Ukrainian river buffalo at micro-satellite DNA loci. *Anim. Breed. Genet.* 2016; 51: 276–283. DOI: 10.31073/abg.51.37. (in Ukrainian)
7. Mokhnachova NB. Genotyping of Ukrainian water buffaloes according β -CN (A2-milk), CSN3 and β LG genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Agr. Ser.* 2021; 59 (3): 361–365. DOI: 10.29235/1817-7204-2021-59-3-361-365.
8. Nechaeva YS, Boronnikova SV, Yusupov RR, Heinze B. The study of ISSR-markers polymorphism in natural and cultural populations of larch. *Fund. Res.* 2013; 6 (6): 1426–1431. Available at: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31753>
9. Pashaei S, Azari MA, Hasani S, Khanahmadi A, Rostamzadeh J. Genetic diversity in Mazandaranian native cattle: comparison with Holstein cattle using the ISSR marker. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2009; 12 (9): 717–721. DOI: 10.3923/pjbs.2009.717.721.
10. Sheikina OV, Prokhorova AA, Novikov PS, Krivorotova TN. Developing of the methodology for the identification of *Picea abies* L. clones by using ISSR markers. *Sci. J. KubGAU*, 2012; 83 (09): 1–14. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/21.pdf>
11. Stolpovskii YA, Lazebny OE, Stolpovskii KY, Sulimova GE. The use of the ISSR-PCR method for identifying domesticated animal breeds and species, inferring their population structures, and assessing gene pool similarity. *Russ. J. Genet.* 2010, 46 (6): 732–739. DOI: 10.1134/S1022795410060141.
12. The second report on the state of the world's animal genetic resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2015. Available at: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/46cdce20-7b52-4517-92bc-90e5d500c6f6>
13. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 1994; 20 (2): 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.

Genetic structure of the Ukrainian water buffalo population by ISSR-PCR markers

N. B. Mokhnachova

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS,
1 Pogrebnyaka str., Chubynske village, Boryspil district, Kyiv region, 08321, Ukraine

The study of intraspecific genetic diversity of cattle, including species of the genus *Bubalus* from the subfamily Bull, is important because of the reduction of biodiversity of farm animals. The basis of genetic diversity is its genetic component. The loss of native species and breeds of cattle is a real threat to the biosphere, as the resilience of natural ecosystems and agroecosystems is directly linked to their genetic ability to adapt to environmental conditions. Polymorphism of ISSR-markers of the Ukrainian population of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the farm of "TASBIO" LLC (Chernihiv region) was analyzed in 66 animals selected for the study. Genomic DNA samples were isolated from venous blood with a standard set of reagents. Genotyping was performed using specific ISSR primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC. We determined the difference in spectra both by the number of amplicons, their lengths (number of nucleotides) and by their polymorphism. As a result of the study, all primers showed polymorphism of buffalo DNA regions. Amplicons were defined in the range from 200 bp up to 4000 bp. Analysis of ISSR spectra revealed 87 loci, of which 71 were polymorphic. (AG)₈CA-marker was the least polymorphic (PIC=0.234), (CTC)₆C the most polymorphic (PIC=0.389). Conservative loci were found in four ISSR markers: 6 in (AG)₈CA marker, 5 in (AG)₈CG, 4 in (GA)₆CC, and 1 in (AG)₉C. 67 species-specific loci were identified for the Ukrainian water buffalo population: 10 for (AG)₉C, 3 loci for (ACC)₆G, 4 for (GAG)₆C, 7 for (CTC)₆C, 15 for (AG)₈CA, and 14 in (AG)₈CG and (GA)₆CC. The ISSR primers used are recommended for molecular genetic analysis of buffalo DNA polymorphism.

Key words: buffalo, genetic structure, DNA, polymorphism, markers, ISSR, locuses, molecular genetic analysis



Розчинність протеїну кормів як індикатор перетравності і доступності поживних речовин в раціонах бугайців

В. С. Козир, В. І. Петренко, Г. Г. Дімчя, А. Н. Майстренко

izkzoo3337@gmail.com

Державна установа «Інститут зернових культур НААН»,
вул. Володимира Вернадського, 14, м. Дніпро, 49027, Україна

Дослідження виконано на бугайцях червоної степової породи з дуоденальними та ілеоцекальними анастомозами за згодовування ізоенергетичних, ізопроїєнових сіноконцентратних раціонів з різним рівнем розчинного протеїну (РчСП) і розщеплюваного протеїну (РщСП). Вивчали перетворення сухої речовини (СР), органічної речовини (ОР), сирого протеїну (СП), сирій золи (СЗ), сирого жиру (СЖ), сирій клітковини (СКл) та безазотових екстрактивних речовин (БЕР) окремо у складному шлунку, тонкому (ТнК) та товстому (ТсК) відділах кишечника. Засвоєння протеїну тваринами оцінювали за кількістю його, перетравленого в ТнК, а непродуктивні витрати — за часткою азоту сечі. Раціони склалися з сіна стоколосу, горохової дерті, мінеральних добавок. Різної кількості РчСП в раціонах досягали згодовуванням натуральної горохової дерті (контроль) та дерті з прожареного гороху за температури +105°C (дослід). За згодовування раціону зі зниженим рівнем РчСП та РщСП видима інтенсивність травлення знижувалась, що проявлялось в дещо меншій кількості спожитого корму, в меншій кількості дуоденального та ілеоцекального хімусів. У складному шлунку перетравність СП на дослідному раціоні зі зниженим рівнем РчСП була на 10% нижчою. На контрольному раціоні з високим рівнем РчСП більше розщеплювалось СП і до ТнК надходило більше амонійного азоту. Доступність СП для перетравлювання в ТнК на дослідному раціоні була на 5,8% вищою, проти контролю, за більшої на 8–10% перетравності СР, ОР та СП, але нижчої перетравності Сз та Сж. У ТсК перетравність поживних речовин на вивчених раціонах мала різноспрямований характер. На контрольному раціоні з підвищеним рівнем РчСП відбувалось знецінення значної частини протеїну кормів внаслідок на 40% більшого виведення з сечею азоту у вигляді сечовини.

Ключові слова: органічна речовина, протеїн, розчинність, жир, клітковина, БЕР, перетравність, складний шлунок, тонкий кишечник, товстий кишечник

В останні десятиріччя інтенсивно вивчають потреби і доступність поживних речовин для великої рогатої худоби, особливо сирого протеїну [1, 6, 13, 15, 18–21]. Встановлено, що якість протеїну кормів, а саме його розчинність у водному середовищі, має важливе значення для ефективного використання поживних речовин кормів жуйними тваринами [14, 19, 21]. Показник розчинності протеїну кормів тісно корелює з розщепленням протеїну в передшлунках і нижче розташованих відділах травного тракту великої рогатої худоби та інших жуйних. Вважається, що майже весь розчинний протеїн кормів розщеплюєть-

ся у передшлунках тварин і за наявності достатньої кількості енергії входить у мікробний білок, який є важливим джерелом повноцінного білка для тварин. Спостерігали, що за збільшення кількості СП в раціоні і його розчинності, а також кількості СП та РчСП на одиницю енергії або дефіциті енергії, ефективність використання кормового СП знижується внаслідок його розщеплення у передшлунках. При цьому значна його частина не трансформується у мікробний білок, проходячи стадії утворення аміаку, глютамінової кислоти та сечовини, виводиться з організму з сечею [4, 9, 11, 14, 22]. Тобто відбуваються непродуктивні

витрати кормового протеїну. Отже, розчинність протеїну є важливою характеристикою білкових кормів і її необхідно враховувати у складанні раціонів, особливо для високопродуктивних тварин.

Проте у більшості довідників чи систем годівлі, зокрема й виданих в останні роки в Україні, введено показник розщеплюваного і нерозщеплюваного протеїну [2, 7, 8, 13, 16, 20], але практично відсутні дані щодо вмісту розчинного і розщеплюваного протеїну в кормах, навіть в останній базі даних хімічного складу кормів за 2009 р. [3].

На нашу думку, важливішим є показник розчинності протеїну, а не розщеплення. По-перше, розчинність протеїну корму є природною властивістю і менше залежить від різних умов годівлі, хоча й може змінюватись за дії деяких фізичних (температура, тиск) та хімічних факторів, а також способів підготовки кормів для згодовування. По-друге, відпрацьована і стандартизована лабораторна методика визначення розчинності протеїну в мінеральному буфері (ГОСТ 28074-89) проста і доступна.

Ступінь розщеплення або руйнування протеїну в передшлунках, навпаки, не є природною фізичною величиною. Це пролонгований процес, який залежить від умов годівлі: концентрації енергії та протеїну в сухій речовині раціону, співвідношення протеїну і енергії, способів заготівлі та підготовки кормів, співвідношення об'ємистих і концентрованих кормів. Сама методика визначення, хоч також стандартизована, але складна, потребує спеціально оперованих тварин, малодоступна, не враховує швидкості просування корму травним трактом. Отже, показник розщеплюваного та нерозщеплюваного протеїну в кормах є величиною орієнтовною і його легко розрахувати за кількістю розчинного протеїну та перетравної органічної речовини [6, 10, 15, 20]. Очевидно, раціональніше накопичувати дані з розчинності протеїну різних кормів і особливо відношення цього показника на одиницю спожитої енергії.

Встановлено, що методика визначення балансу азоту за різницею «корм мінус кал» у жуйних тварин не відображає дійсних величин засвоєння протеїну в організмі [1, 7, 15, 18, 21]. Найефективніше жуйні тварини використовують ті протеїни кормів, які повільніше гідролізуються в рубці і здебільшого перетравлюються у кишечнику. Щоби кількісно визначити ступінь розщеплення протеїну в передшлунках, застосовують методики нейлонових мішечків, які зі зразками кормів на певний час закладають через фістули до рубця тварин або пропускають через весь травний канал. Більшого поширення набули доступніші методи визначення розчинності протеїну способом інкубації зразків кормів в мінеральних буферах, близьких за складом до рубцевої рідини тварин. За кількістю розчинного протеїну, який надходить до тонкого кишечника, і його визначеною середньою перетравністю розраховують кількість розщеплюваного протеїну, яка може надходити і перетравлюватись

у тонкому кишечнику. Таким чином, кількість протеїну, яка надійшла і всмокталася у тонкому кишечнику, стала мірою його доступності для тварин.

Для зниження кількості розщеплюваного протеїну в раціонах великої рогатої худоби використовують різні прийоми, які знижують розчинність протеїну раціону: підбір складників раціону з низькою розчинністю та розщеплюваністю протеїну; оброблення кормів формальдегідом, кислотами, лугами; розміщення у спеціальних капсулах; оброблення сухим теплом, паром тощо.

Розроблялись також різні прийоми накладання фістул та анастомозів на ділянки травного тракту тварин [19, 21] для прямого визначення кількості протеїну, всмоктаного у тонкому кишечнику. Але метод подвійних анастомозів виявився досить трудомістким, не завжди дозволяв використовувати достатню кількість тварин для статистичної обробки результатів. Тому більшого розповсюдження набули праці зі спробами визначити потік поживних речовин до тонкого кишечника в дослідях тільки з одною дуоденальною канюлею, а потім розрахунковим методом прогнозувати надходження протеїну до кишечника [5, 12, 13, 15, 18–21]. Деякі із запропонованих систем оцінювання давали значні похибки [1, 9]. Найбільш задовільні результати показували системи оцінювання, розроблені в останні десятиріччя у США, Голландії та Україні [5, 6, 10, 13].

Попри все, найточніший результат отримують за оцінювання добової кількості хімусів, які проходять через ТНК та ТСК, і визначення їх складу. Незважаючи на певну складність таких досліджень, вони залишаються найточнішими і найбільш актуальними.

Мета досліджень — за різної кількості розчинного протеїну в ізоенергетичних, ізопротеїнових сіноконцентратних раціонах бугайців з накладеними подвійними анастомозами вивчити перетравність основних груп поживних речовин у різних відділах травного каналу, визначити реальну доступність протеїну для тварин і ступінь його знецінення.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на двох бугайцях червоної степової породи живою масою 330–350 кг з накладеними дуоденальними (6–10 см від пілоруса) [22] та ілеоцекальними анастомозами за Синєщоким [18]. Згодовували ізоенергетичні (концентрація доступної для обміну енергії, ДОО, становила 10,84–10,99 МДж/кг СР), ізопротеїнові (концентрація сирого протеїну — 186,4–190,1 г СП/кг СР) сіноконцентратні раціони, які складалися зі злакового сіна (стоколос, *Bromus intermis*) — 6 кг та горохової дерті: контрольний раціон — 2,6 кг з натираного гороху, дослідний раціон — 2,4 кг з прожареного за температури 105°C. Горох обробляли на барабанних сушарках типу АВМ. Мінеральну підгодовлю тварини отримували в однаковій

кількості. Раціони різнилися тільки за рівнем РчСП: 58,34% від СП в контролі і 39,42% — у досліді.

На вказаних раціонах тварин утримували не менше 21 дня з суворим обліком заданих кормів, залишків кормів та випитої води. Потім проводили добові виміри кількості дуоденального та ілеоцекального хімусів, калу, сечі. Зразки дуоденального та ілеоцекального хімусів відбирали кожну годину (4% від кількості, що пройшла за годину дуоденального, 2% — ілеоцекального) і відразу проводили інактивацію кип'ятінням. Для визначення амонійного та сечовинного азоту зразки хімусу заморожували. Порції калу та сечі консервували, потім відбирали середній зразок з добової кількості. Сечовинний азот сечі визначали в 6–8 порціях свіжої сечі. Кожний раціон згодовували по черзі двом тваринам методом періодів.

У зразках кормів, залишках кормів, хімусів та калу визначали: кількість СР — за ГОСТ 27548-87; СЗ — за ГОСТ 26226-95; ОР — за різницею між СР та СЗ; СП — за ГОСТ 13496.4-93; СЖ — за ГОСТ 13496.15-97; СКл — за ГОСТ 13496.2-91; БЕР — розрахунковим методом; РчСП — інкубацією зразків кормів в мінеральному буфері за ГОСТ 28074-89; РщСП — розрахунковим методом за [20], приймаючи, що в передшлунках розщеплюється весь розчинний протеїн і 35% нерозчинного; НРщСП — розрахунковим методом, віднімаючи від загального протеїну розщеплюваний, амонійний та сечовинний азот — дифузним методом за Конвеєм [4] у модифікації Каплана та Свириденко [9]; доступність протеїну — за кількістю, перетравленою в тонкому кишечнику; ефективність використання азоту — за відношенням сечовинного азоту в сечі до загального виділеного азоту [13, 14]. Весь цифровий матеріал обробляли статистично за Рокицьким (1967).

Результати й обговорення

Після просмажування гороху за температури 105°C розчинність протеїну знизилась від 93,5 до 45,0%. Споживання кормів тваринами на досліджуваних раціонах становило 2,17 та 2,01 кг СР на 100 кг живої маси (табл. 1). Концентрація енергії, відповідно, для контрольного та дослідного раціонів становила 10,84 і 10,99 МДж/кг СР, сирого протеїну — 186,4 та 191,1 г/кг. При цьому частка розчинного протеїну у % до загальної кількості сирого протеїну становила 58,3 та 39,4%, розщеплюваного — 72,9 та 60,6%, нерозщеплюваного — 27,1 та 39,4%. На 1 МДж ДОЕ тварини споживали 10,22 та 6,85 г розчинного протеїну на контрольному та дослідному раціонах відповідно ($P < 0,02$). За згодовування дослідного раціону тварини споживали на 5% менше СР та ОР і на 3,7 % менше СП, ніж тварини на контрольному раціоні. Водночас за кількістю спожитих розчинного та розщеплюваного протеїнів різниці були статистично вірогідними ($P < 0,05$ та $P < 0,02$) і досягали 35 та 20% відповідно. Очевидно,

у зв'язку з цим видимі процеси травлення у бугайців на дослідному раціоні відбувались менш інтенсивно або дещо інакше. Добові об'єми дуоденального та ілеоцекального хімусів, а також сечі у них були на 21–25% меншими порівняно з тваринами на контрольному раціоні, де був вищий рівень РчСП та РщСП, а виведення калу — на 10% більшим як у натуральному вигляді, так і в розрахунку на одиницю спожитих СР та ОР. На дослідному раціоні тварини випивали на 19% більше води за абсолютним показником, а в розрахунку на спожиті СР та ОР — на 25%.

Перетравність СР (зміни стосовно спожитої) послідовно: у складному шлунку — тонкому відділі кишечника — товстому кишечнику — виведення з калом — у всьому кишково-шлунковому тракті, на контрольному та дослідному раціонах становила, відповідно, 58,9 та 59,8%; 15,5 та 18,8% (різниця статистично вірогідна, $P < 0,05$); 7,46 та 0,23%; 18,3 та 21,1%; 81,7 та 78,9% (табл. 2). Перетворення ОР у такий же послідовності ділянок травного каналу відбувалось аналогічно перетравності СР і мало такі показники: 66,2 та 65,0%; 11,5 та 16,2%; 5,6 та 0,9%; 16,7 та 19,7%; 83,3 та 80,3% на контрольному та дослідному раціонах відповідно. Загалом можна констатувати, що за зниження кількості розчинного протеїну в раціоні значні зміни у перетравності СР та ОР, щодо спожитого з кормами та у відсотках від надходження, спостерігали на ділянках тонкого і товстого кишечника; з огляду на це, оцінка загальної перетравності поживних речовин за формулою «корм мінус кал» не завжди коректна.

Перетравність СП в наших дослідках суттєво змінювалась уже на ділянці складного шлунку і становила послідовно в різних відділах травного каналу, на контрольному та дослідному раціонах відповідно: у передшлунках — 41,4 і 36,3%, у тонкому кишечнику — 35,5 і 45,1%, на ділянці товстого кишечника — 5,6% та добавка 4,0%, виділення з калом — 16,8 і 22,6%, загальна перетравність у всьому шлунково-кишковому тракті — 83,0 та 77,4%. Тобто на дослідному раціоні зі зменшеною кількістю розчинного протеїну у складному шлунку протеїну розщеплювалось менше, що підтверджується кількістю амонійного та сечовинного азоту в дуоденальному хімусі (11,16 та 7,48 г амонійного, 12,53 та 7,56 г сечовинного); більше його надходило до тонкого кишечника і більше перетравлювалось. Відповідно, до товстого відділу кишечника, порівняно з контролем, надходило на 20% менше протеїну і відбувалось незначне збільшення його кількості — очевидно, за рахунок мікробіального синтезу та ендогенного азоту.

З калом на дослідному раціоні виводилось 22,6% протеїну від спожитого з кормами, на контрольному — 16,8%. Загальна видима перетравність протеїну на дослідному раціоні була на 5,6% нижчою. Оцінюючи перетравність протеїну за класичною схемою, бачимо, що на дослідному раціоні зі зниженим рівнем розчинного протеїну засвоєння азоту начебто було гіршим порівняно з контролем. Але за аналізу

Таблиця 1. Загальна характеристика годівлі та травлення
Table 1. General feeding and digestion characteristics

Показники / Indices	Контроль / Control	Дослід / Experimental
Спожито / Consumed:		
СР, г/добу / Crude protein, g/day	7265,58±121,18	6901,44±355,56
% від контролю / % of control	100	95,0
РЧСП, г/добу / Soluble protein, g/day	804,55±7,62	521,05±22,2
РЧСП, % від СР / Soluble protein, % of crude protein	58,34±0,39	39,42±0,11**
РЧСП, г/МДж ДОО / Soluble protein, g/MJ ME	10,21±0,08	6,87±0,06**
РЩСП, г/добу / Degradable protein, g/day	1005,51±7,87	801,2±32,82
РЩСП, % від СР / Degradable protein, % of crude protein	72,94±0,25	60,62±0,13**
РЩСП, г/МДж ДОО / Degradable protein, g/MJ ME	12,71±0,11	10,57±0,11*
НРЩСП, г/добу / Undegradable protein, g/day	371,48±7,87	520,30±19,68
НРЩСП, % від СР / Undegradable protein, % CP	27,08±0,27	39,38±0,08**
НРЩСП, г/МДж ДОО / Undegradable protein, g/MJ ME	34,27±0,73	47,34±1,79
Концентрація енергії, МДж ДОО/кг СР / Energy concentration, ME MJ/kg DM	10,84	10,99
Концентрація протеїну, г СР/кг СР / Protein concentration, CP/kg DM	186,4	190,1
Випито води / Water drunk:		
л/добу / L/day	21,25±3,25	25,32±0,764
л/кг СР / L/kg DM	2,92	3,67
л/кг ОР / L/kg OM	3,11	3,90
% від контролю / % of control	100	119,2
Пройшло дуоденального хімусу / Duodenal chyme passed:		
л/добу / l/day	94,49±1,38	71,57±9,3
л/кг СР / L/kg DM	13,01±0,07	10,32±0,81
л/кг ОР / L/kg OM	13,83±0,11	10,98±0,87
% від контролю / % of control	100	75,7
Пройшло ілеоцекального хімусу / Ileocecal chyme passed:		
л/добу / l/day	23,37±4,25	18,25±5,05
л/кг СР / L/kg DM	3,22±0,54	2,56±0,65
л/кг ОР / L/kg OM	3,41±0,57	2,78±0,64
% від контролю / % of control	100	78,1
Виведено калу / Feces excreted:		
кг/добу / kg/day	7,5±1,3	8,32±0,21
кг/кг СР / kg/kg DM	1,03±0,17	1,21±0,09
кг/кг ОР / kg/kg OM	1,10±0,18	1,28±0,10
% від контролю / % of control	100	110,9
Виведено сечі / Urine excreted:		
л/добу / l/day	8,66±0,34	6,88± 0,05
л/кг СР / L/kg DM	1,19±0,03	1,00±0,05
л/кг ОР / L/kg OM	1,27±0,025	1,06±0,05
% від контролю / % of control	100	79,5
Виділено азоту з сечею, г/добу / Nitrogen excreted in the urine, g/day	104,18±12,36	104,73±7,99
у тому числі азоту сечовини, г/добу / including urea nitrogen, g/day	76,89±6,09	36,12±3,79
азоту сечовини, % від загального / urea nitrogen, % of total	74,15	34,95
Середня жива маса тварин, кг / Average live weight of animals, kg	334,5±1,5	343,0±40,2
Метаболічна маса (ЖМ ^{0.75}), кг / Metabolic mass (JM ^{0.75}), kg	78,29	82,96

Примітка. Тут і далі * — P<0,05; ** — P<0,02.

Note. Here and further * — P<0.05; ** — P<0.02.

процесу травлення в окремих ділянках травного каналу видно, що на дослідному раціоні дійсне засвоєння протеїну (перетравність і всмоктування) було на 10% вищим від контролю, а частка азоту у вигляді сечовини в загальній кількості азоту сечі становила 35% проти 74% у контролі. Очевидно, на контрольному раціоні з рівнем розчинності протеїну 56% відбувалось його інтенсивне розщеплення з утворенням високої концентрації амонійного і сечовинного азоту. Як відомо [7, 19], доля сечовини в загальному азоті сечі обумовлює ступінь знецінення протеїну кормів та їх

непродуктивні витрати. Отже, в наших дослідях на контрольному раціоні з рівнем сирого протеїну 184,6 г на 1 кг СР, концентрацією енергії 10,84 Мдж на 1 кг СР, співвідношенням сирого протеїну до енергії 17,2 г на 1 Мдж ДОЕ, розчинного протеїну до енергії 10,21 г на 1 Мдж ДОЕ, розщеплюваного протеїну до енергії 12,71 г на 1 Мдж ДОЕ, відбувались на 105% більші непродуктивні втрати азоту протеїну кормів. Вказані вище параметри вмісту енергії та протеїну в контрольному раціоні та, головне, їхнє співвідношення не були оптимальними для засвоєння в організмі тварин.

Таблиця 2. Перетравність сухої речовини, органічної речовини та сирого протеїну, г/добу
Table 2. Digestibility of dry matter, organic matter and crude protein, g/day

Показники / Indices	Раціон Diet	Суха речовина Dry matter	Органічна речовина Organic matter	Сирий протеїн Crude protein
Спожито з кормами Consumed with feed	К / С	7266±121,2	6831±106,2	1372,0±15,7
	Д / Е	6901±355,6	6491±329,7	1321,5±52,5
Змінилось у складному шлунку, +; – Changed in rumen, +; –	К / С	–4269,±11,3	–4520±18,4	–577,9±21,7
	Д / Е	–4130±148,5	–4222±102,4	–479,4±11,2
Змінилось у шлунку, % від спожитого Changed in abomasum, % of consumed	К / С	–58,76	–66,17	–41,37
	Д / Е	–59,84	–65,04	–36,28
Надійшло до тонкого кишечника Income to small intestine	К / С	2996±109,5	2311±87,9	794,0±37,4
	Д / Е	2771±504,4	2269±432,1	842,1±63,7
Змінилось у тонкому кишечнику, +; – до спожитого Changed in small intestine, +; – to the consumed	К / С	–1124±3,5	–784±31,6	–486,6±16,8
	Д / Е	–1298±5,9*	–1050±3,0	–595,8±25,5
— % від спожитого — % of consumption	К / С	–15,47	–11,48	–35,47
	Д / Е	–18,81	–16,17	–45,08
— % від надходження — % of admission	К / С	–37,52	–33,94	–61,29
	Д / Е	–46,86	–46,27	–70,75
Надійшло до товстого кишечника Income to large intestine	К / С	1872±114,0	1527±119,5	307,4±20,6
	Д / Е	1473±510,3	1219±435,1	246,3±89,2
Змінилось у товстому кишечнику, +; – Changed in large intestine, +; –	К / С	–542±121,9	–385±101,0	–77,3±32,3
	Д / Е	–16±502,5	+58±448,2	+52,4±84,2
— % від спожитого — % of consumed	К / С	–7,46	–5,63	–5,63
	Д / Е	–0,23	+0,9	+3,97
— % від надходження — % of admission	К / С	–28,97	–25,21	–25,14
	Д / Е	–1,06	+4,78	+21,27
Виведено з калом Excreted with feces	К / С	1330±235,3	1142±220,3	230,1±55,9
	Д / Е	1457±7,8	1277±13,1	298,7±5,1
— % від спожитого — % of consumption	К / С	18,31	16,72	16,77
	Д / Е	21,11	19,68	22,6
Перетравлено у всьому шлунково-кишковому тракті Digested in gastrointestinal tract	К / С	5935±114,1	5689±114,2	1141,9±43,1
	Д / Е	5444±363,3	5214±342,8	1022,8±47,4
— %	К / С	81,69	83,28	83,01
	Д / Е	78,89	80,32	77,40

Таблиця 3. Перетравність сирової золи та сирого жиру, г/добу
Table 3. Digestibility of crude ash and crude fat, g/day

Показники / Indices	Раціон Diet	Сира зола / Crude ash	Сирий жир / Crude fat
Спожито з кормами Consumed with feed	K / C	434,7±14,19	164,5±3,65
	D / E	410,23±26,13	153,5±8,56
Змінилось у складному шлунку, +; – Changed in rumen, +; –	K / C	+250,5±7,13	+15,2±8,13
	D / E	+91,7±46,15	–3,2±10,88
Змінилось у шлунку, % від спожитого Changed in abomasum, % of consumed	K / C	+57,62	+9,19
	D / E	+22,36	–0,02
Надійшло до тонкого кишечника Income to small intestine	K / C	685,2±22,02	179,6±11,51
	D / E	501,9±72,28	150,3±19,54
Змінилось у тонкому кишечнику, +; – до спожитого Changed in small intestine, +; – to the consumed	K / C	–339,4±28,06	–115,0±4,28
	D / E	–248,6±2,89	–82,1±7,77
— % від спожитого — % of consumption	K / C	–78,08	–69,93
	D / E	–60,59	–53,47
— % від надходження — % of admission	K / C	–49,54	–64,04
	D / E	–49,52	–54,61
Надійшло до товстого кишечника Income to large intestine	K / C	345,8±6,04	64,6±7,22
	D / E	253,4±75,17	68,2±27,31
Змінилось у товстому кишечнику, +; – Changed in large intestine, +; –	K / C	–157,3±20,88	–10,3±1,825
	D / E	–74,0±69,89	–13,5±26,99
— % від спожитого — % of consumed	K / C	–36,19	–6,24
	D / E	–18,03	–8,77
— % від надходження — % of admission	K / C	–45,5	–15,9
	D / E	–29,18	–19,58
Виведено з калом Excreted with feces	K / C	188,4±14,84	54,3±9,05
	D / E	179,4±5,28	54,8±0,31
— % від спожитого — % of consumption	K / C	43,35	33,02
	D / E	43,73	35,68
Перетравлено у всьому шлунково-кишковому тракті Digested in gastrointestinal tract	K / C	246,28±0,06	110,2±5,67
	D / E	230,8±20,85	98,7±8,25
— %	K / C	56,35	66,98
	D / E	56,27	64,32

Перетравність (зміни) сирової золи (табл. 3) найсуттєвіше різнилась між групами у складному шлунку та товстому кишечнику, менше — в тонкому кишечнику, за однакової перетравності у всьому травному каналі. На дослідному раціоні з на 6% меншим споживанням СЗ, порівняно з контролем, у складному шлунку додалось 22,4% золи проти 57,6% в контролі; ця різниця збереглась у ТНК та ТСК, де всмоктування СЗ було на 18% меншим. Зміни в кількості сирової золи протягом травного каналу, очевидно, суттєво зумовлені мікробіальним синтезом в раціонах у передшлунках та товстому кишечнику.

За меншого на 6,7% споживання сирого жиру (табл. 3) на дослідному раціоні його кількість в складному шлунку не змінилась, в контролі — збільшилась на 9%. Очевидно, це збільшення стало результатом інтенсивнішого розщеплення протеїну в передшлунках та синтезу мікробіального білка. В тонкому кишечнику перетравність СЖ була на 16% вищою на контрольному раціоні, ніж у досліді. У товстому відділі кишечника перетравність СЖ на контрольному та дослідному раціонах була однаковою на рівні 6–8%. Загальна перетравність СЖ на обох раціонах різнилась мало.

Таблиця 4. Перетравність сирової клітковини та БЕР, г/добу
Table 4. Digestibility of crude fiber and BER, g/day

Показники / Indices	Раціон Diet	Сира клітковина, г/добу	БЕР, г/добу
Спожито з кормами Consumed with feed	K / C	1555,2±3,53	3739,1±1,05
	D / E	1388,3±84,59	3627,9±184,1
Змінилось у складному шлунку, +; – Changed in rumen, +; –	K / C	–1356,5±27,08	–2600,6±75,73
	D / E	–1164,9±16,85	–2574,6±97,05
Змінилось у шлунку, % від спожитого Changed in abomasum, % of consumed	K / C	–87,22	–69,69
	D / E	–83,91	–70,97
Надійшло до тонкого кишечника Income to small intestine	K / C	198,7±30,62	1138,5±8,32
	D / E	223,4±67,74	1053,3±281,0
Змінилось у тонкому кишечнику, +; – до спожитого Changed in small intestine, +; – to the consumed	K / C	+149,9±10,19	–332,8±32,17
	D / E	+44,7±18,27	–416,8±48,56
— % від спожитого — % of consumption	K / C	+9,64	–8,9
	D / E	+3,22	–11,49
— % від надходження — % of admission	K / C	+75,41	–29,23
	D / E	+20,03	–39,57
Надійшло до товстого кишечника Income to large intestine	K / C	348,6±40,81	805,7±50,49
	D / E	268,2±86,0	630,5±232,58
Змінилось у товстому кишечнику, +; – Changed in large intestine, +; –	K / C	–72,1±8,24	–224,9±56,0
	D / E	+30,3±108,27	+4,0±243,7
— % від спожитого — % of consumed	K / C	–4,63	–6,02
	D / E	+2,18	+0,11
— % від надходження — % of admission	K / C	–20,67	–27,92
	D / E	+11,34	+0,62
Виведено з калом Excreted with feces	K / C	276,6±49,05	580,8±106,49
	D / E	298,6±22,37	640,5±11,11
— % від спожитого — % of consumption	K / C	17,78	15,53
	D / E	21,51	17,65
Перетравлено у всьому шлунково-кишковому тракті Digested in gastrointestinal tract	K / C	1278,7±45,46	3158,3±22,87
	D / E	1089,7±106,96	2987,4±195,21
— %	K / C	82,22	84,54
	D / E	78,49	82,35

Перетравність вуглеводних компонентів раціону наведена у табл. 4. Споживання СКл було на 12% більшим на контрольному раціоні. У шлунку та тонкому кишечнику її перетравність також була дещо вищою в контролі. У товстому кишечнику на обох раціонах спостерігали незначні зміни у перетравності СКл. Загальна перетравність СКл у всьому травному каналі була близькою, з тенденцією до збільшення у контролі.

Перетравність БЕР мало різнилась між раціонами у складному шлунку, тонкому кишечнику і загалом; в товстому відділі кишечника спостерігали тенденцію до більшої їх перетравності на контрольному раціоні.

Вища доступність протеїну в дослідному раціоні обумовила і більші середньодобові прирости бугайців на рівні 1280 г проти 930 в контролі. У подальших дослідках на достатньому поголів'ї за використання подібних раціонів зі зниженим рівнем розчинного протеїну перевага в приростах була в межах 20–25%.

Оцінюючи процеси травлення в різних відділах травного тракту бугайців за використання ізоенергетичних, ізопротеїнових сіно-концентратних раціонів з різною кількістю розчинного протеїну, потрібно зазначити:

— сухо-повітряна температурна обробка зерна гороху за оптимальної температури 100–105°C на 50%

знижує розчинність протеїну і сприяє його підвищеній доступності для перетравлювання в тонкому кишечнику тварин;

— за зменшення у складі раціону кількості розчинного в мінеральному буфері протеїну знижується перетравність в передшлунках СП, СЗ, СЖ та СКл, тому відбувається деякий зсув травлення до кишечника і змінюється інтенсивність та напрямок процесів розщеплення поживних речовин, а також їх адсорбція;

— очевидно, для детальнішого розшифрування процесів травлення в розташованих після передшлунків відділах травного каналу необхідно виокремити нейтрально-детергентну клітковину, кислото-детергентну клітковину та складові речовини БЕР;

— на контрольному раціоні з підвищеним рівнем розчинного протеїну у передшлунках відбувалось інтенсивне розщеплення протеїну зі значним накопиченням амонійного та сечовинного азоту;

— за широкого співвідношення протеїну до енергії (17,2 г сирого протеїну на 1 МДж ДОЕ та 10,21 г розчинного протеїну на 1 МДж ДОЕ) на контрольному раціоні, вочевидь, з причини недостатньої кількості енергії для синтезу мікробіального білка використовувася не весь амонійний азот, який утворився після розщеплення протеїну, і значна частина його виводилася з організму з сечею у формі сечовини. Тим самим знецінювався протеїн кормів;

— перетравність мінеральних елементів (сира зола) та сирого жиру у кишечнику була вищою на контрольному раціоні;

— сира клітковина у складному шлунку інтенсивніше перетравлювалась на контрольному раціоні; на відрізок тонкого кишечника її кількість збільшилась, а в товстому кишечнику вона знову частково перетравлювалась. На дослідному раціоні кількість клітковини у товстому відділі кишечника збільшувалась. Загальна перетравність сирової клітковини у всьому травному каналі на контрольному раціоні була вищою в межах 3%;

— у складному шлунку і тонкому кишечнику перетравність БЕР на обох раціонах була близькою, на відрізок товстого кишечника — значно більшою на контрольному раціоні за практично незмінної їх кількості у досліді. Загальна перетравність БЕР на досліджуваних раціонах різнилась мало;

— оцінка доступності протеїну для тварин за класичною схемою «корм мінус кал» не відображає дійсних обсягів засвоєння його організмом тварин;

— істинною і точною оцінкою доступності протеїну для жуйних є визначення кількості протеїну на вході і виході тонкого кишечника в досліді на оперованих тваринах. Для одержання статистично вірогідних даних потрібно не менше 4-х тварин;

— у визначенні перетравності поживних речовин за класичною схемою недооцінюється роль товстого відділу кишечника;

— у проведених дослідіх кількість сирого протеїну, яка надходила до тонкого кишечника, була

меншою від спожитого, що свідчить про надмірну кількість протеїну в раціонах стосовно енергії або про дефіцит енергії для такого рівня протеїну.

Висновки

1. Зниження розчинності протеїну в сіно-концентратному раціоні за рахунок сухої температурної обробки зерна гороху сприяло зниженню інтенсивності процесу травлення у передшлунках, зсуву перетравності СЗ, СЖ, СКл та БЕР до тонкого та товстого кишечника.

2. Зменшення у складі сіно-концентратного раціону кількості розчинного протеїну на одиницю енергії з 10,2 до 6,9 г сприяє зниженню розщеплення протеїну в передшлунках бугайців, більшому надходженню і перетравності його в тонкому кишечнику, тобто більшій доступності для організму тварин.

3. За підвищеного рівня розчинного протеїну в раціоні (10,2 г на 1 МДж ДОЕ) відбувається значне знецінення протеїну кормів — зростає частка сечовини в загальному азоті сечі.

Перспективи подальших досліджень

Необхідні подальші дослідження щодо доступності протеїну для великої рогатої худоби за різних співвідношень в раціонах розчинного протеїну і енергії для створення бази даних вмісту розчинного протеїну в розповсюджених кормах.

1. Bateman HG, Clark JH, Murphy MR. Development of a system to predict feed protein flow to the small intestine of cattle. *J. Dairy Sci.* 2005; 88 (1): 282–295. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72686-2.
2. Bohdanov HO, Kandyba VM (eds.). *Norms and rations of complete feeding of high-yielding cattle: a handbook*. Kyiv, Agrarian Science, 2012: 296 p. (in Ukrainian)
3. Bohdanov HO, Rudenko EV (eds.). *Information database of chemical composition of feed in Ukraine for the organization of feeding of farm animals*. Kharkiv, the Institute of Animal Husbandry UAAS, 2009: 216 p. (in Ukrainian)
4. Conway EJ. *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. 4th ed. London, Crosby Lockwood, 1957: 162–174.
5. Cyupko VV, Pronina VV, Vasilevskij NV, Zlobina GS, Berus MV, Mukhin SM, Rosso LN, Bublik VN, Osenev AV, Soloveva TL, Kutikov ES, Yugaj KD, Antipin SL. *Normalized feeding for cattle of dairy and combined direction of productivity: guidelines*. Kharkiv, Institute of Animal Husbandry UAAS, 1995: 77 p.
6. Daniel JB, Van Laar H, Dijkstra J, Sauvant D. Evaluation of predicted ration nutritional values by NRC (2001) and INRA (2018) feed evaluation systems, and implications for the prediction of milk response. *J. Dairy Sci.* 2020; 103 (12): 11268–11284. DOI: 10.3168/jds.2020-18286.
7. Ibatullin II, Zhukorskyi OM (eds.). *Handbook of complete feeding of farm animals*. 2016: 300 p. (in Ukrainian)
8. Kandyba VM, Ibatullin II, Kostenko VI (eds.). *Theory and practice of normalized feeding of cattle: a monograph*. Zhytomyr, 2012: 860 p. (in Ukrainian)

9. Kaplan VA, Sviridenko VA. Methods for determination of urea in blood plasma, milk and urine. Methods of research in animal husbandry. Sci. Conf. NII Zh LiP USSR. Kharkiv, 1966: 104–108.
10. Lapiere H, Larsen M, Sauvant D, Van Amburgh ME, Van Duinkerken G. Review: Converting nutritional knowledge into feeding practices. A case study comparing different protein feeding systems for dairy cows. *Animal*. 2018; 12 (s2): s457–s466. DOI: 10.1017/S1751731118001763.
11. Mejlus PI. Changes in some indicators of metabolism in the rumen, physiological condition and productivity of cows when they are fed urea in different ways. Aut. ref. dis. cand. biol. sci. Kaunas, 1964.
12. Moshtaghi Nia SA, Ingalls JR. Effect of moist heat treatment on canola meal nitrogen degradation in the rumen and absorption in the small and intestines of steers using a mobile nylon bag technique. 86th Annu. Meet. Amer. Dairy Sci. Assoc. (ADSA), Logan, Utah. *J. Dairy Sci.* 1991; 74 (1): 180.
13. NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 2001.
14. Petrenko VI, Petrenko MT. The use of protein depending on its solubility. Message 2. Influence of protein solubility on its digestion and productivity of cattle. *Sci. Tech. Bull. Inst. Anim. Husb. UAAS*. Kharkiv, 2000; 77: 83–86. (in Ukrainian)
15. Sauvant D, Nozière P. Quantification of the main digestive processes in ruminants: the equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal*. 2016; 10 (5): 755–770. DOI: 10.1017/S1751731115002670.
16. Shapovalov SO, Dolhaia MM, Rudenko YV, Varchuk SS. Estimation of biological value of proteins in animal feed. Kyiv, Agrarian Science, 2016: 92 p. (in Ukrainian)
17. Sviridenko VA, Kaplan VA. Estimation of digestibility of feed nitrogen by ruminants on the share of urea nitrogen in total urine nitrogen. Method. issl. in alive. Sci. Conf. NII Zh LiP USSR. Kharkiv, 1966: 108–111.
18. Van Duinkerken G, Blok MC, Bannink A, Cone JW, Dijkstra J, van Vuuren AM, Tamminga S. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: The DVE/OEB₂₀₁₀ system. *J. Agric. Sci.* 2011; 149 (3): 351–367. DOI: 10.1017/S0021859610000912.
19. Vasilevskiy NV, Berus MV, Zlobina GS, Tsyupko VV. A new way to assess the influence of the quantity and quality of crude feed protein on its digestion in the gastrointestinal tract of bulls. *New Zootech. Res. Method. Mat. Conf.* Kharkiv, 1992; 2: 26–30.
20. Verite R, Jourmet M, Jarrige R. A new system for the protein feeding of ruminants: the PDI system. *Livestock Prod. Sci.* 1979; 6 (4): 349–367. DOI: 10.1016/0301-6226(79)90003-4.
21. Zlobina GS, Berus MV, Vasilevskiy NV, Bublik VN, Tsyupko VV. Methods for evaluating crude feed protein for digestion in the small intestine and protein rationing system for cattle. *New Zootech. Res. Method. Mat. conf.* 1992; 2: 8–13.
22. Zverev AI, Kharchenko AG. Solubility of feed protein is a factor in its rational use in feeding dairy cows. *Dairy Meat Cattle breed.* 1990; 77: 54–58.

Feed protein solubility as an indicator of digestibility and availability of nutrients in the diets of bulls

V. S. Kozyr, V. I. Petrenko, G. G. Dimchya, A. N. Maistrenko
 izkzoo3337@gmail.com

State Institution Institute of Grain Crops NAAS,
 14 Volodymyr Vernadskyi str., Dnipro, 49027, Ukraine

The research was conducted on steppe red bulls with duodenal and ileocecal anastomoses when feeding isoenergetic, isoprotein hay-concentrate diets with different levels of soluble protein (SP) and rumen degradable protein (RDP). We studied the transformation of dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), crude ash (CA), crude fat (CF), crude fiber (CF) and nitrogen-free extractives (NFE) separately in a complex stomach, small (SI) and large (LI) parts of the intestine. Assimilation of protein by animals was assessed by the amount of it digested in SI, and unproductive costs — by the part of nitrogen in the urine. Diets consisted of hay, peas and mineral supplements. Different amounts of SP in the diets were achieved by feeding natural pea (control) or pea grilled at a temperature of +105°C (experiment). When feeding a diet with a reduced level of SP and RDP, the apparent intensity of digestion decreased, which was manifested in a slightly smaller amount of feed consumed, and in a smaller number of duodenal and ileocecal chyme. In a complex stomach, the CP digestibility of the experimental diet with a reduced level of SP was 10% lower. In the control diet with a high level of SP, more CP was degraded in rumen and more ammonium nitrogen was supplied to SI. The availability of CP for digestion in SI on the experimental diet was 5.8% higher, against control, with 8–10% higher digestibility of DM, OM and CP, but lower digestibility of CA and CF. In LI, the digestibility of nutrients in the studied diets was multidirectional. A significant amount of dietary protein was depreciated in the control diet with a high level of SP due to a 40% increase in urinary nitrogen excretion.

Key words: organic matter, protein, solubility, fat, fiber, nitrogen-free extractives, digestibility, complex stomach, small intestine, large intestine



Критерії відбору високопродуктивних кнурів-плідників і свиноматок за відгодівельними і м'ясними якостями їх потомства з використанням деяких оціночних індексів

В. І. Халак¹, О. М. Жукорський², О. М. Церенюк³

v16kh91@gmail.com

¹Державна установа «Інститут зернових культур НААН України»,
вул. Володимира Вернадського, 14, м. Дніпро, 49009, Україна

²Національна академія аграрних наук України,
вул. Михайла Омеляновича-Павленка, 9, м. Київ, 901010, Україна

³Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

Мета роботи — дослідити відгодівельні і м'ясні якості молодняку свиней великої білої породи та визначити критерії відбору високопродуктивних кнурів-плідників і свиноматок з використанням деяких оціночних індексів. Установлено, що молодняк свиней великої білої породи підконтрольної популяції за віком досягнення живої маси 100 кг переважає мінімальні вимоги класу еліта на 6,13%, товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців — 32,25% і довжиною охолодженої туші — 3,92%. Вірогідна різниця між тваринами різної внутріпородної диференціації за індексом Тайлера (I і III групи) встановлено за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі (91,7 г), віком досягнення живої маси 100 кг (7,3 доби), товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців (3,4 мм), довжиною охолодженої туші (1,7 см), довжиною беконної половини охолодженої туші (2,7 см). З урахуванням внутрішньопородної диференціації за індексом Сазера-Фредіна встановлено, що молодняк свиней II групи переважав ровесників I групи за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі на 4,03%, віком досягнення живої маси 100 кг — 3,67% і довжиною охолодженої туші — 0,2%. Коефіцієнт парної кореляції між відгодівельними і м'ясними якостями молодняку свиней та оціночними індексами коливається у межах від $-0,710$ ($tr=10,24$) до $+0,844$ ($tr=20,98$). Максимальну прибавку додаткової продукції одержано від молодняку свиней I піддослідної групи за індексом Тайлера ($+5,03\%$) та II піддослідної групи за індексом Сазера-Фредіна ($+1,12\%$). Вартість додаткової продукції, яку одержано від молодняку свиней зазначених груп, за умови, що ціна реалізації за 1 кг живої маси молодняку свиней на час проведення дослідження дорівнювала 47,5 грн. становить $+247,51$ і $+55,42$ грн./гол відповідно. Таким чином, критерієм відбору високопродуктивних кнурів-плідників і свиноматок за відгодівельними і м'ясними якостями є межі індексу Тайлера $214,89$ – $242,85$, індексу Сазера-Фредіна — $-3,018$... $-0,102$ бала.

Ключові слова: молодняк свиней, порода, відгодівельні і м'ясні якості, індекс, економічна ефективність, мінливість, кореляція

Результати дослідження відгодівельних і м'ясних якостей молодняку свиней сучасних порід, а також тварин, одержаних на основі промислового схрещування і гібридизації, свідчать про високий рівень їх фенотипового прояву з урахуванням умов утримання і годівлі та їх відповідності фізіологічній нормі [2, 4, 5, 11, 16]. За даними Храмової О. М. [6] встановлено, що кращими відгодівельними якостями характеризу-

ється молодняк свиней, одержаний від свиноматок генотипу F_1 ($L_1 \times Y_1$) і кнурів синтетичної лінії *MaxGrow*. Живої маси 100 кг вони досягали за 171,6 діб, що, порівняно з ровесниками великої білої породи, менше на 14,9 діб або 7,99% ($P \leq 0,001$). Порівняно з ровесниками синтетичних ліній *MaxTer* і *OptiMus*, різниця становить 1,3–10,5 доби або 0,75–6,12%. Також усі тварини, отримані від кнурів зарубіжної селекції,

мали кращу оплату корму приростами, порівняно з аналогами вітчизняної селекції, на 0,12–0,35 кг або 0,13–0,39 корм. од.

Дослідженнями Краснощока О. О. [10] встановлено, що молодняк свиней, одержаний на основі промислового схрещування свиноматок великої білої породи та кнурів породи ландрас, за віком досягнення живої маси 100 кг переважав чистопородних ровесників великої білої породи на 8 діб або на 4,5%. Зазначене свідчить, що в період інтенсифікації селекційного процесу з використанням тварин зарубіжної селекції важливим питанням є дослідження рівня їх адаптації до умов навколишнього середовища, фенотипового прояву основних господарсько корисних ознак, а також пошук критеріїв відбору високопродуктивних тварин за деякими оціночними індексами. Підтвердженням актуальності та практичної цінності вибраного напрямку дослідження є роботи вітчизняних та зарубіжних вчених [3, 7, 11, 13, 15].

Мета роботи — дослідити відгодівельні і м'ясні якості молодняку свиней великої білої породи різної внутрішньопородної диференціації за індексами Тайлера і Сазера-Фредіна, розрахувати рівень кореляційних зв'язків між ознаками та економічну ефективність результатів досліджень.

Матеріали і методи

Дослідження провели в агроформуваннях Дніпропетровської обл., м'ясокомбінаті «Джаз» і лабораторії тваринництва Державної установи «Інститут зернових культур НААН». Об'єктом досліджень був молодняк свиней великої білої породи. Оцінку тварин за відгодівельними і м'ясними якостями проводили з урахуванням наступних показників: середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі, кг; вік досягнення живої маси 100 кг, діб; товщина шпигу на рівні 6–7 грудних хребців, мм; довжина охолодженої туші, см; довжина беконної половини охолодженої туші, см. [1].

Індекси Тайлера (1) і Сазера-Фредіна (2) розраховували за формулами:

$$I_b = 100 + (242 \times K) - (4,13 \times L) \quad (1),$$

де I_b — комплексний індекс відгодівельних та м'ясних якостей, балів;

K — середньодобовий приріст живої маси, кг;

L — товщина шпигу на рівні 6–7 грудних хребців, мм; 242; 4,13 — постійні коефіцієнти [17];

$$I = \frac{1}{\sigma_g} \times \Delta G_1 - \frac{1}{\sigma_f} \times \Delta F_1 \quad (2),$$

де I — індекс Сазера-Фредіна, балів;

ΔG_1 — швидкість росту у відхиленнях від середньої;

ΔF_1 — товщина шпигу у відхиленнях від середньої;

σ_g — фенотипне стандартне відхилення швидкості росту;

σ_f — фенотипне стандартне відхилення товщини шпигу [9].

Силу кореляційних зв'язків між ознаками визначали за шкалою Чеддока (цит. за [14]). Вартість додаткової продукції [12] та біометричну обробку одержаних даних [8] проводили за загальноприйнятими методиками.

Результати й обговорення

Аналіз результатів свідчить, що середньодобовий приріст живої маси молодняку свиней піддослідної групи ($n=51$) за період контрольної відгодівлі становить $792,4 \pm 6,37$ г ($Cv=5,75\%$), вік досягнення живої маси 100 кг — $178,0 \pm 0,68$ доби ($Cv=2,76\%$), товщина шпигу на рівні 6–7 грудних хребців — $21,0 \pm 0,26$ мм ($Cv=8,93\%$), довжина охолодженої туші — $96,8 \pm 0,22$ см ($Cv=1,65\%$), довжина беконної половини охолодженої туші — $86,1 \pm 0,37$ см ($Cv=3,12\%$).

Індекс Тайлера і Сазера-Фредіна коливаються у межах від 178,89 до 242,85 і від –3,018 до +3,427 бала відповідно. Результати дослідження відгодівельних і м'ясних якостей молодняку свиней великої білої породи різної внутрішньопородної диференціації за індексом Тайлера та Сазера-Фредіна наведено в табл. 1 і 2.

Встановлено, що молодняк свиней I групи (індекс Тайлера коливається у межах від 214,89 до 242,85 бала) переважав ровесників III (індекс Тайлера коливається у межах від 178,89 до 192,72 бала): за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі — на 91,7 г ($td=9,28$; $P<0,001$), віком досягнення живої маси 100 кг — 7,3 доби ($td=4,42$; $P<0,001$), товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців — 3,4 мм ($td=6,07$; $P<0,001$), довжиною охолодженої туші — 1,7 см ($td=3,54$; $P<0,01$), довжиною беконної половини охолодженої туші — 2,7 см ($td=3,64$; $P<0,01$). Різниця між тваринами зазначених груп за індексом Тайлера дорівнює 36,2 бала ($td=13,35$; $P<0,001$).

З урахуванням внутрішньопородної диференціації за індексом Сазера-Фредіна встановлено, що молодняк свиней II групи (індекс Сазера-Фредіна у межах від –3,018 до –0,102 бала) переважав ровесників I (індекс Сазера-Фредіна у межах від +0,028 до +3,427 бала): за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі — на 32,3 г ($td=2,92$; $P<0,01$), віком досягнення живої маси 100 кг — 6,7 доби ($td=5,58$; $P<0,001$), довжиною охолодженої туші — 0,2 см ($td=0,47$; $P>0,05$).

Протилежну закономірність між групами встановлено за довжиною беконної половини охолодженої туші та товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців. Різниця між тваринами I і II груп за довжиною беконної половини охолодженої туші становить 1,1 см ($td=1,54$; $P>0,05$), товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців — 2,2 мм ($td=5,23$; $P<0,001$).

Таблиця 1. Відгодівельні і м'ясні якості молодняку свиней великої білої породи різної внутрішньопородної диференціації за індексом Тайлера**Table 1.** Fattening and meat qualities of young pigs of large white breed of different intrabreeding differentiation according to the Tyler index

Показники, одиниці виміру Indicators, units of measurement	Біометричні показники Biometric indicators	Градації індексу Тайлера / Tyler index gradations		
		214,89–242,85	195,52–213,54	178,89–192,72
		група / group		
		I (n=13)	II (n=25)	III (n=13)
Середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі, г The average daily increase in live weight during the period of control fattening, g	$\bar{X} \pm S_x$	834,4 $\pm$ 7,80	796,4 $\pm$ 7,41	742,7 $\pm$ 6,07
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	28,12 $\pm$ 5,524	37,08 $\pm$ 5,244	21,86 $\pm$ 4,294
	$Cv \pm Sc_v, \%$	3,37 $\pm$ 0,662	4,65 $\pm$ 0,657	2,94 $\pm$ 0,577
Вік досягнення живої маси 100 кг, діб Age of achievement of live weight of 100 kg, days	$\bar{X} \pm S_x$	174,4 $\pm$ 1,14	177,9 $\pm$ 0,85	181,7 $\pm$ 1,20
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	4,11 $\pm$ 0,807	4,25 $\pm$ 0,601	4,34 $\pm$ 0,852
	$Cv \pm Sc_v, \%$	2,35 $\pm$ 0,461	2,38 $\pm$ 0,336	2,38 $\pm$ 0,467
Товщина шпигу на рівні 6–7 грудних хребців, мм Thickness of fat at the level of 6–7 thoracic vertebrae, mm	$\bar{X} \pm S_x$	19,1 $\pm$ 0,37	21,1 $\pm$ 0,28	22,5 $\pm$ 0,43
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	1,34 $\pm$ 0,263	1,43 $\pm$ 0,202	1,56 $\pm$ 0,309
	$Cv \pm Sc_v, \%$	7,01 $\pm$ 1,377	6,77 $\pm$ 0,957	6,93 $\pm$ 1,361
Довжина охолодженої туші, см The length of the cooled carcass, cm	$\bar{X} \pm S_x$	97,4 $\pm$ 0,35	97,1 $\pm$ 0,33	95,7 $\pm$ 0,34
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	1,26 $\pm$ 2,475	1,69 $\pm$ 0,239	1,23 $\pm$ 0,241
	$Cv \pm Sc_v, \%$	1,29 $\pm$ 0,253	1,74 $\pm$ 0,246	1,28 $\pm$ 0,251
Довжина беконної половини охолодженої туші, см Length of bacon half of chilled carcass, cm	$\bar{X} \pm S_x$	87,0 $\pm$ 0,58	86,1 $\pm$ 0,59	84,3 $\pm$ 0,47
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	2,10 $\pm$ 0,412	2,98 $\pm$ 0,421	1,70 $\pm$ 0,333
	$Cv \pm Sc_v, \%$	2,41 $\pm$ 0,473	3,46 $\pm$ 0,489	2,01 $\pm$ 0,394

Таблиця 2. Відгодівельні і м'ясні якості молодняку свиней великої білої породи різної внутрішньопородної диференціації за індексом Сазера-Фредіна**Table 2.** Fattening and meat qualities of young pigs of large white breed of different intrabreeding differentiation according to the Sazer-Fredin index

Показники, одиниці виміру Indicators, units of measurement	Біометричні показники biometrics Indicators	Градації індексу Сазера-Фредіна / Sazer-Fredin index gradations	
		+0,028...+3,427	–3,018...–0,102
		група / group	
		I (n=28)	II (n=23)
Середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі, г The average daily increase in live weight during the period of control fattening, g	$\bar{X} \pm S_x$	769,1 $\pm$ 7,33	801,4 $\pm$ 8,25
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	34,37 $\pm$ 4,594	39,59 $\pm$ 5,839
	$Cv \pm Sc_v, \%$	4,46 $\pm$ 0,596	4,94 $\pm$ 0,728
Вік досягнення живої маси 100 кг, діб Age of achievement of live weight of 100 kg, days	$\bar{X} \pm S_x$	182,1 $\pm$ 0,82	175,4 $\pm$ 0,89
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	4,39 $\pm$ 0,586	4,28 $\pm$ 0,631
	$Cv \pm Sc_v, \%$	2,41 $\pm$ 0,322	2,44 $\pm$ 0,359
Товщина шпигу на рівні 6–7 грудних хребців, мм Thickness of fat at the level of 6–7 thoracic vertebrae, mm	$\bar{X} \pm S_x$	20,0 $\pm$ 0,29	22,2 $\pm$ 0,31
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	1,53 $\pm$ 0,204	1,50 $\pm$ 0,221
	$Cv \pm Sc_v, \%$	7,65 $\pm$ 1,022	6,75 $\pm$ 0,995
Довжина охолодженої туші, см. The length of the cooled carcass, cm	$\bar{X} \pm S_x$	96,8 $\pm$ 0,33	97,0 $\pm$ 0,29
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	1,77 $\pm$ 0,236	1,39 $\pm$ 0,205
	$Cv \pm Sc_v, \%$	1,82 $\pm$ 0,243	1,43 $\pm$ 0,210
Довжина беконної половини охолодженої туші, см Length of bacon half of chilled carcass, cm	$\bar{X} \pm S_x$	86,3 $\pm$ 0,59	85,2 $\pm$ 0,42
	$\sigma \pm X_{\sigma}$	3,15 $\pm$ 0,421	2,01 $\pm$ 0,296
	$Cv \pm Sc_v, \%$	3,65 $\pm$ 0,487	2,35 $\pm$ 0,346

Результати розрахунків коефіцієнта парної кореляції між відгодівельними і м'ясними якостями молодняку свиней та оціночними індексами наведено у табл. 3. Коефіцієнт парної кореляції між відгодівельними і м'ясними якостями молодняку свиней та оціночними індексами коливається у межах від $-0,710$ ($tr=10,24$) до $+0,844$ ($tr=20,98$).

Вірогідні коефіцієнти кореляції встановлено за такими парами ознак: індекс Тайлера × середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі ($r=+0,844$), індекс Тайлера × вік досягнення живої маси 100 кг ($r = -0,546$), індекс Тайле-

ра × товщина шпиків на рівні 6–7 грудних хребців, мм ($-0,647$), індекс Тайлера × довжина охолодженої туші ($r = +0,359$), індекс Тайлера × довжина беконної половини охолодженої туші ($r = +0,298$), індекс Сазера-Фредіна × середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі ($r = -0,371$), індекс Сазера-Фредіна × вік досягнення живої маси 100 кг ($r = +0,665$), індекс Сазера-Фредіна × товщина шпиків на рівні 6–7 грудних хребців, мм ($-0,710$).

Результати розрахунку економічної ефективності використання молодняку свиней піддослідних груп наведено в табл. 4. Установлено, що максимальну

Таблиця 3. Коефіцієнти парної кореляції між відгодівельними і м'ясними якостями молодняку свиней та оціночними індексами
Table 3. Pairwise correlation coefficients between fattening and meat qualities of young pigs and evaluation indices

Показник (ознака) / Indicator (attribute)		Биометричні показники / Biometric indicators		Сила кореляційного зв'язку The correlation strength
x	y	r±Sr	tr	
Індекс Тайлера, балів Tyler index, points	1	0,844±0,0402***	20,98	Дуже висока / Very high
	2	-0,546±0,0982***	5,56	Помітна / Noticeable
	3	-0,647±0,0814***	7,95	Помітна / Noticeable
	4	0,359±0,1220**	2,95	Помірна / Moderate
	5	0,298±0,1276*	2,34	Слабка / Weak
Індекс Сазера-Фредіна, балів Sazer-Fredin index, points	1	-0,371±0,1207**	3,08	Помірна Moderate
	2	0,665±0,0780***	8,53	Помітна / Noticeable
	3	-0,710±0,0694***	10,24	Висока / High
	4	-0,084±0,1391	0,60	—
	5	0,010±0,1400	0,07	—

Примітка. 1 — середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі, кг; 2 — вік досягнення живої маси 100 кг, діб; 3 — товщина шпиків на рівні 6–7 грудних хребців, мм; 4 — довжина охолодженої туші, см; 5 — довжина беконної половини охолодженої туші, см. * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$.

Note. 1 — average daily increase in live weight during the period of control fattening, kg; 2 — age of achievement of live weight of 100 kg, days; 3 — the thickness of the fat at the level of 6–7 thoracic vertebrae, mm; 4 — length of cooled carcass, cm; 5 — length of the bacon half of the cooled carcass, cm. * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$.

Таблиця 4. Економічна ефективність результатів досліджень
Table 4. Economic efficiency of research results

Група Group	n	Середньодобовий приріст живої маси за період контрольної відгодівлі, г The average daily increase in live weight during the period of control fattening, g	Прибавка додаткової продукції, % Increase in additional products, %	Вартість додаткової продукції, грн./гол.* Cost of additional products, UAH/animal*
Загальна вибірка / Total sample	51	792,4±6,37	—	—
<i>Внутрішньопородна диференціація за індексом Тайлера / Intrabreed differentiation according to the Tyler index</i>				
III	13	742,7±6,07	-6,27	-321,4
II	25	796,4±7,41	+0,50	+25,09
I	13	834,4±7,80	+5,03	+247,51
<i>Внутрішньопородна диференціація за індексом Сазера-Фредіна / Intrabreed differentiation according to the Sazer-Fredin index</i>				
I	28	769,1±7,33	-2,94	-151,05
II	23	801,4±8,25	+1,12	+55,42

Примітка. * — ціна реалізації молодняку свиней на переробні підприємства регіону на час проведення дослідження дорівнювала 47,5 грн./кг.
Note. * — the sale price of young pigs to processing enterprises of the region at the time of the study was 47.5 UAH/kg.

прибавку додаткової продукції одержано від молодняку свиней I піддослідної групи за індексом Тайлера (+5,03%) та II піддослідної групи за індексом Сазера-Фредіна (+1,12%). Вартість додаткової продукції, яку одержано від молодняку свиней зазначених груп, за умови, що ціна реалізації за 1 кг живої маси молодняку свиней на час проведення дослідження дорівнювала 47,5 грн., становить +247,51 і +55,42 грн./гол. відповідно.

Висновки

1. Молодняк свиней великої білої породи підконтрольної популяції за віком досягнення живої маси 100 кг переважає мінімальні вимоги класу еліта на 6,13%, товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців — 32,25% і довжиною охолодженої туші — 3,92%.

2. Вірогідну різницю між тваринами різної внутрішньопородної диференціації за індексом Тайлера (I і III групи) встановлено за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі (91,7 г; $td=9,28$; $P<0,001$), віком досягнення живої маси 100 кг (7,3 доби; $td=4,42$; $P<0,001$), товщиною шпигу на рівні 6–7 грудних хребців (3,4 мм; $td=6,07$; $P<0,001$), довжиною охолодженої туші (1,7 см; $td=3,54$; $P<0,01$), довжиною беконної половини охолодженої туші (2,7 см; $td=3,64$; $P<0,01$).

3. З урахуванням внутріпородної диференціації за індексом Сазера-Фредіна молодняк свиней II групи переважав ровесників I за середньодобовим приростом живої маси за період контрольної відгодівлі на 4,03%, віком досягнення живої маси 100 кг — 3,67% і довжиною охолодженої туші — 0,2%.

4. Коефіцієнт парної кореляції між відгодівельними і м'ясними якостями молодняку свиней та оціночними індексами коливається від $-0,710$ ($tr=10,24$) до $+0,844$ ($tr=20,98$).

5. Максимальну прибавку додаткової продукції одержано від молодняку свиней I групи за індексом Тайлера (+5,03%) і II за індексом Сазера-Фредіна (+1,12%). Вартість додаткової продукції, отриманої від молодняку свиней зазначених груп, за умови, що ціна реалізації за 1 кг живої маси молодняку свиней на час проведення дослідження 47,5 грн., становить +247,51 і +55,42 грн./гол. відповідно.

6. Критерієм відбору високопродуктивних кнурів-плідників і свиноматок за відгодівельними і м'ясними якостями їх потомства є межі індексу Тайлера 214,89–242,85, індексу Сазера-Фредіна — від $-3,018$ до $-0,102$ балів.

Перспективи подальших досліджень

Подальша робота передбачає провести дослідження відгодівельних і м'ясних якостей молодняку свиней різних поєднань та генотипів за геном MC4R.

1. Berezovsky MD, Khatko IV. Methods for assessing boars and sows on the quality of offspring in breeding plants and breeding breeders. *Modern research methods in pig breeding*. Poltava, 2005: 32–37. (in Ukrainian)
2. Gnatyuk SA. The results and prospects of work of "The Zhivprom" corporation. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*. Mykolaiv, 2015; 2 (84/2): 15–22. Available at: <https://visnyk.mnau.edu.ua/n84v2r2015t2gnatyuk> (in Ukrainian)
3. Gryshyna LP, Fesenko OH. The effectiveness of using a specialized type of pigs at the crossing and hybridization. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*. 2015; 2 (84/2): 40–47. Available at: <https://visnyk.mnau.edu.ua/n84v2r2015t2grishina> (in Ukrainian)
4. Khalak VI, Chernyavsky SE, Voloshchuk VM, Pochernyaev KF, Ilchenko MO. Productive and meat traits of young pigs with different SNP c.1426 G>A genotypes of the melanocortin receptor 4 gene (MC4R), provided that they are distributed according to some traits. *Pig Breed*. Poltava, 2019; 73: 157–165. Available at: https://drive.google.com/file/d/1LBPRQUXycquwpNGzkpn_Og3VFDj54u7/view (in Ukrainian)
5. Khalak V, Gutyj B, Bordun O, Ilchenko M, Horchanok A. Effect of blood serum enzymes on meat qualities of piglet productivity. *Ukr. J. Ecol*. 2020; 10 (1): 158–161. DOI: 10.15421/2020_25.
6. Khramkova OM. Economic and biological features, adaptive properties of pigs of Irish origin and their use in different breeding methods. Abstract. Ph.D. agr. Science: 06.02.01. Mykolaiv, 2021: 22 p. (in Ukrainian)
7. Khvatova MA. Heterosis effect prognostication according to linear swine type combinability. *Sci. Tech. Bull. Inst. Anim. Husb. NAAS*. Kharkiv, 2012; 107: 148–153. (in Ukrainian)
8. Kovalenko VP, Khalak VI, Nezhlukchenko TI, Papakina NS. *Biometric analysis of the variability of traits of farm animals and birds*. Textbook on genetics of farm animals. Kherson, Oldie, 2010: 160 p. (in Ukrainian)
9. Kozlovskiy VG. *Breeding business in pig breeding*. Moscow, Kolos, 1982: 272 p.
10. Krasnoshchok OO. Formation of productivity of pigs depending on methods of cultivation and intensity of growth. Abstract. Ph.D agr. sci.: 06.02.01. Poltava, 2020: 23 p. (in Ukrainian)
11. Loban NA. System of selection and genetic evaluation methods for fattening and meat trains of pigs. *Pig Breed*. Poltava, 2014; 65: 69–75. Available at: <https://drive.google.com/file/d/1mdWfg3nqWZ-bbKFHnObuSYnxwdsylmqV/view> (in Ukrainian)
12. *Methods for determining the economic efficiency of the use in agriculture of the results of scientific research, new technology, inventions and rationalization proposals*. Moscow, VAIPI, 1983: 149 p.
13. Povod MH. Influence of technological features on fattening indicators of pigs. *Bull. Sumy Nat. Agr. Univ. Livestock Ser*. 2014; 2 (2): 30–36. (in Ukrainian)
14. Sidorova AV, Leonova NV, Masich LA. *Workshop on the theory of statistics*. A textbook. Donetsk, Donetsk National University. 2003: 252 p. (in Ukrainian)
15. Susol RL. Productivity of large white pigs with improved meat qualities, taking into account DNA markers. *Sci. Bull. Askaniya-Nova*. 2013; 6: 229–235. (in Ukrainian)
16. Tserenyuk OM. Wales and Landrace pigs genetic potential of productivity on feeding qualities. *Sci. Tech. Bull. Inst. Anim. Husb. NAAS*. Kharkiv, 2018; 120: 160–167. DOI: 10.32900/2312-8402-2018-120-160-167. (in Ukrainian)
17. Vashchenko PA. Prediction of breeding value of pigs based on linear models of selection indices and DNA markers. Abstr. doct. agr. sci.: 06.02.01 Breeding and selection of animals. Mykolaiv, 2019: 43 p. (in Ukrainian)

Selection criteria for highly productive breeding boars and sows by fattening and meat qualities of their offspring using some evaluation indexes

V. I. Khalak¹, O. M. Zhukorsky², O. M. Tserenyuk³
v16kh91@gmail.com

¹SE Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences,
14 Volodymyr Vernadskyi str., Dnipro, 49009, Ukraine

²National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
9 Mykhailo Omelyanovych-Pavlenko str., Kyiv, 901010, Ukraine

³Institute of Pig Breeding and Agrarian Sciences NAAS,
1 Shvedska Mohyla str., Poltava, 36013, Ukraine

The aim of the work is to study the fattening and meat qualities of young white pigs and to determine the criteria for selection of high-yielding breeding boars and sows using some evaluation indices. It was found that young pigs of large white breed of the controlled population at the age of 100 kg exceed the minimum requirements of the elite class by 6.13%, the thickness of the fat at the level of 6–7 thoracic vertebrae — 32.25% and the length of chilled carcass — 3.92%. Significant difference between animals of different intrabreed differentiation according to the Tyler index (groups I and III) was established by the average daily gain of live weight during the control period of fattening (91.7 g), age of 100 kg live weight (7.3 days), fat thickness at the level of 6–7 thoracic vertebrae (3.4 mm), length of chilled carcass (1.7 cm), length of bacon half of chilled carcass (2.7 cm). Taking into account the intrabreed differentiation according to the Sazer-Fredin index, it was found that young pigs of group II outperformed peers of I on average daily live weight gain for the period of control fattening by 4.03%, age of 100 kg — 3.67% and length of chilled carcass — 0.2%. The pairwise correlation coefficient between fattening and meat qualities of young pigs and evaluation indices ranges from -0.710 ($tr=10.24$) to $+0.844$ ($tr=20.98$). The maximum increase in additional products was obtained from young pigs of the first experimental group according to the Tyler index (+5.03%) and the second experimental group according to the Sazer-Fredin index (+1.12%). The cost of additional products obtained from young pigs of these groups, provided that the selling price per 1 kg of live weight of young pigs at the time of the study was 47.5 UAH, is +247.51 and +55.42 UAH/animal respectively. Thus, the criteria for selecting highly productive breeding boars and sows for fattening and meat qualities are the limits of the Tyler index 214.89–242.85, the Sazer-Fredin index — $-3.018\dots-0.102$ points.

Key words: young pigs, breed, fattening and meat qualities, index, economic efficiency, variability, correlation



Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1

Т. М. Рук

tanya.ryk.77@gmail.com

Львівська медична академія імені Андрея Крупинського,
вул. Петра Дорошенка, 70, м. Львів, 79000, Україна

Проблему нестачі органів і тканин у трансплантаційній медицині можна вирішувати завдяки використанню ксенотрансплантації — пересадки людині органів тварин, зокрема свиней. Однак свині мають бути стресостійкими і пристосованими до умов утримання і годівлі у віваріях. Стресостійкість у свиней контролюється ДНК-маркером Hal 1843. Точкова мутація, за якої відбувається заміна 1843C>T в екзоні 17 гена рецептора ріанодину RYR1 у гомозиготному стані у свиней, спричиняє стрес-синдром. Метою дослідження було вивчення генетичної структури окремих популяцій свиней за локусом гена RYR1, відповідального за підвищену стрес-чутливість. Проведено ДНК-тестування 102 свиней порід полтавської м'ясної, миргородської, великої білої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, української степової рябої. Дослідження проводили на зразках ДНК, отриманих із крові свиней. ДНК виділяли за допомогою реагенту *Chelex 100*. Дослідження фрагмента гена RYR1 проводили за поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У досліджених тварин було ідентифіковано два алелі гена ріанодинового рецептора RYR1 (n і N) і три генотипи (NN, Nn, nn). У результаті молекулярного дослідження свиней різних порід був виявлений поліморфізм гена RYR1. Кількість тварин-носіїв рецесивного алеля n гена ріанодинового рецептора RYR1, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливалася у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, великої білої та української степової рябої порід до 100% тварин гомозиготного RYR1ⁿⁿ генотипу в породі п'єтрен і 50% особин породи ландрас, які мали гетерозиготний генотип RYR1^{Nn}. Мутантний алель RYR1ⁿ виявляли у тварин породи п'єтрен зі 100-відсотковою частотою. Гетерозиготний генотип RYR1^{Nn} виявлено у свиней порід полтавська м'ясна (10%), ландрас (50%), миргородська (15%), українська степова ряба (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська звислочева і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип RYR1^{NN}, який свідчить про відсутність у них стрес-синдрому. Встановлено, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої, в'єтнамської звислочевої та української м'ясної. Розведення свиней породи п'єтрен і будь-яких поєднань з цією породою унеможливує використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт.

Ключові слова: ксенотрансплантація, свині, стрес-синдром, ген ріанодинового рецептора RYR1

Дефіцит органів і тканин для пересадки людині — важлива проблема трансплантаційної медицини, одним із напрямів вирішення якої нині вважається використання органів і тканин тварин, ксенотрансплантація. Для медико-біологічних потреб тварини, зокрема свині повинні бути стресостійкими й адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію.

Підвищена чутливість свиней окремих порід до стресів (стресчутливість) стає дедалі гострішою проблемою і в селекційній роботі, оскільки супроводжується значними економічними збитками для господарств [5]. За повідомленнями дослідників, спостерігається різний ступінь прояву стрес-синдрому у тварин різних порід залежно від напряму їх продуктивності [4].

Стресонестійкі тварини характеризуються високою смертністю під час транспортування, гіперчутливістю до дії негативних факторів довколишнього середовища, що призводить до зниження рівня відтворювальних ознак, показників росту та розвитку [1].

У свиней за контроль такої важливої господарської ознаки, як чутливість до стресу, проявом якої є стрес-синдром — PSS (*porcine stress syndrom*), відповідає ген ріанодинового рецептора (RYR1, *ryanodine receptor 1 gene*) [8].

PSS — генетично обумовлена аномалія, яка має автосомно-рецесивний тип успадкування. Причиною її виникнення є точкова мутація в екзоні 17 гена ріанодинового рецептора, який кодує в скелетних м'язах білок кальцієвого каналу [2]. Ця транзиція у позиції 1843 (C→T) призводить до заміни аргініну на цистеїн у позиції 615 ріанодин-рецепторного білка, який є у саркоплазматичному ретикулумі м'язового волокна, що призводить до порушення основної функції цього білка і, як наслідок, відбувається низка біохімічних змін і розвиток злоякісної гіпертермії [3].

Метою нашого дослідження було вивчення генетичної структури окремих популяцій свиней за локусом гена RYR1, відповідального за підвищену стрес-чутливість.

Матеріали і методи

Проведено ДНК-тестування 102 свиней порід полтавської м'ясної, миргородської, великої білої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, української степової рябої. Дослідження проводили на зразках ДНК, отриманих із крові свиней. ДНК виділяли за допомогою реагента *Chelex 100* [12]. Основні параметри отриманих нуклеїнових кислот (концентрація ДНК, ступінь її чистоти та нативності) вимірювали за допомогою приладу *NanoDrop-219* (Інститут молекулярної біології і генетики НАН, м. Київ, Україна).

Дослідження фрагмента гена RYR1 проводили за поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ампліфікацію фрагмента RYR1 гена проводили в ампліфікаторі «Терцик» з праймерами; 5'-GTGCTG-GATGTCCTGTGTTCCCT-3', 5'-CTGGTGACATAGTT-GATGAGGT TTG-3' протягом 35 циклів у такому режимі: денатурація 94°C — 1 хв; 31 цикл — 94°C, 25 с; 68,5°C, 26 с; 72°C, 40 с; елонгація 72°C — 2 хв.

Гідроліз ампліфікованих послідовностей гену RYR1 здійснювали за схемою: реакційна суміш містила 10х рестрикційний буфер (оптимізований для цього ферменту) — 2,5 мкл, воду дейонізовану — 7,3 мкл, ендонуклеазу рестрикції *Hin 6* — 0,2 мкл (4–5 од. акт.) та 12,5 мкл ПЛР-продукту.

Розділення продуктів рестрикції здійснювали методом горизонтального гелі-електрофорезу з використанням 3% агарозного гелю у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М EDTA pH 8,0). Для контролю за розмірами отриманих у результаті ампліфікації фрагментів використовували маркер молекулярного розміру *Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, що дозволяє проводити контроль за розмірами ДНК-фрагментів у діапазоні молекулярних розмірів від 100 до 1000 п.н.

Значення *genome copy number* (мінімальна кількість копій фрагменту ДНК для можливості його візуалізації) розраховували за формулою [9]:

Результати й обговорення

У досліджених тварин було ідентифіковано два алелі гена ріанодинового рецептора RYR1 (n і N) і три генотипи (NN, Nn, nn).

Електрофоретичне розділення рестрикційних фрагментів показано на рис. 1. Фрагменти довжиною 84 і 53 пари нуклеотидів вказують на домігантний гомозиготний генотип NN і це означає, що мутація відсутня, а досліджувана тварина стресостійка. Фрагмент довжиною 137 п.н. класифікується як рецесивний гомозиготний генотип nn і це означає, що тварина стресочутлива.

Тварини з гетерозиготним генотипом Nn — стресостійкі, але є носіями мутантного алеля.

Серед проаналізованих вибірок свиней різних порід, кількість тварин-носіїв рецесивного алеля n гена ріанодинового рецептора RYR1, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливалася у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, великої білої та української степової рябої порід до 100% тварин гомозиготного RYR1ⁿⁿ генотипу в породі п'єтрен і 50% особин породи ландрас, які мали гетерозиготний RYR1^{Nn} генотип.

Встановлено, що носіями алеля стресочутливості виявилися 20% тварин миргородської і 10% свиней полтавської м'ясної порід. Генетико-популяційний аналіз свиней за локусом RYR1 показав, що в популяціях миргородської, великої білої та полтавської м'ясної порід частоти мутантного алеля RYR1ⁿ виявилися набагато нижчими, ніж у стадах порід ландрас та п'єтрен. Вкотре показана тотальна гомозиготність чистопородних свиней породи п'єтрен за мутантним алелем n локусу RYR1. Це пов'язано із надзвичайно високими показниками м'ясності цієї породи і негативним ефектом селекції на підвищену чутливість до стресових факторів, що супроводжується виникненням стрес-синдрому, органічними порушеннями з боку серцево-судинної системи, вадами якості м'яса: PSE (бліде, м'яке, ексудативне) та DFD (сухе, жорстке).

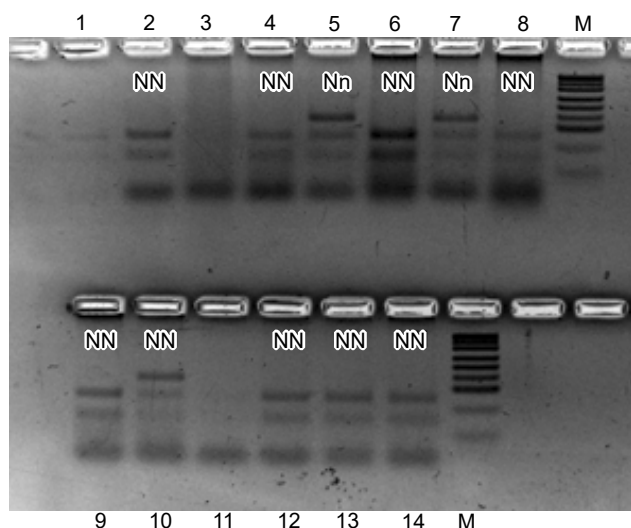


Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. 1–14 — номери свиней та відповідні їм генотипи, M — маркер молекулярного розміру
Fig. 1. Electrophoregram of separation of restriction products of RYR1 locus in 3% agarose gel. 1–14 — numbers of pigs and their corresponding genotypes, M — marker of molecular size

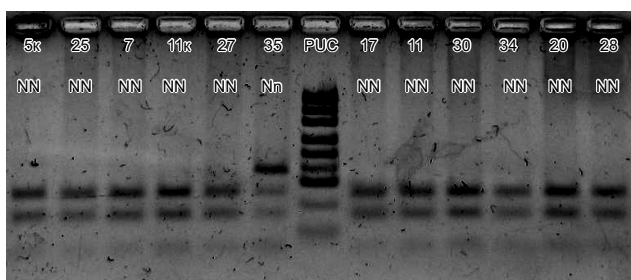


Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. 5к, 25, 7, 11к, 27, 35, 17, 11, 30, 34, 20, 28 — номери тварин української м'ясної породи та відповідні їм генотипи, PUC — маркер молекулярного розміру
Fig. 2. Electrophoregram of separation of restriction products of RYR1 locus in 3% agarose gel. 5k, 25, 7, 11k, 27, 35, 17, 11, 30, 34, 20, 28 — numbers of animals of Ukrainian meat breed and corresponding genotypes, PUC — marker of molecular size

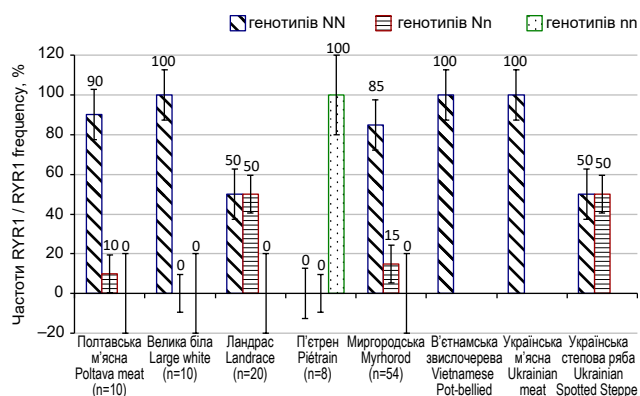


Рис. 3. Частота різних генотипів за геном RYR1 серед свиней різних порід
Fig. 3. Frequency of different genotypes for the RYR1 gene among pigs of different breeds

Таким чином, розведення свиней породи п'єтрєн та будь-яких поєднань з цією породою унеможливорює використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт. Найбільш оптимальними у цьому аспекті є породи, популяції яких повністю позбавлені алеля RYR1ⁿ, оскільки із наукових джерел відомо, що тварини гетерозиготного генотипу реагують на стрес менш інтенсивно, ніж RYR1ⁿⁿ, тобто успадкування схильності до стресових факторів у свиней відбувається за неповного домінування нормального дикого алеля RYR1^N [10].

На рис. 3 наведені дані щодо розповсюдження мутантного алеля n локусу ріанодинового рецептора серед різних порід свиней.

Популяційні дослідження, проведені іншими дослідниками, виявили відсутність алеля RYR1ⁿ або дуже низьку його концентрацію у породах сального і комбінованого напрямів продуктивності [2, 6].

За повідомленням В. С. Топіхи і О. О. Стародубець [11], помісні свині, отримані від схрещування порід дюрк і великої білої англійської селекції, є носіями мутантного алеля, що спричиняє стрес-синдром. У дослідженнях популяції свиней порід п'єтрєн, дюрк і великої білої породи білоруські вчені виявили до 50% мутантного алеля у породи п'єтрєн, 4,4% — в дюрк і 6,7% — у великої білої [7].

Висновки

У результаті молекулярного дослідження свиней різних порід був виявлений поліморфізм гена RYR1. Мутантний алель RYR1ⁿ виявляли у тварин породи п'єтрєн зі 100-відсотковою частотою. Гетерозиготний генотип RYR1^{Nn} виявляли у свиней порід полтавська м'ясна (10%), ландрас (50%), миргородська (15%) українська степова (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська звислочерева і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип RYR1^{NN}, який вказує на відсутність у них стрес-синдрому.

З огляду на результати нашого молекулярно-генетичного аналізу за маркерами RYR1 встановлено, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої української селекції, в'єтнамської звислочереві та української м'ясної.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому плануємо дослідити частоту мутантного алеля вв інших породах свиней української і зарубіжної селекції.

1. Fisher P, Mellett FD, Hoffman LC. Halothane genotype and pork quality. 2. Cured meat products from the three halothane genotypes. *Meat Sci.* 2000; 54 (2): 107–111. DOI: 10.1016/S0309-1740(99)00078-9.

2. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Sci.* 1991; 253 (5018): 448–451. DOI: 10.1126/science.1862346.
3. Hardge T, Scholz A. The influence of RYR1-genotype and breed on fattening performance carcass value and meat quality. *45th Annu. Meet. EAAP*. Edinburgh, 1994: 340 p.
4. Kuznetsov AI, Simngatulin FA. A method for evaluating pigs for stress sensitivity. *Intensification of the selection process in animal husbandry: Mat. conf.* Persianovka. 1986: 76–78.
5. Loban NA, Vasilyuk OYa, Zinovieva NA, Gladyr UF. Evaluation of the stress resistance of pigs by various methods. *Math. Scientific-theoretical journal. Bull. Agr. Sci. Black Sea region*. 2003; 3: 146–150.
6. Metlytska O, Revenko O, Kopylova K. DNA marker systems in pig breeding. *Livestock Ukraine*. 2008; 2: 20–24. (in Ukrainian)
7. Mikhailova MU, Romanishko EL, Kamysh NA. Study of the genetic structure of pig populations by the RYR1 gene locus. *Bull. MDPU I. P. Shamyakina*. 2011; 1 (30): 20–24.
8. Stanišić N, Aleksić S, Di L, Stanimirović Z, Zhenhua G, Petrović M, Delić N, Radović Č, Parunović N, Gogić M. Porcine stress syndrome (PSS) in Mangalitsa pigs. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2012; 28 (4): 873–878. DOI: 10.2298/BAH1204873S.
9. Stephenson FH. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology A Guide to Mathematics in the Laboratory*. Elsevier Inc. 2003: 302 p.
10. Fabrega E, Diestre A, Font J, Carrion D, Velarde A, Ruiz-De-La-Torre JL, Manteca X. Differences in open field behavior between heterozygous and homozygous negative gilts for the RYR(1) gene. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2004; 7 (2): 83–93. DOI: 10.1207/s15327604jaws0702_1.
11. Topikha VS, Starodubets OO. Stress sensitivity of Duroc pigs of the intra-breed type "Steppe". *Bull. Agr. Sci. Black Sea region*. 2008; 2 (45): 149–153.
12. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. *Chelex 100* as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 2013; 54 (3): 134–139. DOI: 10.2144/000114018.

Genotypic structure of micropopulations of domestic pigs at the locus of the ryanodine RYR1 receptor

T. M. Ryk

tanya.ryk.77@gmail.com

Andrei Krupynskyi Lviv Medical Academy,
70 Petro Doroshenko str., Lviv, 79000, Ukraine

An important problem in transplant medicine is the lack of organs and tissues for human transplantation. One of the promising areas of its solution today is the use of organs and tissues of animals — xenotransplantation. Pigs for medical and biological needs must be stress-resistant and adapted to the conditions of keeping and feeding within the vivarium. Stress syndrome in pigs is caused by a point mutation that replaces 1843CT in exon 17 of the ryanodine RYR1 receptor gene in a homozygous state. The aim of the study was to examine the genetic structure of individual pig populations at the locus of the RYR1 gene responsible for hypersensitivity. DNA testing of 102 pigs of Poltava meat, Myrhorod, Great White, Landrace and Pietren breeds was performed. The studies were performed on DNA samples obtained from pig blood. DNA was isolated using *Chelex 100* reagent. Studies of the RYR1 gene fragment were performed by restriction fragment length polymorphism (RFPR) by polymerase chain reaction (PCR). Two alleles of the ryanodine RYR1 receptor gene (n and N) and three genotypes (NN, Nn, nn) were identified in the studied animals. A molecular study of pigs of different breeds revealed a polymorphism of the RYR1 gene. The number of animals carrying the recessive allele n of the ryanodine receptor gene RYR1, which is responsible for the sensitivity of pigs to stress factors, varied considerably: from its complete absence in the Vietnamese Pot-bellied, Ukrainian meat, Large White and Ukrainian Spotted Steppe breeds up to 100% of animals of homozygous RYR1ⁿⁿ genotype in the Piétrain breed and 50% of Landrace individuals with the heterozygous RYR1^{Nn} genotype. The mutant RYR1ⁿ allele was found in animals of the Piétrain breed with a 100% frequency. Heterozygous genotype RYR1^{Nn} was found in pigs of Poltava Meat (10%), Landrace (50%), Myrhorod (15%) Ukrainian Spotted Steppe (50%). Homozygous RYR1^{NN} genotype was detected in all Large White, Vietnamese Pot-bellied, and Ukrainian Meat pigs studied, indicating the absence of stress syndrome. It has been established that pigs of the Great White, Vietnamese Pot-bellied, and Ukrainian Meat breeds are preferred for breeding for biomedical purposes. Breeding of Piétrain pigs and any combinations with this breed makes it impossible to use such animals for biomedical experimental work.

Key words: xenotransplantation, pigs, stress syndrome, RYR1 receptor gene



Використання полівінілалкоголю та полівінілпіролідону для підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до запліднення методом ICSI

О. Ю. Лизогуб

oksanalyzohub@gmail.com

Інститут розведення та генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна

Метою роботи було вивчити вплив середовищ з ПВП (полівінілпіролідон) та ПВА (полівінілалкоголь) на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовку до штучного запліднення для оптимізації біотехнологічних методик. У дослідженнях використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи Дніпро 641. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ імені М. В. Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв. до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу *swim up* у середовищі *Sp-TALP*. Після перебування сперматозоїдів в 10,0%-му розчині ПВП протягом 10 хв. рухливість знизилась на 68,2% ($P<0,05$) і становила 3,4%, а через наступні 10 хв. інкубації знизилась до 1,4% ($P<0,01$), що в 10 разів нижче порівняно з початковою рухливістю. У 10,0%-му розчині ПВА рухливість через 10 хв. інкубації знизилась на 37,4% ($P<0,05$) становила 6,7%, а ще через 10 хв. знизилась до 5,7% ($P<0,01$), що в 1,8 раза нижче порівняно з початковою рухливістю. Встановлено, що в разі застосування 10,0%-го розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнура втрачають рухливість на 86,9% ($P<0,01$) від початкової рухливості, що унеможливує процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). Встановлено, що 10,0%-ий розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів, оскільки він знижує рухливість на 46,7% ($P<0,01$) від початкової рухливості сперматозоїдів. Доведено, що рухливість під час інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнура у 5,0%-ому розчині ПВА знижується лише на 28,0% ($P<0,01$) від початкової, що є оптимальним за використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнура, матеріал яких є в обмеженій кількості та зручним для оператора і безпечним для ооцитів.

Ключові слова: ICSI, рухливість сперматозоїдів, ооцит, полівінілпіролідон, полівінілалкоголь, ембріони свиней

Для отримання ембріонів свиней найчастіше застосовують методику IVF (*In Vitro Fertilization*), яка є дешевшою і технічно простішою. Але якщо кріоконсервовані матеріал наявний в обмеженій кількості, проведення такого методу дослідження є неможливим. Методика ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) сьогодні є унікальною процедурою, завдяки якій можна отримати ембріон, використовуючи один ооцит та один сперматозоїд. Одним з важливих етапів ICSI є знерухомлення сперматозоїдів, яке проводять з використанням розчину ПВП. Незважаючи на його широке

використання, цей розчин негативно впливає на розвиток ооцитів і непридатний для іммобілізації сперматозоїдів кнурів. Розчин ПВА має схожі характеристики в'язкості, але використовується як безпечний агент для культивування ембріонів в невеликих концентраціях, тому є перспективною альтернативою ПВП для використання під час ICSI.

Ін'єкція сперматозоїдів у цитоплазму яйцеклітин ICSI є методом допоміжного розмноження, який використовують для отримання ембріонів *in vitro* у тварин і лікування безпліддя у людей. ICSI забезпечує уник-

нення поліспермії та використання сперматозоїдів як векторів екзогенної ДНК для отримання трансгенних тварин. Ця методика застосовується для реалізації програм збереження біорізноманіття, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку [15, 18].

Головною перевагою запліднення за допомогою ICSI є можливість використання сперми зі зниженою концентрацією або зниженою рухливістю сперматозоїдів, сексованої чи кріоконсервованої або у разі використання сперматозоїдів із придатків сім'яників (епідидиміс) після забою чи загибелі плідника. У свиней IVF призводить до поліспермного запліднення понад 50% яйцеклітин, що істотно знижує ефективність отримання ембріонів *in vitro* [6]. Тому є гостра необхідність щодо застосування цього методу зокрема і для усунення поліспермії [20].

Отримання ембріонів свиней — один з найважливіших заходів, необхідних для збереження різноманіття цього виду тварин. Крім того, свині є важливою експериментальною моделлю через їхню біологічну схожість з людиною і можуть бути потенційними донорами органів для ксенотрансплантацій. Тому надзвичайно важливо оптимізувати процеси запліднення ооцитів свиней *in vitro* та отримання максимально високого рівня формування та розвитку ембріонів [3, 8].

Основні аспекти процедури ICSI на сьогодні охоплюють іммобілізацію сперматозоїда через пошкодження джгутика, аспірацію його в ін'єкційну піпетку, аспірацію цитоплазми та безпосередню ін'єкцію сперматозоїда в ооцит [14]. Іммобілізація сперматозоїда — критично важливий етап для успішного запліднення, оскільки вона необхідна для вивільнення розчинних факторів сперми, які індукують активацію ооцитів, що передуює процесу утворення веретена поділу [2, 13, 20].

Результати щодо застосування ICSI у свиней наразі мають суперечливі дані [16]. У роботах Yong H. Y. et al. [20] та Li X.X. et al. [7] після запліднення методом IVF отримано роздроблених ембріонів на другу добу розвитку на рівні 53,2 та 88,2% відповідно, а після запліднення методом ICSI результативність була нижчою в обох випадках — відповідно, 48,7 та 85,1%. Різниця між методами ICSI та IVF спостерігалася під час застосування бластоцистної культури, а саме дорожчування ембріонів від третьої до п'ятої доби розвитку, що є додатковим методом селекції для визначення найбільш життєздатних ембріонів. У цих дослідженнях відсоток сформованих бластоцист після запліднення *in vitro* за допомогою ICSI був майже удвічі нижчим (10,5 та 20,2% відповідно) порівняно з результатами сформованих бластоцист після IVF (19,4 та 35,2% відповідно). У дослідженнях Wu J. et al [18] за допомогою ICSI було отримано більше ембріонів (51,0%), ніж за допомогою IVF (45,0%). Кількість отриманих бластоцист була вищою під час запліднення методом ICSI (21,0%), ніж під час IVF (16,0%).

За результатами досліджень Mandryk I. [9] встановлено, що запліднення методом ICSI не є оптимізованою методикою, а результативність за її використання може коливатися від 37,5 до 53,3% отриманих ембріонів. Кількість отриманих бластоцист може збільшуватись (або зменшуватись) на 15,8% в разі застосування одного і того ж методу запліднення, а саме ICSI. Але існують випадки, коли запліднення методом ICSI є необхідним через обмежену кількість гамет. Зниження результатів під час такого методу запліднення пов'язують з низкою чинників, серед яких використання сполуки полівінілпіролідону (ПВП) для знерухомлення сперматозоїдів [10, 12].

Для знерухомлення сперматозоїдів використовують 10% розчин ПВП. Він часто застосовується під час ICSI, щоб сповільнити активність сперматозоїдів та контролювати рух рідини в ін'єкційній піпетці, попри його згубний вплив на розвиток ооцитів [5, 7]. Застосування ПВП також запобігає налипанню сперматозоїдів та клітинного дебрису на піпетку, що полегшує проведення процедури [17]. Однією з можливостей покращити метод ICSI є модифікований метод ін'єкції сперматозоїда з використанням ПВА замість ПВП.

На відміну від шкоди ПВП для гамет, сполука ПВА не дає негативних ефектів на ооцити. Yong H. Y. et al. показали, що доволі успішно цю сполуку використовують в невеликих концентраціях у культуральних середовищах навіть для тривалого культивування ембріонів свиней [1, 20].

Використання ПВП для проведення процедури ICSI спричинене тим, що це найбільш густий та в'язкий розчин для цих цілей. Під час використання такого розчину сперматозоїди достатньо сповільнюються для того, щоб їх можна було оцінити, вибрати морфологічно найправильніший та знерухомити. Але, оскільки сперматозоїди кнурів відрізняються від сперматозоїдів інших видів за розмірами, а також для сперматозоїдів вказаного виду тварин не характерний прямолінійний рух, сперматозоїди кнурів мають специфічний рух (рис. 1) та досить невисоку швидкість.

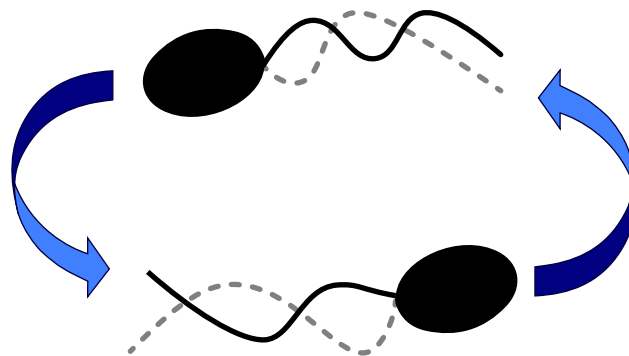


Рис. 1. Траєкторія руху сперматозоїдів кнурів
Fig. 1. The trajectory of boar sperm

Для проведення процедури ICSI у свиней не потрібно значно сповільнювати рух, оскільки зловити сперматозоїд не настільки проблематично [19]. Тому знерухомлення сперматозоїдів кнурів в розчині ПВА простіше і легше, ніж за використання його для інших видів тварин, і абсолютно прийнятне для застосування під час запліднення методом ICSI різних порід свиней.

Ще одним важливим аспектом під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення є здатність розчину запобігати налипанню дебрису і нерухомих сперматозоїдів всередині та зовні піпетки. Треба зазначити, що найважливішим нюансом є ризик залипання сперматозоїда всередині ін'єкційної піпетки, яке може створити проблему під час самої ін'єкції, що, у свою чергу, призведе до дегенерації ооцита. Такий хімічний реагент, як ПВП, запобігає виникненню наведених вище неприпустимих випадків, тому розчин ПВА теж повинен мати такі властивості, щоб процедура була атравматичною для ооцитів.

Для уникнення негативних ефектів, пов'язаних із застосуванням ПВП, можна застосовувати середовище з додаванням ПВА, яке також може тримати стінку та порожнину ін'єкційної піпетки менш липкою упродовж довшого проміжку часу, ніж при проведенні іммобілізації сперматозоїдів без цього розчину [4]. В результаті можна досягти такого ефекту, який ми спостерігаємо за використанням ПВП — менше прилипання мінеральної олії та шматків клітин до ін'єкційної піпетки, але водночас не шкодити гаметам [20]. Тому метою роботи було вивчити вплив середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та підготовку їх до штучного запліднення для оптимізації біотехнологічних підходів.



Рис. 2. Чашка Петрі з доріжками 10,0% розчинів ПВП та ПВА
Fig. 2. Petri dish with lanes of 10.0% PVP and PVA solutions

Матеріали і методи

У дослідженнях використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи *Дніпро 641*. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М. В. Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу *swim up* у середовищі *Sp-TALP*. Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплового середовища під кутом 45° . На дно пробірки підшаровували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів і на 15 хв. залишали в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$. Після інкубації отриману суспензію сперматозоїдів розріджували середовищем *Sp-TALP* до концентрації $1\text{--}5 \times 10^7$ сперматозоїдів в 1 мл.

Для тестування 10,0% розчинів ПВП (*Origio*, Данія) та ПВА (*Sigma*, *P8136*, США) підготовлювали чашку Петрі ($d=35$ мм) з двома доріжками цих середовищ і покривали мінеральною олією *LiteOil* (*GlobalLife*, США) (рис. 2). Чашку Петрі з розчинами попередньо розміщували в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$ впродовж 60 хв. Для оцінки рухливості сперматозоїдів вносили 10 мкл відмитой суспензії сперматозоїдів у 10,0% розчини ПВП та ПВА. Після цього оцінювали рухливість в 10 полях зору за збільшення в 400 разів.

Для дослідження швидкості руху сперматозоїдів використовували ін'єкційну піпетку діаметром 5,0 мкм (*Cook*, США). Експеримент проводили в трьох повторях.

Другим етапом досліджень було оцінити вплив різних концентрацій розчину ПВА на рухливість сперматозоїдів. У дослідженнях було використано чотири концентрації: 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0%-ий розчини ПВА.

Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакету програм *Microsoft Office Excel 2010*.

Результати й обговорення

Перший етап досліджень передбачав оцінку можливості застосування 10,0%-их розчинів ПВП і ПВА в разі запліднення методом ICSI; ми досліджували рухливість сперматозоїдів через 10 і 20 хв. після розміщення їх у досліджувані розчини. Це той проміжок часу, який необхідний для проведення запліднення 10 ооцитів в одній чашці задля зниження часової паузи перебування гамет поза інкубатором. Для запліднення більшої кількості ооцитів використовуються додаткові чашки; відповідно, суспензія

сперматозоїдів розміщується заново у нові чашки з чистими розчинами ПВП чи ПВА. Також було протестовано зручність проведення процедури для оператора, а саме відсутність залипання в піпетці клітин та дебрису, що є важливим елементом під час процедури ICSI.

Встановлено, що після розморожування рухливості сперматозоїдів кнур становила 10,7%. Після перебування сперматозоїдів в 10,0%-му розчині ПВП впродовж 10 хв. рухливість знизилась на 68,2% ($P<0,05$) і становила 3,4%, а через наступні 10 хв. інкубації знизилась до 1,4% ($P<0,01$), що в 10 разів нижче порівняно з початковою рухливістю. В 10,0%-му р-ні ПВА рухливість через 10 хв. інкубації знизилась на 37,4% ($P<0,05$) і становила 6,7%, а ще через 10 хв. знизилась до 5,7% ($P<0,01$), що в 1,8 раза нижче порівняно з початковою рухливістю (табл. 1).

Другий етап досліджень був спрямований на оцінку впливу різних концентрацій розчину ПВА на рухливість кріоконсервованих сперматозоїдів кнур (табл. 2). Використовували чотири концентрації розчину ПВА: 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0%.

Таблиця 1. Вплив 10,0%-их розчинів ПВП та ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнур
Table 1. The effect of 10.0% solutions of PVP and PVA on the motility of deconserved boar sperm

Показники Parameters	Рухливість сперматозоїдів / Sperm motility, %		
	відразу після впорскування Immediately after adding	через 10 хв. after 10 min	через 20 хв. after 20 min
ПВП / PVP, 10,0%	10,7±1,71	3,4±0,86*	1,4±1,3**
ПВА / PVA, 10%	10,7±0,86	6,7±1,71*	5,7±0,65**

Примітка. Тут і в наступній таблиці * — $P<0,05$, ** — $P<0,01$ порівняно із початковою рухливістю.

Note. Here and in the following table * — $P<0,05$, ** — $P<0,01$ compared to the initial motility.

Таблиця 2. Вплив різних концентрацій ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнур
Table 2. Influence of different concentrations of PVA on the motility of deconserved boar sperm

Показники Parameters	Рухливість сперматозоїдів / Sperm motility, %		
	відразу після впорскування immediately after adding	через 10 хв. after 10 min	через 20 хв. after 20 min
10,0%	10,7±0,86	6,7±0,86*	5,7±0,86*
5,0%	10,7±0,86	8,4±0,65**	7,7±0,86*
1,0%	10,7±0,86	9,4±1,71*	9,4±0,65**
0,1%	10,7±0,86	10,7±0,86*	9,7±0,65**

Через 10 хв. інкубації найнижчу рухливість сперматозоїдів спостерігали в 10,0%-му розчині ПВА — вона становила 6,7%, що на 1,7 та 2,7% ($P<0,05$, $P<0,01$) нижче порівняно з 5,0%-им та 1,0%-им розчинами ПВА відповідно. Варто зазначити, що рухливість сперматозоїдів в 0,1%-му розчині ПВА через 10 хв. інкубації не змінилась і залишилась на рівні 10,7%.

Високі показники життєздатності сперматозоїдів кнур були зафіксовані у 0,1%-му розчині ПВА. Через 20 хв. інкубації в цьому розчині рухливість залишалась достатньо високою і становила 9,7%, що на 9,4% нижче порівняно з початковою рухливістю.

Найнижчі показники життєздатності сперматозоїдів кнур спостерігали в 10,0%-му розчині ПВА, тут цей показник становив 5,7%, що на 2,0; 3,7 та 4,0% ($P<0,05$, $P<0,01$) менше порівняно із 5,0, 1,0 та 0,1%-им розчинами ПВА відповідно.

Для успішного проведення процедури ICSI рухливий сперматозоїд механічно знерухомлюють за допомогою різних маніпуляцій з його хвостом: ударами ін'єкційної піпетки, енергійним поглинанням, кількома п'єзоімпульсами або повторюваною аспірацією в ін'єкційну піпетку і з неї. Для цього в більшості ембріологічних лабораторій використовують хімічний агент полівінілпіролідон — саме для уповільнення руху сперматозоїда і для полегшення пошкодження хвостика, незважаючи на переконливі дані щодо шкідливого впливу на виживання і розвиток ооцитів після процедури ICSI [20].

В'язкість розчинів ПВА та ПВП однакової концентрації є схожою, 20,0%-ий розчин ПВП за +25°C має в'язкість 0,084 Па/с, а 20,0%-й розчин ПВА має в'язкість 1,836 Па/с за тієї ж температури [11]. В'язкість — ключова характеристика, необхідна для сповільнення сперматозоїдів, тому під час досліджень з отримання ембріонів свиней методом ICSI ми протестували розчин ПВА в такій же концентрації, як і наявний комерційний розчин ПВП, тобто 10,0%-ий розчин.

Під час застосування 10,0%-го розчину ПВП для кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів ми спостерігали швидку втрату рухливості сперматозоїдів на 68,2% ($P<0,01$) від початкової рухливості (10,7%). Такий результат може бути через те, що 10,0% розчин ПВП достатньо в'язкий, а сперматозоїди кнурів через особливості свого руху, особливо після кріоконсервації, недостатньо добре можуть рухатися у настільки в'язкому середовищі. Оскільки сперматозоїди кнурів мають низьку кріореzистентність, така втрата рухливості призведе до суттєвого зниження результатів запліднення *in vitro*, тому цей розчин не підходить для використання у репродукції свиней.

Альтернативою є застосування розчину ПВА для підготовки сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення. Розчин ПВА забезпечив повільне знерухомлення сперматозоїдів кнур порівняно з розчином ПВП на 3,3 % через 10 хв. культивування і на 4,3% після 20 хв. культивування (табл. 1). У 10,0%-му

розчині ПВП за 10 хв. інкубації рухливість сперматозоїдів кнура знизилась до 3,4%, а в 10,0%-му розчині ПВА — до 6,7% ($P < 0,05$), що на 3,3% вище порівняно з показником рухливості в 10,0%-му розчині ПВП.

Через 20 хв. інкубації результати були ще разючішими — під час культивування в 10,0%-му розчині ПВП рухливість знижувалася до 1,4%, за той самий проміжок часу рухливість сперматозоїдів у 10,0%-му розчині ПВА становила 5,7% ($P < 0,01$).

Аналізуючи отримані дані після інкубації суспензії деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів у розчині ПВА з різними концентраціями, ми встановили, що розчин ПВА в концентрації 10,0% найменш вдалий порівняно з іншими концентраціями. Під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення в 10,0%-му розчині ПВА швидкість руху через 20 хв. знизилася до 5,7% ($P < 0,01$) і проводити ін'єкцію з точки зору всмоктування та випорскування сперматозоїда було б достатньо зручно. Але зниження рухливості є достатньо високим порівняно з іншими концентраціями, тому що часто після розморожування сперматозоїдів кнурів кількість рухливих сперматозоїдів і так є невисокою. Для проведення процедури запліднення методом ICSI необхідно знерухомити сперматозоїд, ми маємо вибирати саме рухливий для впевненості в тому, що він є живим, і знерухомлювати механічно ін'єкторною голкою.

За використання 0,1 та 1,0%-го розчинів ПВА через 20 хв. рухливість сперматозоїдів знизилася на 1,0 та 1,3% ($P < 0,01$) відповідно порівняно з початковою рухливістю. Але швидкість руху в ін'єкційній піпетці була зависокою, оскільки щільність розчину майже не змінилася і була такою ж, як і в культуральному середовищі. Занадто швидкий рух може пошкодити ооцити під час аспірування цитоплазми, що є необхідним етапом в разі проведення ICSI. Наслідком аспірування великої кількості цитоплазми може бути дегенерація ооцита. Також через велику швидкість впускання/випускання рідини можна ін'єкувати велику кількість розчину всередину ооцита, що негативно вплине на розвиток ембріона. Оптимальним розчином є 5,0%-ий розчин ПВА. Рухливість сперматозоїдів у цьому розчині становить 7,7% ($P < 0,05$) за 20 хв. інкубації. Швидкість руху знизилася, що спростило процедуру, до того ж процес запліднення у цьому випадку був безпечнішим для ооцита і для майбутнього ембріона.

Висновки

1. У разі застосування 10,0%-го розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнура втрачають рухливість на 86,9% ($P < 0,01$) від початкової рухливості, що унеможливорює процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI.

2. 10,0%-ий розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів,

оскільки він знижує рухливість на 46,7% ($P < 0,01$) від початкової рухливості сперматозоїдів.

3. Рухливість за інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнура у 5,0%-ому розчині ПВА знижується лише на 28,0% ($P < 0,05$) від початкової, що оптимально під час використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнура, матеріал яких наявний в обмеженій кількості, та зручно для оператора і безпечно для ооцитів.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть скеровані на вивчення впливу об'єму середовища ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура для знерухомлення і застосування їх під час запліднення методом ICSI, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку.

Дотримання етичних стандартів

Всіх міжнародних, національних і/або інституційних принципів догляду та використання тварин було дотримано.

1. Association of Clinical Embryologists. Guidelines on good practice in clinical embryology laboratories. *Human Fertil.* 2012; 15 (4): 174–189. DOI: 10.3109/14647273.2012.747891.
2. Avalos-Durán G, Cañedo-Del Ángel AME, Rivero-Murillo BJ, Zambrano-Guerrero JE, Carballo-Mondragón E, Checa-Vizcaíno MÁ. Physiological ICSI (PICS) vs. Conventional ICSI in couples with male factor: a systematic review. *JBRA Assist. Reprod.* 2018; 22 (2): 139–147. DOI: 10.5935/1518-0557.20180027.
3. Casillas F, Betancourt M, Cuervo C, Ducolomb Y, López A, Juárez-Rojas L, Retana-Márquez S. An efficiency comparison of different *in vitro* fertilization methods: IVF, ICSI, and PICS for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes. *Porc. Health Manag.* 2018; 4: 16. DOI: 10.1186/s40813-018-0093-6.
4. Ding D, Wang Q, Li X, Chen B, Zou W, Ji D, Hao Y, Xue R, Zou H, Wei Z, Zhou P, Cao Y, Zhang Z. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 2020; 28 (2): 148–153. DOI: 10.1017/S0967199419000820.
5. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod. Med. Biol.* 2012; 11 (4): 165–176. DOI: 10.1007/s12522-012-0126-9.
6. Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Bui WC. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2000; 63 (1): 242–250. DOI: 10.1095/biolreprod63.1.242.
7. Li XX, Lee DS, Kim KJ, Lee JH, Kim EY, Park JY, Kim MK. Leptin and nonessential amino acids enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenol.* 2013; 79 (2): 291–298. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.019.
8. Macedo MP, Glanzner WG, Rissi VR, Gutierrez K, Currin L, Baldassarre H, Bordinon V. A fast and reliable protocol for activation of porcine oocytes. *Theriogenol.* 2018; 123: 22–29. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.021.

9. Mandryk-Grad I, Kosenyuk J, Gajda B. Developmental competence and quality of pig embryos obtained from standart *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012; 25 (1): 260–261. DOI: 10.1071/RDv25n1Ab225.
10. Nabi A, Entezari F, Miresmaeli SM, Vahidi S, Lorian K, Anbari F, Motamedzadeh L. Evaluation of sperm parameters and DNA integrity following different incubation times in PVP medium. *Urol. J.* 2022; 19 (3): 232–237. DOI: 10.22037/uj.v18i.6936.
11. Palermo GD, Nagy ZP (eds). *Manual of intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction with other advanced micromanipulation techniques to edit the genetic and cytoplasmic content of the oocyte*. Cambridge, Cambridge university press, 2021: 171 p. DOI: 10.1017/9781108887595.
12. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010; 27: 6–13. DOI: 10.1007/s10815-009-9380-0.
13. Petelak A, Krylov A. Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig. *Theriogenol.* 2019; 135: 115–120. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.014.
14. Pinto S, Carrageta DF, Alves MG, Rocha A, Agarwal A, Barros A, Oliveira PF. Sperm selection strategies and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Andrologia.* 2020; 53 (2): e13725. DOI: 10.1111/and.13725.
15. Rajska I. Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) as an alternative to standard *in vitro* fertilization in pigs. *Sci. Ann. Polish Soc. Anim. Prod.* 2015; 11 (3): 55–66. Available at: <http://rn.ptz.icm.edu.pl/wp-content/uploads/2016/12/Rajska-ang..pdf>
16. Ribas-Maynou J, Yeste M, Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: a systematic review from nonhuman mammals. *Biol.* 2020; 9 (7): 178. DOI: 10.3390/biology9070178.
17. Roychoudhury S, Maldonado-Rosas I, Agarwal A, Esteves S, Sharma R, Gupta S, Assidi M. Parthenogenetic activation and developmental potential of mouse oocytes after intracytoplasmic injection (ICSI) of PVP (polyvinylpyrrolidone) and HA (hyaluronic acid). *Fert. Steril.* 2016; 106 (3): E311. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.883.
18. Wu J, Carrell DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 2001; 65 (5): 1579–1585. DOI: 10.1095/biolreprod65.5.1579.
19. Yamochi T, Hashimoto S, Morimoto Y. Mural granulosa cells support to maintain the viability of growing porcine oocytes and its developmental competence after insemination. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021; 38: 2591–2599. DOI: 10.1007/s10815-021-02212-2.
20. Yong HY, Pyo BS, Hong JY, Kang KS, Lee BC, Lee ES, Hwang WS. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3–4 mm diameter injection pipette. *Human Reprod.* 2003; 18 (11): 2390–2396. DOI: 10.1093/humrep/deg442.

Usage of polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone for preparation of thawed ejaculated boar sperm for fertilization by ICSI

O. Ju. Lyzohub

oksanalyzohub@gmail.com

Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS,

1 Pogrebnyaka str, Chubynske village, Boryspil district, Kyiv Region, 08321, Ukraine

The aim of the study was to explore the effect of PVP (polyvinylpyrrolidone) and PVA (polyvinyl alcohol) media on deconserved ejaculated boar sperm and their preparation for artificial insemination to optimize biotechnological approaches. The studies used ejaculated cryopreserved sperm of a boar of the Myrhorod breed *Dnipro 641*. Genetic material was stored in the Bank of Genetic Resources of Animals IABG named after M. V. Zubets NAAS for eight years. The sperm suspension was thawed in a water bath at +37°C for 5 min until completely thawed. Separation of sperm from cryopreservative agent and diluent was performed using the *swim up* method in *Sp-TALP* medium. After the presence of sperm in the 10.0% solution of PVP for 10 min, motility decreased by 68.2% ($P < 0.05$) and amounted to 3.4%, and after the next 10 min of incubation decreased to 1.4% ($P < 0.01$), which is 10 times lower than the initial mobility. In 10.0% of PVA mobility after 10 min of incubation decreased by 37.4% ($P < 0.05$) and amounted to 6.7%, and after 10 min decreased to 5.7% ($P < 0.01$), which is 1.8 times lower than the initial mobility. It was found that in the case of 10.0% of PVP solution ejaculated deconserved boar sperm lose motility by 86.9% ($P < 0.01$) from the initial motility, which makes it impossible to select a suitable sperm for fertilization by ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). It is shown that 10.0% PVA solution can be used for immobilization of boar sperm, as it reduces motility by 46.7% ($P < 0.01$) of the initial sperm motility. It is proved that the mobility in the case of incubation of deconserved ejaculated boar sperm in 5.0% PVA solution decreases only by 28.0% ($P < 0.05$) from the initial, which is optimal when using cryopreserved boar sperm, material which are limited and convenient for the operator and safe for oocytes.

Key words: ICSI, sperm motility, oocyte, polyvinylpyrrolidone, polyvinylalcohol, pig embryos



Сполуки Германію та їхня роль в організмі тварин

Р. С. Федорук¹, І. І. Ковальчук², Л. М. Мезенцева³, У. І. Тесарівська⁴,
А. З. Пилипець¹, В. Г. Каплуненко⁵

rostislavfedoruk@gmail.com

¹Інститут біології тварин НААН,

вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького,

вул. Пекарська 50, м. Львів, 79010, Україна

³Національна Академія Аграрних Наук України,

вул. Михайла Омеляновича-Павленка, 9, м. Київ, 01010, Україна

⁴Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів і кормових добавок,

вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

⁵ТзОВ «Наноматеріали і нанотехнології»,

вул. Васильківська, 27, м. Київ, 03022, Україна

Проведено аналіз даних літератури та окремих результатів досліджень її авторів за останні роки щодо біологічної дії сполук Германію у лабораторних і продуктивних тварин. У статті відзначено порівняльний вплив мінеральних і органічних сполук Германію хімічного та біотехнологічного синтезу, а також нанотехнологічного цитрату германію на функціонування імунної, гематологічної, антиоксидантної, детоксикаційної, репродуктивної та нервової систем організму тварин. Показано відмінності дії сполук Германію в організмі тварин залежно від його форми, способу, дози та експозиції застосування, методів одержання. На основі порівняння результатів власних досліджень, а також праць інших авторів, висвітлено переваги використання органічних сполук Германію хімічного, біотехнологічного і нанотехнологічного синтезу. Проведено аналіз функціонування окремих органів, систем та організму тварин за короткочасної і тривалої дії різних сполук Германію. За доступними для вивчення літературними джерелами приведено результати досліджень токсичності різних сполук Германію, їх впливу на рівень продуктивності тварин та якість продукції. Обґрунтовано співставлення впливу деяких препаратів, біологічно активних добавок і лікарських засобів, які містять сполуки Германію, на організм тварин. Зроблено висновки про переваги біологічної дії органічних сполук Германію, виготовлених методом біотехнологічного синтезу з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, а також Германію цитрату нанотехнологічного, одержаного на основі нанотехнології, щодо перспективи їх використання у тваринництві та ветеринарній медицині.

Ключові слова: германійорганічні сполуки, тварини, біологічні процеси, токсичність, фізіологічні системи, функції, відтворення

Поширеність Германію у навколишньому середовищі

Германій (Ge), як металоїд, належить до розсіяних елементів, які поширені в природі у вигляді оксидів (GeO_2), сульфідів (GeS_2) або солей германієвої кислоти (GeO_2H_4) [48, 69, 80]. У довкіллі цей елемент надходить також з родовищ кам'яного вугілля та з побічними продуктами переробки корисних копалин у вигляді сульфідних руд, що становить до 30% світового споживання [53, 61, 69, 70]. У біологічних об'єктах Ge вперше був виявлений японськими дослідниками [43, 48, 80]. Це сприяло розвитку низки

досліджень щодо з'ясування біологічних ефектів природних сполук германію, а також створення його нових комплексів з різними лігандами, отриманих методами хімічного, біо- і нанотехнологічного синтезу [7, 42, 48, 91, 92]. Такі сполуки Ge широко застосовуються в біології, медицині, тваринництві та ветеринарії, що підтверджено дослідженнями як *in vitro*, так і *in vivo* [4, 11, 37, 43, 72, 96]. Природними сполуками Ge, що утворюються з участю мікроорганізмів, є органічні комплекси монометилгерманію, які вилугуюються поверхневими водами у річці і деградують у солоних

морських водах [69, 80]. Однак на сьогодні застосовуються екологічні методи одержання Германію із золи вугілля та пилу виплавляння міді як з технологічної сировини, а також з використанням рослинного покриву злакових трав і сільськогосподарських культур [70]. Надходження Ge у кореневу і вегетативну масу рослин залежить від їх виду та морфоструктури ґрунтів [48, 69, 70, 95]. Дослідженнями розподілу Ge в різних типах ґрунтів встановлено його значні коливання залежно від їх структури та вмісту інших чинників [53, 61, 95]. Рослини, вирощені на ґрунтах з нейтральним рН, кумулюють Ge інтенсивніше, ніж на слаболужних. Високий вміст органіки на тлі низьких значень рН ґрунту пасовищ зумовлюють вищий рівень Ge у траві [69, 70, 95].

У рослинах Ge утворює органічні комплекси, які виявляють високу біологічну активність [29, 61, 80]. Вважають, що засвоєння Ge у рослинах відбувається з участю органічних комплексоутворювальних речовин — цукрів, кислот, поліфенолів [95]. Ge може частково замінювати В у рослинах за його дефіциту в ґрунті. Вміст Ge у рослинах малий (від 0,01 до 1 мг/кг маси) [69]. Вищий рівень цього елемента встановлено у часнику, насінні злакових, грибах, женьшені [67, 80]. Однак встановлені значні регіональні та сортові відмінності вмісту Ge у часнику і його середній рівень не перевищує 0,0042 мкг/г. Підживлення озимого часнику германій-вмісним субстратом підвищувало вміст Ge до 0,02 мкг/г тканини [79, 80].

Найвищий вміст Ge встановлено у грибах, зокрема лісові підберезники і білі гриби містять високі рівні Ge 0,01 мкг/г тканини [67, 79]. У грибах, з яких виготовляють фармакологічні препарати, вирощених в експериментальних умовах з додаванням Ge, вміст цього мікроелемента у плодovому тілі зростає до 70–80 мг/кг. Однак біодоступність Ge за цих умов була низькою — 0,4–7,6% для роду *Canoderma* і 5,4–6,6% — для *Plevrotus* на тлі зміни маси грибів [79].

Вміст Ge у воді незначний [12, 84], проте у морській воді рівень його значно вищий — 0,06 мкг/л [12, 79]. Концентрація Ge у воді може суттєво відрізнятися залежно від середовища, температури, агроекологічних та метеорологічних умов. Міграція Ge у довкіллі проходить у вигляді простих іонів або складних сполук [53, 80]. Автори вказують, що вміст Германію у поверхневих водах більш стабільний і може коливатися від 0,01 до 0,17 мкг/л. Природні мінеральні води містять вищі рівні Ge, що відзначено для Судетського регіону Польщі (0,025–10,62 мкг/л), але ці рівні нижчі, ніж у термальних водах [12].

Вплив мінеральних сполук Ge на організм тварин

Сполуки Ge мають ліпофільні властивості і легко всмоктуються в кишечнику та легенях, тому до 95% іонів цього елемента проникають через клітинні стінки і мембрани [23, 48]. Однак розподіл цих компонентів між позаклітинним і внутрішньоклітинним середовищем, а також у тканинах та органах прохо-

дить нерівномірно і залежить від кількості надходження Ge [18, 43, 48]. Зокрема, у кроликів і собак після внутрішньовенного введення GeO_2 вищі концентрації Ge у порядку зниження було встановлено у тканинах таких органів: нирки — печінка — селезінка — шлунково-кишковий тракт — м'язи — мозок — кістки [23]. Розподіл Ge в організмі залежить як від способу його надходження, так і експозиції [11, 48, 52]. Концентрація цього мікроелемента у тканинах організму низька за умов фізіологічного надходження з кормом і водою. Внутрішньом'язові чи внутрішньовенні введення сполук германію підвищують його вміст у тканинах та окремих органах. Але після одноразового перорального застосування розчину GeO_2 у мишей не зростає вміст цього елемента у крові та тканинах [45].

У наших дослідженнях відзначено зростання концентрації Cu, Co, Mn і Zn у тканинах нирок, легень і м'язів щурів за умов тривалого випоювання Ge у вигляді його хімічно синтезованого хелатного комплексу та нанотехнологічного цитрату [24]. Недостатнє надходження Ge з кормів і води може знижувати рівень імунного захисту організму та продуктивності тварин [44, 80, 81]. Вміст цього мікроелемента у крові, за даними різних авторів, коливається і в середньому становить 0,44 мг/л [11, 48]. Розподіл Ge між еритроцитами і плазмою крові лабораторних щурів становить 2:3. Встановлено, що у венозній крові Ge більше локалізований в еритроцитах, в артеріальній — у плазмі [48].

Доведено, що Ge бере участь у транспортуванні O_2 в організмі, запобігаючи розвитку гіпоксії на тканинному рівні [11, 49, 83]. Така біологічна дія Ge першочергово відзначається для тканин, органів і систем, найбільш чутливих до нестачі O_2 — серця, ЦНС, нирок, печінки [81, 89]. Сполуки Ge проявляють проти-мікробну дію, яка менше виражена для бактерій, ніж для дріжджів [37, 51, 58]. Важливими також є детоксикаційні властивості сполук Ge, зокрема за умов токсичного впливу на організм тварин солей важких металів [60, 76]. Крім того, вказані сполуки Ge мають нейротропні, протизапальні, антивірусні, протипухлинні, антиоксидантні та інші корисні для організму властивості [5, 6, 25, 40, 46, 54, 86, 93], які будуть висвітлені у наступних пунктах огляду.

Щодо негативного впливу неорганічних сполук Ge, дослідники відзначають низку побічних ефектів з виникненням нефропатії у період тривалого застосування високих доз GeO_2 [3, 23, 71, 82]. Тривала дія високої дози GeO_2 зумовлювала запальні процеси у м'язовій тканині на тлі дефіциту цитохром-С оксидази у червоних волокнах з появою їх розривів [45]. Така дія оксиду Ge пов'язана також зі зниженням мембранного потенціалу мітохондрій, транслокалізацією ділянки гена Вах та зниженням експресії Bcl-2 [3, 44, 48]. Надмірні дози і експозиції GeO_2 виявляють токсичний вплив на нервову систему. Використання GeO_2 у тварин понад 24 тижні зумовлює сенсорноневрологічну патологію, спричинену мітохондріальною дисфункцією [3, 23, 45].

Однак терапевтичні дози GeO_2 , підібрані у лікуванні та профілактиці пухлин, не проявляли генетичної мутації в організмі мишей, що підтверджено відсутністю шкідливого впливу на швидкість аберації хромосом у їхньому кістковому мозку [66, 98]. У малих дозах (0,1–0,5 мг/кг маси тіла щура) ця сполука пригнічувала зумовлену Cd генотоксичність. Проте за однократної високої дози GeO_2 в 100 мг/кг маси тварини внутрішньо та 4 мг/кг внутрішньом'язово не встановлено токсичної дії [43, 48].

Вплив органічних сполук Ge хімічного синтезу на організм тварин

Крім мінеральних, на сьогодні одержано низку фізіологічно активних органічних сполук Ge хімічного синтезу [9, 46, 50, 51, 52]. Доведено, що такі германієві комплекси проявляють позитивні біологічні ефекти у менших дозах, але мають суттєво нижчу токсичність порівняно з його оксидами [11, 51, 97]. Розподіл Ge у тканинах встановлений у такій залежності: селезінка, нирки, печінка, легені, шлунок, серце та підшлункова залоза [85].

Щодо імуностимулювальних, цитотоксичних, протипухлинних й антиоксидантних властивостей хімічно синтезованих органічних сполук Ge наявні результати низки досліджень [27, 28, 57, 66]. Встановлено, що Ge-132 не виявляв цитотоксичної дії на культивовані клітини ссавців за визначеними рівнями лактатдегідрогенази (ЛДГ) [93]. Доведено проліферативний й антиоксидантний вплив Ge-132 залежно від дози у клітинах яєчників хом'яка. Синтетичний органічний Ge пригнічує внутрішньоклітинне утворення АФК і карбонільованого білка, що індукується H_2O_2 . Автори цього дослідження стверджують про виражену антиоксидантну активність Ge-132 в культивованих клітинах ссавців за умов стресового впливу перекису водню. Аналогічний захисний вплив Ge-132 від апоптозу, зумовленого окиснювальним стресом, відзначено для запліднених ембріонів свині [27, 28]. Застосування Ge-132 у період дозрівання ооцитів свині та ембріонального розвитку після партогенетичної активації покращувало ці процеси з підвищенням рівнів глутатіону і зменшенням утворення АФК й апоптичної дії, спричиненої окисним стресом. Автори цих досліджень пов'язують стимулювальний вплив Ge-132 на розвиток ембріонів свині на рівні експресії мРНК. Біологічна оцінка синтезованих поліфенольних комплексів Ge(IV) вказує на те, що такі сполуки мають високу антиоксидантну і протипухлинну здатність [66]. Германій у поєднанні з кавовою кислотою зумовлював індукуючий вплив на пухлинні клітини U14, інгібуючи їх ріст у мишей [47]. Поліфенольні Ge-вмісні комплекси виявляють сильніші поглинальні властивості гідроксильних елементів, ніж аналогічні ліганди. Автори досліджень відзначають інтеркаляційне (зворотне) включення вказаних комплексів у молекули ДНК тимусу телят, що зумовлює його морфологічні зміни. Сполуки Ge з вуглеводами та нуклеїновими кислотами можуть інгібувати

синтез ДНК і РНК у пухлинних клітинах і підвищувати імунну відповідь організму [77, 78].

Ge у навколишньому середовищі трапляється у формі п'яти ізотопів, здатних утворювати комплексні сполуки. Ізотопи Ge особливо чутливі до комплексоутворення з органічними речовинами та сульфідами [70]. Дослідженнями взаємодій між Ge-132, нуклеїновими кислотами та вуглеводами доведено здатність водного розчину цієї сполуки утворювати комплекси з їх цис-діольними структурами — глюкозою і фруктозою. Спектральний аналіз підтверджує, що Ge-132 має вищу спорідненість до фруктози, ніж до глюкози. Вказану особливість автори рекомендують зарахувати до ще однієї позитивної фізіологічної функції Ge-132. Відзначається, що Ge-132, ймовірно, може взаємодіяти з діолвмісними цукрами в глікопротеїнах і гліколіпідах. Застосовуючи методи ядерного магнітного резонансу (ЯМР), встановлено, що кількість цих діольних груп у структурі сахариду впливала на комплексоутворення між Ge-132 і моноцукрами [77, 78].

Використання органічного Ge у поєднанні з рафінозою стимулювало мікробіологічні процеси у травному каналі щурів [58]. Поєднання Ge-вмісної спіруліни з d-галактозаміном і ліпополісахаридами зумовлювало гепатопротекторну дію у щурів [99].

Стимулювальний вплив має германійорганічна сполука — тригідроксигерміл пропанової кислоти (THGP) на процес ізомеризації лактози та одержання лактулози у фармацевтиці [56]. Додавання THGP до реакційної суміші підвищувало вихід лактулози з 25% до 80% за рахунок її захисту від деградації. Синтезовані координаційні сполуки Ge з іншими мінеральними й органічними речовинами, які проявляють високу біологічну активність [34, 46, 50, 51, 52].

Методами хімічного синтезу створені й апробовані органічні Ge-вмісні сесквіоксанові сполуки — гермасани, герматрани, гермакани, спіро- і органілгерманати [11, 34, 46]. Успішно створюють та досліджують нові фізіологічно активні органічні сполуки Ge з нікотиною, нікотинамідом і бурштиною кислотою [44, 63, 72, 74, 86], а саме гомо- і гетерометалічні координаційні сполуки з біолігандами [36, 64, 73]. Ці сполуки інгібують дію оксидативного стресу у печінці, проявляють цито- і гепатопротекторну активність. Зокрема, Ge-вмісна синтетична сполука «Спірогерманій» проявляє імунорегуляторну, антизапальну і протипухлинну дію, а препарат «Альцинар» має дозозалежний гепатопротекторний вплив [44, 72, 86].

Новосинтезовані органічні сполуки Ge використовують для створення й інших ефективних лікарських засобів і препаратів, котрі застосовують для корекції імунного й антиоксидантного статусу організму [72, 93] та низки порушень функцій органів і систем [52, 64, 86]. Найпоширенішим препаратом, що містить органічний Ge хімічного синтезу, виявився його сесквіоксид-2-карбоксиетил Ge (Ge-132), який має виражену імуностимулювальну, протипухлинну, антивірусну, апоптичну дію [48, 89, 97, 98]. Встановлено,

що імуностимулювальна дія Ge-132 зумовлюється індукцією γ -інтерферону, який бере участь у корекції імунної здатності Т-клітин і макрофагів [6, 11, 36, 82]. Ефективність цього препарату доведено проти вірусних, дерматологічних і респіраторних захворювань, він проявляє протипухлинну дію. Широкий спектр біологічної активності препарату за патологічних станів зумовлений, крім імуностимулювальної дії, здатністю пригнічувати синтез окремих білків ДНК і РНК збудників хвороб [2, 11, 48].

Відзначено різноспрямована залежність дії сполук Ge від його концентрації: за високої — виникає апоптоз клітини [83, 97], за низької — блокується клітинна диференціація [3, 41, 49, 93]. Сироватка крові мишей після застосування органічного Ge-132 проявляла інгібуючу здатність щодо асцитних клітин цих тварин [66, 97]. Вказується, що протипухлинна дія зумовлюється активацією Ge-132 лімфокінів, зокрема γ -інтерферону [44, 47, 97]. Використання Ge-132 у промисловому птахівництві сприяло покращенню інкубаційної якості яєць, підвищенню маси тіла курчат [10, 94]. Крім цього, за впливу вказаного препарату скорочувався період виведення курчат і перепеленят, швидше розпочиналася яйценосність у молодих курей [44, 68].

У наступні періоди на основі органічних і мінеральних сполук було розроблено й інші препарати і лікарські засоби, які успішно застосовуються у медицині, ветеринарії та тваринництві [4, 37, 45, 72, 78, 97]. Зокрема, препарат комплексної дії «Гермакап», який активує імунну систему і зумовлює посилену детоксикаційну, антиоксидантну й адаптивну дію, покращує якість продукції [90, 94]. Препарат «Герматранол» має радіопротекторні, імунокорегувальні і біостимулювальні властивості [72]. Як антагоніст шкідливого впливу важких металів застосовують Ge-цитрат [60].

Вказані комплекси Ge проявляють інгібувальний вплив на низку ензимів плазматичної мембрани клітин серцевого м'яза, чим покращують його скоротливу функцію за умов атрациклінової інтоксикації [63, 64, 73, 74]. Експериментально доведено, що синтезовані органічні координаційні сполуки Ge змінюють поведінкові реакції у тварин за умов моделювання епілепсії та паркінсонізму, а також впливають на реактивність нейронів кори головного мозку [50].

Комплексні хімічно синтезовані сполуки Ge з амінокислотами (германати) виявляють імуномодулювальні, протизапальні властивості [6, 21, 40, 57]. Доведено, що здатність таких органічних сполук Ge активувати імунну систему та функцію макрофагів, нейтрофілів, лімфокінів, інтерферонів, Т-клітин і клітин-кілерів (NK) є фізіологічною основою багатьох терапевтичних ефектів Ge [36, 59].

Ефективність дії сполук Ge біотехнологічного синтезу

Органічні сполуки Ge біотехнологічного синтезу належать до низькотоксичного класу речовин і мають деякі відмінні властивості від його неорганічних

форм. Зокрема, 2-карбоксиетил германію (Ge-132, Bio-Ge) — це біотехнологічно синтезований препарат на основі культивування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з додаванням мінеральної солі Ge. Дослідження токсичності одноразового (2 г/кг маси тіла (м. т.)) і багаторазових (0,5–1,0 і 2 г/кг м. т.) *per os* введення дріжджів, збагачених органічним Ge, вказують на певні відмінності їх біологічного впливу у щурів [41]. Одноразове введення не зумовлювало суттєвих змін клінічних і фізіолого-біохімічних показників організму. За період 13-тижневого введення дріжджів, які містили Bio-Ge, встановлено зниження А/Г співвідношення у крові самців щурів, котрим вводили 1,0 г біомаси дріжджів/кг м. т. і більше. Відзначено збільшення маси серця як самців, так і самок щурів за дії 2,0 г/кг біомаси дріжджів. На основі результатів цих досліджень зроблено висновок, що рівень негативного впливу Bio-Ge у щурів становить більше, ніж 2,0 г/кг м. т. Використання вказаної схеми введення Bio-Ge собакам породи бігль підтвердило відсутність його токсичного впливу за одноразової дози 2,0 г/кг м. т. Багаторазове (13 тижнів) застосування цього препарату зумовлювало деякі дозозалежні зміни гематологічних і біохімічних показників крові, зокрема А/Г коефіцієнта, вмісту ретикулоцитів і тромбоцитів, частоти серцевих скорочень та інтервалів RR і QT у кобелів. Негативний вплив Bio-Ge для собак становить 2,0 г/кг м. т. і більше. Тривале застосування менших доз не мало несприятливого впливу на клінічний стан і фізіологічні показники організму тварин [39].

Важливий етап дослідження фізіологічної дії органічних сполук Ge розпочався після їх біотехнологічного синтезу з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і випробуванням на тваринах «біологічного германію» (Bio-Ge) [20, 39, 40, 42, 44]. Одержаний біотехнологічним методом Bio-Ge пройшов низку фізіологічних і токсикологічних досліджень на лабораторних тваринах, на собаках і клінічних випробувань на людях [11, 39, 40, 41, 47]. Експериментальними доклінічними і клінічними дослідженнями доведено терапевтичну і профілактичну ефективність цього біотехнологічного препарату [11, 20, 36, 43]. Нові дані літератури вказують на те, що одержаний препарат Bio-Ge на основі трансформації Ge в організмі дріжджів з мінеральної сполуки в органічну набуває безпечності і формує високу фізіологічну активність. Підтверджено, що Bio-Ge зв'язаний з білками і має детоксикаційну здатність щодо солей важких металів, підвищує цитотоксичність NK-клітин, активує β -клітини і фактор некрозу пухлин [20, 39, 40, 43].

Виконані на щурах і собаках дослідження гострої, субхронічної і хронічної токсичності Bio-Ge за умов *per os* застосування не виявили токсичного впливу навіть у високих (3 і 5 г/кг м. т.) дозах [36, 39, 40]. Важливо, що застосування Bio-Ge не призводило до кумуляції Ge в нирках і печінці [41].

Характерною є також протизапальна дія Bio-Ge, що змодельована у дослідженнях набряку лапи на

самцях щурів з введенням 1% карагенану у різних дозах [38]. Встановлено дозозалежний інгібувальний вплив Біо-Ge на розвиток запального процесу. Автори вказують на можливість фізіологічного зв'язку протизапальної дії Біо-Ge з інгибуванням вивільнення арахідонової кислоти і біосинтезу простагландину E_2 . Дозозалежний вплив Біо-Ge відзначено також у дослідженні імунного захисту організму мишей з використанням антитіл [20].

Відомо, що клітини-кілери (NK-клітини) можуть активуватися за дії цитокінів, які вивільняються з макрофагів [2]. Водночас встановлено, що NK-клітини відіграють важливу роль у захисній функції організму, а їхня цитотоксичність, яку стимулює Біо-Ge, є одним з основних індикаторів активації імунної системи. Дослідженнями імуностимулювальної здатності добавок Біо-Ge підтверджено підвищенням цитотоксичності NK-клітин, що дало підставу стверджувати про основну їх роль у посиленні Біо-германієм імунної функції організму [11]. Автори цієї публікації стверджують про визнання Біо-Ge новим дієтичним інгредієнтом у США, що документально підтверджено Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA, ID:FDA-2010-S-066S-0243). Крім того, вказується, що Біо-Ge надано статус зеленого списку FDA США і звільнено від контролю імпортової продукції з вмістом цього препарату (FDA Import Alert 54-07). Біо-Ge схвалений у Південній Кореї як функціональний і безпечний інгредієнт харчових продуктів і ліків для підвищення імунітету (KMFDS) — функціональний інгредієнт №2007-15 [11]. Дослідники вказують, що виконані ними та іншими авторами всебічні доклінічні і клінічні дослідження дії та органічної структури Біо-Ge доводять його імуностимулювальну ефективність з активацією імунної системи. На основі визначення зворотної мутації хромосомної аберації та мікроядерних тестів стверджується про відсутність генотоксичності у цього препарату. Автори вважають Біо-Ge багатообіцяючим терапевтичним засобом, подальші дослідження якого виявлять нові потенційні можливості для розвитку імунотерапії [11].

За даними інших авторів [2, 8] ефекторна функція цитокінів макрофагів вважається основою природного імунітету організму та формування його адаптивної імунної відповіді за багатьох інфекційних і паразитарних захворювань. Ці невеликі розчинні білки опосередковують комунікацію між імунними та неімунними клітинами [2]. Рівень цитокінів відіграє основну роль у функціонуванні макрофагів, які опосередковують перехід організму від імунітету вродженого до формування імунітету адаптаційного. У фізіологічному та біохімічному аспектах на біосинтез цитокінів суттєво впливають біологічні комплекси, зокрема ті, які формують складні білки. Їхня регуляторна дія забезпечує транспорт цитокінів до виходу з клітинного середовища. Такі білки, що координують злиття клітинних органел і вивільнення цитокінів, виявлені в дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* [11].

У роботі інших авторів [20] встановлено, що згодовування самицям мишей впродовж 28 днів біомаси дріжджів з Біо-Ge змінювало популяцію В-клітин і вироблення ними антитіл. Кількість В-клітин дозозалежно (від 100 до 800 мг/кг м. т.) збільшувалась на тлі відсутності змін у популяції Т-клітин, дендритних макрофагів і рівня цитокінів. Однак автори не встановили відмінностей цитотоксичності NK-клітин. Біо-Ge дріжджів виявляє кращий потенціал імунної відповіді В-клітин, ніж Ge-вмісний порошок женьшеню. Зроблено висновок, що сполука Біо-Ge може бути новим джерелом позитивного впливу на функцію імунної системи.

Враховуючи аналіз результатів цих та інших досліджень, було сформовано гіпотезу про переважання впливу NK-клітин у механізмах імуностимулювальної дії Ge, підтвердженої для Біо-Ge [11]. Доведено, що активація імунного захисту організму за дії органічних сполук Ge відбувається різноекторно зі збагаченням тканин киснем і поглинанням його активних форм [40, 43, 93], детоксикацією впливів солей важких металів [75, 78], підвищенням вмісту глутатіону й антиоксидантного захисту [28, 57]. Крім того, органічні сполуки Ge біотехнологічного синтезу інгібують ріст клітин і знижують їх токсичні пошкодження від протипухлинного опромінення та процесів пероксидації ліпідів біомембран [89]. Захисну здатність таких органічних сполук Ge відзначено стосовно токсичної дії різних форм АФК, зокрема перекису водню, супероксидного аніона та гідроксильних радикалів [66, 89].

Отже, органічні комплекси Германію, одержані біотехнологічним синтезом, зберігають основні позитивні для організму властивості щодо стимулювального впливу на імунну, антиоксидантну та детоксикаційну системи, посилюють його протипухлинний захист.

Вплив нанотехнологічних сполук Германію на організм тварин

Разом з тим, крім проаналізованих у попередніх пунктах статті, на сьогодні важливу роль у забезпеченні здоров'я і продуктивності тварин відіграють інші нові напрями одержання та застосування біологічно активних речовин, зокрема нанотехнології та наноматеріали [1, 7, 22, 29, 30, 31, 91]. Розроблено і досліджено наноматеріали, різні за технологічною формою, властивостями, походженням, застосуванням, які ефективно використовують у тваринництві та ветеринарній медицині [4, 18, 22, 35, 91, 92]. Ветеринарні засоби і препарати, одержані методами нанотехнології, застосовують для діагностики, лікування і профілактики захворювань, а також покращення відтворення та живлення тварин [10, 33, 62, 92, 96]. Вказується, що нанотехнології та наноматеріали використовуються у розробленні засобів догляду і гігієни для домашніх тварин і мають значні переваги порівняно з традиційними виробами [4, 90, 92].

З цього напрямку в Україні розроблено унікальну технологію одержання нанокарбоксилатів макро- і мікроелементів, зокрема Ge-цитрату нанотехнологічного (GeЦН) [7, 18, 31]. Оскільки даних літератури щодо механізмів дії GeЦН, його токсичності та фізіологічних ефектів недостатньо, у цій частині огляду приведено поглиблене висвітлення біологічного впливу цієї сполуки за матеріалами опублікованої монографії авторського колективу під керівництвом д.м.н. М. П. Гуліч.

За даними цих авторів [18], Ge утворює комплекси з лимонною кислотою у співвідношенні метал-ліганд 1:2, 1:1 і 1:3 залежно від кількості кислоти у середовищі. Такі комплекси розкладаються в лужному середовищі, але стійкі у слабкокислому і кислому. Автори вказують на те, що аквананоцитрати Ge та деяких інших елементів відрізняються від їхніх хімічних аналогів нестабільністю складу. Важливо, що за надлишку лимонної кислоти у реакційному середовищі вільних наночасток Ge чи інших мікроелементів не може бути. Тому оцінка достатності лимонної кислоти у водному розчині цитрату Ge є скринінговим тестом на їхню безпечність як сполуки, одержаної методом нанотехнології. У проведених дослідженнях підгострої та гострої токсичності на мишах і щурах встановлено, що за введення Ge цитрату *per os* його LD₅₀ становить 400 мг/кг м. т. [18]. Автори стверджують про відсутність особливостей токсичності цієї сполуки для організму мишей і щурів. Але в доступній літературі відсутні порівняльні дані щодо рівня токсичності цитрату Ge для тварин інших видів. Автори висловлюють важливі оцінки біологічної активності наноматеріалів у вигляді цитратів металів, зокрема Ge. Вказується, що цитрати біометалів є стійкими хелатними комплексами, мало залежними від лігандного гомеостазу, однак їхня стійкість менша від стійкості внутрішньокордінативних сполук металів з амінокислотами, ензимами, вуглеводами. Вказана біологічна особливість визначає поступове вивільнення Ge з цитрату за конкурентними реакціями з цими сполуками. Ця здатність зумовлює швидке залучення цитрату Ge у метаболічні процеси організму і посилює ефективність його біологічного впливу. Автори зробили висновок про меншу токсичність Ge-цитрату нанотехнологічного, ніж інших його сполук, що підтверджують наші дослідження [24]. Проте цей комплекс ефективніший від його хімічних аналогів як фізіологічний стимулятор високої хімічної чистоти з перспективою широкого практичного застосування у медицині, тваринництві, ветеринарії [18]. Вказані висновки підтверджує низка публікацій інших авторів про високу біологічну ефективність Ge-цитрату нанотехнологічного [13, 60, 83, 90, 91, 92]. На відсутність шкідливого або токсичного впливу GeЦН на організм лабораторних тварин вказують результати низки інших досліджень, виконаних за останні 5–7 років [15, 25, 32, 34, 55, 60, 88]. Підтверджено стимулювальну дію GeЦН у мікродозах (2–20 мг/кг м. т.) на фізіологічні і біохімічні процеси [13, 15, 25], функцію імунної [15, 16, 17, 32], антиоксидантної [13, 25, 55],

репродуктивної [14, 26, 32, 33, 60, 87] та адаптивної [87, 88] систем. Результати досліджень інших авторів вказують на активаційний вплив додавання до корму або питної води визначених мікро кількостей GeЦН на мінеральний, ліпідний і білковий обмін в організмі свиней [35], курчат-бройлерів [10], перепілок [62], бджіл [26, 33, 96]. Додавання GeЦН до цукрового сиропу у період підгодівлі бджіл підвищувало їхню життєздатність і збереженість, а також біологічну цінність та якість меду [96].

Проведені в ІБТ НААН дослідження, результати яких висвітлені у понад 50 публікаціях, зокрема у виданнях Німеччини, Польщі, Словаччини, показали високу біологічну активність нанотехнологічного цитрату Ge, одержаного методом ерозійно-вибухової аквананотехнології [18, 31]. Доведено стимулювальний вплив GeЦН на імуніфізіологічну реактивність і резистентність організму тварин, його детоксикаційну й антиоксидантну функцію [14, 16, 88, 92]. Відзначено вірогідно значимий активаційний вплив нанотехнологічного цитрату Ge на перебіг фізіологічних і біохімічних процесів в організмі щурів декількох поколінь [13, 14, 15], а також на їхній ріст, розвиток та адаптаційні реакції [16, 88], запліднюваність і молочність самиць [87, 88]. Застосування мікродобавок нанотехнологічного цитрату Ge у підгодівлі бджолиних сімей підвищувало резистентність і тривалість життя бджіл, репродуктивну функцію бджолиних маток [26, 33]. Висока біологічна активність нанотехнологічного цитрату Ge поєднується з його низькою токсичністю. За чинним нормативом токсичності германій цитрат нанотехнологічний належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпечності) [18].

Репродуктивна здатність організму та продуктивність тварин за дії сполук Ge

Германій у формі мінеральних і органічних сполук проявляє суттєвий вплив на репродуктивну здатність самиць тварин [33, 44, 60, 75, 88] та етологічні реакції приплоду [87]. Сполуки Ge впливають на запліднюваність самиць, багатоплідність, розвиток ембріонів і плодів, їхню масу та життєздатність [75, 87]. Участь Ge у транспортуванні і забезпеченні тканин O₂ сприяє запобіганню гіпоксії на клітинному рівні [48, 83]. Вказані властивості Ge підвищують здатність O₂ до інгібування утворення та нейтралізації дії пероксидів [27, 52]. З'ясовано особливості впливу сполук Германію на окисно-відновні процеси, антиоксидантний захист і репродуктивну функцію самиць тварин залежно від дози. Зокрема, дослідженнями впливу 100, 200 і 400 мкг/мл карбоксилгерманію (Ge-132) на дозрівання ядра ооцитів свині, вмісту глутатіону (GSH) та активних форм O₂ (АФК) не встановлено значної різниці у формуванні ядра [28]. Однак доза в 200 мкг/мл Ge-132 вірогідно підвищувала вміст глутатіону в ооцитах, а 200 і 400 мкг/мл зумовлювали зниження внутрішньоклітинного рівня АФК. Автори вказують на вищі рівні експресії інформаційної РНК, що пов'язане з процеса-

ми окиснення, але нижчі — матричної РНК, порівняно з контрольною групою. Відносний вміст апоптичних і некротичних клітин в ембріонах свині, оброблених Ge-132, був меншим, ніж у контролі — відповідно, 9,1 проти 17,1% і 0 проти 2,7% [28]. Додавання Ge-132 до культурального середовища захищало запліднені ембріони свині від апоптозу, зумовленого окиснювальним стресом з накопиченням активних форм кисню. Вказується, що Ge-132 покращує потенціал розвитку ембріонів свині, зменшуючи апоптоз в ооцитах і зиготах, спричинений окисним стресом.

У роботі інших авторів [93] встановлено, що синтетичний органічний Ge, який використовують як харчову добавку Ge-132, сприяв проліферації клітин яєчників китайського хом'яка і проявляв антиоксидантну активність за дії окисного стресу, спричиненого перекисом водню. Експериментально доведено, що Ge-132 інгібує утворення АФК, які індукують H_2O_2 , в клітинах яєчників хом'яка. Водорозчинний органічний Ge-132 індукуює синтез антиоксидантів з підвищенням рівня альфа-токоферолу у плазмі крові мишей. Інгібування утворення АФК за дії Ge-132 може пригнічувати активність ензимів, які беруть участь у виробленні цієї форми кисню. Зокрема, результати дослідження впливу Ge-132 *in vitro* на ензимну активність тканин печінки японських макак вказують на інгібування рівня NADH- і NADPH-залежних оксидаз, сприяння підвищенню активності супероксиддисмутази і каталази [89].

Доведено, що застосування Ge-132 у раціоні мишей-самців впродовж чотирьох діб посилювало експресію гена синтезу альфа-токоферолу в 1,62 раза. Ge-132 впливав також на гени, пов'язані з утворенням АТФ, метаболізм ліпідів та апоптоз клітин [59].

Підсумовуючи проведений аналіз результатів досліджень поширення сполук Германію у біологічному середовищі, створення та використання його синтетичних, біотехнологічних і нанотехнологічних комплексів, можна відзначити різновекторність їхньої ефективної біологічної дії як стимулювальних засобів імунної, детоксикаційної, антиоксидантної та низки інших фізіологічних систем у лабораторних і продуктивних тварин. Дані літератури і досліджень авторів публікації вказують на перспективність використання органічних сполук германію біо- і нанотехнологічного синтезу для корекції та стимуляції фізіологічних функцій органів і систем організму на метаболічному рівні, а також для лікування та профілактики окремих патологічних станів у тварин.

Висновки

1. Аналіз даних доступної літератури вказує на незначне поширення Ge у природному середовищі та різноспрямовану біологічну дію його мінеральних й органічних сполук і нанотехнологічного цитрату Ge. Проведено порівняльну оцінку нових результатів власних експериментальних досліджень й інших

авторів щодо безпечності, фізіологічної активності та токсичності в організмі тварин органічних сполук Ge хімічного і нанотехнологічного синтезу.

2. Відзначено значну частку публікацій за останнє десятиріччя щодо біологічної дії органічних сполук Ge у продуктивних тварин, проте лише незначну кількість досліджень проведено з питань їхнього впливу на безпечність, біологічну цінність та якість продукції.

3. Проведений аналіз опублікованих результатів вказує на перспективність комплексних досліджень фізіологічних і біохімічних механізмів стимулювальної біологічної дії в організмі тварин органічних і нанотехнологічних сполук Ge, які визнані безпечними харчовими добавками.

1. Ali A, Ijaz M, Khan YR, Sajid HA, Hussain K, Rabbani AH, Shahid M, Naseer O, Ghaffar A, Naeem MA, Zafar MZ, Malik AI, Ahmed I. Role of nanotechnology in animal production and veterinary medicine. *Trop. Anim. Health Prod.* 2021; 53 (5): 508. DOI: 10.1007/s11250-021-02951-5.
2. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 2014; 5: 491. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491.
3. Arts JHE, Til HP, Kuper CF, de Neve R, Swennen B. Acute and subacute inhalation toxicity of germanium dioxide in rats. *Food Chem. Toxicol.* 1994; 32 (11): 1037–1046. DOI: 10.1016/0278-6915(94)90144-9.
4. Avdosyeva IK, Pashchenko AG, Kushnir VI. Advanced nanotechnologies — an alternative to antibiotics. *Modern poultry.* 2016; 4: 13–15. Available at: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Ptakhivnytstvo/article/view/10217> (in Ukrainian)
5. Azumi J, Takeda T, Shimada Y, Aso H, Nakamura T. The organogermanium compound THGP suppresses melanin synthesis via complex formation with L-DOPA on mushroom tyrosinase and in B16 4A5 melanoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (19): 4785. DOI: 10.3390/ijms20194785.
6. Badawi AM, Hafiz AA. Synthesis and immunomodulatory activity of some novel amino acid germinates. *J. Iran. Chem. Soc.* 2007; 4 (1): 107–113. DOI: 10.1007/BF03245808.
7. Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov MV. *Nanomaterials in Biology. Fundamentals of nano-veterinary medicine.* Kyiv, Avicenna, 2010: 416 p. (in Ukrainian)
8. Bruggeman CW, Dekkers G, Bentlage AEH, Treffers LW, Nagelkerke SQ, Lissenberg-Thunnissen S, Koeleman CAM, Wührer M, van den Berg TK, Rispens T, Vidarsson G, Kuijpers TW. Enhanced effector functions due to antibody defucosylation depend on the effector cell Fcγ receptor profile. *J. Immunol.* 2017; 199 (1): 204–211. DOI: 10.4049/jimmunol.1700116.
9. Bukhtiarova TA, Lukianchuk VD, Seifullina IY, Kravets DS, Martsinko OE, Litvinenko DF, Kozyr VA. Comparative toxicometry of heterometal complexes of Germanium (IV) and 3D-metals based on citric and tartaric acid. *Bull. Sci. Res.* 2018; 4: 127–132. DOI: 10.11603/2415-8798.2017.4.8165. (in Ukrainian)
10. Busol VA, Sytnik MG. Effect from nano-aqua chelates Germanium and Iron on hematological and blood biochemical parameters of broiler chickens. *Sci. Works South. Branch NULES Ukr. Crimean Agrotechnol. Univer. Ser. Vet. Sci.* 2013; 151: 160–164. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Npkau_2013_151_28. (in Ukrainian)
11. Cho JM, Chae J, Jeong SR, Moon MJ, Shin DY, Lee JH. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: *Therapeutic opportunities from new insights. PLoS ONE.* 2020; 15 (10): e0240358. DOI: 10.1371/journal.pone.0240358.

12. Dobrzyński D, Boguszevska-Czubara A, Sugimori K. Hydro-geochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland). *Environ. Geochem. Health*. 2018; 40 (4): 1355–1375. DOI: 10.1007/s10653-017-0061-0.
13. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kovalchuk II, Kropyvka SY. Physiological and biochemical processes in the organisms of rats that were fed with different amounts of germanium citrate. *Biol. Tvarin*. 2015; 17 (2): 50–56. DOI: 10.15407/animbiol17.02.050.
14. Fedoruk RS, Khrabko MI, Tsap MM, Martsynko OE. Growth, development and reproductive function of female rats and their offspring viability at the conditions of the watering of different doses of citrate germanium. *Biol. Tvarin*. 2016; 18 (3): 97–106. DOI: 10.15407/animbiol18.03.097. (in Ukrainian)
15. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Khrabko MI, Tsap MM. Growth and development of the organism and immunophysiological indices of blood of male F_2 rats, affected by different doses of nano-germanium citrate. *Agricult. Sci. Pract.* 2017; 4 (2): 14–22. DOI: 10.15407/agrisp4.02.014.
16. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Khrabko MI, Tsap MM, Dolaychuk OP, Kropyvka SI. Haematological and biochemical parameters of the F_2 rats' organism in a period of prolonged watering of nano-Ge citrate. *Biol. Tvarin*. 2017; 19 (3): 115–121. DOI: 10.15407/animbiol19.03.115. (in Ukrainian)
17. Grushka NG, Pavlovych SI, Kondratska OA, Pilkevich NO, Yanchii RI. The protective effect of germanium citrate on functional state of immune cells and neutrophil activity under the condition of lipopolysaccharide induced inflammation. *Fiziol. Zh.* 2019; 65 (6): 43–50. DOI: 10.15407/fz65.06.043. (in Ukrainian)
18. Gulich MP, Yemchenko NL, Kharchenko OO, Yashchenko OV, Tomashevskaya LA, Antonov MI. *Nanotechnology Products: Citrates of Bioelements (Chemical Characteristics, Biological Action, Scope)*. Kyiv, Medinform, 2018: 202 p. (in Ukrainian)
19. Gunchak OV, Kaplunenko VH. Productive qualities of goslings for meat when used in animal feed additives germanium. *Anim. Husb. Prod. Product. Process.* 2013; 9: 51–54. Available at: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/899> (in Ukrainian)
20. Joo SS, Won TJ, Lee YJ, Kim MJ, Park SY, Lee SH, Hwang KW, Lee DI. Effect of geranti Bio-Ge yeast, a dried yeast containing bio-germanium, on the production of antibodies by B-cells. *Immune Netw.* 2006; 6 (2): 86–92. DOI: 10.4110/in.2006.6.2.86. (in Korean)
21. Jung M, Shin MK, Cha SB, Shin SW, Yoo A, Lee WJ, Park HT, Park JH, Kim B, Jung YK, Yoo HS. Supplementation of dietary germanium biotite enhances induction of the immune responses by foot-and-mouth disease vaccine in cattle. *BMC Vet. Res.* 2014; 10: 179. DOI: 10.1186/s12917-014-0179-6.
22. Kareem EH, Dawood TN, Al-Samarai FR. Application of nanoparticle in the veterinary medicine. *Magna Scientia Adv. Res. Rev.* 2022; 4 (1): 27–38. DOI: 10.30574/msarr.2022.4.1.0082.
23. Keith LS, Faroon OM, Maples-Reynolds N, Fowler BA. Chapter 37 — Germanium. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. 4th Ed. Acad. Press. 2015; 799–816. DOI: 10.1016/B978-0-444-59453-2.00037-8.
24. Khrabko MI, Fedoruk RS, Khrabko MI, Martsinko EE, Denys HH. Microelements content in tissues of female F_0 rats and F_1 males at the watering of nano and chemically synthesized germanium citrate. *Biol. Tvarin*. 2017; 19 (1): 125–134. DOI: 10.15407/animbiol19.01.125. (in Ukrainian)
25. Khrabko M, Fedoruk R, Kropyvka S, Tesarivska U. The regulatory effect of different doses of germanium citrate on physiological and biochemical processes in the body male F_2 . *Bull. Taras Shevchenko Nat. Univer. Kyiv. Ser. Biol.* 2017; 1 (73): 66–69. DOI: 10.17721/1728_2748.2017.73.66-69.
26. Kikish IB, Kovalchuk II, Lesyk YV, Kovalska LM. Mineral composition and qualitative indicators of beekeeping products by bee feeding with citrates Co and Ge. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Fodder Add. Inst. Anim. Biol.* 2021; 22 (2): 149–156. DOI: 10.36359/scivp.2021-22-2.18.
27. Kim E, Hwang SU, Yoon JD, Jeung EB, Lee E, Kim DY, Hyun SH. Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) treatment during *in vitro* culture protects fertilized porcine embryos against oxidative stress induced apoptosis. *J. Reprod. Dev.* 2017; 63 (6): 581–590. DOI: 10.1262/jrd.2017-020.
28. Kim E, Jeon Y, Kim DY, Lee E, Hyun SH. Antioxidative effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on IVM of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and IVF. *Theriogenol.* 2015; 84 (2): 226–236. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.006.
29. Kondrasiy LA, Yakubchak ON, Maliuk NO, Kaplunenko VH. The quality variation of raw milk under preparation based on citrate Zn and Ge. *Sci. Rep. NULES Ukraine*. 2017; 3(67). DOI: 10.31548/dopovid2017.03.019. (in Ukrainian)
30. Kondratska OA, Grushka NG, Kaplunenko VG, Pavlovych SI, Sribna VO, Yanchii RI. Protective effect of germanium citrate in endotoxin-induced ovarian dysfunction in mice. *Med. Perspekt.* 2018; 23 (1/1): 71–77. DOI: 10.26641/2307-0404.2018.1(part1).127240. (in Ukrainian)
31. 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 p. Available at: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=128062> (in Ukrainian)
32. Kotsjumbas G, Tesarivska U, Humenetska M, Shumska M. Hematological parameters and morphological characteristics of the spleen in female rats F_1 under influence of nanohermanium citrate, used in different doses. *Sci. Messenger LNU Vet. Med. Biotechnol. Ser. Vet. Sci.* 2017; 19 (77): 45–50. DOI: 10.15421/nvlvet7711. (in Ukrainian)
33. Kovalchuk II, Kykish IB, Kaplunenko VH. Influence of citrate microelements on the reproductive capacity of queen bees. *Actual problems of natural sciences: modern scientific discussions*. A collective monograph. Riga, Baltija Publishing, 2020: 87–110. DOI: 10.30525/978-9934-26-025-4-6. (in Ukrainian)
34. Kresyun NV, Son HO, Godlevsky LS. The influence of niacin-oxietiliden-diphosphonate germanate and electrical stimulations of paleocerebellar cortex upon electroretinogram in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Achiev. Biol. Med.* 2018; 1: 4–8. Available at: <http://biomed.odmu.edu.ua/?p=4741> (in Ukrainian)
35. Kuldonashvili KV, Sheremeta VI, Kaplunenko VG. Nanoaqua-helat germanium affect on the growth of piglets during the prenatal period. *Anim. Breed. Genet.* 2016; 51: 261–266. DOI: 10.31073/abg.51.35.
36. Kuwabara M, Ohba S, Yukawa M. Effect of germanium, poly-trans-[2-carboxyethyl] germasesquioxane on natural killer (NK) activity in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2002; 64 (8): 719–721. DOI: 10.1292/jvms.64.719.
37. Lavriv PJ, Kravtsov RJ, Avdosyeva IK. Role of nanopreparation hermacap in prophylactics of salmonellosis and heightening status at calves. *Bull. Agricult. Sci.* 2016; 11: 28–33. DOI: 10.31073/agrovisnyk201611-05.
38. Lee JH, Kim KW, Yoon Y, Lee JY, Kim CJ, Sim SS. Anti-inflammatory effect of germanium-concentrated yeast against paw oedema is related to the inhibition of arachidonic acid release and prostaglandin E_2 production in RBL 2H3 cells. *Autonom. Autacoid Pharmacol.* 2005; 25 (4): 129–134. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2005.00335.x.
39. Lee JS, Park JI, Kim SH, Lee HY, Hwang ZZ, Park CB, Sohn TU, Shin S, Kang JK, Kim YB. Oral single- and repeated-dose toxicity studies on *Geranti Bio-Ge yeast*[®], organic germanium fortified yeasts, in dogs. *J. Toxicol. Sci.* 2004; 29 (5): 555–569. DOI: 10.2131/jts.29.555.
40. Lee JS, Park JI, Kim SH, Park SH, Kang SK, Park CB, Sohn TU, Jang JY, Kang JK, Kim YB. Oral single- and repeated-dose toxicity studies on *Geranti Bio-Ge yeast*[®], organic germanium fortified yeasts, in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2004; 29(5): 541–553. DOI: 10.2131/jts.29.541.

41. Lee SH, Oh KN, Rho SN, Lee BH, Lee HJ. Oral repeated-dose toxicity studies especially in the liver and kidney of rats administered with organic Germanium-fortified yeasts. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2006; 11 (2): 115–119. DOI: 10.3746/jfn.2006.11.2.115.
42. Lee SH, Rho SN, Sohn TU. Efficacy study of activation on macrophage in germanium-fortified yeast. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2005; 48 (3): 246–51. Available at: <https://koreascience.kr/article/JAKO200508410620399.kr&sa=U>.
43. Lee WB, Kim IH, Hong JW, Kwon OS, Min BJ, Son GS, Jung YK. Effect of Protein level and dietary germanium biotite on egg production, egg quality and fecal volatile fatty acid in laying hens. *Korean J. Poult. Sci.* 2003; 30 (4): 275–280. Available at: <https://koreascience.kr/article/JAKO200315875828230.kr&sa=U>
44. Li L, Ruan T, Lyu Y, Wu B. Advances in effect of Germanium or germanium compounds on animals — a review. *J. Biosci. Med.* 2017; 5 (7): 56–73. DOI: 10.4236/jbm.2017.57006.
45. Lin CH, Chen SS, Lin YC, Lee YS, Chen TJ. Germanium dioxide induces mitochondria-mediated apoptosis in Neuro-2A cells. *Neurotoxicol.* 2006; 27 (6): 1052–1063. DOI: 10.1016/j.neuro.2006.05.018.
46. Litvinenko D, Kozyr V, Martsynko O. Search for potential antihypoxants among original heterometallic complexes of germanium and 3d-metals based on citric and tartaric acids. *Pharmacol. Drug toxicol.* 2016; 6 (51): 60–65. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/fit_2016_6_9. (in Ukrainian)
47. Liu CH, Yao FY, Sun FY, Jiang JL, Xiao C. Study on the inhibition effect of caffeic acid Germanium on the U14 tumor in mice and the cell apoptosis mechanisms. *Heilongjiang Anim. Sci. Vet. Med.* 2016; 11: 178–180. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2016.2122.
48. Lukevics E, Gar TK, Ignatovich LM, Mironov VF. *Biological Activity of Germanium Compounds*. Riga: Zinatne. 1990: 191 p.
49. Lukevics E, Ignatovich L. Biological activity of organogermanium compounds. *Cheminform.* 2003; 34 (45): 279–295. DOI: 10.1002/chin.200345272.
50. Lukianchuk VD, Seifullina II, Martsinko OE, Shevchuk OO. Cerebroprotection by germanium coordination compounds in experimental acute global brain ischemia. *Intern. J. Med. Med. Res.* 2018; 4 (1): 60–66. DOI: 10.11603/ijmmr.2413-6077.2018.1.9253.
51. Matyushkina MV, Godovan VV, Mudrik LM, Grydina TL. Antimicrobial properties of new coordination compounds of metals with citric acid. *Odesa Med. J.* 2014; 4: 13–17. Available at: <http://journal.odmu.edu.ua/?p=2454>. (in Ukrainian)
52. Menchikov LG, Ignatenko MA. Biological activity of organogermanium compounds (a review). *Pharm. Chem. J.* 2012; 46: 635–638. DOI: 10.1007/s11094-013-0860-2.
53. Midula P, Wiche O, Wiese P, Andráš P. Concentration and bioavailability of toxic trace elements, germanium, and rare earth elements in contaminated areas of the Davidschacht dump-field in Freiberg (Saxony). *Freiberg Ecol. Online.* 2017; 1 (2): 101–112. Available at: https://tu-freiberg.de/sites/default/files/media/institut-fuer-biowissenschaften-10447/ag_sites/default/files/FECO/feco_2_s101-112_midula_et_al_ree_ge_publ_09-04-2017.pdf
54. Mulder P, Van Den Hoek AM, Kleemann R. The CCR2 inhibitor propagermanium attenuates diet-induced insulin resistance, adipose tissue inflammation and non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE.* 2017; 12 (1): e0169740. DOI: 10.1371/journal.pone.0169740.
55. Mylostiva D. Influence of germanium citrate on the defensive antioxidative system of rats organism. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Fodder Add. Inst. Anim. Biol.* 2017; 18 (2): 34–37. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ntbibt_2017_18_2_7 (in Ukrainian)
56. Nagasawa T, Sato K, Kasumi T. Efficient alkaline isomerization of lactose to lactulose in the presence of an organogermanium compound. *J. Appl. Glycosci.* 2017; 64 (2): 27–32. DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2016_018.
57. Nakamura T, Nagura T, Akiba M, Sato K, Tokuji Y, Ohnishi M, Osada K. Promotive effects of the dietary organic Germanium poly-trans-[(2-Carboxyethyl) Germasesquioxane] (Ge-132) on the secretion and antioxidative activity of bile in rodents. *J. Health Sci.* 2010; 56 (1): 72–80. DOI: 10.1248/jhs.56.72.
58. Nakamura T, Nagura T, Sato K, Ohnishi M. Evaluation of the effects of dietary organic Germanium, Ge-132, and raffinose supplementation on caecal flora in rats. *Biosci. Microbiota Food Health.* 2012; 31 (2): 37–45. DOI: 10.12938/bmfh.31.37.
59. Nakamura T, Takeda T, Tokuji Y. The oral intake of organic germanium, Ge-132, elevates α -tocopherol levels in the plasma and modulates hepatic gene expression profiles to promote immune activation in mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.* 2015; 84 (3–4): 183–195. DOI: 10.1024/0300-9831/a000205.
60. Nefodova OO, Halperin OI, Shatorna VF. The influence of cerium and germanium citrates on the process of embryogenesis of rat on the background of cadmium intoxication. *Bull. Probl. Biol. Med.* 2019; 1 (1/148): 273–278. DOI: 10.29254/2077-4214-2019-1-1-148-273-278.
61. Négrel P, Ladenberger A, Reimann C, Birke M, Sadeghi M. GEMAS: source, distribution patterns and geochemical behaviour of Ge in agricultural and grazing land soils at European continental scale. *Appl. Geochem.* 2016; 72: 113–124. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2016.07.004.
62. Nischemenko N, Kaplunenko V, Emelianenko A. Embryonic development of quails in the incubating eggs processing solution aquachelate germanium. *Sci. Bull. the Lviv Nat. Univer. Vet. Med. Biotechnol. S. Z. Gzhytskyi. Ser. Vet. Sci.* 2014; 16 (2/2): 258–264. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2014_16_2%282%29_44. (in Ukrainian)
63. Nizhenkovska I, Narokha V, Bakun A, Bruzgina T. Research of the influence of germanium coordination compounds with niacin and oxyethylidendiphosphonic acid on fatty acid composition of blood serum lipids. *ScienceRise: Pharm. Sci.* 2017; 1 (5): 32–35. DOI: 10.15587/2519-4852.2017.91071. (in Ukrainian)
64. Nizhenkovska I, Narokha V, Savosko S. The study of hepatoprotective properties of the complex of germanium with nicotinic acid in doxorubicin intoxication. *Ukr. Biopharm. J.* 2015; 5 (40): 33–36. Available at: <http://ir.library.nmu.com/handle/123456789/1517>. (in Ukrainian)
65. Oh C, Li M, Kim EH, Park JS, Lee JC, Ham SW. Cheminform abstract: antioxidant and radical scavenging activities of ascorbic acid derivatives conjugated with organogermanium. *Cheminform.* 2011; 42 (16): 3513–3514. DOI: 10.1002/chin.201116213.
66. Pi J, Zeng J, Luo JJ, Yang PH, Cai JY. Synthesis and biological evaluation of Germanium(IV)-polyphenol complexes as potential anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23 (10): 2902–2908. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.03.061.
67. Ponomarenko OM, Samchuk AI, Vovk KV, Shvajka ID, Grodzynska GA. Germanium determination in environmental object by the method of mass spectrometry with inductively coupled plasma. *Ukr. Chem. J.* 2019; 85 (4): 110–113. DOI: 10.33609/0041-6045.85.4.2019.110-113.
68. Qu J. The biological functions of Germanium and its application in the poultry industry. *Feed China.* 2006; 9: 20–26.
69. Rosenberg E. Germanium: environmental occurrence, importance and speciation. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2009; 8: 29. DOI: 10.1007/s11157-008-9143-x.
70. Ruiz AG, Sola PC, Palmerola NM. Germanium: current and novel recovery processes. In: Lee S. (ed.). *Advanced material and device applications with germanium*. London, In Tech Open, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.77997.
71. Sabbioni E, Fortaner S, Bosisio S, Farina M, Del Torchio R, Edel J, Fischbach M. Metabolic fate of ultratrace levels of GeCl₄ in the rat and *in vitro* studies on its basal cytotoxicity and carcinogenic potential in Balb/3T3 and HaCaT cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 2010; 30 (1): 34–41. DOI: 10.1002/jat.1469.

72. Sakhandia IV. Preparations of germanium and their use in medicine. *Ukr. Sci. Med. Youth J.* 2014; 4 (84): 83–86. DOI: 10.32345/USMYJ.84.2014. (in Ukrainian)
73. Seifullina II, Martsinko EE, Afanasenko EV. Design and synthesis of new homo- and heterometal coordination compounds of Germanium(IV) for preparation of low toxic drugs with a wide therapeutic action. *Odesa Nat. Univer. Herald. Chem.* 2015; 20 (4/56): 6–18. DOI: 10.18524/2304-0947.2015.4(56).56690.
74. Seifullina II, Martsinko EE, Khristova NM, Chebanenko EA. Molecular complexes of germanium tetrachloride with niacin, nicotinic amide, isonicotinic hydrazide and their pharmacological actions. *Odesa Nat. Univer. Herald. Chem.* 2016; 21 (2/58): 18–28. DOI: 10.18524/2304-0947.2016.2(58).74777.
75. Shatorna VF, Abramov SV, Sorokin VO, Davydenko IV, Chernilovskaya SV, Kopatskaya MV, Velikorodny VI. Liver morphogenesis under the influence of cadmium salts at the end of embryogenesis and in the postnatal period of development and search for possible ways to reduce the hepatotoxicity of cadmium in experiment. *Bull. Probl. Biol. Med.* 2021; 4 (162): 280–284. DOI: 10.29254/2077-4214-2021-4-162-280-284.
76. Shatorna VF, Harets VI, Nefodova OO, Halperin OI, Deforzh GV, Gruzd VV. Experimental determination of the influence of citrates of metals to embryotoxicity of cadmium salts in embryogenesis of rats. *World Med. Biol.* 2019; 2 (68): 210–214. DOI: 10.26724/2079-8334-2019-2-68-210-214.
77. Shimada Y, Sato K, Masaki M, Nakamura T, Tokuji Y. Quantitative assessment of the interactions between the organogermanium compound and saccharides using an NMR reporter molecule. *Carbohydr. Res.* 2021; 499: 108199. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108199.
78. Shimada Y, Sato K, Takeda T, Tokuji Y. The organogermanium compound Ge-132 interacts with nucleic acid components and inhibits the catalysis of adenosine substrate by adenosine deaminase. *Biol. Trace Element Res.* 2018; 181 (1): 164–172. DOI: 10.1007/s12011-017-1020-4.
79. Siwulski M, Budzyńska S, Rzymiski P, Gąsecka M, Niedzielski P, Kalač P, Mleczeć M. The effects of germanium and selenium on growth, metalloids accumulation and ergosterol content in mushrooms: experimental study in *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum*. *Eur. Food Res. Technol.* 2019; 245: 1799–1810. DOI: 10.1007/s00217-019-03299-9.
80. Sobolev OI, Gutij BV, Soboleva SV, Borshch OO, Kushnir IM, Petryshak RA, Naumyuk OS, Kushnir VI, Petryshak OY, Zhelavskiy MM, Todoruk VB, Sus HV, Levkivska ND, Vysotskij AO, Magrelo NV. A Review of germanium environmental distribution, migration and accumulation. *Ukr. J. Ecol.* 2020; 10 (2): 200–208. DOI: 10.15421/2020_86
81. Song C, Jing X. Advance in physical and chemical properties of Germanium and nutrition functions in animals. *Chinese J. Anim. Sci.* 2005; 41: 64–66.
82. Stadnyk AM, Byts GO, Stadnyk OA. Biological role of germanium in animals and humans. *Sci. Bull. the Lviv Nat. Univer. Vet. Med. Biotechnol. S. Z. Gzhysky.* 2006; 8 (2/1): 174–185. (in Ukrainian)
83. Stoika RS. *Multifunctional Nanomaterials for Biology and Medicine: Molecular Design, Synthesis and Application*. Kyiv, Naukova dumka, 2017: 364 p. (in Ukrainian)
84. Sutton J, Ellwood MJ, Maher WA, Croot PL. Oceanic distribution of inorganic germanium relative to silicon: Germanium discrimination by diatoms. *Global Biogeochem. Cycl.* 2010; 24 (2): 1–13. DOI: 10.1029/2009GB003689.
85. Tan C, Xiao L, Chen W, Chen S. Germanium in ginseng is low and causes no sodium and water retention or renal toxicity in the diuretic-resistant rats. *Exp. Biol. Med.* 2015; 240 (11): 1505–1512. DOI: 10.1177/1535370215571874.
86. Tattis A, Zupanets IA, Shebeko SK, Otrishko IA, Grintsov YF. Study of hepatoprotective properties of the “Altsinara” drug under conditions of acute hepatitis development in rats. *Odesa Med. J.* 2016; 5: 5–11. Available at: <http://journal.odmu.edu.ua/?p=4493>
87. Tesarivska U. Ethological reactions in F₂ weaning female and male rats influenced by different doses of germanium citrate. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Fodder Add. Inst. Anim. Biol.* 2020; 21 (1): 228–234. DOI: 10.36359/scivp.2020-21-1.28. (in Ukrainian)
88. Tesarivska U, Fedoruk R, Shumska M. Reproductive function of rat females and postnatal development of F₁ and F₂ offspring for the actions of different doses of nanogermanium citrate. *Sci. Bull. the Lviv Nat. Univer. Vet. Med. Biotechnol. S. Z. Gzhysky. Ser. Vet. Sci.* 2016; 18 (3/71): 124–129. DOI: 10.15421/nlvvet7128.
89. Tezuka T, Higashino A, Akiba M, Nakamura T. Organogermanium (Ge-132) suppresses activities of stress enzymes responsible for active oxygen species in monkey liver preparation. *Adv. Enzyme Res.* 2017; 5 (2): 13–23. DOI: 10.4236/aer.2017.52002.
90. Velichko VA, Yakubchak ON, Kaplunenko VG, Avdosieva IK. The influence of *Hermacap* on the improvement of cows milk-raw indicators quality. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Fodder Add. Inst. Anim. Biol.* 2017; 18 (2): 114–122. (in Ukrainian)
91. Vlizlo V, Bashchenko M, Iskra R, Fedoruk R, Zhukorskyi O, Mezentseva L. Nanotechnologies and their application in animal husbandry and veterinary medicine. *Bull. Agr. Sci.* 2015; 93 (11): 5–9. DOI: 10.31073/agrovisnyk201511-01. (in Ukrainian)
92. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Iskra RJ. Biological effect of functional nanomaterials in various species of animals. *Bull. Agr. Sci.* 2018; 11: 80–86. DOI: 10.31073/agrovisnyk201811-11.
93. Wada T, Hanyu T, Nozaki K, Kataoka K, Kawatani T, Asahi T, Sawamura N. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2018; 41 (5): 749–753. DOI: 10.1248/bpb.b17-00949.
94. Wen P, Zhao XY, Ao Y, Qi GM, Liu ZY. The effect of two types of germanium compound on the production performance of meat chicken. *Feed Rev.* 2000; 4: 4–6.
95. Wiche O, Székely B, Moschner C, Heilmeyer H. Germanium in the soil-plant system — a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25 (32): 31938–31956. DOI: 10.1007/s11356-018-3172-y.
96. Yakubchak OM, Yermak AV. The influence of hermanium citrate on the indicators of quality and safety of natural honey. *Sci. Rep. NULES Ukraine.* 2019; 2 (78). DOI: 10.31548/dopovid2019.02.019. (in Ukrainian)
97. Yang F, Gong L, Jin H, Pi J, Bai H, Wang H, Cai H, Yang P, Cai J. Chrysin-organogermanium(IV) complex induced Colo205 cell apoptosis-associated mitochondrial function and anti-angiogenesis. *Scanning.* 2015; 37: 246–257. DOI: 10.1002/sca.21205.
98. Yang F, Jin H, Pi J, Jiang JH, Liu L, Bai HH, Yang PH, Cai JY. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium(IV) complex in MCF-7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23 (20): 5544–5551. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.08.055.
99. Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K. Hepatoprotective effect of germanium-containing *Spirulina* in rats with D-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced hepatitis. *Brit. J. Nutr.* 2013; 111 (1): 135–140. DOI: 10.1017/S0007114513001943.

Germanium compounds and their role in animal body

R. S. Fedoruk¹, I. I. Kovalchuk², L. M. Mezentseva³, U. I. Tesarivska⁴, A. Z. Pylypets¹, V. H. Kaplunenko⁵
rostislavfedoruk@gmail.com

¹Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

²Stepan Gzhytsky National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv,
50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

³The National Academy of agrarian sciences of Ukraine,
9 Mykhailo Omelyanovych-Pavlenko str., Kyiv, 01010, Ukraine

⁴Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives,
11 Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

⁵Nanomaterials and Nanotechnologies LLC,
27 Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine

Last years literature data and separate research results analysis was carried out concerning biological influence of Germanium compounds at laboratory and productive animals. The article states a comparative effect of mineral and organic Germanium compounds in chemical and biotechnological synthesis, as well as nanotechnological germanium citrate influence on the functioning of the immune, hematological, antioxidant, detoxification, reproductive and nervous systems of animals. The article displays a difference in influence of Germanium compounds on animal body depending on its form, dose and exposure. Benefits of using organic Germanium compounds in chemical, biotechnological and nanotechnological synthesis are highlighted based on a comparative analysis of the own research results, as well as other authors. Functioning analysis of a separate body organs, body systems as well as animal body in total was conducted after animals been exposed to short-term and long-lasting action of various Germanium compounds. Studies results for various Germanium compounds toxicity, their impact on animal productivity and product quality are stated based on the available literature. Comparison of influence effect for some drugs, biologically active additives and products containing Germanium compounds on the animal body was documented. Conclusions are made about the advantages of biological action of organic Germanium compounds, made by biotechnological synthesis using yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and Germanium citrate, obtained on the basis of nanotechnology, regarding the prospects of its use in animal husbandry and veterinary medicine.

Key words: organogermanium compounds, animals, biological processes, toxicity, physiological systems, functions, reproduction

Знати хоче багато хто. Здобувати знання — не всі!

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН ОГОЛОШУЄ НАБІР В АСПІРАНТУРУ

за спеціальностями:



091 «БІОЛОГІЯ»

спеціалізації: «біохімія», «фізіологія людини і тварин»

211 «ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА»

спеціалізації: «біохімія», «фізіологія людини і тварин»

204 «ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА

ТА ПЕРЕРОБКИ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА»

спеціалізації: «біохімія», «фізіологія людини і тварин»

Термін подання документів з 01.07. до 31.08.2022 р.

Довідки за тел.: (+38 032) 270-25-04, (+38 097) 831-83-30 (вчений секретар).

e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

www.inenbiol.com

КОНКУРС НА ЗДОБУТТЯ ПРЕМІЇ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО,



яку присуджує Інститут біології тварин НААН
провідним вченим за високі досягнення
у вирішенні актуальних проблем аграрної науки,
згідно з рішенням Вченої ради ІБТ НААН
від 12.05.2022 р. (протокол №4),

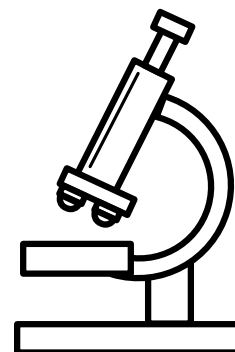
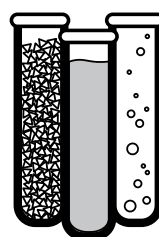
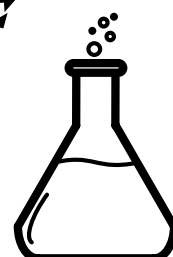
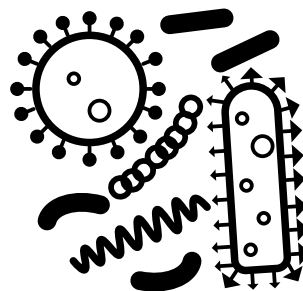
у 2022 році відбуватися не буде.

Про відновлення конкурсу буде оголошено
після припинення воєнних дій в Україні.



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 кормів
- Дослідження молока
- Дослідження яєць
- Визначення показників якості меду
- 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
тел.: +38 (032) 270-23-89, +38 (96) 858-37-76
e-mail: markinfo@inenbiol.com.ua

Завжди раді співпраці з Вами!