Науковий журнал «Біологія тварин»

Свідоцтво про державну реєстрацію: № КВ 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, CABI*.

Головний редактор: Салига Ю. Т., д. біол. н.
Науковий редактор: Вудмаска І. В., д. с.-г. н.
Відповідальний секретар: Судин К. Ю.
Літературний редактор: Процик-Кульчицька М. Р.
Комп'ютерна верстка: Судин К. Ю.

Scientific journal "The Animal Biology"

Certificate of print media State registration: No. КВ 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, CABI*.

Editor-in-chief: Yuriy Salyha, Dr. Sc.
Scientific Editor: Ihor Vudmaska, Dr. Sc.
Editorial secretary: Kateryna Sudyn.
Literary editor: Maria Protsyk-Kulchytska.
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)
Бартлевскі 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, Інститут біології тварин НААН (Україна)
Гунчак Алла Володимирівна, Інститут біології тварин НААН (Україна)
Ґжегоцький Мечислав Романович, Львівський національний медичний університет ім Данила Галицького (Україна)
Доліба Микола, Пенсильванський університет (США)
Заячківська Оксана Станіславівна, Американський університет наук про здоров'я (США)
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)
Ковальскі Зигмунд, Сільськогосподарський університет імені Гуго Коллонтая у Кракові (Польща)
Ковальчук Ірина Іванівна, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького (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)
Лущак 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)
Муравскі 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, Інститут біології тварин НААН (Україна)
Стапай Петро Васильович, Інститут біології тварин НААН (Україна)
Стибель Володимир Володимирович, Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок (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 Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine.
Tel. / Fax: (+38 032) 260-07-95, (+38 032) 270-23-89.
E-mail: editor.animbiol@gmail.com
Website: http://aminbiol.com.ua

Друкується за рішенням Вченої ради ІБТ НААН, протокол №5 від 20 березня 2025 р. Підписано до друку 22.01.2025. Формат 60×84/8. Папір офсетний. Друк офсетний. Гарнітура Arial. Видавництво «Сполом», вул. Краківська, 9, м. Львів, 79008. Тел./факс: (+38 032) 297-55-47. e-mail: spolom@mail.lviv.ua Свідоцтво держреєстру: серія ДК № 2038 від 02.02.2005 р.

ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ
ТВАРИН
НААН

ISSN 1681-0015 (print)
ISSN 2313-2191 (online)

DOI: 10.15407/animbiol

БІОЛОГІЯ ТВАРИН

The ANIMAL BIOLOGY

2025 ▪ Volume 27 ▪ Issue 1 ▪ Issue DOI: 10.15407/animbiol27.01

EDITORIAL COUNCIL

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

Halyna Antonyak, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)
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)
Mechyslav Gzhegotskyi, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)
Viktoriia Havryliak, Lviv Polytechnic National University (Ukraine)
Mykhailo Hladii, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)
Alla Hunchak, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)
Ruslana Iskra, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)
Liliia Kalachniuk, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (Ukraine)
Czesław Klocek, University of Agriculture in Kraków (Poland)
Yaroslav Korpan, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Ukraine)
Igor Kotsyumbas, State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives (Ukraine)
Iryna Kovalchuk, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv (Ukraine)
Zygmunt Maciej Kowalski, University of Agriculture in Kraków (Poland)
Oleg Krishtal, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine (Ukraine)
George Kulik, Wake Forest University (USA)
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, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)
Petro Stapay, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)
Rostyslav Stoika, Institute of Cell Biology NAS of Ukraine (Ukraine)
Volodymyr Stybel, State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives (Ukraine)
Roman Tyzio, Mediterranean Institute of Neurobiology (France)
Oleg Vishchur, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)
Oleksandr Voytyuk, Uppsala University (Sweden)
Oksana Zayachkivska, American University of Health Sciences (USA)

© Інститут біології тварин НААН, *Біологія тварин*, 2025
© Institute of Animal Biology NAAS, *The Animal Biology*, 2025-

ЗМІСТ

Буслик Т., Козак М., Юзвяк М., Салига Ю. Т., Стапай П., Саєнко А., Трапіна І., Парамонова Н.
Аналіз 3′UTR послідовності гену міостатину в овець української гірськокарпатської породи 3

Курята Н. В., Чечет О. М., Горбатюк О. І., Піщанський О. В., Баланчук Л. В., Мех Н. Я., Жовнір О. М.
Фторхінолонрезистентні штами *Escherichia coli* в кормах для тварин і птиці з кормовиробничих підприємств України 9

Хопта Н. С., Романюк А. Л., Нечитайло Л. Я., Ерстенюк А. М.
Метаболічні процеси в організмі та в кістках експериментальних тварин за умов впливу іонів кадмію та нітритів 15

Амінов Р. Ф., Амінова А. С., Макеєва Л. В., Фролов О. К., Федотов Є. Р., П'ятигорець Т. В.
Вплив водно-сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* на регенеративні властивості різаної рани шкіри щурів ... 21

Муквич В. В., Севериновська О. В.
Вплив кофеїну на показники варіабельності серцевого ритму самок щурів із доксорубіциновою кардіоміопатією 27

Іваницький І. Т., Шаран М. М.
Гематологічні показники кнурів за згодовування комплексних кормових добавок в умовах теплового стресу 34

Чечет О. М., Віщур О. І., Коваленко В. Л., Куртяк Б. М., Смолянінов К. Б., Волторністий А. В.
Активність природних механізмів захисту в курчат-бройлерів за дії синбіотичного препарату «Біомагн»
та дезінфекційного засобу «Діолайд» 41

Прудиус Т. Я.
Вплив кормової добавки «Активо» на деякі показники системи антиоксидантного захисту свиноматок
та отриманих від них поросят 48

Петренко В., Барабаш В.
Вплив природного відбору на відтворювальну функцію бугаїв 53

CONTENTS

Buslyk T., Kozak M., Yuzviak M., Salyha Yu., Stapay P., Saienko A., Trapina I., Paramonova N.
Sequence analysis of the 3′UTR region of the myostatin gene in Ukrainian Carpathian Mountain sheep 3

Kuryata N. V., Chechet O. M., Gorbatyuk O. I., Pishchanskyi O. V., Balanchuk L. V., Mekh N. Y., Zhovnir O. M.
Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in animal and poultry feed from Ukrainian feed-producing enterprises 9

Khopta N. S., Romaniuk A. L., Netchitajlo L. Ja., Ersteniuk A. M.
Metabolic processes in the body and bones of experimental animals under conditions of exposure by cadmium and nitrite ions 15

Aminov R. F., Aminova A. S., Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Fedotov E. R., Piatyhorets T. V.
The effect of water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* on the regenerative properties
of excisional wounds of rat skin 21

Mukvych V. V., Severynovska O. V.
Effect of caffeine on heart rate variability parameters in female rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy 27

Ivanytskyi I. T., Sharan M. M.
Hematological parameters of boars fed with complex feed additives under heat stress conditions 34

Chechet O., Vishchur O., Kovalenko V., Kurtyak B., Smolyaninov K., Voltornistyi A.
The activity of immunological indicators in chickens with the complex use of a symbiotic drug "Biomagn"
and a disinfectant "Diolide" 41

Prudyus T. Y.
Feed additive "Activo" influence on several antioxidant defense system parameters of sows and their progeny 48

Petrenko V. I., Barabash V. I.
Influence of natural selection on the reproductive function in bulls 53

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.003
UDC 636.325.082
Received 31.01.2025 ▪ Revision 13.03.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Sequence analysis of the 3′UTR region of the myostatin gene in Ukrainian Carpathian Mountain sheep

T. Buslyk[1], M. Kozak[1], M. Yuzviak[1], Yu. Salyha[1], P. Stapay[1], A. Saienko[2], I. Trapina[3], N. Paramonova[3]
tvbuslyk@gmail.com

[1]Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine
[2] Institute of Pig Breeding and Agrarian Sciences NAAS, 1 Shvedska Mohyla str., Poltava, 36013, Ukraine
[3]University of Latvia, Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Genomics and Bioinformatics, 1 Jelgavas str., Riga, LV-1004, Latvia

ORCID:
T. Buslyk https://orcid.org/0000-0002-9369-2178
M. Kozak https://orcid.org/0000-0002-2271-8529
M.Yuzviak https://orcid.org/0000-0002-6782-5416
Yu. Salyha https://orcid.org/0000-0002-5731-7936
P. Stapay https://orcid.org/0000-0002-4183-4605
A. Saienko https://orcid.org/0000-0002-0527-5367
I. Trapina https://orcid.org/0000-0002-2165-4770
N. Paramonova https://orcid.org/0000-0001-6375-3331

Authors' Contributions:
BT: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Validation; Funding acquisition; Writing — original draft.
KM: Visualization; Writing — original draft.
YM: Investigation.
YS: Project administration; Supervision.
SP: Investigation.
SA: Investigation; Writing — review & editing.
TI: Methodology; Formal analysis; Writing — review & editing.
PN: Conceptualization; Supervision; Funding acquisition; Writing — review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
Not applicable.

Acknowledgements:
This study was carried out during the EURIZON FELLOWSHIP PROGRAMME "Remote Research Grants". This project has received funding from European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement no. 871072.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Preservation and rational use of the sheep gene pool is a highly urgent issue in the development of sheep breeding. Modern methods of selection and breeding work enable the realisation of genetic potential for increased productivity and breeding value in farm animals. Preservation of the valuable gene pool of the Ukrainian Mountain Carpathian sheep breed should be carried out using scientifically based methods that allow for the protection of the breed's valuable traits, such as high adaptive capacity to the conditions of the mountain region and the dairy and meat direction of productivity. The myostatin (*MSTN*) gene is considered as a marker for improving economically useful traits in livestock. The sequence of 1093 bp of the 3′-untranslated region (3′UTR) of the Ukrainian Mountain Carpathian sheep myostatin gene was analysed to search for potentially beneficial mutations in the gene. Several of eight known SNPs that are polymorphic in Latvian dark-head, Merinolandschaf, Ile de France, Texel, Charollais, Poll Dorset, White Suffolk, Lincoln, Kamieniec, Pomeranian, Colored Polish Merino were found to be monomorphic in the Ukrainian Carpathian Mountain breed. The following genotypes were identified: c.*707TT, c.*709AA, c.*874TT, c.*1098AA, c.*1232GG, c.*1267AA, c.*1316GG, c.*1489GG in the Ukrainian Carpathian Mountain breed. In conclusion, it should be noted that marker-associated selection of the 3′-untranslated region of the myostatin gene (3'UTR) is not suitable for Ukrainian Carpathian Mountain sheep due to the confirmed monomorphism of the studied SNPs in this region. Based on the obtained results, we concluded that it is important to continue studying other regions of the *MSTN* gene, including a larger number of animals and phenotype data. This will help to identify specific mutations within the gene that may serve as potential genetic markers for improving economically important traits in Ukrainian Carpathian Mountain sheep.

Key words: *MSTN*, myostatin, 3′UTR, Ukrainian Carpathian Mountain Sheep-breed, sheep

Introduction

The Ukrainian Carpathian Mountain Sheep (UCM) breed of sheep belongs to the local breeds of sheep in the Western region of Ukraine. This breed is kept in the farms located at the foothill and mountainous regions of the Transcarpathian, Ivano-Frankivsk, Lviv, and Chernivtsi regions. The UCM breed of sheep was bred by the method of reproductive crossing of local coarse-wool ewes of the Tsakel type with rams of the Tsygai breed.

In the mountainous areas of the Carpathians, aboriginal coarse-wool sheep with wool of various colors have been bred for a long period of time and were used for the production of carpet wool. Smooth and pile carpets, artificial fur, coat fabrics, knitwear, and other products were also manufactured [20].

As a breed, the UCM breed began its development in 1993 with the order from the Ministry of Agriculture and Food of Ukraine dated December 31, 1993 no. 363. Despite the unique characteristics of sheep of this breed and their ability to adapt to difficult environmental conditions, the number of livestock has been decreasing uncontrollably over the past 20 years.

According to the database of the Ukrainian Animal Breeding Center, the population of animals of the UCM breed decreased sharply in 2023, from 1,288 sheep in 2019 to 296 in 2023 [1]. Such a rapid decrease is explained by the low profitability of breeding.

Today, 9 sheep breeds have already disappeared without a trace in Ukraine: Walahian, Pirni, Reshetilivska, Chushka, Mazayev Merino, Malich, Hutsulian, Chuntuk [21]. The long-term crisis in sheep breeding and the active war phase in the territory of Ukraine exacerbate this situation even more.

The Carpathian sheep breed played an important role in the historical development of the Carpathian region, preserving cultural crafts, traditions, and the material culture of local communities. Sheep breeding was the main animal husbandry activity of the local Hutsulian population and had a great influence on the entire lifestyle and culture, which over the centuries formed a specific structure of economic activity in the region [4].

The Carpathian Mountain sheep are characterized by a high foraging ability. The selection of these animals was aimed at securing the maximum possible meat productivity when using mainly green pasture fodder. Under the conditions of feeding them with concentrated feed at the rate of 0.4–0.5 kg per head, the young animals reach slaughter conditions (up to 28 kg) by the age of six months. It typically takes 4.1–5.1 feed units to obtain 1 kg of growth in lambs up to 6 months of age, and 7.9 feed units in sheep up to one-year-old [22].

At the same time, the Mountain Carpathian sheep are relatively small — for example, breeding rams have a live weight of 55–65 kg, and ewes have a weight of 36–41 kg. It is important to note that there is a positive relationship between live weight and milk yield of ewes. With an increase in body weight, the milk yield also increases. With a live weight of ewes between 26–30 kg, their milk yield is 71 kg, and with a live weight of 36 kg — 90 kg or higher [3].

A literature analysis over the past 10 years showed that the UCM breed is practically unstudied in terms of genetics. Only in 2018, Chokan and co-authors described the genetic structure of the UCM breed using 11 microsatellite loci. Their analysis indicated significant genetic variability of the studied microsatellite loci. A total of 106 alleles were identified, and the average value of the inbreeding coefficient had a low negative value (0.070), which suggested almost no inbreeding in the studied UCM population [5].

In view of the above context, the urgent issue of developing new breeding methods using molecular genetic markers to increase the meat productivity of sheep is emerging, which will certainly increase the economic potential of the sheep industry in Ukraine. The myostatin gene (*MSTN*) is considered a potential genetic marker for improving economically important traits in livestock due to its well-established role in the negative regulation of muscle growth. Variations in *MSTN*, particularly in regulatory regions such as the 3′UTR, have been associated with enhanced muscle mass, feed efficiency, and overall carcass quality, making it a valuable target for marker-assisted selection in breeding programs [9, 12].

And it is specifically the 3′UTR region of the myostatin gene in the UCM sheep that interests us.

Materials and Methods

The studies were carried out on 14 purebred Ukrainian Carpathian Mountain sheep of both sexes (three rams and eleven ewes), which were bred on the farm “Gafynets” (Pavshino village, Mukachevo district, Transcarpathian region). Blood samples were collected from the sheep’s jugular vein in blood collection tubes with an EDTA anticoagulant.

For genomic DNA extraction, we used a DNA extraction kit (*Zymo Research*, USA) according to the manufacturer’s instructions for extraction from whole blood, serum, and plasma samples. DNA quality and quantity were assessed using agarose gel electrophoresis and spectrophotometry techniques. DNA yields were quantified using a *Nanodrop* spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA).

Sequence information for the sheep *MSTN* gene (AY918121, AM992883, and AF393618) available in GenBank was used for the genomic region reconstruction and primer design. *MSTN* gene sequence information for *Oryx dammah* (XM_040227852.1), *Bos taurus* (JQ711180.1), *Cervus elaphus* (OU343110.1), *Capra hircus* (EF591039), *Equus asinus* (XM_014837576.3), and *Sus scrofa* (AY208121.1) was used in the bioinformatic analysis.

A 1.093 kb myostatin gene fragment containing the 3′UTR sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the UCM sheep breed genomic DNA.

The structure of primers: forward: 5′-GCTGAATGGCTGATGTTATC-3′; reverse: 5′-AGCAACTTGACCAGAACCAATGT-3′. The PCR reaction was performed in a 50 µl reaction containing 100 ng of sheep genomic DNA, 1× Taq reaction buffer, 5 nmol dNTPs, 20 pmol of each primer, and 0.25 units of Taq DNA polymerase (*New England Biolabs*).

The PCR program was carried out with an initial

5 min denaturing step at 94°C, followed by 35 cycles (each cycle included 30 s at 94°C, 30 s at 57.5°C, and 1 min at 68°C), and a final 10 min extension at 72°C.

PCR products were then sequenced by the Sanger sequencing method at *Explogen LLC* (Lviv, Ukraine), and the chromatograms were analyzed using *FinchTV* software (*Geospiza Inc.*) for the identification of possible mutations in the 3′UTR of *MSTN*.

Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (MSA) (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo) was used to generate the sequence multiple alignments.

Results and Discussion

The study sequenced of the 3′UTR region of the *MSTN* gene with a length of 1093 bp, localized from 118150011 to 118151103 (fig. 1).

Alignment analysis of the myostatin 1.093 kb sequence of the 3′UTR of myostatin from the NCBI revealed a high degree of its conservation during evolution. The similarity of the 3′UTR region of the myostatin gene between sheep and antelope (*Oryx dammah*, XM_040227852.1), red deer (*Cervus elaphus*, OU343110.1), cattle (*Bos taurus*, JQ711180.1), pig (*Sus scrofa*, AY208121.1), and donkey (*Equus asinus*, XM_014837576.3) was found to be 98.08%, 97.00%, 96.80%, 91.28%, and 89.34%, respectively.

The alignment results indicate that this region is quite conserved, which may primarily be associated with its functionality (fig. 2).

For the first time, data on the significant impact of mutations in the 3′UTR of the sheep myostatin gene were published in 2006. The author demonstrated an important role in the regulation of myostatin expression through target sites for microRNAs [6] demonstrated, through target sites. MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, short non-coding RNAs about 22 nucleotides in length [8]. There are more than twenty thousand miRNAs identified, and their number is rapidly increasing [17, 19].

The mutations in the Texel's 3′UTR of the *MSTN* (myostatin) gene create a potential target site for miR-1 and miR-206, so its expression is inhibited and the suppression of skeletal muscle growth is removed. Therefore, this sheep breed shows a double-muscled phenotype [6]. It has also been shown that there are regions targeted by miR-27b in the 3′UTR region. According to Zhang et al., miR-27b contributes to the proliferation of sheep skeletal muscle satellite cells, targeting *MSTN* and suppressing its expression. Furthermore, miR-27b controls *MSTN* in ovine satellite cells by suppressing its translation at the initial stage, followed by mRNA degradation [24].

According to the *Ensembl* database [7], 8 polymorphisms are currently known in the studied region (1093 bp). These polymorphisms occur with individual frequencies in different breeds (table). The most studied SNP in the 3′UTR is rs408469734 (c.*1232G>A). It is worth noting that this polymorphism is also found in various publications under other names, in particular: g.9827G>A, g.+6723G-A, c.2360G>A [12].

Polymorphism at this locus occurs in crossbred sheep (Blue-faced Leicester × Scottish Blackface [18]), in Texel and Charollais, in Poll Dorset × White Suffolk rams and AG or GG White Suffolk × (Border Leicester × Merino) dams [13], in Australian Texels, White Suffolk, Poll Dorset, and Lincoln [15], New Zealand Texel-cross sheep [14], and in Polish breeds such as Kamieniec and Pomeranian sheep [16], and in Charollais and Texel sheep bred in Latvia [23].

On the other hand, the Colored Polish Merino sheep were monomorphic for G at the c.*1232 position [9]. No polymorphism was found at this locus in the Latvian dark-head, Merinolandschaf, Ile de France, Dorper [23], NZ Romney, Coopworth, Corriedale, Dorper, Perendale, Suffolk, Merino, Dorset Down, Coopdale, and Poll Dorset [11]. Summarizing the literature data, it can be concluded that this SNP c.*1232G>A is associated with various phenotypic traits related to economic benefits, in particular body weight at birth, average daily gain, dry matter intake, slaughter weight [23], loin and fore shank weights [9], proportion and muscle-to-bone ratio, muscle-to-fat ratio [18], carcass composition, and the proportional weights of the loin and hindquarter muscles [13].

Several of eight known SNPs that are polymorphic in the Latvian dark-head, Merinolandschaf, Ile de France, Texel, Charollais, Poll Dorset, White Suffolk, Lincoln, Kamieniec, Pomeranian, and Colored Polish Merino were monomorphic in the Ukrainian Carpathian Mountain breed. The following genotypes were identified: c.*707TT, c.*709AA, c.*874TT, c.*1098AA, c.*1232GG, c.*1267AA, c.*1316GG, c.*1489GG in the Ukrainian Carpathian Mountain breed.

Thus, the sequencing of the 3′-untranslated region of the myostatin gene in the Ukrainian Carpathian Mountain sheep revealed complete monomorphism across eight known SNP loci, including c.*1232G>A, which has been previously linked to economically important traits in other sheep breeds. While the absence of genetic variation in the studied region suggests that this particular fragment may have limited utility for marker-assisted selection in this population, this conclusion should be interpreted with caution. The small sample size may not fully reflect the genetic diversity of the breed, and the study did not include phenotype-genotype association analysis, which is essential for assessing the functional significance of genetic markers. Moreover, focusing solely on the 3′UTR excludes the possibility that other regions of the *MSTN* gene, such as exons, introns, or promoter regions, may harbor functional polymorphisms with relevance for selection.

It is also worth noting that while polymorphic (particularly heterozygous) loci are typically used in mark-

GCTGAATGGCTGATGTTATCAGGTTTATCAAGCAAAAAACATTCAGTAAAGTAATAAGTTTCTCCTTTCTTCAGGTGCATTTTTACACTC
CTCCCTATGGGCAATGGATTTTCCATAAAGAAAGAAAAA**N**C**M**TTTTTCTAGAGGTCTACATTCAATTCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGT
GTTTAAAAGGCAGTCAAAAAGTATTCATTTTTGTCAAAATTTCAAAATTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATAATG
GAAATGACTGATTCTATCAATA**K**TGTATAAAAAGATTTTGAAAACAGTTGCATTTATATAATATGTATACAATATTGTTTTGTAAATAAATGTCT
CCTTTTTTATTTACTTTGGTATATTTTTACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAAGACATGTCATGTGGGACATAAAAGCAA
ATGCTTATATTTTGGAGCAAATTAGTTGATTAAATAGTGGTCTTAAAACTCCATATGC**R**AATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATT
TTTTTACATTGTTAGCATTCACTTATGGGTTCGTGATGGCTGTATAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCATTGTATTCAAATCT
CAAC**R**TTCCATTATTTTAATACTTATAAATATTAAGCAA**R**CCAAAATGATTTAACTCTATTATCTGAAATCAGAATAATAAACTGATG**R**TATCTT
ACAAATTGTTAATTTTATTTTATAATTTGATAATGAATATATTTCTGCATATATTTACTACTATTTTGTAAATTAGGATTTTGTTAATCAAATAAATT
GTACTTATGATTAAGTGAAATTATTTCTTACATCTAATGTGTAGAAACAATGTAAGTTATATTAAAGT**R**TTTTCACCTTTTTTGAAAGACAACA
GTTTTAGGTTATAATGATTAACTCTAGATTTCTGGCTTCCACTTTATTATAAAAGTTTAAGGACTGAGCACAAAAGTTTGGTTTAGAAATGTT
AGGTCTGCTACTCTAGTTTCTCATGGGTGAAATTCCTGTT**ACATTGGTTCTGGTCAAGTTGCT**

Fig. 1. The work sequence of the DNA. The forward and reverse primers and positions where single nucleotide substitutions could potentially occur are underlined and highlighted: **K** — G or T, **M** — A or C, **N** — A or C or G or T, **R** — A or G. Information about the polymorphisms was obtained from the *Ensembl* database (on 11 March 2025]).

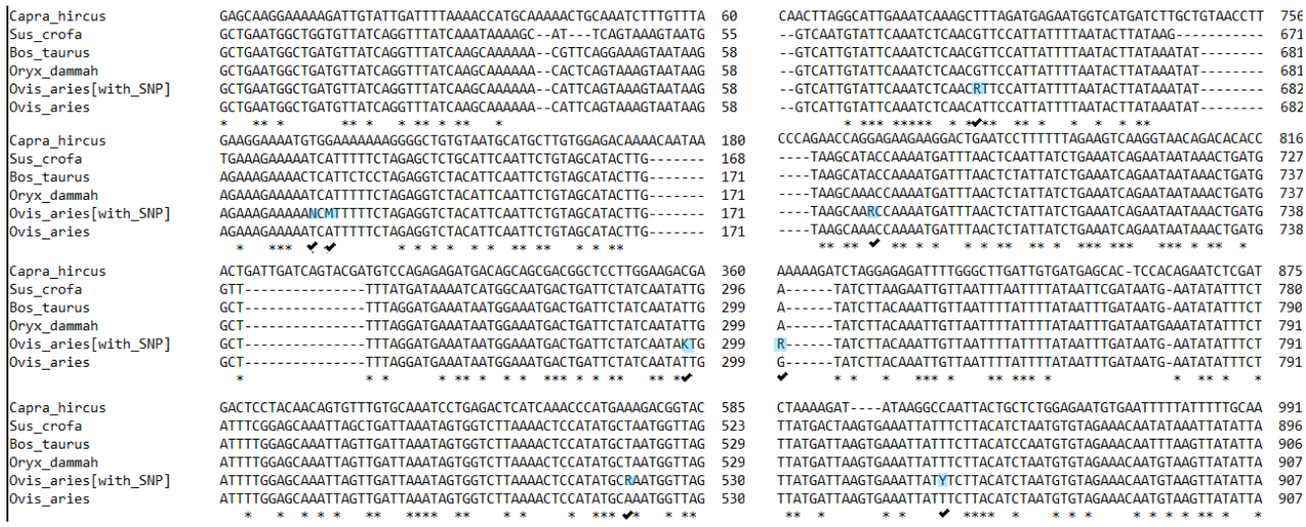


Fig. 2. The *MSTN* gene partial sequence alignment between species. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 3′UTR region are described in sheep using single letter code: **K** — G or T, **M** — A or C, **N** — A or C or G or T, **R** — A or G. GenBank (NCBI) accession numbers of the *MSTN* gene sequences used in the study are indicated in the Materials and Methods section.

Table. Sheep breeds and *MSTN* gene polymorphisms located in the 3′UTR (1093 pb)

ID	Localization	Mutation	Alternative name	Breed in which the mutation was detected	Reference
rs591795591	2:118150140	T/-	c.*707DelT	Latvian dark-head Merinolandschaf, Ile de France and Texel (TEX)	[23]
rs414527527	2:118150142	A/C	c.*709A>C	Charollais	[23]
rs1093989187	2:118150307	T/G	c.*874T>G	—	[7]
rs430092736	2:118150531	A/G	c.*1098A>G	—	[7]
rs408469734	2:118150665	A/G	c.*1232G>A g.9827G>A, g, +6723G>A, c. 2360G>A	Texel, Charollais, Poll Dorset White Suffolk, Lincoln, Kamieniec, Pomeranian, Colored Polish Merino	[9, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 23]
rs1088525878	2:118150700	A/G	c.*1267A>G	Romney	[7]
rs419982449	2:118150749	G/A	c.*1316G>A	Charollais	[23]
rs592881811	2:118150922	G/A	c.*1489G>A	Ouled Djellad	[7]

er-assisted selection due to their ability to differentiate individuals and associate genotypes with phenotypes, monomorphic loci can also hold value. A fixed (monomorphic) allele may indicate a previously successful selection event and a genetically established trait in the breed. Additionally, such loci can be informative in population comparisons, evolutionary studies, or when evaluating the genetic uniformity of a breed. Therefore, the presence of monomorphic loci should not be interpreted as entirely lacking relevance but rather as part of a broader genetic context. Therefore, it is important to continue studying other regions of the *MSTN* gene, including a larger number of animals and phenotype data. This will help to more accurately assess the potential of *MSTN* as a genetic marker for improving economically important traits in the Ukrainian Carpathian Mountain sheep.

Using sequencing of the 3-untranslated region (3′UTR) of the myostatin gene of the Ukrainian Carpathian Mountain sheep the following genotypes were identified: c.*707TT, c.*709AA, c.*874TT, c.*1098AA, c.*1232GG, c.*1267AA, c.*1316GG, c.*1267AA, c.*1489GG. Based on obtained results, we concluded that it is important to continue studying other regions of the *MSTN* gene, including a larger number of animals and phenotype data. This will help to identify specific mutations within the gene that may serve as potential genetic markers for improving economically important traits in the Ukrainian Carpathian Mountain sheep.

References

1. Animal Breeding Center. Available at: http://animalbreedingcenter.org.ua (last access 13.03.2025)
2. Bellinge RH, Liberles DA, Iaschi SP, O'Brien PA, Tay GK. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genet.* 2005; 36 (1): 1–6. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2004.01229.x.
3. Burda LR, Stapay PV. Physicochemical parameters of milk of sheep of the Ukrainian Mountain Carpathian breed under different conditions of keeping. *Sci Tech Bull*. 2008; 9 (4): 13–17. (in Ukrainian)
4. Burkat VP (ed). *Sheep Farming in Ukraine*. Kyiv, Agrarna nauka, 2006: 614 p. ISBN 966–540–082–7. (in Ukrainian)
5. Chokan T, Radko A, Tarasjuk S, Szumiec A, Rubiś D. Genetic structure of Ukrainian Mountain Carpathian sheep by use of microsatellite loci. *Anim Breed Genet.* 2018; 51: 225–230. DOI: 10.31073/abg.51.30. (in Ukrainian)
6. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*. 2006; 38: 813–818. DOI: 10.1038/ng1810.
7. *Ensembl Project*. The genome browser. Available at: https://www.ensembl.org/index.html (last access 13.03.2025)
8. Gangemi CMA, Alaimo S, Pulvirenti A, García-Viñuales S, Milardi D, Falanga AP, Fragalà ME, Oliviero G, Piccialli G, Borbone N, Ferro A, D'Urso A, Croce CM, Purrello R. Endogenous and artificial miRNAs explore a rich variety of conformations: a potential relationship between secondary structure and biological functionality. *Sci Rep*. 2020; 10: 453. DOI: 10.1038/s41598-019-57289-8.
9. Grochowska E, Borys B, Mroczkowski S. Effects of intronic SNPs in the myostatin gene on growth and carcass traits in Colored Polish Merino sheep. *Genes*. 2019; 11 (1): 2. DOI: 10.3390/genes11010002.
10. Hadjipavlou G, Matika O, Clop A, Bishop SC. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (*GDF8*) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. *Anim Genet.* 2008; 39 (4): 346–353. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01734.x.
11. Han J, Forrest RH, Hickford JG. Genetic variations in the myostatin gene (*MSTN*) in New Zealand sheep breeds. *Mol Biol Rep*. 2013; 40 (11): 6379–6384. DOI: 10.1007/s11033-013-2752-7.
12. Hickford JGH, Forrest RH, Zhou H. Letter to the editor. *J Anim Sci.* 2009; 87 (6): 1853. DOI: 10.2527/jas.2009-1960.
13. Hope M, Haynes F, Oddy H, Koohmaraie M, Al-Owaimer A, Geesink G. The effects of the myostatin g+6723G>A mutation on carcass and meat quality of lamb. *Meat Sci.* 2013; 95 (1): 118–122. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.03.029.
14. Johnson PL, Dodds KG, Bain WE, Greer GJ, McLean NJ, McLaren RJ, Galloway SM, van Stijn TC, McEwan JC. Investigations into the GDF8 *g+6723G-A* polymorphism in New Zealand Texel sheep. *J Animal Sci.* 2009; 87 (6): 1856–1864. DOI: 10.2527/jas.2008-1508.
15. Kijas JW, McCulloch R, Edwards JEH, Oddy VH, Lee SH, van der Werf J. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine *GDF8* locus. *BMC Genet.* 2007; 8: 80. DOI: 10.1186/1471-2156-8-80.
16. Kolenda M, Grochowska E, Milewski S, Mroczkowski S. The association between the polymorphism in the myostatin gene and growth traits in Kamieniec and Pomeranian sheep breeds. *Small Rum Res.* 2019; 177: 29–35. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2019.06.007.
17. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl Acid Res*. 2019; 47 (D1): D155–D162. DOI: 10.1093/nar/gky1141.
18. Masri AY, Lambe NR, Macfarlane JM, Brotherstone S, Haresign W, Bünger L. Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.*1232G>A) on carcass traits in crossbred lambs. *Meat Sci.* 2011; 87 (4): 412–418. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.11.019.
19. *miRBase*: The microRNA database the archive for microRNA sequences and annotations. Available at: https://mirbase.org (last access 13.03.2025)
20. Petryshyn MA, Gaivanovych SI, Yatskevich YO. *Wool Quality of the Precarpathian and Transcarpathian Intrabreed Types. Sheep Breeding.* Kyiv, Agrarna nauka. 1995: 53–56. (in Ukrainian)
21. Rieznykova NL. Extinct farm animals' breeds of Ukraine. *Anim Breed Genet*. 2022; 64: 201–219. DOI: 10.31073/abg.64.18. (in Ukrainian)
22. Stapay PV, Makar IA, Havrylyak VV, Paranyak NM, Lyko IY, Tkachuk VM, Chokan TV, Sedilo GM, Perih DP, Martyshchuk MV. *Physiological and Biochemical Foundations of Sheep Nutrition*. Lviv, Leo-Blank, 2007: 100 p. (in Ukrainian)
23. Trapina I, Kairisa D, Plavina S, Krasnevska N, Paramonovs J, Senfelde L, Paramonova N. The multi-loci genotypes of the myostatin gene associated with growth indicators of intensively fattened lambs of Latvian sheep. *Animals.* 2024; 14 (21): 3143. DOI: 10.3390/ani14213143.
24. Zhang W, Wang SY, Deng SY, Gao L, Yang LW, Liu XN, Shi GQ. MiR-27b promotes sheep skeletal muscle satellite cell proliferation by targeting myostatin gene. *J Genet.* 2018; 97 (5): 1107–1117. DOI: 10.1007/s12041-018-0998-5.

Аналіз 3′UTR послідовності гену міостатину в овець української гірськокарпатської породи

Т. Буслик[1], М. Козак[1], М. Юзвяк[1], Ю. Т. Салига[1], П. Стапай[1], А. Саєнко[2], І. Трапіна[3], Н. Парамонова[3]
tvbuslyk@gmail.com

[1]Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна
[2]Інститут свинарства і аграрних наук НААН, вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна
[3]Латвійський університет, факультет фармацевтичних наук, лабораторія геноміки та біоінформатики, вул. Єлгавська, 1, м. Рига, LV-1004, Латвія

Збереження та раціональне використання генофонду овець є дуже актуальною проблемою розвитку вівчарства. Сучасні методи селекційно-племінної роботи забезпечують реалізацію генетичного потенціалу для підвищення продуктивності та племінної цінності сільськогосподарських тварин. Збереження цінного генофонду української гірськокарпатської породи овець має здійснюватися науково обґрунтованими методами, які дозволяють зберегти цінні властивості породи — високу адаптаційну здатність до умов гірського регіону та молочно-м'ясний напрям продуктивності. Ген міостатину (*MSTN*) розглядають як маркер для покращення господарсько корисних ознак у тварин. Було проведено секвенування фрагменту 1093 bp 3′-нетранслюючої ділянки (3′UTR) гена міостатину українських гірськокарпатських овець для пошуку потенційно корисних мутацій у гені. Вісім відомих SNP, кілька з яких є поліморфними у порід латвійська темноголова, мериноландшаф, іль-де-франс, тексель, шаролле, полдорсет, білий суффолк, лінкольн, кам'янська, померанська, кольоровий польський меринос, були мономорфними в української гірськокарпатської породи. У досліджуваній популяції овець виявлено генотипи: c.*707TT, c.*709AA, c.*874TT, c.*1098AA, c.*1232GG, c.*1267AA, c.*1316GG, c.*1267AA, c.*1489GG. Варто зазначити, що у зв'язку з мономорфністю досліджених SNP 3-нетранслюючої ділянки гена міостатину українських гірських карпатських овець маркер-асоційовану селекцію за цим регіоном (3′UTR) гена міостатина проводити не можна. На підставі отриманих результатів ми дійшли висновку про важливість подальшого вивчення інших ділянок гена *MSTN* з охопленням більшої кількості тварин і даних фенотипу. Це допоможе ідентифікувати специфічні мутації в гені, які можуть слугувати потенційними генетичними маркерами для покращення економічно важливих ознак в овець української гірськокарпатської породи.

Ключові слова: *MSTN,* міостатин, 3′UTR, українська гірськокарпатська порода, вівці

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.009
UDC 619.616:2.619.615.3.636.2
Received 07.06.2024 ▪ Revision 05.02.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in animal and poultry feed from Ukrainian feed-producing enterprises

N. V. Kuryata[1], O. M. Chechet[2], O. I. Gorbatyuk[2], O. V. Pishchanskyi[2], L. V. Balanchuk[2], N. Y. Mekh[2], O. M. Zhovnir[3]
sviryaga@gmail.com

[1]Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stus str. Lviv, 79034, Ukraine
[2]State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, 30 Donetska str. Kyiv, 03151, Ukraine
[3]Institute of Veterinary Medicine NAAS, 30 Donetska str., Kyiv, 03151, Ukraine

ORCID:
N. V. Kuriata https://orcid.org/0000-0002-6958-1064
O. M. Chechet https://orcid.org/0000-0001-5099-5577
O. I. Gorbatyuk https://orcid.org/0000-0002-0573-2089
O. V. Pishchanskyi https://orcid.org/0009-0002-0111-4977
L. V. Balanchuk https://orcid.org/0000-0003-0989-5886
N. Y. Mekh https://orcid.org/0009-0006-9472-5054
O. M. Zhovnir https://orcid.org/0000-0003-1677-2120

Authors' Contributions:
KNV: Conceptualization; Methodology; Investigation; Data curation; Visualization.
C**OM:** Conceptualization; Project administration; Supervision.
GOI: Conceptualization; Methodology; Investigation; Supervision; Data curation; Visualization.
POV: Conceptualization; Project administration; Supervision; Methodology; Investigation.
BLV: Methodology; Investigation.
MNY: Methodology; Investigation.
ZOM: Methodology; Investigation.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
Not applicable.

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

The article presents the results of studying the sensitivity of *Escherichia coli* strains isolated from animal and poultry feed samples to fluoroquinolones of the second (ofloxacin, norfloxacin), third (levofloxacin) and fourth (moxifloxacin) generations. It was shown that high resistance to norfloxacin was detected in 7 strains of isolated *E. coli*, which accounted for 33.3 % of the identified ones. To ofloxacin and to the representative of the third generation of fluoroquinolones — levofloxacin, 3 isolated strains of *E. coli* were resistant, which was 14.3 % of the studied strains. Resistance to the representative of the fourth generation of fluoroquinolones — moxifloxacin — was detected in 1 strain of *E. coli*, which was 4.8 % of the tested strains. The results of the studies on fluoroquinolone resistance of the isolated *E. coli* strains indicate a significant contamination of animal and poultry feed with fluoroquinolone-resistant escherichia. This poses potential risks for the spread and possible transmission of such resistance to other bacterial species and the normobiota of the gastrointestinal tract of animals, poultry when ingested with feed and humans when consuming products of animal origin after feeding such feed.

Key words: *Escherichia coli*, fluoroquinolones, mixed fodder, bran, meal, premixes, animal meal, fish meal

Introduction

Achieving the welfare of animals and poultry, ensuring their high productivity, their resistance to bacterial diseases, high livestock safety, and obtaining safe animal products is impossible without the use of high-quality, safe and nutritious feed [16, 19]. Scientists emphasize the need to create a strong feed base, which includes a system and structure for the production of biologically safe feed and is one of the main conditions for ensuring food security in Ukraine [9, 12]. However, a number of researchers emphasize the problem of contamination of feed with bacterial pathogens, including zoonotic pathogens, during their production, at critical points of certain technological processes, due to the lack of prediction of contamination of individual components of feed used as raw materials from other agricultural sectors [7, 14]. Although Ukraine has a system for monitoring raw materials and products of the entire agricultural sector, monitoring of animal and poultry feed does not cover all possible risks. The resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics isolated from cattle, pig and poultry feed, feed materials, dry and canned feed remains an extremely urgent problem today. This is due to the danger of antibiotic resistance transmission to other species of animals, poultry, and humans [2, 4]. In the last decade, bacterial microorganisms have developed resistance mechanisms that have seriously limited the effectiveness of conventional antibiotic therapy [3].

It should be recalled that Ukraine has implemented the National Action Plan to Combat Antimicrobial Resistance in accordance with the provisions of the Global Strategy of the World Health Organisation (WHO) to curb antibiotic resistance. However, the Plan does not cover Ukrainian feed production enterprises.

Scientists point out that *E. coli* is included in the list of pathogens that the WHO considers to be resistant pathogens [6]. In particular, *E. coli* is able to develop resistance to clinically important antibiotics — fluoroquinolones. The mechanism of action of fluoroquinolones is based on the specific inhibition of DNA gyrase (for gram-negative microorganisms) and topoisomerase IV for gram-positive bacteria [3].

The aim of our work was to test *E. coli* strains isolated from animal and poultry feed samples for susceptibility to clinically important representatives of fluoroquinolones of the II (ofloxacin, norfloxacin), III (levofloxacin) and IV (moxifloxacin) generations and to determine the prevalence of fluoroquinolone-resistant escherichia.

Materials and Methods

The study was carried out in the Scientific Research Microbiology Department of SSRILDVSE (Kyiv) and the Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Lviv).

As a result of microbiological studies of 382 samples of various types of animal and poultry feed, 21 *E. coli* strains were isolated and identified. In particular, among 36 samples of premixes, *E. coli* was isolated in 2 cases; among 47 samples of mixed fodder and bran — in 7 cases; among 127 samples of meal and cake — in 6 cases; among 88 samples of other feeds — in 6 cases, *E. coli* was isolated from grain samples [7].

In the studies to determine the susceptibility of *E. coli* of the isolated strains to fluoroquinolones, discs with a certain antibiotic concentration were used according to the latest EUCAST recommendations, in particular, ofloxacin (5 µg) and norfloxacin (10 µg) — second-generation fluoroquinolones, levofloxacin (5 µg) — third-generation fluoroquinolones and moxifloxacin (5 µg) — fourth-generation fluoroquinolones [17].

All antibiotic disks are manufactured by Himedia Laboratories Pvt. Limited, India with the appropriate expiration dates. Antibiotic disks are registered in Ukraine and meet international quality standards ISO, CE, WHO GMP [17].

In accordance with the recommendations of the EUCAST version, before setting up experiments to determine the susceptibility to fluoroquinolones of the isolated E. coli strains, regular and extended internal quality control was performed to determine the diffusion of disks with fluoroquinolones at their respective concentrations: ofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), levofloxacin (5 µg), moxifloxacin (5 µg) [18].

Mueller Hinton Agar M173 (Mueller-Hinton agar) with a pH in the range of 7.2–7.4 was used for testing according to EUCAST recommendations. The manufacturer is HIMEDIA, the batch used has been tested and standardized in accordance with the requirements of CI-SI-M6: Protocol for the evaluation of dry Mueller Hinton agar. The composition of the Mueller-Hinton agar on a g/l basis includes: meat infusion 300.0; acid hydrolyzate of casein 17.5; starch 1.50; agar-agar 17.00. The agar was prepared according to the described method: 38.0 g of powder was dissolved in 1000 ml of distilled water, boiled until the powder was completely dissolved; sterilized at 1.1 atm (121°C) for 15 min. After sterilization, the Mueller-Hinton agar was thoroughly mixed and poured into Petri dishes with an agar column height of 4.0±0.5 mm (about 25.0 cm^3). After complete solidification of the agar, the dishes were dried to remove condensation. Ready-made Mueller-Hinton agar plates were checked for sterility and suitability for *E. coli* growth. To control the sterility, the plates with Mueller-Hinton medium were left in a thermostat at 37.0±1.0°C for 24 hours. Control of the growth properties of Mueller-Hinton medium was checked by using a test culture of *E. coli* ATCC 25922 for inoculation, followed by cultivation in a thermostat at 37.0±1.0°C for 24 hours and determination of the growth rate of the culture.

For regular extended internal control of the determination of diffusion of fluoroquinolone disks, the test culture of *E. coli* ATSS 25922, recommended by EUCAST for microorganisms of the *Enterobacterales* order, was used. The test culture of *E. coli* was inoculated on MPA and after 24 h of incubation in a thermostat at 37±0.5°C, the agar of the grown daily culture was washed off with sterile saline under aseptic conditions. Using a turbidity detector for bacteriological suspensions (Densi-La-Meter "Lachema"), the inoculums were brought to a concentration of 0.5 McFarland optical units with sterile saline.

The results of the routine and extended internal quality control for determining the diffusion of fluoroquinolone disks were recorded by measuring the diameter of the zones of growth inhibition of the test culture of *E. coli* ATCC 25922 and checking their compliance with the values recommended by EUCAST [18].

To determine the susceptibility to the indicated fluoroquinolones, inoculums of the isolated *E. coli* strains were prepared in a similar way (as well as the test culture).

The prepared bacterial inocula of the isolated *E. coli* strains were applied to bacterial plates with Mueller-Hinton agar in a volume of 0.1 cm^3 per plate. Inoculation of the respective bacterial suspensions into the agar was performed using a sterile swab, which was previously moistened in the respective inoculum. The applied inoculum of escherichia was thoroughly rubbed into the agar surface. Rubbing was performed by rotating the test dish in a circle. The inoculated bacterial dishes were kept at room temperature for about 15 minutes to diffuse the respective bacterial inocula into the agar. The antibiotic disks were applied to the surface of the inoculated bacterial dishes (4 for each dish). Incubation of the cups with cultures and antibiotic disks was carried out for 20 h in a thermostat at a temperature of 35±1°C.

The results were recorded by measuring the diameter of the growth inhibition zones of each *E. coli* strain around the disk with the corresponding antibiotic. The zone of growth inhibition of escherichia strains was clear, without any growth within it. To measure the growth inhibition zones, the bacterial dish with the lid closed was placed upside down over a dark matte surface at an angle of 45°, creating a reflected light effect. The growth inhibition zone was measured using a caliper to the nearest millimeter.

The results were interpreted in accordance with the current version of EUCAST according to the Breakpoint Tables for the interpretation of the diameters of the zones of growth inhibition of cultures. [17].

Research Results

The results of routine quality control of disks containing fluoroquinolones ofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin are presented in table 1.

The results of the quality control of the diffusion of disks with ofloxacin, norfloxacin, levofloxacin and moxifloxacin showed that the diameters of the growth inhibition zones under their action on the test culture of *E. coli* ATCC 25922 were within the permissible values. In particular, according to EUCAST, the range of permissible values of the size of the zone of growth inhibition of *E. coli* ATCC 25922 for ofloxacin is within 29–33 mm. During the quality control of the disks with ofloxacin, the diameter of the growth inhibition zone was 32 mm, which confirmed the compliance of the drug with EUCAST requirements. According to the results of the quality control of the diffusion of disks with norfloxacin, its compliance with EUCAST requirements was confirmed, since the diameter of the growth inhibition zones of the test culture of *E. coli* was 31 mm, with the permissible range of values from 28 to 35 mm. The quality of diffusion of moxifloxacin disks was confirmed by the diameter of the zone of growth inhibition of the test culture of *E. coli* at 30 mm with a range of permissible values from 28 to 35 mm. Based on the analysis of the results of the control of diffusion of disks with fluoroquinolones, these antibacterial drugs were approved for use in further studies of the sensitivity of the isolated *E. coli* strains.

According to the analysis of the results of studies on the sensitivity of 21 (twenty-one) identified *E. coli* strains to fluoroquinolones, the highest resistance to norfloxacin was found in 7 (33.3 %) strains of *E. coli.* It should be noted that the above-mentioned strains of *E. coli* were isolated from samples of feed bran (2 strains), wheat grain (2), sunflower sprats (2) and protein-mineral-vitamin supplements for poultry (1 strain). Importantly, the *E. coli* strain Ec18 isolated from wheat bran was completely insensitive to norfloxacin, as evidenced by the continuous growth of *Escherichia* colonies around the antibiotic disk.

It should also be noted that in *E. coli* strain Ec49, isolated from sunflower meal, developed resistance to norfloxacin in individual bacteria among the susceptible population. This was confirmed by the growth of single colonies in the zone of crop growth inhibition, the diameter of which was 33 mm, and the zone without colony growth was 24 mm (table 2).

It should be noted that among the isolated escherichia, strain Ec18 isolated from wheat bran was found to be completely resistant to norfloxacin, a representative of the second-generation fluoroquinolones (fig. 1).

The results of tests to study the sensitivity of isolated *E. coli* to ofloxacin showed the resistance of 3 (14.3 % of the identified) strains of *E. coli* Ec31, Ec42, and Ec49 isolated from samples of wheat bran and sunflower meal.

According to the results of the study, 33.3 % of *E. coli* strains isolated from animal and poultry feed samples had a high level of resistance to norfloxacin and 3 strains of *E. coli* showed resistance to ofloxacin. At the same time, resistance to ofloxacin continued to develop among susceptible bacteria in the *E. coli* population. This was confirmed by the growth of single colonies in the zone of growth inhibition. The strain Ec49 was re-identified, in which, under the action of ofloxacin, bacteria with resistance to ofloxacin were formed in the sensitive population

Table 1. Results of regular extended internal quality control for the determination of diffusion of fluoroquinolone disks with *E. coli* test culture ATCC 25922 according to EUCAST

Antibiotic	**According to EUCAST recommendations (Version 13.2, 2023)**		Results of studies of regular extended internal quality control of diffusion of disks with fluoroquinolones:		
	Concentration of the drug, µg	**Diameter of the inhibition zone growth of the test culture, mm**	with the test culture of *E. coli* ATCC 25922 (according to the latest EUCAST recommendations for the study of the sensitivity of bacteria of the genus *Enterobacterales* to fluoroquinolones)		
		range of permissible values, mm	Diameter of growth inhibition zones, mm	conformity recommendations EUCAST	Conclusions
Ofloxacin	**5**	**29–33**	32	is within the range of permissible values	admission to the main experiment
Norfloxacin	**10**	**28–35**	31	— ‘’ —	— ‘’ —
Levofloxacin	**5**	**29–37**	33	— ‘’ —	— ‘’ —
Moxifloxacin	**5**	**28–35**	30	— ‘’ —	— ‘’ —

Table 2. Results of tests for fluoroquinolone susceptibility of *E. coli* strains isolated from animal and poultry feed samples from feed production enterprises in Ukraine, mm (n strains = 21)

No.	Type of feed from which isolated and identified strains *of E. coli*	Isolated strains *of E. coli*	Fluoroquinolones used in the experiment:							
			Ofloxacin (5 µg) II generation		Norfloxacin (10 µg) II generation		Levofoxacin (5 µg) III generation		Moxifloxacin (5 µg) IV generation	
			Diameter inhibition. strain growth, mm	interpretation	Diameter inhibition. strain growth, mm	interpretation	Diameter inhibition. strain growth, mm	interpretation	Diameter inhibition. strain growth, mm	interpretation
According to EUCAST requirements										
Range of permissible values of the diameter of the disk diffusion zone according to the EUCAST checkpoint table, mm			S≥ R< 24 22		S≥ R< 24 24		S≥ R< 25 22		S≥ R< 22 22	
Research results										
1	Protein, mineral and vitamin supplement for poultry	Ec15	31	S	**20**	**R**	28	S	**20**	**R**
2	Compound feed for cattle	Ec16	30	S	28	S	25	S	23	S
3	Wheat bran	Ec18	22	S	***c.rg.**	**R**	**20**	**R**	25	S
4	Pre-starter food «Piglet»	Ec21	30	S	26	S	**18**	**R**	31	S
5	Wheat fodder bran	Ec27	27	S	31	S	28	S	29	S
6	Sunflower meal	Ec31	**15**	**R**	30	S	23	S	25	S
7	Wheat fodder bran	Ec42	**15**	**R**	30	S	26	S	25	S
8	Sunflower meal	Ec49	****21/ (30)**	**R**	****24/ (33)**	**R**	26	S	27	S
9	Vitamin and mineral premix for calves TC VMP TSB 1 %	Ec53	23	S	28	S	28	S	25	S
10	Corn grain	Ec55	23	S	28	S	28	S	25	S
11	Sunflower meal	Ec57	27	S	28	S	25	S	24	S
12	Wheat fodder bran	Ec58	26	S	30	S	**21**	**R**	30	S
13	Soybean meal	Ec59	25	S	31	S	25	S	29	S
14	Sunflower meal	Ec61	28	S	28	S	24	S	32	S
15	Corn grain	Ec64	26	S	28	S	25	S	24	S
16	Corn grain	Ec65	29	S	33	S	28	S	28	S
17	Wheat fodder bran	Ec66	28	S	**22**	**R**	30	S	24	S
18	Corn grain	Ec67	30	S	28	S	26	S	30	S
19	Wheat grain	Ec68	26	S	**20**	**R**	24	S	27	S
20	Sunflower meal	Ec69	26	S	**22**	**R**	27	S	24	S
21	Wheat of 2 and 3 classes	Ec70	26	S	**19**	**R**	26	S	22	S
ALL fluoroquinolone-resistant strains:			**3**		**7**		**3**		**1**	

Note. S — sensitive; R — resistant *c.gr. — continuous growth of bacteria to the disk (no growth inhibition zone); **21/(30) — a clear zone of growth inhibition of 21 mm with the formation of a growth inhibition zone of 30 mm (single colonies of *E. coli* grew from 30 mm to 21 mm)

of *E. coli*. This was confirmed by the results of the study, as the diameter of the zone of inhibition of culture growth of this strain was 30 mm, and decreased to 21 mm due to the growth of single culture colonies in the zone of inhibition. In *E. coli* strains Ec31, Ec42, the diameter of the growth inhibition zone was limited and amounted to 15 mm, while the range of permissible values according to EUCAST was less than 22 mm (fig. 2).

The analysis of the test results showed that the level of resistance of 3 (14.3 % of the identified) strains of *E. coli* Ec18, Ec21 and Ec58 was quite high to the representative of the third generation of fluoroquinolones — levofloxacin.

Resistance to moxifloxacin was detected in one strain of *E. coli* Ec15 (4.8 % of the identified strains). The risk of spreading *E. coli* resistant to IV generation fluoroquinolones, as recognized antibiotics with high bactericidal activity, is enhanced by the fact that this strain was isolated from samples of protein-mineral-vitamin supplement for poultry and is likely to contaminate a large percentage of poultry, transmit its resistance to other populations of bacterial microorganisms and therefore be dangerous to human health, other animal and poultry species.

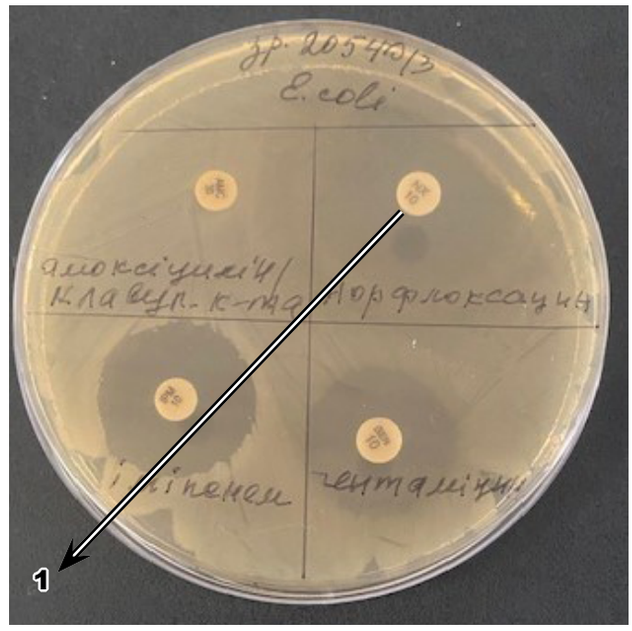


Fig. 1. Norfloxacin resistance of *E. coli* strain Ec18 isolated from wheat bran

Note. 1 — no zone of growth inhibition.

Discussion

A number of researchers still hold the opinion of the high bactericidal efficacy of third-generation fluoroquinolones and are convinced that they have high bactericidal activity against gram-negative and gram-positive microorganisms; bacterial pathogens sensitive to penicillin; penicillin-resistant *Streptococcus pneumonia* and show bactericidal activity against atypical pathogens. The results of our research and that of other scientists show that sensitivity is decreasing and resistance is being developed in microorganisms to all generations of fluoroquinolones.

Scientists report that in the study of animal feed and mixed fodder, the species composition of the microflora is represented by *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosae*. The largest share was made up of *E. coli* isolates . According to the authors, during the period 2019–2021, there was a tendency to increase the number of *E. coli* resistant to antibacterial drugs, the share of which in 2021 amounted to 26.6 % of the studied feed samples. Scientists emphasize that among *E. coli* isolates, the activity of resistance to fourth-generation fluoroquinolones is increasing, which until now have been characterized by high bactericidal activity against gram-positive, gram-negative, anaerobic, acid-fast microorganisms, as well as atypical pathogens, peptonococci, peptinostreptococci [8].

Resistance to moxifloxacin was detected according to the results of our studies in the case when *E. coli* was isolated and identified in a sample of poultry feed.

Scientists emphasize that fluoroquinolones have a rapid and effective bactericidal effect, have good penetration into organs and tissues, and ensure a high level of drug concentration in the blood. Currently, fluoroquinolones are considered to be one of the most bactericidally effective drugs to which bacterial pathogens are very sensitive and only in a few cases have they developed resistance to these antibiotics [10, 15]. That is why fluoroquinolones are considered to be priority antibiotics to which resistance in pathogens of bacterial etiology develops to a lesser extent. This is also reported by practitioners and scientists who use fluoroquinolones in severe cases of pneumonia caused by various pathogens, including representatives of the *Enterobacteriaeceae* family — *E. coli* and *Klebsiella* spp. [13]. There is still no consensus on

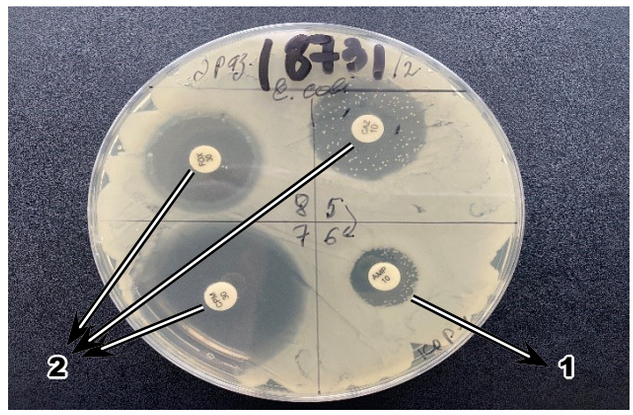


Fig. 2. Formation of antibiotic resistance in individual bacteria of the sensitive population of the *E. coli* strain Ec31 isolated from sunflower meal sample

Note. 1 — the zone of growth inhibition is clear of colony growth (culture is sensitive to the antibiotic); 2 — growth characteristics of individual colonies after exposure to fluoroquinolones and other antibiotics in the zone of inhibition of the sensitive population of escherichia (formation of resistance).

this issue. Other researchers and medical practitioners report a low therapeutic level of III and IV generation fluoroquinolones and the need for fluoroquinolones with higher bactericidal activity [11].

The results of our studies have shown the prevalence of fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains isolated from different types of animal and poultry feed, which indicates possible risks of disease in animals and poultry and epidemiological consequences due to the possibility of transmission of such resistance to other species of microorganisms and the normal intestinal biota of humans, animals and poultry.

References

1. Baggio D, Ananda-Rajah MR. Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Austral Prescr.* 2021; 2021; 44: 161–164. DOI: 10.18773/austprescr.2021.035.
2. Chechet OM, Haidei OS, Andriiashchuk VO, Horbatiuk OI, Kovalenko VL, Musiiets IV, Ordynska DO, Skliar VV, Gutyj BV, Krushelnytska OV. Results of monitoring studies of caecal samples with animal contents for antimicrobial resistance in 2021. *Sci Mess LNUVMBT Ser Vet Sci*. 2022; 24 (106): 128–135. DOI: 10.32718/nvlvet10620.
3. Coba-Males MA, Lavecchia MJ, Alcívar-León CD, Santamaría-Aguirre J. Novel Fluoroquinolones with Possible antibacterial activity in gram-negative resistant pathogens: In silico drug discovery. *Molecules*. 2023; 28 (19): 6929. DOI: 10.3390/molecules28196929.
4. Fukushima S, Hagiya H, Uda K, Gotoh K, Otsuka F. Current prevalence of antimicrobial resistance in Okayama from a national database between 2018 and 2021. *Acta Med Okayama*. 2023; 77 (3): 255–262. DOI: 10.18926/AMO/65490.
5. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *CSH Persp Med.* 2016; 6: a025320. DOI: 10.1101/cshperspect.a025320.
6. Kanyuka OV, Pavliv OV. Antimicrobial efficacy of ofloxacin in surgical infections. *Sci Bull LNUVMBT Gzhitsky.* 2012; 14 (2/1): 141–145. Availsble at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2012_14_2(1)__28
7. Kuryata N, Salyha Y, Chechet O, Horbatyuk O, Pishchanskyi O, Balanchuk L. Antibiotic resistance level of *Escherichia coli* isolates isolated from animal and poultry feed samples. Proc Int Sci Pract Conf "Actual Problems of Modern Biology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine", October 3–4, 2024, Lviv, Ukraine. *Biol Tvarin*. 2024; 26 (3): 83.
8. Kushnir IM, Kolodiy GV, Murska SD, Semen IS, Berbeka UZ. Research of feed for productive animals for determination of general microbial pollution. *Sci Tech Bull SSRCIVMPFAIAB*. 2021; 22 (2): 230–236. DOI: 10.36359/scivp.2021-22-2.26.
9. Lavruk VV. Technological processes in the production of livestock products. *Agrosvit*. 2017; 12: 15–19. Available at: http://www.agrosvit.info/?op=1&z=2425&i=2
10. Lungu IA, Moldovan OL, Biriș V, Rusu A. Fluoroquinolones hybrid molecules as promising antibacterial agents in the fight against antibacterial resistance. *Pharmaceutics*. 2022; 14 (8): 1749. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081749.
11. Mori H, Suzuki H. Update on quinolone-containing rescue therapies for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2020; 26 (15): 1733–1744. DOI: 10.3748/wjg.v26.i15.1733.
12. Nalyvaiko LI, Rodionova KO, Avdosieva IV, Ivleva OV. The spread of bacterial infection through feeds and productsof animal origin. *Agr Visnyk Prychornomoria*. 2019; 93: 154–159. Available at: http://lib.osau.edu.ua/jspui/handle/123456789/3305
13. Nesterenko OM, Prokopenko BB, Nesterenko OO, Vorobyova TI. Rationale for the use of levofloxacin 750 mg intravenously for the treatment of severe community acquired pneumonia in the hospital (literature review). *Emerg Med*. 2019; 2 (97): 35–44. DOI: 10.22141/2224-0586.2.97.2019.161641.
14. Pichura V, Potravka L, Domaratskiy Y, Vdovenko N, Stratichuk N, Baysha K, Pichura I. Long-term changes in the stability of agricultural landscapes in the irrigated agriculture of the Ukraine Steppe Zone. *J Env Eng*. 2023; 24 (3): 188–198. DOI: 10.12911/22998993/158553.
15. Shariati A, Arshadi M, Khosrojerdi MA, Abedinzadeh M, Ganjalishahi M, Maleki A., Heydary M, Hoshnud S. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Front Public Health*. 2022; 10: 1025633. DOI: 10.3389/fpubh.2022.1025633.
16. Stepasiuk LM, Lopanchuk AA. Fodder production as the main factor in the effective development of the livestock sector. *Econ Agr Indust Comp.* 2016; 4: 28–32. Available at: https://eapk.com.ua/uk/journals/tom-23-4-2016/kormovirobnitstvo-yak-osnovny-chinnik-efektivnogo-rozvitku-galuzi-skotarstva
17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. Available at: http://www.eucast.org
18. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 13.2, 2023. Available at: http://www.eucast.org
19. Veklenko YA, Hetman NI, Zakhlebna TP, Ksenchina OM. Productivity of feed cultures and efficiency of their production for organic production of plant raw materials. *Feed Feed Prod*. 2020; 89: 143–150. DOI: 10.31073/kormovyrobnytstvo202089-14.

Фторхінолонрезистентні штами *Escherichia coli* в кормах для тварин і птиці з кормовиробничих підприємств України

Н. В. Курята[1], О. М. Чечет[2], О. І. Горбатюк[2], О. В. Піщанський[2], Л. В. Баланчук[2], Н. Я. Мех[2], О. М. Жовнір[3]
sviryaga@gmail.com

[1]Інститут біології тварин НААН, вул. Василя Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна
[2]Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна
[3]Інститут ветеринарної медицини НААН, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

У статті представлено результати вивчення чутливості штамів *Escherichia coli*, виділених зі зразків кормів для тварин і птиці, до фторхінолонів II (офлоксацину, норфлоксацину), III (левофлоксацину) та IV (моксіфлоксацину) поколінь. Показано, що високу стійкість до норфлоксацину виявлено в семи штамів виділених ешерихій, що становить 33,3 % ідентифікованих. До офлоксацину та до представника III покоління фторхінолонів — левофлоксацину — були стійкими по три виділені штами *E. coli*, що становить по 14,3 % усіх досліджених. До представника IV покоління фторхінолонів — моксіфлоксацину — резистентність виявлено в одного штаму *E. coli*, тобто в 4,8 % досліджених. Результати проведених досліджень з вивчення стійкості до фторхінолонів виділених штамів *E. coli* вказують на значну контамінацію кормів для тварин і птиці фторхінолонрезистентними ешерихіями. Це створює потенціальні ризики з розповсюдження та ймовірної передачі такої стійкості іншим видам бактерій і нормобіоті шлунково-кишкового тракту тварин і птиці при потраплянні в організм з кормом, а також людини — якщо вона вживатиме продукцію тваринного походження після згодовування таких кормів.

Ключові слова: *Escherichia coli*, фторхінолони, комбікорм, висівки, шрот, премікси, мука тваринного походження, рибна мука

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.015
UDC 546.48:546.173:577.12
Received 13.01.2025 ▪ Revision 08.03.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Метаболічні процеси в організмі та в кістках експериментальних тварин за умов впливу іонів кадмію та нітритів

Н. С. Хопта, А. Л. Романюк, Л. Я. Нечитайло, А. М. Ерстенюк
nhopta@ifnmu.edu.ua

Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018, Україна

ORCID:
N. S. Khopta https://orcid.org/0009-0009-1350-2089
A. L. Romaniuk https://orcid.org/0009-0002-7667-0484
L. Ja. Netchitajlo https://orcid.org/0000-0002-7330-3411
A. M. Ersteniuk https://orcid.org/0000 0002 5291 5347

Authors' Contributions:
KNS: Investigation; Formal analysis; Writing — original draft.
RAL: Writing — review & editing.
NLJ: Data curation.
EAM: Conceptualization; Supervision.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
The research methodology was approved by the Bioethics Commission of the Ivano-Frankivsk National Medical University (protocol no. 149/25 from 23.01.2025).

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Важкі метали, до яких належить кадмій, а також нітрати й нітрити відносять до найбільш поширених полютантів довкілля. Відомо, що стан кісткової тканини визначається узгодженістю процесів де- та ремінералізації, збалансованістю кальцій-фосфатного обміну, вмістом есенціальних біоелементів, активністю ензимів, що забезпечують ступінь мінеральної щільності кісток. В експерименті вивчали маркери кісткового метаболізму у плазмі крові та стегнових кістках білих щурів-самців за умов комплексної дії іонів кадмію і нітритів. Інтоксикацію тварин здійснювали упродовж десяти діб уведенням відповідної солі (водний розчин $NaNO_2$ з питною водою та внутрішньом'язово розчин $CdCl_2$) у дозі 1/10 LD_{50} щоденно один раз на добу. Показники кісткового метаболізму досліджували на 1-шу, 14-ту та 28-му доби після завершення введення токсикантів. У плазмі крові визначали концентрацію загального й іонізованого кальцію, магнію, фосфатів, оксипроліну, активності лужної і кислої фосфатаз за стандартизованими методиками. Вміст у стегнових кістках біоелементів кальцію, магнію, цинку, купруму й токсичного кадмію визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115ПК. Мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) визначали методом рентгенівської денситометрії. Експеримент проводили з дотриманням вимог біоетики. Результати дослідження показали, що за умов комплексної дії досліджуваних токсикантів у плазмі крові відбуваються суттєві зміни концентрації загального й іонізованого кальцію, магнію, фосфатів. Зростає концентрація оксипроліну та активність кислої фосфатази як маркерів діяльності остеокластів. Водночас активність лужної фосфатази знижується, що свідчить про пригнічення функції остеобластів. У мінеральній фазі стегнових кісток виявили зменшення вмісту остеотропних біоелементів на тлі зростання токсичного кадмію. Також суттєво знижувалася мінеральна щільність стегнових кісток, особливо в ділянках головки та шийки. Найбільші зміни спостерігали на 14-ту і 28-му доби після введення токсикантів. Одержані результати засвідчують порушення кальцій-фосфатного обміну та процесів ремоделювання кісткової тканини в інтоксикованих щурів, зокрема про переважання процесів остеокластичної резорбції над остеосинтезом.

Ключові слова: кадмію хлорид, натрію нітрит, кісткова тканина, маркери кісткового метаболізму, остеотропні біоелементи, мінеральна щільність

Вступ

У сучасних умовах України, коли на значній території відбуваються активні бойові дії та одночасно ведеться інтенсивне аграрне виробництво із застосуванням мінеральних добрив, загрозливо зростає забруднення довкілля солями важких металів, зокрема кадмію (Cd), а також нітратами й нітритами. Дослідження, проведені в північних областях — Чернігівській, Сумській і Харківській — показали, що ґрунти містять небезпечно високий рівень важких металів, а це створює потенційну загрозу для сільського господарства й екосистем [2, 4]. Однак військові дії не є єдиним чинником впливу на погіршення якості ґрунтів — чимало важить порушення агротехніки, наприклад, надмірне використання мінеральних добрив, зокрема азотних. У відносно екологічно чистому Прикарпатському регіоні забруднення ґрунтів, водойм і джерел питної води іонами Cd, а також нітратами й нітритами виявлено поблизу Бурштинської ДРЕС, у районах з інтенсивним агровиробництвом і навіть на деяких територіях гірської зони Карпат [14, 15].

Проблема забруднення довкілля важкими металами стоїть на порядку денному у світі вже не одне десятиліття. Зокрема, відомо, що антропогенний чинник поширення сполук Cd в екосистемах утричі перевищує природні джерела надходження [23]. Відповідно, по харчових ланцюгах Cd потрапляє в організм тварин і людини. Аналіз харчових дієт розвинутих країн за даними низки авторів [15] показав, що в організм дорослої людини з їжею надходить від 4 до 84 мкг Cd щоденно, хоча оптимальна його кількість не повинна перевищувати 1–5 мкг/добу, тимчасом порогова токсичність становить 30 мкг/добу [23]. Цигарковий дим також вносить вагому частку в отруєння організму Cd [8, 18]. Механізм токсичного впливу Cd зумовлений його здатністю активувати процеси пероксидації ліпідів і протеїну (при одночасному пригніченні антиоксидантного захисту), порушувати цілісність мембран, інгібувати активність ензимів, що мають важливе значення для підтримання гомеостазу організму [9, 10, 20, 23]. Відома хвороба ітай-ітай — отруєння людей, викликане вживанням рису, що містив сполуки Cd. При цьому розвивається ушкодження нирок та кісток [19, 20].

Поряд з важкими металами нітрати й нітрити вже тривалий час залишаються найпоширенішими полютантами довкілля в багатьох країнах світу, зокрема і в Україні. Особливо чутливі до їхньої токсичної дії такі категорії населення: діти, вагітні, хронічно хворі з патологією кардіо- та респіраторної систем [5, 11, 24]. Найнебезпечнішою з точки зору ураження нітратами є вода з колодязів і поверхневих джерел. Гранично допустима концентрація нітратів у воді 50 мг/л, а більш токсичних нітритів — 0,5 мг/л. За деякими даними [4, 5] в окремих сільських місцевостях ще до 2022 року рівень нітратів у криничній воді значно перевищував допустимі показники. Також відомо, що харчова добавка E250 (натрій нітрит $NaNO_2$) використовується як консервант і поліпшувач забарвлення рибних і м'ясних продуктів [6]. В організмі значна частина нітратів відновлюються у більш токсичний метаболіт нітрит-іон (NO_2^-), який, як свідчать дослідження [5, 11, 21, 22], сприяє окисненню гемоглобіну до метгемоглобіну, внаслідок чого розвивається гемічна гіпоксія та знижується інтенсивність енергетичного обміну. Ще одним фактором токсичності нітритів є їхня здатність метаболізувати до канцерогенних нітрозамінів. Однак немає достатньої інформації щодо впливу нітритів на стан кісткової тканини.

Зважаючи на сказане вище, актуальним є дослідження впливу іонів Cd^{2+} та NO_2^- на показники метаболічних процесів у кістковій тканині експериментальних тварин. Тому метою даної роботи було дослідити комплексний вплив кадмію хлориду ($CdCl_2$) і натрію нітриту ($NaNO_2$) на показники метаболічних процесів у кістковій тканині білих щурів, вміст остеотропних біоелементів і МЩКТ у різних ділянках стегнових кісток тварин.

Методи дослідження

Експерименти проводили на білих безпородних щурах-самцях (n=36) з масою тіла 170–240 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні. Утримання тварин і маніпуляції з ними проводилися з дотриманням вимог біоетики згідно з українським законодавством та відповідно до положень Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Тварин було поділено на чотири групи: перша група — інтактні (n=12), служили контролем; друга, третя й четверта — інтоксиковані тварини. Інтактним тваринам вводили фізіологічний розчин (0,9 % розчин NaCl) відповідного об'єму. Інтоксикацію тварин здійснювали протягом десяти діб уведенням відповідної солі в дозі 1/10 LD_{50} щоденно один раз на добу (водний розчин $NaNO_2$ з питною водою 21 мг/кг та внутрішньом'язово розчин $CdCl_2$ 1,2 мг/кг маси тіла тварини). З метою вивчення показників у різний період адаптації білих щурів до впливу іонів Cd^{2+} та NO_2^- забір матеріалу (кров і стегнові кістки) проводили після декапітації під легким ефірним наркозом на 1-шу (друга група тварин), 14-ту (третя група) та 28-му добу (четверта група) після завершення введення токсикантів. У плазмі крові визначали концентрацію загального й іонізованого кальцію (Ca), магнію (Mg), рівень фосфатів, активність лужної (ЛФ) і кислої (КФ) фосфатази за допомогою уніфікованих методик з використанням наборів реактивів «Simko LTD», «Lachema» та «Філісіт-Діагностика». МЩКТ вимірювали за допомогою еталонної рентгенівської денситометрії (апарат KUNTCERD-701) у різних ділянках стегнових кісток: діафіза, епіфіза, головки, шийки. Після проведення денситометричних вимірювань стегнові кістки озолювали й у золі визначали концентрацію

біоелементів Ca, Mg, цинку (Zn), купруму (Cu), а також Cd на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115ПК. Отримані результати опрацьовано з використанням критерію Стьюдента. Усі дані аналізували за допомогою програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Результати в таблицях показано як x±SE (середнє значення±стандартна похибка). Відмінності між значеннями вважали вірогідними за P<0,05 [23].

Результати й обговорення

Проведені дослідження показали, що за умов комплексної дії іонів Cd^{2+} та NO_2^- в організмі інтоксикованих тварин спостерігаються суттєві зміни активності ензимів, які є маркерними для стану остеобластів та остеокластів (табл. 1). Лужна фосфатаза (ЛФ, гідролаза, шифр КФ 3.1.3.1.) — гомодимерний глікопротеїн, у кожному мономері якого є п'ять залишків цистеїну, два атоми цинку й один магнію, які формують його активний центр. ЛФ дефосфорилює субстрати, активна в лужному середовищі [5, 7]. Кістковий ізоензим лужної фосфатази, глікопротеїн, який локалізується в мембранах остеобластів, характеризує їх діяльність у процесі остеосинтезу (кісткоутворення) та становить значну частину загальної активності ЛФ. Тому визначення загальної активності ЛФ служить маркером ремоделювання кісткової тканини [6]. Дослідження цього показника в різних групах тварин показало, що активність ензиму ЛФ вірогідно знижувалася протягом усього періоду спостереження, а найнижчу активність зафіксовано на 28-му добу — вона на 47 % менша, ніж в інтактних тварин. Кисла фосфатаза (КФ, шифр КФ 3.1.3.2) — лізосомальний ензим, який дефосфорилює субстрати. КФ монофосфоестераза в активному центрі містить іони Zn^{2+} та окисно-відновну групу $Fe^{2+/3+}$ [19]. Багатоядерні клітини, що беруть участь у резорбції кістки і хряща — остеокласти, секретують кістковий ізоензим кислої фосфатази — тартратрезистентну кислу фосфатазу (ТРКФ) [13, 16]. Підвищення її активності свідчить про посилення процесів руйнування кісткової тканини [1], а також спостерігається при різних захворюваннях, що супроводжуються посиленою резорбцією кісткової тканини, а саме: при остеопорозі, хворобі Педжета, гіперпаратиреозі, нирковій остеодистрофії. Наші дослідження засвідчили, що вже на 1-шу добу після десятиденного введення токсинів активність цього маркерного ензиму кісткової резорбції підвищувалася вдвічі, а до кінця спостереження (четверта група тварин) у 4,5 раза, порівняно з інтактними щурами. У процесі ремоделювання кісткової тканини важливими є збалансованість процесів резорбції й остеосинтезу. Відображенням цього може служити індекс ЛФ/КФ [8]. Як видно з даних таблиці 1, цей індекс поступово вірогідно знижувався у всіх групах інтоксикованих щурів: у 3,8–4,3 раза відповідно на 1-шу й 14-ту доби та у 9,5 раза на 28-му добу, порівняно з показником інтактних щурів.

За таких обставин важливим є дослідження рівня іонів металів, які виступають активаторами досліджуваних ензимів. Як зазначено вище, для ЛФ такими активаторами є іони Zn^{2+} і Mg^{2+}, які формують структуру його активного центру. Результати дослідження концентрації Mg у плазмі крові уражених тварин засвідчили її вірогідне зниження відповідно від 40 % на 1-шу добу до 54–57 % на 14-ту і 28-му доби, порівняно з інтактними (табл. 2). Це можна пояснити накопиченням токсичних іонів Cd^{2+}, який є відомим антагоністом ессенціальних двовалентних металів, зокрема, кальцію, магнію, цинку та інших [9, 19, 20]. Стосовно різкого підвищення активності КФ і концентрації в золі кісток Zn^{2+} (табл. 3), то упродовж експерименту вміст цього біоелемента коливався на 20–31 % нижче за показники інтактних тварин. Можливо, для активності КФ більше значення має концентрація феруму (Fe^{II} та Fe^{III}), що плануємо надалі вивчити.

Зниження активності ЛФ та різке підвищення КФ супроводжувалося неоднозначними змінами концентрації неорганічного фосфату (табл. 2). Найвищий рівень спостерігався на 1-шу добу після десятиденного ураження: на 62 % перевищував значення інтактних тварин. У наступний період (14-та доба) наближався до контрольних значень, а на 28-му добу — на 25 % перевищував контрольні показники. Рівень фосфат-іонів великою мірою визначається співвідношенням активностей ЛФ і КФ, які каталізують гідроліз фосфоестерних зв'язків з утворенням неорганічного фосфату, що має важливе значення для процесів мінералізації кісткової тканини. Можна припустити, що рання фосфатемія пов'язана зі зростанням активності КФ. Активація цього ензиму може відбуватися під впливом субкомпенсованого метаболічного ацидозу, який розвивається при кадмієвій інтоксикації [24]. З іншого боку, концентрація неорганічного фосфату перебуває під контролем паратгормону, кальцитоніну і вітаміну D. Порушення секреції або активності цих регуляторів може призвести до зміни кальцій-фосфатного обміну в організмі експериментальних тварин [10, 21, 25].

Стосовно концентрації загального Ca у плазмі крові інтоксикованих тварин, то ми встановили, що цей показник зростав упродовж перших 14-ти днів після завершення інтоксикації до 21 %, порівняно з контрольною групою (табл. 2). У віддалений період експерименту (28-ма доба) спостерігалося зниження загального вмісту кальцію на 27 %, порівняно з 14-ю добою, та на 12 %, порівняно з інтактними тваринами. Для детальнішої характеристики метаболізму Ca в організмі важливим є дослідження рівня іонізованого кальцію. Відомо, що саме іонізований кальцій плазми визначає біологічну активність цього елемента: іони Ca^{2+} беруть участь у регуляції проникності мембран, у передачі гормональних сигналів, нервового імпульсу, у функціонуванні міокарда, механізмах м'язового скорочення, згортанні крові тощо. Концентрація Ca^{2+} у плазмі крові уражених тварин на 1-шу й 14-ту доби після завершення введення іонів Cd^{2+} та NO_2^- була вищою, ніж у інтактних

на 8–17 %, у пізньому періоді спостереження знижувалася до рівня контрольних показників інтактних щурів. Такі зміни рівня Ca^{2+} у плазмі крові можуть свідчити про порушення функції паращитоподібних залоз, оскільки відомо, що регуляція концентрації іонів Ca^{2+} здійснюється паратгормоном і кальцитоніном. На порушення функції щитоподібної залози за умов кадмієвої інтоксикації вказують і автори окремих досліджень [3]. Щодо впливу нітритів на обмін Са, то можна висловити припущення, що іони NO_2^- можуть взаємодіяти з аморфним фосфатом кальцію і спричиняти порушення цілісності мінерального матриксу кісткової тканини.

Таблиця 1. Активність лужної та кислої фосфатаз у плазмі крові білих щурів-самців (n=36, x±SE)
Table 1. Alkaline and acid phosphatase activity in the blood plasma of white male rats (n=36, x±SE)

Досліджувані показники, активність ензиму у мкмоль/с·л Investigated parameters, enzyme activity in µmol/s·l	Групи тварин / Groups of animals			
	Інтактні / Intact	Інтоксиковані / Intoxicated		
	Перша, контроль I, control (n=12)	Друга, 1 доба II, 2nd day (n=8)	Третя, 14 доба III, 14th day (n=8)	Четверта, 28 доба IV, 28th day (n=8)
Лужна фосфатаза, ЛФ Alkaline phosphatase, ALP	15,07±0,08	10,84±2,28 P<0,005	9,30±1,23 P<0,001	7,10±1,95 P<0,001
Тартрат резистентна кисла фосфатаза, ТРКФ Tartrate resistant acid phosphatase, TRACP	0,93±0,23	1,88±0,18 P<0,01	2,47±0,13 P<0,01	4,17±0,48 P<0,001
Співвідношення активностей ЛФ/КФ Activity ratio ALP/TRACP	16,20±0,35	5,77±0,21 P<0,05	3,76±0,28 P<0,001	1,70±0,19 P<0,005

Примітка. Тут і в інших таблицях P — ступінь вірогідності, порівняно з інтактними тваринами.
Note. Here and in the next tables P is the significance level compared to the intact animals.

Таблиця 2. Біохімічні показники плазми крові білих щурів-самців (n=36, x±SE)
Table 2. Blood plasma biochemical parameters in white male rats (n=36, x±SE)

Досліджувані показники, ммоль/л Investigated parameters, mmol/l	Групи тварин / Groups of animals			
	Інтактні / Intact	Інтоксиковані / Intoxicated		
	Перша, контроль I, control (n=12)	Друга, 1 доба II, 2nd day (n=8)	Третя, 14 доба III, 14th day (n=8)	Четверта, 28 доба IV, 28th day (n=8)
Загальний Ca / Total Calcium	2,34±0,08	2,68±0,13 P<0,005	2,83±0,14 P<0,001	2,08±0,17 P<0,005
Іонізований Ca^{2+} / Ionized Calcium	0,68±0,02	0,43±0,04 P<0,005	0,38±0,02 P<0,001	0,35±0,02 P<0,01
Оксипролін / Oxyproline	28,31±2,79	71,38±3,23 P<0,05	74,56±1,39 P<0,01	99,70±2,94 P<0,001
Фосфати / Phosphates	1,33±0,05	2,16±0,24 P<0,005	1,42±0,08 P<0,01	1,76±0,15 P<0,05
Магній / Magnesium	0,72±0,08	0,43±0,02 P<0,01	0,31±0,03 P<0,001	0,33±0,03 P<0,005

Таблиця 3. Концентрація основних біоелементів та кадмію в золі стегнових кісток білих щурів-самців (n=36, x±SE)
Table 3. The concentration of main bioelements and cadmium in the ashes of femurs of white male rats (n=36, x±SE)

Досліджувані показники, маса на 1 г золи Investigated parameters, weight per 1 g of ash	Групи тварин / Groups of animals			
	Інтактні / Intact	Інтоксиковані / Intoxicated		
	Перша, контроль I, control (n=12)	Друга, 1 доба II, 2nd day (n=8)	Третя, 14 доба III, 14th day (n=8)	Четверта, 28 доба IV, 28th day (n=8)
Кальцій, мг / Calcium, mg	330,9±6,25	311,12±3,31 P<0,01	305,65±3,28 P<0,001	285,06±3,47 P<0,001
Магній, мг / Magnesium, mg	38,14±1,40	51,83±2,14 P<0,001	34,62±1,81 P<0,01	45,61±2,53 P<0,001
Цинк, мкг / Zinc, mkg	458,61±37,24	314,17±25,12 P<0,001	252,90±32,81 P<0,001	369,62±29,33 P<0,001
Купрум, мкг / Copper, mkg	17,95±0,88	13,56±0.72 P<0,001	13,62±0,72 P<0,001	17,7±1,05 —
Кадмій, мкг / Cadmium, mkg	2,10±0,26	8,18±0,43 P<0,001	8,85±0,52 P<0,001	37,08±1,02* P<0,001

Встановлені зміни показників кальцій-фосфатного обміну у плазмі крові спонукали до вивчення кількісного вмісту основних мінеральних компонентів кісткової тканини піддослідних тварин. У результаті дослідження встановлено основні відмінності в хімічному складі мінерального матриксу (табл. 3) інтоксикованих та інтактних тварин, які полягають у тому, що упродовж 28-денного спостереження вміст основного макроелемента кісткової тканини Ca знижувався, порівняно з контрольною групою, від 6,3 % на 1-шу добу до 13,8 % на 28-му добу. Стосовно рівня Mg, то ми відзначили зростання його вмісту у стегновій кістці уражених тварин на 35,8 % (1-ша доба), потім вміст дещо знижувався і на 28-му добу на 19,6 % залишається вищим за рівень інтактних. Визначення концентрації остеотропних мікроелементів купруму (Cu) і цинку (Zn) показало, що вміст Cu на 1-шу і 14-ту доби становив тільки 73 % показника інтактних тварин, а на 28-му добу спостерігалася тенденція до нормалізації. Вміст Zn у стегнових кістках тварин, яких піддавали інтоксикації, протягом усього періоду спостереження був суттєво нижчий за показники контрольної групи, найменші значення зафіксовані на 14-ту добу — на 45 % нижче від рівня інтактних тварин. Дослідження вмісту токсичного елементу Cd показало накопичення його в кістковій тканині, починаючи з 1-ї доби (друга група щурів) — у 3,9 раза, на завершення експерименту цей показник перевищував у 17,7 раза контрольні значення інтактних тварин (табл. 3).

Порушення макро- та мікроелементного складу кісткової тканини, яке спостерігалося за умов комбінованого впливу $CdCl_2$ і $NaNO_2$, викликає структурні зміни мінерального матриксу кістки. Крім цього, Cu і Zn виступають у ролі кофакторів ензимів, і тому мають важливе значення в регуляції метаболічних процесів у кістках. Зокрема, в утворенні колагену (Cu^{2+} як активатор проліл- і лізилгідроксилаз), обміні фосфатів (Zn^{2+} як активатор ЛФ і КФ). На тлі таких змін цікаво було дослідити стан колагенової матриці кістки. Колагенові білки I типу становлять 90 % міжклітинної речовини кістки, решта — це основна мінералізована речовина. Амінокислотний склад колагену дуже специфічний: він містить 23 % оксипроліну й оксилізину — амінокислот, які не входять до жодного з інших білків організму та утворюються з проліну й лізину за допомогою гідроксилаз, згаданих вище [22]. Такий склад забезпечує утворення міцних поперечних зв'язків, які, своєю чергою, формують особливий уклад колагенових волокон у кістці, що сприяє її мінералізації. Тому визначення концентрації у плазмі крові оксипроліну, який забезпечує формування міцної колагенової матриці кістки і з'являється в крові та сечі при катаболізмі колагену, доводить руйнування колагену і є одним із загальноприйнятих маркерів кісткової резорбції [1, 25]. В інтоксикованих тварин (друга, третя, четверта групи) концентрація оксипроліну зростала на початку експерименту в 2,7 раза, а в кінці спостереження у 3,5 раз перевищувала значення інтактних тварин, що узгоджується з різким зростанням активності ТРКФ — лізосомального ензиму остеокластів, які руйнують кісткову тканину.

На тлі таких результатів цікаво було з'ясувати зміни МЩКТ в різних ділянках стегнових кісток інтоксикованих щурів у динаміці експерименту. У підсумку визначено зниження МЩКТ у всіх вивчених ділянках стегнової кістки, а найнижчі значення спостерігалися на 14-ту добу (третя група тварин) у середньому на 48 %. До кінця експерименту МЩКТ дещо відновлювалася, однак була вірогідно нижчою на 21–25 % за контрольні значення інтактних, а найменший показник МЩКТ зафіксовано в головці та шийці стегнової кістки, що узгоджується з іншими результатами, які ми одержали.

Комплексна дія іонів кадмію та нітриту на організм експериментальних тварин (білих щурів-самців) обумовлює значне накопичення в кістковій тканині кадмію, при цьому в мінеральній фазі знижується вміст біоелементів кальцію, магнію, цинку й купруму. Водночас зменшується МЩКТ, особливо в ділянці головки та шийки стегнових кісток. Порушення мінерального складу кістки уражених тварин супроводжується змінами показників кальцій-фосфатного обміну плазми крові, зокрема концентрації кальцію та магнію. Активність лужної фосфатази знижується на тлі зростання активності тартрат резистентної кислої фосфатази, концентрації фосфатів і оксипроліну. Отже, встановлено переважання процесів остеокластичної резорбції в кістках над остеосинтезом. Отримані дані відкривають перспективу подальших досліджень і пошуку ефективних засобів корекції метаболічних процесів в організмі тварин, викликаних впливом органічних і неорганічних полютантів.

Джерела

1. Boykiv DP. Biochemical indicators in the norm and in pathology: Educational guide. Ed. by Sklyarova OY. Kyiv, Medicine, 2007: 320 p. (in Ukrainian)
2. Briefing on the environmental damage caused by the russia's war of aggression against Ukraine (February 10 — February 23, 2024). *EcoZagroza*. Official resource of the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine, 06.03.2024. Available at: https://ecozagroza.gov.ua/en/news/141
3. Chen A, Kim SS, Chung E, Dietrich KN. Thyroid hormones in relation to lead, mercury, and cadmium exposure in the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2008. *Environ Health Perspect*. 2012; 121 (2): 181–186. DOI: 10.1289/ehp.1205239.
4. Datsko O. The impact of war on agricultural land. Research of the Sumy National Agrarian University. *Ukraine War Environmental Consequences Work Group*. 24.12.2024. Available at: https://uwecworkgroup.info/uk/seeds-of-metal-how-war-is-polluting-ukraines-farmland-and-threatening-food-security/#more-3917 (in Ukrainian)
5. Donets IM, Yeroshenko HA, Hryhorenko AS, Shevchenko KV, Kinash OV. Impact of sodium nitrite and ponceau 4R on respiratory system: Theoretical grounding and significance at: DOI: 10.31718/2077-1096.21.4.173. (in Ukrainian)
6. Grote-Koska D, Klauke R, Brand K, Schuman G. Alkaline phosphatase activity — pH impact on the measurement result. *Clin Chem Lab Med*. 2017; 55 (7): 146–149. DOI: 10.1515/cclm-2016-0771.

7. Huang L, Zeng X, Sun Z, Wu A, He J, Dang Y, Pan D. Production of a safe cured meat with low residual nitrite using nitrite substitutes. *Meat Sci*. 2020; 162: 108027. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.108027.
8. Janaydeh M, Ismail A, Zulkifli SZ, Omar H. Toxic heavy metal (Pb and Cd) content in tobacco cigarette brands in Selangor state, Peninsular Malaysia. *Environ Monit Assess*. 2019; 191 (10): 637. DOI: 10.1007/s10661-019-7755-y.
9. Khopta NS, Bazalytska IS, Ersteniuk AM. Some aspects of toxic effects of cadmium on organism of experimental. *J Ed, Health Sport*. 2017; 7 (3): 559-69. Available at: https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/4398
10. Khopta NS, Ersteniuk AM. Metabolic changes in the bone tissue of animals under conditions of experimental cadmiosis. *ScienceRise Biol Sci*. 2018; 5 (14): 31–35. DOI: 10.15587/2519-8025.2018.147090. (in Ukrainian)
11. Lemoine A, Pauliat-Desbordes S, Challier P, Tounian P. Adverse reactions to food additives in children: A retrospective study and a prospective survey. *Arch Pédiatr.* 2020; 27 (7): 368–371. DOI: 10.1016/j.arcped.2020.07.005.
12. Millán JL. Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinerg Signall*. 2006; 2: 335–341. DOI: 10.1007/s11302-005-5435-6.
13. Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, LaGrange CA, Chaney WG, Lin MF. Human prostatic acid phosphatase: Structure, function and regulation. *Intern J Mol Sci*. 2013; 14 (5): 10438–10464. DOI: 10.3390/ijms140510438.
14. Nechytailo L. The content of Cadmium and Zinc in the ecosystem of Ciscarpathian region and the impact of Cadmium intoxication on the trace element status of the body of experimental animals. *Med Clin Chem.* 2018; 20 (4): 60–65. Available at: https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/MCC/article/view/9797 (in Ukrainian)
15. Nechytailo L, Danyliv S, Kuras L, Shkurashivska S, Buchko A. Dynamics of changes in cadmium levels in environmental objects and its impact on the bio-elemental composition of living. *Brazil J Biol.* 2024; 84: e271324. DOI: 10.1590/1519-6984.271324.
16. Nenonen A, Cheng S, Ivaska KK, Alatalo SL, Lehtimäki T, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Vuori I, Väänänen HK, Halleen JM. Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2005; 20 (10): 1804–1812. DOI: 10.1359/JBMR.050403.
17. Nosivets DC. Study of the level of bone alkaline phosphatase in blood serum of rats with experimental equivalents of hypothyroidism and osteoarthritis against the background of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Ukr J Med Biol Sports*. 2021; 6 (1): 33–36. DOI: 10.26693/jmbs06.01.032. (in Ukrainian)
18. Pinto E, Cruz M, Ramos P, Santos A, Almeida A. Metals transfer from tobacco to cigarette smoke: Evidences in smokers' lung tissue. *J Hazard Mater.* 2017; 325: 31–35. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.069.
19. Radike M, Warshawsky D, Caruso J, Goth-Goldstein R, Reilman R, Collins T, Yaeger M, Wang J, Vela N, Olsen L, Schneider J. Distribution and accumulation of a mixture of arsenic, cadmium, chromium, nickel, and vanadium in mouse small intestine, kidneys, pancreas, and femur following oral administration in water or feed. *J Toxicol Environ Health.* 2002; 65 (23): 2029–2052. DOI: 10.1080/00984100290071324.
20. Shatorna VF, Onul NM, Zemlany OA, Stryzhak OV. Changes in the morphogenesis of bone tissue under the influence of heavy metals (review of scientific literature data). *Persp Innov Sci Ser Med.* 2024; 2 (36): 1308–1318. DOI: 10.52058/2786-4952-2024-2(36)-1308-1318. (in Ukrainian)
21. Tiron OI. Main exogenous and endogenous factors that can influence the morphofunctional characteristics of the thyroid gland (literature review). *Rep Vinnytsia Nat Med Univer.* 2018; 22 (4): 760–765 DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(4)-32. (in Ukrainian)
22. Trakhtenberg IM, Babienko VV. Biological consequences of environmental pollution with nitrites and nitrates. *J Integr Anthropol.* 2013; 1 (21): 37–39. Available at: https://anthropology.odmu.edu.ua/?p=5088&lang=en (in Ukrainian).
23. Weiß CH. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: *Statistica*, version 8. AStAAdv. Stat. Analysis. 2007; 91 (3): 339–341. DOI: 10.1007/s10182-007-0038-x.
24. Wexler P (ed.). *Encyclopedia of Toxicology.* A reference Work. 3rd ed. Academic Press; 2014: 5220. ISBN 978-0-323-85434-4. Available at: https://www.sciencedirect.com/referencework/9780323854344/encyclopedia-of-toxicology
25. Zaitseva OV, Shandrenko SG, Veliky MM. Biochemical markers of collagen type I metabolism in bone tissue. *Ukr Biochem J.* 2015; 87 (1): 21–32. DOI: 10.15407/ubj87.01.021.

Metabolic processes in the body and bones of experimental animals under conditions of exposure by cadmium and nitrite ions

N. S. Khopta, A. L. Romaniuk, L. Ja. Netchitajlo, A. M. Ersteniuk
nhopta@ifnmu.edu.ua

Ivano-Frankivsk National Medical University, 2 Halytska str. Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine

Heavy metals, including cadmium, and also nitrates and nitrites, belong to the most common environmental pollutants. It is known that the condition of bone tissue is determined by the coherence of de- and remineralization processes, the balance of calcium-phosphate metabolism, the content of essential bioelements, and the activity of enzymes that ensure the degree of bone mineral density. The experiment studied markers of bone metabolism in blood plasma and femurs of white male rats under conditions of complex action of cadmium ions and nitrites. Intoxication of animals was carried out for 10 days by administration of the appropriate salt (aqueous solution of $NaNO_2$ with drinking water and intramuscular solution of $CdCl_2$) at a dose of 1/10 LD_{50} daily once a day. Bone metabolism indicators were examined on the 1st, 14th, and 28th day after the end of toxicant administration. The concentration of total and ionized calcium, magnesium, phosphates, oxyproline, activity of alkaline and acid phosphatase were determined in blood plasma by standardized methods. The content of the bioelements calcium, magnesium, zinc, copper, and toxic cadmium in the femurs was determined using a S-115PK atomic absorption spectrophotometer. Bone mineral density (BMD) was determined by X-ray densitometry. The experiment was conducted in compliance with bioethical requirements. The results of the study showed that under the conditions of the complex action of the studied toxicants, significant changes in the concentration of total and ionized calcium, magnesium, and phosphates occur in blood plasma. The concentration of oxyproline and acid phosphatase activity increase as markers of osteoclast activity. At the same time, alkaline phosphatase activity decreases, indicating inhibition of osteoblast function. In the mineral phase of femoral bones, a decrease in the content of osteotropic bioelements was found against the background of an increase in toxic cadmium. The mineral density of the femurs also decreased significantly, especially in the head and neck areas. The greatest changes were observed on the 14th and 28th days after the introduction of toxicants. The obtained results indicate a violation of calcium-phosphate metabolism and bone tissue remodeling processes in intoxicated rats, in particular, the predominance of osteoclastic resorption processes over osteosynthesis.

Key words: cadmium chloride, sodium nitrite, bone tissue, markers of bone metabolism, osteotropic bioelements, bone mineral density

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.021
UDC 595.143.6:615.32:616-001.4
Received 29.01.2025 ▪ Revision 14.03.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

The effect of water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* on the regenerative properties of excisional wounds of rat skin

R. F. Aminov, A. S. Aminova, L. V. Makyeyeva, O. K. Frolov, E. R. Fedotov, T. V. Piatyhorets
91_amin_91@ukr.net

Zaporizhzhia National University, Laboratory of Cell and Organismal Biotechnology of the Research Department, 66 Universytetska str., Zaporizhzhia, 69011, Ukraine

ORCID:
R. F. Aminov https://orcid.org/0000-0002-8471-1525
A. S. Aminova https://orcid.org/0000-0002-6638-8576
L. V. Makyeyeva https://orcid.org/0000-0002-3188-2638
O. K. Frolov https://orcid.org/0009-0001-5094-2501
E. R. Fedotov https://orcid.org/0000-0001-8333-5946

Authors' Contributions:
ARF: Conceptualization; Methodology; Investigation; Writing — original draft.
AAS: Data curation; Formal analysis; Writing — review & editing.
MLV: Investigation.
FOK: Investigation.
FER: Investigation.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
Not applicable.

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

The process of skin wound healing begins immediately after injury. Wounds remain one of the most pressing scientific and practical problems of modern veterinary medicine. Treatment of skin wounds in our time requires the use of therapy that promotes wound cleansing and facilitates their healing. In recent years, scientists have focused on the study of natural biologically active substances capable of accelerating wound healing and affecting other diseases. Among them a special place is occupied by medicinal leeches, which have a wide range of therapeutic effects due to the presence of over 100 biologically active substances in their body. An important factor in accelerating the healing of skin wounds is perfusion, such an ability is possessed by leech saliva. Given their significant effects, the study of the effect of water-salt extract of *Hirudo verbana* on the regenerative properties of excisional wounds has become relevant. The results of the study indicate that the water-salt extract for topical application accelerates wound cleansing and reparative processes. Moreover, on the 14th day, the wound in animals of the experimental group almost completely healed. On the 30th day, the wounds in the experimental group of rats completely healed, epithelialized and began to actively be covered with hair.

Key words: excisional wounds, skin, medicinal leeches, *Hirudo verbana*, biologically active substances, rats

Introduction

The skin is the largest organ of the body, which plays the role of a barrier that protects the body from adverse environmental factors and pathogenic microorganisms, and is of fundamental importance in maintaining homeostasis [12, 14, 16, 20, 22]. The process of skin wound healing begins immediately after injury. Wounds remain one of the most pressing scientific and practical problems of modern veterinary medicine and medicine [1, 8, 11, 21, 25, 28]. Skin wound healing is accompanied by a phased change in the structure of its structural elements — the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue, which depends on the reactivity of tissues and cells in their composition [1, 8, 12, 16]. Treatment of skin wounds in today's world requires the use of therapy that promotes wound cleansing and facilitates their healing. In recent years, scientists have focused on the study of natural biologically active substances (BAS) that can accelerate wound healing and affect other diseases [13, 17, 23]. Among them, medicinal leeches (ML) occupy a special place, which have a wide range of therapeutic effects due to the presence of more than 100 BAS in their body [3–6, 9, 18, 24, 26]. An important factor in accelerating the healing of skin wounds is perfusion, and the saliva of ML has this ability. ML secrete various anticoagulants, such as hirudin and factor Xa inhibitors, into the wound, preventing scab formation and thereby accelerating the healing process.

Our previous studies and studies by other researchers prove the positive effect of ML *Hirudo verbana* on a rat model on the reparative regeneration of internal organs: thymus, spleen, kidneys, and liver [5, 7, 9, 18, 24].

There are some studies on the effectiveness of ML of two other species, *Hirudo medicinalis* and *Hirudo orientalis*, in healing of incised wounds under primary tension, wound reduction by more than 50 % on day 14 [2, 27]. This accelerated healing may be linked to the presence of peptidases in the ML, which influence the functional activity of various cells, such as endothelial cells, lymphocytes, platelets, and macrophages, thereby promoting granulation tissue formation. Additionally, antihemostatic substances like calins, apyrase, platelet-activating factor antagonists, and hirudin play a role in regulating blood clotting mechanisms. The presence of eglin C also reduces free oxygen radical levels in neutrophils, preventing inflammation and tissue destruction. They have also found use in the treatment of chronic non-healing wounds, such as the treatment of diabetic foot ulcers, bedsores, and venous leg ulcers, which has been experimentally confirmed in a mouse model, where in animals after the use of leeches, necrosis decreased and the survival rate of heart flaps increased [27]. These effects are likely due to the release of vasodilators, such as histamine-like substances, acetylcholine, and carboxypeptidase-A inhibitors, which increase blood flow to the site of the bite and reduce local swelling. Acetylcholine, in particular, can relax endothelial muscles, dilate blood vessels, and promote microcirculation, delivering fresh oxygenated blood to the affected area. This restores normal blood flow and provides tissues and hair follicles around the wound with the oxygen and nutrients required for regeneration. Also, studies by other authors indicate the effectiveness of hirudotherapy in restoring organs in norm and damaged by traumatic injuries. For example, in the early stages of healing a human ear wound in the case of diabetic ulcer, the use of ML shows increased vascularization and reduced hyperemia of the wound due to the disappearance of necrotic areas and rapid healing of wounds [27]. Given the significant effects of ML, the study of the effect of the water-salt extract of *Hirudo verbana* on the regenerative properties of an incised wound has become relevant.

Fig. 1. Compress application moistened with water-salt extract of medical leech

Materials and Methods

The study was conducted on 60 male white laboratory rats weighing 245–260 g. Experimental animals were kept under standard sanitary conditions. After creating the incisional experimental wound, the animals were housed in separate cages with weekly bedding changes under aseptic conditions. No signs of contaminant bacterial infection were observed during the observation period in either group of animals. Throughout the study, they were housed in a vivarium maintained at a temperature of 20–25°C, with humidity not exceeding 55 %, on a natural light "day-night" cycle, individually in plastic cages, and fed a balanced diet [19].

The experimental procedures adhered to the "International Recommendations for Medical and Biological Research Using Animals" and the national "Joint Ethical Principles of Animal Experiments" (Ukraine, 2001), in accordance with Council Regulation 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010, on the protection of animals used for scientific purposes.

The wound model was created as follows: under ketamine anesthesia (40 mg/kg b.w.), after hair removal on the back of the animals, following aseptic and antiseptic procedures. Before the experiment, the animals were randomly divided into 2 groups of 30 animals each. Using a template, circular skin areas of 1,5 cm (706,5 mm^2) were excised with surgical scissors [10, 19]: 1 — control group, where wound healing occurred spontaneously without treatment; 2 — experimental group of animals, where an aqueous saline extract of medicinal leech was applied to the lesion site in the form of a lotion on days 1, 2, 3, 7, 10, and 14. The concentration of the aqueous saline extract was 0.022 mg/ml (fig. 1).

Treatment began 24 hours after wound creation. The rate of epithelialization and wound edge contraction was calculated based on the decrease in the wound area at specific time intervals.

On days 3, 7, 14, and 30 of the experiment, the wound area was measured in all animal groups, and the healing rate was calculated using the formula:

$$V = 100 \times (So - St)/So,$$

where So is the initial wound area, mm^2;
St is the wound area on the day of measurement, mm^2.

The wound healing rate is a relative indicator and allows characterizing the dynamics of the wound healing process, regardless of the difference in the initial wound area.

Statistical processing of the obtained data was carried out using parametric statistical methods (Student's *t*-test), after preliminary verification of the samples for normal distribution. The data in the table are presented as mean±SD, using the *IBM SPSS Statistics 21.0* (USA) software packages. Differences were considered significant at a significance level of $P<0.05$.

Table. The dynamics of wound healing in rats (mean±SD)

Day of wound healing	Indicator					
	Control			Experiment		
	Absolute wound area, mm^2	Relative wound area, %	V, mm^2/day	Absolute wound area, mm^2	Relative wound area, %	V, mm^2/day
Before excision of the skin flap	176.62±7.66	100.00±6.44	—	176.62±7.66	100.00±6.44	—
Immediately after excision	183.76±8.49	101.96±6.33	—	153.86±9.22	93.33±7.11	—
Day 3	167.33±7.88	97.76±5.97	8.94±1.44	116.84±6.88*	81.33±8.86*	24.06±3.23*
Day 7	136.78±7.12	88.30±8.09	25.56±2.66	78.50±7.11*	66.66±6.79*	48.98±5.89*
Day 14	30.17±2.93	41.65±3.94	83.58±8.77	10.17±1.02*	24.46±2.12*	93.39±8.78
Day 30	6.15±0.99	18.33±2.04	96.65±8.75	1.13±0.21*	8.00±0.78*	99.26±9.11

Note. * — P<0.05 compared to the control group.

Results of the Study

After the wound was inflicted, it was observed that the condition of the wound in all groups was almost identical (fig. 2A): tissues of pink-red color [10, 19].

On the 3rd day of observation, the control group was dominated by a post-traumatic inflammatory process, the edges of the wound were roller-shaped, swollen, the wound was covered with thick brown crusts, the bottom was hyperemic, the wound took on a purulent character, with a large amount of purulent content (fig. 2B), which corresponds to the physiological norm and corresponds to the studies conducted by other scientists [10, 11, 15, 16, 19, 28]. In the experimental group, the wounds decreased somewhat in size, actively began to cleanse and become covered with a scab (fig. 2C). This observed effect may be attributed to the presence of bdelins, ellins, and the multifunctional protein destabilase-lysozyme, which not only has destabilase activity but also exhibits lysozyme and antimicrobial properties. As an antibiotic, destabilase inhibits the growth of many bacteria, fungi, and archaea. Moreover, substances such as chloromycetin, theromycin, thermisin, and destabilase in leech saliva demonstrate strong antimicrobial activity by destroying bacterial cell components.

In subsequent observation periods, significant changes in the condition of the wounds and the course of healing were recorded in table. On the 7th day of observation, the macroscopic picture changed even more significantly (fig. 2D, 2I). As can be seen from fig. 2D, the wound in the control group animal practically did not decrease in size, is of a purulent-necrotic nature. In the experimental groups of animals, the wound was completely cleansed (fig. 2I), has small areas, is covered with a scab and actively epithelizes, the edges of the wound fit tightly to its bottom, on which granulation tissues begin to develop. This accelerated healing may be linked to the presence of peptidases in the ML, which influence the functional activity of various cells, thereby promoting granulation tissue formation.

Further healing of wounds in all groups was characterized by the development of granulation tissue, which was covered with epithelium from the edges. Significantly stronger dominance of these processes in the experimental group, which received an aqueous-saline extract in the form of a compress. On the 14th day of observation, the wound in the control group animals did not heal completely (fig. 2F, 2G). A defect remained, which was covered with a scab. In the experimental group, the wound almost healed, where a small part of it remained, which is in the process of epithelization. Interestingly, in the same animals, the hairline began to actively recover (fig. 2G). The faster regrowth of new hair may be attributed to improved blood supply to hair follicles due to enhanced circulation in the wound area an effect of ML. These effects are likely due to the release of vasodilators, such as histamine-like substances, acetylcholine, and carboxypeptidase-A inhibitors, which increase blood flow to the site of the bite and reduce local swelling. This restores normal blood flow and provides tissues and hair follicles around the wound with the oxygen and nutrients required for regeneration.

On the 14th day, the condition of the wounds was characterized by a further process of epithelization from its edges and, accordingly, a decrease in the area of the wound. Pronounced positive changes in the animals of the experimental group, which were treated with an aqueous-saline extract, consisted in the fact that they had a small, clean, oval-stretched wound in the middle of the area where the primary wound was modeled [10]. At the end of the observation, on the 30th day, the wound almost completely healed in the control group, a small area covered with a dense scab was observed (fig. 2H). In the experimental group, no wound is visible, since the hairline has recovered, which covered the site of the previous injury (fig. 2I). A significant decrease in the size of the wound and rapid restoration of the hairline at the final stages of healing indicated the speed of regenerative processes. Similar results were obtained by other scientists when analyzing the effect of *Hirudo medicinalis* and *Hirudo orientalis* on the healing of wounds by primary tension [2, 27].

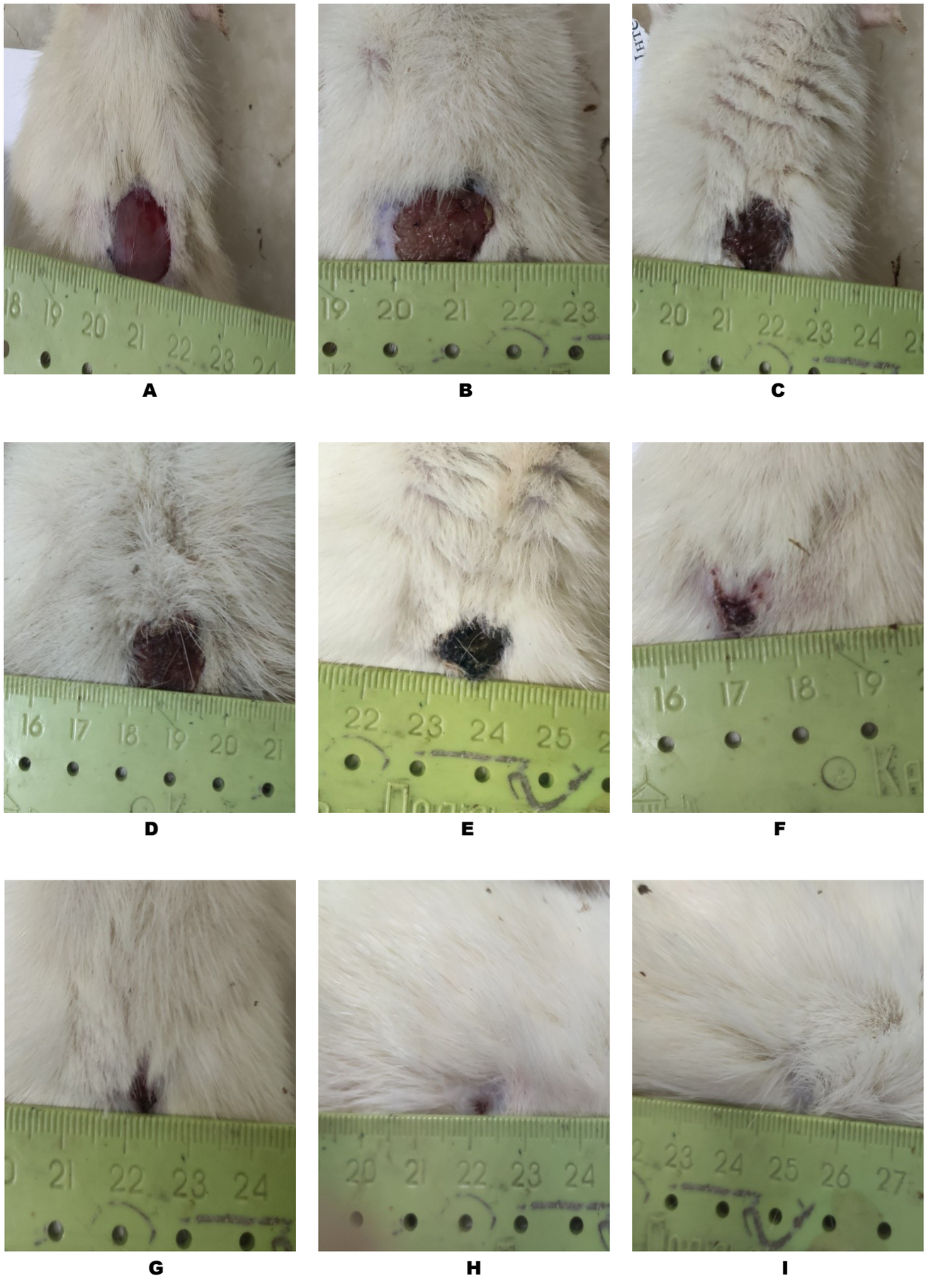


Fig. 2. Wound appearance during healing at different times. A — intact, B — day 3 control, C — day 3 experiment, D — day 7 control, E — day 7 experiment, F — day 14 control, G — day 14 experiment, H — day 30 control, I — day 30 experiment

Thus, according to visual assessments, it can be concluded that the water-salt extract with local use accelerates the cleansing of wounds and reparative processes compared with the control group. Moreover, on the 14th day, the wound in the animals of the experimental group almost completely healed. On the 30th day, the wounds in the rats of the experimental group completely healed, epithelialized and actively began to be covered with a hairline.

References

1. Alghazal AM, Hamed RS, Deleme ZH. Impact of rhamnolipid on skin wound regeneration in rats. *Al-Rafidain Dent J.* 2024; 24 (1): 220–230. DOI: 10.33899/rdenj.2024.148304.1255.
2. Amani L, Motamed N, Ardakani MM, Shasaltaneh DM, Malek M, Shamsa F, Fatemi E., Amin M. Semi-solid product of medicinal leech enhances wound healing in rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2021; 16 (4): e113910. DOI: 10.5812/jjnpp.113910.
3. Aminov R. The influence of the water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 on the general course of embryogenesis in rats after intraperitoneal administration. *Stud Biol.* 2023; 17 (2): 85–94. DOI: 10.30970/sbi.1702.713.
4. Aminov R, Aminova A. Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbana* on the immune system of the host rats. *Ann Parasitol.* 2021; 67 (4): 603–610. DOI: 10.17420/ap6704.376.
5. Aminov R, Aminova A, Makyeyeva L. Morphological parameters of spleen and thymus of the male rats on the basis of the hirudological influence of *Hirudo verbana*. *Ann Parasitol.* 2022; 68 (1): 55–60. https://doi.org/10.17420/ap6801.408
6. Aminov R, Frolov A, Aminova A. The effect of the biologically complex of a medical leech active substances on the immunosuppressive state of rats. 20. *Jordan J Biol Sci.* 2022; 15 (2): 257–261. DOI: 10.54319/jjbs/150213.
7. Chhayani K, Daxini P, Patel P. An overview on medicinal leech therapy. *J Pharmacy Pharmacol.* 2023; 11 (6): 107–113. DOI: 10.17265/2328-2150/2023.06.001.
8. Derymedvid LV, Tsulun OV. Influence of a new wound-healing ointment on morphogenesis of full-thickness excision wounds in healthy rats and rats with diabetic state. *Morphologia.* 2014; 8 (2): 20–29. DOI: 10.26641/1997-9665.2014.2.20-29. (in Ukrainian)
9. Dudhrejiya AV, Pithadiya, SB, Patel AB, Vyas AJ, Patel AI, Gol DA. Medicinal leech therapy and related case study: Overview in current medical field. *J Pharmacogn Phytochem.* 2023; 12 (1): 21–31. DOI: 10.22271/phyto.2023.v12.i1a.14543.
10. Estevão LRM, Cassini-Vieira P, Leite AGB, de Carvalho Bulhões AAV, da Silva Barcelos L, Evêncio-Neto J. Morphological evaluation of wound healing events in the excisional wound healing model in rats. *Bio-protocol.* 2019; 9 (13): e3285. DOI: 10.21769/BioProtoc.3285.
11. Gonzalez ACO, Costa TF, Andrade ZA, Medrado ARAP. Wound healing — A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016; 91 (5): 614–620. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741.
12. Hrytsevych NR, Nikitina NS, Stepanova LI, Savchuk OM, Vereshchaka VV. Content of growth factors and hypoxia-inducible factor 1α in the wound bed of the skin of rats with metabolic syndrome. *Physiol J.* 2023; 69 (6): 69–76. DOI: 10.15407/fz69.06.069. (in Ukrainian)
13. Jabbar AAJ, Abdul-Aziz Ahmed K, Abdulla MA, Abdullah FO, Salehen NA, Mothana RA, Houssaini J, Hassan RR, Hawwal MF, Fantoukh OI, Hasson S. Sinomenine accelerate wound healing in rats by augmentation of antioxidant, anti-inflammatory, immunuhistochemical pathways. *Heliyon.* 2023; 10 (1): e23581. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23581.
14. Jiao Q, Zhi L, You B, Wang G, Wu N, Jia Y. Skin homeostasis: Mechanism and influencing factors. *J Cosmet Dermatol.* 2024; 23 (5): 1518–1526. DOI: 10.1111/jocd.16155.
15. Kananykhina E, Elchaninov A, Bolshakova G. Impact of stem cells on reparative regeneration in abdominal and dorsal skin in the rat. *J Dev Biol.* 2024; 12: 1–6. DOI: 10.3390/jdb12010006.
16. Khimich OS, Rautskis VP, Khimich SD, Pivtorak VI, Kryvonos MI. Macroscopic assessment of the dynamics of the wound process in the treatment of infected wounds in rats using the immunomodulator “Blastomunil”. *Bukovyn Med Herald.* 2024; 28 (110): 70–77. DOI: 10.24061/2413-0737.28.2.110.2024.11. (in Ukrainian)
17. Kshetrimayum V, Chanu KD, Biona T, Kar A, Haldar PK, Mukherjee PK, Sharma N. *Paris polyphylla* Sm. characterized extract infused ointment accelerates diabetic wound healing in *in vivo* model. *J Ethnopharmacol.* 2024; 331: 118296. DOI: 10.1016/j.jep.2024.118296.
18. Lari A, Iqbal Z, Tausif M, Ali M. Management of ghangrana (dry gangrene) by Irsal-E-Alaq (leech therapy) — A case study. *Ind J Unani Med.* 2021; 14 (1): 56–60. DOI: 10.53390/ijum.v14i1.9.
19. Makyeyeva L, Frolov O, Aliyeva O. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress. *Innov Biosyst Bioeng.* 2025; 9 (1): 13–25. DOI: 10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
20. Mansfield K, Naik S. Unraveling immune-epithelial interactions in skin homeostasis and injury. *Yale J Biol Med.* 2020; 93 (1): 133–143. PMID: 32226343.
21. Nikitina NS, Stepanova LI, Vereschaka VV, Savchuk OM, Beregova TV. Influence of carbopol gel with melanine on content of cytokins in the wounds substrate of full-thickness excisional wounds of skin in the rats. *Bull Probl Biol Med.* 2019; 2/1 (150): 168–171. DOI: 10.29254/2077-4214-2019-2-1-150-168-171 (in Ukrainian)
22. Smahlii ZV. The effect of mechanical skin damage on manifestations of endotoxicosis and immune response under the influence of skeletal trauma complicated by acute blood loss and PRP-therapy effectiveness. *Bull Med Biol Res.* 2022; 1 (11): 95–102. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2022.1.12977. (in Ukrainian)
23. Sun C, Yan H, Jiang K, Huang L. Protective effect of casticin on experimental skin wound healing of rats. *J Surg Res.* 2022; 274: 145–152. DOI: 10.1016/j.jss.2021.12.007.
24. Trenholme HN, Masseau I, Reinero CR. Hirudotherapy (medicinal leeches) for treatment of upper airway obstruction in a dog. *J Vet Emerg Crit Care.* 2021; 31 (5): 661–667. DOI: 10.1111/vec.13094.
25. Wu ML, Yang ZM, Dong HC, Zhang H, Zheng X, Yuan B, Yang Y, Liu J, Li PN. Maggot extract accelerates skin wound healing of diabetic rats via enhancing STAT3 signaling. *PLoS ONE.* 2024; 19 (9): e0309903. DOI: 10.1371/journal.pone.0309903.
26. Yang F, Li Y, Guo S, Pan Y, Yan C, Chen Z. Hirudo lyophilized powder ameliorates renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammation. *Evid Bas Complem Alt Med.* 2021; 6657673: 1–12. DOI: 10.1155/2021/6657673.
27. Zakian A, Ahmadi HA, Keleshteri MH, Madani A, Tehrani-Sharif M, Rezaie A, Davoodi F, Kish GF, Raisi A, Langerudi MT, Pasha MBM. Study on the effect of medicinal leech therapy (*Hirudo medicinalis*) on full-thickness excisional wound healing in the animal model. *Res Vet Sci.* 2022; 153: 153–168. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.10.015.
28. Zhurakovska HV, Savosko SI. Histological features of scar tissue formation in different methods of postoperative wound closure. *Med Today Tomorrow.* 2022; 91 (2): 13–25. DOI: 10.35339/msz.2022.91.2.zhs.

Вплив водно-сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* на регенеративні властивості різаної рани шкіри щурів

Р. Ф. Амінов, А. С. Амінова, Л. В. Макеєва, О. К. Фролов, Є. Р. Федотов, Т. В. П'ятигорець
91_amin_91@ukr.net

Запорізький національний університет, лабораторія клітинної та організменної біотехнології науково-дослідної частини, вул. Університетська, 66, м. Запоріжжя 69011, Україна

Процес загоєння шкірної рани починається відразу після травми. Рани залишаються однією з найактуальніших наукових і практичних проблем сучасної ветеринарії та медицини. Лікування ран шкіри в наш час вимагає застосування терапії, яка сприяє очищенню ран і полегшує їх загоєння. Останніми роками дослідники зосередилися на вивченні природних біологічно активних речовин, здатних прискорювати загоєння ран і впливати на інші захворювання. Серед них особливе місце посідають медичні п'явки, які мають широкий спектр лікувальної дії завдяки наявності в їхньому організмі понад ста біологічно активних речовин. Важливим фактором прискорення загоєння шкірних ран є перфузія, і такою здатністю володіє слина п'явки. Враховуючи суттєвий її ефект, актуальним стало вивчення впливу водно-сольового екстракту *Hirudo verbana* на регенеративні властивості різаної рани. Результати дослідження показують, що водно-сольовий екстракт при місцевому застосуванні прискорює очищення ран і репаративні процеси. Причому на 14-ту добу рана у тварин дослідної групи майже повністю загоюється. На 30-ту добу рани в щурів дослідної групи цілком загоїлися, епітелізувалися та почали активно покриватися волосяним покривом.

Ключові слова: різані рани, шкіра, медичні п'явки, *Hirudo verbana*, біологічно активні речовини, щури

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.027
UDC 616.127-008:547.857.4]:599.323.4
Received 24.01.2025 ▪ Revision 10.03.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Вплив кофеїну на показники варіабельності серцевого ритму самок щурів із доксорубіциновою кардіоміопатією

В. В. Муквич, О. В. Севериновська
mukvichv@ukr.net

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, просп. Науки, 72, м. Дніпро, 49045, Україна

ORCID:
V. V. Mukvych: https://orcid.org/0000-0002-9180-5589
O. V. Severynovska: https://orcid.org/0000-0002-0002-1237

Authors' Contributions:
MVV: Conceptualization; Investigation; Data curation; Formal analysis; Writing — original draft, review & editing; Visualization.
SOV: Conceptualization; Investigation; Formal analysis; Writing — review & editing;

Declaration of Conflict of Interests:
The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval:
The study was approved by The Bioethics Committee of Oles Honchar Dnipro National University (Protocol no. 1 from 04.11.2024)

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Кардіотоксичність залишається одним із ключових факторів, які обмежують клінічне використання хіміотерапевтичних препаратів, зокрема антрациклінових антибіотиків. Серед останніх доксорубіцин (DOX) вирізняється високою протипухлинною активністю і широко застосовується для лікування різноманітних форм злоякісних новоутворень. Одним із сучасних неінвазивних та інформативних методів оцінки функціонального стану серцево-судинної системи є аналіз варіабельності серцевого ритму (ВСР). У пошуках засобів корекції доксорубіцинової кардіоміопатії зростає інтерес до вивчення впливу природних сполук із потенційним кардіопротекторним ефектом. Кофеїн у низьких і помірних дозах може проявляти антиоксиданту дію і має потенційні кардіопротекторні властивості. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах-самках лінії Вістар масою 250±50 г (n=36). Здорових тварин випадковим чином розподілили на три групи по 12 особин у кожній: I (контроль) — через зонд отримували фізіологічний розчин (1 мг/кг); II — отримували доксорубіцин (1 мг/кг маси тіла) внутрішньочеревно 1 раз на тиждень впродовж 4 тижнів; III — отримували кофеїн (25 мг/кг маси тіла) через зонд 1 раз на добу та доксорубіцин (1 мг/кг маси тіла) внутрішньочеревно 1 раз на тиждень впродовж 4 тижнів. У самок щурів реєстрували електрокардіограму (ЕКГ) та оцінювали показники аналізу ВСР за Р. М. Баєвським. Введення доксорубіцину призвело до вірогідних змін всіх показників ВСР, які свідчать про розвиток вегетативного дисбалансу. У самок щурів другої групи, порівняно з контрольними, спостерігали вірогідне підвищення частоти серцевих скорочень (ЧСС), моди (Мо), амплітуди моди (АМо), індексу вегетативної рівноваги (ІВР), індексу напруги (ІН) та вірогідне зниження варіаційного розмаху (ВР), середньоквадратичного відхилення (RMSSD), відсотока NN-інтервалів із різницею >50 мс (pNN50), що вказує на переважання симпатичної активності та зниження парасимпатичного впливу. У самок щурів, яким вводили кофеїн разом з доксорубіцином, простежували часткову нормалізацію показників ВСР, а саме ЧСС, Мо і ВР, до наближених знаачень контролю. Показники АМо, ІВР, ІН характеризувались вірогідним підвищенням порівняно з відповідними даними у самок контрольної групи та вірогідним зниженням щодо самок другої групи. Отримані результати свідчать про потенційну модулюючу дію кофеїну на автономну регуляцію серцевого ритму самок щурів з доксорубіциновою кардіміопатією. Кофеїн у дозуванні 25 мг/кг запобігає вегетативним зсувам, спричиненим цим хіміотерапевтичним препаратом, або їх пом'якшує.

Ключові слова: цитоксичність, доксорубіцинова кардіоміопатія, кофеїн, вплив стимуляторів, варіабельність серцевого ритму, оксидативний стрес, самки щурів

Вступ

Кардіотоксичність залишається одним із найбільш актуальних обмежень у клінічному застосуванні хіміотерапевтичних засобів, а саме антрациклінових антибіотиків. Серед представників цієї групи доксорубіцин (DOX) є одним із ефективних протипухлинних препаратів, який застосовують у лікуванні різних злоякісних новоутворень. Доксорубіцин здатен спричиняти розвиток дозозалежної кардіоміопатії, яка проявляється структурно-функціональними порушеннями міокарду та розладами серцевого ритму [4–5, 7, 10, 20]. До молекулярних механізмів кардіотоксичності доксорубіцину входять оксидативний стрес, мітохондріальна дисфункція, апоптоз кардіоміоцитів, порушення метаболізму кальцію, індукція запальних процесів тощо [8–9, 11, 16]. У зв'язку з цим, залишається актуальним пошук ефективних і безпечних засобів профілактики чи корекції кардіотоксичних ефектів доксорубіцину.

Одним із сучасних неінвазивних та інформативних методів оцінки функціонального стану серцево-судинної системи є аналіз варіабельності серцевого ритму (ВСР) [13, 19]. У випадку доксорубіцинової кардіоміопатії аналіз показників ВСР, який відображає баланс між симпатичним і парасимпатичним відділами автономної нервової системи, є важливим інструментом для виявлення ранніх стадій дисфункцій вегетативної регуляції, які передують вираженим структурно-функціональним змінам міокарду.

У контексті пошуку засобів корекції доксорубіцинової кардіоміопатії зростає інтерес до вивчення впливу природних сполук із потенційним кардіопротекторним ефектом. Кофеїн — один із найбільш вживаних психостимуляторів [6]. Він входить до групи метилксантинів й чинить різноспрямований та багатогранний вплив як на серцево-судинну систему, так і на весь живий організм. З одного боку, кофеїн може підвищувати артеріальний тиск і частоту серцевих скорочень, а з іншого — у низьких і помірних дозах здатен чинити антиоксиданту дію та проявляти потенційні кардіопротекторні властивості [1, 3, 17–18]. Проте його вплив на вегетативну регуляцію серцевої діяльності за умов токсичного ураження серця вивчено недостатньо. Незважаючи на велику кількість наукових досліджень щодо фармакологічної дії кофеїну, їхні результати залишаються суперечливими. Крім того, більшість експериментальних робіт проведені переважно на самцях щурів, що обмежує екстраполяцію результатів на жіночу популяцію. У цьому контексті особливу наукову цінність становить дослідження впливу кофеїну на показники варіабельності серцевого ритму саме в самок щурів з моделлю доксорубіцинової кардіоміопатії.

Мета роботи — дослідження змін показників варіабельності серцевого ритму під впливом кофеїну в самок щурів із доксорубіциновою кардіоміопатією задля виявлення його потенційного кардіопротекторного ефекту і можливостей регуляції автономної нервової системи.

Матеріали і методи

Утримання щурів та експериментальні дослідження проведено згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Положення про використання тварин в біомедичних дослідах», відповідно до Директиви 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових цілей. Експерименти затверджені комісією з біоетики Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

Досліди проводили на білих статевозрілих щурах самках лінії Вістар масою 250±50 г (n=36) за класифікацією лабораторних тварин І. П. Западнюка [21] впродовж місяця. Здорових тварин випадковим чином розподілили на три групи по 12 особин у кожній: I — контрольна група самок щурів, яким через зонд вводили фізіологічний розчин (1 мг/кг), II — самки щурів, які отримували доксорубіцин («Доксорубіцин „Ебеве"», EBEWE Pharma Ges. m. b. H. Nfg. KG, Австрія) у дозі 1 мг/кг маси тіла внутрішньочеревно 1 раз на тиждень впродовж 4 тижнів, III — самки щурів, яким через зонд вводили кофеїн («Кофеїн-бензоат натрію-Дарниця», ПрАТ «Фармацевтична фірма „Дарниця"», Україна) у дозуванні 25 мг/кг маси тіла 1 раз на добу та доксорубіцин (Доксорубіцин «Ебеве», EBEWE Pharma Ges. m. b. H. Nfg. KG, Австрія) внутрішньочеревно у дозі 1 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень впродовж 4 тижнів. Введення кофеїну здійснювали внутрішньошлунково через зонд у вигляді водного розчину, для приготування якого кофеїн розчиняли у фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) безпосередньо перед введенням. Концентрація становила 2,5 мг/мл, що забезпечувало ведення 1 мл/100 г маси тіла для дози 25 мг/кг маси тіла. Доксорубіцин — це готовий ін'єкційний лікарський засіб у вигляді стерильного водного розчину, який не потребував додаткового розведення. Об'єм введення становив 0,05 мл/100 г маси тіла [12].

Перед початком експериментальної частини нашої роботи для щурів, яких використовували у досліді, проводили карантин відповідно до всіх правил зоогігієни. Тварин всіх досліджуваних груп утримували у стандартних умовах — за достатнього температурного режиму, освітленості та вологості в приміщенні віварію, а також забезпечували звичайний харчовий раціон в розрахунку добової потреби та питну воду без обмежень [21].

Електрокардіограму (ЕКГ) в самок щурів реєстрували за допомогою голчатих електродів (II стандартне відведення). Запис та цифрове перетворення сигналу ЕКГ здійснювали на електрокардіографічному комплексі для проведення широкого спектру кардіологічних досліджень «Кардіолаб»

(ХАІ-Медика, м. Харків, Україна). Тривалість кожного запису ЕКГ щурів — 1 хвилина. Оцінювали показники аналізу варіабельності серцевого ритму (ВСР) за Р. М. Баєвським [13]. Визначали середню частоту серцевих скорочень (ЧСС), моду (Мо), амплітуду моди (АМо), варіаційний розмах (ВР), індекс вегетативної рівноваги (ІВР), індекс напруги (ІН), а також часові показники ВСР — RMSSD (середньоквадратичне відхилення), pNN50 (відсоток NN-інтервалів із різницею >50 мс).

Статистичну обробку отриманих результатів виконано за допомогою пакету *IBM SPSS Statistics*, версія 26.0. Усі отримані дані перевіряли на відповідність нормальному розподілу за допомогою критерію Шапіро-Вілка. За результатами перевірки, у всіх групах розподіл показників не відрізнявся від нормального (P<0.05), що дозволило застосовувати параметричні методи статистичного аналізу. Для оцінки відмінностей між трьома групами використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). При виявленні статистично вірогідних відмінностей (P<0.05) додатково проводили *post hoc* аналіз із використанням тесту Тьюкі (Tukey HSD) для визначення пар груп, між якими спостерігаються вірогідні відміності. Описову статистику представлено у вигляді кількості тварин у групі (n), середнього значення (M) та стандартного відхилення (SD). Для візуалізації даних використовували графічні методи, зокрема ящикові діаграми (*Boxplot*).

Результати й обговорення

У межах нашого дослідження було проаналізовано вплив кофеїну на варіабельність серцевого ритму в самок щурів з доксорубіциновою кардіоміопатією. Для цього ми визначали низку інформативних показників, які характеризують вегетативну регуляцію серцевої діяльності: середню частоту серцевих скорочень (ЧСС), моду (Мо), амплітуду моди (АМо), варіаційний розмах (ВР), індекс вегетативної рівноваги (ІВР), індекс напруги (ІН), а також часові показники ВСР — RMSSD (середньоквадратичне відхилення) та pNN50 (відсоток NN-інтервалів із різницею >50 мс). Оцінка цих параметрів дозволила комплексно охарактеризувати стан симпатико-парасимпатичного балансу та адаптаційних можливостей серцево-судинної системи у самок щурів. Далі наведено результати змін кожного з вказаних показників у самок щурів трьох груп, статистично вірогідні відмінності між ними, а також інтерпретацію отриманих даних щодо стану автономної регуляції серцевої діяльності.

Проведений нами статистичний аналіз отриманих результатів підтвердив наявність вірогідних відмінностей між досліджуваними групами самок щурів за показником ЧСС. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) показав, що відмінності значень ЧСС між самками контрольної групи (I група) (n=12, M=502.23, SD=10,11), самками щурів, які щоденно отримували доксорубіцин (II група) (n=12, M=618.36, SD=8.05), і самками щурів, яким вводили доксорубіцин разом з кофеїном (III група) (n=12, M=503.78, SD=5.51), є статистично вірогідними ($F(2.51)=1212.98$, $P<0.001$, $\eta^2=0.979$). *Post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі (Tukey HSD) дав нам можливість визначити, що показник ЧСС у самок щурів другої групи був вірогідно вищим в 1,2 раза, порівняно з самками контрольної (P<0.001, середня різниця — 116,13) і третьої групи (P<0.001, середня різниця — 114,57), що ми відобразили на рис. 1.

Водночас за результатами ЧСС в останніх вищезазначених групах самок щурів статистично вірогідних відмінностей не виявлено (P=0.834), що свідчить про подібність цих груп тварин за відповідним показником. Величина ефекту ($\eta^2=0.979$) вказує, що 97.9% варіації ЧСС зумовлено експериментальними умовами; це є підтвердженням потужного впливу досліджуваних факторів.

Однофакторний дисперсійний аналіз засвідчив, що відмінності значень інтервалів між серцевими скороченнями, які трапляються найчастіше в максимальному розряді гістограми R-R між самками щурів першої (n=12, M=497.78, SD=7.40), другої (n=12, M=617.06, SD=7.15) і третьої групи (n=12, M=502.83, SD=8.98), є статистично вірогідними ($F(2.51)=1317.38$, $P<0.001$, $\eta^2=0.981$). *Post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі показав, що середні значення Мо в самок щурів, які протягом місяця отримували доксорубіцин, були вірогідно вищими в 1,2 раза, порівняно з самками контрольної (P<0.001, середня різниця = 119.28) і третьої групи (P<0.001, середня різниця = 114.23). Відсутність статистичної вірогідності спостерігали за показниками Мо в самок першої групи, порівняно з даними самок третьої групи (P=0.1424).

За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ми виявили наявність статистично вірогідних відмінностей серед показників АМо між трьома групами самок щурів ($F(2.15)=87.66$, $P<0.001$, $\eta^2=0.062$). З рис. 2 видно, що середнє значення АМо в самок щурів контрольної групи становило 72.46 % (SD=2.72), у самок щурів другої групи, які отримували протягом місяця доксорубіцин, — 90.76 % (SD=5.38), у самок щурів третьої групи — 79.13 % (SD=4.07). На рис. 2 бачимо, що *post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі, проведений з метою ідентифікації парних відмінностей, засвідчив вірогідне підвищення показника АМо в самок другої групи в 1,3 раза, порівняно з відповідними значеннями самок контрольної групи (P<0.001, середня різниця = 18.3), а також в 1,2 раза щодо цих значень у самок третьої групи (P<0.001, середня різниця = 11.63).

Самки щурів, які отримували кофеїн разом з доксорубіцином, мали в 1,1 раза вірогідно вищі значення АМо, порівняно з самками першої групи (P<0.001, середня різниця = 6.67). Від'ємна різниця, зазначена вище між показниками в самок другої та третьої груп,

свідчить лише про те, що значення AMo в одній з груп перевищують його ж в іншій групі, а знак мінус вказує лише на порядок віднімання. Таким чином, результати Tukey HSD підтверджують, що всі групи самок щурів мають статистично вірогідні відмінності між собою.

Однофакторний дисперсійний аналіз показав, що відмінності значень між тривалістю найбільшого та найменшого кардіоінтервалів між самками щурів першої (n=12, M=29, SD=4.13), другої (n=12, M=14.06, SD=2.29), і третьої групи (n=12, M=25.72, SD=3.27) є статистично вірогідними ($F(2.15)=101.04$, $P<0.001$, $\eta^2=0.062$), що відображено на рис. 3.

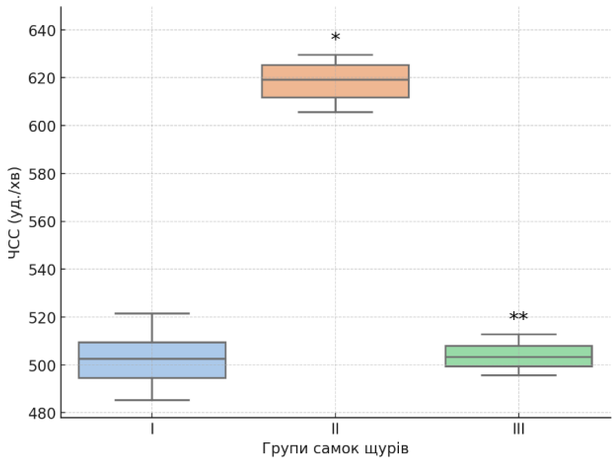


Рис. 1. Динаміка частоти серцевих скорочень (ЧСС) (уд/хв) у самок щурів контрольної групи (I), за дії доксорубіцину (II) та спільного впливу кофеїну і доксорубіцину (III)
Fig. 1. Heart rate dynamics (beats/min) in female rats of the control group (I), under action of doxorubicin (II) and combined effects of caffeine and doxorubicin (III)

Post hoc аналіз за критерієм Тьюкі показав, що в самок щурів контрольної групи показник ВР характеризувався вірогідним підвищенням у 2.1 раза, порівняно зі значеннями в самок другої групи ($P<0.001$, середня різниця = 14.944). Натомість у самок щурів, які протягом місяця отримували кофеїн разом з доксорубіцином, значення ВР в 1,8 раза вірогідно перевищували відповідний показник в самок щурів, які отримували лише доксорубіцин ($P<0.001$, середня різниця = 11.667).

Ми також проаналізували показники, пов'язані з парасимпатичною активністю автономної нервової системи, — RMSSD і pNN50. Однофакторний дисперсійний аналіз показав, що відмінності значень RMSSD між самками щурів першої (n=12, M=14.18, SD=1.70), другої (n=12, M=5.10, SD=0.96) і третьої групи (n=12, M=6.17, SD=0.73) є статистично вірогідними ($F(2.15)=306.46$, $P<0.001$, $\eta^2=0.062$). За допомогою *post hoc* аналізу Тьюкі виявили, що значення RMSSD у самок щурів другої та третьої груп відзначились різким вірогідним зниженням у 2,8 раза ($P<0.001$, середня різниця = −9.0807) та 2.3 раза ($P<0.001$, середня різниця = −8.0147), порівняно з самками контрольної групи. Однофакторний дисперсійний аналіз показав, що відмінності серед показників pNN50 в самок щурів контрольної групи (n=12, M=22.56, SD=2.89), в самок, яким протягом місяця вводили доксорубіцин (n=12, M=14.73, SD=1.49), та самок, які впродовж місяця отримували кофеїн разом з доксрубіцином (n=12, M=19.26, SD=1.92), є статистично вірогідними ($F(2.15)=58.51$, $P<0.001$, $\eta^2=0.062$). *Post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі засвідчив вірогідне зниження показників pNN50 у самок щурів другої групи — в 1.5 раза та

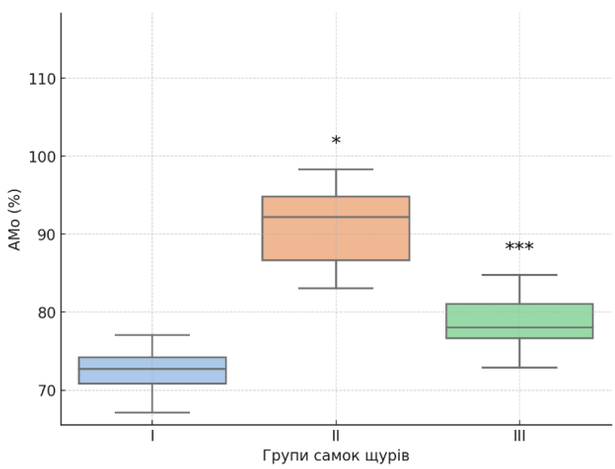


Рис. 2. Динаміка амплітуди моди (AMo) (%) у самок щурів контрольної групи (I), за дії доксорубіцину (II) та поєднання кофеїну і доксорубіцину (III)
Fig. 2. Mode amplitude (AMo) dynamics (%) in female rats of the control group (I), under action of doxorubicin (II) and the combination of caffeine and doxorubicin (III)

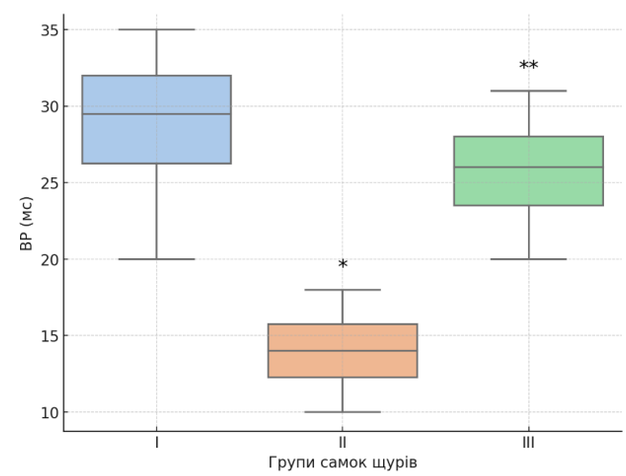


Рис. 3. Динаміка варіаційного розмаху (ВР) (мс) у самок щурів контрольної групи (I), за дії доксорубіцину (II) та поєднання кофеїну і доксорубіцину (III)
Fig. 3. Variation range (VR) dynamics (%) in female rats of the control group (I), under action of doxorubicin (II) and the combination of caffeine and doxorubicin (III)

Примітка. * — вірогідність щодо показників самок I групи (P<0,001); ** — вірогідність щодо показників самок II групи (P<0,001).
Note. * is significance compared to the indicators of the I group female rats (P<0.001); ** is significance compared to the indicators of the II group female rats (P<0.001).

в 1.3 раза, порівняно з відповідними значеннями в самок контрольної (P<0.001, середня різниця = −7.830) та третьої групи (P<0.001, середня різниця = 4.532).

ІВР є одним з чутливих показником у структурі ВСР, що відображає баланс між симпатичним і парасимпатичним відділами вегетативної нервової системи. Однофакторний дисперсійний аналіз показав, що відмінності значень ІВР між самками щурів першої (n=12, M=0.0025, SD=0.0003), другої (n=12, M=0.0051, SD=0.0005) і третьої групи (n=12, M=0.0030, SD=0.0003) є статистично вірогідними ($F(2.51)=239.45$, $P<0.001$, $\eta^2=0.904$). *Post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі засвідчив, що значення ІВР у самок щурів, яким вводили доксорубіцин, були вірогідно удвічі вищими від відповідного показника у самок щурів контрольної групи (P<0.001, середня різниця = 0.0026) та в 1.7 раза вищими, порівняно з показником у самок щурів, які отримували кофеїн разом з доксорубіцином (P<0.001, середня різниця = 0.0021). ІВР у самок щурів третьої групи характеризувався вірогідним підвищенням в 1.2 раза щодо самок щурів першої групи (P<0.0004, середня різниця = 0.0005).

ІН є чутливим показником симпатичної активації серед параметрів варіабельності серцевого ритму, який допомагає оцінити рівень регуляторної напруги з боку автономної нервової системи. За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ми виявили, що відмінності значень ІН між самками щурів першої (n=12, M=0.25, SD=0.034), другої (n=12, M=0.52, SD=0.028) і третьої групи (n=12, M=0.31, SD=0.027) є статистично вірогідними ($F(2.51)=373.74$, $P<0.001$, $\eta^2=0.936$). *Post hoc* аналіз за критерієм Тьюкі показав, що саме в тих самок щурів, які отримували протягом місяця доксорубіцин, спостерігали максимальні значення ІН — вірогідно вищі у 2.1 раза та в 1.7 раза, порівняно з самками щурів контрольної групи (P<0.001, середня різниця = 0.271) та самками щурів, яким вводили кофеїн разом з доксорубіцином (P<0.001, середня різниця = 0.210).

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень, які вказують на кардіотоксичний ефект доксорубіцину, що супроводжується значним вірогідним підвищенням ЧСС [4–5, 20]. Збільшення цього показника, ймовірно, зумовлене розвитком компенсаторної тахікардії у відповідь на кардіоміопатію, спричинену доксорубіцином. Відомо, що доксорубіцин провокує оксидативний стрес і пошкодження мітохондрій кардіоміоцитів, що може сприяти порушенню серцевого ритму, а також гіперактивацію симпатичної нервової системи [8–9, 15–16]. Однак поєднане введення кофеїну разом з доксорубіцином у самок щурів не призвело до вірогідного підвищення значень ЧСС порівняно з самками щурів контрольної групи. Це може вказувати на потенційний кардіопротекторний ефект кофеїну, який, згідно з низкою досліджень, здатен знижувати оксидативний стрес, поліпшувати функцію серцевого м'яза й моделювати активність аденозинових рецепторів [1, 18]. Одним із потенційних механізмів такого впливу може бути блокада аденозинових рецепторів A1 і A2A, що зменшує активацію проапоптотичних шляхів і сприяє збереженню кардіоміоцитів від ушкодження [2]. Кофеїн здатний проявляти антиапоптотичний вплив і сприяти стабілізації функції мітохондрій в серцевому м'язі, чим можна пояснити вірогідне зниження ЧСС у самок щурів, які отримували кофеїн і доксорубіцин, порівняно з самками щурів другої групи. Результати нашого дослідження демонструють, що доксорубіцин спричиняє виражене вірогідне підвищення показника ЧСС, що пов'язано з його кардіотоксичними властивостями [4, 20]. Натомість його комбіноване застосування разом з кофеїном дозволяє вірогідно знизити відповідний показник майже до рівня значень ЧСС самок контрольної групи, що свідчить про можливий кардіопротекторний вплив кофеїну.

Результати за показниками Mo в самок щурів третьої групи можуть вказувати на те, що кофеїн потенційно модулює або зменшує негативний вплив доксорубіцину; це узгоджується з літературними даними про його нейропротекторні, антиоксидантні та кардіопротекторні властивості [17–18]. Відомо, що доксорубіцин є антрацикліновим антибіотиком, який широко застосовується в хіміотерапії, проте його використання обмежене через виражену кардіотоксичність, пов'язану з підвищенням рівня окисного стресу та дисфункцією мітохондрій [4, 9, 11]. У свою чергу, кофеїн проявляє антиоксидантні властивості, впливає на клітинні сигнальні шляхи — PI3K/Akt/mTOR, AMPK, MAPK, p53, які регулюють апоптоз і метаболізм, що може пояснювати результати нашого дослідження [2].

Отримані нами значення AMo свідчать про те, що введення самкам доксорубіцину протягом місяця призводить до значного вірогідного підвищення цього показника, що може вказувати на розвиток дистресу або функціональних змін у вегетативній регуляції серцево-судинної системи. Натомість кофеїн, введений разом з доксорубіцином, значно знижував рівень AMo порівняно з самками другої групи, хоча і не до контрольного рівня. Це може свідчити про можливу захисну або модулюючу дію кофеїну на порушення, індуковані доксорубіцином [14].

Зниження адаптаційної здатності серцево-судинної системи, прояв порушення регуляції автономної нервової системи, а також серцевої дисфункції, може бути зумовлене різким вірогідним зниження показника ВР у самок щурів, які протягом місяця отримували доксорубіцин. Однак кофеїн, який вводили самкам щурів третьої групи разом з доксорубіцином, вірогідно підвищив ВР порівняно з самками другої групи.

У самок щурів, які отримували доксорубіцин, було зафіксовано вірогідне зниження значень RMSSD і pNN50 відносно відповідних показників у самок контрольної групи. Такі зміни свідчать про пригнічення парасимпатичної регуляції серця, що є характерним для станів оксидативного стресу, запалення чи ураження міокарда [11]. Відомо, що доксорубіцин спричиняє

підвищення рівня реактивних форм кисню, що призводить до мітохондріальної дисфункції й апоптозу кардіоміоцитів. Прояв вираженого негативного впливу доксорубіцину на варіабельність серцевого ритму може бути наслідком пригнічення автономної регуляції серцевого ритму під впливом цього хіміотерапевтичного засобу [15]. Натомість додавання кофеїну при введенні доксорубіцину у самок щурів третьої групи частково пом'якшувало негативний вплив вказаного препарату, хоча при цьому не спостерігали повного відновлення автономного контролю серця. Оскільки ми простежували тенденцію до збільшення значень RMSSD і вірогідне підвищення показника pNN50, порівняно з самками щурів другої групи, це може вказувати на потенційний модуляційний ефект кофеїну на серцево-судинну систему.

У контрольній групі самок щурів значення IBP відповідали фізіологічній нормі автономного балансу між симпатичною та парасимпатичною ланкою. Підвищення показника IBP у самок другої групи вказує на різке зміщення вегетативного балансу в бік симпатикотонії або зниження адаптаційних резервів серцево-судинної системи. Введення кофеїну в комбінації з доксорубіцином спричинило вірогідне зниження значень IBP у самок третьої групи, порівняно з самками другої групи. Це може свідчити про модуляційний ефект кофеїну на автономну регуляцію серцевого ритму і зменшення вираженості симпатичної домінанти, яка була спричинена дією відповідного хіміотерапевтичного препарату.

Різке зростання ІН у самок щурів другої групи, порівняно з відповідним показником контролю, свідчить про посилення симпатичного впливу на серцево-судинну систему. Такий ефект узгоджується з раніше описаними нами проявами кардіотоксичної дії доксорубіцину [5, 20]. Натомість відповідний високий показник ІН у самок щурів другої групи також може відображати зниження варіативності серцевого ритму як маркер зменшення адаптаційних резервів серцево-судинної системи. Отримані нами результати свідчать про високий ступінь залежності значень ІН від належності самок щурів до тієї чи іншої експериментальної групи. Значення коефіцієнта η^2=0.936, отримане в результаті проведення нами дисперсійного аналізу, вказує на те, що близько 94 % загальної варіації в показниках ІН пояснюється впливом експериментального чинника. Це вказує на наявність надзвичайно сильного ефекту введення доксорубіцину та комбінованої дії доксорубіцину з кофеїном на стан вегетативної регуляції серцевої діяльності.

Підводячи підсумки проведеного нами дослідження, варто зазначити, що доксорубіцин спричиняє значні зміни в показниках варіабельності серцевого ритму, тоді як кофеїн може частково нейтралізувати ці ефекти. Введення самкам щурів доксорубіцину призвело до вірогідних змін всіх показників ВСР, які свідчать про розвиток вегетативного дисбалансу. У самок щурів другої групи, порівняно з контролем, спостерігали вірогідне підвищення ЧСС, Mo, AMo, IBP, ІН та вірогідне зниження BP, RMSSD, pNN50, що вказує на переважання симпатичної активності та зниження парасимпатичного впливу. У самок щурів, яким вводили кофеїн разом з доксорубіцином, простежували часткову нормалізацію показників ВСР, а саме ЧСС, Mo і BP, до наближених значень самок щурів контрольної групи. Показники AMo, IBP, ІН характеризувались вірогідним підвищенням, порівняно з відповідними даними в самок контрольної групи, та вірогідним зниженням відносно самок щурів другої групи. Отже, отримані нами результати свідчать про потенційну модулюючу дію кофеїну на автономну регуляцію серцевого ритму самок щурів з доксорубіциновою кардіміопатією. Кофеїн у зазначеному дозуванні запобігає вегетативним зсувам, спричиненим хіміотерапевтичним препаратом, або їх пом'якшує.

Джерела

1. Abu-Hashem AA, Hakami O, El-Shazly M, El-Nashar HAS, Yousif MNM. Caffeine and purine derivatives: A comprehensive review on the chemistry, biosynthetic pathways, synthesis-related reactions, biomedical prospectives and clinical applications. *Chem Biodivers.* 2024; 21 (7): e202400050. DOI: 10.1002/cbdv.202400050.
2. Bhardwaj I, Ansari AH, Rai SP, Singh S, Singh D. Molecular targets of caffeine in the central nervous system. *Prog Brain Res.* 2024; 288: 35–58. DOI: 10.1016/bs.pbr.2024.06.012.
3. Charles A. The role of caffeine in headache disorders. *Curr Opin Neurol.* 2024; 37 (3): 289–294. DOI: 10.1097/WCO.0000000000001249.
4. Chen Y, Shi S, Dai Y. Research progress of therapeutic drugs for doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother.* 2022; 156: 113903. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113903.
5. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart.* 2018; 104 (12): 971–977. DOI: 10.1136/heartjnl-2017-312103.
6. Israelsen IME, Westgate CSJ, Kamp-Jensen C, Jensen RH, Eftekhari S. Effects of caffeine on intracranial pressure and pain perception in freely moving rats. *Headache.* 2023; 63 (9): 1220–1231. DOI: 10.1111/head.14634.
7. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R. Doxorubicin — an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells.* 2023; 12 (4): 659. DOI: 10.3390/cells12040659.
8. Kitakata H, Endo J, Ikura H, Moriyama H, Shirakawa K, Katsumata Y, Sano M. Therapeutic targets for DOX-Induced cardiomyopathy: Role of apoptosis *vs.* ferroptosis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (3): 1414. DOI: 10.3390/ijms23031414.
9. Li D, Yang Y, Wang S, He X, Liu M, Bai B, Tian C, Sun R, Yu T, Chu X. Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Redox Biol.* 2021; 46: 102089. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102089.
10. Li Q, Xia C, Li H, Yan X, Yang F, Cao M, Zhang S, Teng Y, He S, Cao M, Chen W. Disparities in 36 cancers across 185 countries: Secondary analysis of global cancer statistics. *Front Med.* 2024; 18 (5): 911–920. DOI: 10.1007/s11684-024-1058-6.
11. Li Y, Yan J, Yang P. The mechanism and therapeutic strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity: Role of programmed cell death. *Cell Stress Chaperon.* 2024; 29 (5): 666–680. DOI: 10.1016/j.cstres.2024.09.001.
12. Li XY, Xu L, Lin GS, Li XY, Jiang XJ, Wang T, Lü JJ, Zeng B. Protective effect of caffeine administration on myocardial ischemia/reper-

fusion injury in rats. *Shock.* 2011; 36 (3): 289–294. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182222915.

13. Lisun Y, Uhlev Y. Heart rate variability, applying and methods of analysis. *Pain Anaest Intens Care.* 2020; 4 (93): 83–89. DOI: 10.25284/2519-2078.4(93).2020.220693. (in Ukrainian)
14. Mukvych V, Severynovska O. Modulatory effect of caffeine on heart rate variability parameters in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Bul Probl Biol Med.* 2024; 4 (175): 433–441. DOI: 10.29254/2077-4214-2024-4-175-433-441. (in Ukrainian)
15. Prathumsap N, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies. *Eur J Pharmacol.* 2020; 866: 172818. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172818.
16. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother.* 2021; 139: 111708. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111708.
17. Saimaiti A, Zhou DD, Li J, Xiong RG, Gan RY, Huang SY, Shang A, Zhao CN, Li HY, Li HB. Dietary sources, health benefits, and risks of caffeine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023; 63 (29): 9648–9666. DOI: 10.1080/10408398.2022.2074362.
18. Song X, Singh M, Lee KE, Vinayagam R, Kang SG. Caffeine: A multifunctional efficacious molecule with diverse health implications and emerging delivery systems. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (22): 12003. DOI: 10.3390/ijms252212003.
19. Tiwari R, Kumar R, Malik S, Raj T, Kumar P. Analysis of heart rate variability and implication of different factors on heart rate variability. *Curr Cardiol Rev.* 2021; 17 (5): e160721189770. DOI: 10.2174/1573403X16999201231203854.
20. Xue S, Chen H, Zhang J, Tian R, Xie C, Sun Q, Wang H, Shi T, Guo D, Wang Y, Wang Q. Qishen granule alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing ferroptosis via nuclear erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2) pathway. *J Ethnopharmacol.* 2024; 335: 118604. DOI: 10.1016/j.jep.2024.118604.
21. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk EA, Zakharija EA. *Laboratory Animals: Breeding, Maintenance, and Use in Experiments*. Kyiv, Vyshcha Shkola, 1983: 383 p. (in Ukrainian)

Effect of caffeine on heart rate variability parameters in female rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy

V. V. Mukvych, O. V. Severynovska
mukvichv@ukr.net

Oles Honchar Dnipro National University, 72 Nauky Ave., Dnipro, 49045, Ukraine

Cardiotoxicity remains a significant limitation in the clinical application of chemotherapeutic agents, particularly anthracyclines. Doxorubicin (DOX), a widely used representative of this group, exhibits potent antitumor activity and is commonly administered in the treatment of various malignant tumors. One of the modern, non-invasive, and informative methods for assessing the functional state of the cardiovascular system is heart rate variability (HRV) analysis. In the context of searching for means to correct doxorubicin-induced cardiomyopathy, there is growing interest in studying the effects of natural compounds with potential cardioprotective properties. Caffeine, at low and moderate doses, is capable of exerting antioxidant effects and demonstrating potential cardioprotective activity. The study was conducted on 36 sexually mature female Wistar rats weighing 250 ± 50 g. Healthy animals were randomly divided into three groups (n=12 per group): GROUP I (control) received physiological saline (1 mg/kg) via oral gavage; group II received doxorubicin at a dose of 1 mg/kg body weight intraperitoneally once a week for 4 weeks; group III received caffeine at a dose of 25 mg/kg body weight daily via oral gavage, along with doxorubicin at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally once a week for 4 weeks. The electrocardiogram (ECG) was recorded in female rats using a “Cardiolab” electrocardiographic complex for a wide range of cardiological studies (HAI-Medica, Kharkiv, Ukraine). Thus, the administration of doxorubicin to female rats led to statistically significant changes in all HRV parameters, indicating the development of autonomic imbalance. In female rats of the second group, compared to the control, a significant increase was observed in heart rate (HR), mode (Mo), mode amplitude (AMo), vegetative balance index (VBI), and stress index (SI), along with a significant decrease in variation range (VR), root mean square of successive differences (RMSSD), and the percentage of NN intervals differing by more than 50 ms (pNN50). These changes suggest a predominance of sympathetic activity and reduced parasympathetic influence. In female rats that received caffeine in combination with doxorubicin, a partial normalization of HRV parameters was observed, approaching the values recorded in the control group, particularly HR, Mo, and VR. Meanwhile, AMo, VBI, and SI remained significantly elevated compared to the control group, but showed a significant decrease relative to the second group. These findings indicate the potential modulatory effect of caffeine on the autonomic regulation of heart rhythm in female rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. Caffeine, at the given dosage, helps prevent or attenuate autonomic disturbances caused by this chemotherapeutic agent.

Key words: cytotoxicity, doxorubicin-induced cardiomyopathy, caffeine, stimulant effects, heart rate variability, oxidative stress, female rats

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.034
UDC 636.09:636.4;616:151
Received 24.09.2024 ▪ Revision 05.03.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Гематологічні показники кнурів за згодовування комплексних кормових добавок в умовах теплового стресу

І. Т. Іваницький, М. М. Шаран
ivanickijivan285@gmail.com

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

ORCID:
M. M. Sharan https://orcid.org/0000-0003-2299-4811
I. T. Ivanytskyi https://orcid.org/0009-0008-2189-8661

Authors' Contributions:
IIT: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Writing — original draft.
SMM: Conceptualization; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Writing — review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
The research methodology was approved by the Bioethical commission in the Institute of Animal Biology (National Academy of Sciences of Ukraine; Protocol no. 167 from January 7, 2025).

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Метою роботи було з'ясувати вплив згодовування комплексних кормових добавок на гематологічні показники кнурів за умов теплового стресу та нормальної температури. Експеримент провели на дев'яти клінічно здорових кнурах-плідниках віком 2–4 роки порід ландрас, п'єтрен і макстер. Проведено дві серії експериментів тривалістю 90 діб (дослідження тварин, відбір та аналіз матеріалу були аналогічними): за нормальних теплових умов (<23°C) і за умов теплового стресу (25–30°C). У першій серії (група Дослідна 1) всім кнурам індивідуально до комбікорму впродовж 30 діб додавали кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, яка містила вітаміни A, D_3, E, і C з глюконатом цинку у дозі 2 мл. У другій серії експериментів (група Дослідна 2) всім кнурам індивідуально до комбікорму впродовж 30 діб додавали кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, яка містила вітаміни A, D_3, E, C, глюконат цинку та бетаїн у дозі 20 мл. Для моделювання теплового стресу створювали умови підвищеної температури (25–30°C) і вологості (70–80 %) впродовж 7 днів тривалістю 3 год щодня, ізолюючи клітки поліетиленовою плівкою. Температуру та вологість контролювали термогігрометром з визначенням середніх величин на кожному етапі. Наприкінці кожного етапу досліду від усіх піддослідних кнурів брали проби крові і визначали гематологічні показники: еритроцити, гемоглобін, гематокрит, еритроцитарні індекси, вміст тромбоцитів і лейкоцитів. Встановлено, що під впливом теплового стресу в кнурів вірогідно (P<0,05–0,001) знижуються гематологічні показники: вміст еритроцитів, гемоглобіну, гематокрит, MCV, MCHC за незначного зменшення вмісту лейкоцитів і тромбоцитів порівняно з періодом нормальних температурних умов. Згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку за умов теплового стресу вірогідно (P<0,05–0,01) підвищило вміст еритроцитів, лейкоцитів, гемоглобіну, гематокриту, еритроцитарних індексів MCV та MCH порівняно з контролем. Аналогічно, згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну в умовах теплового стресу призвело до вірогідного (P<0,01) підвищення вмісту еритроцитів, лейкоцитів, гемоглобіну та гематокриту з одночасним зростанням еритроцитарних індексів MCV, MCH (P<0,05) та MCHC. Водночас згодовування кнурам обох комплексних кормових добавок за умов нормальних температури та вологи спричиняло незначне збільшення усіх досліджуваних гематологічних показників.

Ключові слова: кнури, тепловий стрес, кормова ліпосомальна добавка, гематологічні показники

Вступ

Тепловий стрес може мати великий вплив на більшість аспектів репродуктивної функції у ссавців. До його наслідків належать порушення сперматогенезу та розвитку ооцитів, дозрівання яйцеклітин, раннього розвитку ембріона, росту плода і плаценти та лактації. Ці шкідливі ефекти теплового стресу є результатом або гіпертермії, пов'язаної з тепловим стресом, або фізіологічних змін у тварин, які перебувають у тепловому стресі, для регулювання температури тіла [28]. Багато впливів підвищеної температури на гамети і ранній ембріон пов'язані зі зростанням вироблення активних форм кисню. Генетична адаптація до теплового стресу можлива як щодо регуляції температури тіла, так і щодо стійкості клітин до підвищеної температури [7].

У галузі репродуктивної біотехнології однією із проблем є дослідження причин зниження якості спермато-, оо- й ембріогенезу високопродуктивних тварин. Фізіологічні і біохімічні механізми перебігу порушень функціонального стану репродуктивної системи тварин, пов'язані зокрема 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 розроблені [38]. Тому подальші комплексні дослідження з вивчення відтворної функції продуктивних тварин за дії теплового стресу є актуальними.

У практиці свинарства в літній період свині часто потерпають від теплового стресу, який супроводжується зниженням їхньої продуктивності та відтворної здатності [35]. У цей період погіршується якість спермопродукції у кнурів-плідників, особливо функціональна активність сперміїв [13, 19]. У корекції цих процесів для зменшення дії теплового стресу провідна роль належить різним біологічно активним речовинам. Дослідження показують, що тепловий стрес спричиняє ознаки оксидаційного стресу у свиней, а також знижує їхні репродуктивні показники [5, 33, 36]. Науковці і практики запропонували низку заходів для зниження негативної дії теплового стресу на організм свиней, які передбачають корекцію годівлі, технологічних елементів тощо [8, 23]. Останнім часом практикують згодовування бетаїну як антистресового препарату та осмопротектора [11, 37]. Дослідження на баранах-плідниках встановили позитивну дію згодовування вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку на гематологічні показники та якість сперми у період статевого спокою [29, 30].

Водночас недостатньо даних щодо впливу теплового стресу на метаболічні процеси в організмі кнурів та взаємозв'язок між показниками антиоксидантного захисту та якістю сперми. Також не розроблено дієвих заходів для профілактики та усунення негативної дії теплового стресу на спермопродуктивність кнурів [16].

З огляду на численні літературні дані, логічним є з'ясування дії теплового стресу на гематологічні показники у кнурів-плідників і можливість їх корекції згодовуванням вітамінів A, D_3, E, і C у поєднанні з глюконатом цинку та бетаїном, що і стало метою наших досліджень.

Матеріали та методи

Дослідження проведено у Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси» на дев'яти клінічно здорових кнурах віком 2–4 роки порід ландрас, п'єтрен і макстер, яких утримували в індивідуальних клітках. Перед початком експерименту проведено клінічний огляд кожної тварини з визначенням температури тіла.

Проведено два етапи досліджень, у яких дослідження тварин, відбір матеріалу, його аналіз були аналогічними: 1) дослідження за нормальних теплових умов (<23°C) — 90 діб; 2) дослідження за умов теплового стресу (25–30°C) — 90 діб. На кожному з етапів проведено три серії експериментів тривалістю по 30 діб, що обумовлено тривалістю сперматогенезу у кнурів.

У першій серії (група Дослідна 1) всім кнурам індивідуально до комбікорму впродовж 30 діб додавали кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, до складу якої входили вітаміни A, D_3, E, і C з глюконатом цинку у дозі 2 мл. Для виготовлення 20 мл добавки використано: 2 г глюконату цинку, 250 тис. МО вітаміну A, 25 тис. МО вітаміну D_3, 250 мг вітаміну E, 500 мг вітаміну C, а також лецитин і твін-20 та деіонізовану воду.

У другій серії експериментів (група Дослідна 2) всім кнурам індивідуально до комбікорму впродовж 30 діб додавали кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, до складу якої входили вітаміни A, D_3, E, C, глюконат цинку та бетаїн у дозі 20 мл. Для виготовлення 20 мл добавки використано: 200 мг глюконату цинку, 25 тис. МО вітаміну A, 2500 МО вітаміну D_3, 25 мг вітаміну E, 50 мг вітаміну C, 8 г бетаїну, а також лецитин, твін-20 та деіонізовану воду.

Для виготовлення обох препаратів суміш перемішували та диспергували на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1 за частоти 22кГц впродовж 2–3 хв до утворення тонкої емульсії.

У третій серії експериментів (група Контрольна) кормових добавок з комбікормом кнурам не згодовували.

Моделювали тепловий стрес, для чого створювали умови підвищеної температури (25–30°C) і вологості (понад 80 %) впродовж 7 днів тривалістю 3 год щодня, ізолюючи клітки поліетиленовою плівкою. Температуру та вологість контролювали термогігрометром з визначенням середніх величин на кожному етапі.

Наприкінці кожного етапу досліду від усіх піддослідних кнурів відбирали проби крові з хвоста до ранкової годівлі. У крові визначали гематологічні показники: еритроцити, гемоглобін, гематокрит, еритроцитарні коефіцієнти — середній об'єм еритроцита (MCV), середній

вміст гемоглобіну в еритроциті (МСН), середню концентрацію гемоглобіну в одному еритроциті (МСНС), а також вміст тромбоцитів і лейкоцитів. Визначення показників проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі *Mythic 18 Orphee Vet* (*Orphee*, Швейцарія).

Усі отримані цифрові дані обробляли 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 при P<0,05.

Таблиця 1. Основні гематологічні показники кнурів за згодовування комплексних ліпосомальних добавок (n=9, M±m)
Table 1. Main hematological indicators of boars fed complex liposomal supplements (n=9, M±m)

Показник Index	Групи / Groups		
	Контрольна Control	Дослідна 1 Experiment 1	Дослідна 2 Experiment 2
За нормальної температури / At normal temperature			
Еритроцити, Т/л Erythrocytes, T/l	7,43±0,14	7,49±0,13	7,67±0,12
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	107,50±2,94	113,93±3,02	111,37±3,30
Гематокрит, % Hematocrit, %	39,29±0,58	40,52±0,38	41,04±0,40*
За умов теплового стресу / Under heat stress conditions			
Еритроцити, Т/л Erythrocytes, T/l	6,62±0,19[b]	7,38±0,13**	7,50±0,14**
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	96,89±2,41[a]	109,22±3,41**	110,39±3,13**
Гематокрит, % Hematocrit, %	41,21±0,45[c]	39,58±0,24**	38,86±0,57**

Таблиця 2. Еритроцитарні індекси крові кнурів за згодовування комплексних ліпосомальних добавок (n=9, M±m)
Table 2. Erythrocyte blood indices of boars fed complex liposomal supplements (n=9, M±m)

Показник Index	Групи / Groups		
	Контрольна Control	Дослідна 1 Experiment 1	Дослідна 2 Experiment 2
За нормальної температури / At normal temperature			
MCV, 10^{-15} л MCV, 10^{-15} l	26,53±1,43	28,03±1,60	25,88±1,58
MCH, 10^{-12} г MCH, 10^{-12} g	10,16±0,47	10,43±0,44	11,38±0,49
MCHC, г/л MCHC, g/l	288,91±24,21	304,93±19,49	317,19±21,06*
За умов теплового стресу / Under heat stress conditions			
MCV, 10^{-15} л MCV, 10^{-15} l	22,77±1,21[a]	26,60±1,11*	26,07±1,16*
MCH, 10^{-12} г MCH, 10^{-12} g	8,17±0,41[b]	9,87±0,40*	9,66±0,33*
MCHC, г/л MCHC, g/l	283,02±26,81	304,93±19,49	302,98±16,77

Результати

У проведених дослідженнях встановлено значні зміни гематологічних показників у кнурів під впливом теплового стресу. Зокрема, вміст еритроцитів у крові кнурів зменшився на 13,62 % (P<0,01) порівняно з періодом нормальних температур і вологості (табл. 1). Аналогічно, за дії теплового стресу вміст гемоглобіну у крові кнурів був нижчим на 9,87 % (P<0,05), ніж за нормальної температури. Водночас гематокрит під впливом теплового стресу знизився на 9,76 % (P<0,001) порівняно з періодом нормальних температурних умов.

Комплексні кормові добавки згодовували як за нормальних температурних умов, так і за дії теплового стресу. Аналіз впливу згодовування добавок засвідчив їхню позитивну дію на гематологічні показники кнурів-плідників за нормальної температури. Так, після згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) вміст еритроцитів майже не змінився, проте спостерігали тенденцію до збільшення вмісту гемоглобіну та гематокриту на 5,98 % та 3,14 % відповідно.

Подібні зміни гематологічних показників спостерігали й після згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2). Зокрема, встановлено тенденцію до збільшення вмісту еритроцитів і гемоглобіну на 3,14 % та 3,60 % відповідно за одночасного збільшення гематокриту на 4,47 %.

Таблиця 3. Вміст лейкоцитів і тромбоцитів у крові кнурів за згодовування комплексних ліпосомальних добавок (n=9, M±m)
Table 3. The content of leukocytes and platelets in the blood of boars fed complex liposomal supplements (n=9, M±m)

Показник Index	Групи / Groups		
	Контрольна Control	Дослідна 1 Experiment 1	Дослідна 2 Experiment 2
За нормальної температури / At normal temperature			
Тромбоцити, $\times 10^9$/л Platelets, $\times 10^9$/l	359,60±9,08	349,89±13,97	353,20±14,45
Лейкоцити, $\times 10^9$/л Leukocytes, $\times 10^9$/l	8,11±0,31	9,60±0,32**	9,40±0,20***
За умов теплового стресу / Under heat stress conditions			
Тромбоцити, $\times 10^9$/л Platelets, $\times 10^9$/l	355,29±11,01	383,04±13,25	8,40±0,27**
Лейкоцити, $\times 10^9$/л Leukocytes, $\times 10^9$/l	6,83±0,58	379,04±14,67	9,20±0,20**

Примітка. * — P<0,05, ** — P<0,01, *** — P<0,001 — вірогідна різниця між дослідними та контрольною групами; [a] — P<0,05, [b] — P<0,01, [c] — P<0,001 — вірогідна різниця між контрольною групою за нормальної температури та за умов теплового стресу.
Note. * — P<0.05, ** — P<0.01, *** — P<0.001 — significant difference between the experimental and control groups; [a] — P<0.05, [b] — P<0.01, [c] — P<0.001 — significant difference between the control group at normal temperature and under heat stress conditions.

За згодовування комплексних кормових добавок кнурам-плідникам в умовах теплового стресу зміни гематологічних показників були більш виражені. Зокрема, згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) призвело до збільшення вмісту еритроцитів у крові на 11,41 % (P<0,01). Аналогічно, вміст гемоглобіну і гематокрит у крові кнурів під впливом згодовування комплексної добавки за умов теплового стресу збільшилися на 12,73 % (P<0,01) та 11,63 % (P<0,01) відповідно, порівняно з контролем.

Подібні зміни гематологічних показників встановлено і після згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2) в умовах теплового стресу. Зокрема, вміст еритроцитів, гемоглобіну та гематокрит у крові кнурів-плідників, порівняно з контролем, збільшився на 13,26 % (P<0,01), 13,93 % (P<0,01) та 9,59 % (P<0,01) відповідно.

Зміни еритроцитів під впливом згодовування кнурам-плідникам комплексних кормових добавок підтверджує коливання еритроцитарних індексів як за нормальної температури, так і під час теплового стресу. Так, за нормальних температурних умов після згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) спостерігали тенденцію до збільшення середнього об'єму еритроцита (MCV), середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті (MCH) і середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті (MCHC) — на 5,65 %, 2,74 та 5,55 % відповідно, порівняно з контролем (табл. 2). Після згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2) MCH та MCHC мали на 12,04 і 9,79 % відповідно більші значення, порівняно з контролем, за майже незмінного значення MCV.

Під впливом теплового стресу еритроцитарні індекси крові кнурів значно знизилися. Зокрема, середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середня концентрація гемоглобіну в одному еритроциті (MCHC) зменшилися на 14,20 % (P<0,05), 19,58 % (P<0,01) та 2,04 % відповідно.

Згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) за умов теплового стресу спричинило зростання еритроцитарних індексів MCV, MCH та MCHC на 16,84 % (P<0,05), 20,82 % (P<0,01) та 7,74 % відповідно, порівняно з контролем. Подібні зміни еритроцитарних індексів встановлено за згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2): значення MCV, MCH та MCHC мали на 14,49 % (P<0,05), 18,23 % (P<0,05) та 7,05 % відповідно вищі від контролю значення.

Після згодовування комплексних ліпосомальних добавок кнурам-плідникам встановлено зміни вмісту лейкоцитів і тромбоцитів як за нормальної температури, так і за умов теплового стресу (табл. 3).

Зокрема, за нормальної температури після згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) спостерігали тенденцію до зниження вмісту тромбоцитів на 2,70 %, порівняно з контролем, на фоні підвищення вмісту лейкоцитів на 18,36 % (P<0,01).

Подібні зміни спостерігали і після згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2) — збільшення вмісту лейкоцитів на 15,89 % (P<0,001) з одночасною тенденцією до зниження вмісту тромбоцитів на 1,78 %.

Під впливом теплового стресу кількість лейкоцитів у крові кнурів-плідників знизилася на 15,75 %, хоча ці дані невірогідні, натомість вміст тромбоцитів зменшився лише на 1,20 %. Після згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку (Дослідна 1) у період впливу теплового стресу вміст лейкоцитів зріс на 22,93 % (P<0,01) за одночасного збільшення кількості тромбоцитів лише на 7,81 %.

Аналогічно, згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну (Дослідна 2) призвело до зростання кількості лейкоцитів на 34,63 % (P<0,01) на тлі незначного збільшення вмісту тромбоцитів на 6,69 %.

Обговорення

Тепловий стрес є одним із найважливіших факторів, який серйозно впливає на добробут тварин та економічні вигоди тваринництва. Тепловий стрес виникає через дисбаланс у механізмі надходження та втрати тепла [25]. Стрес у тварин спричиняє каскад різких змін у біологічних функціях, серед яких — зниження споживання сухої речовини, ефективність корму для росту, порушення метаболізму води, білку, енергії та мінерального балансу [26, 27]. Це також провокує зміну гормональної секреції, ферментативних реакцій і метаболітів крові [15]. Такі зміни призводять до погіршення росту, виробництва та відтворення. Сезонні та екологічні зміни можуть впливати на показники крові худоби [14].

Сезонний стрес у тварин можна передбачити за допомогою температурно-вологісного індексу [2]. У нашому експерименті було створено умови помірного теплового стресу (температура 25–28°C, вологість 80–88 %). Оскільки фізіологічна рівновага підтримується кров'ю, то кожна зміна, яка відбувається в організмі тварин, відображається в показниках крові [9]. У зв'язку з цим, ми акцентували свої дослідження на вивчення змін гематологічних показників під впливом теплового стресу.

Зміни показників крові є важливими показниками фізіологічного стану тварини. Загальний аналіз крові є важливим діагностичним інструментом для моніторингу відповіді та диференціальної діагностики. Добре відомо, що такі змінні, як порода, фізіологічна стадія, вік, репродуктивна стадія, а також умови довкілля та пора року впливають на фізико-біохімічні параметри. В окремих експериментах параметри крові були використані для сортування обмежень продуктивності м'ясної худоби [17].

У наших дослідженнях встановлено вірогідне (P<0,05–0,001) зниження вмісту еритроцитів, гемогло-

біну та гематокриту в кнурів-плідників під дією теплового стресу. Подібні результати отримали L. Gutierrez-De La R. зі співавт. [17] і S. Casella зі співавт. [9], які встановили значне зниження кількості еритроцитів у корів із супутніми значними змінами гемоглобіну та гематокриту впродовж літа. K. Singh зі співавт. [34] також підтвердили зниження кількості еритроцитів у овець під час теплового стресу і довели, що вміст еритроцитів знижується у тварин, які погано адаптовані до холоду, але підвищуються у високоадаптованих [18]. Водночас C. T. Shibu зі співавт. [32] повідомили про значно нижчий гемоглобін під час спеки порівняно з холодною температурою, а інші дослідники влітку спостерігали суттєво вищий рівень гемоглобіну у великої рогатої худоби, ніж взимку [22, 24].

Окремі автори звертають увагу на важливість еритроцитарних індексів в інтерпретації аналізів метаболічного профілю великої рогатої худоби [21]. У нашому експерименті під впливом теплового стресу вірогідно (P<0,05–0,01) знизилися еритроцитарні індекси крові кнурів: середній об'єм еритроцита (MCV) і середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH) за незначного зниження середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті (MCHC) на 2,04 %.

Для нівелювання дії теплового стресу на кнурів-плідників ми запропонували дві кормові добавки у формі ліпосомальної емульсії, до складу яких входять вітаміни A, D_3, E, C, глюконат цинку та бетаїн. Ліпосомальна емульсія забезпечує пролонгований ефект, захищає діючі речовини під час проходження їх через травний тракт використанням лецитину та твіну. Вказані вітаміни мають антиоксидантні властивості [1, 4, 6], активізуючи у комплексі обмінні процеси та покращуючи репродуктивну функцію самців [12, 31]. Роль Цинку у репродуктивній функції самців теж широко висвітлена у літературі [3, 10]: встановлена його позитивна дія на синтез тестостерону, статеву активність та якісні показники сперми. Антистресові та осмопротекторні властивості бетаїну базуються на тому, що як природний донор метилу він може знижувати рівень гомоцистеїну в крові, посилювати антиоксидантну активність і знижувати оксидативний стрес [20].

Аналіз результатів проведених досліджень підтвердив позитивну дію згодовування кнурам-плідникам обох комплексних добавок з вітамінами A, D_3, E, C, глюконатом цинку та бетаїном під час теплового стресу на гематологічні показники. Зокрема, встановлено вірогідне (P<0,05–0,01) зростання вмісту еритроцитів, лейкоцитів і гемоглобіну, гематокриту, еритроцитарних індексів MCV, MCH та MCHC на тлі незначного збільшення кількості тромбоцитів. Це може свідчити про нормалізацію метаболічних процесів та інтенсифікацію захисних сил в організмі кнурів-плідників.

Таким чином, застосування вітамінів A, D_3, E та C у поєднанні з глюконатом цинку та бетаїном у формі ліпосомальної емульсії нормалізує в кнурів гематологічні показники, знижені дією теплового стресу, що в підсумку може покращити метаболічні та репродуктивні показники плідників; однак це потребує додаткових досліджень.

Отож, за дії теплового стресу вірогідно знижуються гематологічні показники в кнурів: вміст еритроцитів — на 13,62 % (P<0,01), вміст гемоглобіну — на 9,87 % (P<0,05), гематокрит — на 9,76 % (P<0,001), MCV — на 14,20 % (P<0,05), MCHC — на 19,58 % (P<0,01), порівняно з періодом нормальних температур і вологості.

Згодовування кнурам вітамінів A, D_3, E, і C з глюконатом цинку за умов теплового стресу спричинило збільшення вмісту еритроцитів у крові на 11,41 % (P<0,01), гемоглобіну — на 12,73 % (P<0,01), гематокриту — на 11,63 % (P<0,01), еритроцитарних індексів MCV та MCH — на 16,84 % (P<0,05) і 20,82 % (P<0,01) відповідно, вміст лейкоцитів — на 22,93 % (P<0,01), порівняно з контролем.

Згодовування кнурам-плідникам вітамінів A, D_3, E, C, глюконату цинку та бетаїну в умовах теплового стресу призвело до підвищення вмісту еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту на 13,26 % (P<0,01), 13,93 % (P<0,01) та 9,59 % (P<0,01) відповідно, порівняно з контролем, з одночасним зростанням еритроцитарних індексів MCV, MCH та MCHC на 14,49 % (P<0,05), 18,23 % (P<0,05) і 7,05 % відповідно, а також збільшенням кількості лейкоцитів на 34,63 % (P<0,01) та тромбоцитів на 6,69 %.

Згодовування кнурам обох комплексних кормових добавок за умов нормальних температурно-вологісних умов спричиняло невірогідне збільшення усіх досліджуваних гематологічних показників.

Подальші дослідження будуть скеровані на з'ясування впливу згодовування комплексних кормових добавок кнурам-плідникам в умовах теплового стресу на біохімічні процеси в організмі та сперміях.

Джерела

1. Abdulkareem TA, Al-Haboby AH, Al-Mjamei SM, Hobi AA. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. *Small Rum Res.* 2005; 57 (1): 67–71. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.06.017.
2. Akyuz A, Boyaci S, Cayli A. Determination of critical period for dairy cows using temperature humidity index. *J Anim Vet Adv.* 2010; 9 (13): 1824–1827. DOI: 10.3923/javaa.2010.1824.1827.
3. Allouche-Fitoussi D, Breitbart H. The role of zinc in male fertility. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (20): 7796. DOI: 10.3390/ijms21207796.
4. Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafra D, Cariati F, Salzano C, Galdiero G, Piscopo M, Vece A, Colao A, Pivonello R. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017; 18 (3): 285–305. DOI: 10.1007/s11154-017-9425-0.
5. Audet I, Laforest JP, Martineau GP, Matte JJ. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J Anim Sci.* 2004; 82 (2): 626–633. DOI: 10.2527/2004.822626x.
6. Baiomy AA, Mohamed AEA, Mottelib AA. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on productive and reproductive performance in rams. *J Vet Med Res.* 2009; 19 (1): 39–43. DOI: 10.21608/jvmr.2009.77807.
7. Brown-Brandl TM, Eigenberg RA, Nienaber JA, Kachman SD. Thermoregulatory profile of a newer genetic line of pigs. *Livest Prod Sci.*

2001; 71 (2–3): 253–260. DOI: 10.1016/S0301-6226(01)00184-1.

8. Cabezón FA, Stewart KR, Schinckel AP, Barnes W, Boyd RD, Wilcock P, Woodliff J. Effect of natural betaine on estimates of semen quality in mature AI boars during summer heat stress. *Anim Reprod Sci.* 2016; 170: 25–37. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.009.
9. Casella S, Scianò S, Zumbo A, Monteverde V, Fazio F, Piccione G. Effect of seasonal variations in Mediterranean area on haematological profile in dairy cow. *Comp Clin Pathol*. 2013; 22 (4): 691–695. DOI: 10.1007/s00580-012-1468-8.
10. Cheah Y, Yang W. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *Adv Biosci Biotechnol*. 2011; 2 (4): 182–197. DOI: 10.4236/abb.2011.24029.
11. Chudak RA, Podolian YM, Babkov YI. The qualitative characteristics of pig meat under the action of feed additive "Betain". *Agr Sci Feed Technol*. 2017; 2 (96): 118–124. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/anxt_2017_2_18 (in Ukrainian)
12. Cofré-Narbona EJ, Peralta-Troncoso OA, Urquieta-Mangiola BE, Raggi-Saini LA, Benavides-Aguila N, Parraguez-Gamboa VH. Improvement of antioxidant status and semen quality by oral supplementation with vitamins C and E in rams. *Rev Cient*. 2016; 26 (3): 156–163. Available at: https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/141691/Improvement-of-antioxidant-status-and-semen-quality.pdf?sequence=1&isAllowed=y
13. Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N, Madej A. Stress and its influence on reproduction in pigs: A review. *Acta Vet Scand.* 2008; 50: 48. DOI: 10.1186/1751-0147-50-48.
14. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (eds). *Schalm's Veterinary Hematology.* 5th ed. Wiley, 2000: 1344 p. Available at: https://books.google.com.ua/books/about/Schalm_s_Veterinary_Hematology.html?id=HKCDyJH41IcC&redir_esc=y
15. Ganaie AH, Shanker G, Bumla NA, Ghasura RS, Mir NA, Wani SA, Dudhatra GB. Biochemical and physiological changes during thermal stress in bovines. *J Vet Sci Technol.* 2013; 4 (1): 1000126. DOI: 10.4172/2157-7579.1000126.
16. Guevara RD, Pastor JJ, Manteca X, Tedo G, Llonch P. Systematic review of animal-based indicators to measure thermal, social, and immune-related stress in pigs. *PLoS ONE.* 2022; 17 (5): e0266524. DOI: 10.1371/journal.pone.0266524.
17. Gutierrez-De La R JH, Warnick AC, Cowley JJ, Hentgs JF. Environmental physiology in the substropics. I. Effect of stress in some haematological values of beef cattle. *J Anim Sci.* 1971; 32 (5): 968–973. DOI: 10.2527/jas1971.325968x.
18. Habibu B, Dzenda T, Ayo JO, Yaqub LS, Kawu MU. Haematological changes and plasma fluid dynamics in livestock during thermal stress, and response to mitigative measures. *Livest Sci.* 2018; 214: 189–201. DOI: 10.1016/j.livsci.2018.05.023.
19. Horky P, Tmejova K, Kensova R, Cernei N, Kudr J, Ruttkay-Nedecky B, Sapakova E, Adam V, Kizek R. Effect of heat stress on the antioxidant activity of boar ejaculate revealed by spectroscopic and electrochemical methods. *Int J Electrochem Sci.* 2015; 10 (8): 6610–6626. DOI: 10.1016/S1452-3981(23)06746-9.
20. Kempson SA, Vovor-Dassu K, Day C. Betaine transport in kidney and liver: Use of betaine in liver injury. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32 (S1): 32–40. DOI: 10.1159/000356622.
21. Klinkon M, Jazbec I, Zadnik T, Trenti F. Red blood cell (RBC) count in cattle in Slovenia. *Proceedings of the 18th World's Buiatrics Congress*. 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, Italy. 1994; 29 (2–2): 1269–1271.
22. Lateef A, Das H, Panchasara HH, Nilufar H, Sanap MJ. Seasonal effects on milk yield, erythrocytic and leukocytic indices of Kankrej cattle (*Bos indicus*). *Vet World.* 2014; 7 (7): 472–477. DOI: 10.14202/vetworld.2014.472-477.
23. Li Y, Wang A, Taya K, Li CM. Declining semen quality and steadying seminal plasma ions in heat-stressed boar model. *Reprod Med Biol.* 2015; 14 (4): 171–177. DOI: 10.1007/s12522-015-0205-9.
24. Naik BR, Siva Kumar AVN, Ravi A, Bramhaiah KV, Chakravarthi VP. Effect of seasons on physiological and hematological values in Punganur cattle. *Int J Pharm Biosci.* 2013; 4 (4): 40–49. Available at: https://www.ijpbs.net/abstract.php?article=Mjc5MA==
25. Purwar V, Cherryl DM, Singh S, Kumar J, Khare A, Thorat G. Assessment of haematological parameters during different climatic seasons. *J Pharmacognos Phytochem.* 2019; 8 (1): 1741–1744. Available at: https://www.phytojournal.com/archives/2019.v8.i1.7010/assessment-of-haematological-parameters-during-different-climatic-seasons
26. Purwar V, Oberoi PS, Alhussien MN, Santoshi P, Diwakar, Kumar N. Effect of protected fat, yeast, niacin, zinc and chromium supplementation on the productive performance of heat-stressed Karan Fries heifers. *Ind J Dairy Sci.* 2018; 71 (3): 252–257.
27. Purwar V, Oberoi PS, Dang AK. Effect of feed supplement and additives on stress mitigation in Karan Fries heifers. *Vet World.* 2017; 10 (12): 1407–1412. DOI: 10.14202/vetworld.2017.1407-1412.
28. Ross JW, Hale BJ, Gabler NK, Rhoads RP, Keating AF, Baumgard LH. Physiological consequences of heat stress in pigs. *Anim Prod Sci.* 2015; 55 (12): 1381–1390. DOI: 10.1071/AN15267.
29. Sharan O. Semen quality of rams fed a liposomal vitamin-mineral supplement during the period of sexual rest. *Sci Mess LNUVMBT Ser Vet Sci*. 2023; 25 (111): 84–89. DOI: 10.32718/nvlvet11113. (in Ukrainian)
30. Sharan OM, Stefanyk VY. Hematological indicators and sperm quality of rams during the sexual rest period when fed a liposomal vitamin and mineral supplement. *Biol Tvarin.* 2022; 24 (4): 12–16. DOI: 10.15407/animbiol24.04.012. (in Ukrainian)
31. Shedeed HA. Evaluating the effect of adding vitamins E & C to the extender for Barki ram semen by cooling. *Int J Env Agric Biotechnol.* 2020; 5 (2): 356–365. DOI: 10.22161/ijeab.52.10.
32. Shibu CT, Singh SV, Upadhyay RC. Impact of temperature rise on pulmonary dynamics, heat dissipation and antioxidant status in KF heifers. *Ind J Anim Nutr.* 2008; 25 (1): 67.
33. Shostya AM, Sarnavska IV. Influence of vitamin feed additive on the quality of sperm production in boars. *Bull Poltava State Agr Acad.* 2022; 1: 134–141. DOI: 10.31210/visnyk2022.01.17. (in Ukrainian)
34. Singh KM, Singh S, Ganguly I, Ganguly A, Nachiappan RK, Chopra A, Narula HK. Evaluation of Indian sheep breeds of arid zone under heat stress condition. *Small Rum Res.* 2016; 141: 113–117. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.07.008.
35. Stančić B, Božić A, Stančić I, Dragin S, Radović I, Petrović M. Effect of season on native boar sperm quality parameters. The First International Symposium on Animal Science, Belgrade (Serbia), November 8–10 2012: 65–70.
36. Sui H, Wang S, Liu G, Meng F, Cao Z, Zhang Y. Effects of heat stress on motion characteristics and metabolomic profiles of boar spermatozoa. *Genes.* 2022; 13 (9): 1647. DOI: 10.3390/genes13091647.
37. The use of natural betaine in pig diets. *Organic Group LLC.* Available at: https://organic-group.com.ua/zastosuvannya-naturalnogo-betayinu-u-ratsionah-svynej (last access 01.02.2025) (in Ukrainian)
38. 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. (in Ukrainian)

Hematological parameters of boars fed with complex feed additives under heat stress conditions

I. T. Ivanytskyi, M. M. Sharan
ivanickijivan285@gmail.com

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

The aim of the work was to determine the effect of feeding complex feed additives on hematological indicators of boars under conditions of heat stress and normal temperature. The experiment was conducted on nine clinically healthy breeding boars aged 2–4 years of the Landrace, Piétrain and Maxter breeds. Two series of experiments lasting 90 days were conducted with the similar study of animals, material selection and analysis: under normal thermal conditions (<23°C) and under conditions of heat stress (25–30°C). In the first series (Experimental group 1), all boars were individually given a feed additive in the form of a liposomal emulsion, which contained vitamins A, D_3, E, and C with zinc gluconate in a dose of 2 ml, for 30 days. In the second series of experiments (Experimental group 2), all boars were individually given a feed additive in the form of a liposomal emulsion, which contained vitamins A, D_3, E, C, zinc gluconate and betaine in a dose of 20 ml, for 30 days. Heat stress was simulated by creating conditions of elevated temperature (25–30°C) and humidity (70–80%) 3 hours daily for 7 days by insulating the cages with polyethylene film. Temperature and humidity were monitored with a thermohygrometer with average values determined at each stage. At the end of each stage of the experiment, blood samples were taken from all experimental boars and hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, erythrocyte indices, platelet and leukocyte content) were determined. It has been found that under the influence of heat stress in boars, hematological indicators significantly (P<0.05–0.001) decrease: the content of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCHC with a slight decrease in the content of leukocytes and platelets compared to the period of normal temperature conditions. Feeding boars vitamins A, D3, E, and C with zinc gluconate under heat stress conditions caused a significant (P<0.05–0.01) increase in the content of erythrocytes, leukocytes, hemoglobin, hematocrit, erythrocyte indices MCV and MCH, compared to the control. Similarly, feeding boars with vitamins A, D3, E, C, zinc gluconate and betaine under heat stress conditions resulted in a significant (P<0.01) increase in the content of erythrocytes, leukocytes, hemoglobin and hematocrit with a simultaneous increase in the erythrocyte indices MCV, MCH (P<0.05) and MCHC. At the same time, feeding boars with both complex feed additives under normal temperature and humidity conditions caused a slight increase in all studied hematological parameters.

Key words: boar, heat stress, liposomal feed additive, hematological parameters

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.041
UDC 619.22.28:614.48:615.9:636.065
Received 03.01.2025 ▪ Revision 18.02.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

The activity of immunological indicators in chickens with the complex use of a symbiotic drug "Biomagn" and a disinfectant "Diolide"

O. Chechet[1], O. Vishchur[2,3], V. Kovalenko[1], B. Kurtyak[3], K. Smolyaninov[2], A. Voltornistyi[2]
smolianinow@ukr.net

[1]State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, 30 Donetska str., Kyiv, 03151, Ukraine
[2]Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine
[3]Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, 50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

ORCID:
O. Chechet https://orcid.org/0000-0001-5099-5577
O. Vishchur https://orcid.org/0000-0003-4503-3896
V. Kovalenko https://orcid.org/0000-0002-2416-5219
B. Kurtyak https://orcid.org/0000-0001-8401-5928
K. Smolyaninov https://orcid.org/0000-0002-9615-5191
A. Voltornistyi https://orcid.org/0009-0008-0889-9635

Authors' Contributions:
CO: Investigation.
VO: Conceptualization.
KV: Conceptualization; Writing — original draft.
KB: Investigation.
KS: Writing — original draft.
VA: Investigation.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
The research methodology was approved by the Bioethical commission in the Institute of Animal Biology (National Academy of Sciences of Ukraine), Protocol no. 166 from January 7, 2025.

Acknowledgements:
The research was carried out with the support of the State Service of Ukraine on Food Safety and Consumer Protection.

The research was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of Ukraine under project 110/4-pr-2023.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

The goal of the research was to determine the effect of the complex use of symbiotic and disinfectant on immunological indicators in broiler chickens. The research was carried out on ROSS-308 cross broiler chickens. Chickens 1–41 days old (2 groups of 100 chickens) were kept in standard production premises with free access to feed and water, observing the technological parameters of cultivation. The chickens of the research group, in addition to the standard diet, were fed the synbiotic "Biomagn" (0.5 kg/t compound feed) according to the scheme and throughout the experiment they drank the drug "Diolaid" with water (1 mg/l). Blood for immunological studies was collected on 10–27–34–41 days. The study was conducted without violating the guidelines of the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Complex application of the proposed synbiotic and disinfectant to chickens contributed to an increase in the level of immunological reactivity, as indicated by higher (P<0.05–0.01) bactericidal and lysozyme activity of blood serum and phagocytic activity of blood pseudoeosinophils of chickens compared to the control, an optimizing effect on the level of circulating immune complexes. So, the results of the research indicate the additive effect of the synbiotic drug "Biomagn" and the disinfectant "Diolide" on the functioning of the mechanisms of natural protection of broiler chickens during their growing period. This effect is due to the complex normalizing effect of the applied agents.

Key words: broiler chickens, symbiotic, chlorine dioxide, bactericidal, lysozyme and phagocytic activity

Introduction

Natural (or nonspecific) resistance of animal's organism and poultry is associated with immune system development and environmental factors: feeding, environmental, man-made. Deterioration of the ecological situation, increase in the number and influence forces of stress factors, including anthropogenic factors, have a negative influence on the health of poultry. All this contributes to the suppression of natural resistance, reduced immune potential and productive qualities of poultry, as a result of which the organism is unable to produce the required number of immunocompetent cells and antibodies to form a full immune response [16, 18, 22, 29].

Moreover, presence of critical physiological periods and uncontrolled use of antibiotics, sulfonamides preparations, coccidiostats and carrying out numerous vaccinations leads to antibiotic resistance, immunodeficiency and death of poultry [5, 12, 23, 25].

Aiming to normalize the intestinal microflora, increase the immune potential and viability of poultry in Ukraine and abroad began to use probiotics and prebiotics.

Microbial preparations from associations of non-pathogenic bacteria demonstrate a positive influence on productivity and natural resistance of the organism. Literature data analysis demonstrates number of advantages of probiotics and prebiotics using over existing the effect of applied vitamin and antibiotic preparations [11, 20, 21]. Combined preparations from probiotics and prebiotics are called synbiotics [4, 5, 13, 16].

Biomagn is synbiotic preparation consisting of a complex: magnesium chloride, chitosan, and probiotic bacteria cultures of the following species: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Enterococcus faecium* and dried products of fermentation of microorganisms *Lactococcus lactis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and other substances [7]. It shows antagonistic activity to different pathogenic bacteria and fungi.

Despite a long period of research and impressive results, the "probiotic concept" still remains hypothetical. And first of all because the mechanisms by which probiotic strains of bacteria exhibit their protective properties in vivo is not deeply studied. For today, the influence of probiotic preparations on the activity of protective systems of the poultry's organism has not been sufficiently studied. First of all, elucidation requires research of the influence of synbiotic preparations on the state of natural defense mechanisms in chickens in critical periods of their rearing [16, 23].

Currently the quality and safety of drinking water is especially relevant in the case of getting them from different water supply systems with high levels of chemical and biological pollution [1, 9, 10, 15]. The main reason for the low quality of drinking water from surface and groundwater sources in poultry farms is their unsatisfactory condition due to untimely replacement of filters, cleaning of pipelines and their rehabilitation. Scientists have accumulated extensive experience in the processing of water with chlorine dioxide at various stages of the technological process. Compared to chlorine, chlorine dioxide is characterized by lower doses and a higher rate of interaction with water components, such as 0.1–2.0 mg/L at a exposure of 30 min contact for complete disinfection. Dosages of 0.2–0.4 mg/L are effective bactericidal concentrations at which residual concentrations of chlorite are safe, prevent unpleasant odors and tastes in water [2, 9, 17, 24, 31].

At the post-disinfection stage, chlorine dioxide has a double action: bactericidal and virucidal effects as chlorine dioxide; bactericidal effects in chlorite ion form. As a bactericidal agent, chlorine dioxide can remain active in water for at least 48 hours, i.e. it has a prolonged action [3, 27].

That is why we performed study of the influence of "Biomagn" synbiotic preparation in combination with an aqueous solution of disinfectant "Diolide" on the indicators of cellular and humoral links of nonspecific resistance in broiler chickens during their rearing have high applied importance.

The purpose of the research was to determine the influence of the synbiotic preparation "Biomagn" in combination with an aqueous solution of the disinfectant "Diolide" on the activity of natural defense mechanisms in broiler chickens during the period of their rearing.

Materials and Methods

The research was performed in one of the farms of Lviv region on broiler chickens of ROSS-308 cross, 1-41 days after hatching. The study was conducted without violating the guidelines of the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Chickens were maintained in poultry houses with free access to feed-stuff and water, technological parameters of broiler breeding (temperature and light regime) under norms of ONTP-2005.

Two groups of broiler chickens were created for research: control and experimental groups, 100 heads in each. The control group of poultry received the standard compound feed-stuff (SCF) according to the existing norms recommended for ROSS-308 cross. The experimental chickens were similarly fed SCF and "Biomagn" synbiotic preparation at the rate of 0.5 kg per ton of combined feed. This preparation was used by such scheme: the first time at one day of age — seven days in a row, the next task — at 22 days of age, seven days in a row.

The preparation "Biomagn" represents probiotic bacteria mixture, involving the following species: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *Enterococcus faecium* and dried fermentation products of microorganisms: *Lactococcus lactis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, as well as chitosan, magnesium chloride, xylanase, cellulase, protease, milk thistle meal, acidity regulator, betaine and emulsifier.

Along with this, the experimental group of poultry was supplied by water a solution of the preparation "Diolide" [7] where the main active substances: sodium chlorite and sodium chloride. For disinfection of drinking water, the preparation "Diolide" was used at a dose of 1.0 mg/L of chlorine dioxide. Diolide was added through the mediators. Pre-mother liquor is diluted to a concentration that allows it to be presented by the medicator in accordance with its technical characteristics. This preparation was developed in the State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Expertise.

To carry out the immunological testing was performed on chicken of different ages: 10-; 27-; 34- and 41-days after hatching.

Phagocytosis was determined in heparin-stabilized blood. The phagocytic reaction of pseudoeosinophils in the blood was evaluated using a daily culture of *Escherichia coli* strain VKM-125 by phagocytic activity (FA), phagocytic index (FI) and phagocytic number (PN) by the method described in the reference book [2].The content of circulating immune complexes (CIC) — by their precipitation with polyethylene glycol, lysozyme activity (LASK)

using *Micrococcus lysodeicticus* strain VKM-109, bactericidal activity (BASK) with the use of daily culture of *E. coli* strain VKM-125 were determined in the blood serum, according to these methods, which are described in the reference book [2].

Also, quality and safety of drinking water was tested by microbiological indicators. Samples of drinking water before and after disinfection of the water supply system were taken for the research. The study was carried out using microbiological research methods according to the orders and methodological recommendations of the Ministry of Health of Ukraine [32]. From 2 different dilutions of the test sample in the amount of 1 ml was made in 2 bacteriological cups and poured 15 ml of molten and cooled to 45°C MPA, the samples were cultured at temperature 37°C. The total number of microorganisms in 1 ml was determined by the method of colonies counting that grew from each dilution, multiplied the number of colonies by the degree of dilution and summed their number [26].

The experimental study was carried out under recommendations of "General Ethical Principles of Animal Experiments", approved by the National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001) and agreed with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 1985).

Digital data were processed by biometric method of variational nonparametric analysis using *Microsoft Excel* spreadsheet package *Microsoft Office Professional XP* and *Origin 6.1* program. The differences between values were considered statistically significant: P<0.05; P<0.01 and P<0.001.

The free software *Jamovi 2.3.28* (jamovi.org) was used for statistical processing. The Shapiro-Wilk test was applied to check the normality of the distribution, and the Levene's test was used to assess the equality of variances. In the case of normal distribution and equal variances, the Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences between groups.

Results and Discussion

The key principle of evaluation the immune status of poultry involves the quantitative characterization of the functional activity of non-specific resistance factors.

Analysed the data in the compared groups met the criteria of normality of distribution (according to Shapiro-Wilk algorithm) and homogeneity of variances (according to Levene's test). The probability of difference was estimated by Student's *t*-test. As we can observe from the data in table 1, the tested indicators of the humoral link of nonspecific resistance in broilers of the control group are increased. At the same time, these changes were more pronounced in chickens when studying the content of circulating immune complexes. Thus, in 34 days chicken the content of the CIC was one and a half times higher than in 10 days. These data indicate an increase in the antigenic load on the organism of chickens during this period, which may be due to a number of negative factors.

The "Biomagn" synbiotic preparation in combination with an aqueous solution of "Diolide" preparation caused an activating influence on the mechanisms of non-specific protection of the organism of broilers. It is known that the state of natural resistance of the organism fully characterizes the bactericidal activity of blood serum, which is an integral indicator of the humoral link of nonspecific resistance of the organism and is the ability to inhibit the growth of microorganisms. From the data shown in table 1 we see that the use of the studied preparations caused an increase in BASK in chickens of the experimental group compared with the control, especially at 16 days of age, where the differences were significant. Here with the lysozyme activity of serum in experimental group at 27th; 34th and 41th days after hatching was respectively 5.6 (P<0.01); 5.0 (P<0.05) and 6.6% (P<0.05) is higher in comparison with control group. These data indicate the activating effect of the tested preparations on humoral resistance markers in poultry.

Instead, the action of "Biomagn" in combination with "Diolide" solution in working concentration revealed a decrease in the level of circulating immune complexes in the serum of broiler chickens of the experimental group relative to the control (table 1). In particular, on the 10th and 27th day the content of CIC in the blood of broilers of the experimental group tended to increase, and at 34th and 41th days of age was 1.3 (P<0.001) and 1.27 times, respectively (P<0.01) is smaller than in the control group. Thus, the results of these investigations indicate the optimizing influence of the studied preparations on the level of circulating immune complexes in the serum of broiler chickens. It is known that significant and long-term circulation of CIC content in the organism can lead to organ pathology.

Phagocytes are the main active components of the cellular component of natural defense, starting from the embryonic period of development. They form the first line of defense of the cellular component of the organism's natural or nonspecific resistance. From the data shown in table 2 we can see, that synbiotic preparation application in combination with the disinfectant "Diolide" significantly affected the state of the cell unit of nonspecific resistance in broilers. In particular, phagocytic activity, which characterizes the level of pseudoeosinophils in peripheral blood at 27th; 34th and 41th days after hatching was higher (P<0.01–0.001) than in control group of chicken.

Also, the direct coordination was found between phagocytic activity and phagocytic number, and especially the phagocytic index in the blood of experimental group of broilers. In all periods of the investigation, the phagocytic index in experimental group was higher (P<0.05–0.001) than in the control group. It indicates the stimulating influence of the components of the investigated preparation on the activity of the cellular link of the natural defense mechanisms of the poultry.

Table 1. Nonspecific resistance humoral factors in broiler chicken under the action of the studied preparations (M±m; n=7)

Indicators	Groups	Research period (age of poultry), day			
		10th	27th	34th	41th
BASK, %	C	38.04±0.56	39.61±0.30	39.22±0.42	40.01±0.56
	E	40.87±0.52**	41.29±0.56	41.48±1.27	42.17±1.25
LASK, %	C	17.4±2.27	19.2±0.66	22.6±0.75	21.29±1.57
	E	20.29±1.32	24.8±1.16**	27.57±1.45*	27.8±1.77*
CIC, mmol/l	C	38.0±2.86	42.2±2.96	55.2±2.83	54.8±2.15
	E	43.14±2.56	45.14±2.16	42.4±1.13***	43.0±1.38**

Note. Here and further * — P<0.05, ** — P<0.01, *** — P<0.001 compared to the control group of chicken using Student's *t*-test.

Table 2. Phagocytosis and pseudoeosinophils' level markers in broiler chicken peripheral blood under the action of the tested preparations (M±m; n=7)

Indicators	Groups	Research periods, day			
		10th	27th	34th	41th
Phagocytic activity, %	C	31.6±0.81	32.0±0.83	33.4±0,51	33.80±0.37
	E	35.0±0.58	36.2±0.58**	37.5±0.50***	38.0±0.31***
Phagocytic index, un.	C	4.55±0.08	4.69±0.10	4.67±0.12	4.89±0.04
	E	5.14±0.04***	5.26±0.05**	5.33±0.03***	5.76±0.27*
Phagocytic number, un.	C	14.45±0.50	14.69±0.49	13.99±0.21	14.47±0.20
	E	14.62±0.26	14.55±0.26	14.19±0.21	15.15±0.62

Table 3. "Diolide" effect for the water supply system treatment

Concentration of working solution (for chlorine dioxide):		Consumption of mother liquor (ml) Diolide for the production of working solution in the amount of: 100 liters	Before disinfection number CFU/cm³	After disinfection number CFU/cm³ (norm <20 CFU/cm³)
mg/L	Percentage of the preparation %			
1.0	0.0004	20.0	56	0

Other results of this experiment demonstrated presence of mesophilic, aerobic and facultative anaerobic microorganisms in the amount of 56 CFU/cm³ (at less than 20 CFU/cm³), does not correspond to sanitary and hygienic norms and rules (table 3) in the drinking water for poultry.

The use of disinfectant "Diolide" allowed to normalize bacteriological parameters of water.

These data, on the one hand, indicate the possible contamination of tested water with opportunistic pathogens for use from decentralized water supply. On the other hand – the effectiveness of tested disinfectant to normalize the bacterial microflora of water was demonstrated. It should be noted that opportunistic pathogens in large quantities can cause disease in humans, animals and poultry.

This is also indicated by the results obtained by [26] and [32], who noted that opportunistic pathogens in large scales in decentralized water supply can be a reason of disease cases in humans, and animals (including poultry). However, [24] and other scientists recommend chlorine dioxide use for the improvement of disinfectant effectiveness, which has also been confirmed by other scientists. After disinfection of the water supply system in the samples of the investigated water, no growth of bacterial microflora was detected, which corresponds to DSTU 7525:2014 "Requirements and methods of quality control of drinking water". These data are also consistent with the results of research [6] conducted on laboratory animals, which indicates the safety of chlorine dioxide in the water supply system. The influence of chlorine dioxide on water quality is also noted by scientists [27]. At the same time, they pay attention to filters for water purification, because without control over the use of disinfectants, they can serve as a source of microorganisms, which is also consistent with our previous work [9, 17, 26].

Thus, the results of the research indicate a positive influence of the synbiotic "Biomagn" together with an aqueous solution of the preparation "Diolide" on the activity of natural defense mechanisms in broiler chickens during the period of their rearing. This influence is due to the complex additive action of factors containing the studied preparations. In particular, the active basis of the preparation "Biomagn" is a multicomponent symbiosis of probiotic strains, designed taking into account the synergistic complement of the unique properties of each of them, namely: antagonistic activity against a wide range of pathogenic and opportunistic microorganisms [11]. Thus, as noted [30], representatives of the genus *Bacillus*, containing the investigated preparation, having a clear antagonism against pathogenic microorganisms, produce a number of enzymes: xylanase, protease, cellulose which improve cleavage in the gastrointestinal tract (GIT) of arabinoxylans (pentosans) and starch into oligosaccharides and partially

into mono- and trisaccharides, and reduce the viscosity of food in the digestive tract [28, 30]. In this case, the investigated symbiotic preparation contains the products of metabolism of the above miroorganisms, and especially the genus *Bacillus*, providing the synthesis of various amino acids and antibiotics [14, 19].

At the same time, the synbiotic preparation contains the products of metabolism of the above microorganisms — enzymes: xylanase, protease, cellulase, which improve the breakdown in the gastrointestinal tract (GIT) of arabinoxylans (pentosans) and starch into oligosaccharides and partly on mono-, di- and trisaccharides, and reduce the viscosity of food in the digestive tract. Proteases (alkaline and acidic) improve the absorption of the protein they break down into peptides. It should be noted that the yeast cell wall contained in the preparation contains mannanol oligosaccharides (MOS), which are bound to bacterial receptors by mannose residues they are not destroyed by digestive enzymes and are firmly held on the surface of pathogenic bacteria. Pathogenic bacteria with blocked receptors cannot attach to the surface of epithelial cells and pass through the gastrointestinal tract. At the same time, MOS exhibits prebiotic properties and strengthens the non-specific protection of animals and poultry, improves their intestinal microflora which is confirmed in the works of many authors [11, 23, 28].

The multidirectional influence of probiotic preparations from aerobic bacilli may be due to bacterial translocation. This phenomenon, which was discovered only at the end of the last century, is the penetration of viable bacteria from the gastrointestinal tract through the blood into the internal organs. Translocation of representatives of the normal microflora and bacterial components of probiotics is a natural defense mechanism, one of the important factors in the activation of nonspecific resistance of the microorganism [13].

The preparation "Biomagn" has pronounced sorption properties due to the high content of aluminosilicates, which allows you to effectively sorb mycotoxins or other toxins from food. Another component of the preparation, milk thistle flour, which contains the active substance — silymarin, which has hepatoprotective and antioxidant properties. Along with this there is a stimulation of mucin synthesis and strengthening of the intestinal mucosal protective barrier and supply microbiota stability in the intestinal tract.

The tested synbiotic preparation contains magnesium chloride. As noted by [28], magnesium ions are known to simultaneously activate natural resistance in chicken by participating in process of immune response as a cofactor in Ig synthesis, antibody-dependent cytolysis, lymphocyte binding to Ig M, macrophage responses to lymphokines. Magnesium is involved in the formation of adhesion molecules, in the interaction of phagocytes and the object of phagocytosis, is part of the properdin system. In the presence of Mg^{2+} ions, a C3b complex with factor B is formed. C3b triggers an alternative pathway for complement activation. Magnesium is also involved in the classical pathway of complement activation, in the formation of the C4b2a complex, which has converting activity against C3 [8, 32].

In general, the mechanism "Biomagn" influence is based due to the complex action of both probiotic microorganisms and products of their synthesis and other substances. The latter are known to be powerful regulators of immune and antioxidant function of the organism, and due to the disinfectant "Diolide" is the neutralization of microorganisms in the water supply system, which allows to get quality and safe water. This complex additive action of the investigated factors provides optimal microbocinosis and acid-base balance, protects the intestinal mucosa, improves digestion of nutrients, enhances immune potential, and in particular natural defense mechanisms, which generally has a positive influence on the growth and viability of broilers.

Thus, we can note the positive effect of "Biomagn" synbiotic preparation together with the aqueous solution of the disinfectant "Diolide" on the activity of natural protective factors in broiler chickens during their growing period. This is evidenced by the higher lysozyme activity of blood serum and phagocytic activity of pseudoeosinophils in chickens of the experimental group compared to the control at 27th; 34th and 44th days after hatching ($P<0.05–0.001$). In all periods of research, the phagocytic index in experimental group was higher than in the control chicken ($P<0.05–0.001$).

Under the action of the investigated preparations in the blood serum of broiler chickens at 16 days after hatching recorded higher bactericidal activity of blood serum ($P<0.01$), while at 34th and 44th days after hatching revealed a lower content of circulating immune complexes ($P<0.01–0.001$), which indicates the activating influence of the investigated preparations on the activity of the humoral link of nonspecific resistance and reducing the antigenic load on the organism.

References

1. Adeola AO, Paramo L, Fuoco G, Naccache R. Emerging hazardous chemicals and biological pollutants in Canadian aquatic systems and remediation approaches: A comprehensive status report. *Sci Total Environ.* 2024; 954: 176267. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.176267.
2. Barratt MD, Rodford RA. The computational prediction of toxicity. *Curr Opin Chem Biol.* 2001; 5 (4): 383–388. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00218-0.
3. Brandariz-Núñez D, Balado-Alonso AM, De La Cámara-Gómez M, Fandiño-Orgueira JM, Martín-Herranz MI. Toxicity induce by chlorine. *Farm Hospital*. 2022; 46 (5): 308–310. DOI: 10.7399/fh.13221.
4. Bringer MA, Gabrielle PH, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Acar N. The gut microbiota in retinal diseases. *Exp Eye Res*. 2022; 214: 108867. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108867.
5. Cash BD. Emerging role of probiotics and antimicrobials in the management of irritable bowel syndrome. *Curr Med Res Opin.* 2014; 30 (7): 1405–1415. DOI: 10.1185/03007995.2014.908278.

6. Catlin NR, Willson CJ, Creasy DM, Rao DB, Kissling GE, McIntyre BS, Wyde M. Differentiating between testicular toxicity and sexual immaturity in ortho-phthalaldehyde inhalation toxicity studies in rats and mice. *Toxicol Pathol.* 2018; 46 (7): 753–763. DOI: 10.1177/0192623318801790.
7. Chechet OM, Kovalenko VL. *Immunomodulatory probiotic Biomagn*. Technical Conditions TC U 24.2-00699690–003. 2022: 18 p.
8. Coty JB, Oliveira EE, Vauthier C. Tuning complement activation- and pathway through controlled molecular architecture of dextran chains in nanoparticle corona. *Intern J Pharmac.* 2017; 532 (2): 769–778. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.048.
9. Du Y, Lv XT, Wu QY, Zhang DY, Zhou YT, Peng L, Hu HY. Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review. *J Env Sci.* 2017; 58: 51–63. DOI: 10.1016/j.jes.2017.01.013.
10. El-Shehawy R, Gorokhova E, Fernández-Piñas F, del Campo FF. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Res.* 2012; 46 (5): 1420–1429. DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.021.
11. Guarner F, Sanders ME, Szajewska H, Cohen H, Eliakim R, Herrera-deGuise C, Karakan T, Merenstein D, Piscoya A, Ramakrishna B, Salminen S, Melberg J. World gastroenterology organisation global guidelines: Probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol.* 2024; 58 (6): 533–553. DOI: 10.1097/MCG.0000000000002002.
12. Ho CS, Wong CTH, Aung TT, Lakshminarayanan R, Mehta JS, Rauz S, McNally A, Kintses B, Peacock SJ, Fuente-Nunez C, Hancock REW, Ting DSJ. Antimicrobial resistance: a concise update. *Lancet Microb*. 2025; 6 (1): 100947. DOI: 10.1016/j.lanmic.2024.07.010.
13. Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat Rev. Immunol.* 2012; 12 (10): 728–734. DOI: 10.1038/nri3312.
14. Koenen ME, Kramer J, van der Hulst R, Heres L, Jeurissen SHM, Boersma WJA. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *British Poult Sci.* 2004; 45 (3): 355–366. DOI DOI: 10.1080/00071660410001730851.
15. Kovalenko VL, Ponomarenko GV, Kukhtyn MD, Paliy AP, Bodnar OO, Rebenko HI, Kozytska TG, Makarevich TV, Ponomarenko OV, Palii AP. Evaluation of acute toxicity of the «Orgasept» disinfectant. *Ukr J Ecol.* 2020; 10 (4): 273–278. DOI: 10.15421/2020_1982.
16. Kucheruk MD, Zasekin DA. The influence of prophylactic biopreparations on preservation and microbiocenosis of chickens. *Sci Mess LNUVMBT Ser Vet Sci.* 2019; 21 (94): 44–50. DOI: 10.32718/nvlvet9408.
17. Ma JW, Huang BS, Hsu CW, Peng CW, Cheng ML, Kao JY, Way TD, Yin HC, Wang SS. Efficacy and safety evaluation of a chlorine dioxide solution. *Intern J Environ Res Publ Health*. 2017; 14 (3): 329. DOI: 10.3390/ijerph14030329.
18. Orishchuk OS, Tsap SV. Scientific and practical basis for the use of probiotics to improve the quality of poultry products. *Theor Appl Vet Med*. 2020; 8 (4): 241–245. DOI: 10.32819/2020.84034.
19. Placha I, Pogany Simonova M, Cobanova K, Laukova A, Faix S. Effect of *Enterococcus faecium* AL41 and *Thymus vulgaris* essential oil on small intestine integrity and antioxidative status of laying hens. *Res Vet Sci*. 2010; 89 (2): 257–261. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.03.006.
20. Prokopenko OO, Smolyaninov KB, Vishchur OI, Mudrak DI, Broda NA, Masyuk MB, Smolyaninova OO, Voltornisty AV. The effect of drugs "Enteronormin" and "Zeleris" on the antioxidant potential of young calves. *Biol Tvarin*. 2024; 26 (4): 55–59. DOI: 10.15407/animbiol26.04.055.
21. Prokopenko O, Vishchur O, Romanovych M, Levkivska N, Sobko G. The influence of the synbiotic preparation, Iodine and Selenium, on the state of natural and adaptive protec-tion of calves. *Abstracts of reports of the Conference "Modern Methods of Diagnosis, Treatment and Prevention in Veterinary Medicine"*, Lviv, 2021: 124–125. (in Ukrainian)
22. Razanova O, Yaremchuk O, Gutyj B, Farionik T, Novgorodska N. Dynamics of some mineral elements content in the muscle, bone and liver of quails under the apimin influence. *Sci Horizons*. 2022; 25 (5): 22–29. DOI: 10.48077/scihor.25(5).2022.22-29.
23. Romanovych MM. The dynamics of humoral protection factors in broilers under the conditions of probiotic preparations application. *Sci Mess LNUVMBT Ser Vet Sci*. 2018; 20 (83): 264–267. DOI: 10.15421/nvlvet8352.
24. Sanekata T, Fukuda T, Miura T, Morino H, Lee C, Maeda K, Araki K, Otake T, Kawahata T, Shibata T. Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Sci*. 2010; 15 (2): 45–49. DOI DOI: 10.4265/bio.15.45.
25. Slivinska LG, Yaremchuk VY, Shcherbatyy AR, Gutyj BV, Zinko HO. Efficacy of hepatoprotectors in prophylaxis of hepatosis of laying hens. *Reg Mech Biosys.* 2022; 13 (3): 287–293. DOI DOI: 10.15421/022237.
26. Sokoliuk VM, Zasiekin DA. Sanitary and hygienic evaluation of the water on the example of one of the farms of NULES of Ukraine. *Vet Biotechnol*. 2016; 28: 265–271. Available at: https://vetbiotech.kiev.ua/en/archives/35-28/466-sokoluk-v-m (in Ukrainian)
27. Sorlini S, Gialdini F, Biasibetti M, Collivignarelli C. Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Res.* 2014; 54: 44–52. DOI: 10.1016/j.watres.2014.01.038.
28. Tam M, Gómez S, González-Gross M, Marcos A. Possible roles of magnesium on the immune system. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57 (10): 1193–1197. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601689.
29. Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, Rescigno M. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarised *ex-vivo* organ culture model. *Gut.* 2012; 61 (7): 1007–1015. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300971.
30. Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. *Bacillus clausii* probiotic strains: Antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*. 2004; 38 (6): 86–90. DOI; 10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69.
31. Yu CH, Huang TC, Chung CC, Huang HH, Chen HH. Application of highly purified electrolyzed chlorine dioxide for tilapia fillet disinfection. *Sci World J*. 2014: 619038. DOI: 10.1155/2014/619038.
32. Zakharenko MO, Polyovyi LV, Poliakovskyi VM, Shevchenko LV, Yaremchuk OS. *Sanitary and Hygienic Requirements for Water and Water Supply of Agricultural Enterprises*. A tutorial. Vinnytsia, VNAU Publ., 2011. (in Ukrainian)

Активність природних механізмів захисту в курчат-бройлерів за дії синбіотичного препарату «Біомагн» та дезінфекційного засобу «Діолайд»

О. М. Чечет[1], О. І. Віщур[2,3], В. Л. Коваленко[1], Б. М. Куртяк[3], К. Б. Смолянінов[2], А. В. Волторністий[2]
smolianinow@ukr.net

[1]Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики
та ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна
[2] Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна
[3] Львівський національний університет ветеринарної медицини і біотехнологій ім. С. З. Ґжицького,
вул. Пекарська, 50 м. Львів, 79010, Україна

Підвищення збереження курчат та забезпечення високої інтенсивності їх росту на всіх стадіях вирощування є однією з найбільш актуальних проблем птахівництва. У зв’язку з цим, надзвичайно важливими є розробка і впровадження у виробництво різних засобів для підвищення імунобіологічної реактивності та життєздатності птиці. Значні перспективи у цьому напрямку відкриваються за використання пре- і пробіотиків та безпечних дезінфекційних засобів. З огляду на це, актуальним є дослідження комплексної дії синбіотика та дезінфектанта на функціонування природних механізмів захисту курчат-бройлерів упродовж періоду їх вирощування. Дослідження проводили в одному із господарств Львівської області на курчатах-бройлерах кросу РОСС-308, починаючи з 1- до 41-добового віку. Курчат утримували у пташниках з вільним доступом до корму і води, за технологічних параметрів вирощування бройлерів (температурний та світловий режим) відповідно до норм ОНТП-2005. Для досліджень сформували 2 групи курчат-бройлерів — контрольну і дослідну групи, по 100 голів у кожній. Бройлерам контрольної групи згодовували стандартний комбікорм (СК) згідно з чинними нормами, рекомендованими для кросу РОСС-308. Курчатам дослідної групи аналогічно згодовували СК і синбіотичний препарат «Біомагн» із розрахунку 0,5 кг на тонну комбікорму. Вказаний препарат застосовували за схемою: перший раз в однодобовому віці — сім днів поспіль, наступне задавання — у 22-добовому віці, сім днів поспіль. Препарат «Біомагн» — це суміш пробіотичних бактерій *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *Enterococcus faecium* та висушених продуктів ферментації мікроорганізмів *Lactococcus lactis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, магнію хлориду, хітозану й інших речовин та емульгатора. Водночас бройлерам дослідної групи впродовж всього експерименту з водою випоювали розчин препарату «Діолайд», де основні діючі речовини — натрію хлорит, натрію хлорид, дозою 1,0 мг/л за двоокисом хлору. Для проведення імунологічних досліджень у курчат брали кров у різні вікові періоди: у 10-, 27-, 34- і 41-добовому віці. Застосування курчатам синбіотичного препарату «Біомагн», а також дезінфекційного засобу «Діолайд» позитивно впливало на досліджувані показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму. Про це свідчать вища ($P<0,05–0,01$) бактерицидна і лізоцимна активність сироватки крові та фагоцитарна активність псевдоеозинофілів крові у курчат дослідної групи щодо контрольної. При цьому констатовано оптимізувальний вплив досліджуваних препаратів на рівень циркулюючих імунних комплексів. Результати проведених досліджень свідчать про адитивний вплив синбіотичного препарату «Біомагн» і дезінфекційного засобу «Діолайд» на функціонування механізмів природного захисту курчат-бройлерів упродовж періоду їх вирощування. Цей вплив зумовлений комплексною нормалізуючою дією досліджуваних чинників, що містить синбіотичний препарат і дезінфекційний засіб.

Ключові слова: курчата-бройлери, про- і пребіотики, діоксид хлору, псевдоеозинофіли крові, неспецифічна резистентність

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.048
UDC 612.11:615.37:636.4
Received 10.07.2024 ▪ Revision 17.01.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Feed additive "Activo" influence on several antioxidant defense system parameters of sows and their progeny

T. Y. Prudyus
tarasvet126@gmail.com

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

ORCID:
T. Y. Prudyus https://orcid.org/0000-0003-3594-7539

Authors' Contributions:
PTY: Conceptualization; Methodology; Investigation; Data curation; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing — original draft, review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
The research methodology was approved by the Bioethical commission in the Institute of Animal Biology (National Academy of Sciences of Ukraine), Protocol no. 167 from January 7, 2025.

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Intensive farming technologies are developed primarily to maximise economic benefits. At the same time, productive animals are often exposed to many stress factors and excessive physiological stress, which subsequently leads to a deterioration in animal welfare, health and, ultimately, a decrease in productive performance. Oxidative stress is one of the most common negative processes that occur in the animal body in the result of various factors, namely, a violation of the pro- and antioxidant balance. This does not occur on its own, but is mainly an accompanying process under the influence of various nature stress factors, such as toxins, temperatures, critical physiological periods, infectious pathologies, excessive, unbalanced or insufficient feeding, etc. This article elucidates the results of the feed additive "Activo" effect studies, that contains secondary plant components of oregano and chilli pepper essential oils on the quantitative content of lipid peroxidation products and the activity of antioxidant defence systems in sows and piglets obtained from them. The study was carried out in the conditions of the industrial complex *Barkom LLC*, Lviv region. Based on the principle of analogues, two groups of Large White breed gestating sows were formed, 10 animals per group — control and experimental. For the experimental group, the feed additive "Activo" was additionally introduced into the diet in the amount of 0.1 kg/t of finished feed. The content of lipid hydroperoxides and TBA-active products, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity were determined in the blood of sows and their progeny. The results of our studies showed that the use of the feed additive "Activo" for sows and piglets obtained from them is helpful to reduce the negative effects of oxidative stress, which has a negative effect on both sows and their offspring.

Key words: sows, piglets, feed additive "Activo", essential oils, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, TBA-active products, lipid hydroperoxides

Introduction

Modern livestock farming technologies, and pig farming in particular, are primarily aimed at producing the maximum amount of product in the shortest possible time. Such approaches are primarily driven by economic efficiency, which is the goal of the vast majority of producers. At the same time, they often do not take into account the very high physiological stresses, sometimes on the verge of pathological disorders, that animals experience

during their industrial rearing and maintenance. An animal organism has biological limits to its growth, development, reproduction, etc. and healthy viability in general. In recent years, in addition to the emergence and spread of new diseases of various etiologies, including infectious diseases (both viral and bacterial), pigs and piglets often suffer from various physiological disorders caused by overly intensive housing and feeding technologies. It is also worth noting changes in the genetic potential of pigs, such as high fertility, multiple births, reduced fattening time, composition and properties of feed, premixes, veterinary preparations, vaccines, etc. All of this leads to excessive stress factors in pigs, which in turn often leads to a decrease in their immunity and negatively affects the health and welfare of animals, ultimately reducing the quality and quantity of their productivity.

Stressful factors in the animal bodies often result in an increase in the so-called reactive oxygen species (ROS) and free radicals formation, and a decrease in the antioxidant defence of the body [1]. There are many types of ROS, including singlet oxygen, hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen radicals — superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroperoxide ($HO_2^{\cdot}$) and hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), which are formed in the process of reducing molecular oxygen. Oxidative stress and ROS are often interrelated with a wide range of pathological processes in the body.

Many studies have shown that the periods of sow gestation, piglet birth, lactation, and weaning are characterised by increased oxidative stress parameters [2], which subsequently negatively affects milk synthesis, reproductive functions, and shortens the period of productive use of sows [5]. In addition, numerous studies have established the fact that excessive ROS production can eventually lead to insulin resistance [11], which has a negative impact during the prenatal and lactation periods of sows, which significantly reduces animal feed intake [10, 15].

Piglets are exposed to stress during and after birth, which also increases the amount of ROS in the body. Newborn piglets often have a reduced level of passive immunity obtained with sow colostrum, which, in combination with underdeveloped active immunity, can have negative consequences for their health and survival.

In order to reduce negative stress effects, mitigate them and normalise animal homeostasis, scientists from many countries are actively working to find and develop new highly effective and at the same time safe and affordable stress-protective agents, including antioxidants. In recent years, various components of biological, microbiological and plant origin have been increasingly used for this purpose. Preparations and feed additives based on such substances should have as little toxicity and side effects as possible, unlike many artificially synthesised factors.

In this regard, the use of several plant essential oils (PEs) is promising. Essential oils are a large class of secondary plant metabolites that often have high antioxidant capacity. All (EOs) are structurally characterised by aromatic rings with several hydrogen hydroxyl groups, which makes EOs suitable for neutralising free radicals and other reactive oxygen species. In the last decade, more and more attention has been paid to EOs as functional components of feed additives for sows and piglets. In particular, a number of studies have shown that EOs can have an anti-inflammatory effect and reduce oxidative stress in sows, increase their reproductive capacity and promote the growth and development of their progeny [3].

The aim of the study was to investigate the effect of the feed additive "Activo", which contains secondary plant components of oregano and chilli pepper essential oils, on the lipid peroxidation products quantitative content and the activity of antioxidant defence systems in sows and piglets obtained from them.

Materials and Methods

The study was conducted in the conditions of the industrial complex of *Barkom LLC*, Lviv region (Ukraine). Two groups of the Large White breed gestating sows were formed according to the principle of analogues, 10 animals per group — control and experimental. The animals were kept in the same box in individual farrowing pens under the same conditions. The control and experimental groups of animals were fed a feed balanced in terms of biologically active substances. For the experimental group, the feed additive "Activo" was additionally introduced into the diet in the amount of 0.1 kg/t of finished feed. The experiment started on the 85th day of gestation or 30 days before the expected farrowing. Blood samples were taken from the jugular vein of pregnant sows before the experiment. The sows were transferred to the maternity ward, 5 days before the planned farrowing, where they were fed lactating sow feed, and the animals in the experimental group continued to receive the specified feed additive. Lactating sows were fed in individual troughs four times a day in the amount of 7 kg. Blood samples were taken from the jugular vein for research three days before the expected farrowing, as well as on the 21st day of lactation. Piglets obtained from sows of the control and experimental groups automatically became piglets of the control and experimental groups. The piglets were fed pre-starter feed starting from the fifth day of life. The piglets of the experimental group were administered the specified feed additive in the amount of 0.2 kg/t of finished feed in the pre-start feed. The finished feed was fed from day 5 after birth until weaning. Blood samples for biochemical studies were taken from the cranial *vena cava* of newborn suckling piglets at 5th, 14th and 28th days of age.

In the blood of sows and piglets we determined the parameters: the lipid hydroperoxides and TBA-active products content, the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase, by the methods described [11, 14]. Namely, the lipid hydroperoxides

content in blood plasma was determined by a method based on the optical density spectrophotometric measurement of reaction products with ammonium thiocyanate, Mohr's salt and hydrochloric acid. The concentration of TBA-active products, which characterises the lipid peroxidation rate, was determined by a method based on the reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA), which at high temperature and acidic environment proceeds with the formation of a coloured trimethyl complex containing one MDA molecule and two TBA molecules. Glutathione peroxidase activity was determined by a method based on a comparative study of the degree of reduced glutathione oxidation (GSH) by tertiary butyl peroxide. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by the method based on the reduction of nitroblue tetrazolium to nitroformazone by superoxide anion radicals formed in the reaction between phenazine methanesulfate and the reduced form of NADPH.

The results were processed by standard methods of mathematical statistics using *Microsoft Excel* software. Statistical significance was determined by the Student's test.

The study is fully complied with the ethical requirements for the use of animals in experimental research (Strasbourg, 1986; Kyiv, 2002), and the study methodology is approved by the Bioethics Committee of the Institute of Animal Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Results and Discussion

Sows are exposed to various stressors, including pregnancy, lactation, weaning, estrus and insemination throughout their productive lives. One of the most stressful periods is the farrowing period, during which sows undergo significant physiological changes associated with zygote formation, embryo growth, and subsequently farrowing and lactation. The most significant oxidative stress occurs during pregnancy, as the placenta is the site of active oxygen metabolism [16]. Scientists have proved that oxidative stress and lipid peroxidation are stronger and more intense in pregnant animals compared to non-pregnant animals [6]. Excessive formation of reactive nitrogen species and reactive oxygen species disrupts the normal physiological function of the mammalian placenta and affects most other physiological processes [16].

According to the results of our studies with the use of the feed additive "Activo" in gestating and lactating sows, the lipid peroxide products (LPP) and TBA-active products content in their blood compared to the control was significantly lower in the experimental group animals (table 1). Starting from the first blood sampling period and the beginning of the experimental feed additive introduce, it can be seen that with the systematic consumption of mixed fodder in the blood of the experimental group sows, the indicators of TBA-active products significantly decreased. TBA-active products indicators in the control group slightly decreased at the beginning of the 85th day of farrowing, but increased on the 112th day and decreased on the 21st day of lactation. The increase of parameters on day 112 of gestation can be explained by a abrupt increase in fetal development. But, as can be seen from the results obtained in the experimental group, the indicators of oxidative processes were systematically statistically significantly reduced: on the 85th, 112th day of pregnancy, and 21st day of lactation by 16.78% ($P<0.05$), 22.65% ($P<0.001$), 24.89% ($P<0.001$) compared to the control group, respectively.

Thus, analysing the feed additive "Activo" use, which contains components from oregano, chilli, cinnamon and rosemary, in particular, such as carvacrol, thymol, we see that these components have a great potential to enhance antioxidant protection and the ability to reduce oxidative stress in sows. Analysing similar works by other authors, we can say that this, in turn, has a positive effect on the embryonic and post-embryonic development of piglets [4, 8], development and function of the gastrointestinal tract [9], body formation [4] and acid-base balance [14], etc. A number of studies also show that the addition of oregano, chilli, carvacrol, and thymol to sow feed has an effect on the antioxidant function of suckling piglets [3].

An interesting natural tendency in the presence of lipid peroxidation products — hydroperoxides (HPO) and TBA-active products, was noted in the study of young piglets blood. According to the estimation of total lipid peroxidation (LPP), we see a tendency to their gradual decrease (table 2).

In particular, it was admitted that piglets of the experimental group had significantly lower level of TBA-active products on the 14th day of life of 6.28% ($P<0.01$) compared to the control group. Regarding the content of lipid hydroperoxides, in piglets of the experimental group, statistically lower values were found on the 5th and 14th day of life 26.42% ($P<0.05$), 19.23% ($P<0.01$), respectively, compared to the control group. Since piglets born from sows of the experimental group consumed only colostrum and milk from birth to 5 days of life and showed lower HPL and TBARS, this may indicate the transfer of active components of essential oils to piglets through colostrum. We can also see that piglets' consumption of sows milk in the experimental group and starter feed containing oregano, chilli, carvacrol, thymol led to an even lower reduction in LPPs. The obtained results indicate the inhibitory effect of the studied feed additive on the intensity of the lipid peroxidation processes.

According to the results of glutathione peroxidase and superoxide dismutase determination in sows' erythrocytes, it was found increased activity of these enzymes (table 3). During the period of the "Activo" feed additive use, a significantly higher level of COD activity was found in animals of the experimental group on the 21st day of lactation by 21% ($P<0.05$) compared to the control.

Furthermore, in piglet blood, superoxide dismutase (SOD) is the primary antioxidant, which maintains and

controls the free radicals level and creates conditions for the normal use of the oxygen environment of the body. This enzyme deactivates reactive oxygen species, which degrade to hydrogen peroxide [13].

From the table 4 data, we can see that the feed additive "Activo" exhibits antioxidant properties, which led to a decrease in the free radical oxidation activity degree, which led to a decrease in the use of GSH (glutathione peroxidase) and a statistical increase in its use in erythrocytes in the experimental group on the 14th and 28th day by 19.7% (P<0.01), 22.7% (P<0.01), respectively, compared to the control. This explains the increase in protective and detoxifying properties in the body.

To sum up, the results of our studies have shown that the use of the "Activo" feed additive for sows and piglets obtained from them is advisable to reduce the negative effects of oxidative stress, which has a negative effect on both sows and their progeny.

Table 1. The content of lipid peroxidation products in the blood plasma of sows (M±m, n=5)

Indexes	Groups	Periods of experiment		
		85 days in gestation	112 days in gestation	21 days in lactation
TBARS, μmol/ml	C	4.31±0.103	4.37±0.111	4.26±0.143
	E	3.5868±0.0304*	3.38±0.068***	3.1998±0.091***
HPL, Units. E/ml	C	2.58±0.110	2.60±0.045	2.42±0.035
	E	2.261±0.054**	2.241±0.057***	2.150±0.041***

Note. Here and further * — P<0.05, ** — P<0.01, *** — P<0.001 compared to the control group.

Table 2. The content of lipid peroxidation products in the blood plasma of suckling piglets (M±m, n=5)

Indexes	Groups	Periods of experiment		
		5th day of life	14th day of life	28th day of life
TBARS, μmol/ml	C	4.8167±0.054	4.3323±0.03	3.9424±0.126
	E	4.4501±0.128	4.0599±0.061**	3.480±0.184
HPL, Units. E/ml	C	0.53±0.02	0.52±0.01	0.489±0.02
	E	0.39±0.03*	0.42±0.03*	0.436±0.019

Table 3. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in blood erythrocytes of sows (M±m, n=5)

Indexes	Groups	Periods of experiment		
		85 days in gestation	112 days in gestation	21 days in lactation
Glutathione peroxidase, nM NADPH/min./mg Hb RBS	C	10.55±0.21	7.39±0.25	9.73±0.09
	E	11.18±0.40	6.32 ±0.53	10.23±0.23
Superoxide dismutase, units Act/mg protein×min	C	21.54±3.61	19.91±1.84	22.15±1.57
	E	22.86±1.64	23.81±1.41	26.81±1.20*

Table 4. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in blood erythrocytes of suckling piglets (M±m, n=5)

Indexes	Group	Periods of experiment		
		5 days of life	14 days of life	28 days of life
Glutathione peroxidase, nM NADPH/min./mg Hb RBS	C	15.1±0.31	13.45±0.19	13.86±0.17
	E	15.5±0.81	16.1±0.68**	17.0±0.72**
Superoxide dismutase, units Act/mg protein*min	C	22.40±1.18	23.36±1.07	26.30±1.25
	E	24.43±0.69	25.56±0.75	31.12±1.03*

References

1. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 59 (1): 2–11. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x.
2. Berchieri-Ronchi CB, Kim SW, Zhao Y, Correa CR, Yeum KJ, Ferreira ALA. Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation. *Animal*. 2011; 5 (11): 1774–1779. DOI: 10.1017/S1751731111000772.
3. Chen J, Huang Z, Cao X, Zou T, You J, Guan W. Plant-derived polyphenols in sow nutrition. *Anim Nutr*. 2023; 12: 96–107. DOI: 10.1016/j.aninu.2022.08.015.
4. Garcia-Contreras C, Vazquez-Gomez M, Barbero A, Pesantez JL, Zinellu A, Berlinguer F, Gonzalez-Añover P, Gonzalez J, Encinas T, Torres-Rovira L, Nuñez Y, Ballesteros J, Ayuso M, Astiz S, Isabel B, Ovilo C, Gonzalez-Bulnes A. Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on placental gene expression and fetal antioxidant status, DNA-methylation and phenotype *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (5): 1187. DOI: 10.3390/ijms20051187.
5. Lapointe J. Mitochondria as promising targets for nutritional interventions aiming to improve performance and longevity of sows. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2014; 98 (5): 809–821. DOI: 10.1111/jpn.12160.
6. Mihu D, Sabău L, Costin N, Ciortea R, Măluţan A, Mihu CM. Implications of maternal systemic oxidative stress in normal pregnancy and in pregnancy complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25 (7): 944–951. DOI: 10.3109/14767058.2011.600796.
7. Mosnier E, le Floc'h N, Etienne M, Ramaekers P, Sève B, Père MC. Reduced feed intake of lactating primiparous sows is associated with increased insulin resistance during the peripartum period and is not modified through supplementation with dietary tryptophan. *J Anim Sci*. 2010; 88 (2): 612–625. DOI: 10.2527/jas.2008-1768.
8. Parraguez VH, Sales F, Peralta OA, De los Reyes M, Campos A, González J, Peralta W, Cabezón C, González-Bulnes A. Maternal supplementation with herbal antioxidants during pregnancy in swine. *Antiox*. 2021; 10 (5): 658. DOI: 10.3390/antiox10050658.
9. 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.
10. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Rad Biol Med*. 2011; 50 (5): 567–575. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
11. 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.
12. 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.
13. Vyslotska LV, Gutyj BV, Kozenko OV, Khalak VI, Chornyj MV, Martyshuk TV, Krempa NY, Vozna OY, Todoriuk VB. System of antioxidant protection of the body of piglets under the action of feed additive "Sylimevit". *Sci Mess LNUVMBT Ser Vet Sci*. 2021; 23 (104): 10–17. DOI: 10.32718/nvlvet10402.
14. Wang T, Yao W, Xia J, Li J, Shao Y, Huang F. Dietary supplementation with garcinol during late gestation and lactation facilitates acid-base balance and improves the performance of sows and newborn piglets. *J Anim Sci.* 2019; 97 (11): 4557–4566. DOI: 10.1093/jas/skz292.
15. Weldon WC, Lewis AJ, Louis GF, Kovar JL, Giesemann MA, Miller PS. Postpartum hypophagia in primiparous sows: I. Effects of gestation feeding level on feed intake, feeding behavior, and plasma metabolite concentrations during lactation. *J Anim Sci*. 1994; 72 (2): 387–394. DOI: 10.2527/1994.722387x.
16. Wu F, Tian FJ, Lin Y, Xu WM. Oxidative stress: Placenta function and dysfunction. *Am J Reprod Immunol*. 2016; 76 (4): 258–271. DOI: 10.1111/aji.12454.
17. Zhao Y, Flowers WL, Saraiva A, Yeum KJ, Kim SW. Effect of social ranks and gestation housing systems on oxidative stress status, reproductive performance, and immune status of sows. *J Anim Sci*. 2013; 91 (12): 5848–5858. DOI: 10.2527/jas.2013-6388.

Вплив кормової добавки «Активо» на деякі показники системи антиоксидантного захисту свиноматок та отриманих від них поросят

Т. Я. Прудиус
tarasvet126@gmail.com

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

Інтенсивні технології вирощування сільськогосподарських тварин розробляються переважно для отримання максимального економічного ефекту. При цьому продуктивні тварини часто зазнають дії багатьох стресових чинників і надмірних фізіологічних навантажень, що призводить до погіршення добробуту тварин, їх здоров'я і, врешті-решт, до зниження продуктивних показників. Одним з найпоширеніших негативних процесів, які виникають у тваринному організмі внаслідок дії різноманітних чинників, є оксидативний стрес, тобто порушення про- і антиоксидантної рівноваги. Оксидативний стрес не виникає сам по собі, а переважно є супровідним процесом за дії стрес-факторів різної природи — наприклад, токсинів, температур, критичних фізіологічних періодів, інфекційних патологій, надмірної, чи незбалансованої, або недостатньої годівлі тощо. У роботі показано результати досліджень впливу кормової добавки «Активо», до складу якої входять вторинні рослинні компоненти ефірних олій орегано, перцю чилі, на кількісний вміст продуктів ПОЛ та активність систем антиоксидантного захисту у свиноматок та отриманих від них поросят. Дослідження проведено в умовах промислового комплексу ТОВ «Барком» (Львівська обл.). За принципом аналогів було сформовано дві групи поросних свиноматок великої білої породи по 10 тварин у кожній — контрольну та дослідну. Для дослідної групи в раціон додатково було введено кормову добавку «Активо» у кількості 0,1 кг/т готового корму. У крові свиноматок та поросят від них отриманих визначали вміст гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів, активність глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази. Результати проведених нами досліджень показали, що застосування для свиноматок та отриманих від них поросят кормової добавки «Активо» є доцільним з метою зменшення негативної дії оксидативного стресу, який чинить негативну дію як на свиноматок, так і на їхнє потомство.

Ключові слова: свиноматки, поросята, кормова добавка «Активо», ефірні олії, оксидативний стрес, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, ТБК-активні продукти, гідропероксиди ліпідів

https://doi.org/10.15407/animbiol27.01.053
UDC 636.22.28
Received 04.09.2024 ▪ Revision 12.02.2025 ▪ Accepted 20.03.2025 ▪ Published online 11.04.2025

Вплив природного відбору на відтворювальну функцію бугаїв

В. Петренко, В. Барабаш
izkzoo3337@gmail.com

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

ORCID:
V. Petrenko https://orcid.org/0000-0002-1716-6248

Authors' Contributions:
PV: Investigation; Data curation; Validation; Writing — original draft, review & editing.
BV: Conceptualization; Methodology; Investigation; Formal analysis.

Declaration of Conflict of Interests:
None to declare.

Ethical approval:
None.

Acknowledgements:
None.

Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

У статті наведено результати багаторічних досліджень впливу природного та статевого відбору на репродуктивну функцію бугаїв за умов прив'язного та безприв'язного утримання. Встановлено, що в ієрархічній структурі стада домінантні самці отримують перевагу у доступі до ресурсів та статевих партнерів, що призводить до зниження лібідо, якості сперми й репродуктивної активності у підлеглих бугаїв. Доведено, що ранговий стрес є однією з ключових причин імпотенції та репродуктивної недостатності у таких тварин. З'ясовано, що домінантні особини мають кращі адаптаційні властивості, вищу спермопродукцію та типологічні характеристики нервової системи, пов'язані з лідерством. Проведено комплексне вивчення фізіологічних, етологічних, біохімічних, морфологічних показників, що дозволило виявити ефективні підходи до покращення умов утримання бугаїв, мінімізації дії інтрасексуального добору та стабілізації репродуктивної функції у племінних стадах. Вперше показано, що тип вищої нервової діяльності тварин може бути використаний як селекційний критерій для формування високопродуктивного плідницького складу. Отримані результати мають важливе значення для удосконалення методів утримання, відбору та використання бугаїв у штучному осіменінні та системі племінної роботи.

Ключові слова: бугаї, природний відбір, статева функція, ранговий стрес, ієрархія в стаді

Вступ

На багатьох племпідприємствах біологічні можливості формування і нормального функціонування відтворної системи у бугаїв не використовуються в належному обсязі через те, що реалізація генетичного потенціалу плідників у цьому напрямку залежить від багатьох факторів, пов'язаних з природним відбором і конкретними умовами утримання та використання тварин [2, 6]. Нерідко умови виробництва бувають несприятливими, що передусім негативно впливає на показники сперми, які спонтанно погіршуються навіть у клінічно здорових бугаїв [23]. Це дуже важко усунути сучасними методами [2]. Потрібні надійні та безпечні засоби впливу на статеву систему бугаїв для прискореного покращення їх спермопродукції і надання стійкості виробничому процесу удосконалення маточних стад, який цілком залежить від благополучного стану статевої сфери плідників [8, 19].

Однак у літературі недостатньо висвітлено вплив природного відбору й елімінації в умовах стада або групового безприв'язного утримання на статеву функцію худоби. Мало даних про зв'язок зоосуспільної пристосованості, реакцій домінування і підлеглості та статевої функції тварин в стаді, яке є штучною популяцією. Майже не вивчено етолого-фізіологічні механізми формування і підтримання стадної ієрархії та її ролі у процесах відтворення потомства, а також природної регуляції чисельності стада і виходу телят в зв'язку з інтрасексуальним та епігамним відбором. Не вивчено також, як впливає тип нервової системи на ранг тварин у стаді.

Практично не вивчено заходів з обмеження негативної дії природного відбору способами утримання плідників у період їх вирощування, навчання віддачі сперми та використання в мережі штучного осіменіння. Тому досить актуальним є теоретичне обґрунтування та розробка способів утримання, використання і стимуляції відтворної функції у бугаїв. Вивчення зазначених проблем має велике наукове і народногосподарське значення, воно дає можливість розробити ефективнішу етологічно та екологічно обґрунтовану технологію утримання, використання та стимуляції статевої системи бугаїв на сучасних племпідприємствах [7, 25].

Матеріали і методика досліджень

Дослідження проводили протягом 20 років у реальних умовах роботи племінних господарств, агрофірм і тваринницьких підприємств в Україні та Республіці Таджикистан. Загалом у дослідженнях взяли участь понад 1400 бугаїв-плідників, більше 10 тисяч молодих бугайців на відгодівлі, а також понад 20 тисяч корів і телиць різних порід (червона степова, українська чорно-ряба, симентальська, швіцька, костромська, казахська білоголова) віком від 12 місяців до 3 років.

Щоб результати були максимально точними та надійними, вчені застосовували цілий комплекс взаємодоповнюючих методів. Основним був метод груп-аналогів, який дозволяв порівнювати тварин, що мали однакову годівлю та використання, але перебували в різних умовах утримання — наприклад, прив'язаних, безприв'язних або з доступом до моціону.

Проводили детальні спостереження за поведінкою тварин, зокрема проявами домінування, підлеглості, статевої активності, реакціями на нових тварин у групі, а також добовою (циркадною) активністю. Це дозволило дослідити, як формується ієрархія у стаді.

Використовували фізіологічні та біохімічні методи — вивчали якість сперми (об'єм, концентрацію, рухливість сперматозоїдів), газообмін, склад крові, рівень гормонів після введення АКТГ, що впливає на функцію наднирників.

Застосовували зоотехнічні методи для контролю росту, живої маси, тільності корів, ефективності осіменіння. А типологічні тести допомогли визначити тип нервової системи бугаїв та особливості їхньої реакції на подразники, поведінку в стресових ситуаціях.

Для оцінки результатів використовували статистичні методи, які дозволяли визначити вірогідність відмінностей між тваринами різних груп, порід, умов утримання, а також виявити взаємозв'язки між їхніми поведінковими, фізіологічними та репродуктивними показниками.

У деяких випадках проводили контрольний забій, щоб порівняти розвиток органів та тканин у тварин, яких утримували в різних умовах, — з дією або без дії природного відбору.

Бугаїв розподілили на контрольні (прив'язне утримання) та дослідні (безприв'язне групове утримання) групи. Це дозволило оцінити, як впливає конкуренція між самцями (інтрасексуальний відбір) на їхнє становище в ієрархії, статеву функцію, поведінку, здатність до адаптації.

Окремо досліджували вплив соціального стресу, який виникає внаслідок рангової боротьби між тваринами. Вивчали прояви імпотенції, зниження лібідо, погіршення якості сперми у підлеглих особин. Також аналізували циркадні реакції, гормональні зміни, реакцію організму на введення стрес-гормону АКТГ.

Усі дослідження проводили з дотриманням етичних норм поводження з тваринами відповідно до чинного законодавства України та міжнародних стандартів.

Результати досліджень

Дія факторів природного відбору в стадах була такою ж, як і при модельному відборі [17]. Етологічні дослідження інтрасексуального та епігамного відбору в стаді, які визначались синхронно, показали, що в умовах вільного покриття маток всього два бугаї-домінанти з шести переважно брали участь у природному розмноженні. За період досліджень вожак стада покрив 23, а його найближчий суперник — 12 корів. Водночас 4 підлеглих бугаї покрили всього по одній корові, тобто майже не брали участі у розмноженні через ранговий стрес (табл. 1).

У близько 100 стад об'єднання «Ховалінг» бугаї-домінанти негативно впливали на лібідо підлеглих самців, у зв'язку з чим серед останніх більш ніж 60 % мали імпотенцію, що виникла і підтримувалась на основі неспецифічних адаптаційних реакцій та стресу.

В зв'язку з такою дією статевого відбору корови стада також мали різну пристосованість, тобто здатність до виживання та розмноження: у 26–28 % не було телят в поточному році. При цьому лише 43,1 % найпристосованіших тварин мали телят на підсосі та знову запліднилися в кращі для майбутнього потомства природні строки (табл. 2).

Різниця в заплідненні між домінантними та підлеглими коровами у стаді досягла 32 %. У корів-дочок домінантних матерів жива маса досягла 400 кг, тобто майже не змінилася, а заплідненість знизилася на 4,6 %, тоді як у підлеглих корів-дочок жива маса зросла на 30 кг і запліднюваність — на 4,4 %, що можна пояснити дією рушійного відбору, який підтягує підлеглих особин стада до середньої норми. Напрям природного відбору або його вектор був таким же, як у направленого штучного відбору, що треба використовувати у проведенні селекції худоби в системі «корова-теля» [3, 5, 13, 26].

Таким чином, в практиці варто усувати дію факторів природного відбору завдяки покращенню умов годівлі, утримання і відтворення тварин, тому що зумовлене ним зниження продуктивності та плодю-

чості, а також порушення репродуктивної функції у підлеглих особин стада, пов'язане з природною регуляцією його чисельності, є наслідком його негативного впливу на ефективність всієї галузі, що підтверджують дослідження й інших науковців [4, 9].

Статевий відбір діє на рівні стада, яке є штучною популяцією. Це відбувається на основі таких імовірних чинників, як число домінантних бугаїв у стаді, а також кількість корів, які приходять в охоту в одиницю часу, тривалість часу на покриття маток — корів та телиць в охоті. Водночас у стаді діють дві черги, пов'язані зі зменшенням його чисельності. Це першочерговий доступ тварин до всіх ресурсів стада, який забезпечує домінантним особинам репродукцію за рахунок підлеглих. Крім того, у стаді діє черга з відмовленнями, яка функціонує в тому випадку, коли всі бугаї зайняті покриттям маток, а імовірні особини, які прийшли в охоту, усунуті від розмноження, хоча вони могли б мати нащадків [21].

При цьому число покритих і усунутих від розмноження корів обумовлює елімінацію, яка здійснюється на основі адаптаційних реакцій та реакції, стресу. Це призводить до імпотенції підлеглих бугайців, а також до відсутності потомства у підлеглих в стаді корів через вплив зоосоціального рангового стресу [16].

Для вірогіднішого спостереження природного добору необхідно було не тільки виявити бугаїв, які не беруть участі в природному розмноженні, а й визначити напрям відбору або його вектор і довести, що відбувається саме вибіркова елімінація підлеглих і вибіркове виживання та участь в розмноженні домінантних особин стада. При цьому відображенням напрямку статевого добору є циркадна, зафіксована генетичною пам'яттю поведінка тварин, котра з покоління до покоління без навчання виникає при взаємовідносинах особин у стаді.

Таблиця 1. Покриття корів і телиць домінантними та підлеглими бугаями
Table 1. Coverage of cows and heifers by dominant and subordinate bulls

Етологічна належність Ethological affiliation	Ієрархічний ранг Hierarchical rank	Число корів та телиць, покритих бугаєм Number of cows and heifers covered by a bull	В тому числі в % Including in %
Вожак стада Herd leader	1	23	58,99
Домінантний бугай Dominant bull	2	12	30,77
Підлеглий Subordinate	3	1	2,56
Підлеглий Subordinate	4	1	2,56
Підлеглий Subordinate	5	1	2,56
Підлеглий Subordinate	6	1	2,56
Всього Total	6	39	100,00

Таблиця 2. Жива маса і тільність домінуючих та підлеглих в стадах корів та їх дочок
Table 2. Live weight and body mass of dominant and subordinate cows and their daughters in herds

Етологічна належність корів Ethological affiliation of cows	Фактори природного добору Factors of natural selection	Голів Heads	Жива маса, кг Live weight, kg		Тільність, % Body weight, %	
			Матерів Mothers	Дочок Daughters	Матерів mothers	Дочок Daughters
Частина тварин, яка розмножується Part of animals that reproduce	Стабілізуючий, ведучий і статевий stabilizing, driving and sexual	423	346±2,66	—	71±2,5	—
В тому числі / Including домінантні / dominant	Стабілізуючий і статевий stabilizing and sexual	178	399±3,06	400	85,9±2,4	81,3
підлеглі / subordinate	ведучий і статевий driving and sexual	245	301±8,3	331	53,8±4,9	68,2
Різниця Difference	—	—	97,6	69	32,1	13,1

Домінантні бугаї мали першочерговий доступ до кормів, води, солі та кращих місць відпочинку. Вони поїдали більше концентрованих кормів і суттєво менше часу витрачали на ігри, порівняно з підлеглими в стаді плідниками. Ці бугаї мали більшу спроможність до екстрополяції [20].

Бугаї-домінанти менше рухалися і більше лежали або стояли, проявляли комфортнішу активність, ніж підлеглі плідники, а статеву активність спрямовували лише на корів і телиць в охоті. На відміну від домінантних, підлеглі бугаї в стаді проявляли статеве збудження лише один на одного. Це було пов'язане з відсутністю у них стійкого лібідо щодо корів і телиць в охоті [12].

У більшої частини підлеглих бугаїв спостерігали природну імпотенцію, обумовлену ранговим стресом, в зв'язку з чим вони не могли покрити навіть зафіксовану в станку корову в охоті [11].

Отже, дослідження добової (циркадної) поведінки бугаїв об'єктивно свідчать про те, що вона дійсно є відображенням вектору статевого відбору, спрямованого на переважне виживання і розмноження домінантних тварин в стадах.

Примітивні емоції оборонного типу, які виникали серед тварин в конкурентних умовах стада, пов'язаних з вектором статевого відбору, мали суттєвий вплив на соматичну перебудову організму, що відображалося на їхніх етологічних і фізіологічних показниках та спермопродукції [10].

Встановлено, що вищі адаптивні можливості у стаді мали домінантні тварини з сильним, врівноваженим, рухомим типом вищої нервової діяльності (ВНД), порівняно з підлеглими особинами з таким же типом, які суттєво різнилися лише показником числа витриманих диференціювань до числа позитивних відповідей, а також за перетворенням негативної реакції в позитивну («−» в «+»). Це пов'язане з урівноваженістю нервових процесів, що свідчить про вищу спроможність домінантів до навчання та аналізу зовнішніх подразників.

Жива маса та сперма домінантних бугайців швіцької породи була суттєво кращою, порівняно з підлеглими особинами стада, протягом всього періоду вирощування тварин (табл. 3).

Різниця за живою масою була значною. Показники сперми домінантних і підлеглих бугайців також вірогідно (P<0,01) відрізнялися за активністю (рухомістю) сперматозоїдів, що пояснюється наявністю у підлеглих тварин зоосуспільного стресу. Таким чином, одержані нові дані про те, що сперма також є дзеркалом адаптивних процесів в організмі тварин і може об'єктивно характеризувати його стан.

У природніх умовах поведінка регулює репродуктивні процеси, які лежать в основі еволюції виду, за рахунок ізоляції, яка обмежує схрещування, та міграції особин до інших популяцій (стад) [1,15, 24].

У дослідах було встановлено, що статеві реакції бугайців один на одного в процесі формування ієрархії після їх переведення з прив'язного на безприв'язне утримання або при введенні до сформованого стада нових особин закономірно підрозділяються на три періоди.

В перший період (тиждень), особливо в першу годину після переведення, у бугайців спостерігали бурхливі статеві реакції один на одного. При цьому пульс і число дихальних рухів у тварин зростало удвічі і більше. Дослідження крові у 20 бугайців швіцької породи, утримуваних на прив'язі, через добу після пе-

Таблиця 3. Жива маса і якість сперми бугайців у 18-місячному віці
Table 3. Live weight and sperm quality of bulls at 18 months of age

Показники Indicators	Домінантні Dominant (n=5)	Підлеглі Subordinate (n=6)	± домінантні до підлеглих ± dominant to subordinate	Стат. вірогідність різниці td при P<0,01 Stat. siginficance of difference td at P<0.01
Жива маса (кг) у віці (міс.) Live weight (kg) at age (months) 9	236±10,6	221±10,5	+15	1,0
12	302±13,2	286±13,3	+16	0,8
15	363±15,6	330±13,2	+33	1,4
18	439±19,8	389±12,4	+50	2,0
Якість сперми / Sperm quality: об'єм, мл / volume, ml	2,9±0,2	2,2±0,9	+0,7	0,76
активність, бали activity, points	5	4	+1	1,0
концентрація, млрд./мл concentration, billion/ml	0,672±0,17	0,487±0,61	+0,185	0,3
Загальна якість сперматозоїдів, млрд. Overall sperm quality, billion.	1,95±0,03	1,07±0,11	+0,88	7,8

реведення їх на безприв'язне утримання, встановило наявність у тварин стресу. За першу добу жива маса бугайців зменшилась на 20–30 кг. Активність сперми різко знизилася (P<0,05), функціональна активність статевих залоз загальмувалась. Дихальний коефіцієнт також різко знизився — з 1,0 до 0,7.

У другий період (тривалістю 20 діб) спостерігали стабілізацію гомосексуальних реакцій у бугайців стада із подальшим гальмуванням статевих та оборонних рефлексів. Спермопродукція бугайців статистично вірогідно покращувалась. Показники плазми крові бугайців через 10 днів безприв'язного утримання знизились майже до початкового рівня, але були вищими, ніж до переведення. В цей час статева функція бугайців вже не зазнавала такого перенапруження.

Третій період (тривалістю 30–40 діб) характеризувався чітким встановленням ієрархії серед тварин стада. В цей період ми вперше спостерігали явище відносного згасання статевого потягу (лібідо) бугайців на особин свого стада. Проте достатньо було ввести до стада нових бугайців (одного або декількох), як статеві реакції на них у бугайців стада починали проявлятися знову. В цей період у бугайців відновлювалась втрачена раніше жива маса і середньодобові прирости, які зростали до 900 грамів, покращувалась спермопродукція.

Отже, було одержано нові дані про те, що в основі закономірностей формування і підтримки ієрархії в стаді бугайців лежать складні комплекси поведінки і фізіологічних реакцій. Вперше встановлено таку якість ієрархічного рангу у бугайців-лідерів стада, як його детермінованість властивостями вищої нервової діяльності, що важливо для практики відбору тварин для оцінки та використання в селекції.

Тому вожаками у стаді завжди ставали найбільш агресивні бугайці сильного врівноваженого рухомого типу вищої нервової діяльності, у яких сперма майже не погіршувалась, що свідчило про відсутність у них стресу. Нелідируючі бугайці різних ієрархічних рангів і типів ВНД мали випадковий розподіл у стаді. Бугайці зі слабким типом ВНД не брали участі в активній боротьбі за ієрархічний ранг і посідали підлегле становище в стаді. Відбирання бугайців-лідерів можна проводити в спеціалізованих елеверах згідно з оцінкою за продуктивними якостями потомства для подальшого використання в селекції. Одержані нами дані та висновки пізніше буди підтверджені й іншими вченими [14, 26].

Для вивчення можливості обмеження негативної дії ефектів інтрасексуального відбору на ріст, розвиток, фізіологічний стан та спермопродукцію бугайців в період статевого дозрівання ми провели дослід, в якому одну групу бугайців з 6- до 18-місячного віку (12 голів) вирощували в умовах прив'язного, а іншу (12 голів) — в умовах безприв'язного утримання, тобто без обмеження чинників природного відбору.

Жива маса бугайців обох груп протягом всього досліду перевищувала вимоги для тварин класу еліта-рекорд. У 18-місячному віці різниця за живою масою між бугайцями дослідних груп становила 30 кг на користь бугайців, яких вирощували в умовах прив'язного утримання, — 480 кг проти 450 кг відповідно (P<0,1).

Витрати кормів на вирощування тварин із прив'язним утриманням становили 2,7 тис. кормових одиниць, для піддослідної грпи із груповим безприв'язним утриманням — 3,0 тис. кормових одиниць, тобто на 12,0 % більше. Майже всі екстер'єрні проміри і індекси будови тіла у бугайців безприв'язної групи в 18-місячному віці були більшими, ніж у тварин прив'язної. За результатами забою тварин (по три бугайці з групи) було встановлено, що останні поступалися перед бугайцями безприв'язної групи за масою м'язів (з салом) і сухожиль всього на 2,5 %, а за масою селезінки — на 1,5 %. Водночас за масою кісток вони перевершували своїх аналогів з прив'язної групи на 4,0 %, за масою серця — на 7,0 %, легень — на 21,0 %, шлунка — на 6,0 %.

Обумовлений різною дією чинників природного відбору розвиток внутрішніх органів виразно відобразився на прирості основних тканин із тенденцією забезпечення вищої життєздатності в бугайців безприв'язної групи [14].

Дослідження газообміну на бугайцях під час статевого збудження й еякуляції показало (табл. 4), що його відновлення до початкового рівня у бугайців з групи прив'язного утримання закінчувалось через добу, а в бугайців з групи безприв'язного утримання — через 3–4 години.

Таблиця 4. Газоенергетичний обмін у бугайців до і після взяття сперми, % до середньодобового рівня
Table 4. Gas-energy exchange in bulls before and after semen collection, % of average daily level

Групи Groups	Час взяття сперми (міс.) Time of sperm collection (months)	Виділено CO_2 (л) Released CO2 (l)		Поглинуто O_2 (л) Absorbed O2 (l)		Теплопродукція (ккал.) Heat production (kcal)	
		12 міс. 12 months	18 міс. 18 months	12 міс. 12 months	18 міс. 18 months	12 міс. 12 months	18 міс. 18 months
Дослідна безприв'язна Experimental loose	До взяття / Before Taking	208	140	171	140	182	141
	Після взяття / After Taking	191	133	171	125	178	126
Контрольна прив'язна Control tethered	До взяття / Before Taking	240	212	208	183	215	184
	Після взяття / After Taking	210	231	193	207	196	207

Відомо, що в природному стані сперматозоїди зберігаються у хвості придатка сім'яника в умовах зниженого тиску кисню, тоді як в свіжоодержаній спермі без контакту з повітрям місткість кисню сягає 200 %, а після розведення синтетичним середовищем — на 325 % (відносних). Отже, через 6 годин кисень у спермі витрачається, що призводить до зниження редокспотенціалу й окислювально-відновлювального показника. Відновити місткість кисню в такій спермі можна лише штучною оксигенацією. У водневому живильному середовищі окислювально-відновлювальний режим в спермі, навпаки, різко знижується [18, 22].

Аналіз досліджень газообміну і даних щодо окислювально-відновлювального показника у спермі бугайців дав нам змогу вперше спостерігати явище підвищеної оксигенації організму (зокрема статевої сфери) самців при статевому збудженні й еякуляції, спрямоване на забезпечення оптимальних стартових умов для запліднення самиць.

Контрастні умови утримання піддослідних бугайців вплинули і на їхню рухову активність. Крокометричні дослідження засвідчили, що кількість крокових рухів на добу в бугайців дослідної групи була на 16 % більшою, ніж у тварин контролю.

Дослідженні орієнтувального та умовного кормового рефлексів показало, що реакція тварин на зовнішні подразники залежала від попередніх умов їх вирощування. Неадекватна реакція бугайців на зовнішні подразники стала основною причиною їхньої активної оборонної, а в деяких — буйної поведінки, обумовленої парабіотичною врівноваженою або гальмувальною фазами дії кори головного мозку. Об'єктивна оцінка типологічних властивостей нервової системи та типу конституції у бугайців швіцької породи дала змогу встановити, що 63,9 % тварин сильних типів вищої нервової діяльності належать до широкотілих і 36,1 % — до вузькотілих типів конституції. Тобто вибраковування ремонтних бугайців небажаних типів конституції перед постановкою для оцінки за продуктивними якостями нащадків дасть змогу залишати на плем'я тільки тварин бажаного типу нервової системи.

Таблиця 5. Вміст еозинофілів і незрілих форм нейтрофілів до і після введення АКТГ, % (середні дані)
Table 5. Content of eosinophils and immature forms of neutrophils before and after ACTH administration, % (average values)

Тип нервової системи Type of nervous system	Група Group	Еозинофіли / Eosinophils			Нейтрофіли / Neutrophils		
		До введення АКТГ Before ACTH administration	Після введення АКТГ After ACTH administration		До введення АКТГ Before ACTH administration	Після ввеення АКТГ After ACTH administration	
			4 год. 4 hrs	9 год. 9 hrs		4 год. 4 hrs	9 год. 9 hrs
Слабкий / Weak	Контрольна Control	10,5	6,0	12,5	6,2	12,2	8,7
	Дослідна Experimental	3,0	1,0	4,5	2,5	8,2	9.5
Сильний / Strong	Контрольна Control	5,8	5,0	2,8	6,5	11,5	14,3
	Дослідна Experimental	2,7	3,2	2,7	9,2	16,2	20,2

Таблиця 6. Показники сперми бугаїв до **і** після введення АКТГ
Table 6. Semen characteristics of bulls before and after ACTH administration

Показник Indicator	До введення Before administration	Після введення After administration	Вірогідність різниці Statistical significance of difference
Кількість бугаїв, гол. Number of bulls, head	5	5	—
Число еякулятів Number of ejaculates	7	12	—
Показники сперми / Semen characteristics: об'єм, мл. / volume, ml	2,10±0,18	1,77±0,25	1,28
активність, бали / activity, points	6,00±0,01	3,00±0,50	6,00
концентрація, млрд./мл. concentration, billion/ml	0,61±0,12	0,70±0,11	0,69
загальна кількість сперматозоїдів, млрд. total number of spermatozoa, billion	1,28	1,24	—

При дослідженні впливу адренокортикотропного гормону (АКТГ) на систему гіпофіз — кора наднирників та спермопродукцію піддослідних бугайців різних типів нервової системи ставили завдання виявити зв'язок між типологічними властивостями нервової системи тварин та зміною наявності еозинофілів (табл. 5).

Зміни морфологічної картини крові залежали від функціонального стану системи гіпофіз – кора наднирників у бугайців, вирощених в різних умовах утримання та дії інтрасексуального відбору. Морфологічний стан крові у бугайців різних типів ВНД також залежав від функціонального стану адреногіпофізарної системи. Порівняння реакції стрес на введення АКТГ у бугаїв слабкого і сильного типів ВНД показало, що вона залежала від типологічних властивостей нервової системи, які є позитивно пов'язаними з швидкістю виснажування кори наднирників.

В зв'язку з штучно викликаним стресом (табл. 6), який виник внаслідок введення АКТГ, погіршились показники сперми у всіх бугайців, незалежно від типу їх нервової системи. Особливо помітним було суттєве зниження (в 2 рази) показника активності (рухомості) сперми бугайців після введення АКТГ.

Тобто показник активності сперматозоїдів у щойно одержаній (нативній) спермі дійсно можна використовувати для оцінки стресостійкості та стресочутливості бугаїв.

В зв'язку з дією інтрасексуального відбору показники сперми та кількість еозинофілів в периферичній крові бугайців дослідної групи закономірно відображали їхню ієрархічну взаємодію в стаді. Тому, порівняно з вожаком стада, домінантні бугайці піддослідної групи продукували на 45,6 % і підлеглі — на 83,2 % менше сперматозоїдів. Вірогідну різницю між домінантними і підлеглими бугайцями на користь перших відзначили за об'ємом еякуляту й активністю сперми.

Бракованих еякулятів у підлеглих бугайців було на 25,4 % більше, ніж у вожака, і на 20,4 % більше, ніж у домінантних бугайців стада. Водночас бугайці контрольної групи з прив'язного утримання мали на 0,6 мл більший об'єм еякуляту, порівняно з вожаком і домінантними, і на 1,7 мл — порівняно з підлеглими бугайцями. За загальною кількістю сперматозоїдів у всіх еякулятах бугайці контрольної групи перевищували домінантних на 34,2 % і підлеглих бугайців піддослідної групи — на 79,7 %. Однак вожак дослідної групи перевершував за цим показником бугайців контролю на 19,8 %. Усі наведені різниці статистично вірогідні.

Показники сперми піддослідних бугайців за весь період вирощування (табл. 7) між контрольною та дослідною групами також різняться.

Одержані нами нові дані свідчать про те, що домінування частини бугайців піддослідної групи, обумовлене дією інтрасексуального відбору, закономірно вплинуло на ріст, розвиток, статеву активність та спермопродукцію усіх бугайців стада.

Отже, плодючість тісно пов'язана з ієрархічним рангом тварин. Вона становить основну ланку багатосхідчастої природної регуляції інтрасексуального відбору, яка здійснюється за допомогою складних комплексів поведінки, фізіологічних адаптаційних реакцій та стресу, котрі обумовлюють закономірну систему пристосувань до середовища з рівнем функціонування статевої системи кожної особини стада.

У зв'язку з дією статевого відбору в умовах природного розмноження групового безприв'язного та прив'язного утримання (з моціоном в кільцевих коридорах) основною закономірністю є погіршення лібідо (аж до імпотенції), ерекцій, простато-тестистикулярної взаємодії і спермопродукції у підлеглих бугаїв як наслідок перенесеного болю, страху та агресивності інших тварин. Це можна усунути за допомогою різних способів утримання та стимуляції, які забезпечують раціональне використання плідників в умовах сучасних підприємств.

Спроможність тварин до розмноження залежала від їхнього місця у стадній ієрархії. Вища тільність домінантних корів стада, порівняно з підлеглими (85,9 % проти 53,8 %), забезпечувала більше представництво їхніх нащадків у наступному поколінні.

Таблиця 7. Показники сперми піддослідних бугайців з 12- до 18-місячного віку,
Table 7. Semen characteristics of experimental bulls from 12 to 18 months of age

Показник Indicator	Групи / Groups		Різниця Difference
	Контрольна Control	Дослідна Experimental	
Кількість еякулятів/ Number of ejaculates	224	160	64
Об'єм, мл / Volume, ml	1,97±0,06	1,37±0,06	0,60
Активність, бали / Activity, points	0,7	0,7	—
Концентрація, млрд./мл. / Concentration, billion/ml	0,735±0,03	0,747±0,04	0,012
Загальна кількість сперматозоїдів, млрд. Total number of spermatozoa, billion	1,446±0,09	1,021±0,01	0,425

Основною закономірністю формування та підтримання взаємовідносин бугайців (ієрархії) у стаді є виникнення складних комплексів поведінки та адаптаційних реакцій і стресу, а також відносного згасання селективної складової лібідо на особин своєї групи, яке відновлювалось у сформованому стаді на новоприбулих тварин.

Встановлено важливу для відбору, оцінки та використання в селекції якість ієрархічного рангу бугайців-лідерів стада — його детермінованість типом нервової системи. Лідерами стада ставали найбільш агресивні домінантні бугайці сильного врівноваженого рухомого типу вищої нервової діяльності, які мали більшу спроможність до екстраполяції.

Контрастні відмінності у способах обмеження дії інтрасексуального добору найчіткіше виявилися у 18-місячному віці, коли бугайці дослідної групи (безприв'язне утримання) за живою масою поступалися аналогам контролю (прив'язне утримання) на 50 кг ($P<0,1$), а за загальною кількістю сперматозоїдів в еякуляті тварини контрольної групи перевершували домінантних бугайців дослідної групи на 34,2 і підлеглих — на 79,7 %.

Вперше показано закономірність неадекватної реакції відповіді бугайців, вирощуваних на прив'язі або в умовах обмеження інтрасексуального відбору, на зовнішні подразники, яка стала основною причиною їхньої активно-оборонної і буйної поведінки, обумовленої врівноважувальною та гальмівною фазами діяльності кори головного мозку. Реакції на подразники відновлювалися до норми лише після переведення самців на групове безприв'язне утримання та встановлення ієрархії.

Об'єктивна оцінка типу ВНД та типу конституції у бугаїв швіцької породи дала можливість вперше встановити, що 63,9 % сильних типів ВНД належать до широкотілих і 36,1 % — до вузькотілих типів конституції, що суттєво спрощує відбір тварин бажаного типу для оцінки та використання в селекції.

Бібліографія

1. Ahearn JN. Evolution of behavioral reproductive isolation in a laboratory stock of *Drosophila silvestris*. *Cell Mol Life Sci.* 1980; 36: 63–64. DOI: 10.1007/BF02003975.
2. Aitken RJ, Hanson AR, Kuczera L. Electrophoretic sperm isolation: Optimization of electrophoresis conditions and impact on oxidative stress. *Human Reprod*. 2011; 26 (8): 1955–1964. DOI: 10.1093/humrep/der162.
3. Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA. Review: Using artificial insemination *v.* natural service in beef herds. *Animal.* 2018; 12 (1): s45–s52. DOI: 10.1017/S175173111800054X.
4. Brito LF, Bedere N, Douhard F, Oliveira HR, Arnal M, Peñagaricano F, Schinckel AP, Baes CF, Miglior F. Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. *Animal.* 2021; 15 (1): 100292 DOI: 10.1016/j.animal.2021.100292.
5. Burkat VP. *Consolidation of Breeding Groups of Animals: Theoretical and Methodological Aspects*. Kyiv, Agrarna Nauka, 2002: 51–57. ISBN 966-540-162-9 (in Ukrainian)
6. Butler ML, Bormann JM, Weaber RL, Grieger DM, Rolf MM. Selection for bull fertility: A review. *Transl Anim Sci.* 2020; 4 (1): 423–441. DOI: 10.1093/tas/txz174.
7. Cojkic A, Morrell JM. Animal welfare assessment protocols for bulls in artificial insemination centers: Requirements, principles, and criteria. *Animals*. 2023; 13 (5): 942. DOI: 10.3390/ani13050942.
8. Creciun M, Ghenciu V, Arian I, Tataru CP, Dumbrăveanu I. The effects of auxiliary substances used in doping on male sexual reproductive function. *Sanatate Publ Econ Managem Med*. 2024; 5 (102): 24. DOI: 10.52556/2587-3873.2024.5(102).24.
9. Davis TC, White RR. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. *Theriogenol.* 2020; 150: 27–33. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.041.
10. Dixson AF, Anderson MJ. Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiol Behav*. 2004; 83 (2): 361–371. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.08.022.
11. Fisinin RM. Immunity in modern animal husbandry and poultry farming. *Anim Husb Today.* 2011; 9: 40–47. (in Ukrainian)
12. Gekkiyev AD. Improvement of sire evaluation methods in gene pool herds of dairy cattle. *Anim Husb Ukr*. 2004; 9: 12–18. (in Ukrainian)
13. Ghoreishifar SM, Eriksson S, Johansson AM, Khansefid M, Moghaddaszadeh-Ahrabi S, Parna N, Davoudi P, Javanmard A. Signatures of selection reveal candidate genes involved in economic traits and cold acclimation in five Swedish cattle breeds. *Genet Sel Evol*. 2020; 52 (1): 52. DOI: 10.1186/s12711-020-00571-5.
14. Honcharenko IV. *Oogenesis, Spermatogenesis and Selection Challenges in Dairy Cattle*. Kyiv, Naukova Dumka; 2003: 38 p. (in Ukrainian)
15. Martin MD, Mendelson TC. Male behaviour predicts trait divergence and the evolution of reproductive isolation in darters (*Percidae*: *Etheostoma*). *Anim Behav*. 2016; 112: 179–186. DOI: 10.1016/j.anbehav.2015.11.027.
16. Naqvi SMK, Kumar D, Paul RK, Sejian V. Environmental stresses and livestock reproduction. In: Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R (eds). *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*. Springer; 2012: 97–128. DOI: 10.1007/978-3-642-29205-7_5.
17. Oliinyk SO. Ethological characteristics of keeping bulls of different genotypes. *Visn Dnipropetrovsk State Agrar Univer*. 2002; 2: 131–132. (in Ukrainian)
18. Park C, Chapman FA. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North Am J Aquacult.* 2005; 67 (1): 52–27. DOI: 10.1577/FA03-068.1.
19. Petrie WM. Sexual effects of antidepressents and psychomotor stimulant drugs. In: Ban TA; Freyhan FA (eds). *Drug Treatment of Sexual Dysfunction*. 1980; 190–209. ISBN electronic, 978-3-8055-2906-8, ISBN print 978-3-318-03970-2. DOI: 10.1159/000402337.
20. Rioja-Lang FC, Roberts DJ, Healy SD, Lawrence AB, Haskell MJ. Dairy cows trade-off feed quality with proximity to a dominant individual in Y-maze choice tests. *Appl Anim Behav Sci*. 2009; 117 (3–4): 159–164. DOI: 10.1016/j.applanim.2008.12.003.
21. Roden C, Hilde V, Guy M, Linda VE. Reproductive success of bison bulls (*Bison bison bison*) in semi-natural conditions. *Anim Reprod Sci*. 2003; 79 (1–2): 33–43. DOI: 10.1016/S0378-4320(03)00084-8.
22. Tamayo-Canul J, Alvarez M, López-Urueña E, Nicolas M, Martínez-Pastor F, Anel E, Anel L, de Paz P. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim Reprod Sci.* 2011; 126 (1–2): 76–82. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.04.011.

23. Tirpan MB, Olğaç KT, Gürler H, Kaya U. Effects of different equilibration conditions on cryopreserved bovine sperm quality. *Kocatepe Vet Dergisi.* 2017; 10 (2): 57–62. Available at: https://dergipark.org.tr/tr/pub/kvj/issue/32997/368489
24. Turbek SP, Scordato ESC, Safran RJ. The role of seasonal migration in population divergence and reproductive isolation. *Trends Ecol Evol*. 2018; 33 (3): 164–175. DOI: 10.1016/j.tree.2017.11.008.
25. Wang Z, Gong W, Yao Z, Jin K, Niu Y, Li B, Zuo Q. Mechanisms of embryonic stem cell pluripotency maintenance and their application in livestock and poultry breeding. *Animals*. 2024; 14 (12): 1742. DOI: 10.3390/ani14121742.
26. Zubets MV, Tokarev NF, Vynnychuk DT. *Ethology of Cattle.* Kyiv, Agrarna Nauka, 1996: 212 p. (in Ukrainian)

Influence of natural selection on the reproductive function in bulls

V. I. Petrenko, V. I. Barabash
izkzoo3337@gmail.com

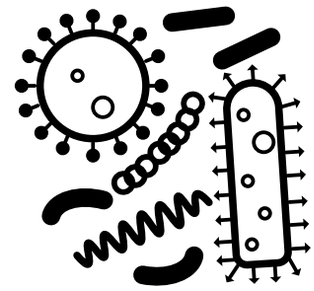
Institute of Grain Crops NAAS, 14 Volodymyra Velykoho str., Dnipro, 49027, Ukraine

The article presents long-term research results on the impact of natural and sexual selection on the reproductive function in bulls under tethered and loose housing conditions. It was found that dominant males within the herd hierarchy have preferential access to resources and mates, resulting in decreased libido, semen quality, and reproductive activity in subordinate bulls. Rank-related stress is identified as a key factor causing impotence and reproductive failure in these animals. Dominant individuals demonstrated superior adaptability, higher sperm production, and neurotypical characteristics associated with leadership. A comprehensive assessment of physiological, ethological, biochemical, and morphological parameters revealed effective strategies for improving housing conditions, mitigating the impact of intrasexual selection, and stabilizing reproductive function in breeding herds. For the first time, the type of higher nervous activity in bulls is proposed as a selection criterion for forming a high-performance breeding stock. The findings are crucial for refining bull management, selection, and application in artificial insemination and genetic improvement programs.

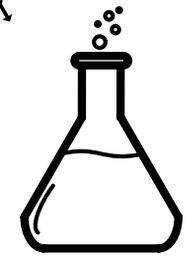
Keywords: bulls, natural selection, sexual function, rank stress, herd hierarchy

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН ПРОВОДИТЬ:

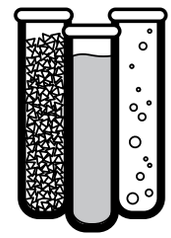
- Дослідження біохімічних показників (аналізатор *Humalyzer 2000*, Німеччина)
- Гематологічний аналіз (аналізатор *Mythic-18Vet*, Швейцарія)
- Мікробіологічні дослідження (посів на стерильність, антибіотикограма, склад мікрофлори кишечнику тварин, мікробіологічний аналіз кормів, води, повітря)



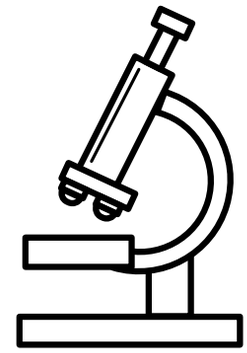
- Імуноферментні дослідження (аналізатор *Stat Fax 3000*, Німеччина)



- 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!

AMCOVET

ВЕТЕРИНАРНІ ПРЕПАРАТИ

від відомих світових виробників

Ексклюзивний авторизований дистриб'ютор компаній:

kela focus on health

agrovetmarket animalhealth

InoVet

Veko INNOVATION, CARE & ANIMAL HEALTH

Україна, м. Київ,
вул. Ґарета Джонса, 15, оф. 201
Моб.: +380 (67) 224-59-34
Моб.: +380 (67) 219-21-99
office@amcovet.com.ua

Запрошуємо до співпраці!

amcovet.com.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