

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

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

Засновник: Інститут біології тварин НААН.

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

Мова видання: українська, англійська.

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

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

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

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

Комп'ютерна верстка: Судин К. Ю.

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

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

Founder: Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine.

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

Language: Ukrainian, English.

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

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

Scientific Editor: Ihor Vudmaska, Dr. Sc.

Editorial secretary: Olexandra Grabovska, PhD.

Page layout: Kateryna Sudyn.

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Салига Юрій Тарасович, Інститут біології тварин НААН (Україна) — Голова колегії, головний редактор

Вудмаска Ігор Васильович, Інститут біології тварин НААН (Україна) — заступник головного редактора

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

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

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

Віщур Олег Іванович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Войтюк Олександр, Уппсальський університет (Швеція)

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

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

Гунчак Алла Володимирівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

Доліба Микола, Пенсильванський університет (США)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кулік Джордж, Медичний центр Університету Вейк Форест (США)

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

Луговий Богдан, Університет Маунт Сент Вінсент (Канада)

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

Мадіч Алла Всеволодівна, Кембриджський університет (Великобританія)

Мароунек Мілан, Інститут тваринництва (Чехія)

Медина Ігор, Середземноморський інститут нейробіології (Франція)

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

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

Остапів Дмитро Дмитрович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

Снітинський Володимир Васильович, Львівський національний університет природокористування (Україна)

Стапай Петро Васильович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

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

Тизьо Роман, Середземноморський інститут нейробіології (Франція)

Федорович Єлизавета Іллівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)

Шаран Микола Михайлович, Інститут біології тварин НААН (Україна)

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

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



ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ
ТВАРИН
НААН

ISSN 1681-0015 (print)

ISSN 2313-2191 (online)

DOI: 10.15407/animbiol

БІОЛОГІЯ ТВАРИН

The ANIMAL BIOLOGY

2023 ▪ Volume 25 ▪ Issue 4 ▪ Issue DOI: 10.15407/animbiol25.04

EDITORIAL COUNCIL

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

Ihor Vudmaska, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine) — deputy chief editor

Halyna Antonyak, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)

Paweł Mieczysław Bartlewski, Ontario Veterinary College, University of Guelph (Canada)

Rostyslav Bilyy, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)

Nicolai M. Doliba, University of Pennsylvania (United States)

Yelyzaveta Fedorovych, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

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

Mechyslav 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, Ivan Franko National University of Lviv (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, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv (Ukraine)

Zygmunt Maciej Kowalski, University of Agriculture in Kraków (Poland)

Oleg Krishtal, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine (Ukraine)

George Kulik, Wake Forest University (United States)

Yaroslav Lesyk, Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University (Ukraine)

Bohdan Luhovyy, Mount Saint Vincent University (Canada)

Volodymyr Lushchak, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University (Ukraine)

Alla Madich, University of Cambridge (United Kingdom)

Milan Marounek, Institute of Animal Science (Czech Republic)

Igor Medina, Mediterranean Institute of Neurobiology (France)

Pavol Mudroň, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice (Slovak Republic)

Maciej Murawski, University of Agriculture in Kraków (Poland)

Dmytro Ostapiv, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Tatyana Pivneva, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine (Ukraine)

Mykola Sharan, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Volodymyr Snityns'kyi, Lviv National Environmental University (Ukraine)

Petro Stapay, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Rostyslav Stoika, Institute of Cell Biology NAS of Ukraine (Ukraine)

Volodymyr Stybel, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv (Ukraine)

Roman Tyzio, Mediterranean Institute of Neurobiology (France)

Oleg Vishchur, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)

Oleksandr Voytyuk, Uppsala University (Sweden)

Oksana Zayachkivska, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)

Ostap Zhukorskyi, The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Ukraine)

ЗМІСТ

Баландюх Н. І. Аналіз спектру живлення жаби трав'яної (<i>Rana temporaria</i>) та ропухи сірої (<i>Bufo bufo</i>) в антропогенно-трансформованих оселищах Українського Розточчя.....	3
Кумар А., Вірмані М., Кумар Р., Кумар С., Сартак, Канвар А., Кумар С., Патіл Ч. Додавання 1,3-диметилксантину покращило параметри якості сперми бугаїв.....	11
Чечет О. М., Горбатюк О. І., Пискун О. О., Мусієць І. В., Романько М. Є., Бучковська Г. А., Курята Н. В., Ординська Д. О., Шалімова Л. В., Мех Н. Я., Баланчук Л. В., Тогачинська Л. В., Кучинський М. В. Мікробіологічний моніторинг поширеності захворювання на мастити корів за мікробіологічними показниками досліджень молока у тваринницьких господарствах різних регіонів України за період 2018–2022 рр.	17
Яремчук І., Корнят С., Шаран М., Штапенко О., Гевкан І., Андрушко О. Стан обмінних процесів та відтворна здатність самців кролів за умов теплового стресу.....	26
Прудіус Т. Я., Смолянінов К. Б. Вплив пробіотичного препарату «ЕнзАктив Мікс» на деякі ланки обміну речовин та показники антиоксидантного захисту в організмі свиноматок та отриманих від них поросят.....	32
Боровик І. І., Маренков О. М. Аналіз лінійно-вагових показників річкових раків (<i>Astacus</i>) у водоймах Дніпропетровської області	37
Руминська Т. М., Лаврик Г. С. Вплив похідної 4-тіазолідинону та німесуліді на парієтальну кишкову мікробіоту щурів за індукованого запального процесу <i>in vivo</i>	44
Передерій Д. Б. Вплив теплового стресу на глутатіонову ланку антиоксидантного захисту та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у печінці курей	51

CONTENTS

Balandiukh N. The food spectrum analysis of <i>Rana temporaria</i> and <i>Bufo bufo</i> in anthropogenically transformed habitats of the Ukrainian Roztochchia	3
Kumar A., Virmani M., Kumar R., Kumar S., Sarthak, Kanwar A., Kumar S., Patil C. S. Inclusion of 1,3-dimethylxanthine improved quality parameters of bull semen	11
Chechet O., Gorbatiuk O., Pyskun O., Musiets I., Romanko M., Buchkovska G., Kuriata N., Ordynska D., Chalimova L., Mekh N., Balanchuk L., Togachynska L., Kuchynskyi M. Microbiological monitoring of the prevalence of mastitis in cows in livestock farms among different regions of Ukraine during 2018–2022	17
Yaremchuk I., Kornyat S., Sharan M., Shtapenko O., Gevkan I., Andrushko O. Metabolic processes and reproductive ability of male rabbits under the action of heat stress	26
Prudyus T. Ya., Smolyaninov K. B. “EnzActive mix” probiotic preparation effect on some metabolism sites and antioxidant defense parameters of sows and their piglets organisms	32
Borovyk I. I., Marenkov O. M. Analysis of linear-weight parameters of narrow-clawed crayfish (<i>Astacus</i>) in water reservoirs of Dnipropetrovsk region.....	37
Rumynska T., Lavryk G. Effect of 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on parietal intestinal microbiota of rats during induced inflammation process <i>in vivo</i>	44
Perederiy D. B. The influence of heat stress on the antioxidant protection glutathione link and the content of lipid peroxidation products in chicken liver	51



Аналіз спектру живлення жаби трав'яної (*Rana temporaria*) та ропухи сірої (*Bufo bufo*) в антропогенно-трансформованих оселищах Українського Розточчя

Н. І. Баландюх

ntl1957k@ukr.net



Львівський національний університет імені І. Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

ORCID:

N. Balandiukh <https://orcid.org/0009-0003-6401-5025>

Authors' Contributions:

BN: Conceptualization; Investigation; Methodology; Data curation; Formal analysis; Supervision.

Declaration of Conflict of Interests:

None.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Bioethics of the Ivan Franko National University of Lviv (Protocol no. 17-02-2021 від 09.02.2021, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Як результат роботи, було відібрано 109 особин двох видів земноводних: жаби трав'яної (*Rana temporaria*) та ропухи сірої (*Bufo bufo*). Саме ці два види є найчисленнішими серед інших земноводних на досліджуваній території, тому можна вважати їх фоновими видами в межах антропогенно-трансформованих оселищ Українського Розточчя. Під час аналізу зібраного матеріалу було застосовано індекс елективності Івлєва для визначення вибіркового ставлення досліджуваних видів земноводних до кількості харчових об'єктів. Порівнюючи дані з пасток Барбера та матеріал, вилучений зі шлунків земноводних, дійшли висновку, що, залежно від типу оселища, і жаба трав'яна (*R. temporaria*), і ропуха сіра (*B. bufo*) проявляють певну вибіркковість у живленні. Ропуха сіра найбільше споживає представників типу *Annelida* (15%), класу *Arachnida* (15%) та безхребетних ряду *Coleoptera* (18%), які сумарно становлять 48% від всіх спожитих об'єктів. Жаба трав'яна в умовах антропогенно-трансформованих середовищ віддає перевагу безхребетним типу *Mollusca* (15%), надкласу *Myriapoda* (20%) та представникам ряду *Hemiptera* (20%), що становить 55%. У половині досліджених нами шлунків обох видів земноводних були виявлені рослинні рештки — частини листя та гілок. Також в особин виду *B. bufo* у шлунку було виявлено камінці; найімовірніше, вони потрапили туди випадково під час захоплення основних кормових об'єктів. Види безхвостих земноводних дуже вразливі до негативного впливу різноманітних антропогенних чинників. Вирубання лісів, осушення водойм (глобальних та локальних), забруднення середовища — це все може серйозно впливати на різні типи екосистем, а в подальшому призвести до зникнення частини видового спектру живлення амфібій. Цей фактор важливий для проведення періодичного моніторингу трофіки досліджуваного класу тварин, оскільки земноводні відіграють важливу роль у ланцюгах живлення.

Ключові слова: *Rana temporaria*, *Bufo bufo*, живлення (трофіка), поширення, чисельність, герпетобіоти, оселища, Українське Розточчя

Вступ

Жаба трав'яна (*Rana temporaria*) та ропуха сіра (*Bufo bufo*) є одними з найпоширеніших видів заходу

України [9, 11], зокрема територій Українського Розточчя, де трапляються повсюдно.

Напрямок цієї роботи є актуальним, оскільки, згідно з аналізом літератури з початку 2000-х рр., достатньої

кількості даних щодо сучасних досліджень трофіки земноводних немає. Також вартує уваги й те, що сьогодні зростає тенденція до трансформації екосистем, зокрема внаслідок антропогенних чинників, здійснюється негативний вплив на батрахофауну, відбуваються фрагментація природних оселищ земноводних, інтенсивна експлуатація автомобільних доріг, які слугують бар'єрами під час сезонних міграцій тварин, забруднення водойм-нерестилищ тощо. Тому, щоб визначити місце і роль земноводних у трофічних ланцюгах і зберегти їх на перспективу, необхідним є вивчення поживи земноводних як одного з головних напрямів сучасних екологічних досліджень тварин.

Вартує уваги й те, що залежно від типу оселища та сезону активності, земноводні можуть проявляти різні харчові вподобання — наприклад, як це прослідковувалось у ропухи сірої (*B. bufo*): така поведінка у вибірковості її живлення, найімовірніше, пов'язана з великою кількістю таксонів безхребетних у місцях проживання впродовж певних сезонів [2].

Отже, метою цієї роботи було дослідити трофіку двох видів земноводних (*B. bufo*, *R. temporaria*) в межах антропогенно-трансформованих оселищ території Українського Розточчя.

Матеріали і методи

Дослідження трофіки земноводних здійснювали в розрізі сезонів їхньої активності (весна, літо, осінь) протягом 2020–2022 рр. на різних антропогенно-трансформованих територіях в межах Українського Розточчя: лісонасадження, сад, пасовище, узбіччя автодороги (території, які прямо чи опосередковано зазнають впливу людської діяльності, що призводить до змін їхніх характеристик). Водночас ми досліджували якісний та кількісний склад герпетобіонтної ентомофауни як основного джерела поживи для обраних видів земноводних. Реалізували це завдання завдяки заздалегідь встановленим пасткам Барбера [3] з подальшою ідентифікацією спійманих видів безхребетних. Окрім цього, вираховували частоту трапляння об'єктів поживи в шлунках досліджуваних видів земноводних. Збір натурного матеріалу здійснювали двічі на місяць, а відбір безхребетних з пасток Барбера — один раз на місяць. Виміри безхребетних, одержаних з пасток Барбера та вилучених зі шлунків земноводних, здійснювали за допомогою штангенциркуля (з точністю до 0,1 мм). Щоб дослідити живлення земноводних, відбирали вже загинувших на автошляхах особин, а також використовували безкровний метод — промивання шлунків живих [10].

Під час камеральної роботи з безхребетними, вилученими зі шлунків земноводних, та об'єктами, одержаними з пасток Барбера, ми використовували бінокуляр, який слугував для дослідження малих за розміром герпетобіонтів, а також їхніх окремих частин, які досить часто траплялись у шлунках земноводних, оскільки процес їх перетравлення не відбувся повністю.

Для їх подальшої ідентифікації використовували атлас комах України [4], визначник комах [15], визначник наземних молюсків Заходу України [12].

Для визначення вибіркового ставлення досліджуваних видів земноводних до кількості харчових об'єктів було застосовано індекс елективності Івлєва (Е), який обчислювали за формулою [8]:

$$E = \frac{r - p}{r + p},$$

де r — частка безхребетних у трофіці досліджуваних видів земноводних,

p — частка безхребетних у пастках Барбера.

Якщо E набуває додатних значень (від 0 до +1), то це вказує на вибір жертв хижаків, якщо ж навпаки, від'ємних (від 0 до -1), — на їх уникнення; $E = 0$ означає, що вибірковість у живленні відсутня. Усі маніпуляції з тваринами узгоджені з принципами «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших досліджень. Наукові цілі» (Страсбург, Франція, 1985 р.), а також схвалені Комітетом з етики Львівського національного університету імені Івана Франка (Україна) на початку дослідження (Протокол №17-02-2021 від 09.02.2021) та після завершення.

Результати й обговорення

Живлення ропухи сірої (*B. bufo*) та жаби трав'яної (*R. temporaria*) досліджували на основі оригінальних даних. Загалом зібрано та досліджено 109 шлунків двох фонових видів земноводних, зокрема 56 — жаби трав'яної (*R. temporaria*) та 53 — ропухи сірої (*B. bufo*). Різноманітність герпетобіонтних безхребетних на території дослідження представлена на рисунку. Склад безхребетних, вилучених зі шлунків земноводних, поданий у табл. 1–4.

Згідно з результатами (рис.), в межах чотирьох досліджених ділянок найчастіше виявляли представників рядів *Coleoptera* та *Hymenoptera* — їх частка становила близько 1/2 від усього зібраного матеріалу. У мізерних кількостях траплялись представники типів *Annelida*, *Mollusca* та підкласу *Acari*.

Згідно з даними табл. 1, жаба трав'яна (*R. temporaria*) певною мірою споживає менших за розміром безхребетних, тому прослідковується розмірна вибірковість жертв. Зокрема, серед малорозмірних представників у шлунках *Rana temporaria* найбільше траплялись представники типу *Mollusca*, рядів *Hymenoptera* та *Hemiptera*.

Аналізуючи трофічний спектр жаби трав'яної (*R. temporaria*) залежно від типу антропогенно-трансформованого оселища, ми виявили такі тенденції:

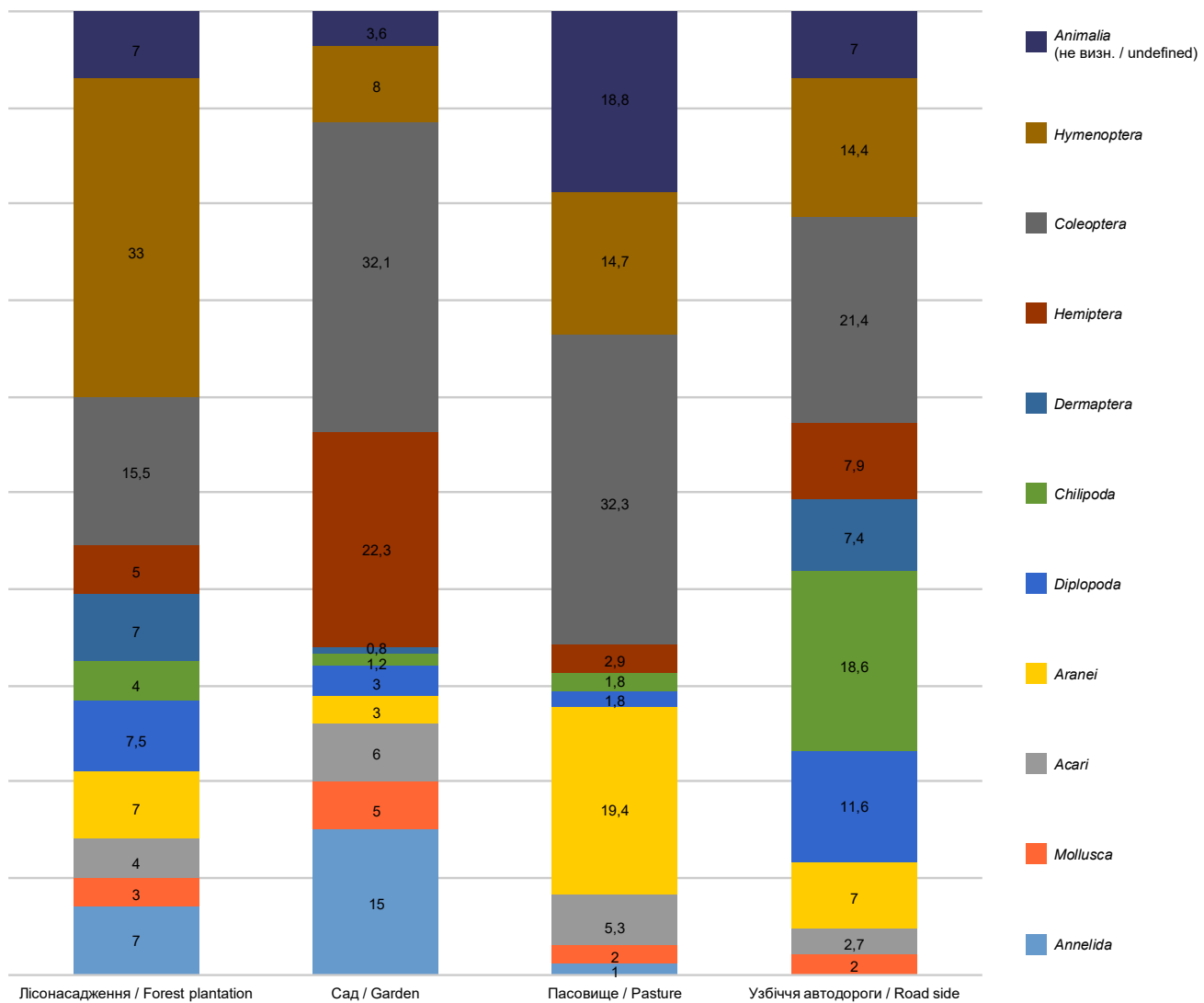


Рис. Якісний і кількісний склад герпетобіонтної фауни безхребетних у досліджуваних антропогенно-трансформованих оселищах земноводних Українського Розточчя (пастки Барбера)
Fig. Qualitative and quantitative composition of the herpetobiont fauna of invertebrates in the investigated anthropogenically transformed amphibian habitats of the Ukrainian Roztochchia (Barber traps)

1. Сумарно представники ряду *Aranei*, а також родин *Carabidae* та *Formicidae* становлять 50% харчового раціону в лісонасадженні.

2. Представники групи *Pulmonata*, ряду *Hemiptera* та родини *Carabidae* становлять половину всіх спожитих об'єктів у саду.

3. У харчовому спектрі жаби трав'яної (*R. temporaria*) у межах пасовища найчастіше траплялись представники групи *Pulmonata* та родини *Carabidae*; їх сумарна частка в харчовому спектрі становить близько половини всіх спожитих об'єктів.

4. На узбіччях автодороги серед об'єктів живлення найчастіше траплялися представники надкласу *Myriapoda* (*Diplopoda*, *Chilopoda*) та ряду *Hemiptera*, які сумарно становили половину всіх спожитих безхребетних.

Якщо порівняти ці дані з результатами, одержаними з пасток Барбера, то можна прослідкувати певну

вибірковість у живленні цього виду, зокрема щодо представників надкласу *Myriapoda*, оскільки у пастках Барбера вони траплялись в мізерній кількості, на відміну від вмісту шлунків. Та все ж, підсумовуючи, можемо стверджувати, що жаба трав'яна (*R. temporaria*) загалом споживає ті герпетобіонтні об'єкти, яких в оселищі є найбільше.

Згідно з результатами табл. 2, вирахувавши середнє значення індексу елективності Івлєва, на всіх чотирьох антропогенно-трансформованих ділянках у підсумку отримуємо додатні значення (0,02; 0,22; 0,16; 0,07). Це означає, що з перелічених таксонів кормової бази досліджуваного виду земноводних більшою чи меншою мірою спостерігається часткова вибірковість щодо певних груп безхребетних: зокрема, найбільшу вибірковість у живленні жаба трав'яна (*R. temporaria*) проявляє в ділянках саду та пасовища до представників ряду *Coleoptera*, типу *Mollusca* та надкласу *Myriapoda*.

Таблиця 1. Порівняння харчового спектру жаби трав'яної *R. temporaria* (n=56) в різних типах антропогенно-трансформованих оселищ з урахуванням стандартного відхилення (SD) для кожного таксону
Table 1. Diet spectrum comparison of the common frog *R. temporaria* (n=56) in different types of anthropogenically transformed habitats with standard deviation (SD) for each taxon

Таксони Taxa	Лісонасадження / Forest plantation		Сад / Garden		Пасовище / Pasture		Узбіччя автодороги/ Roadside	
	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n
<i>Annelida</i>								
<i>Oligochaeta</i>								
<i>Lumbricidae</i>	19,0±0,8	7	15,0±0,4	9	10,0±0,8	7	12,0±0,7	2
<i>Mollusca</i>								
<i>Gastropoda</i>								
<i>Pulmonata</i>	7,0±0,5	8	4,0±0,7	19	7,0±0,9	13	3,0±0,7	2
<i>Arachnida</i>								
<i>Acari</i>	3,0±0,7	5	2,0±0,4	3	3,0±0,5	4	3,0±0,7	2
<i>Aranei</i>	5,0±0,4	37	4,0±0,5	9	5,0±0,4	7	3,0±0,7	2
<i>Myriapoda</i>								
<i>Diplopoda</i>	10,0±0,8	7	9,0±0,4	9	—	—	8,0±0,6	16
<i>Chilopoda</i>	11,0±0,5	9	5,0±0,5	3	—	—	10,0±0,5	14
<i>Insecta</i>								
<i>Dermaptera</i>	19,0±0,8	9	8,0±0,5	7	—	—	5,0±0,5	3
<i>Hemiptera</i>	6,0±0,6	11	6,0±0,5	21	4,0±0,7	7	5,0±0,2	13
<i>Coleoptera</i>								
<i>Curculionidae</i>	—	—	5,0±0,4	3	—	—	—	—
<i>Silphidae</i>	—	—	7,0±0,4	4	—	—	—	—
<i>Carabidae</i>	7,0±0,8	28	8,0±0,6	32	7,0±0,6	19	6,0±0,4	11
<i>Chrysomelidae</i>	5,0±0,5	7	5,0±0,4	9	7	1	—	—
<i>Hymenoptera</i>								
<i>Formicidae</i>	3,0±0,4	29	3,0±0,5	8	3,0±0,6	7	3,0±0,5	3
<i>Animalia</i> (не визнач. / undefined)	4,0±0,6	17	4,0±0,4	7	3,0±0,6	7	4,0±0,8	5
Рослинні рештки / Plant residues	7,0±1,5	9	6,0±1,0	4	3	1	—	—
Середній розмір поживи Average food item size	8,1±0,7		6,1±0,7		5,2±0,6		5,6±0,7	
Всього / Total		183		147		83		73

Таблиця 2. Вибірковість живлення жаби трав'яної *R. temporaria* за індексом елективності Івлева (E)
Table 2. Feeding selectivity of the common frog *R. temporaria* on the basis of Ivlev's selectivity index (E)

Таксони Taxa	Лісонасадження Forest plantation	Сад Garden	Пасовище Pasture	Узбіччя автодороги Roadside
<i>Annelida</i>				
<i>Oligochaeta</i>				
<i>Lumbricidae</i>	−0,24	−0,35	0,78	1,00
<i>Mollusca</i>				
<i>Gastropoda</i>				
<i>Pulmonata</i>	0,20	0,41	0,82	0,19
<i>Arachnida</i>				
<i>Acari</i>	−0,16	−0,48	−0,09	−0,01
<i>Aranei</i>	0,53	0,27	−0,34	−0,44
<i>Myriapoda</i>				
<i>Diplopoda</i>	−0,30	0,39	—	0,31
<i>Chilopoda</i>	0,13	0,27	—	0,02
<i>Insecta</i>				
<i>Dermaptera</i>	−0,09	0,72	—	−0,29
<i>Hemiptera</i>	0,23	−0,21	0,53	0,39
<i>Coleoptera</i>				
<i>Curculionidae</i>	—	0,68	—	—
<i>Silphidae</i>	—	1,00	—	—
<i>Carabidae</i>	0,23	−0,16	−0,11	−0,17
<i>Chrysomelidae</i>	−0,17	0,52	0,39	
<i>Hymenoptera</i>				
<i>Formicidae</i>	−0,31	−0,18	−0,22	−0,26
<i>Animalia</i> (не визнач. / undefined)	0,20	0,15	−0,33	−0,01
Середнє значення / Mean	0,02	0,22	0,16	0,07

Аналогічний аналіз даних здійснений за дослідження трофічного складу ропухи сірої (*B. bufo*).

Ми провели аналіз зв'язку між явищами (розмір жертви та її чисельність у шлунку), і згідно з результатами табл. 3, залежність кількості споживання жертв від розміру їх тіла в *B. bufo* слабо виражена. Тож ми дійшли висновку, що ропуха сіра (*B. bufo*) не здійснює зайві енергозатрати для пошуку конкретного великорозмірного харчового ресурсу, а споживає найпоширеніших і найчисленніших особин безхребетних, які трапляються повсюдно, тому розмірна вибірковість практично відсутня. Як виняток, серед великорозмірних об'єктів живлення ропуха сіра (*B. bufo*) віддавала перевагу представникам типу *Annelida*.

Дослідивши трофічний спектр ропухи сірої (*B. bufo*) щодо їх проживання у різних типах антропогенно-трансформованих середовищ, ми виявили та проаналізували певні переваги у споживанні таких герпетобіотних безхребетних, зокрема:

1. Лісонасадження. У цьому типі оселища вид надавав перевагу представникам класу *Arachnida* (*Acari*, *Aranei*), які становили 1/3 частини від усіх

спожитих безхребетних. Трохи в менших кількостях переважали і представники родин *Lumbricidae* та *Formicidae*. Згідно з деякими літературними джерелами, для земноводних родини *Bufo* загальною характерною мірмекофагією [1, 5, 6, 7, 13, 14].

2. Сад. Найбільше у шлунках *B. bufo* траплялись представники родини *Lumbricidae* та ряду *Hemiptera*. Безхребетні цих категорій становили близько третини всіх спожитих об'єктів.

3. Пасовище. У цьому типі середовища серед об'єктів живлення в шлунках *Bufo bufo* переважали герпетобіоти ряду *Hemiptera* та родини *Carabidae*, які становили близько половини всіх спожитих об'єктів.

4. Узбіччя автодороги. Найбільше в шлунках траплялись представники родини *Lumbricidae*.

Якщо порівняти дані табл. 3 з результатами пасток Барбера, то можна прослідкувати вибірковість у живленні цього виду земноводних. Зокрема, найбільше у шлунках *B. bufo* траплялись представники типу *Annelida*, натомість у пастках Барбера їх відсоток був мізерний. Щодо інших груп безхребетних харчова вибірковість не прослідковується.

Таблиця 3. Порівняння харчового спектру ропухи сірої *B. bufo* (n=53) у різних типах антропогенно-трансформованих середовищ з урахуванням стандартного відхилення (SD) для кожного таксону
Table 3. Diet spectrum comparison of the common toad *B. bufo* (n=53) in different types of anthropogenically transformed habitats with standard deviation (SD) for each taxon

Таксони Taxa	Лісонасадження / Forest plantation		Сад / Garden		Пасовище / Pasture		Узбіччя автодороги / Roadside	
	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n	довжина об'єкта поживи, мм food item length, mm	к-сть екз., n number of items, n
<i>Annelida</i>								
<i>Oligochaeta</i>								
<i>Lumbricidae</i>	19.0±0,4	18	11.0±0,7	9	14,0±0,8	8	15.0±1,0	12
<i>Mollusca</i>								
<i>Gastropoda</i>								
<i>Pulmonata</i>	7.0±0,5	6	6.0±0,5	3	10.0±0,8	6	12.0±1,4	2
<i>Arachnida</i>								
<i>Acari</i>	3.0±0,2	21	2.0±0,2	3	2.0	1	3.0	1
<i>Aranei</i>	8.0±1,0	36	11.0	1	10.0±0,5	5	6.0±0,2	5
<i>Myriapoda</i>								
<i>Diplopoda</i>	13.0±0,5	10	10±1,0	6	12.0	1	10.0±0,5	2
<i>Chilopoda</i>	6.0±0,7	5	6.0±0,8	4	7.0	1	6	1
<i>Insecta</i>								
<i>Dermaptera</i>	10.0±0,8	12	9.0±0,6	8	—	—	11.0±0,7	2
<i>Hemiptera</i>	6,0±0,8	4	7.0±0,7	11	9,0±0,5	10	10.0±1,4	2
<i>Coleoptera</i>								
<i>Curculionidae</i>	6.0	1	4.0±0,2	6	—	—	—	—
<i>Staphylinidae</i>	11.0	1	9.0	1	10.0	1	9.0±0,7	6
<i>Silphidae</i>	13.0±0,4	6	8.0	1	—	—	—	—
<i>Carabidae</i>	11.0±0,5	16	8.0±0,7	7	9.0±0,7	18	8.0±0,2	5
<i>Chrysomelidae</i>	10.0±0,6	13	10.0±0,2	6	10.0	1	—	—
<i>Coccinellidae</i>	5.0	1	8.0±0,7	6	—	—	9.0	1
<i>Hymenoptera</i>								
<i>Formicidae</i>	4.0±0,4	17	4,0±0,2	4	3.0±0,4	6	3.0±0,4	3
<i>Animalia</i> (не визнач. / undefined)	3.0±0,4	8	—	—	4.0±0,8	6	5.0±0,5	8
Рослинні рештки / Plant residues	6.0±0,5	8	6,0±0,8	6	8.0±0,5	3	—	—
Середній розмір поживи Average food item size	8,2±0,6		7,4±0,6		8.3±0,6		8.2±0,7	
Всього / Total		183		82		67		50

Таблиця 4. Вибірковість живлення ропухи сірої *B. bufo* за індексом елективності Івлева (Е)
Table 4. Feeding selectivity of the Common Toad *B. bufo* on the basis of Ivlev's selectivity index (E)

Таксони Taxa	Лісонасадження Forest plantation	Сад Garden	Пасовище Pasture	Узбіччя автодороги Roadside
<i>Annelida</i>				
<i>Oligochaeta</i>				
<i>Lumbricidae</i>	0,12	−0,32	0,80	1,00
<i>Mollusca</i>				
<i>Gastropoda</i>				
<i>Pulmonata</i>	0,05	0,17	0,83	−0,04
<i>Arachnida</i>				
<i>Acari</i>	0,40	−0,03	0,39	0,42
<i>Aranei</i>	0,24	−0,37	−0,02	0,38
<i>Myriapoda</i>				
<i>Diplopoda</i>	0,02	0,15	0,56	−0,15
<i>Chilopoda</i>	−0,07	0,91	0,56	−0,56
<i>Insecta</i>				
<i>Dermaptera</i>	0,20	0,48	—	−0,54
<i>Hemiptera</i>	−0,34	−0,29	0,28	−0,64
<i>Coleoptera</i>				
<i>Curculionidae</i>	−0,78	0,93	—	—
<i>Staphylinidae</i>	0,54	1,00	0,08	0,58
<i>Silphidae</i>	0,87	1,00	—	—
<i>Carabidae</i>	0,17	−0,26	−0,67	−0,06
<i>Chrysomelidae</i>	0,28	0,64	0,58	—
<i>Coccinellidae</i>	−1,00	1,00	—	0,74
<i>Hymenoptera</i>				
<i>Formicidae</i>	−0,51	0,12	−0,24	−0,16
<i>Animalia</i> (не визнач. / undefined)	−0,38	−0,23	−0,29	0,33
Середнє значення / Mean	−0,01	0,31	0,24	0,10

Згідно з даними табл. 4, на деяких антропогенно-трансформованих ділянках ропуха сіра (*B. bufo*) достатньо мірою ігнорує безхребетних, а саме з родин *Formicidae*, *Carabidae* та ряду *Hemiptera*, що досить нетипово для цього виду земноводних, оскільки в умовах природного середовища вона в найбільшій кількості споживає саме ці групи безхребетних.

Відповідно до результатів середніх значень індексу Івлева, наведених в табл. 4, на більшості досліджених нами трансформованих ділянках спостерігають часткова вибірковість, зокрема найбільше щодо представників типу *Annelida* та окремих представників ряду *Coleoptera* (родин *Staphylinidae*, *Silphidae*, *Chrysomelidae*, *Coccinellidae*).

Загалом впродовж періоду проведення досліджень в антропогенно трансформованих оселищах Українського Розточчя зібрали 109 особин двох видів земноводних — 56 особин жаби трав'яної (*R. temporaria*) та 53 особини ропухи сірої (*B. bufo*). Сумарно зі шлунків

вилучено та досліджено 868 об'єктів живлення. Також було встановлено 12 пасток Барбера, з яких досліджено 840 герпетобіонтних безхребетних. Детальний аналіз живлення двох фонових видів земноводних дозволив встановити, що для обох видів земноводних характерна певна вибірковість у живленні.

Провели аналіз вибірковості живлення земноводних за допомогою індексу елективності Івлева. Зокрема, згідно з нашими результатами, ропуха сіра (*B. bufo*) в умовах антропогенно-трансформованих оселищ віддає перевагу представникам типу *Annelida* (15%), класу *Arachnida* (15%) та безхребетним ряду *Coleoptera* (18%), що сумарно становить 48% від всіх спожитих об'єктів. Натомість жаба трав'яна, залежно від типу оселища в умовах антропогенно-трансформованих середовищ, віддає перевагу безхребетним типу *Mollusca* (15%), надкласу *Myriapoda* (20%) та представникам ряду *Hemiptera* (20%), які загалом становили 55%.

На підставі проведених досліджень ми припускаємо про різні трофічні преференції ропухи сірої (*B. bufo*) і жаби трав'яної (*R. temporaria*), що вказує на різні екологічні ніші, які вони займають у ценозі, будучи представниками одних і тих же угруповань земноводних на території Українського Розточчя, що свідчить про відсутність харчової конкуренції між цими видами.

Джерела

1. Astwood-Romero JA, Álvarez-Perdomo N, Parra-Torres MF, Rojas-Peña JI, Nieto-Vera MT, Ardila-Robayo MC. Stomach contents in anurans species from Natural Reserves in the Villavicencio municipality, Meta, Colombia. *Zoología*. 2016; 38 (1): 165–181. DOI: 10.15446/caldasia.v38n1.57836.
2. Balandiukh NI, Andriishyn BO, Reshetylo OS. Seasonal diet differences of the common toad *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) in Ukrainian Roztochchia (Western Ukraine). *Acta Biol. Univer. Daugavpiliensis*, 2020; 20 (2): 113–119. Available at: <https://du.lv/seasonal-diet-differences-of-the-common-toad-bufo-bufo-linnaeus-1758-in-ukrainian-roztochia-western-ukraine>
3. Dunger W, Fiedler HJ. *Soil Biology Methods*. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Publishing, 1989: 432 p. Available at: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19901941589>
4. Gusev VI, Yermolenko VM, Svishchuk VV, Shmygovskiy KA. *Atlas of Insects of Ukraine*. Kyiv, Radianska Shkola, 1962: 304 p. Available at: <http://irbis-nbuv.gov.ua/ulib/item/ukr0000016> (in Ukrainian)
5. Ivlev VS. *Experimental Ecology of fish Nutrition*. Moscow, Kharchpromvydav, 1955: 251 p.
6. Kuzmin SL, Dunaev EA, Munkhbayar H, Munkhbaatar M, Oyuunchimeg Z, Terbish H. *Amphibians of Mongolia*. Moscow, Partnership of Scientific Publications KMK, 2017: 302 p. Available at: https://amphibiaweb.org/refs/pdfs/Kuzmin_Amphibia_Mongolia.pdf
7. Menéndez-Guerrero PA. Trophic ecology of the anuran community of the Yasuní National Park in the Ecuadorian Amazon. Bachelor Degree work Biol. Sci. Pontifical Catholic University of Ecuador, Quito, Ecuador. 2001: 164 p. Available at: <https://multimedia20stg.blob.core.windows.net/publicaciones/Menendez%202001.pdf> (in Spanish)
8. Parmelee JR. *Trophic ecology of a tropical anuran assemblage*. Scientific Papers, Natural History Museum, The University of Kansas. 1999; 11: 1–59. DOI: 10.5962/bhl.title.16167.
9. Pysanets E. *Amphibians of Ukraine*. A guide for identifying amphibians of Ukraine and neighboring countries. Kyiv, Raevsky Publishing House, 2007: 92 p. Available at: https://museumkyiv.org/upload/zoo/Amphibia_in_Ukraine_ukr.pdf
10. Shcherbak NN (ed.). *Guide to the Study of Amphibians and Reptiles*. Kyiv, 1989: 172 p.
11. Shcherbak NN, Shcherban MI. *Amphibians and Reptiles of Ukrainian Carpathians*. Kyiv, Naukova Dumka, 1980: 268 p.
12. Sverlova NV, Hural RI. *A Key for the Identification of Terrestrial Mollusks of Western Ukraine*. Lviv, National Museum of Natural History, 2005. (in Ukrainian)
13. Toft C. Feeding ecology of Panamanian litter anurans: patterns in diet and foraging mode. *J. Herpetol.* 1981; 15 (2): 139–144. DOI: 10.2307/1563372.
14. Weber NA. The food of the giant toad, *Bufo marinus*, in Trinidad and British Guiana with special reference to the ants. *Annals Entomol. Soc. America*. 1938; 31 (4): 499–503. DOI: 10.1093/aesa/31.4.499.
15. Yermolenko VM., Klyuchko F. *A Handbook of Insects*. Kyiv, Radianska Shkola, 1971: 183 p. (in Ukrainian)

The food spectrum analysis of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* in anthropogenically transformed habitats of the Ukrainian Roztochchia

N. Balandiukh
ntl1957k@ukr.net

Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevsky str., Lviv 79005, Ukraine

As a result of the research, 109 individuals of two amphibian species: the common frog (*Rana temporaria*) and the common toad (*Bufo bufo*) were selected. These two species are the most numerous among other species of amphibians within the studied territory, therefore, they can be considered typical species in the anthropogenically transformed habitats of the Ukrainian Roztochchia. During the analysis of the collected material, Ivlev's selectivity index was used to determine the selective attitude of the studied amphibian species to the number of consumed objects. Comparing data obtained from Barber's traps and material extracted from the stomachs of amphibians, it was concluded that depending on the habitat type, both the common frog (*Rana temporaria*) and the common toad (*Bufo bufo*) show a certain feeding selectivity. The common toad consumes mostly the representatives of *Annelida* (15%), *Arachnida* (15%) and *Coleoptera* (18%), what makes up 48% of all consumed objects in total. The common frog, under the conditions of anthropogenically transformed environment, prefers *Mollusca* (15%), *Myriapoda* (20%) and *Hemiptera* (20%) mostly, what is 55% in total. In half of the stomachs we examined for, both amphibian species, plant residues were found, specifically parts of leaves and branches. Additionally, in individuals of the *Bufo bufo* species, stones were discovered in the stomach. Most likely, these items ended up there accidentally during the capture of primary food objects. Species of tailless amphibians are highly vulnerable to the negative impact of various anthropogenic factors. Deforestation, water bodies drainage, and global or local environmental pollution can significantly affect diverse ecosystems. This, in turn, may lead to the disappearance of segments of the dietary spectrum for amphibians. Monitoring the trophic interactions of this animal class is crucial, given the importance of amphibians as vital links in food chains. This factor underscores the need for periodic trophic monitoring, as amphibians play a pivotal role in sustaining ecological balance within their vulnerable populations.

Key words: *Rana temporaria*, *Bufo bufo*, feeding (trophics), distribution, number, herpetobionts, habitats, Ukrainian Roztochchia



Inclusion of 1,3-dimethylxanthine improved quality parameters of bull semen

Amit Kumar¹, Meenakshi Virmani¹, Rajesh Kumar¹, Sudarshan Kumar¹, Sarthak¹, Arushi Kanwar¹, Sandeep Kumar², C. S. Patil³

virmanim2003@yahoo.com



¹Department of Veterinary Physiology and Biochemistry,

College of Veterinary Sciences, Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences (LUVAS), Hisar, Haryana 125001, India

²Department of Veterinary Gynaecology and Obstetrics,

College of Veterinary Sciences, Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences (LUVAS), Hisar, Haryana 125001, India

³Department of Animal Genetics and Breeding,

College of Veterinary Sciences, Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences (LUVAS), Hisar, Haryana 125001, India

ORCID:

Amit Kumar <https://orcid.org/0009-0008-8923-9056>

Meenakshi Virmani <https://orcid.org/0000-0002-6510-3153>

Rajesh Kumar <https://orcid.org/0000-0003-4586-1923>

Sudarshan Kumar <https://orcid.org/0009-0007-0650-4778>

Sarthak <https://orcid.org/0009-0001-5884-2046>

Arushi Kanwar <https://orcid.org/0000-0003-3668-3678>

Sandeep Kumar <https://orcid.org/0000-0002-3849-147X>

C. S. Patil <https://orcid.org/0000-0002-8030-2898>

Authors' Contributions:

KA: Methodology; Investigation; Writing — original draft, review & editing.

VM: Conceptualization; Funding acquisition; Supervision.

KR: Validation; Project administration.

KS: Methodology; Investigation.

S: Methodology; Investigation.

KA: Writing — review & editing.

KS: Writing — review & editing.

PCS: Data curation; Formal analysis.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

The current study was duly approved by the Institutional Animal Ethical Committee of the University for sample collection from the animals.

Acknowledgements:

Authors are thankful to Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences (Hisar) for providing the essential amenities for conducting the research.

Funding for this research was received from State Plan Fund of Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences (Hisar).

Methylxanthines are a unique class of drug, derived from the purine base xanthine and 1,3-dimethylxanthine (Theophylline) is the most commonly used methyl xanthine. The present study was conducted to study the effect of supplementation of 1,3-dimethylxanthine in semen extender on sperm motility and morphological parameters of semen. A total of 15 semen ejaculates were collected from three adult cattle bulls. Each ejaculate was divided into five groups. First group was kept as control (C) in which samples were diluted with Tris-egg yolk-glycerol extender and samples of other 4 groups (T-5, T-10, T-20 and T-40) were supplemented with 1,3-dimethylxanthine at a dose rate of 5, 10, 20 and 40 mM respectively. The diluted semen samples were incubated at 37°C in water bath and evaluated for various seminal parameters at 15 and 30 min of incubations. Sperm motility, sperm kinetic parameters and sperm abnormalities of semen of all groups were assessed using computer assisted sperm analyser (CASA). Morphological parameters of spermatozoa of control and supplemented groups were also evaluated. The results revealed that 1,3-dimethylxanthine supplementation resulted in significant increase in motile sperm concentration, kinematic parameters, sperm viability, sperms with intact plasma membrane as compared to other groups. However, sperm abnormalities viz., bent tail, coiled tail, distal droplet and distal midpiece reflex varied non-significantly in all groups. Thus, it can be concluded that 1,3-dimethylxanthine (Theophylline) inclusion at 10 mM concentration in semen extender improved the quality of semen.

Key words: 1,3-dimethylxanthine (Theophylline), semen, semen extender, motility, CASA



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Introduction

Artificial insemination (AI) and semen cryopreservation are the two most popular and widely utilized methods for reproducing domestic animals [8, 12]. Animal

genetic improvements have been made possible in large part by the use of cryopreserved semen in artificial insemination (AI) [3]. However, the production and supply of frozen semen with an acceptably predictable fertility has always been a challenge because of poor fertility

of cryopreserved semen. Semen extenders are used in animal breeding and artificial insemination to preserve and prolong the life span of sperm outside the body. These extenders are specially designed solutions that aid in nourishing and protecting the sperm, extending their survival time and improving the probability of successful insemination. One important factor in determining the quality of frozen thawed samples for AI is sperm motility, and fertility is closely associated with the total number of progressively motile spermatozoa in semen [13]. Changes in the plasma membrane permeability in the spermatozoa's tail region and the formation of ice crystals in the mitochondria and axonemes following cryopreservation may result in a decrease in sperm motility [16].

Various substances have been used to improve the quality of cryopreserved semen like glutathione [18], theobromine [15] and taurine [17] in semen during cryopreservation process. Methylxanthines are a unique class of drugs that are derived from the purine base xanthine and have been reported to enhance sperm motility and Theophylline is the most used methylxanthine. According to studies, methylxanthines enhance sperm intracellular cAMP, which is crucial for improving sperm fertility by inhibiting the enzyme cyclic adenosine monophosphate (cAMP) phosphodiesterase, which breaks a phosphodiester bond [5]. Theophylline significantly increases sperm mobility when added to semen by activating the production of cAMP, which could result in less apoptotic and dead/necrotic sperm. This increase in intracellular cAMP causes an increased sperm mitochondrial activity which contributes in providing energy for sperm motility [10].

Materials and methods

Semen Collection and processing

Clinically healthy mature cattle bulls of 3 to 5 years of age and 450 to 550 kg body weight and showed good libido were selected. Animals were housed individually under semi open sheds maintained under the same dietary and management standards at Animal Farm, Department of Animal Genetics and Breeding, College of Veterinary Sciences, Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences, Hisar. The bulls were maintained in a clean and hygienic place and were reared on a balanced breeding bull diet as per the Minimum Standard Protocol of the Government of India (2000) and drinking water was available *ad libitum* throughout the day. The bulls were exercised daily on a rotatory bull exerciser. Semen was collected in the morning hours twice a week from the bulls using a sterile artificial vagina. Immediately after collection, a tube containing the ejaculate was kept in a water bath at 37°C. Sperm motility was subjectively assessed under a phase-contrast microscope equipped with a warm stage (37°C) at 200X magnification and a total of 15 semen ejaculates with $\geq 70\%$ sperm motility were diluted with TRIS-egg yolk-glycerol extender to make the sperm concentration of 80 million /mL.

Extender preparation

TRIS-egg yolk-glycerol (TEYG) extender was prepared by adding 30.28 gm Tris, 16.75 gm citric acid, 12.00 gm D-Fructose in 1 litre of deionized water (DDW). 20% egg yolk and 7% glycerol were added to the extender. The extender was supplemented with standard antibiotics (Penicillin 10 Lakh IU/litre and Streptomycin 1 gm/litre). The diluted semen was divided into five aliquots, one aliquot (group C) was kept as control and the other four aliquots (groups T-5, T-10, T-20 and T-40) were supplemented with 5, 10, 20 and 40 mM 1, 3-dimethylxanthine respectively in TEGY extender. The semen samples were incubated in water bath at 37°C, and samples were evaluated for kinematic and morphological parameters at 15 and 30 min of incubation.

Evaluation of semen for kinetic parameters

Sperm kinematics, motility and morphological anomalies were assessed using the computer assisted sperm analyser (CASA) system. For each sample, 5 optical fields were selected from each of the eight chambered Leja slide (depth 20 μm). Sperm kinetics and motility of fresh and frozen-thawed semen were assessed using a computer-assisted sperm analyzer (CASA) system (IVOS-II, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) as previously described [9]. Before analysis using CASA, the semen sample was diluted with pre-warmed Tris buffer to give a sperm concentration of about 40×10^6 sperm/mL. The prepared semen sample (2 μL) was loaded in a pre-warmed (38°C) eight chamber Leja slide (depth 20 μm) and analyzed for sperm kinetics and motility characteristics.

The following motion characteristics were recorded: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average lateral head displacement (ALH, μm), average path distance (DAP), straight line distance (DSL), curvilinear distance (DCL), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight linear velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), beat cross frequency (average rate at which the curvilinear path crosses the average path) (BCF, Hz), wobble (WOB), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %) of the sperm. Sperm Abnormalities viz., bent tail (%), coiled tail (%), distal droplet (%) and distal midpiece reflex (%) were also recorded. The CASA software settings were as follows: temperature = 38°C, frame rate = 60 Hz, frames acquired = 30, minimum contrast = 35, minimum cell size = 5 pixels, cell size = 9 pixels, cell intensity = 110 pixels, VAP cut-off = 37 $\mu\text{m/s}$, STR cut-off = 50%.

Estimation of sperm liveability and morphology

Eosin-nigrosin staining technique was used to identify the live or dead spermatozoa and abnormal spermatozoa [20]. In this process, eosin-nigrosin stain was slightly warmed at 37°C in a hot air oven and the semen along with the stain were placed on warm grease free glass slides, mixed well, and kept at room temperature for air drying. The slides were examined under microscope (1000X). Live spermatozoa remained unstained, but

dead spermatozoa stained pink against a blue-black background. Sperms that were merely partially stained were considered dead. Approximately 200 sperms were counted randomly from various fields, and the percentage of live and dead sperm as well as their morphology was determined.

Estimation of acrosome integrity

The percentage of intact acrosome was calculated using Giemsa stain in accordance with the methodology described by [19]. A thin smear of extended semen was prepared, dried and fixed in neutral formalin saline solution for 15 min. The smear was rinsed slowly with running tap water and stained for 40 min in working Giemsa stain solution. The degree of change in acrosome was estimated using phase contrast microscope (1000X). The percentage of sperm with intact acrosomes was determined by counting approximately 200 sperms randomly from different fields.

Assessment of plasma membrane integrity

Hypo-osmotic swelling test (HOST) was used to assess the functional integrity of sperm membrane as per the procedure described by Kumar et al. [9]. HOST is a more accurate predictor of ability of spermatozoa to fertilize than super vital staining. The assay was conducted out by combining 100 μ L of the semen sample with 1 mL of the hypo-osmotic solution, which was made up of 1.351 g of fructose and 0.735 g of sodium citrate in 100 mL of distilled water. The sperm tail bending/coiling was evaluated by placing 15 μ L of thoroughly mixed sample on a warm slide (37°C)

and seeing it under light microscopy at 400x magnification. At least 200 spermatozoa were observed per slide. Sperm with coiled tail after incubation was considered having intact plasma membrane.

Statistical Analysis

The data were analyzed using the SPSS (Version 23) software package. Using one-way analysis of variance, the sperm quality parameters were compared in control and supplemented groups Duncan's multiple range tests were used to examine mean differences. Variation was deemed significant when $P \leq 0.05$. The values for all parameters were given as mean \pm standard error.

Results and Discussion

The effect of theophylline supplementation was evaluated on the spermatozoa characteristics in cattle bull semen stored at 37°C in the present study. Motile sperm concentration varied significantly in control and supplemented groups at 15 and 30 min of incubation (table 1). The percent motile sperms increased significantly in groups T-5 and T-10 at 15 min incubation. However, at 30 min incubation, the increase was non-significant in supplemented groups. Progressive motile sperms were significantly higher in groups T-5 and T-10 but observed highest in group T-10 as compared to control and others groups at 15 and 30 min incubation. Sperm abnormality parameters like bent tail, coiled tail, distal droplet, and distal mid-piece reflex varied non-significantly among all the groups at 15 and 30 min of incubation.

Table 1. Effect of supplementation of different concentrations of theophylline on sperm motility and sperm abnormalities after 15 and 30 min of incubation

Parameters	Incubation time, min	C	T-5	T-10	T-20	T-40	P value
Motile sperm, %	15	47.58 ^a \pm 4.53	62.50 ^{bc} \pm 2.96	67.28 ^c \pm 4.04	49.29 ^a \pm 3.59	55.25 ^{ab} \pm 4.79	0.003
	30	51.09 ^a \pm 3.39	60.15 ^{ab} \pm 3.63	63.35 ^b \pm 3.48	57.51 ^{ab} \pm 3.33	52.65 ^a \pm 2.76	0.062
Progressive motile sperm, %	15	34.17 ^a \pm 3.62	45.82 ^{bc} \pm 3.05	52.32 ^c \pm 4.05	33.70 ^a \pm 3.62	35.01 ^{ab} \pm 4.87	0.002
	30	35.15 ^a \pm 2.78	45.11 ^b \pm 3.99	46.11 ^b \pm 3.39	31.19 ^a \pm 2.70	38.89 ^{ab} \pm 2.73	0.005
Bent tail, %	15	0.29 \pm 0.09	0.35 \pm 0.19	0.14 \pm 0.05	0.56 \pm 0.31	0.39 \pm 0.15	0.587
	30	0.27 \pm 0.16	0.68 \pm 0.51	0.67 \pm 0.51	0.18 \pm 0.05	0.03 \pm 0.03	0.549
Coiled tail, %	15	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.07 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03	0.152
	30	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03	0.07 \pm 0.04	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.537
Distal droplet, %	15	0.07 \pm 0.04	0.03 \pm 0.03	0.01 \pm 0.01	0.11 \pm 0.05	0.07 \pm 0.05	0.446
	30	0.04 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.05	0.726
Distal midpiece reflex, %	15	6.44 \pm 0.89	4.82 \pm 0.68	4.47 \pm 0.47	4.00 \pm 0.39	5.63 \pm 0.70	0.077
	30	4.03 \pm 0.71	4.29 \pm 0.70	4.30 \pm 0.61	5.54 \pm 0.51	4.19 \pm 0.91	0.562

Note. Here and in the next tables Mean \pm SE values with different superscript in a row differ significantly ($P < 0.05$).

Groups: T-5 = Theophylline @ 5mM; T-10 = Theophylline @ 10 mM; T-20 = Theophylline @ 20 mM and T-40 = Theophylline @ 40 mM.

Absolute (Actual) kinematic parameters of CASA reflect the physical characteristics of cell movement, and these include distance average path (DAP), distance curvilinear (DCL), straight line velocity (DSL), lateral head amplitude (ALH), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL) and beat cross frequency (BCF). The results of absolute kinematic parameters of spermatozoa of control and supplemented groups are presented in table 2. ALH values at 15 min of incubation showed a non-significant increase in supplemented groups (group T-10 and T-20), however, at 30 min incubation, there was a significant increase in ALH values in groups T-5 and T-10. DAP and DCL values varied non-significantly at 15 min incubation and were ob-

served to increase significantly in groups supplemented with 5 and 10mM of theophylline as compared to control and other groups. DSL values increased in groups T-5 and T-10 significantly at 15 min incubation, but non-significantly at 30 min incubation. VAP of spermatozoa increased significantly in group T-10 at 15 min incubation and in groups T-5 and T-10 at 30 min incubation in comparison to control and other supplemented groups. VCL and VSL values showed higher values in group T-10 at 15 min incubation but significant increase in groups T-5 and T-10 at 30 min incubation. BCF of spermatozoa decreased significantly in all the supplemented groups, with the lowest BCF values in groups T-20 and T-40 at 30 min incubation as compared to control group (table 2).

Table 2. Effect of supplementation of different concentrations of theophylline on actual kinematic parameters of spermatozoa after 15 and 30 min of incubation

Parameter	Incubation time, min	C	T-5	T-10	T-20	T-40	P value
ALH, μm	15	9.39 \pm 0.67	9.05 \pm 0.52	10.11 \pm 0.64	10.06 \pm 0.62	8.83 \pm 0.87	0.567
	30	5.70 ^a \pm 0.25	8.54 ^c \pm 0.53	7.73 ^{bc} \pm 0.47	6.69 ^{ab} \pm 0.46	6.85 ^{ab} \pm 0.18	0.000
DAP, μm	15	25.98 \pm 1.26	27.20 \pm 1.19	28.25 \pm 1.31	24.28 \pm 1.50	23.95 \pm 1.60	0.141
	30	22.25 ^a \pm 1.35	27.77 ^c \pm 2.29	25.24 ^{bc} \pm 1.72	22.35 ^a \pm 1.56	21.51 ^a \pm 1.15	0.050
DCL, μm	15	50.24 \pm 3.49	52.02 \pm 2.78	55.91 \pm 2.96	50.88 \pm 3.89	49.61 \pm 4.17	0.729
	30	37.64 ^a \pm 1.98	51.48 ^b \pm 4.51	45.61 ^{ab} \pm 3.35	41.27 ^a \pm 3.16	38.35 ^a \pm 2.35	0.017
DSL, μm	15	20.31 ^{ab} \pm 0.85	21.70 ^b \pm 1.13	22.05 ^b \pm 1.16	17.34 ^a \pm 0.96	17.54 ^a \pm 1.03	0.002
	30	19.13 \pm 1.33	22.96 \pm 1.93	21.20 \pm 1.52	18.24 \pm 1.34	17.98 \pm 0.95	0.083
VAP, $\mu\text{m/s}$	15	105.19 ^b \pm 6.26	95.45 ^{ab} \pm 4.67	105.32 ^b \pm 6.31	94.05 ^{ab} \pm 7.46	79.71 ^a \pm 7.21	0.041
	30	75.06 ^a \pm 2.63	103.54 ^c \pm 8.43	93.80 ^{bc} \pm 6.60	71.53 ^a \pm 5.21	84.67 ^{ab} \pm 2.28	0.001
VCL, $\mu\text{m/s}$	15	200.81 \pm 14.54	180.86 \pm 10.90	204.19 \pm 12.97	189.47 \pm 15.45	161.11 \pm 16.04	0.209
	30	125.78 ^a \pm 4.45	190.53 ^c \pm 16.01	169.46 ^{bc} \pm 12.82	131.39 ^a \pm 10.43	148.06 ^{ab} \pm 3.93	0.000
VSL, $\mu\text{m/s}$	15	82.51 ^c \pm 4.33	75.37 ^{bc} \pm 3.31	81.62 ^c \pm 4.37	68.11 ^{ab} \pm 5.40	58.47 ^a \pm 4.43	0.001
	30	64.93 ^{ab} \pm 2.75	85.65 ^c \pm 7.03	78.90 ^{bc} \pm 5.61	58.29 ^a \pm 4.28	72.29 ^{abc} \pm 2.25	0.001
BCF, Hz	15	23.06 \pm 0.62	22.22 \pm 0.59	21.88 \pm 0.57	21.43 \pm 0.48	21.83 \pm 0.95	0.493
	30	27.29 ^b \pm 0.64	25.96 ^{ab} \pm 0.65	25.48 ^{ab} \pm 0.76	24.40 ^a \pm 0.67	25.18 ^a \pm 0.57	0.042

Table 3. Effect of supplementation of different concentrations of theophylline on relative kinematic parameters of spermatozoa after 15 and 30 min of incubation

Parameter	Incubation time, min	C	T-5	T-10	T-20	T-40	P value
WOB, %	15	56.25 \pm 1.97	57.35 \pm 1.77	54.07 \pm 1.15	52.04 \pm 1.00	54.32 \pm 2.60	0.271
	30	62.24 \pm 1.14	56.44 \pm 1.41	58.07 \pm 1.78	59.47 \pm 2.20	58.85 \pm 0.89	0.125
LIN, %	15	46.14 \pm 2.59	47.88 \pm 2.26	43.71 \pm 1.65	39.70 \pm 1.45	43.39 \pm 3.50	0.169
	30	54.79 \pm 1.70	47.58 \pm 1.87	49.95 \pm 2.24	50.84 \pm 2.82	50.78 \pm 1.34	0.184
STR, %	15	80.20 ^b \pm 1.71	81.58 ^b \pm 1.38	79.65 ^{ab} \pm 1.36	74.94 ^a \pm 1.55	77.33 ^{ab} \pm 2.17	0.051
	30	85.55 \pm 1.56	82.55 \pm 1.22	84.47 \pm 1.42	82.97 \pm 1.60	84.87 \pm 1.30	0.529

Relative (Derived) kinematic parameters of CASA reflect the pattern of sperm movement and are combinations of absolute parameters. These include Wobble (WOB = VAP/VCL), linearity (LIN = VSL/VCL) and straightness (STR = VSL/VAP). Wobble and Linearity showed non-significant variation among control and supplemented groups at 15- and 30-min incubation (table 3). Straightness values decreased significantly as the concentration of theophylline in semen extender increased

at 15 min of incubation but it showed non-significant variation among the control and all supplemented groups at 30 min incubation. Morphological parameters of spermatozoa were also evaluated, and results are reported in table 4. Spermatozoa with intact acrosome increased significantly in groups T-5 and T-10. Similarly, percent viability of spermatozoa and spermatozoa with intact plasma membrane showed a significant increase in group T-10 samples as compared to control and others groups.

Table 4. Effect of supplementation of different concentrations of theophylline on morphological parameters of spermatozoa after 15 and 30 min of incubation

Parameters	C	T-5	T-10	T-20	T-40	P value
Acrosome integrity, %	78.53 ^a ±1.26	80.47 ^{ab} ±1.31	84.33 ^b ±1.17	79.13 ^a ±1.66	77.73 ^a ±1.69	0.016
Livability, %	60.60 ^{ab} ±0.94	63.27 ^{bc} ±0.7	65.33 ^c ±1.61	61.40 ^{ab} ±1.35	59.27 ^a ±1.13	0.006
Plasma membrane integrity, %	59.80 ^a ±0.69	61.40 ^a ±1.28	65.80 ^b ±1.81	60.40 ^a ±1.64	59.73 ^a ±1.24	0.014

Motility, vitality rates and number of sperms are vital parameters in fertilization activity of sperms and play essential role in changing fertilization rate [6]. Supplementation of 1, 3-dimethylxanthine (Theophylline) at lower doses has significantly improved the motility and viability related parameters of spermatozoa in the present study. These findings are in agreement with the observations of other workers whom reported significant improvement in the motility characteristics (individual motility and progressive motility) of sperms after fortification of Murrah buffalo semen with theophylline at a concentration of 10 mM [4]. Similarly, significant increase was reported in sperm motility in human semen supplemented with 20 mM theophylline [1]. The possible reason for the improved motility values of spermatozoa recorded in T-10 group in the present study may be attributed to the reason that theophylline causes increment of cAMP inside the cell by inhibiting phosphodiesterase enzyme [2]. Increase in sperm intracellular cAMP plays a main role in glycolytic pathways of sperm [11], thus enhancing sperm fertility [5]. This increase in intracellular cAMP causes an increase sperm mitochondrial activity which plays a key role in providing energy for sperm motility [10]. The stimulating effect of dimethylxanthine induces amplitude of the motility of sperm more than 50% of control value [7]. Increased sperm viability and increased number of spermatozoa with intact acrosome and intact plasma membrane may be attributed to the reason that dimethylxanthine (theophylline) has a protective effect on sperm membranes, as it being oxygen radical scavengers and reducing the peroxidation of lipid and that prevents oxidative stress-induced DNA damage [14].

Based on the findings, it was concluded that supplementing semen extender with 1, 3-dimethylxanthine up to a concentration of 10 mM was beneficial in enhancing the

quality of the semen. However, in order to evaluate the fertility of semen, further research on *in vitro* and *in vivo* validation of supplemented semen is necessary.

References

1. Abbas HS, Mossa HA, Al-Anbari LA, Selman MO, Al-Zahawi BA. A stimulatory approach for *in vitro* activation of human sperm motility by using theophylline. *Int. J. Adv. Res.* 2018; 6 (4): 1128–1132. DOI: 10.21474/IJAR01/6961.
2. Vali A, Asilian A, Khoddami L, Shahtalebi M. Caffeine effect in treatment of psoriasis vulgaris. *Seasonal J. Skin Dis.* 2005; 181 (6): 465–462.
3. Anzar M, Farooq U, Mirza MA, Shahab M, Ahmad N. Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pakistan Vet. J.* 2003; 23 (3): 106–113. Available at: http://www.pvj.com.pk/pdf-files/23_3/106-113.pdf
4. Bishist R, Raina VS, Bhakat M, Mohanty TK, Lone SA, Sinha R. Effect of antioxidant additives on freezability of buffalo spermatozoa. *Buffalo Bull.* 2020; 39 (3): 337–344. Available at: <https://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/BufBu/article/view/908>
5. Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE, Krapf D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Mol. Basis Dis.* 2014; 1842 (12): 2610–2620. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.07.013.
6. Homonnai ZT, Paz G, Sofer A, Kraicer PF, Harell A. Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fert.* 1976; 21 (3): 162–170. PMID: 12119.
7. Hong CY, Chiang BN, Ku J, Wei YH, Fong JC. Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *British J. Clin. Pharmacol.* 1985; 19 (1): 45–49. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1985.tb02611.x.
8. Jewgenow K, Braun BC, Dehnhard M, Zahmel J, Goeritz F. Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Reprod. Dom. Anim.* 2017; 52 (S2): 18–23. DOI: 10.1111/rda.12836.
9. Kumar P, Kumar D, Sikka P, Singh P. Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative

- stress during cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 2015; 152: 26–31. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.11.015.
10. Li P, Li ZH, Dzzyuba B, Hulak M, Rodina M, Linhart O. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Biol. Reprod.* 2010; 83 (5): 852–858. DOI: 10.1095/biolreprod.110.085852.
11. Loughlin KR, Agarwal A. Use of theophylline to enhance sperm function. *Archiv. Androl.* 1992; 28 (2): 99–103. DOI: 10.3109/01485019208987686.
12. De Fátima Lucio C, de Souza Ramos Angrimani D, Brito MM, Vannucchi CI. Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. *J. Vet. Androl.* 2017; 2 (1). Available at: <https://www.ivis.org/library/journal-of-veterinary-andrology/journal-of-veterinary-andrology-vol-21-jan-jun-2017/oxidative-stress-challenges-during-sperm-cryopreservation-dogs>
13. Mason SJ. A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen. *Reprod. Dom. Anim.* 2017; 52 (S2): 275–280. DOI: 10.1111/rda.12864.
14. Okada H, Tatsumi N, Kanzaki M, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S. Formation of reaction oxygen species by spermatozoa from asthenozoospermic patients: response to treatment with pentoxifylline. *J. Urol.* 1997; 157 (6): 2140–2146. DOI: 10.1016/S0022-5347(01)64697-4.
15. Pankaj PK, Raina VS, Roy B, Mohanty TK, Mishra A. Effect of anti-oxidant preservative on cold protection ability of low grade riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *As. Australas. J. Anim. Sci.* 2009; 22 (5): 626–635. DOI: 10.5713/ajas.2009.70267.
16. Prapaiwan N, Tharasanit T, Punjachaipornpol S, Yamtang D, Roong-sitthichai A, Moonarmart W, Kaeket K, Manee-In S. Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. *As. Australas. J. Anim. Sci.* 2016; 29 (5): 646–651. DOI: 10.5713/ajas.15.0572.
17. Reddy NS, Mohanarao GJ, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 119 (3–4): 183–190. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.01.012.
18. Shah N, Singh V, Yadav HP, Verma M, Chauhan DS, Saxena A, Yadav S, Swain DK. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2017; 182: 111–122. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.05.006.
19. Singh GV, Kumar A, Sachan V, Agrawal JK, Saxena A. Effect of the addition of insulin like growth factor-I (IGF-I) on cryopreservation of Hariana bull semen. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 2020; 10 (4): 611–614. Available at: https://ijas.rasht.iau.ir/article_677970.html
20. Virmani M, Malik RK, Singh M, Patil CS, Singh P, Vijayalakshmy K. Enrichment of semen extender with *Syzygium aromaticum* extract: its impact on bull sperm preservation as an alternative to antibiotics. *Rum. Sci.* 2020; 9 (1): 63–68. Available at: <https://www.anandpub.com/archive-june-volume-2020-9-13>

Додавання 1,3-диметилксантину покращило параметри якості сперми бугаїв

Аміт Кумар¹, Мінакші Вірмані¹, Раджеш Кумар¹, Сударшан Кумар¹, Сартак¹, Аруші Канвар¹, Сандіп Кумар², Ч. Патіл³
virmanim2003@yahoo.com

¹Кафедра ветеринарної фізіології та біохімії, Коледж ветеринарних наук, Університет ветеринарії та тваринництва імені Лали Ладжпат Рай (LUVAS), Гісар, Хар'яна, 125001, Індія

²Кафедра ветеринарної гінекології та акушерства, Коледж ветеринарних наук, Університет ветеринарії та тваринництва імені Лали Ладжпат Рай (LUVAS), Гісар, Хар'яна, 125001, Індія

³Кафедра генетики та розведення тварин, Коледж ветеринарних наук, Університет ветеринарії та тваринництва імені Лали Ладжпат Рай (LUVAS), Гісар, Хар'яна, 125001, Індія

Метилксантини є унікальним класом препаратів, отриманих з пуринової основи ксантину, а 1,3-диметилксантин (теофілін) є найчастіше використовуваним метилксантином. Метою цього дослідження було вивчити вплив додавання 1,3-диметилксантину до розріджувача на рухливість сперматозоїдів і морфологічні параметри сперми. Загалом було зібрано 15 еякулятів сперми від трьох дорослих бугаїв. Кожен еякулят розділили на п'ять груп. У першій, контрольній групі (С) зразки розбавляли гліцеринним розріджувачем Tris яєчного жовтка, а до зразків інших 4 груп (Т-5, Т-10, Т-20 і Т-40) додавали 1,3-диметилксантин у дозі 5, 10, 20 і 40 мМ відповідно. Розведені зразки сперми інкубували за 37°C на водяній бані та оцінювали різні параметри сперми через 15 і 30 хв. інкубації. Рухливість сперматозоїдів, кінетичні параметри сперми та аномалії сперматозоїдів сперми всіх груп оцінювали за допомогою комп'ютерного аналізатора сперми (CASA). Також оцінювали морфологічні показники сперматозоїдів контрольної та дослідних груп. Результати показали, що додавання 1,3-диметилксантину призвело до значного збільшення концентрації рухомих сперматозоїдів, кінематичних параметрів, життєздатності сперматозоїдів, сперматозоїдів з інтактною плазматичною мембраною порівняно з іншими групами. Однак аномалії сперматозоїдів — загнутий або згорнутий хвіст, дистальний краплинний і центральний рефлекс — не відрізнялися в усіх групах. Тому можна зробити висновок, що додавання 1,3-диметилксантину (теофіліну) у концентрації 10 мМ до розріджувача покращує якість сперми.

Ключові слова: 1,3-диметилксантин (теофілін), сперма, розріджувач сперми, рухливість, CASA



Мікробіологічний моніторинг поширеності захворювання на мастити корів за мікробіологічними показниками досліджень молока у тваринницьких господарствах різних регіонів України за період 2018–2022 рр.

О. М. Чечет, О. І. Горбатюк, О. О. Пискун, І. В. Мусієць, М. Є. Романько,
Г. А. Бучковська, Н. В. Курята, Д. О. Ординська, Л. В. Шалімова,
Н. Я. Мех, Л. В. Баланчук, Л. В. Тогачинська, М. В. Кучинський
goroliva@ukr.net



Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

ORCID:

O. M. Chechet <https://orcid.org/0000-0001-5099-5577>
O. I. Gorbatiuk <https://orcid.org/0000-0002-0573-2089>
O. O. Pyskun <https://orcid.org/0000-0003-2777-368X>
I. V. Musiets <https://orcid.org/0000-0002-2456-560X>
M. Y. Romanko <https://orcid.org/0000-0003-0285-5603>
G. A. Buchkovska <https://orcid.org/0009-0007-4449-614X>
N. V. Kuriata <https://orcid.org/0000-0002-6958-1064>
D. O. Ordynska <https://orcid.org/0000-0003-3481-3248>
L. V. Chalimova <https://orcid.org/0000-0003-1159-7159>
N. Y. Mekh <https://orcid.org/0009-0006-9472-5054>
L. V. Balanchuk <https://orcid.org/0000-0003-0989-5886>
L. V. Togachynska <https://orcid.org/0009-0005-5032-5940>
M. V. Kuchynskyi <https://orcid.org/0009-0003-2652-3360>

Authors' Contributions:

COM: Project administration; Conceptualization; Methodology; Supervision.
HOI: Investigation; Data curation; Formal analysis.
POO: Data curation; Formal analysis; Writing — original draft.
MIV: Investigation; Data curation; Writing — original draft.
RMV: Investigation; Visualization.
BGA: Data curation; Formal analysis.
KNV: Data curation; Writing — original draft.
ODO: Investigation; Data curation; Visualization.
CLV: Data curation; Writing — original draft.
MNY: Investigation; Data curation; Visualization.
BLV: Data curation; Formal analysis.
TLV: Methodology; Investigation; Data curation.
KMV: Project administration; Supervision; Writing — review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

Not applicable.

Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Молоко та молочна продукція — один із найважливіших сировинних ресурсів, які відіграють життєво важливу роль у структурі харчування населення України. Безпечність і якість сирого молока є основою у виробництві молочних продуктів. З огляду на це, є необхідність проводити мікробіологічні дослідження зразків молока від корів для виявлення маститів. Актуальними є питання з визначення кількості соматичних клітин (КСК), бактеріальної забрудненості (БЗМ), бактерій групи кишкової палички (БГКП), кількісного видового складу патогенних мікроорганізмів, оскільки ці показники дають змогу оцінити епізоотичну ситуацію щодо поширеності маститів корів у тваринницьких господарствах різних регіонів України, встановити домінуючі етіологічні фактори, які спричиняють захворювання на мастити, прописати лікувально-профілактичні заходи для запобігання подальшому погіршенню ситуації. Результати наших мікробіологічних моніторингових досліджень щодо поширеності маститів корів показали динаміку до збільшення їх кількості, про що свідчило зростання КСК від 12,1% у 2018 р. до 41,5% у 2021 рр.; зростання показників БЗМ від 8,1 до 37,3% відповідно. За період з 2018 по 2021 рр. надмірне зростання кількості патогенних бактерій кокової групи, зокрема *Staphylococcus* spp. (80,0% від всіх ізолятів), *Streptococcus* spp. (28,1% відповідно), підтверджувало їх основну роль у формуванні зовнішніх і внутрішніх етіологічних факторів, які спричиняють ураження вимені у корів. За показниками кількості виділених БГКП простежили тенденцію до їх зменшення, що засвідчує зниження їхнього впливу на етіологічні фактори, які провокують виникнення маститів у корів. Результати випробувань за 2022 р. показали різке падіння доставки зразків молока для дослідження за мікробіологічними показниками, що пов'язане з впливом на тваринницьку галузь політичних, соціальних, економічних та інших чинників через військову агресію в Україні.

Ключові слова: молоко, мастит, соматичні клітини, бактеріальна забрудненість, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp.

Вступ

Підтримання продуктивності та конкуренто-спроможності молочної промисловості потребує великого обсягу молока та широкого асортименту молочних продуктів на продовольчому ринку. Відповідно до системи сталого виробництва, основними пріоритетами у молочній галузі є внесок у соціально-економічний розвиток регіону, якість добробуту тварин у молочному скотарстві, підтримання продуктивного здорового стада корів для отримання високоякісного молока. Глобальна відповідальність молочної промисловості, великих молочних ферм та дрібних виробників полягає у виробництві високоякісного молока та безпечної для людини і тварин молочної продукції, запобіганні поширенню інфекційних хвороб та харчовим отруєнням [1, 29, 30].

Одним із найпоширеніших та найдорожчих захворювань, які вражають молочну худобу в усьому світі, є мастити, які характеризуються запаленнями тканини молочної залози. Вони призводять до катастрофічних наслідків для молочної галузі кожної країни. За даними вчених і аналітиків, мастити великої рогатої худоби щорічно коштують молочної промисловості близько 2 мільярдів доларів у США, близько 794 мільйонів канадських доларів у Канаді, більше 168 мільйонів фунтів стерлінгів у Великобританії [21].

За даними Міжнародної молочної федерації, щорічно близько 25,0% корів хворіють на мастити, що завдає значно більших збитків молочному скотарству, ніж усі інші хвороби разом. Є дані про щорічну поширеність маститів у корів в країнах Європи, яка варіює від 8,0 до 48,0% [2].

Глобальні щорічні втрати від маститів становлять близько в 30 мільярдів євро через зниження загальної кількості надоїв, низьку якість молока, високу вартість лікування і ветеринарні витрати, утилізацію молока за лікування, збільшення об'єму робіт та передчасне вибракування тварин. Крім того, збитки знижують якість кінцевого продукту, промисловий вихід для виробництва похідних та зміну складу маститного молока [1, 4, 30].

Мастити виникають як наслідок дії на молочну залозу механічних, термічних, хімічних та біологічних факторів. На долю біологічного (мікробного) фактору припадає 85,0% усіх випадків маститу. Бактеріальні мастити спричинені коками (стрептококи, стафілококи, диплококи) та паличкоподібними формами бактерій (кишкова паличка, кориневі бактерії, клебсієли, ентеробактерії тощо). Одними з найпоширеніших патогенів інфекційних маститів є стрептококи і стафілококи, оскільки вони утворюють біоплівку, яка поліпшує захист, допомагає вижити в несприятливих умовах довкілля та знижує ефективність антибактеріальної терапії.

Мастити корів можуть бути клінічно вираженими та субклінічними. Субклінічні мастити найнебезпеч-

ніші, оскільки мають прихований (безсимптомний) перебіг без візуальних клінічних ознак та діагностуються лише за допомогою лабораторних методів.

В Україні мастити у корів є актуальною проблемою сьогодення, оскільки молоко тут є важливим продуктом харчування [6, 11].

У країнах ЄС метод підрахунку соматичних клітин (КСК) вважають найдієвішим для перевірки корів на субклінічні мастити за досліджень безпечності сирого молока та управління дійним стадом. В європейських країнах метод підрахунку кількості соматичних клітин використовують у двох напрямках: для управління конкретним молочним стадом та в державних програмах боротьби з маститами у корів для забезпечення виробництва безпечного та високоякісного молока. Соматичні клітини представлені клітинами з ядрами — лейкоцитами, моноцитами та епітеліальними клітинами [33].

Бактеріальна забрудненість (БЗ) є показником кількості мікроорганізмів у 1 см³ молока. Відомо, що на бактеріальне забруднення молока впливає багато чинників, пов'язаних із недотриманням санітарно-гігієнічних вимог, порушенням технологій доїння і зберігання молока. Але однією з основних, найчастіших і найважливіших причин є забруднення молока через вим'я, адже після доїння соскові канали залишаються відкритими до 20–25 хв, що робить вим'я доступним для заселення мікроорганізмами та через більш глибокі процеси у вимені уможливорює розвиток клінічного або субклінічного маститів [24].

Бактерії групи кишкової палички (БГКП) — *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. — спричиняють розвиток у корів маститів, зокрема токсичних. Особлива небезпека криється у тому, що представники БГКП здатні спричинити тяжкі отруєння людини [15, 31].

Етіологічний спектр збудників маститів у корів дуже різноманітний. Вчені наголошують, що нараховують понад 140 видів потенційних патогенів, здатних спричинити мастити в худоби молочного напрямку. За їхніми даними, найпоширенішими збудниками є патогенні стрептококи, деякі види коагулазонегативних стафілококів, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp. та інші [3, 10, 12, 16, 22, 27].

Мета нашої роботи — мікробіологічний моніторинг проведених досліджень зразків молока від корів на території України за період з 2018 по 2022 рр., характеристика основних тенденцій щодо виявлення маститів у корів за показниками КСК, БЗМ, БГКП, патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Дослідження проведено в умовах лабораторії захворювань бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу (ЛЗБЕ НДБВ)

Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ), м. Київ.

За мікробіологічними дослідженнями визначено показники: кількість соматичних клітин (КСК), бактеріальну забрудненість молока (БЗМ), бактерії групи кишкової палички (БГКП), патогенні мікроорганізми (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp.) [7, 8, 17, 18, 26].

Згідно з чинною нормативною документацією, сире молоко від корів не повинно містити патогенних мікроорганізмів, зокрема бактерій *S. aureus* (в 0,1 см³), *L. monocytogenes* (у 25,0 см³), бактерій роду *Salmonella* (у 25,0 см³).

За вивчення, систематизації та аналізу річних звітів регіональних лабораторій Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (ДСУПБХПЗС) та ДНДІЛДВСЕ (м. Київ) проведено мікробіологічний моніторинг досліджень зразків молока за показниками КСК, БЗМ, БГКП, патогенних мікроорганізмів для виявлення маститів у корів із господарств різних областей України за період 2018–2022 рр. Дані наведені без урахування окупованої території АР Крим та частини тимчасово окупованих територій Донецької та Луганської обл.

Методи досліджень — мікроскопічні, культуральні, біохімічні, біологічні, статистичні.

Результати досліджень

Аналіз результатів досліджень показав, що протягом 2018–2022 рр. для мікробіологічних досліджень надійшло 224547 проб молока від корів, із яких 5505 зразків (2,5% до досліджених) мали позитивні результати.

За аналізом результатів досліджень встановлено, що найбільший обсяг досліджень проведено у 2018 р. — 65172 зразків молока від корів. Проте результат щодо позитивних випадків складав близько 2,1% від доставлених проб та зберігався на такому ж рівні у наступному 2019 р. — 2,0%.

Кількість позитивних результатів серед усіх зразків молока свідчить, що найбільша напруженість епізоотичної ситуації щодо захворювання у корів була характерною для 2020 і 2021 рр., оскільки в цей період було зареєстровано, відповідно, 3,0 та 3,5% непридатного для вживання молока серед усіх доставлених для досліджень зразків. Це засвідчує позитивну динаміку щодо зростання показників з позитивними результатами в означений досліджуваний період. Проте у 2022 р. загальна кількість виявлених зразків маститного молока знизилася до рівня близько 2,0%, що було пов'язане зі станом тваринництва в Україні через військову агресію.

Аналізуючи одержані дані, ми простежували тенденцію до кількісного зменшення надходжень зразків молока корів для його перевірки на наявність маститів у дійних стадах господарств. Політична, соціальна, економічна, епізоотична, епідеміологічна ситуація в Україні протягом досліджуваного періоду, ймовірно, впливала на загальну тенденцію щодо зниження кількісних об'ємів доставки зразків молока через зменшення загального поголів'я великої рогатої худоби і дійного стада зокрема у тваринницьких господарствах різних регіонів України, також як наслідок епідемії COVID-19 та введення воєнного стану на території держави через військову агресію.

За період 2018–2022 рр. серед тваринницьких господарств України найбільші об'єми молока на виявлення маститів у корів доставлено із Полтавської обл. — від 12398 зразків у 2018 р. до 7371 зразка у 2022 р. У господарствах цього регіону протягом 2018–2021 рр. кількість позитивних зразків непридатного до вживання молока коливалася в межах від 2,5 до 4,5% від доставлених проб. У 2022 р. позитивні показники на мастити становили лише 1,4% від усіх досліджених, оскільки майже вдвічі зменшилася кількість доставлених зразків молока.

Серед інших областей України, які у значних об'ємах досліджували молоко корів на виявлення маститів, — Рівненська, Луганська, Кіровоградська, Тернопільська, Сумська та Житомирська. Показники ураженості маститами поголів'я дійного стада варіювали в межах від 0,1 до 4,0–5,0% проб молока з усіх доставлених для досліджень.

Варто зауважити, що у деяких випадках позитивні результати були надто високими. Зокрема, у тваринницьких господарствах Миколаївської та Чернівецької обл. серед доставлених проб виявлено понад 50,0% непридатного молока через мастити, але при цьому для досліджень було скеровано невелику кількість зразків — ймовірно, лише від тих корів, які мали підозру на мастити (табл. 1).

Збільшення кількості соматичних клітин у зразках молока від корів дають підозри щодо розвитку клінічного або субклінічного маститів. За досліджуваний період в середньому із 85578 зразків молока, дослідженого на КСК, виявлено 1,0% позитивних проб зі збільшеним вмістом соматичних клітин серед досліджених, що вказувало на вибракування такої кількості сировини та засвідчувало підозру про ймовірний розвиток маститів у корів. Найвищі показники КСК спостерігали у корів із тваринницьких господарств Кіровоградської (3,8% від досліджених), Рівненської (1,4%), Полтавської (1,3%), Харківської (0,5%), Тернопільської обл. (0,2%) відповідно. У пробах молока від корів із господарств інших регіонів України означені показники були незначними, але підтверджували існування проблеми щодо розвитку маститів у корів, необхідності лікування тварин або їх вибракування (табл. 2).

Таблиця 1. Кількісні дослідження зразків молока на виявлення маститів у корів із господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр.
Table 1. Quantitative studies of milk samples for the detection of mastitis in cows from farms in different regions of Ukraine for the period 2018–2022

Область Region	2018			2019			2020			2021			2022		
	Загальна кількість Total number	Виявлено позитивних Positive	% від досліджених % of analyzed	Загальна кількість Total number	Виявлено позитивних Positive	% від досліджених % of analyzed	Загальна кількість Total number	Виявлено позитивних Positive	% від досліджених % of analyzed	Загальна кількість Total number	Виявлено позитивних Positive	% від досліджених % of analyzed	Загальна кількість Total number	Виявлено позитивних Positive	% від досліджених % of analyzed
Вінницька / Vinnytsia	912	110	12,1	436	30	6,9	314	41	13,4	206	11	5,3	171	5	2,9
Волинська / Volyn	76	9	11,8	958	0	0	0	0	0	0	0	0	535	0	0
Дніпропетровська / Dnipropetrovsk	1073	6	0,6	702	10	1,4	294	14	4,8	301	9	3,0	20	3	15,0
Донецька / Donetsk	603	17	2,8	405	15	3,7	17	9	52,9	69	9	13,0	0	0	0
Житомирська / Zhytomyr	4208	23	0,6	5173	12	0,2	3249	26	0,8	4180	9	0,2	2715	0	0
Закарпатська / Transcarpathian	2437	15	0,6	1502	24	1,6	792	0	0	449	0	0	193	0	0
Запорізька / Zaporizhzhia	494	24	4,9	541	5	0,9	349	3	0,9	237	1	0,4	0	0	0
Івано-Франківська / Ivano-Frankivsk	80	8	10,0	67	0	0	1	1	100,0	0	0	0	0	0	0
Київська / Kyiv	2230	252	11,3	1678	171	10,2	1583	28	1,8	6	3	50,0	729	10	1,4
Кіровоградська / Kirovohrad	5058	134	2,7	4672	22	0,5	4484	10	0,2	3168	498	15,7	1944	248	12,8
Луганська / Luhansk	6087	237	3,9	4067	170	4,2	1972	141	7,2	4206	160	3,8	0	0	0
Львівська / Lviv	0	0	0	8540	41	0,5	0	0	0	0	0	0	1150	0	0
Миколаївська / Mykolayiv	13	6	46,2	15	2	13,3	5	1	20,0	5	1	20,0	0	0	0
Одеська / Odesa	3543	42	1,2	127	14	11,0	17	0	0	11	3	27,3	14	1	7,1
Полтавська / Poltava	12398	314	2,5	11959	308	2,6	12232	554	4,5	10877	470	4,3	7371	103	1,4
Рівненська / Rivne	7305	17	0,2	3241	41	1,3	2325	59	2,5	2473	24	1,0	2642	36	1,4
Сумська / Sumy	4912	72	1,5	176	52	29,5	114	54	47,4	72	29	40,3	0	0	0
Тернопільська / Ternopil	6383	4	0,1	4754	8	0,2	4445	32	0,7	4333	28	0,7	5033	16	0,3
Харківська / Kharkiv	1558	20	1,3	1637	59	3,6	1000	40	4,0	4489	47	1,1	774	19	2,5
Херсонська / Kherson	14	0	0	5	0	0	27	4	14,8	7	0	0	0	0	0
Хмельницька / Khmelnytsk	1842	20	1,1	5	0	0	9	1	11,1	7	5	71,4	2	2	100,0
Черкаська / Cherkasy	781	21	2,7	1635	79	4,8	4158	124	3,0	1814	45	2,5	1897	28	1,5
Чернігівська / Chernihiv	3132	29	0,9	2450	20	0,8	1992	16	0,8	1713	4	0,2	1395	26	1,9
Чернівецька / Chernivtsi	33	13	39,4	4	3	75,0	39	15	0,4	0	0	0	0	0	0
Всього / Total	65172	1393	2,1	54749	1086	2,0	39418	1173	3,0	38623	1356	3,5	26585	497	1,9

Таблиця 2. Мікробіологічні показники досліджень на виявлення маститів та мікробіологічної стабільності зразків молока у корів з тваринницьких господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр.
Table 2. Microbiological indicators of research on the detection of mastitis and microbiological stability of milk samples from cows from livestock farms in different regions of Ukraine for the period 2018–2022

Область Region	Кількість соматичних клітин (КСК) Somatic cells number (SCN)		Бактеріальна забрудненість молока (БЗМ) Milk bacterial pollution (MBP)		Бактерії групи кишкової палички (БГКП) <i>Escherichia coli</i> bacteria (ECB)		<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Streptococcus</i> spp.		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.	
	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive	Загальна кількість Total number	Позитивних проб Positive
Вінницька / Vinnytsia	428	0	298	0	313	22	402	168	360	7	0	0	238	0	0	0
Волинська / Volyn	479	0	1009	0	19	3	24	2	19	4	0	0	19	0	0	0
Дніпропетровська / Dnipropetrovsk	0	0	0	0	787	8	787	27	786	4	0	0	15	0	0	0
Донецька / Donetsk	81	2	440	0	249	0	306	48	18	0	0	0	0	0	0	0
Житомирська / Zhytomyr	9001	7	10361	0	48	13	62	46	53	4	0	0	0	0	0	0
Закарпатська / Transcarpathian	1720	8	1288	8	1288	15	700	8	210	0	0	0	0	0	167	0
Запорізька / Zaporizhzhia	0	0	0	0	418	19	410	13	390	1	0	0	241	0	161	0
Івано-Франківська / Ivano-Frankivsk	0	0	6	0	15	5	62	1	65	3	0	0	0	0	0	0
Київська / Kyiv	2107	0	1534	0	807	91	1028	336	742	29	0	0	8	8	0	0
Кіровоградська / Kirovohrad	9663	366	9663	546	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
Луганська / Luhansk	1188	6	4138	0	3430	422	3562	205	3503	75	206	0	305	0	0	0
Львівська / Lviv	786	0	3166	26	2618	0	1473	10	1473	5	0	0	0	0	6	0
Миколаївська / Mykolayiv	0	0	0	0	7	2	9	2	8	5	0	0	7	0	0	0
Одеська / Odesa	199	10	92	0	302	20	1536	14	1529	8	14	0	28	4	0	0
Полтавська / Poltava	22536	298	28135	851	184	5	2047	261	1930	332	2	0	2	2	0	0
Рівненська / Rivne	8958	128	8922	40	5	1	3	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Сумська / Sumy	2356	1	2340	9	150	4	265	161	162	31	1	1	0	0	0	0
Тернопільська / Ternopil	11691	24	11808	41	233	2	65	15	59	0	121	6	58	0	0	0
Харківська / Kharkiv	5695	27	1388	14	798	13	752	72	725	59	0	0	100	0	0	0
Херсонська / Kherson	0	0	0	0	10	3	13	1	15	0	0	0	10	0	0	0
Хмельницька / Khmelnytsk	1798	2	0	0	26	1	34	25	5	0	0	0	2	0	0	0
Черкаська / Cherkasy	2653	4	6905	130	172	14	274	93	173	24	2	0	48	0	0	0
Чернігівська / Chernihiv	4239	0	2967	0	1100	9	1011	54	925	28	68	0	53	0	0	0
Чернівецька / Chernivtsi	0	0	0	0	25	9	25	15	26	7	0	0	0	0	0	0
Всього / Total	85578	883	90760	1665	13004	681	14850	1579	13178	626	414	7	1136	15	334	0
% позитивних / % of positive	1,0		1,8		5,2		10,6		4,8		1,7		1,3		0	

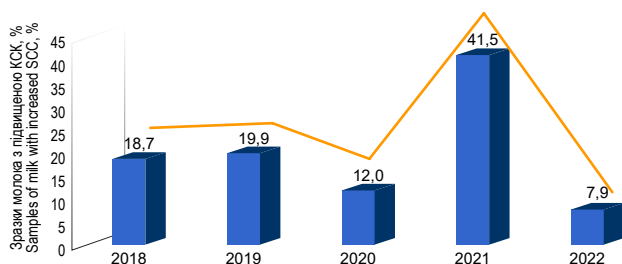


Рис. 1. Динаміка показників підвищеного вмісту соматичних клітин у зразках молока за досліджень на виявлення маститів у корів за період 2018–2022 рр.
Fig. 1. Dynamics of somatic cells increased content indicators in milk samples studied for the mastitis detection in cows during 2018–2022

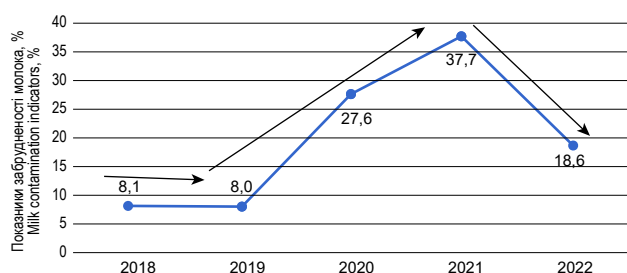


Рис. 2. Варіаційні коливання показників бактеріальної забрудненості молока від корів із господарств різних регіонів України протягом 2018–2022 рр.
Fig. 2. Bacterial contamination indicators variational fluctuations in cow milk from farms located in different regions of Ukraine during 2018–2022

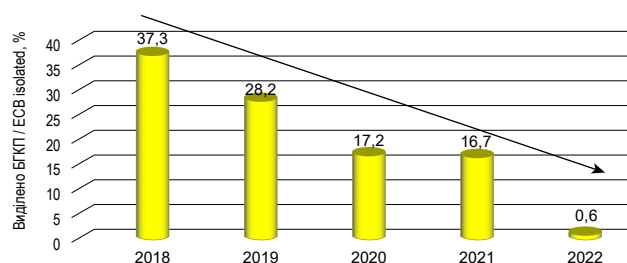


Рис. 3. Динаміка середніх показників виділення БГКП у зразках молока від корів із господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр.
Fig. 3. The E. coli isolation average dynamics in cow milk samples from farms located in different regions of Ukraine during 2018–2022

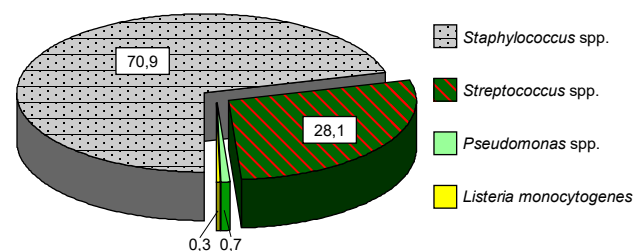


Рис. 4. Видовий склад та частки випадків виділення патогенних мікроорганізмів у зразках молока від корів із господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр.
Fig. 4. Species composition and the pathogenic microorganisms isolation cases fraction in cow milk samples from farms located in different regions of Ukraine during 2018–2022

Як показав аналіз результатів досліджень за період 2018–2022 рр., саме з 2018 по 2020 рр. показники КСК варіювали в межах 12,0–20,0 %. Піковим щодо виявлення маститів у корів був 2021 р., коли кількість позитивних результатів сягала 41,5%, хоча об'єм доставлених на дослідження зразків молока був значно меншим порівняно з попередніми роками. Це створювало ймовірну загрозу зростання кількості хворих на мастити корів у тваринницьких господарствах України, потреби їх лікування, вибракування сировини, погіршення якості продукції, небезпеку для здоров'я людини і тварин. Різке зниження виявлених позитивних випадків зі збільшеним рівнем соматичних клітин у пробах молока спостерігалося у 2022 р., але це пов'язано зі зменшенням понад удвічі доставок проб молока на дослідження (рис. 1).

Якість і безпечність молока засвідчують показники бактеріальної забрудненості молока (БЗМ), за якими визначають кількість мікроорганізмів (мезофільних аеробних і факультативно анаеробних) в 1 см³ молока. Дослідження середніх показників бактеріальної забрудненості молока за період 2018–2022 рр. показали, що серед 90760 доставлених зразків молока було виявлено 1665 проб з високою бактеріальною забрудненістю, яка становила 1,8% та свідчила про ймовірну наявність маститів у корів (рис. 2). За результатами досліджень щорічних даних щодо високих рівнів бактеріальної забрудненості молока виявлено варіаційні коливання показників БЗМ в межах від 8,0 до 8,1% від досліджених зразків. З 2021 р. спостерігали тенденцію до зростання показників підвищеного рівня БЗМ в 3,5 раза порівняно з попередніми роками. Пік показників БЗМ від корів виявлено у 2021 р. — 37,7% від досліджених, що свідчить про зростання небезпеки для людини і тварин через виробництво неякісного молока та ймовірне погіршення епізоотичної ситуації щодо розвитку маститів у корів. В 2022 р. позитивних результатів виявлено удвічі менше порівняно з попереднім, «піковим» роком. Проте це пов'язане з доставкою на дослідження незначних об'ємів проб молока через ймовірне зменшення чисельності дійного стада корів в Україні внаслідок військової агресії та введення воєнного стану у державі.

Наявність БГКП у зразках молока слугує надійним сигналом щодо розвитку маститів у корів. За аналізом результатів перевірки зразків молока від корів дійного стада впродовж 2018–2022 рр. та порівняння щорічних середніх показників, спостерегли тенденцію до зменшення кількості виділення БГКП та чітку позитивну динаміку поліпшення епізоотичної ситуації із колиформними бактеріями, які є однією з причин розвитку маститів (рис. 3). Ймовірно, таку сприятливу ситуацію зі зменшенням кількості позитивних результатів частково можна пояснити зменшенням об'ємів доставлених проб молока, оскільки за проведеним аналізом досліджень спостерігали таку тенденцію. За дослідний період найбільшу кількість БГКП виділено в тваринницьких господарствах північно-західного регіону України: зокрема в Чернігівській обл., де позитивні показники БГКП

сягали понад 36,0%, та Житомирській, де було 27,1% позитивних результатів. Варіації показників від 11,0 до понад 16,0% щодо кількості позитивних випадків БГКП були виявлені у Київській, Луганській, Харківській обл.

Мастити в корів завжди супроводжуються запаленнями, причиною яких є патогенні мікроорганізми. За нашими результатами досліджень було встановлено, що за період 2018–2022 рр. серед виділених збудників основну роль відігравала кокова інфекція (рис. 4). Зокрема найбільшу частку серед виділених із проб молока збудників становили бактерії видів *Staphylococcus* (70,9%) та *Streptococcus* (28,1%) відповідно. За дослідний період випадки виділення збудників *Pseudomonas* spp. склали 0,7%, *L. monocytogenes* — 0,3% відповідно серед виділених патогенів. Протягом 2018–2022 рр. жодного разу не виявлено збудників *Salmonella* spp.

Обговорення

Як наголошують науковці, практичні лікарі ветеринарної медицини та виробники молока і молочної продукції, мастити великої рогатої худоби є однією з найпоширеніших глобальних хвороб у світовій тваринницькій галузі, які не лише створюють загрозу здоров'ю людини і тварин, але й завдають колосальних збитків для підприємств і господарств різної форми власності [6, 11, 19].

КСК є показником для оцінки здоров'я вимені, а також гігієнічної якості молока, який використовують в усіх країнах світу. Високий рівень соматичних клітин у сирому молоці вказує на мікробне запалення молочної залози, що у подальшому має негативні наслідки щодо якості молока і молочної продукції [13, 23, 25, 29].

Результати проведеного нами аналізу рівня КСК за період 2018–2022 рр. показали, що в Україні цей показник був високим і зростав до 2021 р. Лише у 2022 р. спостерігався різкий спад — ймовірно, пов'язаний зі зменшенням кількості доставки проб молока для випробувань через військову агресію щодо України.

Відомо, що бактерії змінюють властивості молока. В альвеолах здорової корови утворюється стерильне молоко, в якому наявні лише молочнокислі бактерії від 10–50 тис. КУО/см³ (60,0–70,0% молока). У протоках і цистерні вимені їхня кількість сягає 10 тис. КУО/см³ (29,9–39,9% молока). У цистерні дійок бактерій значно більше — до 10 млн. КУО/см³. Це природний процес і таке молоко є практично стерильним. Науковці констатують факт, що підвищена бактеріальна забрудненість виникає внаслідок запальних процесів у вимені або через недотримання правил гігієни під час виробництва молока чи його зберігання [28, 32].

За одержаними результатами наших досліджень, рівень БЗМ у зразках від корів в Україні за період 2018–2022 рр. підтверджував небезпеку, пов'язану зі зростанням захворюваності на різні види маститів включно до 2021 р. У 2022 р. спостерігався різкий спад — ймовірно, пов'язаний зі згадуваними раніше причинами.

Дані зарубіжних науковців засвідчують, що в розвитку запальних процесів у вимені важливою є наявність грампозитивних і грамнегативних бактерій, які набули стабільного характеру. Науковці наводять дані, що за результатами досліджень у Скандинавії, Швейцарії, Великобританії та Огайо (США) домінують грампозитивні коки. При цьому визначають і коліформні види бактерій у 10,0–20,0% клінічних випадків [12, 32].

Щодо важливих етіологічних агентів, які провокують мастити в жуйних, за проведеним оглядом з поширеності різних видів бактерій у всьому світі було встановлено, що *Staphylococcus* spp. є одним зі збудників, які найчастіше виявляють у випадках інтрамаммарної інфекції в молочних стадах [4, 6, 21].

Результати наших досліджень співпадають із результатами інших науковців, оскільки виявлена у зразках молока стафілококова інфекція становила 70,9% від усіх виділених патогенів та до 2021 р. включно мала динамічне зростання показників.

Streptococcus spp. — це друга група мікроорганізмів, що є одним із етіологічних чинників маститу. У більшості стад *Streptococcus agalactiae* і *Streptococcus uberis* є основними ізолюваними видами. Відомо, що *S. agalactiae* залишається одним із найпоширеніших інфекційних збудників у багатьох молочних регіонах світу. Зокрема в Бразилії, Китаї, Таїланді, Колумбії повідомляють про поширеність на рівні до 60,0% молочного стада. У Данії повідомили, що інтрамаммарні інфекції, спричинені *S. agalactiae*, пов'язані з високим рівнем КСК (середнє геометричне — 1 129 тис./см³ на рівні чверті), зниженням продуктивності молока (від 1,6 до 4,5 кг/корову на добу) і повторними епізодами клінічного маститу [9, 28].

Відомо, що *S. uberis* є важливим агентом субклінічних інфекцій і клінічних епізодів маститу великої рогатої худоби в усьому світі і спричиняє виникнення близько 5,0–17,0% клінічних маститів, які вражають молочних корів протягом періоду лактації [27].

Результати наших досліджень за період 2018–2022 рр. щодо рівня ураженості вимені корів збудниками *Streptococcus* spp. показали, що ураженість була достатньо високою і становила 28,1% від усіх випадків ураження молочної залози бактеріальними патогенами, що співпадає з даними інших вітчизняних та іноземних науковців.

За даними зарубіжних вчених, молочна худоба є резервуаром різних видів *Salmonella* spp., а інфікована тварина часто є безсимптомним носієм, який важко ідентифікувати, оскільки поширеність *Salmonella* spp. коливається в сезонні періоди у зразках молока [15, 20]. За нашими даними, в Україні за період 2018–2022 рр. *Salmonella* spp. не виділяли.

Стало відомо, що у деяких країнах США та Швейцарії були зафіксовані спалахи лістеріозу, пов'язані з вживанням молока та молочної продукції. Виділення *L. monocytogenes* зі зразків сирого молока, проведені в Європі, показали, що від 2,5 до 6,0% проб можуть бути контаміновані цією бактерією [10, 12, 16].

За аналізом наших досліджень, за період 2018–2022 рр. у зразках молока від корів дійного стада збудник *L. monocytogenes* було виділено у 0,3% випадків серед усіх одержаних позитивних результатів, що засвідчує незначну порівняно з країнами Європи зараженість цим зоонозним збудником.

Наразі одержаний величезний масив наукових даних, які детально характеризують молекулярні механізми вірулентності представників роду *Pseudomonas* та реалізації патогенезу синьогнійної інфекції. *Pseudomonas* spp. є потенційним умовно-патогенним мікроорганізмом, здатним провокувати інфекційне запалення через набір власних біологічних компонентів, які виконують функцію факторів патогенності, призводять до пошкодження тканин і забезпечують виживаність збудника. Фактори патогенності — адгезія, інвазія в випадках дисемінації і персистенції, а також пряма інтоксикація та забезпечення усунення від імунної відповіді — діють на всіх етапах розвитку інфекційного процесу, зокрема і за розвитку маститів [3]. Оскільки *Pseudomonas* spp. проявляє високу вірулентність, то розвиток спровокованих нею маститів у корів здебільшого пов'язаний із впливом факторів зовнішнього середовища. Саме за порушення норм і санітарно-гігієнічних вимог можливе проникнення у молочні канали вимені збудників роду *Pseudomonas*, які спричиняють запалення молочної залози [5, 14]. Дані інших науковців і дослідників логічно узгоджуються з результатами наших аналізів щодо досліджень зразків молока на присутність збудників *Pseudomonas* spp. за період 2018–2022 рр., оскільки ураженість збудниками становила 0,7% від одержаних позитивних результатів. Це викликає занепокоєність щодо подальшого поширення псевдомонадної інфекції, оскільки у країнах Європи виділення такої інфекції у зразках молока — явище дуже рідкісне [22]. Результати проведеного нами мікробіологічного моніторингу зразків молока від корів для виявлення маститів підтверджують серйозність означеної проблеми в Україні.

Отже, виявлено 2,5% позитивних результатів серед зразків дослідженого молока від корів із тваринницьких господарств різних регіонів України за період 2018–2022 рр. Простежили динаміку щорічного зростання показників з позитивними результатами з 2018 по 2021 рр. включно та зменшення їх кількості у 2022 р., пов'язане зі станом тваринницької галузі в Україні через військову агресію. Найбільші об'єми молока досліджено в господарствах Полтавської, Рівненської, Луганської, Кіровоградської, Тернопільської, Сумської, Житомирської обл. Найбільшу ураженість щодо захворювань на мастити спостерігали в корів з господарств Миколаївської і Чернівецької обл. — понад 50,0% позитивних результатів.

Зростало варіювання показників з підвищенням вмістом КСК від 12,0% до 19,9% за період 2018–2020 рр. з піком 41,5% у 2021 р. та різким їх зменшенням у понад у 5 разів у 2022 р.

Виявлено позитивну динаміку зростання показників БЗМ від 8,1% до 37,3% за період 2018–2021 р.,

що підвищує небезпеку збільшення випадків маститу бактеріальної етіології. В 2022 р. спостерігали різкий спад кількості досліджуваних показників.

Виявлена за період 2018–2022 рр. тенденція до зменшення кількості позитивних випадків визначення БГКП у досліджених зразках молока від корів із тваринницьких господарств різних регіонів України свідчить про зменшення ролі колиформних бактерій в етіології розвитку маститів у корів.

За результатами випробувань проб молока від корів із тваринницьких господарств різних регіонів України встановлено, що серед виділених патогенних збудників маститу основну роль відігравала кокова інфекція. Зокрема, бактерії видів *Staphylococcus* ізолювано у 70,9%; *Streptococcus* — у 28,1% випадків; бактерії родів *Pseudomonas* spp. — у 0,7% та *L. monocytogenes* — у 0,3% випадків. Протягом 2018–2022 рр. збудників *Salmonella* spp. не виділяли.

Джерела

1. Bonestroo J, Fall N, Hogeveen H, Emanuelson U, Klaas IC, Voort M. The costs of chronic mastitis: A simulation study of an automatic milking system farm. *Prevent. Vet. Med.* 2023; 210: 105799. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105799.
2. Chen H, Weersink A, Kelton D, Massow M. Estimating milk loss based on somatic cell count at the cow and herd level. *J. Dairy Sci.* 2021; 104 (7): 7919–7931. DOI: 10.3168/jds.2020-18517.
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007; 67 (3): 351–368. DOI: 10.2165/00003495-200767030-00003.
4. Eleodoro JI, Fagnani R. Etiological agents and bacterial sensitivity in subclinical mastitis in Brazil: a ten-year systematic review. *Vet. Ital.* 2022; 58 (4): 2601. DOI: 10.12834/VetIt.2601.17023.2.
5. Giltner CL, Van Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, Irvin RT. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol. Microbiol.* 2006; 59 (4): 1083–1096. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.05002.x.
6. Guzmán-Luna P, Nag R, Martínez I, Mauricio-Iglesias M, Hospido A, Cummins E. Quantifying current and future raw milk losses due to bovine mastitis on European dairy farms under climate change scenarios. *Science Total Environ.* 2022; 833: 155149. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155149.
7. Harkavenko TO, Lototskyi VV, Bergilevich OM, Kasyanchuk VV, Kozyska TG, & Dyachenko TO. Counting of somatic cells in the udder secretion of individual cows and collected raw milk by the microscopic method, determination of the geometric mean. The methodological recommendations. Kyiv, SSRILDVSE, 2021; 80 p. (in Ukrainian)
8. ISO 13366-1:2008. Milk. Enumeration of somatic cell. Part 1: Microscopic method (Reference method). Available at: <https://www.iso.org/standard/40259.html>
9. Jones GM, Pearson RE, Clabaugh GA, Heald CW. Relationships between somatic cell counts and milk production. *J. Dairy Sci.* 1984; 67 (8): 1823–1831. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81510-6.
10. Kasalica A, Vuković V, Vranješ A, Memiši N. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2011; 27 (3): 1067–1082. DOI: 10.2298/BAH1103067K.
11. Kejnova Rysova L, Duchacek J, Legarova V, Gasparik M, Sebova A, Hermanova S, Codl R, Pytlík J, Stadnik L, Nejeschlebova H. Dynamics of milk parameters of quarter samples before and after the dry period on Czech farms. *Animals.* 2023; 13 (4): 712. DOI: 10.3390/ani13040712.
12. Lee SHI, Cappato LP, Guimarães JT, Balthazar CF, Rocha RS, Franco LT, da Cruz AG, Corassin CH, de Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes* in milk: Occurrence and recent advances in methods for inactivation. *Beverages.* 2019; 5 (1): 14. DOI: 10.3390/beverages5010014.

13. Li W, Liao S, Tsou C. A novel sensing chip with dual-coil inductance for determining raw milk quality. *Sensor. Actuat. A: Phys.* 2016; 241: 96–103. DOI: 10.1016/j.sna.2016.01.035.
14. Lin H, Shavezipur M, Yousef A, Maleky F. Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. *J. Dairy Sci.* 2016; 99 (3): 1822–1830. DOI: 10.3168/jds.2015-10179.
15. Murinda SE, Nguyen LT, Nam HM, Almeida RA, Headrick SJ, Oliver SP. Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathogen. Disease.* 2004; 1 (2): 97–104. DOI: 10.1089/153531404323143611.
16. Nero LA, De Mattos MR, M. De Aguiar Ferreira Barros, Ortolani MBN, Beloti V, De Melo Franco BDG. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonos. Publ. Health.* 2008; 55 (6): 299–305. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x.
17. Order of the Ministry of Agrarian and Food Policy of Ukraine No. 118 from March 12, 2019. On Approval of the Requirements for the Milk and Dairy Products Safety and Quality. Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0593-19#n23> (in Ukrainian)
18. Order of the Ministry of Agrarian and Food Policy of Ukraine No. 595 from August 22, 2022 On Amendments to the Order of the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine from March 12, 2019 No. 118. Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1077-22#Text> (in Ukrainian)
19. Pakrashi A, Ryan C, Guéret C, Berry DP, Corcoran M, Keane MT, Mac Namee B. Early detection of subclinical mastitis in lactating dairy cows using cow-level features. *J. Dairy Sci.* 2023; 106 (7): 4978–4990. DOI: 10.3168/jds.2022-22803.
20. Pangloli P, Dje Y, Ahmed O, Doane CA, Oliver SP, Draughon FA. Seasonal incidence and molecular characterization of *Salmonella* from dairy cows, calves, and farm environment. *Foodborne Pathogen. Disease.* 2008; 5 (1): 87–96. DOI: 10.1089/fpd.2008.0048.
21. Park S, Jung D, Altshuler I, Kruban D, Dufour S, Ronholm J. A longitudinal census of the bacterial community in raw milk correlated with *Staphylococcus aureus* clinical mastitis infections in dairy cattle. *Anim. Microbiome.* 2022; 4 (1): 59. DOI: 10.1186/s42523-022-00211-x.
22. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2007; 297 (5): 277–295. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.03.012.
23. Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Seydlová R, Dragounová H, Švejcárová M, Peroutková J, Elich O. Somatic cell count in goat milk: an indirect quality indicator. *Foods.* 2021; 10 (5): 1046. DOI: 10.3390/foods10051046.
24. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 2013; 37 (5): 664–698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.
25. Rainard P, Foucras G, Boichard D, Rupp R. Invited review: Low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. *J. Dairy Sci.* 2018; 101 (8): 6703–6714. DOI: 10.3168/jds.2018-14593.
26. Regulation of the European Parliament and Council (EC) No. 853/2004 of April 29, 2004 on food hygiene, Chapter IX, Annex III. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>
27. Rodriguez Z, Kolar QK, Krogstad KC, Swartz TH, Yoon I, Bradford BJ, Ruegg PL. Evaluation of reticulorumenal temperature for the prediction of clinical mastitis in dairy cows challenged with *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Sci.* 2023; 106 (2): 1360–1369. DOI: 10.3168/jds.2022-22421.
28. Rossi RS, Amarante AF, Correia LBN, Guerra ST, Nobrega DB, Latosinski GS, Rossi BF, Rall VLM, Pantoja JCF. Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 2018; 101 (11): 10220–10229. DOI: 10.3168/jds.2018-14753.
29. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 2003; 34 (5): 579–596. DOI: 10.1051/vetres:2003028.
30. Sun X, Zhao R, Wang N, Zhang J, Xiao B, Huang F, Chen A. Milk somatic cell count: From conventional microscope method to new biosensor-based method. *Trends Food Sci. Technol.* 2023; 135: 102–114. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.03.020.
31. Tarnavskiy DV, Hirin SV, Hulii MA, Horenkova OK, Tkachenko TA, Tkachenko VV. A clinical case of catarrhal mastitis in a cow. *Sci. Mess. LNUVMBT. Vet. Sci.* 2022; 24 (108): 180–186. DOI: 10.32718/nvlvet10826. (in Ukrainian)
32. Waage S, Jonsson P, Franklin A. Evaluation of a cow-side test for detection of gram-negative bacteria in milk from cows with mastitis. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35 (2): 207–212. DOI: 10.1186/BF03548348.
33. Weis D, Weifurthner M, Bruckmaier R. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2004; 87 (10): 3280–3289. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73464-5.

Microbiological monitoring of the prevalence of mastitis in cows in livestock farms among different regions of Ukraine during 2018–2022

O. Chechet, O. Gorbatiuk, O. Pyskun, I. Musiiets, M. Romanko, G. Buchkovska, N. Kuriata, D. Ordynska, L. Chalimova, N. Mekh, L. Balanchuk, L. Togachynska, M. Kuchynskiy
goroliva@ukr.net

State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary-Sanitary Examination, 30 Donetska str., Kyiv 03151, Ukraine

Milk and dairy products are one of the most important raw materials that play a vital role in the nutritional structure of the Ukrainian population. The safety and quality of raw milk is the basis for dairy production. In view of the above, there is a need to conduct microbiological tests of milk samples from cows to detect mastitis. The issues of determining the somatic cell count (SCC), bacterial contamination (BCM), *Escherichia coli* bacteria (ECB), and the quantitative species composition of pathogenic microorganisms are relevant, as they provide an opportunity to assess the epizootic situation regarding the prevalence of cow mastitis in livestock farms in different regions of Ukraine, to establish the dominant etiological factors that cause mastitis, and to prescribe treatment and preventive measures to prevent further deterioration of the situation. The results of our microbiological monitoring studies on the prevalence of cow mastitis showed a trend towards an increase in their number, as evidenced by an increase in the SCC from 12% in 2018 to 41.5% in 2021; an increase in BCM from 8.1% to 37.3%, respectively. For the period from 2018 to 2021 inclusive, the number of pathogenic bacteria of the coccal group, in particular *Staphylococcus* spp. (80.0% of all isolates), *Streptococcus* spp. (28.1%, respectively), confirmed their main role in the formation of external and internal etiological factors that cause udder lesions in cows. In terms of the number of detected ECB, there was a tendency to reduce, which indicates a decrease in their impact on the etiological factors that provoke mastitis in cows. The test results for 2022 showed a sharp drop in the delivery of milk samples for microbiological testing, which was due to the impact of political, social, economic, and other factors on the livestock industry due to military aggression in Ukraine.

Key words: milk, mastitis, somatic cells, bacterial contamination, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp.



Стан обмінних процесів та відтворна здатність самців кролів за умов теплового стресу

I. Яремчук, С. Корнят, М. Шаран, О. Штапенко, І. Гевкан, О. Андрушко
yiruna@gmail.com



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

ORCID:

I. Yaremchuk <https://orcid.org/0000-0001-8787-2132>

S. Korniat <https://orcid.org/0000-0002-1430-7754>

M. Sharan <https://orcid.org/0000-0003-2299-4811>

O. Shtapenko <https://orcid.org/0000-0002-1192-8432>

I. Gevkan <https://orcid.org/0000-0002-5480-785X>

O. Andrushko <https://orcid.org/0009-0004-8932-9992>

Authors' Contributions:

YIM: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Supervision; Writing — original draft.

KSB: Investigation; Data curation; Visualization.

SMM: Project administration; Conceptualization; Methodology; Supervision; Formal analysis; Writing — review & editing.

SOV: Formal analysis; Methodology; Supervision; Review & editing.

GII: Methodology; Investigation; Data curation.

AOB: Investigation; Data curation; Formal analysis.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Bioethics of the Institute of Animal Biology NAAS (Protocol no. 138 from 04.09.2023, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Метою роботи було дослідити метаболічні процеси та репродуктивну здатність самців кролів за умов теплового стресу та дії комплексного наносомального препарату. Досліджено репродуктивну функцію самців кролів за дії теплового стресу і за усунення його негативної дії згодовуванням наносомального препарату. З'ясували зміни біохімічних показників крові та якісних параметрів сперми самців кролів за досліджуваних чинників. Встановлено, що за умов теплового стресу частота пульсу в кролів збільшується на 24,9% ($P < 0,001$), а після введення їм наносомального препарату — знижується на 10,7% ($P < 0,05$). Тепловий стрес спричинив зміни біохімічних показників крові самців кролів, які свідчать про стресовий стан організму: підвищення рівня глюкози на 31,8% ($P < 0,01$) на фоні зниження основних метаболічних параметрів — загального білка на 12,5% ($P < 0,05$), холестеролу на 31,4% ($P < 0,001$), тестостерону на 41,7% ($P < 0,001$). Згодовування комплексного наносомального препарату знизило ознаки стресу організму та інтенсифікувало обмінні процеси. За дії теплового стресу знизилися показники якості сперми самців кролів: концентрація спермій зменшилась на 27,1%, загальна кількість спермій у еякуляті — на 25,3%, кількість спермій з прямолінійно-поступальним рухом (PMOT) — на 6%; кількість дегенерованих спермій підвищилася на 35,4% ($P < 0,01$). Також знизилися кінематичні показники спермій: середня швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (VAP) — на 10,3%; швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) — на 7,9%; криволінійна швидкість головки спермія (VCL) — на 6,7%. Згодовування комплексного наносомального препарату призвело до збільшення кількості спермій з прямолінійно-поступальним рухом (PMOT) та підвищення основних кінетичних показників (VAP, VSL та VCL) спермій кролів за умов теплового стресу.

Ключові слова: самці кролів, тепловий стрес, кров, сперма, наносомальний препарат, CASA

Вступ

Кліматичні чинники довкілля призводять до напруження адаптивних резервів організму [9, 3], що зумовлює зниження відтворної функції, оскільки для

більшості ксенобіотиків характерні гонадо- та ембріотоксичні властивості. Адаптація організму до дії стресових чинників як біотичного, так і абіотичного характеру є однією з ключових проблем фундаментальної науки, оскільки вирішення цих завдань має вагоме

практичне значення у біології і медицині. Тепловий стрес є глобальною проблемою, яка змінює кількість та якість кормів [4], знижує продуктивність тварин і виробництво продуктів тваринництва [12]. Тому з'ясування причин виникнення і розвитку порушень репродуктивної функції за впливу чинників довкілля дозволить визначити межі адаптаційно-компенсаторних можливостей організму, віднайти способи їх посилити та розробити профілактичні заходи.

З іншого боку, на фоні глобального потепління, яке проявляється і в Україні, наука потребує рішень для підвищення відтворної здатності тварин у певні сезонні періоди та отримання якісної спермопродукції і здорового потомства. Для реалізації цього завдання необхідно застосовувати сучасні досягнення молекулярної біології та ветеринарії у створенні комплексних наносомальних препаратів. Зменшення розмірів наносом (50–100 нм) призводить до збільшення їхньої сумарної поверхні в препараті і появи у них унікальних хімічних, механічних, біологічних та проникних властивостей порівняно з класичними матеріалами. Наносомальні препарати мають широкі перспективи використання в різних галузях медицини, біотехнології та в повсякденному житті завдяки своєму поліфункціональному складу, полііндукторному впливу на різні системи організму [11, 18], значним перевагам у досягненні органів-мішеней в захищеній формі та пролонгованому впливу на активацію спермато-, оо- та ембріогенезу.

У галузі репродуктивної біотехнології однією з проблем є дослідження чинників, які знижують якість спермато-, оо- і ембріогенезу високопродуктивних тварин [17]. Фізіологічні і біохімічні механізми перебігу порушень функціонального стану репродуктивної системи тварин [13], зокрема пов'язані із потеплінням клімату чи з віковими, або сезонними аспектами, ще детально не з'ясовані, а методи інтенсифікації репродуктивної функції тварин з урахуванням молекулярних механізмів регуляції остаточно не розроблено. Тому подальші комплексні дослідження з вивчення відтворної функції продуктивних тварин за дії теплового стресу є актуальними. Особливої уваги також заслуговує використання комплексних наносомальних препаратів на основі гормонів, вітамінів, наносукцинатів і наноцитратів Mn і Zn для підвищення відтворної функції тварин за дії теплового стресу.

Матеріали і методи

У віварії Інституту біології тварин НААН в індивідуальних клітках було розміщено 10 клінічно здорових самців кролів віком 5 місяців. Перед початком експерименту провели клінічний огляд кожної тварини з вимірюванням температури ректальною термометрією ($N\ 38,5\text{--}39,5^\circ\text{C}$). Пульс кролів визначали промацуванням стегнової або плечової артерій ($N\ 150\text{--}300\text{ уд/хв}$). Для визначення частоти дихання кролів підрахову-

вали рухи грудної клітки, черевної стінки або хвоста, а також закрив нос, чи прикладали руку до ніздрів, що дозволяє відчувати рух повітря під час видиху ($N\ 20\text{--}50\text{ рухів/хв}$).

Проведено три етапи експериментів тривалістю по 50 днів, у яких дослідження тварин, відбір та аналіз матеріалу були аналогічними: за нормальних температурних умов; за теплового стресу; за згодовування наносомального препарату за теплового стресу. Тепловий стрес модулювали автоматичним підтримуванням температури (помірний тепловий стрес $25^\circ\text{C} \text{ — } 2\text{ год}$). Показники мікроклімату контролювали за допомогою термогігрометра.

Для усунення негативної дії теплового стресу на репродуктивну функцію самців дослідним тваринам згодовували розроблений наносомальний препарат на основі прототипу — Патент на корисну модель №138343 «Препарат для стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів» (2019). У препараті поєднані органічні сполуки біогенного мікроелемента — високополімерного йоду, адаптогену — спиртової настоянки китайського лимоннику, наночастинок — цинку, кобальту і міді, а також фосфоліпідів та вітамінів А, D₃, Е і F та введення їх до складу ліпосомальної емульсії. Препарат задавали разом із концентрованим кормом двічі на добу у кількості 20 мл впродовж 45 днів у дозі 0,2 мл на 1 кг маси тварини, з розрахунку його дії на нормалізацію сперматогенезу, статевої активності, кількості та якості сперми.

У кінці кожного етапу експериментів проводили дослідження статевої поведінки, відбирали кров з вушної вени та сперму за допомогою штучної вагіни. У сироватці крові визначали вміст загального білка, його фракцій — альбуміну, α , β і γ -глобулінів; концентрацію глюкози, холестеролу, активність аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ). Визначення показників здійснювали на напівавтоматичному аналізаторі крові *Humalyzer-2000* (*Human GmbH*, Німеччина), використовуючи реактиви фірми *Human* (Німеччина).

Наприкінці етапу від самців кролів двічі на тиждень дулетною садкою отримували еякуляти і вивчали фізіологічні показники їхньої якості: об'єм (мл), концентрацію спермій (млрд/мл), кількість живих спермій (%) та динамічні показники спермій (CASA).

Об'єм еякуляту визначали за допомогою градушованої пробірки, а концентрацію спермій — спектрофотометрично за допомогою фотометра SDM-5 з сенсорним дисплеєм (*Minitube*). Життєздатність статевих клітин, морфологічні порушення та відсоток дегенеративних спермій, а також кінетичні показники спермій визначали комп'ютеризованою системою CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) з активуванням модуля *Sperm Vision* [20].

Усі отримані цифрові дані оброблено за допомогою комп'ютерної програми *Statistica* з використанням методу варіаційної статистики та програми *Excel* із пакетів сервісів *Microsoft Office* 2007 та 2010. Відмінності між групами вважалися статистично вірогідними за $P < 0,05$.

Результати й обговорення

У дослідженні встановлено, що за умов підвищення навколишньої температури частота пульсу в кролів збільшується на 24,9% ($P<0,001$) (табл. 1). Водночас після введення самцям кролів наносомального препарату вона знижується на 10,7% ($P<0,05$).

Частота дихання за умов підвищення температури навколишнього середовища зростала на 62,9% ($P<0,001$), однак після введення наносомального препарату зменшувалася на 20,5% ($P<0,001$). Це може свідчити про здатність складових ліпосомального

препарату регулювати температуру тіла та позитивно впливати на нівелювання теплового навантаження у кролів, що узгоджується з дослідженнями інших авторів [7, 10]. Ректальна температура, температура вуха, температура задньої поверхні (тильна поверхня шкіри), температура поверхні передньої лапи (вище ліктя), температуру поверхні задньої лапи (вище коліна) змінювалися аналогічно до змін пульсу та частоти дихання, проте різниці були статистично невірогідними, що може вказувати на більшу стійкість терморегуляції організму кролів до змін навколишньої температури [6].

Таблиця 1. Температура, пульс і дихання самців кролів за нормальної температури навколишнього середовища, в умовах теплового стресу та після введення наносомального препарату ($n=10$)

Table 1. Temperature, pulse and respiratory rate in male rabbits at normal ambient temperature, under heat stress and after nanosomal preparation supplementation ($n=10$)

Показник Parameter	За нормальних умов Under normal conditions	За умов теплового стресу Under heat stress	Після введення наносомального препарату After nanosomal preparation supplementation
Пульс, ударів/хв. / Pulse rate, beats/min	186,4±8,04	232,9±6,37***	208,2±7,33*
Частота дихання, разів/хв. / Respiratory rate, times/min	42,3±1,25	68,9±1,73***	54,8±2,12***
Ректальна температура, °C / Rectal temperature, °C	39,5± 1,44	40,2±1,87	39,9±1,11
Температура вуха, °C / Ear temperature, °C	38,6±1,86	39,8±2,12	39,2±2,46
Температура задньої поверхні (тильна поверхня шкіри), °C Temperature of the hind surface (back surface of the skin), °C	38,4±1,67	39,9±1,65	39,5±1,97
Температура поверхні передньої лапи (вище ліктя), °C Temperature of front paw surface (above the elbow), °C	38,6±1,28	39,4±1,34	39,1±1,45
Температура поверхні задньої лапи (вище коліна), °C Temperature of hind paw surface (above the knee), °C	38,2±1,32	39,1±1,86	38,8±1,78
Середня температура поверхні шкіри, °C / Skin temperature, °C	38,5±1,36	39,8±1,57	39,4±1,86

Примітка. У цій та наступних таблицях * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$ — статистично вірогідні різниці другої групи порівняно з першою та третьої порівняно з другою.

Note. In this and the following tables * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$ — statistically significant differences of the 2nd group compared to the 1st and the 3rd compared to the 2nd.

Збільшення температури утримання кролів призвело до зменшення рівня загального білка у крові на 12,5% ($P<0,05$) та його зростання на 3,8% після застосування препарату (табл. 2). Зниження вмісту білка за зростання температури утримання кролів можна пояснити зменшенням поїдання корму внаслідок зниження апетиту, що настає через пригнічення тварин за підвищеної до некомфортного рівня температури. Значення білкових фракцій сироватки крові (альбуміни, α -глобуліни, β -глобуліни, γ -глобуліни) змінювалися подібно до змін рівня загального білка в крові дослідних тварин.

Рівень глюкози в крові кролів за умов теплового стресу стрімко зріс на 31,8% ($P<0,01$) та після згодовування препарату знизився на 6,9% ($P<0,05$). Вказані зміни можна пояснити порушенням роботи системи травлення за підвищення температури утримання кролів і зменшенням поїдання кормів

внаслідок загального пригнічення тварин [2]. Холестерол (холестерин) належить до групи стероїдів. Він синтезується переважно у печінці, а також надходить у кров з кишечника. Його рівень у крові кролів за умов теплового стресу знизився на 31,4% ($P<0,001$) та після згодовування препарату підвищився на 9,5% ($P<0,05$). Зниження рівня холестеролу у крові кролів за умов теплового стресу можна пояснити зменшенням надходження жирів з кормом внаслідок зниження рівня його поїдання тваринами.

Аспартатамінотрансфераза та аланінамінотрансфераза локалізуються у клітинах більшості органів і систем. Вони переносять аміногрупи від аспарагінової кислоти (АСТ) та аланіну (АЛТ) на альфакетоглутарову кислоту. Дослідження активності АСТ та АЛТ у сироватці крові використовують для діагностики хвороб печінки (гепатиту, гепатозу тощо). Трансамінази є досить чутливими та інформативними показниками

Таблиця 2. Біохімічні показники сироватки крові дослідних кролів за нормальної температури навколишнього середовища, в умовах теплового стресу та після введення наносомального препарату (n=10)**Table 2.** Blood biochemical indexes in male rabbits at normal ambient temperature, under heat stress and after nanosomal preparation supplementation (n=10)

Показник Parameter	За нормальних умов Under normal conditions	За умов теплового стресу Under heat stress	Після введення наносомального препарату After nanosomal preparation supplementation
Загальний білок, г/л / Total protein, g/L	62,4±2,38	54,6±2,71*	56,7±3,19
Альбуміни / Albumin, %	57,6±2,11	53,9±2,56	54,1±3,95
α-глобуліни / α-globulin, %	12,3±0,68	11,2±0,53	12,9±0,74
β-глобуліни / β-globulin, %	16,1±0,49	14,8±0,65	5,3±0,74
γ-глобуліни / γ-globulin, %	12,9±0,23	11,5±0,47	13,1±0,84
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol/l	4,87±0,34	6,42±0,21**	5,98±0,19*
Холестерол, ммоль/л / Cholesterol, mmol/l	2,45±0,07	1,68±0,03***	1,84±0,06*
АЛТ, од/л / ALT, i.u./l	48,8±2,21	51,4±3,11	56,2±3,87
АСТ, од/л / AST, i.u./l	26,1±1,04	28,6±1,46	29,1±1,82
Тестостерон, нг/мл / Testosterone, ng/ml	5,62±0,12	3,28±0,14***	4,49±0,42*

ураження печінки. Найвищу активність трансаміназ у крові спостерігають за розвитку некрозу печінки і гострого паренхіматозного гепатиту, дещо нижчу — за хронічного гепатиту та дистрофії. Зростання активності АСТ і АЛТ у сироватці крові починається за 3–8 днів до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в перші дні розвитку патологічного процесу. У нашому випадку послідовно збільшувався рівень вказаних ензимів у крові кролів, що можна пояснити певними порушеннями роботи печінки внаслідок перегрівання організму тварин.

Концентрація тестостерону в плазмі крові самців кролів за умов теплового стресу знизилася на 41,7% ($P<0,001$), що можна пояснити погіршенням роботи статевих залоз, де цей гормон синтезується, внаслідок чого його рівень зменшується, оскільки синтез є нижчим, ніж метаболізм. Зниження якості сперми за дії теплового стресу призводить до низки фізіологічних і біохімічних реакцій в тестикулах, які змінюють внутрішнє мікрооточення сім'яників, призводять до посилення вільнорадикальних процесів, підвищення рівня білків теплового стресу, пошкодження мембран мітохондрій, ендоплазматичного ретикулулу [5, 8].

Після застосування препарату у складі раціону рівень вказаного гормону в крові піднімався на 36,9% ($P<0,05$), що може бути наслідком позитивного впливу наявних у препараті фосфоліпідів, вітамінів та солей мікроелементів.

У результаті проведених досліджень встановлено окремі параметри якості сперми для контрольної і дослідних груп за різних температурних умов та після введення наносомального препарату. Вірогідних відмінностей в об'ємі еякуляту не виявлено (табл. 3). Еякуля-

ти, відібрані за нормальних умов, мали значно нижчий відсоток дегенерованих спермій, ніж за умов теплового стресу. Отримані дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів [16], де показано, що за впливу теплового стресу впродовж 30-ти днів значно погіршується якість спермопродукції у кнурів-плідників та морфометричні показники спермій, зокрема зменшується маса еякуляту, знижується кількість спермій та їхня рухливість.

Тепловий стрес — один із найбільш негативних чинників навколишнього середовища щодо репродуктивної функції самців кролів, оскільки погіршується запліднювальна здатність та розміри посліду після спаровування з самцями, які зазнали теплового стресу впродовж літнього сезону порівняно із зимовим [1, 14]. Тому є актуальним завданням збереження якісних характеристик сперми кролів впродовж високих температур навколишнього середовища. Після згодовування тваринам комбікорму з наносомальним препаратом відзначено позитивні зміни якості сперми. Спостерігали вірогідне збільшення об'єму, кількості рухливих та відсотка життєздатних спермій, тоді як кількість мертвих спермій зменшилася ($P<0,001$) порівняно з відповідними показниками у тварин контрольної групи. Хоча параметри прямолінійно-поступального руху спермій були вищими за нормальних умов навколишнього середовища, проте суттєвих відмінностей їхньої якості не спостерігали.

Варто зазначити, що концентрація спермій була вищою на 27,1% за нормальних умов навколишнього середовища, ніж у період теплового стресу. Проте після введення до корму наносомального препарату у період теплового стресу статеві активність та якість сперми у дослідних кролів підвищилася. Густина еякуляту дослідних груп кролів збільшилася на 16% порівняно

з контролем; відповідно, зросла й загальна кількість спермій. Натомість кількість спермій з цитоплазматичними краплями була нижча за теплового стресу, ніж за нормальних умов середовища. Це може бути пов'язано з тим, що у цей період кролі були ще молоді і спермії у них були недорозвиненими. Також встановлено, що вплив теплового стресу на морфологію спермій залежить від тривалості його дії та циклу сперматогенезу [15, 19].

Високу якість спермій характеризують динамічні показники свіжоотриманих еякулятів сперми кролів, виміряні за допомогою комп'ютерної системи оцінки CASA.

У табл. 4 наведено відносний вміст спермій з прямолінійно-поступальним рухом (PMOT), середню швидкість просування головки спермія по усередненій траєкторії руху (VAP), швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) та криволінійну швидкість головки спермій (VCL). Показник PMOT за умов теплового стресу зменшився на 6%. Середня швидкість просування головки спермія (VAP) знизилася на 10,3%, швидкість прямолінійного руху (VSL) зменшилася на 7,9%, а криволінійна швидкість (VCL) — лише на 6,7%.

Таблиця 3. Параметри якості сперми кролів за нормальної температури навколишнього середовища, в умовах теплового стресу та після введення наносомального препарату (n=10)

Table 3. Semen production parameters in rabbits at normal ambient temperature, under heat stress and after nanosomal preparation supplementation (n=10)

Показник Parameter	За нормальних умов Under normal conditions	За умов теплового стресу Under heat stress	Після введення наносомального препарату After nanosomal preparation supplementation
Об'єм еякуляту, мл / Semen volume, ml	0,82±0,12	0,84±0,10	0,90±0,07
Концентрація спермій, ×10 ⁶ клітин/мл Sperm cells concentration, ×10 ⁶ cells/ml	286,52±32,8	208,95±33,08	246,45±23,43
Загальна кількість спермій, ×10 ⁶ клітин/мл Total sperm cells count, ×10 ⁶ cells/ml	234,94±21,23	175,52±26,72	221,80±19,20
Життєздатність спермій (рухливість) / Sperm vitality (motility), %	80,92±2,34	74,21±2,62	80,71±2,28
Вміст спермій з прямолінійно-поступальним рухом, % Sperm progressive motility, %	76,21±2,08	68,53±2,02	72,82±2,06
З цитоплазматичними краплями / With cytoplasmic drops, %	9,34±0,80	7,21±0,85	7,28±0,90
Дегенерованих спермій / Sperm abnormality, %	9,74±0,96	18,58±1,71**	12,01±1,45

Таблиця 4. Параметри рухливості спермій кролів за різних температурних режимів за системою CASA (n=10)

Table 4. Rabbits' sperm motility parameters under different temperature regimes based on CASA system (n=10)

Показник Parameter	За нормальних умов Under normal conditions	За умов теплового стресу Under heat stress	Після введення наносомального препарату After nanosomal preparation supplementation
Кількість спермій з прямолінійно-поступальним рухом (PMOT), % Sperm cells with rectilinear-progressive movement (PMOT), %	76,21±2,08	68,53±2,02	72,82±2,06
Криволінійна швидкість (VCL), мкм/сек. Curvilinear velocity (VCL), μm/s	106,6±2,8	99,51±3,92	101,54±2,66
Швидкість прямолінійного руху (VSL), мкм/сек. Rectilinear movement velocity (VSL), μm/s	46,1±1,90	42,50±2,80	44,67±1,60
Середня швидкість просування (VAP), мкм/сек. Average advancement velocity (VAP), μm/s	70,3±2,20	63,99±2,51	68,70±1,70

Згодовування наносомального препарату призвело до покращення динамічних показників сперми кролів за умов теплового стресу. Встановлено, що швидкість прямолінійного руху головки спермія (VSL) та криволінійна швидкість (VCL) не відрізнялася від еякулятів, відібраних за нормальних умов.

Після введення до корму наносомального препарату за умов теплового стресу статеву активність та якість сперми кролів підвищилася. Густина еякуляту дослідних груп кролів збільшилася на 16% порівняно з контролем, тож збільшилася і загальна кількість спермій у еякуляті.

Тепловий стрес спричиняє зменшення об'єму еякуляту кролів, концентрації спермій в еякуляті, відсоток живих спермій та їхні динамічні показники (VCL, VAP, VSL), вірогідне зниження активності ензимів-маркерів запліднювальної здатності СДГ і ЦХО ($P < 0,05-0,01$).

Для превенції теплового стресу та усунення його негативної дії на репродуктивну функцію самців кролів тваринам треба згодовувати розроблений наносомальний препарат.

Джерела

1. Attia YA, Kamel KI. Semen quality, testosterone, seminal plasma biochemical and antioxidant profiles of rabbit bucks fed diets supplemented with different concentrations of soybean lecithin. *Animal*. 2012; 6 (5): 824–833. DOI: 10.1017/S1751731111002229.
2. Ayyat MS, Abd El-Latif KM, Helal AA, Al-Sagheer AA. New Zealand White rabbits tolerance to chronic thermal stress at different dietary energy/protein levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2021; 278: 114992. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114992.
3. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A and Abdrabba M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2015; 100 (3): 401–412. DOI: 10.1111/jpn.12379.
4. Chapman SC, Chakraborty S, Drecker MF, Howden SM. Plant adaptation to climate change — opportunities and priorities in breeding. *Crop Pasture Sci.* 2012; 63 (3): 251–268. DOI: 10.1071/CP11303.
5. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod. Biomed. Online*. 2015; 30 (1): 14–27. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.09.018.
6. El-Kholy KH, Wafa WM, El-Nagar HA, Aboelmagd AM, El-Ratel IT. Physiological response, testicular function, and health indices of rabbit males fed diets containing phytochemicals extract under heat stress conditions. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2021; 8 (2): 256–265. DOI: 10.5455/javar.2021.h510.
7. El-Ratel IT, Attia K, El-Raghi AA, Fouda SF. Relieve the negative effects of heat stress on semen quality, reproductive efficiency and oxidative capacity of rabbit bucks using different natural antioxidants. *Anim. Biosci.* 2020; 34 (5): 844–854. DOI: 10.5713/ajas.20.0258.
8. Hamilton TRS, Siqueira AFP, de Castro LS, Mendes CM, Delgado JC, de Assis PM, Mesquita LP, Maiorka PC, Nichi M, Goissis MD, Visintin JA, Assumpção MEODÁ. Effect of heat stress on sperm DNA: protamine assessment in ram spermatozoa and testicle. *Ox. Med. Cell. Longev.* 2018; 2018: 5413056. DOI: 10.1155/2018/5413056.
9. Henry B, Charmley E, Eckard R, Gaughan JB, Hegarty R. Live-stock production in a changing climate: adaptation and mitigation research in Australia. *Crop Past. Sci.* 2012; 63 (3): 191–202. DOI: 10.1071/CP11169.
10. Hosny NS, Hashem NM, Morsy AS, Abo-elezz ZR. Effects of organic selenium on the physiological response, blood metabolites, redox status, semen quality, and fertility of rabbit bucks kept under natural heat stress conditions. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 290. DOI: 10.3389/fvets.2020.00290.
11. Kornyat S, Sharan M, Ostapiv D, Korbeckij A, Jaremchuk I, Andrushko O. Quality of deconserved bull sperm for the action of nanosuccinates Zn, Cu and Mn in the diluents. *Biol. Tvarin.* 2021; 23 (1): 23–29. DOI: 10.15407/animbiol23.01.023. (in Ukrainian)
12. Lacetera N. Impact of climate change on animal health and welfare. *Anim. Front.* 2019; 9 (1): 26–31. DOI: 10.1093/af/vfy030.
13. Liang ZL, Chen F, Park S, Balasubramanian B, Liu WC. Impacts of heat stress on rabbit immune function, endocrine, blood biochemical changes, antioxidant capacity and production performance, and the potential mitigation strategies of nutritional intervention. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9: 906084. DOI: 10.3389/fvets.2022.906084.
14. Marai IFM, Habeb AAM, Gad AE. Rabbits productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livestock Prod. Sci.* 2002; 78 (2): 71–90. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00091-X.
15. Naseer Z, Ahmad E, Şahiner HS, Epikmen ET, Fiaz M, Yousuf MR, Khan SA, Serin İ, Ceylan A, Aksoy M. Dietary quercetin maintains the semen quality in rabbits under summer heat stress. *Theriogenol.* 2018; 122: 88–93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.009.
16. Pavlova SV. Morphological and physiological peculiarities of different breed boars' spermatozoa under the action of heat stress. *Bull. Poltava State Agr. Acad.* 2020; 3: 189–195. DOI: 10.31210/visnyk2020.03.21. (in Ukrainian)
17. Peña ST, Gummow B, Parker AJ, Paris DBBP. Revisiting summer infertility in the pig: could heat stress-induced sperm DNA damage negatively affect early embryo development? *Anim. Prod. Sci.* 2017; 57 (10): 1975–1983. DOI: 10.1071/AN16079.
18. Shcherbak O, Kovtun S, Zyzyun A, Osypchuk A. Biotechnology model receiving rabbit embryos *in vitro* using nanomaterials. *Biol. Tvarin.* 2015; 17 (2): 172–178. Available at: <https://aminbiol.com.ua/index.php/104-archive/bt-17-2-2015/1401> (in Ukrainian)
19. Vizzarri F, Palazzo M, Casamassima D, Ondruska L, Massanyi M, Tirpak F, Formicki G, Gren A, Massanyi P. *Lippia citriodora* (verbascoside) extract supplementation: effect on rabbit semen quality *in vivo* and *in vitro*. *Czech. J. Anim. Sci.* 2019; 64 (1): 1–10. DOI: 10.17221/35/2018-CJAS.
20. Yaremchuk IM, Sharan MM. Modern opportunities of sperm quality analysis and sperm dose calculation. *Biol. Tvarin.* 2012; 14 (1–2): 697–703. Available at: <https://aminbiol.com.ua/index.php/archive?catid=1:2013-02-15-09-09-13&id=203:2013-03-09-12-31-38> (in Ukrainian)

Metabolic processes and reproductive ability of male rabbits under the action of heat stress

I. Yaremchuk, S. Kornyat, M. Sharan, O. Shtapenko, I. Gevkan, O. Andrushko
yiruna@gmail.com

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

The aim of the work was to study the metabolic processes and reproductive capacity in male rabbits under conditions of heat stress and the action of a complex nanosomal preparation. We have studied the reproductive function in male rabbits under the effects of heat stress and the elimination of its negative effect by feeding a nanosomal drug. We have investigated the changes in biochemical parameters of blood and quality parameters of sperm of male rabbits under the studied factors. It was established that under conditions of heat stress, the pulse rate of rabbits increases by 24.9% ($P < 0.001$), and after the introduction of the nanosomal preparation, it decreases by 10.7% ($P < 0.05$). Heat stress caused changes in the biochemical parameters of the blood of male rabbits, which indicate a stressful state of the body: an increase in the level of glucose by 31.8% ($P < 0.01$), against the background of a decrease in the main metabolic parameters: total protein by 12.5% ($P < 0.05$), cholesterol by 31.4% ($P < 0.001$), testosterone by 41.7% ($P < 0.001$). Feeding the complex nanosomal preparation reduced the signs of body stress and intensified metabolic processes. Under the effects of heat stress, sperm quality indicators of male rabbits decreased: the concentration of sperm by 27.1%, the total number of sperm in the ejaculate by 25.3%, the number of sperm with rectilinear-progressive movement (PMOT) by 6% and the number of degenerated sperm increased by 35.4% ($P < 0.01$). The kinematic parameters of sperm also decreased: the average speed of sperm head advancement along the average trajectory of movement (VAP) by 10.3%; the speed of rectilinear movement of the sperm head along the straight segment between the initial and final points of the trajectory (VSL) by 7.9%; the curvilinear velocity of the sperm head (VCL) by 6.7%. Feeding the complex nanosomal preparation led to an increase in the number of spermatozoa with rectilinear-progressive movement (PMOT) and an increase in the main kinetic indicators (VAP, VSL and VCL) of rabbit spermatozoa under the conditions of heat stress.

Key words: male rabbits, heat stress, blood, sperm, nanosomal drug, CASA

Yaremchuk I, Kornyat S, Sharan M, Shtapenko O, Gevkan I, Andrushko O. Metabolic processes and reproductive ability of male rabbits under the action of heat stress. *Biol. Tvarin.* 2023; 25 (4): 26–31. DOI: 10.15407/animbiol25.04.026.



“EnzActive mix” probiotic preparation effect on some metabolism sites and antioxidant defense parameters of sows and their piglets organisms

T. Ya. Prudyus, K. B. Smolyaninov

tarasvet126@gmail.com



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

ORCID:

T. Ya. Prudyus — <https://orcid.org/0000-0003-3594-7539>

K. B. Smolyaninov — <https://orcid.org/0000-0002-9615-5191>

Authors' Contributions:

PTY: Conceptualization; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision.

SKB: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation.

Declaration of Conflict of Interests:

None.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Bioethics of the Institute of Animal Biology NAAS (Protocol no. 93-01 from 03.06.2021, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Taking into consideration the relevance and significant scientific and practical interest in the issue of probiotic preparations effect on various metabolism sites and productivity of farm animals, we have studied the probiotic feed additive “EnzActive mix” based on live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on some metabolism sites, the content of lipid peroxidation products and the antioxidant defense activity in sows and piglets obtained from them. The actuality of such studies is explained by the significant interest in the use of probiotic preparations not only in human medicine, but also in the practice of animal husbandry. The aim of the work was to study the effect of the specified feed additive on some metabolism sites of the farrowing sows and the piglets obtained from them organism, on the lipid peroxidation products (LPP) content, as well as the activity of antioxidant enzymes, in particular, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in their body. It was established that feed additive “EnzActive mix”, based on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, administration decreased the lipid peroxidation products (LPP) content (TBARS and lipids hydroperoxides) in sows and their progeny blood, in the result of the study. The reason for such LPP content decrease was the antioxidant defense enzyme — superoxide dismutase increase in the sows' and their progeny's RBC (red blood cells). However, it was admitted also feed additives' positive effect on sows' parameters of productivity.

Key words: “EnzActive mix”, sows, piglets, *Saccharomyces cerevisiae*, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), lipid hydroperoxides

Introduction

In recent years, a large number of probiotics that are used to normalize intestinal microflora and increase animal resistance have appeared [7]. Various yeast strains that can be used as either probiotics or prebiotics (nutritional ingredients that selectively stimulate microbiota growth) are in particular attention. The usage of prebiotics, such as inactive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and carbohydrates, isolated from their cell wall (mannan-oligosaccharides-MOS and β -glucans), and also autolytic yeast is the focus of research in poultry and livestock production [2–6, 8].

Benefits of autolytic yeasts usage include improvement of milk and meat productivity, improvement of laying and egg quality; increase of feed efficiency and nutrition digestibility; rumen medium improvement and its pH stabilization in highly concentrated diet; β -glucans boost immune system, mannans bind pathogens and balance intestine microflora; they have long shelf life period, and are thermostable, can be granulated and extruded; functional peptides and flavor nucleotides improve appetite and feed taste, that allows to use them in diets for young animals. The research, development and testing of the efficacy of such products is a promising area for the development of the agricultural sector [3].

Taking into consideration the relevance and significant scientific and practical interest in the issue of probiotic preparations effect on various sites of farm animals metabolism and productivity, we conducted the study of corresponding probiotic preparation effect on several metabolism sites, lipid peroxidation substances content and antioxidant defense enzymes activity in sows' and their piglets' organism — mentioned parameters should additionally characterize metabolic and productive efficacy of researched preparation. “EnzActive mix” is a unique combination of live *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with activity not less than $1,5 \times 10^{10}$ CFU/g and enzyme complex including: protease, cellulase, xylanase, α -amylase, β -glucanase, phytase, under the layer of inactivated yeast cells.

Materials and Methods

During the study, ethical requirements for the use of animals in experimental research were fully respected (Strasbourg, 1986; Kyiv, 2002), and the research methodology was approved by the Bioethics Committee at the Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (protocol no. 93-01 from June 3, 2021).

The study was conducted on the base of industrial complex “Barkom” LLC, Lviv region. Two groups of large white breed sows (3 litters) of 10 animals each were formed — control and experimental, by the principle of analogues. The animals were kept in the same box under the same conditions. The control group received a standard diet balanced by biologically active substances. The experimental group received standard diet, same with control, though to the diet the “EnzActive mix” feed additive was additionally included in the dosage 0.3 kg/t of the finished feed. The study started on the 85th day of sow gestation or in 30 days before the expected farrowing. Blood samples for biochemical analysis were taken in sows before the experiment. The sows were transferred to the farrowing ward in 5 days before farrowing where they were fed lactating sows diet, and the experimental group continued to include additionally the specified feed additive. Gestating sows were fed twice a day at a rate of 3.5 kg/day, lactating sows were fed in individual troughs four times a day in the amount of 7 kg. Blood samples for research were taken three days before expecting farrowing and on the 21st day of lactation. The piglets of the experimental group were additionally fed investigated feed additive in the amount of 0.5 kg/t of the finished feed. The finished compound feed was fed to piglets from 5 days after birth till weaning. Blood samples for biochemical analysis were taken from piglets on the 5th, 14th, and 28th day after birth from cranial *vena cava*.

The content of lipid hydroperoxides and TBC-active products, activity of glutathione peroxidase and

superoxide dismutase were determined in the blood. The research data is highlighted and related to works [9, 10].

Biochemical parameters of the sows and piglets blood were determined with *Humalyzer 2000* biochemical analyzer. We also evaluated sows behavior, feed consumption, live weight loss during the experiment, quantity of piglets born. For piglets behaviour, live weight gain and average daily weight gain on days 5–14–28 of life, pre-starter feed consumption, and the presence of diarrhoea were evaluated. The results were processed by standard methods of mathematical statistics using *Microsoft Excel* software. Statistical significance was determined by the Student's test.

Results and Discussion

The data on certain biochemical parameters changes in the blood serum of sows treated with “EnzActive mix” feed additive in addition to the diet are shown in the table 1. Based on the results we saw in this study, we have determined that in general the use of this additive did not cause significant changes in biochemical blood parameters of the studied sows, in particular the content of macronutrients calcium and phosphorus, triacylglycerol fats, cholesterol and enzymes, which would indicate a certain toxic effect. There was also a tendency to an increase in albumin content during the study period and a decrease in urea on the 21st day of lactation ($P < 0.05$), which may indicate a positive effect of the feed additive on the protein metabolism intensification in their bodies.

Table 1. Biochemical blood parameters in sows ($M \pm m$, $n=5$)

Parameters	Groups	Study periods		
		85 days in gestation	112 days in gestation	21 day in lactation
Albumines, g/l	C	32.8 \pm 2.46	35.0 \pm 2.39	30.8 \pm 2.44
	T	34.9 \pm 1.82	39.6 \pm 1.97	32.4 \pm 1.29
Calcium, mmol/l	C	2.27 \pm 0.13	2.12 \pm 0.23	2.48 \pm 0.11
	T	2.26 \pm 0.07	2.36 \pm 0.09	2.4 \pm 0.04
Phosphorus, mmol/l	C	2.2 \pm 0.12	3.32 \pm 0.14	1.80 \pm 0.16
	T	2.1 \pm 0.16	3.62 \pm 0.39	1.96 \pm 0.11
Triglycerides, mmol/l	C	0.6 \pm 0.07	1.40 \pm 0.15	0.45 \pm 0.04
	T	0.63 \pm 0.02	1.31 \pm 0.30	0.72 \pm 0.28
Cholesterol, mmol/l	C	1.46 \pm 0.15	2.18 \pm 0.12	2.24 \pm 0.15
	T	1.73 \pm 0.08	2.23 \pm 0.167	2.1 \pm 0.29
Urea, mmol/l	C	4.97 \pm 0.09	4.4 \pm 0.38	7.26 \pm 0.32
	T	4.7 \pm 0.23	4.28 \pm 0.18	6.12 \pm 0.32*
ALT, MO/l	C	49.2 \pm 2.76	50.98 \pm 4.73	42.38 \pm 2.72
	T	55.2 \pm 2.25	57.06 \pm 2.59	38.44 \pm 1.32
AST, MO/l	C	22.73 \pm 1.85	38.6 \pm 2.99	35.72 \pm 2.85
	T	27.46 \pm 1.61	31.3 \pm 2.24	32.6 \pm 4.16

Table 2. Biochemical blood parameters in piglets (M±m, n=5)

Parameters	Groups	Study periods		
		5 days	14 days	28 days
Albumines, g/l	C	25,02±2,35	23,46±2,08	19,24±1,49
	T	29,6±1,97	26,28±1,81	28,4±2,15**
Calcium, mmol/l	C	2,12±0,23	2,3±0,13	2,7±0,15
	T	2,36±0,09	2,68±0,02*	2,96±0,13
Phosphorus, mmol/l	C	3,32±0,14	2,36±0,08	3,78±0,30
	T	3,62±0,38	2,54±0,08	3,88±0,25
Triglycerides, mmol/l	C	1,41±0,16	1,61±0,15	1,34±0,05
	T	1,31±0,30	1,61±0,15	1,39±0,12
Cholesterol, mmol/l	C	2,18±0,12	3,90±0,30	2,90±0,22
	T	2,23±0,17	3,62±0,25	2,46±0,20
Urea, mmol/l	C	4,40±0,38	4,56±0,31	4,40±0,38
	T	4,28±0,18	6,18±1,09	4,28±0,18
ALT, MO/l	C	57,06±2,59	39,28±2,97	51,24±5,50
	T	51,24±5,50	57,24±7,27	57,06±2,59
AST, MO/l	C	51,48±11,81	70,72±17,01	51,48±12,99
	T	31,24±2,23	140,46±25,46	31,24±2,23

Table 3. The content of lipid peroxidation products in the blood plasma of sows (M±m, n=5)

Parameters	Groups	Study periods		
		85 days in gestation	112 days in gestation	21 day in lactation
TBARS, µmol/ml	C	4.31±0.103	4.37±0.111	4.26±0.143
	T	4.33±0.118	3.52±0.132**	3.51±0.185*
HPL, Units. E/ml	C	2.58±0.110	2.60±0.045	2.42±0.035
	T	2.34±0.075	2.41±0.087	2.22±0.069*

Table 4. The content of lipid peroxidation products in the blood plasma of suckling piglets (M±m, n=5)

Parameters	Groups	Study periods		
		5 days	14 days	28 days
TBARS, µmol/ml	C	4.8167±0.05	4.3323±0.03	3.9424±0.13
	T	4.4071±0.06**	4.2201±0.08	3.4829±0.04**
HPL, Units. E/ml	C	0.53±0.02	0.52±0.01	0.49±0.02
	T	0.45±0.03	0.39±0.02**	0.35±0.007***

Table 5. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in blood erythrocytes of sows (M±m, n=5)

Parameters	Groups	Study periods		
		85 days in gestation	112 days in gestation	21 day in lactation
Glutathione peroxidase, nM NADPH/min/mg Hb RBS	C	10.55±0.21	7.39±0.25	9.73±0.09
	T	9.51±0.32	7.13±0.34	10.51±0.14
Superoxide dismutase, units Act/mg protein×min	C	21.54±3.61	19.91±1.84	22.15±1.57
	T	23.01±1.53	24.92±1.79	27.02±1.24*

The data of biochemical processes dynamics in piglets (obtained from the sows fed with “EnzActive mix”) organism are shown in the table 2. We can see from the table, that on 28th day of life in the piglets blood a significant increase of albumin content is observed. In particular, the albumin content in the blood serum of the experimental group piglets was statistically higher by 47.61% (P<0.01) comparing with the control.

It is known that albumin performs, among other things, antioxidant and transport functions in the body, including and for macro- and microelements, which may indicate a positive stimulating effect of the feed additive on the albumin fraction of proteins metabolism [6]. Analyzing the results of the blood serum test of suckling piglets of both groups, we see a gradual increase in the Potassium content throughout the entire experiment period. However, in experimental group piglets of 14 days of age, the Potassium content was significantly higher by 16.50% (P<0.05) than in the control group. The level of inorganic Phosphorus in the experimental group slightly decreased on the 14th day of piglet life, but compared to the control group it was still slightly higher.

Table 3 shows the data on changes in the content of lipid peroxidation products in the blood of sows receiving the “EnzActive mix” feed additive included in the diet. As a result of the studies, it was determined the concentration of TBARS and lipid hydroperoxides in the blood serum, which characterizes the intensity of lipid peroxidation processes in the body and serves as a marker of the endogenous intoxication rate [9, 10]. The studies have shown that including the “EnzActive mix” to sows diet of the experimental group had an inhibitory effect on the lipid peroxidation processes intensity, as indicated by a statistically lower content of TBARS in the blood plasma three days before farrowing and on the 21st day of lactation 19.45% and 17.6% (P<0.01; P<0.05) and lipid hydroperoxides on the 21st day of lactation 8.26% (P<0.05) compared to the same indicators in the control group.

As for the piglets obtained from these sows, it was found that the inclusion of “EnzActive mix” feed additive into the piglet diet caused a decrease in the lipid peroxidation products content in the blood plasma. Specifically, we found a significantly lower level of TBARS on the 5th and 28th day of suckling piglets’ life and lipid hydroperoxides on the 14th and 28th day (table 4). The obtained results indicate the inhibitory effect of the studied preparation on the intensity of the lipid peroxidation processes.

In the table 5 we can see that these changes occurred because of increased superoxide dismutase activity in red blood cells of sows and their piglets. The results of the study of the antioxidant defense system by the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in sow blood erythrocytes show significantly higher activity rate of superoxide dismutase on the 21st day of lactation in the experimental group comparing to the control.

Table 6. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in blood erythrocytes of suckling piglets ($M \pm m$, $n=5$)

Parameters	Groups	Study periods		
		5 days	14 days	28 days
Glutathione peroxidase, nM NADPH/min/mg Hb RBS	C	15.1 \pm 0.31	13.45 \pm 0.19	13.86 \pm 0.17
	T	14.15 \pm 0.37	13.26 \pm 0.22	12.97 \pm 0.27
Superoxide dismutase, units Act/mg protein \times min	C	22.40 \pm 1.18	23.36 \pm 1.07	26.30 \pm 1.25
	T	23.87 \pm 0.71	25.18 \pm 1.12	30.11 \pm 0.92*

From the data presented in table 6 we can see that the activity of superoxide dismutase, which is one of the first line of enzyme protection against superoxide anion radicals and hydrogen peroxide [5], was 14.5% higher in piglets of the experimental group on day 28 after weaning compared to control ($P<0.05$). Our results are completely consistent with the literature data on the antioxidant effect of probiotic preparations based on *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, it is known that their antioxidant effect relates to the yeast polysaccharides action [11], and our studies show that it is accompanied by an increase of the key antioxidant enzyme — superoxide dismutase activity. No significant changes were observed in glutathione peroxidase activity.

A positive effect of feed additive is shown in the study on young piglets from the 1st day of life till 5 days of age. Based on the study results it was determined that piglets' live weight increased by 7.77% in the experimental group comparing to control. A significant increase in the live weight of piglets in the experimental group on day 14 was 13.72% ($P<0.5$), and on day 28 it was 8.40% ($P<0.01$) compared to the control group, respectively. The average daily weight gain of the control and experimental groups during the study period was 210 g and 230 g, respectively, that is statistically significant by 9.53% ($P<0.01$). Piglets of the experimental group consumed 1.89% more pre-starter feed than the control group. Higher feed intake at an early age in piglets indicates a healthy intestine and increased nutrient absorption, that is confirmed by the average daily gain and body weight in the experimental group [7]. During the lactation period sows of the control group lost 23 kg and those of the experimental group lost 20 kg, which is 1.95% less than in control. The higher feed intake and digestibility by 2.54% ($P<0.01$) compared to the control group caused the preservation of body weight in experimental group.

Based on the results of the study, we have determined, that administration of the “EnzActive mix” probiotic feed additive, based on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to gestating sows led to a decrease in the lipid peroxidation products (TBARS and lipid hydroperox-

ides) content in their blood and in the blood of their progeny. Such a decrease in the content of LPP products was due to an increase in the key antioxidant defense enzyme — superoxide dismutase activity in the erythrocytes of sows and piglets obtained from them. Furthermore, it was admitted a positive effect of the feed additive on sow productivity.

References

1. Arunachalam K, Sreeja PS, Yang X. The antioxidant properties of mushroom polysaccharides can potentially mitigate oxidative stress, beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Front. Pharmacol.* 2022; 13: 874474. DOI: 10.3389/fphar.2022.874474.
2. Bortoluzzi C, Barbosa J, Pereira R, Fagundes NS, Rafael JM, Menten JFM. Autolyzed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation improves performance while modulating the intestinal immune-system and microbiology of broiler chickens. *Front. Sustain. Food Syst. Sec.* 2018; 2: 85. DOI: 10.3389/fsufs.2018.00085.
3. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 14 (8): 491–502. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75.
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11 (8): 506–514. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.
5. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran TB, Mitra S, Olatunde A, Shariati MA, Rebezov M, Rengasamy KRR, Mubarak MS. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022; 62 (26): 7282–7300. DOI: 10.1080/10408398.2021.1913400.
6. Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Unraveling the mysteries of serum albumin — more than just a serum protein. *Front. Physiol.* 2014; 5: 299. DOI: 10.3389/fphys.2014.00299.
7. Prudyus T. Morphological characteristics of the duodenum of piglets fed with various feed additives. *Reg. Mech. Biosys.* 2023; 14 (2): 266–272. DOI: 10.15421/022339.
8. Prudyus TY, Vishchur OI. Efficacy of “EnzActive mix” feed additive in piglet growing. *Biol. Tvarin.* 2022; 24 (4): 27–31. DOI: 10.15407/animbol24.04.027.
9. Rosalovsky VP, Grabovska SV, Salyha YT. Changes in glutathione system and lipid peroxidation in rat blood during the first hour after chlorpyrifos exposure. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87 (5): 124–132. DOI: 10.15407/ubj87.05.124.
10. Salyha N. Effects of L-glutamic acid and pyridoxine on glutathione depletion and lipid peroxidation generated by epinephrine-induced stress in rats. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (4): 102–110. DOI: 10.15407/ubj90.04.102.
11. Slivinska OM, Senkiv OM, Iskra RY. Antioxidant system in rats' skeletal muscles and blood at hyperglycemia and the influence of zinc citrate. *J. Karazin Kharkiv Nat. Univer.* 2016; 26: 5–10. Available at: <https://periodicals.karazin.ua/biology/article/view/6251><https://periodicals.karazin.ua/biology/article/view/6251>

Вплив пробіотичного препарату «ЕнзАктив Мікс» на деякі ланки обміну речовин та показники антиоксидантного захисту в організмі свиноматок та отриманих від них поросят

Т. Я. Прудіус, К. Б. Смолянiнов
tarasvet126@gmail.com

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

Враховуючи актуальність та значний науково-практичний інтерес до питання впливу пробіотичних препаратів на різні ланки метаболізму і продуктивності сільськогосподарських тварин, ми дослідили вплив кормової добавки «ЕнзАктив Мікс» на основі живих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на деякі ланки обміну речовин, вміст продуктів пероксидації ліпідів і активність антиоксидантного захисту в організмі свиней та отриманих від них поросят. Актуальність таких досліджень обумовлена значним інтересом до застосування пробіотичних препаратів не тільки в гуманітарній медицині, але й у практиці тваринництва. Метою роботи було дослідити вплив вказаної кормової добавки на деякі ланки метаболізму в організмі порослих свиноматок та отриманих від них поросят, на показники вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), а також активність антиоксидантних ензимів, зокрема супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази в їх організмі. В результаті проведених досліджень встановлено, що застосування свиноматкам під час порослості пробіотичної кормової добавки «ЕнзАктив Мікс» на основі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* призводило до зниження вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (ТБК-активних продуктів та гідроперекисей ліпідів) у їх крові та крові отриманих від них поросят. Таке зменшення вмісту продуктів ПОЛ було обумовлене зростанням активності ключового ферменту антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази в еритроцитах свиноматок та отриманих від них поросят. Крім того, ми простежили позитивний вплив кормової добавки на показники продуктивності свиноматок.

Ключові слова: «ЕнзАктив Мікс», свиноматки, поросята, *Saccharomyces cerevisiae*, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, ТБК-активні продукти, гідроперекиси



Аналіз лінійно-вагових показників річкових раків (*Astacus*) у водоймах Дніпропетровської області

I. I. Боровик, О. М. Маренков

vanbor17@gmail.com



Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, просп. Гагаріна 72, м. Дніпро, 49010, Україна, Borovyk_Iva@fbe.dnu.edu.ua

ORCID:

I. I. Borovyk <https://orcid.org/0000-0001-8106-1080>

O. M. Marenkov <https://orcid.org/0000-0002-3456-2496>

Authors' Contributions:

BII: Conceptualization; Project administration; Data curation; Formal analysis Investigation; Writing — original draft.

MOM: Supervision; Methodology; Data curation; Writing — review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

All the work with experimental animals was performed in accordance with the rules of bioethics in compliance with the European Convention "On the Humane Treatment of Laboratory Animals", "General Principles of Animal Experiments" and in accordance with "The Regulations on the Use of Animals in Biomedical Experiments".

Acknowledgements:

None.

Робота присвячена дослідженню річкових раків. Довгопалый рак *Astacus leptodactylus* є одним із ключових об'єктів промислового господарства, також він відіграє важливу роль у розвитку біоценозів водойм. На території Дніпропетровської обл. раки живуть в різноманітних прісноводних водоймах, зокрема у річках, озерах, заплавах та ставках. Відомо, що водойми Придніпров'я зазнають значного антропогенного впливу, що може спричинити зміни у циклах розвитку та особливостях розмноження гідробіонтів. Досліджувані ділянки водосховищ характеризувалися різноманітним ступенем та чинниками навантаження — такими, як, наприклад, забруднення води хімічними та радіоактивними речовинами, нафтопродуктами, стічними водами, а також використання азотних і фосфорних добрив. Ці антропогенні втручання можуть призводити до зменшення популяцій водних організмів, що становить серйозну загрозу екосистемам водойм. Чутливість рака до змін у навколишньому середовищі дозволяє використовувати цей вид як біоіндикаторний. До біоіндикаторних маркерів можна віднести також показники плодючості і морфометричні характеристики. Проведений аналіз лінійно-вагових показників виявив, що раки, вилучені із Запорізького водосховища, мали на 15–18% більшу довжину тіла порівняно з раками, вилученими з Кам'янського водосховища та Самарської затоки. Також у них були на 18–20% більші розміри головогрудей, а маса раків майже на 50% перевищувала масу особин з інших водойм. Самарська затока демонструє суттєво менші показники плодючості порівняно з Запорізьким водосховищем. Було зафіксовано, що тут плодючість раків була вірогідно нижчою на 63%, ніж у Запорізькому водосховищі. Встановлені відмінності в морфометричних показниках між раками, вилученими із Запорізького водосховища, Самарської затоки та з Кам'янського водосховища, можуть свідчити про неоднорідність умов існування у водоймах Дніпропетровщини та можуть бути спричинені антропогенним навантаженням.

Ключові слова: річкові раки, морфометрія, лінійно-вагові показники, кластерний аналіз, водосховище, плодючість, *Astacus*, десятиногі раки, біоіндикація, водойми, екологічний стан



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Вступ

Річкові раки, які входять до родини (*Astacidae*), є ключовими об'єктами промислового використання безхребетних у прісних водоймах. Ці раки належать до підряду довгохвостих раків (*Macrura*), ряду десятиногих (*Decapoda*) та підкласу вищих раків (*Malacostraca*).

Особливості біології та морфологічні відмінності європейських річкових раків роду *Astacus* Fabricius, 1775 під впливом екологічних та антропогенних чинників залишаються гарячою точкою біолого-екологічних досліджень. Існують різні наукові погляди щодо екологічних досліджень ракоподібних. Західноєвропейські дослідники виокремлюють три види цього роду: широкопалого рака *Astacus astacus* L., 1758, довгопалого рака *A. leptodactylus* Eschscholtz, 1823 та товстопалого рака *Astacus pachypus* Rathke, 1837 [14]. С. Я. Бродський, детально опрацювавши систематику раків України, визначив два роди, які охоплювали сім видів [1]. Останні праці С. В. Межжерина доводять факт таксономічної неоднорідності довгопалого рака *A. leptodactylus* і показують, що насправді це група ієрархічно пов'язаних видів, якому варто надати статус окремого роду *Pontastacus* Bott, 1950 [10]. Оскільки всі ці види мешкають переважно у спільних ареалах, в одних і тих же водоймах, і враховуючи біологічні особливості розмноження раків та видові взаємовідносини, ці види досить близькі, тому між ними може проходити гібридизація [11]. У цьому аспекті досить великий інтерес становлять водойми Центральної та Східної України, в яких, згідно з літературними даними, мешкають декілька видів річкових раків [15]. При цьому водойми степового Придніпров'я зазнають значного антропогенного навантаження, що певним чином відображається на циклах розвитку, особливостях розмноження гідробіонтів і на їхніх морфологічних показниках [5, 6, 9].

У науковій роботі основну увагу спрямовано на ретельний аналіз таких характеристик, як морфометричні показники, статевий диморфізм та плодючість вищих раків у водоймах Придніпров'я. На сьогоднішні дослідження різних аспектів біології та екології річкових раків, зокрема найпоширенішого для нашої території виду *A. leptodactylus*, стають надзвичайно актуальними. На території Дніпропетровської обл. раки живуть в будь-яких прісних водоймах — річках, озерах, заплавах, водоймищах, ставках. Їх багато в р. Самара, р. Оріль, р. Мокра Сура, Запорізькому та Кам'янському водосховищах. Відомо, що Запорізьке водосховище розташоване в густонаселеному регіоні з розвиненою промисловістю і сільським господарством, тому воно належить до водойм з посиленням антропогенним навантаженням. Найбільшого впливу за ступенем і різноманіттям речовин-забруднювачів зазнають верхня частина водосховища, а також Самарська затока. На забруднення води важкими металами у Самарській затоці впливають також донні відкладення у зв'язку з вторинним забрудненням,

що призводить до винесення металів з донних осадів у воду [16]. Негативний вплив руйнування природних біотопів, заболочування, осушення, забруднення води хімічними та радіоактивними речовинами, нафтопродуктами, стічними водами, а також використання азотних і фосфорних добрив відображається на фізіологічних показниках раків і призводить до зменшення їхніх популяцій [8, 12]. Для вивчення реакції організмів раків на вплив комплексу екологічних та антропогенних чинників у біологічних дослідженнях можна застосовувати морфометричні та кластерні аналізи.

Матеріали і методи

Матеріалом для проведення досліджень слугували особини річкових раків виду *A. leptodactylus*, зібрані у вегетаційний період (березень-червень) 2021–2022 р. на ділянках прибережної зони Кам'янського (с. Шульгівка, 48°42'35"N 34°21'14"E) і Запорізького (с. Карнаухівка, 48°28'39"N 34°45'14"E) водосховищ та в районі Самарської затоки Запорізького водосховища (с. Олександрівка, 48°30'19"N 35°11'13"E).

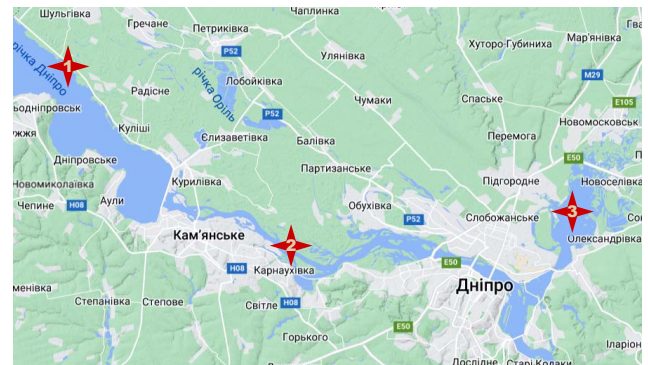


Рис. 1. Ділянки проведення досліджень
1 — с. Шульгівка (48°42'35"N 34°21'14"E),
2 — с. Карнаухівка (48°28'39"N 34°45'14"E),
3 — с. Олександрівка (48°30'19"N 35°11'13"E)

Fig. 1. Research locations:
1 — Shulhivka village (48°42'35"N 34°21'14"E),
2 — Karnaukhivka village (48°28'39"N 34°45'14"E),
3 — Oleksandrivka village (48°30'19"N 35°11'13"E).

Досліджувані станції відбору проб мали різні умови існування для раків, а також варіювали за ступенем впливу екологічних та антропогенних чинників [5, 6, 16]. Збір матеріалу проводили за допомогою стандартних раколовків відкритого типу з сіткою №20, збирали вручну у прибережних зонах з наявністю нір раків, а також застосовували спеціальні пастки з приманками.

Під час проведення досліджень здійснили обробку 25 екземплярів річкових раків. З обох водосховищ було відібрано по 30 особин. Після вилову раків їх фіксували у спирті (зі складом 70% спирту та 2% гліцерину) для визначення видової належності. Особини довгопалого рака проходили морфометричний аналіз за допомогою

лінійки та штангенциркуля згідно із загальноприйнятою методикою з точністю до 1 мм. Масу кожної індивідуальної особини визначено з точністю до 1 г на лабораторних вагах ТЕВ-0,3-0,005 (Харків, 2021 р.). Перед зважуванням на вагах кожну особину підсушували за допомогою фільтрувального паперу до відсутності вологих плям.

Для ідентифікації видової приналежності використовували ознаки, запропоновані С. Я. Бродським [2]. Усі вилучені зразки зарахували до виду *A. leptodactylus*. Для дослідження репродуктивного потенціалу виміряли показники плодючості раків прямим підрахунком кількості ікринок на черевці самки. Всі ікринки були відокремлені з черевця, підраховували їхню кількість, виміряли діаметр (за допомогою проміру десяти ікринок) та масу. Для статистичного аналізу застосовували загальноприйняті методи з використанням програмних пакетів *Microsoft Excel 2007* та *Statistica 6.0*.

Усі роботи з дослідними тваринами виконували згідно з правилами біоетики із дотриманням Європейської Конвенції «Про гуманне ставлення до лабораторних тварин», «Загальних принципів експериментів на тваринах» та відповідно до «Положення про використання тварин в біомедичних експериментах» [3, 4, 7, 13].

Результати й обговорення

Серед вилучених самок раків найменшу довжину (8,8 см) мала самка у Самарській затоці, а найбільшу довжину (14,5 см) — самка, вилучена з Запорізького водосховища. Середня довжина зібраних раків варіювала в межах від 10,38 см до 11,78 см. Самки, зібрані із Самарської затоки, відрізнялися меншими лінійно-ваговими показниками. Морфометричні, вагові та репродуктивні параметри самок, зібраних з різних водойм, проходили статистичний аналіз, і було виявлено лише значущу відмінність у плодючості раків, зібраних в Самарській затоці (табл. 1). За іншими показниками вірогідних відмінностей ($P < 0,05$) серед раків не виявлено.

Найбільший показник плодючості простежили у раків, вилучених із Запорізького водосховища ($338,50 \pm 44,00$ ікринок), найменший — у раків із Кам'янського водосховища ($199,17 \pm 45,81$ ікринок). Встановлено, що в Самарській затоці плодючість раків була на 63% вірогідно нижчою, ніж в Запорізькому водосховищі ($P < 0,05$) і становила $215,75 \pm 31,24$ ікринок (рис. 3). При цьому розміри поодиноких ікринок та їхня вага не відрізнялися і були в межах від 0,26–0,27 мм та 13–14 мг відповідно.

Плодючість раків залежить від низки чинників — як екологічних, так і фізіологічних, зокрема від довжини тіла самок, від чисельності популяції, її стану тощо. У стабільних умовах популяція річкових раків розмножується з властивою циклічністю, середня плодючість самок залишається на приблизно однаковому рівні, а кількість молодняку, який додається до популяції, майже відповідає або перевищує кількість вилучених особин раків.

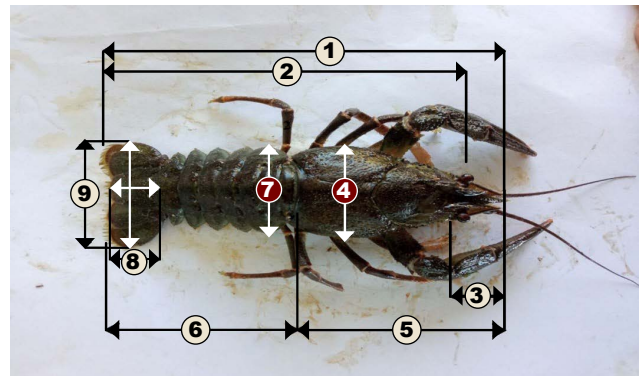


Рис. 2. Схема вимірювання річкового рака: 1 — повна довжина; 2 — промісна довжина; 3 — довжина роstrу; 4 — ширина головогрудей; 5 — довжина головогрудей; 6 — довжина черевця; 7 — ширина черевця біля початку плевр 3-го порядку; 8 — довжина тельсона; 9 — ширина тельсона.
Fig. 2. Scheme of crayfish measurements: 1 — total length; 2 — carapace length; 3 — rostrum length; 4 — cephalothorax width; 5 — cephalothorax length; 6 — abdomen length; 7 — abdomen width at the beginning of pleuron of the 3rd order; 8 — telson length; 9 — telson width.

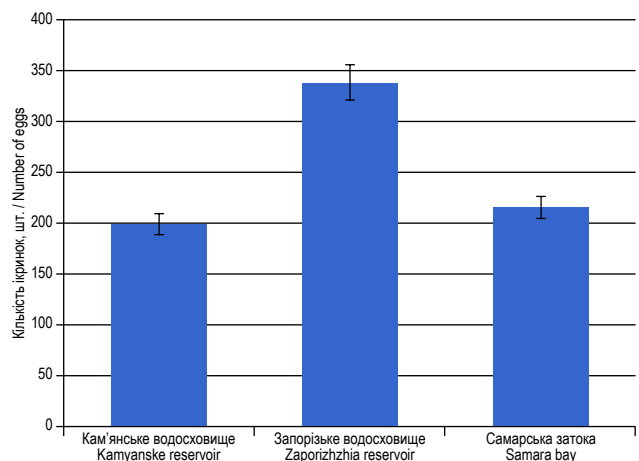


Рис. 3. Показники плодючості річкових раків
Fig. 3. Fecundity indicators of crayfish

Самці річкових раків відрізнялися незначно вищими лінійними показниками. З усіх зразків вилучених самців найменшу довжину (9,5 см) зафіксували в особини, відібраної з Кам'янського водосховища, тоді як найбільша довжина (14,5 см) виявилася у самця, вилученого з Запорізького водосховища. Середня довжина річкових раків була в діапазоні від 10,38 см до 12,76 см (табл. 2).

Встановлено, що самці раків з Самарської затоки в середньому характеризувалися меншими біологічними показниками, ніж особини з інших водойм.

Порівнюючи статистичний аналіз вибірок самців з аналізом самиць, виявили, що серед самців, зібраних із Кам'янського водосховища, існує статистично вірогідна різниця за такими показниками: повна довжина і довжина тіла (показники 1 і 2), ширина і довжина головогрудей (показники 4 і 5), ширина черевця (показник 7), ширина тельсона (показник 9) та вага (показник 10) (табл. 3).

Таблиця 1. Морфометричні показники самиць раків
Table 1. Morphometric indicators of crayfish females

Показники Parameters	Кам'янське водосховище Kamyanske reservoir (n=25)	Запорізьке водосховище Zaporizhzhia reservoir (n=25)	Самарська затока Samara bay (n=25)
	M±m	M±m	M±m
Повна довжина, см / Total length, cm	10,92±0,39	11,78±0,88	10,38±0,54
Промислова довжина, см / Carapace length, cm	9,67±0,39	10,60±0,63	9,26±0,45
Довжина роструму, см / Rostrum length, cm	1,58±0,09	1,70±0,15	1,50±0,14
Ширина головогрудей, см / Cephalothorax width, cm	2,77±0,15	3,17±0,23	2,73±0,13
Довжина головогрудей, см / Cephalothorax length, cm	5,32±0,29	5,95±0,43	5,01±0,22
Довжина черевця, см / Abdomen length, cm	5,53±0,20	5,88±0,41	5,29±0,31
Ширина черевця біля початку плевр 3-го порядку, см Abdomen width at the beginning of pleuron of the 3 rd order, cm	2,85±0,21	3,90±0,70	2,94±0,16
Довжина тельсона, см / Telson length, cm	1,52±0,03	1,72±0,12	1,60±0,10
Ширина тельсона, см / Telson width, cm	4,33±0,25	4,77±0,30	4,11±0,24
Маса, г / Weight, g	33,74±4,07	47,58±8,56	31,74±4,00
Маса без ікри, г / Weight without eggs, g	30,97±3,55	42,87±7,83	32,93±4,60
Плодючість, ікр. / Fertility, eggs	199,17±45,81	338,50±44,00*	215,75±31,24*
Діаметр ікринки, мм / Egg diameter, mm	0,26±0,001	0,27±0,01	0,26±0,001
Маса ікри, г / Total egg mass, g	2,76±0,64	4,71±0,80	2,94±0,60
Маса ікринки, г / Single egg mass, g	0,014±0,0004	0,013±0,0009	0,013±0,0018

Примітка. Тут і далі * — різниця вірогідна за P<0,05.

Note. Here and further * — the difference is significant at P<0.05.

Таблиця 2. Морфометричні показники самців раків
Table 2. Morphometric indicators of male crayfish

Показники Parameters	Кам'янське водосховище Kamyanske reservoir (n=25)	Запорізьке водосховище Zaporizhzhia reservoir (n=25)	Самарська затока Samara bay (n=25)
	M±m	M±m	M±m
Повна довжина, см / Total length, cm	10,74±0,21	12,76±0,74	10,38±0,21
Промислова довжина, см / Carapace length, cm	9,50±0,23	11,30±0,71	9,20±0,22
Довжина роструму, см / Rostrum length, cm	1,64±0,09	1,82±0,13	1,64±0,10
Ширина головогрудей, см / Cephalothorax width, cm	2,88±0,12	3,52±0,19	2,80±0,12
Довжина головогрудей, см / Cephalothorax length, cm	5,74±0,23	6,88±0,28	5,50±0,16
Довжина черевця, см / Abdomen length, cm	5,08±0,04	5,92±0,44	4,98±0,14
Ширина черевця біля початку плевр 3-го порядку, см Abdomen width at the beginning of pleuron of the 3 rd order, cm	2,32±0,10	2,70±0,12	2,34±0,12
Довжина тельсона, см Telson length, cm	1,56±0,12	1,64±0,13	1,42±0,15
Ширина тельсона, см Telson width, cm	4,28±0,18	5,56±0,50	4,32±0,22
Маса, г / Weight, g	36,44±2,84	70,73±12,73	32,68±1,58

Таблиця 3. Величини *t*-критерію Стюдента для самців раків, вилучених з різних водойм

Table 3. Student's *t*-test values for male crayfish collected from different water reservoirs

Показники Parameters	K-3 K-Z	K-C K-S	3-C Z-S
Повна довжина, см Total length, cm	2,63*	1,21	3,09*
Промислова довжина, см Carapace length, cm	2,41*	0,94	2,83*
Довжина роstrу, см Rostrum length, cm	1,14	0,00	1,10
Ширина головогрудей, см Cephalothorax width, cm	2,85*	0,47	3,20*
Довжина головогрудей, см Cephalothorax length, cm	3,15	0,86	4,28*
Довжина черевця, см Abdomen length, cm	1,90	0,69	2,04
Ширина черевця біля початку плевр 3-го порядку, см Abdomen width at the beginning of pleuron of the 3 rd order, cm	2,43*	0,13	2,12
Довжина тельсона, см Telson length, cm	0,45	0,73	1,11
Ширина тельсона, см Telson width, cm	2,41*	0,14	2,27*
Маса, г / Weight, g	2,63*	1,16	2,97*

Примітка. К — Кам'янське водосховище; 3 — Запорізьке водосховище; С — Самарська затока.

Note. K — Kamyanske Reservoir; Z — Zaporizhzhia Reservoir; S — Samara bay.

Підтверджено, що самці раків, вилучені із Запорізького водосховища, характеризувалися більшою довжиною тіла — на 15% та 18% відповідно порівняно із самцями, вилученими з Кам'янського водосховища та Самарської затоки. Крім того, їхні головогруді були більшими на 18–20%, а маса раків — майже вдвічі більшою, ніж в особин з інших водойм (рис. 4).

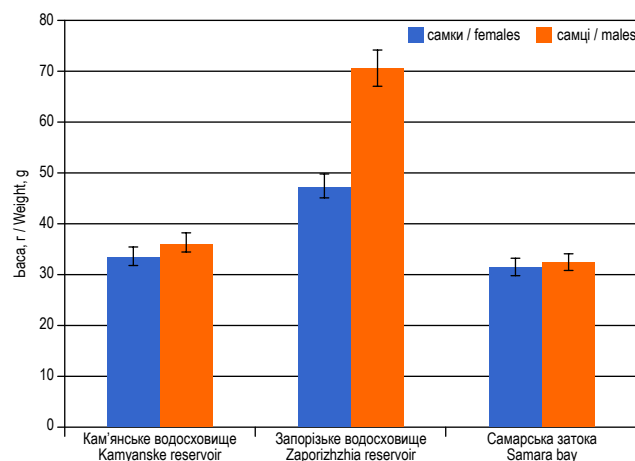


Рис. 4. Вагові показники раків, вилучених з різних водойм
Fig 4. Weight indicators of crayfish collected from different water reservoirs

Таблиця 4. Порівняльний аналіз морфометричних показників самців та самок раків Кам'янського водосховища

Table 4. Comparative analysis of morphometric parameters of males and females of crayfish from the Kamianske Reservoir

Показники Parameters	Самці Males	Самки Females	<i>t</i> -критерій Стюдента Student's <i>t</i> -test	Відсоток різниці, % Percentage difference, %
	M±m	M±m		
Повна довжина, см / Total length, cm	10,74±0,21	12,76±0,74	2,63*	15,83
Промислова довжина, см / Carapace length, cm	9,5±0,23	11,3±0,71	2,41*	15,93
Довжина роstrу, см / Rostrum length, cm	1,64±0,09	1,82±0,13	1,14	9,89
Ширина головогрудей, см / Cephalothorax width, cm	2,88±0,12	3,52±0,19	2,85*	18,18
Довжина головогрудей, см / Cephalothorax length, cm	5,74±0,23	6,88±0,28	3,15*	16,57
Довжина черевця, см / Abdomen length, cm	5,08±0,04	5,92±0,44	1,90	14,19
Ширина черевця біля початку плевр 3-го порядку, см Abdomen width at the beginning of pleuron of the 3 rd order, cm	2,32±0,1	2,7±0,12	2,43*	14,07
Довжина тельсона, см / Telson length, cm	1,56±0,12	1,64±0,13	0,45	4,88
Ширина тельсона, см / Telson width, cm	4,28±0,18	5,56±0,5	2,41*	23,02
Маса, г / Weight, g	36,44±2,84	70,73±12,73	2,63*	48,48

Результати статистичного аналізу морфометричних показників виявили, що між статевими групами раків (самиці та самці) спостерігаються вірогідні різниці. Наприклад, повна та промислова довжина самиць перевищували аналогічні показники у самців на 15,83–15,93%.

Самиці відрізнялися не лише більшою довжиною, але й шириною. Зокрема, ширина головогрудей самиць була більшою на 18,18%. Крім цього, порівняно з самцями, в самок раків спостерігали на 23,02% ширший тельсон і на 14,07% більшу ширину черевця біля початку плевр 3-го порядку.

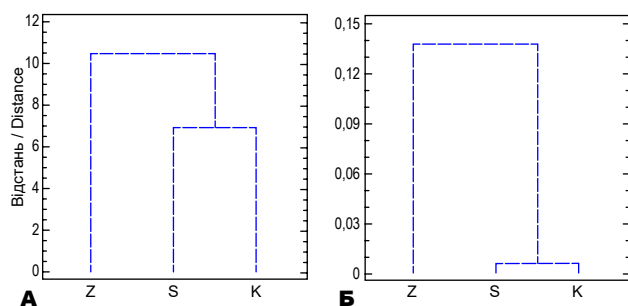


Рис. 5. Результати кластерного аналізу морфометричних показників раків різних водойм: А — самки, Б — самці. Z — Запорізьке водосховище, S — Самарська затока, K — Кам'янське водосховище

Fig. 5. Results of morphometric parameters cluster analysis in crayfish from different water reservoirs: A — females, Б — males. Z — Zaporizhzhia reservoir, S — Samara bay, K — Kamyanske reservoir

Для зведення результатів морфометричного аналізу та виділення головних критеріїв подібності та різниці біологічних показників раків із різних водойм Дніпропетровщини доцільним є використання методу кластерного аналізу. Цей метод базується на узагальненні основних закономірностей лінійно-вагових показників досліджуваних раків. Результати аналізу представлені у вигляді дендрограми (рис. 5).

За результатами кластерного аналізу простежили, що як самки, так і самці, вилучені із Запорізького водосховища, відрізнялися за морфометричними показниками від раків, вилучених із Самарської затоки та з Кам'янського водосховища. На сьогодні можна стверджувати, що відмінності між лінійно-ваговими показниками досліджуваних особин можуть бути спричинені антропогенними чинниками, оскільки обидві водойми утвореного кластеру (Самарська затока та Кам'янське водосховище) впродовж багатьох років характеризуються як екологічно незадовільні через комплексний вплив антропогенних чинників.

У результаті дослідження визначили, що серед самців раків, вилучених із Запорізького водосховища, відповідно, на 15% та 18% більша довжина тіла порівняно з вилученими з Кам'янського водосховища та Самарської затоки. Крім того, їхні головогруді більші на 18–20%, а маса раків — практично на 50% вища, ніж в особин з інших водойм.

Проведені дослідження свідчать про вірогідні морфологічні відмінності між самцями та самками раків. Повна та промислова довжини самиць перевищували аналогічні показники у самців на 15,83–15,93%. Ширина головогрудей самиць також була більшою на 18,18%. В самок раків спостерігали на 23,02% більший розмір тельсона і на 14,07% більшу ширину черевця біля початку плевр 3-го порядку. Ці характеристики, ймовірно, пов'язані з репродуктивною функцією черевця та тельсона, зокрема зі зберіганням, захистом, виношуванням та аерацією ікри і молодняку раків.

За результатами кластерного аналізу встановлено, що як самки, так і самці, вилучені із Запорізького водосховища, за морфометричними показниками відрізнялися від раків, вилучених із Самарської затоки та з Кам'янського водосховища. Визначена розбіжність може вказувати на неоднорідність середовища існування раків у водоймах Дніпропетровської обл., імовірна причина цього — різний ступінь антропогенного навантаження.

Джерела

1. Brodsky SY. *Fauna of Ukraine. Higher Crustaceans*. Kyiv, Naukova dumka, 1981; 26 (3): 203. (in Ukrainian)
2. Brodsky SY. *Instructions for conducting work on crayfish and its fishery at observation points and in operations*. Kyiv, 1965: 26 p. (in Ukrainian)
3. Diamantino TC, Almeida E, Soares AMVM, Guilhermino L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*. 2001; 45 (4–5): 553–560. DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00029-7.
4. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. From 22.09.2010. *Official J. Eur. Un.* 2010; 276: 33–79. Available at: <https://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC098296>
5. Fedonenko OV, Yesipova NB, Sharamok TS, Marenkov OM. Hydroecological condition of the Kakhovka Reservoir. *Is. Bioind. Ecol. Zaporizhzhia: ZNU*, 2010; 15 (2): 214–222. (in Ukrainian)
6. Fedonenko OV, Sharamok TS. Anthropogenic impact of heavy metals on the ecosystem of the Zaporizhzhia (Dnipro) Reservoir. *Probl. Ecol. Nature Conserv. Technogen. Region*. 2010; 1: 173–177. (in Ukrainian)
7. Hendel NV. Regulation of animal experimentation: international and national legal standards. *Ukr. J. Intern. Law. Special Issue: International Legal Standards for the Treatment and Protection of Animals and Ukraine's Practice*. 2013: 71–74. Available at: https://jusintergentes.com.ua/archives/animals_2013.pdf (in Ukrainian)
8. Marenkov OM, Prychepa MV, Kovalchuk J. The influence of heavy metal ions on the viability and metabolic enzyme activity of the marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017). *Intern. Lett. Nat. Sci.* 2018; 70: 11–23. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.70.11.
9. Mashkova KA, Sharamok TS. Analysis of heavy metal content in water and muscles of crucian carp (*Carassius gibelio*) in the Samara river of the Dnipropetrovsk region. *Bull. Sumy Nat. Agr. Univer. Ser. Agron. Biol.* 2022; 48 (2): 124–130. DOI: 10.32845/agrobio.2022.2.17. (in Ukrainian)
10. Mezhzherin SV, Kostyuk VS, Zhalai EI. Allozyme and morphological evidence for the reality of two sympatric species of freshwater crayfish within *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (*Decapoda: Astacidae*). *Rep. NAS Ukraine*. 2012; 9: 131–135. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/dnanu_2012_9_23 (in Ukrainian)
11. Mezhzherin SV, Kostyuk VS, Zhalai EI. Species composition, features of genetic structure, and morphological variability of freshwater crayfish populations *Astacus Fabricius*, 1775 in the Southeast of Ukraine. *Sci. Bull. Uzhhorod Univer. Ser. Biol.* 2012; 33: 133–136. (in Ukrainian)
12. Naboka A, Marenkov OM, Kovalchuk J, Shapovalenko Z, Nesterenko OS, Dzhibolda B. Parameters of the histological adaptation of marmorkrebs *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) (*Decapoda, Cambaridae*) to manganese, nickel and lead ions pollution. *Intern. Lett. Nat. Sci.* 2018; 70: 24–33. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.70.24. (in Ukrainian)

13. Regulations on the Committee on Ethics (Bioethics). Regulatory document of the Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from November 19, 2012 no. 1287. Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1287736-12> (in Ukrainian)
14. Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD. *Atlas of Crayfish in Europe*. Paris, Muséum national d'Histoire naturelle, 2006: 187 p. Available at: <https://sciencepress.mnhn.fr/en/collections/patrimoines-naturels/atlas-crayfish-europe>
15. Ulman EZ. Biological condition of the crayfish population in the Kyiv Reservoir. *Fisher. Sci. Ukr.* 2009; 3 (9): 39–42. Available at: <https://fsu.ua/index.php/uk/2009/3-2009-9/2009-03-039-042> (in Ukrainian)
16. Yesipova N, Hudym N. Hydroecological monitoring of the Zaporizhzhia (Dnipro) reservoir. 11th Intern. Sci. Pract. Conf. "International Forum: Problems and Scientific Solutions", April 6–8, 2023, Melbourne, Australia. *InterConf.* 2023; 149: 271–275. Available at: <https://archive.interconf.center/index.php/conference-proceeding/article/view/2925> (in Ukrainian)

Analysis of linear-weight parameters of narrow-clawed crayfish (*Astacus*) in water reservoirs of Dnipropetrovsk region

I. I. Borovyk, O. M. Marenkov
vanbor17@gmail.com

Oles Honchar Dnipro National University, 72 Gagarina ave., Dnipro 49010, Ukraine

This research focuses on studying the narrow-clawed crayfish in the Dnipropetrovsk region. The narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus*, is a crucial component of industrial fisheries and plays a significant role in the development of aquatic ecosystems. Within the territory of the Dnipropetrovsk region, crayfish inhabit various freshwater bodies, including rivers, lakes, floodplains, and ponds. It is known that water bodies in the Dnipro region undergo substantial anthropogenic impact, leading to alterations in the life cycles and reproductive features of hydrobionts. Investigated areas of reservoirs were characterized by diverse levels and factors of pollution, such as contamination of water with chemical and radioactive substances, oil products, wastewater, and the use of nitrogen and phosphorus fertilizers. These anthropogenic interventions may result in a decrease in populations of aquatic organisms, posing a serious threat to water ecosystems. The sensitivity to environmental changes makes crayfish a valuable bioindicator species. Fertility indicators and morphometric characteristics can be considered as bioindicators. The analysis of linear-weight parameters revealed that crayfish extracted from the Zaporizhzhia Reservoir had a body length 15–18% greater than those from the Kamianske and Samara Bay. Additionally, they exhibited larger cephalothorax dimensions by 18–20%, and their mass was almost 50% higher compared to individuals from other water bodies. Samara Bay demonstrated significantly lower fertility indicators compared to the Zaporizhzhia Reservoir, with crayfish fertility being reliably 63% lower. The established differences in morphometric indicators between crayfish from the Zaporizhzhia Reservoir, Samara Bay and Kamianske Reservoir may indicate heterogeneity in the living conditions within the water bodies of Dnipropetrovsk and might be induced by anthropogenic pressures.

Key words: crayfish, morphometry, linear-weight parameters, cluster analysis, reservoirs, fertility, *Astacus*, decapod crustaceans, bioindication, ecological state



Effect of 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on parietal intestinal microbiota of rats during induced inflammation process *in vivo*

T. Rumynska^{1,2}, G. Lavryk¹
tanityshka.r@ukr.net



¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69 Pekarska str., Lviv 79010, Ukraine

²Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stus str., Lviv 79034, Ukraine

ORCID:

T. Rumynska <https://orcid.org/0000-0002-0669-5865>

H. Lavryk <https://orcid.org/0000-0002-6470-1653>

Authors' Contributions:

RT: Methodology; Investigation; Data curation; Formal analysis; Validation; Funding acquisition; Visualization; Writing — original draft.

LH: Visualization; Writing — original draft; Formal analysis.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the Commission on Ethics of Scientific Research, Experimental Developments and Scientific Works of the Danylo Halytskyi LNMU (Protocol no. 10 from 20.12.2021, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

This study was funded by the Ministry of Health of Ukraine, grant number: 0123U100153.

The authors are grateful to the Armed Forces of Ukraine for the opportunity to engage in scientific work during the war. We express our gratitude to R. B. Lesyk, head of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry of Danylo Halytskyi LNMU, and I. M. Yushin for the synthesis of the compound.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, which are widely used in the treatment of diseases accompanied by pain and fever, can cause diseases of the gastrointestinal tract and are associated with disturbances of the intestinal microbiota. The search for new compounds that could affect the community of microorganisms, exhibiting antimicrobial and anti-inflammatory effects, is an important task of modern medicine and veterinary medicine. One of the promising molecules that have such effects are 4-thiazolidinone derivatives. The aim of this study was to analyze the effect of the newly synthesized compound *Les6490* and drug nimesulide on the intestinal wall microbiota of rats *in vivo* under the conditions of Freund's adjuvant-induced inflammatory process. The study of the effect of the above-mentioned drugs on the intestinal microbiota *in vivo* was carried out on a biomodel of rats, which were intragastrically administered with the test substances for two weeks. The study material was the parietal mucosa of the small intestine, the microbiome of which was studied using 16S rRNA sequencing. Metagenomic analysis made it possible to analyze the types of microorganisms in experimental groups with induced inflammation (groups A and AL) and without it (groups K, L, N). It was established that the composition of the microbiome of the intestinal tract of rats changes under the conditions of induced inflammation and under the action of the compound *Les6490* (groups A and L) in comparison with the control group (group K). The influence of *Les6490* on the intestinal tract microbiome composition in rats is similar to that of nimesulide, but the effect is more pronounced. The compound *Les6490* potentiates the growth of *Helicobacter* and has an effect against *Stenotrophomonas* in the group without induced inflammation (group L), but in the group of inflammation (group AL) no such effect is observed. The compound alone (not in inflammation models) leads to increased species diversity of the rat gut microbiome.

Key words: microbiome, inflammatory process, 4-thiazolidinone derivative, 16S rRNA sequencing, intestinal microbiota, rats

Introduction

The gut microbiota is a collection of microorganisms inhabiting the gastrointestinal tract (GI), which begins to form after birth and is characterized by age and popula-

tion characteristics. It contains trillions of microorganisms belonging to hundreds of species, exceeding the number of cells in the human body [20]. It includes bacteria, fungi, viruses and other microorganisms. The intestinal microbiota participates in important physiological functions of the

gastrointestinal tract, including motility, biotransformation of nutrients, immunomodulation and development of immunotolerance, synthesis of many biologically active substances, in particular those that are not produced in the body and do not come from the outside. Metabolites produced by the intestinal microbiota, in particular short-chain fatty acids (SCFAs), participate in important biochemical and physiological processes — they provide the energy needs of the intestinal epithelium, regulate smooth muscle motility, influence the level of pituitary hormones, and prevent the malignant transformation of colonocytes [1]. The production of signaling molecules for neural circuits has also been revealed. These compounds play a key role in neurogenesis, mental and cognitive development, emotions and behavior, as well as in the progression of neuropsychiatric diseases [18, 19].

The intestinal microbiota produces some important biologically active activators of the immune system, on which the response to a possible pathogenic threat depends. Therefore, the microbiota of the intestinal canal is evaluated as an additional functionally active human organ [8]. Changes in the species composition and quantitative relationships between the components of the microbiota can act as an etiopathogenetic factor of diseases of the gastrointestinal tract and the other organs and systems, in particular, disrupt the regulatory mechanisms of immune protection [17, 37]. On the other hand, measures and drugs aimed at modulating the intestinal microbiota have a therapeutic effect [37]. Thus, the colonization of *Bacteroides fragilis* is associated with increased activity of regulatory T-cells, which can alleviate the course of autoimmune diseases [26, 31]. Several species of commensal gram-positive bacteria in the colon (the most common of them are *Faecalibacterium prausnitzii* and *Roseburia*) synthesize butyrate (one of the important SCFAs) [16], which intracellular accumulation is one of the protective mechanisms against carcinogenesis [27], or exhibits an anti-inflammatory effect in the mucous membrane [14]. Regulation of intestinal microbiota, in the direction of increasing the number of bacteria of the genera *Akkermansia* and *Bacteroides*, can facilitate the course of colitis [35]. Bacteria of *L. casei* CRL431 species contributed to the normalization of processes related to obesity, which was reflected in the indicators of specific biomarkers [17].

The gut microbiome has been shown to be important for maintaining immune homeostasis, can influence local adaptive immune responses, and modulate systemic inflammation [9]. Many studies point to a microbial imbalance in the gut in autoimmune diseases. For example, studies have shown a decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and type 1 diabetes [15]. The study [11] revealed an increase in the number of *Methanobrevibacter* and *Akkermansia* and a decrease in the number of *Butyrivibrio* in patients with multiple sclerosis. The other studies have shown a decrease quantity in *Faecalibacterium* and an increase in *Eggerthella* and *Collinsella* in patients with rheumatoid arthritis (RA) [4]. Also, a number

of authors indicate that the modulation of the intestinal microbiota has a positive effect on the course of RA [38, 17].

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are widely used in the treatment of diseases associated with pain and fever, are capable of causing CKD diseases that are associated with disturbances of the intestinal microbiota, which is indicated in a number of scientific works analyzed in the literature review [33].

The search for the new compounds that could affect the microbiological community, exhibit antimicrobial and anti-inflammatory effects, is an important task of modern medicine and veterinary medicine. Derivatives of 4-thiazolidinone are one of the promising molecules that potentially possess the mentioned properties [13].

The purpose of the conducted research was to analyze the impact of 4-thiazolidinone derivative (*Les6490*) and nimesulide (NSAID) on the intestinal wall microbiota of rats *in vivo* during Freund's adjuvant-induced inflammatory process.

Materials and Methods

Chemistry

The synthesis of the investigated compound was conducted at the Department of Pharmaceutical, Organic, and Bioorganic Chemistry, Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

The melting points were measured in open capillary tubes on a *BÜCHI B-545* melting point apparatus (*BÜCHI Labortechnik AG*, Flawil, Switzerland) and were uncorrected. The elemental analyses (C, H, N) were performed using the *Perkin-Elmer 2400 CHN* analyzer (*Perkin-Elmer*, Waltham, MA, USA) and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. The 500 MHz ^1H and 100 MHz ^{13}C NMR spectra were recorded on a *Varian Unity Plus 500* (500 MHz) spectrometer (*Varian Inc.*, Palo Alto, CA, USA). All spectra were recorded at room temperature, except where indicated otherwise, and were referenced internally to solvent reference frequencies. Chemical shifts (δ) are quoted in ppm and coupling constants (J) are reported in Hz. LC-MS spectra were obtained on a *Finnigan MAT INCOS-50* (*Thermo Finnigan LLC*, San Jose, CA, USA). The reaction mixture was monitored by thin layer chromatography (TLC) using commercial glass-backed TLC plates (*Merck Kieselgel 60 F254*, *Merck*, Darmstadt, Germany). Solvents and reagents that are commercially available were used without further purification. The thiazolidine-2,4-dione (*i*) and 1,3-diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde (*ii*) and were prepared according to the methods described in [10, 37] respectively.

General procedure for the synthesis of 5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione *Les6490*. A mixture of 0.01 mol of thiazolidine-2,4-dione (*i*), 0.011 mol of 1,3-diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde (*ii*) and 0.015 mol of ammonium acetate in 20 ml of toluene was heated under reflux for 5 h. Yellow crystalline precipitate was filtered off, washed with hexane,

and recrystallized from a mixture of DMF-ethanol (1:2). Yield: 85%, yellow crystal powder, mp 278–280°C (DMF-EtOH (1:2)). LC-MS (ESI+): *m/z* 348.0 (100.0%, [M+H]⁺). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H arom.), 7.47–7.59 (m, 6H, arom. + CH=), 7.63 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H arom.), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, arom.), 8.68 (s, 1H, CH, pyrazole), 12.52 (s, 1H, NH, thiazolidinone). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 115.9, 119.8, 122.5, 123.1, 127.9, 128.4, 129.2, 129.4, 130.1, 131.8, 154.1, 167.5 (C=O), 167.9 (C=O) [37].

Animals

The experimental work was performed on sexually mature non-linear white rats with an initial weight of 220±5.1 g, obtained from the vivarium of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University. Before the experiments, the rats were acclimatized for a week. They were allowed *ad libitum* access to water and a standard rodent diet and housed in an air-conditioned experimental animal room (temperature: 22–24°C, humidity 50–65%, and a 12-h light/dark cycle).

Research was conducted in accordance with the provisions of the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 2005), Directive 2010/63/EU Of The European Parliament And Of The Council and Law Of Ukraine No. 3447-IV on the Protection of Animals from Cruelty as amended by 440-IX dated 14.01.2020, according to protocol no. 10 dated 20.12.2021 of the meeting of the Commission on Ethics of Scientific Research, Experimental Developments and Scientific Works of the Danylo Halytskyi LNMU.

Modeling of the inflammatory process

In order to induce the inflammatory process, experimental animals were injected with Freund's adjuvant (AF) in a volume of 0.1 ml, subcutaneously in the plantar part of the hind limb [22, 24].

Study of gut microbiota

The study of the effect of the 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on the gut microbiota *in vivo* was carried out on a rat biomodel. The animals of the experimental group (n=30) with normal feeding received nimesulide (NSAID) at a dose of 15.0 mg/kg and a derivative of 4-thiazolidinone — *Les6490* (5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione) at a dose of 10 mg/kg intragastrically once a day during 14 days.

Table. Groups of rats involved in the experiment

Group number	Group name	Group description in the experiment	Investigated by 16sRNA sequencing
1	A	Freund's adjuvant	1
2	AL	Freund's adjuvant + <i>Les6490</i>	1
3	K	Control animals	1
4	L	<i>Les6490</i>	1
5	N	Nimesulide	1

After that, the animals were removed from the experiment by decapitation against the background of inhalation anesthesia with diethyl ether. *Les6490* and nimesulide were dissolved in *Tween 80* before administration. The studied material was the parietal mucus of the transverse colon (parietal microbiota) collected under aseptic conditions.

Rats were randomly divided into 5 groups of 6 rats per group (table). A total of 30 rats were involved, material samples (one from each group) were sent for 16s RNA sequencing (*Novogene*, Beijing, China).

In order to induce the inflammatory process, animals of the first (A) and second (AL) groups were injected with Freund's adjuvant (AF) in a volume of 0.1 ml subcutaneously in the plantar part of the hind limb. After the appearance of signs of inflammation on the 5th day, the animals of the 2nd group were given the *Les6490* compound. Group 3 (K) was control (intact animals). Group 4, 5 — animals without induced inflammation, which were intragastrically injected with the *Les6490* compound (group L) and nimesulide (group N) [20] for 14 days.

Sequencing of 16S rRNA

DNA extraction, sequencing, and microbiome quantification were performed by *Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd.* To study the composition of the microbial community in each sample, operational taxonomic units (OTUs) were obtained by clustering with 97% identity on the effective tags of all samples and then identified. The amplicon was sequenced on an Illumina paired-end platform to generate 250 bp paired-end reads (Raw PE), then combined and preprocessed to obtain clean tags.

Total genomic DNA from the samples was isolated by the CTAB/SDS method. DNA concentration and purity were monitored on a 1% agarose gel. According to the concentration, DNA was diluted to 1 ng/μL with sterile water. 16S rRNA genes were amplified using specific primers (16S V4: 515F-806R, etc.). All PCR reactions were performed using *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs).

Results and Discussion

The 4-thiazolidinone-bearing derivative *Les6490* (*iii*) has been synthesized by Knoevenagel condensation of 1,3-diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde (*i*) and thiazolidine-2,4-dione (*ii*) with satisfactory yield (85%) and purity (fig. 1).

Metagenomic analysis by 16S rRNA gene sequencing made it possible to combine the obtained separate FASTQ files, and the filtered sequences provided readings of at least 400 nucleotide sequences. This made it possible to cluster similar variants and to single out separate taxonomic units of the species and genus of bacteria.

The fig. 2 shows the alpha diversity of the intestinal microbiome by the number of detected species based on the Abundance-based coverage estimators index (ACE). The results show that with induced inflammation (group A)

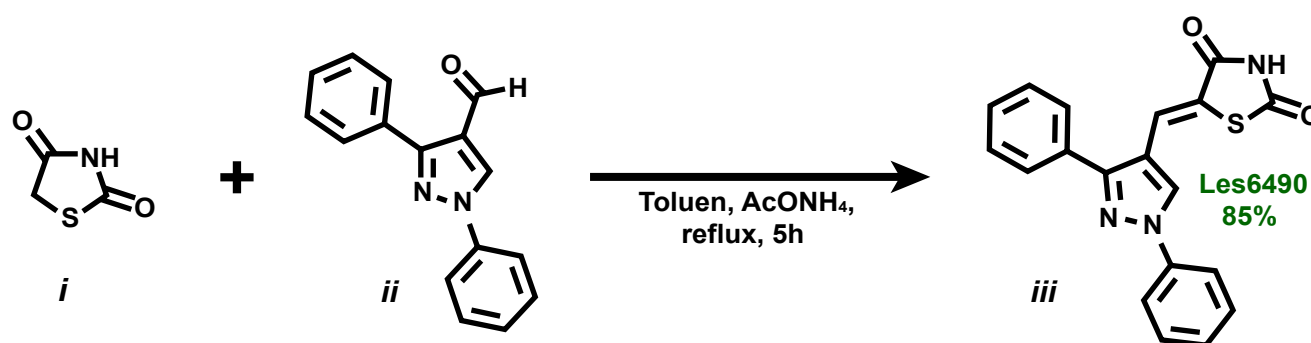


Fig. 1. Scheme of 5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione, *Les6490* synthesis

there is a decrease in the alpha diversity of the intestinal microbiota compared to the control, probably due to the action of pro-inflammatory cytokines [3]. In the AL group under the influence of *Les6490*, this effect is removed — alpha diversity in this group is higher than in the control, while in groups N (nimesulide) and L (*Les6490*) there is a slight increase in the index of alpha diversity.

The dendrogram of microbiota diversity at the level of types and classes (fig. 3) visualizes features close to those marked in fig. 2. In group A, *Proteobacteria* predominate with a significant decrease in the *Firmicutes* class compared to the control. At the same time, the indicators of groups A and AL are close to each other, but different from the control, which indicates the influence of the inflammatory process on the intestinal microbiome. The greatest alpha diversity was found in group L under the influence of *Les6490*, while nimesulide showed a much smaller effect (group N).

The results of the study of dominant taxa at the level of individual genera in the microbiomes of the intestinal canal of rats under experimental conditions are visualized in fig. 4. It is important that when using the indicated primers, about half of the genomes were identified.

Genomes of four genera of bacteria were identified in the control group. Representatives of the intestinal microbiota of the main genus, *Lactobacillus*, were found in the largest number. The genus *Stentotrophomonas* are weakly fermenting gram-negative bacteria that are found in water, soil, and plants, and can also cause opportunistic nosocomial infections [27]. The genomes of *Nitronomonas*, aerobic bacteria capable of oxidizing ammonia, and *Delftia* bacteria of the *Burkholderiaceae* family found in water, soil and the intestinal tract of animals and humans, were also discovered. Since they are able to metabolize various substances — xenobiotics, so they are recommended for use in bioremediation systems. However, some variants have virulence factors and are isolated in opportunistic diseases in humans and animals [36].

In animals with induced inflammation (groups A and AL), bacteria of the genus *Lactobacillus* were not detected or were detected in minimal quantities (group AL in which animals received *Les6490* compound against the background of an inflammatory process).

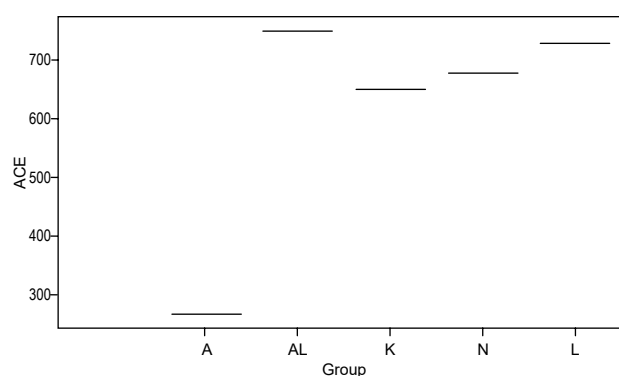


Fig. 2. Results of the ACE alpha-diversity index

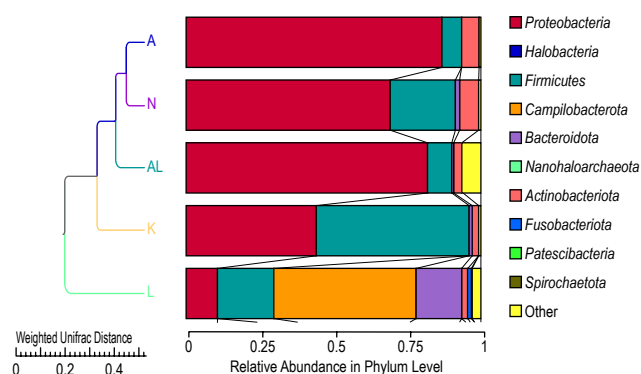


Fig. 3. Species diversity results at the phylum and class levels

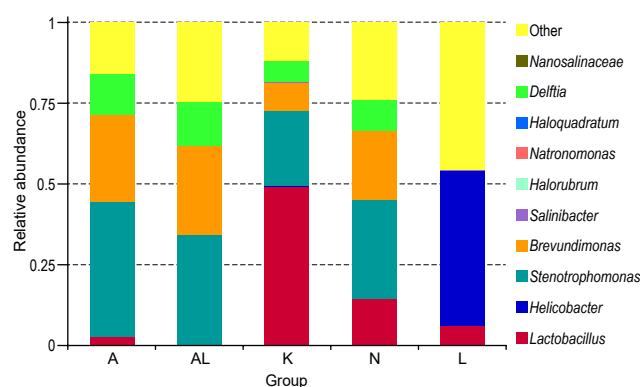


Fig. 4. Relative abundance of dominant tax

The most pronounced changes were found in animals of group L that received *Les6490*. Compared to the control, the relative number of bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Stenotrophomonas* decreased. However, in this group an increase in the number of *Helicobacter* was noted, which is not observed in the other studied groups. *Helicobacter* species easily colonize the surface of the gastrointestinal tract due to microaerophilic metabolism, spiral shape and special motility [29]. Depending on their location in the gastrointestinal system, they are divided into gastric *Helicobacteria* such as *Helicobacter pylori*, and entero-hepatic *Helicobacteria*, which mainly colonize the intestine and the hepatobiliary system and play a protective role in the development of certain autoimmune processes [25]. In addition, *Helicobacter* can induce the production of antibacterial peptides that counteract potentially harmful bacteria [34], or compete with bacteria for the same ecological niche. Bacteria of the *Delftia* genus were not detected in the animals of this group. In animals of groups A, AL and N, the number of these bacteria was approximately the same, although slightly higher than in the control. Therefore, the fact of the absence of genetic sequences in bacteria of the *Delftia* genus isolated from animals that received the drug *Les6490* (group L) requires the additional study. The obtained results indicate an alteration of the composition of the intestinal microbiome in the animals of this group.

The composition of the microbiota of animals from group N that received nimesulide was also characterized by certain features. A relatively smaller number of lactobacilli was noted in the intestinal microbiome of these animals compared to the control and group L. In contrast to the L group, the composition of the N group was dominated by bacteria of the genera *Stenotrophomonas* and *Brevundimonas* characterized by the synthesis of carotenoids, which can act as antioxidants, but it is very difficult to synthesize them chemically [21]. However, their number did not differ significantly from groups A and AL. Therefore, the studied compound *Les6490* and nimesulide differed in their effect on the composition of the microbiota in rats under the experiment conditions.

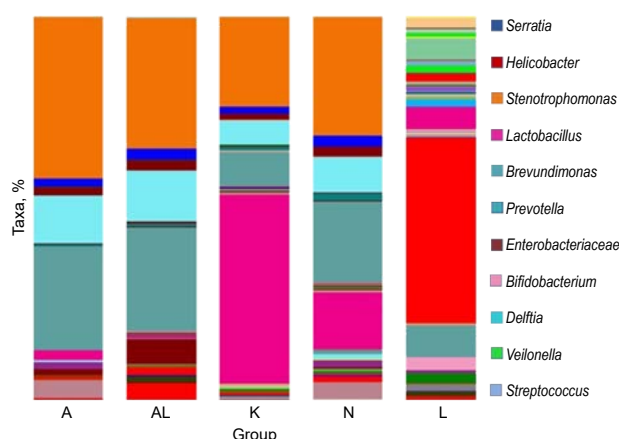


Fig. 5. Taxonomic composition of the intestinal microbiome in rats

The results of the study of the relative amounts of bacterial taxa at the species level are shown in fig. 5. When comparing these results with the previous ones, it should be taken into account that the composition of higher-order taxa may include a different number of lower taxa. However, such properties of microbiota as competitive ability, production of signaling molecules and pathogenicity factors, etc., are manifested precisely at the level of individual species or variants of one species of microorganisms. The results of visualization of the relationships between species and genera in the intestinal microbiome of experimental animals showed that the greatest diversity was found in group L rats, that received the compound *Les6490*. Bacteria of the genus *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Helicobacter* were found in this group, which are absent or found in slightly smaller quantities in the other groups of animals. On the other hand, in this group, the number of bifidobacteria is reduced and bacteria of the *Serratia* genus are absent. In group N, compared to group L, the number of bifidobacteria is higher, but lower than in the control group. In the groups of animals with induced inflammation, the number of bifidobacteria is also significantly lower than in the control and in group N. It should be taken into account that bifidobacteria are considered and used as probiotics, which have the ability to suppress the growth of pathogenic bacteria and regulate the immune response. Thus, the present studies show the development of changes in the components of the microbiome of the intestinal canal both during the induced inflammatory process and during inflammation against the background of the introduction of *Les6490*. But the most expressive changes were found in animals under the influence of the newly synthesized substance *Les6490* and, partially, nimesulide.

The composition of the microbiomes of the intestinal tract changes under the conditions of induced inflammation and under the action of the newly synthesized compound *Les6490* in comparison to the control group. The compound *Les6490* affects the microbiome composition of the intestinal tract of rats in a similar way to the NSAID nimesulide, but this effect is more pronounced. The compound *Les6490* potentiates the growth of *Helicobacter*, inhibits *Stenotrophomonas* and generally promotes the development of greater species diversity of the gut microbiome.

References

1. Anachad O, Taouil A, Taha W, Bennis F, Chegiani F. The implication of short-chain fatty acids in obesity and diabetes. *Microbiol. Insights*. 2023; 16. DOI: 10.1177/11786361231162720.
2. Ather AQ, Tahir MN, Khan MA, Mehmood K, Chaudhry F. 1,3-Diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde. *Acta Cryst*. 2010; 66 (12): o3170. DOI: 10.1107/S1600536810045630.
3. Bander ZA, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The gut microbiota and inflammation: An overview. *IJERPH*, 2020; 17 (20): 7618. DOI: 10.3390/ijerph17207618.

4. Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta EV, Murray J, Nelson H, Matteson EL, Taneja V. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2016; 8 (1): 43. DOI: 10.1186/s13073-016-0299-7.
5. Dong Y, Yao J, Deng Q, Li X, He Y, Ren X, Zheng Y, Song R, Zhong X, Ma J, Shan D, Lv F, Wang X, Yuan R, She G. Relationship between gut microbiota and rheumatoid arthritis: A bibliometric analysis. *Front. Immunol.* 2023; 14. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1131933.
6. Eissa MM, Mostafa DK, Ghazy AA, El azzouni MZ, Boulos LM, Younis LK. Anti-arthritis activity of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* derived-antigens in adjuvant arthritis in rats: Role of FOXP3⁺ Treg Cells. *PLoS One.* 2016; 11: e0165916. DOI: 10.1371/journal.pone.0165916.
7. Engevik MA, Danhof HA, Ruan W, Engevik AC, Chang-Graham AL, Engevik KA, Shi Z, Zhao Y, Brand CK, Krystofiak ES, Venable S, Liu X, Hirschi KD, Hyser JM, Spinler JK, Britton RA, Versalovic J. *Fusobacterium nucleatum* secretes outer membrane vesicles and promotes intestinal inflammation. *mBio.* 2021; 12 (2): e02706-20. DOI: 10.1128/mBio.02706-20.
8. Goodrich JK, Davenport ER, Clark AG, Ley RE. The relationship between the human genome and microbiome comes into view. *Annu. Rev. Genet.* 2017; 51: 413–433. DOI: 10.1146/annurev-genet-110711-155532.
9. He J, Chu Y, Li J, Meng Q, Liu Y, Jin J, Wang Y, Wang J, Huang B, Shi L, Shi X, Tian J, Zhufeng Y, Feng R, Xiao W, Gan Y, Guo J, Shao C, Su Y, Hu F, Sun X, Yu J, Kang Y, Li Z. Intestinal butyrate-metabolizing species contribute to autoantibody production and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Sci. Adv.* 2022; 8 (6): eabm1511. DOI: 10.1126/sciadv.abm1511.
10. Ivasechko I, Yushyn I, Roszczenko P, Senkiv J, Finiuk N, Lesyk D, Holota S, Czarnomysy R, Klyuchivska O, Khylyuk D, Kashchak N, Gzella A, Bielawski K, Bielawska A, Stoika R, Lesyk R. Development of novel pyridine-thiazole hybrid molecules as potential anticancer agents. *Molecules.* 2022; 27 (19): 6219. DOI: 10.3390/molecules27196219.
11. Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçulu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, De Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 2016; 7: 12015. DOI: 10.1038/ncomms12015.
12. Kamel KM, Gad AM, Mansour SM, Safar MM, Fawzy HM. Venlafaxine alleviates complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats: Modulation of STAT-3/IL-17/RANKL axis. *Life Sci.* 2019; 226: 68–76. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.03.063.
13. Konechnyi Y, Lozynskyi A, Ivasechko I, Dumych T, Paryzhak S, Hrushka O, Partyka U, Pasichnyuk I, Khylyuk D, Lesyk R. 3-[5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-propionic acid as a potential polypharmacological agent. *Sci. Pharm.* 2023; 91 (1): 13. DOI: 10.3390/scipharm91010013.
14. Li G, Lin J, Zhang C, Gao H, Lu H, Gao X, Zhu R, Li Z, Li M, Liu Z. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut Microb.* 2021; 13 (1): 1968257. DOI: 10.1080/19490976.2021.1968257.
15. López P, de Paz B, Rodríguez-Carrio J, Hevia A, Sánchez B, Margolles A, Suárez A. Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24072. DOI: 10.1038/srep24072.
16. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12: 661–672. DOI: 10.1038/nrmicro3344.
17. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *New Engl. J. Med.* 2016; 375 (24): 2369–2379. DOI: 10.1056/NEJMra1600266.
18. Mitrea L, Nemeş SA, Szabo K, Teleky BE, Vodnar DC. Guts imbalance imbalances the brain: A review of gut microbiota association with neurological and psychiatric disorders. *Front. Med.* 2022; 9: 813204. DOI: 10.3389/fmed.2022.813204.
19. Morrison KE, Jašarević E, Howard CD, Bale TL. It's the fiber, not the fat: significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. *Microbiome.* 2020; 8 (1): 15. DOI: 10.1186/s40168-020-0791-6.
20. NIMESULIDE: instruction, use of NIMESULIDE 100 mg. Normative and directive documents of the Ministry of Health of Ukraine. Available at: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=228>
21. Nishida Y, Adachi K, Kasai H, Shizuri Y, Shindo K, Sawabe A, Komemushi S, Miki W, Misawa N. Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'-beta-hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71 (8): 4286–4296. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4286-4296.2005.
22. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The genus *alisticipes*: Gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front. Immunol.* 2020; 11: 906. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00906.
23. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S., Surana SJ, Ojha S, Patil CR. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *IJMS.* 2019; 20 (18): 4367. DOI: 10.3390/ijms20184367.
24. Patil KR, Patil CR. Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. *J. Tradit. Complement. Med.* 2016; 7 (1): 86–93. DOI: 10.1016/j.jtcme.2016.02.001.
25. Ram M, Barzilai O, Shapira Y, Anaya JM, Tincani A, Stojanovich L, Bombardieri S, Bizzaro N, Kivity S, Agmon Levin N, Shoenfeld Y. *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases — fact or fiction? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51 (5): 1075–1082. DOI: 10.1515/ccm-2012-0477.
26. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, Mazmanian SK. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science.* 2011; 332 (6032): 974–977. DOI: 10.1126/science.1206095.
27. Said MS, Tirthani E, Lesho E. *Stenotrophomonas maltophilia*. In: *StatPearls*. Treasure Island, StatPearls Publ., 2024. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572123>
28. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the intestinal epithelium: Modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. *Cells.* 2021; 10 (7): 1775. DOI: 10.3390/cells10071775.
29. Sonnenberg A. Protective role of *Helicobacter pylori* against inflammatory bowel disease: a hypothesis. *Pract. Gastroenterol.* 2009; 33: 23–33. Available at: <https://www.ficomputing.net/pdf/September09/SonnenbergArticle.pdf>
30. Sonnenberg A. Review article: historic changes of *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2013; 38 (4): 329–342. DOI: 10.1111/apt.12380.
31. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, Begum-Haque S, Kasper DL, Kasper LH. A commensal symbiotic factor derived from bacteroides fragilis promotes human CD39⁺Foxp3⁺ T cells and *t_{reg}* function. *Gut Microb.* 2015; 6 (4): 234–242. DOI: 10.1080/19490976.2015.1056973.
32. Turkevych NM, Vvedenskij VM, Petlichnaya LP. Method of obtaining pseudothiohydantoin and thiazolidinedione-2,4. *Ukr. Khim. Zh.* 1961; 27: 680–681. Reprinted in: *Chem. Abstr.* 1962; 56: 73455.
33. Wang X, Tang Q, Hou H, Zhang W, Li M, Chen D, Gu Y, Wang B, Hou J, Liu Y, Cao H. Gut microbiota in NSAID enteropathy: New insights from inside. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 679396. DOI: 10.3389/fcimb.2021.679396.
34. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevens CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; 2: 406–415. DOI: 10.1038/ncpgasthep0265.

35. Yang H, Cai R, Kong Z, Chen Y, Cheng C, Qi S, Gu B. Teasapoin ameliorates murine colitis by regulating gut microbiota and suppressing the immune system response. *Front. Med.* 2020; 7: 584369. DOI: 10.3389/fmed.2020.584369.
36. Yin Z, Liu X, Qian C, Sun L, Pang S, Liu J, Li W, Huang W, Cui S, Zhang C, Song W, Wang D, Xie Z. Pan-genome analysis of *Delftia tsuruhatensis* reveals important traits concerning the genetic diversity, pathogenicity, and biotechnological properties of the species. *Microbiol. Spectr.* 2022; 10 (2): e0207221. DOI: 10.1128/spectrum.02072-21.
37. Yushyn I, Holota S, Ivantsiv O, Lesyk R. *rel-2*-[4-Chloro-2-[(5R,6R,7S)-6-[5-(4-methoxyphenyl)-3-(2-naphthyl)-3,4-dihydropyrazole-2-carbonyl]-5-methyl-2-oxo-3,5,6,7-tetrahydrothiopyrano[2,3-d]thiazol-7-yl]phenoxy]acetic acid. *Molbank.* 2022; 2022: M1410. DOI: 10.3390/M1410.
38. Zhao T, Wei Y, Zhu Y, Xie Z, Hai Q, Li Z, Qin, D. Gut microbiota and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to novel therapeutic opportunities. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1007165. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1007165.

Вплив похідної 4-тіазолідинону та німесуліді на парієтальну кишкову мікробіоту щурів за індукованого запального процесу *in vivo*

Т. М. Руминська^{1,2}, Г. С. Лаврик¹
tanityshka.r@ukr.net

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010, Україна

²Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Нестероїдні протизапальні препарати, які широко застосовуються у лікуванні хвороб, що супроводжуються болем та гарячкою, здатні спричиняти захворювання шлунково-кишкового каналу і асоціюються з порушеннями кишкової мікробіоти. Пошук нових сполук, які б могли впливати на спільноту мікроорганізмів, проявляти протимікробну та протизапальну дію, є важливим завданням сучасної медицини та ветеринарії. Одними із перспективних молекул, які проявляють такі ефекти, є похідні 4-тіазолідинону. Метою дослідження було проаналізувати вплив новосинтезованої сполуки *Les6490* та німесуліді на пристінкову мікробіоту кишки щурів *in vivo* за умов індукованого запального процесу ад'ювантом Фрейнда. Експериментальне дослідження проводили на щурах, яким інтрагастрально впродовж двох тижнів вводили досліджувані речовини. Матеріалом для дослідження слугував пристінковий слиз тонкої кишки, мікробіом якого вивчали за допомогою секвенування 16S рРНК. Метагеномний аналіз дав можливість проаналізувати види мікроорганізмів у дослідних групах з індукованим запаленням (групи А та АL) та без запалення (групи К, L, N). Встановлено, що склад мікробіому кишкового тракту щурів змінюється в умовах індукованого запалення та за дії сполуки *Les6490* (групи А та L) якщо порівнювати з контрольною групою (група К). Вплив сполуки *Les6490* на склад мікробіому кишкового каналу щурів подібний до німесуліді, але її дія є вираженішою. Сполука *Les6490* сприяє збільшенню кількості бактерій роду *Helicobacter* та пригнічує ріст *Stenotrophomonas* у групі без індукованого запалення (група L), натомість у групі із запаленням (група АL) такого ефекту не спостерігали. Сама по собі сполука (не в моделях із запаленням) призводить до збільшення видової різноманітності мікробіому кишки щурів.

Ключові слова: мікробіом, запальний процес, похідна 4-тіазолідинону, секвенування 16S рРНК, мікробіота кишківника, щури



The influence of heat stress on the antioxidant protection glutathione link and the content of lipid peroxidation products in chicken liver

D. B. Perederiy
peredina0310@gmail.com



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

ORCID:

D. B. Perederiy <https://orcid.org/0000-0002-9759-3513>

Authors' Contributions:

PDB: Investigation; Methodology; Statistics; Data curation; Formal analysis; Visualization; Writing — original draft, review and editing.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Bioethics of the Institute of Animal Biology NAAS (Protocol no. 115 from 28.09.2022, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

None.

Heat stress is one of the main reactions of the body's response to environmental factors, negatively affecting the welfare of various animal species. An increase in environmental temperature can cause stress, which, in turn, potentially has various negative consequences for animals including disruption of the antioxidant system functioning. Violating the antioxidant-prooxidant balance can lead to an increased free radicals formation in the body, which can damage cells and promote the development of various diseases. The article presents the study results of the artificially simulated heat stress effect on individual indicators of the antioxidant system and lipid peroxidation products in the chickens' liver. The choice of these animals for this study is due to the fact that the poultry is particularly sensitive to the elevated environmental temperatures and, accordingly, to heat stress. This is caused by the biological peculiarities of birds, in particular, they lack sweat glands, and their body surface is mostly covered with feathers, which, together with the high density of keeping in the industrial poultry farming, often leads to the heat stress. The purpose of this work was to find out the presence or absence of changes in individual indicators of the antioxidant system glutathione link and the lipid peroxidation products content in chickens' liver. The analysis of indicators such as lipid hydroperoxides (LOOH), TBA-active products, reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GR) will allow us to obtain information about the body's antioxidant defense system state and the oxidative stress level under heat stress conditions. In this study we used 18 hens of the white Leghorn breed. The research was conducted in the vivarium of the Institute of Animal Biology of the National Academy of Sciences in two stages. During the first stage, chickens were kept at an air temperature of 20°C for 7 days. During the second stage, we created heat stress conditions by increasing the temperature to 35°C 6 hours a day, also for 7 days. It has been found that as the ambient temperature increased, the content of LOOH, GSH, and activity of GSH-Px in the liver of chickens increased ($P < 0.01$), while, on the contrary, the content of TBA-active products and activity of GR decreased ($P < 0.01$). The obtained data prove the heat stress effect on the antioxidant protection glutathione link in chicken liver. Research results can be of practical value for improving the bird keeping conditions in the industrial poultry farming, developing strategies for protection against stress, and improving the conditions to ensure the animals' welfare and health.

Key words: chickens, liver, heat stress, oxidative stress, antioxidant defense system



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Introduction

Recently, the influence of climatic anomalies, changes, and fluctuations has become a great challenge in many areas of human activity, especially agriculture and, in particular, animal husbandry. Today, most countries of the world, including Ukraine, suffer significant economic losses due to the problems of high temperatures in various technological processes of raising agricultural animals. Such temperature regime violations often lead to heat stress in animals, which, in turn, harms their health, reproductive ability, and productive indicators. Heat stress (HS) is a condition in which animals cannot maintain a balance between the heat production and release. HS in chickens occurs when their body temperature rises to a dangerous level. This can happen due to high air temperature, humidity, or the combination of both factors. Poultry is particularly susceptible to HS due to its biological peculiarities — intensive metabolism level, increased heat production, rapid growth, and high productivity level. This imbalance can be caused by changes in the environmental factors combination (e.g. sunlight, thermal radiation, air temperature, humidity, and motion) and animal characteristics (e.g. species, sex, and metabolic rate) [20]. Among these factors, high ambient temperature plays the major role in the HS occurrence [23]. For optimal chickens' growth the thermoneutral zone is 18–21°C [26], and for laying hens the perfect environmental temperature ranges from 21 to 28°C [7]. Although there are data that any ambient temperature higher than 25°C already causes HS in poultry [21].

When the bird's body tries to maintain its thermal homeostasis, it simultaneously increases the level of reactive oxygen species (ROS). Many radicals and metabolites are described as found to be toxic and start as "reactive oxygen species" [16]. ROS are partially reduced oxygen metabolites, such as superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals [11]. Oxidized molecules pull electrons away from other molecules, causing a chain reaction that, if left unchecked, can cause significant tissue damage. As a result, the body enters the oxidative stress (OS) stage — a disproportion between antioxidants and free radicals in the system of elements. Antioxidants (AO) are substances that, on the contrary, prevent the oxidation of other molecules [2], meanwhile the free radicals are molecules containing active oxygen and precisely they cause the cell molecules oxidation. Increased ROS release is harmful, it intensifies muscle aging and protein degradation. ROS are highly reactive and can modify biologically active cellular macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids [8, 10].

Despite numerous diverse pathological changes caused by heat stress, at the physiological level, many of the observed effects are the result of OS [9, 22]. This was confirmed by previous studies on poultry [13, 37]. Oxidative phenomena lead to the development of many metabolic dysfunctions, including OS, which can cause cell death [16]. In addition, OS can alter the redox balance

of several cellular redox couples — e.g. reduced glutathione (GSH), and glutathione disulfide (GSSG), leading to altered expression of key enzymes in detoxification, antioxidant defense, cellular transitions, inflammatory responses, etc.

It is known that in chickens, acute stress induces the ROS production, disrupting the mitochondria function, which leads to a decrease in the aerobic fat and glucose metabolism and an increase in glycolysis, which ultimately leads to poor quality of chicken meat [13]. The body protects itself from the adverse effects of ROS using two important mechanisms, which are: the regulation of membrane permeability and the antioxidant system (AS) [1, 27]. This system protects cells from oxidative damage to proteins, lipids, and DNA [3, 5]. AS biochemical elements include both non-enzymatic low-molecular components — e.g. vitamin C, reduced glutathione (GSH) and uric acid, and enzymatic high-molecular substances — e.g. superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), catalase (CAT). The SOD enzyme absorbs the superoxide radical, which is vital for creating a defense mechanism against ROS [18]. It is responsible for the dismutation of free radicals to water peroxide; after that, GSH-Px and CAT split water peroxide into water and oxygen molecules, creating inactive radicals [27, 36]. Heat stress has been shown to decrease cellular ROS levels in several animal models [19]. They limit the oxidation rate and progression, thereby protecting cells from oxidative damage. And already after cell damage, the recovery mechanisms are activated [13].

According to recent scientific studies, it has been established that an increase in ambient temperature above the physiological optimum can cause oxidative damage to the liver tissues in birds, which further disrupts lipid metabolism [12]. When chickens are exposed to HS, the content of free radicals in their bodies increases, while the AO enzymes activity and their ability to absorb free radicals decrease [24]. Mitochondria are both a major generator of cellular ROS and a highly sensitive target for the damage they cause. Accordingly, the mitochondrial function disruption and the subsequent effect on systemic metabolism and energy balance are the main determinants of the HS effect on the birds' liver [25]. Therefore, HS, frequently occurring in chickens and other types of commercial poultry, creates a big problem for poultry farming, especially in conditions of global warming, because, unfortunately, in the upcoming decades they predict only the climatic anomalies frequency rising and increase in heat loads [35]. Due to the above, it is important to deepen research of the physiological and biochemical mechanisms in the heat stress influence on various metabolism links in chickens, to search for biochemical markers of heat stress, as well as ways to mitigate it and reduce its negative effects.

This study aimed to investigate the status of the glutathione system specific parameters — the content of reduced glutathione (GSH), the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), as well

as the content of lipid peroxidation products — TBA-active products and lipid hydroperoxides (LOOH) in chicken liver homogenates under normal temperature conditions and heat stress simulated in vivarium conditions.

Materials and Methods

The research was conducted in the vivarium of the Institute of Animal Biology of the National Academy of Sciences on 18 White Leghorn chickens. The poultry was kept in metal cages with feeders and automatic drinkers. During the experiment, the birds consumed standardized complete feed and clean drinking water. In the vivarium room the required temperature, humidity, and light mode were monitored daily and maintained according to the experimental scheme. During the first seven days, the chickens were kept at a temperature of 20°C as the normal temperature conditions — control group (C), 9 chickens. On the seventh day, the biological material of the liver was collected for further biochemical studies. From the eighth day of the experimental period, the air temperature in the vivarium raised to 35°C for 6 hours every day — experimental group (E), 9 chickens. On the 14th day or after seven days of exposure of chickens to elevated temperature, the biological material was collected again. Therefore, liver samples were taken from each bird both before and after exposure to heat stress. These samples were used to determine the following indicators: the content of LOOH, TBA-active products, GSH, GSH-Px, and GR. The conducted studies were not repeated.

All the manipulations with chickens were carried out by the principles of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 2005), Council of Europe Directive no. 2010/63/EU and Law of Ukraine no. 3447-IV “On the Protection animals from cruel treatment” with amendments 440-IX from 14.01.2020, according to protocol no. 115 from 28.09.2022 of the meeting of the Commission on bioethics of scientific research of the Institute of Animal Biology NAAS.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity (KF 1.11.1.9) was determined by the rate of GSH oxidation before and after incubation with tertiary butyl hydroperoxide, as described [32]. The development of the reaction is based on the interaction of SH-groups with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, resulting in the formation of a colored product — thionitrophenyl anion. Its amount is directly proportional to the number of SH groups that have reacted with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. 0.2 ml of tissue homogenate was incubated in a water bath at 37°C for 10 minutes. with 0.83 ml Tris-HCl buffer pH 8.5, which contained 6 mM EDTA solution and 12 mM sodium azide solution. A 4.8 mM solution of GSH (reduced glutathione) was prepared on this buffer. Then 0.05 ml of 20 mM tertiary butyl hydroperoxide solution was added and incubated again for 5 min. at 37°C. The reaction was stopped by adding 0.4 ml of a 10% THO solution, after which 5 ml of

0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.1 ml of Ellman's reagent was added to 0.1 ml of the supernatant, and the optical density was measured at $\lambda = 412$ nm. GSH-Px activity was expressed in nmol GSH/min. per 1 mg of protein.

Glutathione reductase (GR) activity (KF 1.6.4.2) was determined by the method [6]. The principle of the method is based on the catalytic NADPH-dependent reaction of the reduction of the oxidized form of glutathione, the intensity of which is estimated by the rate of decrease in extinction, at which the NADPH solution has a light absorption maximum (340 nm). For the reaction, the liver homogenate was diluted with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) in a ratio of 1:9. The reaction was carried out in a thermostatic cuvette at a temperature of 37°C. 1.8 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) with the addition of 1 mM EDTA, 0.1 ml of a 20 mM aqueous solution of oxidized glutathione, and 100 μ l of diluted homogenate were added to the cuvette. After 3 min. the reaction was started by adding 0.1 ml of a 2 mM NADPH solution dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The optical density of the investigated solutions was measured at a wavelength of 340 nm. GR activity was calculated according to the Bouguer-Lambert-Beer law, using the molar light absorption coefficient for NADPH at a wavelength of 340 nm ($\epsilon = 6200$ M⁻¹ cm⁻¹). Enzyme activity was expressed in μ mol of NADPH/min. per 1 mg of protein.

The content of reduced glutathione (GSH) was measured before and after the reaction colorimetrically according to the method [17]. The color reaction is based on the interaction of SH-groups with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with the formation of a colored product — thionitrophenyl anion. The content of the latter is directly proportional to the number of SH-groups that have reacted with DTNB. 0.2 ml of 20% sulfosalicylic acid solution was added to 0.6 ml of liver homogenate for protein precipitation. The samples were centrifuged for 10 min. at 3,000 g. An aliquot (0.1 ml) was transferred to tubes containing 2.55 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer with 0.01% EDTA, pH 8.5. 25 μ l of DTNB solution was added to the resulting mixture. After the formation of color, the extinction index was determined on a spectrophotometer at $\lambda = 412$ nm. The GSH content was calculated according to the calibration graph and expressed in mmol/g of tissue.

The concentration of TBA-active products was determined using the reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA), as described [32]. During the determination, 4.5 ml of 20% phosphotungstic acid was added to 1 ml of liver homogenate and centrifuged for 15 minutes at 700 g. The supernatant liquid was drained, and 1.0 ml of 0.8% TBA solution was added to the precipitate and kept for 1 h in a water bath at a temperature of 100°C. After that, the tubes were cooled and centrifuged. In the resulting centrifuge, the optical density was measured at a wavelength of 535 and 580 nm to exclude the absorption of painted complexes by TBA substances of a non-lipid nature. The concentration of TBA-active products was expressed in nmol of MDA per 1 g of tissue.

The content of lipid hydroperoxides (LOOH) was determined as described [32], according to which 2.8 ml of ethanol and 0.05 ml of a 50% THO solution were added to 0.2 ml of liver homogenate and shaken for 5–6 min. 1.5 ml of the supernatant was taken and adjusted to 2.7 ml with ethanol, 0.02 ml of concentrated HCl, and 0.03 ml of a 1% solution of Mohr's salt in a 3% solution of HCl were added. The optical density was measured after adding ammonium thiocyanate at $\lambda = 480$ nm. The LOOH content in biological material was expressed in terms of optical density at 480 nm per 1 g of tissue.

Statistical analysis was performed as described [29]. Data are expressed as mean \pm standard deviation. All the data were analyzed using *Statistica 10* software. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA). Student's *t*-test was used to examine differences between 2 groups. The difference was considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

It is known that GSH and a complex of enzymes — glutathione peroxidase, glutathione transferase, and glutathione reductase are an important system of free radicals inactivation. It is also known that GSH is synthesized in the liver, from where it is transported to various organs and tissues [41]. Therefore, the indicators of the glutathione link of the antioxidant system of the liver of chickens under the influence of heat stress are of obvious interest. As shown by the results of our research presented in fig. 1, the content of GSH in the liver of chickens increased after a week of TS compared to the control ($P < 0.001$). When analyzing the available scientific literature, we can see that similar results were obtained in many works by different scientists and years [24, 40]. However, at the same time, there is quite a lot of data that indicates the opposite direction of changes in the content of GSH in body tissues, which indicates that heat stress leads to a decrease in glutathione levels. GSH depletion is associated with increased ROS generation and increased sensitivity to hyperthermia [34]. We also found a significant ($P < 0.001$) increase in glutathione peroxidase

activity in the liver homogenates of chickens subjected to heat stress compared to the control group (fig. 1B). This seems quite logical, based on the known fact that GSH-Px protects the body's cells from oxidative stress, inhibits inflammation and oxidant-induced regulated cell death, catalyzes the breakdown of hydrogen peroxide, and oxidizes glutathione. However, as in the case of GSH, it should be emphasized that the data regarding the direction of changes in glutathione peroxidase activity in related studies are not unambiguous. Thus, an increase in GSH-Px activity, similar to the data we obtained, was also reported by S. Pamok et al. [15], W. Habashy et al. [28], L. Yang et al. [40]. But in contrast, P. Seven et al. [33] found a decrease in GSH-Px activity in the blood, liver, kidney, and heart of broilers. Interestingly, K. Sahin et al. [30] found that quail suffering from chronic heat stress had reduced hepatic GSH-Px activity. This was also confirmed in other researches [22, 31].

Regarding glutathione reductase activity of the liver, in our study, we observed its significant ($P < 0.001$) decrease in the group of chickens that were subjected to daily heat stress for 7 days compared to birds that were kept under physiologically comfortable temperature conditions (fig. 1C). It is known that GR is involved in the regulation, modulation, and maintenance of cellular redox homeostasis. Therefore, a possible explanation for the decline in GR activity in liver homogenates that we observed may be a parallel simultaneous increase in the content of GSH in the liver. One of the reasons for the decrease in glutathione reductase activity under conditions of increased heat load may be a simultaneous decrease in the content of NADH and NADPH in the cells since GR is an enzyme dependent on NADPH, the activity of which is inhibited in the event of accumulation of the oxidized form of the nucleotide (NADP). $\text{NADPH} + \text{H}^+$ is formed in the hexose monophosphate shunt (pentose cycle) and provides H^+ for the regeneration of GSH from GSSG by GR. The normal functioning of the NADPH-dependent GR in the cell is very important for preventing oxidative damage to mitochondria, which are unable to synthesize *HV de novo* and therefore depend on the intensity of GR recovery of oxidized glutathione and its entry from the cytosol through the outer mitochondrial membrane.

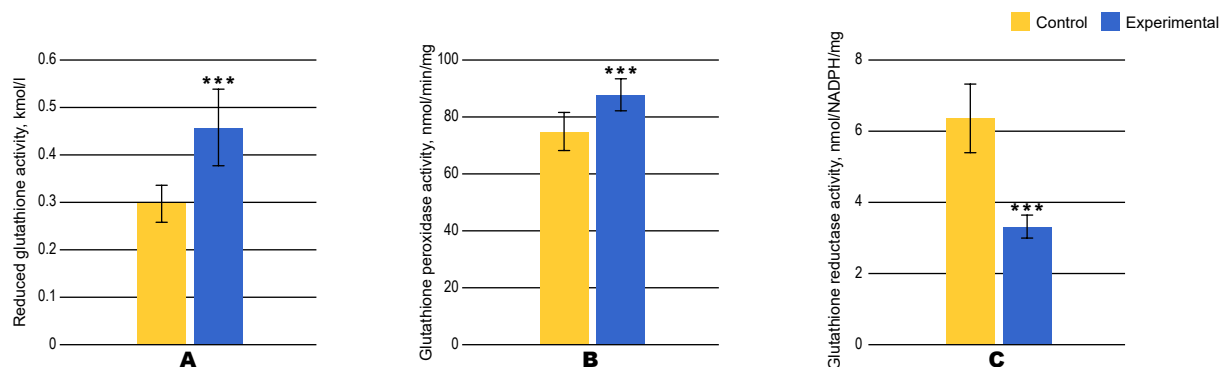


Fig. 1. Activity of antioxidant indicators in the liver of chickens: A — reduced glutathione, B — glutathione peroxidase, C — glutathione reductase. Note. Here and further ** — $P < 0.01$, *** — $P < 0.001$ compared to the control group.

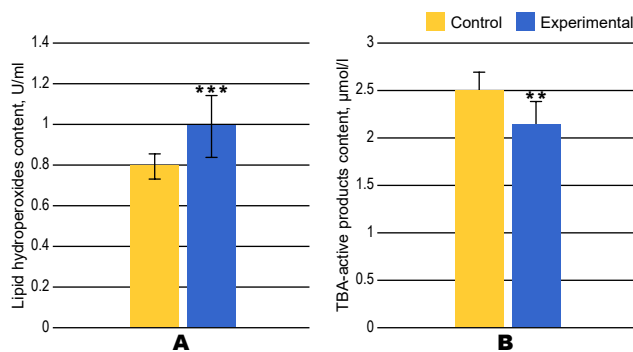


Fig. 2. The content of lipid peroxidation products in the chickens' liver: A — lipid hydroperoxides, B — TBA-active products

As in our case, according to the data obtained by W. Habashy et al. [15], 12 days after HS the GR level in the liver decreased ($P < 0.01$) compared to the liver homogenate of the control groups. The similar studies were conducted by K. Sahin et al. on Japanese quail [30] and their results showed that there was a decrease in hepatic GR activity. But the results of Q. Miao et al. [24], on the contrary, showed that with the ambient temperature rise, the GR activity increased significantly ($P < 0.05$).

As can be seen from the fig. 2, the LOOH content significantly increased ($P < 0.001$) in the liver of chickens that were subjected to heat stress for seven days compared to the control group of birds. In general, LOOHs are reactive intermediates that occur during the peroxidation of unsaturated lipids in biological membranes. They are formed in the biological system in enzymatic and non-enzymatic ways. LOOHs have various harmful effects on cellular macromolecules and are also important regulators of cellular processes.

The fact that the content of LOOH, a byproduct of lipid peroxidation, increases in liver homogenates during thermal stress on chickens indicates the simultaneous occurrence of oxidative stress in the body. As for the content of TBA-active products, we found that their content decreased significantly ($P < 0.001$) in the liver of chickens after exposure to heat stress for 7 days compared to the control. TBA-active products are also a marker of oxidative stress and in most cases their amount increases during HS. The research by M. Azad et al. [4] showed a 1.5-fold increase in TBA-active products. The results of the study on Japanese quail [30] showed an increase in the level of TBA-active products in the liver by 84.8%. Another experiment on one-day-old broiler chickens [31] confirmed an increase in the content of TBA-active products. L. Yang et al. [40], L. Tang et al. [38] and Y. Wang et al. [39] also showed that HS induced the formation of TBA-active products. However, at the same time, the results of Q. Miao et al. [14], W. Habashy et al. [24] showed that the content of TBA-active products did not change when the ambient temperature increased. In general, the increase in the level of LOOH, GSH, and GSH-Px indicates the activation of AS, because these AO neutralize free radicals in the animal's body to protect it from stress.

As shown in the majority of modern studies, the content of TBA-active products mainly increases under the HS influence.

The data obtained in our study convincingly indicate that the activation of oxidation processes in poultry is a direct consequence of heat stress. The main redox pathways of the glutathione link of the antioxidant system, including GSH, GSH-Px, GR, and TBA-active products sometimes react differently in the liver, according to the tissue's need for ROS detoxification or tolerance to them.

References

- Aluwong T, Kawu M, Raji M, Dzenda T, Govwang F, Sinkalu V, Ayo J. Effect of yeast probiotic on growth, antioxidant enzyme activities and malondialdehyde concentration of broiler chickens. *Antiox. (Basel)*. 2013; 2 (4): 326–339. DOI: 10.3390/antiox2040326.
- Aluwong T, Sumanu VO, Ayo JO, Ocheja BO, Zakari FO, Minka NS. Daily rhythms of cloacal temperature in broiler chickens of different age groups administered with zinc gluconate and probiotic during the hot-dry season. *Physiol. Rep.* 2017; 5 (12): e13314. DOI: 10.14814/phy2.13314.
- Attia YA, El-Naggar AS, Abou-Shehema BM, Abdella AA. Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair, and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. *Animals*. 2019; 9 (8): 547. DOI: 10.3390/ani9080547.
- Azad MAK, Kikusato M, Maekawa T, Shirakawa H, Toyomizu M. Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2010; 155 (3): 401–406. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.12.011.
- Azeez OI, Myburgh JG, Bosman AM, Featherston J, Sibeko-Matjila KP, Oosthuizen MC, Chamunorwa JP. Next generation sequencing and RNA-seq characterization of adipose tissue in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in South Africa: Possible mechanism(s) of pathogenesis and pathophysiology of pancreatitis. *PLoS ONE*. 2019; 14 (11): e0225073. DOI: 10.1371/journal.pone.0225073.
- Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1975; 250 (14): 5475–5480. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41206-4.
- Castilho VAR, Garcia RG, Lima NDS, Nunes KC, Caldara FR, Nääs IA, Barreto B, Jacob FG. Welfare of laying hens in different densities of housing. *Rev. Bras. Biosys. Engineer.* 2015; 9 (2): 122–131. DOI: 10.18011/bioeng2015v9n2p122-131. (in Portuguese)
- Celi P, Gabai G. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Front. Vet. Sci.* 2015; 26 (2): 48. DOI: 10.3389/fvets.2015.00048.
- Chauhan SS, Celi P, Leury BJ, Clarke IJ, Dunshea FR. Dietary antioxidants at supranutritional doses improve oxidative status and reduce the negative effects of heat stress in sheep. *J. Anim. Sci.* 2014; 92 (8): 3364–3374. DOI: 10.2527/jas.2014-7714.
- Chauhan SS, Celi P, Ponnampalam EN, Leury BJ, Liu F, Dunshea FR. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: role of vitamin E and selenium. *Anim. Prod. Sci.* 2014; 54 (10): 1525–1536. DOI: 10.1071/AN14334.
- Del Vesco AP, Khatlab AS, Goes ESR, Utsunomiya KS, Vieira JS, Oliveira Neto AR, Gasparino E. Age-related oxidative stress and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. *Animal*. 2017; 11 (10): 1783–1790. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000386>.
- Emami NK, Jung U, Voy B, Dridi S. Radical response: Effects of heat stress-induced oxidative stress on lipid metabolism in the avian liver. *Antiox. (Basel)*. 2020; 10 (1): 35. DOI: 10.3390/antiox10010035.

13. Estévez M. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *Poult. Sci.* 2015; 94 (6): 1368–1378. DOI: 10.3382/ps/pev094.
14. Habashy WS, Milfort MC, Rekaya R, Aggrey SE. Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. *Int. J. Biometeorol.* 2019; 63 (12): 1569–1584. DOI: 10.1007/s00484-019-01769-z.
15. Habashy WS, Milfort MC, Rekaya R, Aggrey SE. Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. *Mol. Biol. Rep.* 2018; 45 (3): 389–394. DOI: 10.1007/s11033-018-4173-0.
16. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142 (2): 231–255. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705776.
17. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analyt. Biochem.* 1976; 74 (1): 214–226. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
18. Huang C, Jiao H, Song Z, Zhao J, Wang X, Lin H. Heat stress impairs mitochondria functions and induces oxidative injury in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 2015; 93 (5): 2144–2153. DOI: 10.2527/jas.2014-8739.
19. Kikusato M, Toyomizu M. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e64412. DOI: 10.1371/journal.pone.0064412.
20. Lara LJ, Rostagno MH. Impact of heat stress on poultry production. *Animals.* 2013; 3 (2): 356–369. DOI: 10.3390/ani3020356.
21. Lee MT, Lin WC, Lee TT. Potential crosstalk of oxidative stress and immune response in poultry through phytochemicals — a review. *As. Austral. J. Anim. Sci.* 2019; 32 (3): 309–319. DOI: 10.5713/ajas.18.0538.
22. Liu LL, He JH, Xie HB, Yang YS, Li JC, Zou Y. Resveratrol induces antioxidant and heat shock protein mRNA expression in response to heat stress in black-boned chickens. *Poult. Sci.* 2014; 93 (1): 54–62. DOI: 10.3382/ps.2013-03423.
23. Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM. Physiological traits as affected by heat stress in sheep — A review. *Small Rum. Res.* 2007; 71 (1–3): 1–12. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.10.003.
24. Miao Q, Si X, Xie Y, Chen L, Liu Z, Liu L, Tang X, Zhang H. Effects of acute heat stress at different ambient temperature on hepatic redox status in broilers. *Poult. Sci.* 2020; 99 (9): 4113–4122. DOI: 10.1016/j.psj.2020.05.019.
25. Musatov A, Hebert E, Robinson NC. Modification of nuclear-coded subunits of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta.* 2002; 12 (Suppl.): 96.
26. Naga Raja Kumari K, Narendra Nath D. Ameliorative measures to counter heat stress in poultry. *World. Poult. Sci. J.* 2018; 74 (1): 117–130. DOI: 10.1017/S0043933917001003.
27. Ogbuagu NE, Aluwong T, Ayo JO, Sumanu VO. Effect of fisetin and probiotic supplementation on erythrocyte osmotic fragility, malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity in broiler chickens exposed to heat stress. *J. Vet. Med. Sci.* 2018; 80 (12): 1895–1900. DOI: 10.1292/jvms.18-0477.
28. Pamok S, Aengwanich W, Komutrin T. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *J. Thermal. Biol.* 2009; 34 (7): 353–357. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2009.06.003.
29. Petrovska IR, Salyha YT, Vudmaska IV. *Statistical Methods in Biological Research: The educational and methodological manual.* Kyiv, Agrarian Science, 2022: 172 p. (in Ukrainian)
30. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Ali S, Sahin N, Hayirli A. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails. *Poult. Sci.* 2010; 89 (10): 2251–2258. DOI: 10.3382/ps.2010-00749.
31. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Hayirli A, Bilgili S, Kucuk O. Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* 2016; 95 (5): 1088–1095. DOI: 10.3382/ps/pew012.
32. Salyha YT. Effect of chlorpyrifos on glutathione system and lipid peroxidation products content in various organs of rats. *Biol. Tvarin.* 2013; 15 (2): 122–130. Available at: <https://aminbiol.com.ua/index.php/archive/92-archive/bt2-15-2013/1586> (in Ukrainian)
33. Seven PT, Yilmaz S, Seven I, Cerci IH, Azman MA, Yilmaz M. Effects of propolis on selected blood indicators and antioxidant enzyme activities in broilers under heat stress. *Acta Vet. Brno.* 2009; 78 (1): 75–83. DOI: 10.2754/avb200978010075.
34. Shrieve DC, Li GC, Astromoff A, Harris JW. Cellular glutathione, thermal sensitivity, and thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts and their heat-resistant variants. *Cancer Res.* 1986; 46 (4/1): 1684–1687. PMID: 3948159.
35. Stillman JH. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiol.* 2019; 34 (2): 86–100. DOI: 10.1152/physiol.00040.2018.
36. Sumanu VO, Aluwong T, Ayo JO, Ogbuagu NE. Evaluation of changes in tonic immobility, vigilance, malondialdehyde, and superoxide dismutase in broiler chickens administered fisetin and probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and exposed to heat stress. *J. Vet. Behav.* 2019; 31: 36–42. DOI: 10.1016/j.jveb.2019.01.003.
37. Surai PF, Kochish II, Fisinin VI, Kidd MT. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antiox. (Basel).* 2019; 8 (7): 235. DOI: 10.3390/antiox8070235.
38. Tang LP, Liu YL, Zhang JX, Ding KN, Lu MH, He YM. Heat stress in broilers of liver injury effects of heat stress on oxidative stress and autophagy in liver of broilers. *Poult. Sci.* 2022; 101 (10): 102085. DOI: 10.1016/j.psj.2022.102085.
39. Wang Y, Xia L, Guo T, Heng C, Jiang L, Wang D, Wang J, Li K, Zhan X. Research Note: Metabolic changes and physiological responses of broilers in the final stage of growth exposed to different environmental temperatures. *Poult. Sci.* 2020; 99 (4): 2017–2025. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.048.
40. Yang L, Tan GY, Fu YQ, Feng JH, Zhang MH. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2010; 151 (2): 204–208. DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.10.010.
41. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspect. Med.* 2009; 30 (1–2): 29–41. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.003.

Вплив теплового стресу на глутатіонову ланку антиоксидантного захисту та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у печінці курей

Д. Б. Передерій
peredina0310@gmail.com

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

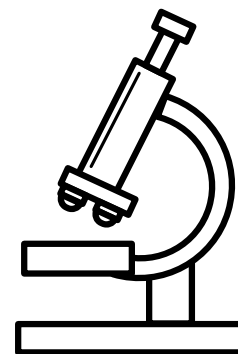
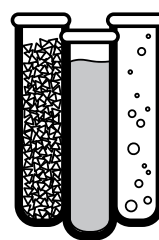
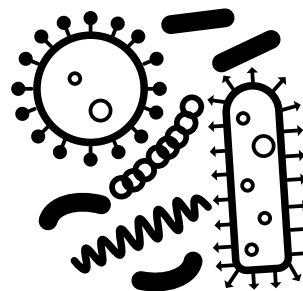
Тепловий стрес є однією з основних реакцій відповіді організму на фактори навколишнього середовища, який негативно впливає на добробут різних видів тварин. Підвищення температури навколишнього середовища може провокувати стрес, який, зі свого боку, загрожує різними негативними наслідками для тварин, зокрема збоєм у функціонуванні антиоксидантної системи. Порушення антиоксидантно-прооксидантної рівноваги може призвести до підвищеного утворення в організмі вільних

радикалів, здатних пошкоджувати клітини та сприяти розвитку різних захворювань. У статті наведено результати дослідження впливу штучно змодельованого теплового стресу на окремі показники антиоксидантної системи та продукти пероксидного окиснення ліпідів у печінці курей. Вибір цих тварин для дослідження зроблено з огляду на те, що птиця особливо чутлива до впливу підвищених температур довкілля і, відповідно, до теплового стресу. Це пов'язано із біологічними особливостями птахів, зокрема у них відсутні потові залози, поверхня тіла значною мірою вкрита пір'ям, що разом із високою щільністю посадки поголів'я в умовах промислового птахівництва нерідко стає причиною виникнення теплового стресу. Метою цієї роботи було з'ясувати наявність або відсутність змін окремих показників глутатіонової ланки антиоксидантної системи та вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів у печінці курей. Аналіз таких показників, як гідропероксили ліпідів (ГПЛ), ТБК-активних продуктів, відновлений глутатіон (ВГ), глутатіонпероксидаза (ГП) і глутатіонредуктаза (ГР), дозволить отримати інформацію про стан антиоксидантної захисної системи організму та рівень окислювального стресу за умов теплового стресу. У роботі було використано 18 курей породи Білий Леггорн. Дослідження проведено у віварії Інституту біології тварин НААН двома етапами: на першому курей утримували за температури повітря 20°C протягом 7 діб, на другому — створили умови теплового стресу підвищенням температури до 35°C на 6 год. в день також протягом 7 діб. Встановлено, що з підвищенням температури навколишнього середовища вміст ГПЛ, ВГ та активність ГП у печінці курей зростає ($P < 0,001$), а вміст ТБК-активних продуктів та активність ГР — навпаки, знижувалися ($P < 0,01$). Отримані дані засвідчують вплив теплового стресу на глутатіонову ланку антиоксидантного захисту печінки курей. Результати досліджень можуть мати практичне значення для вдосконалення умов утримання птахів у промисловому птахівництві, розробки стратегій захисту від стресу та покращення умов їх утримання з метою забезпечення добробуту та здоров'я тварин.

Ключові слова: кури, печінка, тепловий стрес, оксидативний стрес, антиоксидантна система захисту

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!

НАДАЄМО КОНСУЛЬТАЦІЇ СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВУ

◆ скотарство

◆ свинарство

◆ вівчарство

◆ кролівництво

◆ птахівництво

◆ бджільництво

◆ рибництво



(утримання, годівля, відтворення,
лікування захворювань,
розробка кормів і БАД,
підвищення репродуктивної здатності)



Для довідок:

тел. (+38 097) 444-19-25,

(+38 097) 384-21-77,

(+38 032) 260-07-95

inenbiol@mail.lviv.ua

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

Ми готові співпрацювати з Вами для створення ефективної рекламної стратегії, яка відповідає Вашим потребам і бюджету.

Пропонуємо різні варіанти розміщення реклами, зокрема банери, оголошення або статейно-рекламні матеріали.

Реклама в нашому журналі дозволить Вам:

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

Пропозиції до співпраці на 2024 рік:

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

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