

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

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

**Засновник:** Інститут біології тварин НААН.

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

**Мова видання:** українська, англійська.

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

**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-Кульницька М. Р.

**Комп'ютерна верстка:** Судин К. Ю.

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

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

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

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

**Language:** Ukrainian, English.

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

**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)

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

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

**Вішур 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)

**Гжегоцький 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)

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

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

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

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

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

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

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

**Кулік Джордж**, Медичний центр Університету Вейк Форест (США)

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

**Луговий Богдан**, Університет Маунт Сент Вінсент (Канада)

**Луцак 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 Павел**, Університет ветеринарної медицини та фармації в Кошице (Словаччина)

**Муравський Ірина Іванівна**, 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.animbior@gmail.com  
**Вебсторінка:** <http://aminbiol.com.ua>

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



ІНСТИТУТ  
БІОЛОГІЇ  
ТВАРИН  
НААН

ISSN 1681-0015 (print)

ISSN 2313-2191 (online)

DOI: 10.15407/animbiol

# БІОЛОГІЯ ТВАРИН

---

## The ANIMAL BIOLOGY

2025 ▪ Volume 27 ▪ Issue 4 ▪ Issue DOI: 10.15407/animbiol27.04

---

### EDITORIAL COUNCIL

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

**Halyna Antonyak**, Ivan Franko National University of Lviv (Ukraine)  
**Paweł Mieczysław Bartlewski**, Ontario Veterinary College, University of Guelph (Canada)  
**Rostyslav Bilyy**, Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ukraine)  
**Nicolai M. Doliba**, University of Pennsylvania (United States)  
**Yelyzaveta Fedorovych**, Institute of Animal Biology NAAS (Ukraine)  
**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 Kłoczek**, University of Agriculture in Kraków (Poland)  
**Yaroslav Korpan**, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Ukraine)  
**Igor Kotsymbas**, 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)

---

## ЗМІСТ

### **Огляд**

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Okunlo O. O., Lawal T. E., Alalade J. A., Ayoola M. O., Adebisi I. A.<br>Огляд стану виробництва молочної продукції у Нігерії .....  | 3  |
| Suslova N. I., Semionov O. V.<br>Новітні підходи та перспективи лікування міксоматозної дегенерації мітрального клапана у собак..... | 14 |

### **Дослідження**

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bura M., Vantsura V., Shalai Ya., Mandzynec S., Mitina N., Zaichenko O.<br>Морфометричний та дисперсійний аналіз параметрів ембріона в'юна за впливу ПЕГ-носія .....                                        | 22 |
| Gavrylenko A. V., Masjuk D. M.<br>Вплив суміші органічних кислот та гліцеридів на регуляцію бар'єрної функції кишечника поросят за використання SCFA-M:<br>аналіз молекулярних маркерів .....               | 30 |
| Fedynshyn N. I.<br>Точне налаштування профілів фолатів та мікроелементів для зменшення резорбції ембріонів у домашніх кроликів.....                                                                         | 36 |
| Mokhnachova N. B., Suprovich T. M., Suprovich M. P.<br>Поліморфізм гена BoLA-DRB3 української бурої породи .....                                                                                            | 42 |
| Aminov R. F., Omelyanchik L. O., Tavrog M. L., Aminova A. S., Pototska O. I.<br>Прискорення регенерації волоссяних фолікулів під впливом екстракту <i>Hirudo verbana</i> у моделі різаної рани у щурів..... | 47 |
| Kamratska O.<br>Морфологічний та імунологічний профіль крові поросят за впливу кормової добавки «Глобіген Джамп Старт»<br>та несприятливих параметрів мікроклімату.....                                     | 53 |
| Teniaev V., Saenko A., Peka M., Tsereniuk O.<br>Генотипування свиней української великої білої породи за інтронним поліморфізмом гена <i>HMGA1</i> .....                                                    | 58 |
| Vorobets P. Y.<br>Динаміка вмісту мікроелементів у молочці маточному бджолоному різних порід (підвидів) медоносних бджіл<br>залежно від місяця його відбору .....                                           | 64 |
| Ivanytskyi I. T., Sharan M. M.<br>Концентрація окремих гормонів і якість сперми кнурів після згодовування ліпосомального комплексу вітамінів<br>з глюконатом цинку в умовах теплового стресу.....           | 70 |
| Dul S. Yu., Prudyus T. Ya.<br>Ефективність використання інактивованих глутатіонових дріжджів у годівлі перепілок м'ясо-яєчного напрямку.....                                                                | 77 |
| Hurenko O. O., Drozdovska S. B.<br>Зміни мікробіому кишки під впливом фізичних вправ в умовах метаболічних порушень.....                                                                                    | 83 |

## CONTENTS

### **Review**

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Okunlo O. O., Lawal T. E., Alalade J. A., Ayoola M. O., Adebisi I. A.<br>A review of the state of dairy production in Nigeria .....         | 3  |
| Suslova N. I., Semionov O. V.<br>New approaches and prospects for the treatment of myxomatous degeneration of the mitral valve in dogs..... | 14 |

### **Experimental works**

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bura M., Vantsura V., Shalai Ya., Mandzynets S., Mitina N., Zaichenko O.<br>Morphometric and ANOVA analysis of the loach embryo parameters under the PEG-carrier influence.....                          | 22 |
| Gavrylenko A., Masiuk D.<br>The effect of organic acids mixture in the form of glycerids on the regulation of intestinal barrier function in piglets using SCFA-M:<br>analysis of molecular markers..... | 30 |
| Fedynshyn N.<br>Fine-tuning folate and micronutrient profiles to reduce embryo resorption in domestic rabbits.....                                                                                       | 36 |
| Mokhnachova N. B., Suprovich T. M., Suprovich M. P.<br>Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Ukrainian brown breed.....                                                                              | 42 |
| Aminov R. F., Omelyanchik L. O., Tavrog M. L., Aminova A. S., Pototska O. I.<br>Morphometric changes of hair follicles in rat excisional wounds treated by <i>Hirudo verbana</i> extract.....            | 47 |
| Kamratska O.<br>Morphological and immunological profile of piggles blood under the influence of feed additive "Globigen Jump Start"<br>and adverse microclimate parameters.....                          | 53 |
| Teniaev V., Saenko A., Peka M., Tsereniuk O.<br>Genotyping of Ukrainian Large White pigs by intronic polymorphism in <i>HMGA1</i> gene .....                                                             | 58 |
| Vorobets P. Y.<br>Dynamics of the content of trace elements in royal jelly of different breeds (subspecies) of honey bees<br>depending on the month of its collection.....                               | 64 |
| Ivanytskyi I. T., Sharan M. M.<br>Concentration of some hormones and quality of boar semen after feeding liposomal vitamin complex with zinc gluconate<br>under heat stress conditions .....             | 70 |
| Dul S. Yu., Prudyus T. Ya.<br>Efficiency of using inactivated glutathione yeast in the feeding of meat-and-egg quails .....                                                                              | 77 |
| Hurenko O. O., Drozdovska S. B.<br>Exercise-induced modulation of the gut microbiome in metabolically dysregulated state .....                                                                           | 83 |



## A review of the state of dairy production in Nigeria

O. O. Okunlola<sup>1</sup>, T. E. Lawal<sup>2</sup>, J. A. Alalade<sup>1</sup>, M. O. Ayoola<sup>2</sup>, I. A. Adebisi<sup>1</sup>

olujuwonokunlola@yahoo.com



<sup>1</sup>Oyo State College of Agriculture and Technology, Faculty of Animal and Fisheries Technology, Department of Animal Production Technology, PMB 10, Igbo-ora, Oyo State, Nigeria

<sup>2</sup>Bowen University, College of Agriculture, Engineering and Sciences, Animal Science and Fisheries Unit, Agriculture Programme, Iwo, Osun State, Nigeria

### ORCID:

O. O. Okunlola <https://orcid.org/0000-0002-4940-6824>

### Authors' Contributions:

OOO: Writing — original draft.

LTE: Supervision.

AJA: Project Administration.

AMO: Methodology; Investigation.

AIA: Formal analysis.

### Declaration of Conflict of Interests:

The authors declare that we do not have competing interests whatsoever.

### Ethical approval:

Not applicable.

### Acknowledgements:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Nigeria's population is projected to approximate 400 million by 2050, and food security is essential for sustaining a stable, cohesive, and secure nation. This reality indicates that the existing reliance on imports for the food requirements of Nigerians must be reduced, which can be accomplished primarily through substantial investments in agriculture to enhance productivity and self-sufficiency. Livestock farming, encompassing dairy production, is a sector of significant interest and strategic importance for economic diversification and food security. Nonetheless, the sector's contribution to Nigeria's overall agricultural output is markedly minimal, necessitating strategic measures to stimulate sustainable development. The dairy sector in Nigeria necessitates immediate attention due to numerous challenges, including sub-standard animal husbandry practices, inadequate and low-quality feed, prevalent diseases and insufficient animal health management, restricted access to water in the dry season, detrimental impacts of climate change, minimal investment in research and development, infrastructural deficiencies, and limited access to financing. This review acknowledges the significance of developing homemade solutions to address local issues by establishing clear objectives to enhance milk production through increased productivity among both smallholder and commercial dairy farmers, while promoting backward integration in milk production, collection, and aggregation.

**Key words:** dairy, policy, Nigeria, milk production

## Introduction

Nigeria's current human population is approximately 210 million, making it the seventh most populous country globally [31]. The national population is anticipated to reach 400 million by 2050, positioning it as the third most populous country following India and China. Food security is increasingly problematic, with rising food demand being satisfied by imports. Milk is the predominant dairy product in Nigeria. It constitutes 61 % of the revenue in the dairy sector. It is ingested as either fresh cow's milk or processed forms, including powdered milk, condensed milk, evaporated milk, newborn formula, and fermented milk. There are around 20.6 million cows, of which 2.3 million are lactating, yielding an estimated annual milk production of 672 million kilograms [20].

Approximately 95 % of cattle in Nigeria are privately owned and overseen by indigenous nomadic ranchers. The remaining 5 % is possessed by medium and large-scale farmers in controlled pastures. In Nigeria, milk production is predominantly derived from cattle, with negligible contributions from goats and sheep.

Nigerian cattle provide roughly 570 million kilograms of the annual milk supply, which totals 1.6 billion kilograms, with the remainder sourced from imports. Nigeria's milk production constitutes approximately 13 % of West African output and 0.01 % of global production; nonetheless, it relies significantly on imports (60 %) to address the supply imbalance [35].

In the country, three primary production systems are discernible: pastoral (traditional), semi-intensive, and commercial (intensive), with the pastoral and



semi-intensive systems generating the majority of milk consumed in both rural and urban regions of Nigeria. The Nigerian dairy sector primarily operates on a subsistence basis, yielding approximately 450,000 tons of milk annually [23].

This production has proven insufficient to meet the dairy requirements of Nigeria [23]. The productivity of cattle in Nigeria is reportedly suboptimal due to several factors, including the low genetic potential of indigenous breeds, feed scarcity, disease prevalence, inadequate management, and substandard breeding practices, which may result in prolonged days open, delayed age at first calving, extended calving intervals, reduced lactation duration, and diminished milk yield. The local dairy production in Nigeria significantly lags behind the yearly demand, which was projected at 1.45 billion kilograms in 2010 [23], resulting in a per capita milk consumption of less than 10 kilograms, compared to the global benchmark of 40 kilograms per capita.

### Dairy cattle production in Nigeria

The distribution of the cattle population in Nigeria has been significantly affected by the presence of tsetse flies and the diseases they transmit, a phenomenon peculiar to tropical Africa. The most substantial cattle population in Nigeria is located in the extensively tsetse-fly-free northern regions of the country. Consequently, it is unsurprising that historically, the majority of Nigeria's cattle population, predominantly of the humped zebu kind, is raised in the northern region of the country.

Nevertheless, the Keteku, Muturu, Ndama, and Kuri cattle breeds are located in the Southwestern, Southeastern, and Northeastern regions of the country, respectively [10]. In the dry season, many Zebu cattle herds from the North are compelled to migrate southward into tsetse-fly-infested areas for seasonal transhumance to access superior grass and increased water availability [11].

The gradual decline of the tsetse fly problem in Southern Nigeria, primarily due to deforestation, has significantly diminished the natural habitats and wildlife hosts of the tsetse fly. Consequently, through natural selection and co-adaptation, this has resulted in the evolution of less virulent forms of the disease and the emergence of trypanosomiasis-tolerant Zebu cattle populations [10].

Historically, traditional dairy production in Nigeria is predominantly concentrated in the Northern regions, particularly among the Fulani, who have specialised in cattle husbandry for millennia and possess an estimated 90 % of the nation's cattle population. The Fulani males focus on cattle rearing, while the women are responsible for milking the cattle [4, 35, 40].

Inadequate infrastructure, such as road networks, has significantly impeded the delivery of milk products. This elucidates why conventional dairy products are predominantly found in the northern regions of the country [3].

**Table 1.** Nigeria: Cattle population by production system

|                   | Extensive  | Semi-intensive | Intensive |
|-------------------|------------|----------------|-----------|
| Cattle population | 15 111 309 | 3 089 804      | 203 548   |

Source. GLW 3.0 and Federal Ministry of Agriculture and Rural Development, 2017

Nigeria is expected to have 18.2 million cattle. They are mostly overseen in substantial herds by semi-sedentary and transhumant pastoralists. The majority of animals are dual-purpose indigenous breeds, such as the Bunaji, Sokoto Gudali, and Rahaji. Extensive commercial farms cultivate imported exotic breeds and their hybrids. Nigeria has three dairy cattle production systems: the extensive or traditional system, the semi-intensive (agro-pastoral) system, and the intensive (modern) system [6]. Approximately 82 % of animals are reared in large systems, 17 % in semi-intensive systems, and roughly 1 % in intensive systems. A fourth production system, the commercially orientated urban farmers, has begun to appear but remains somewhat marginal [30].

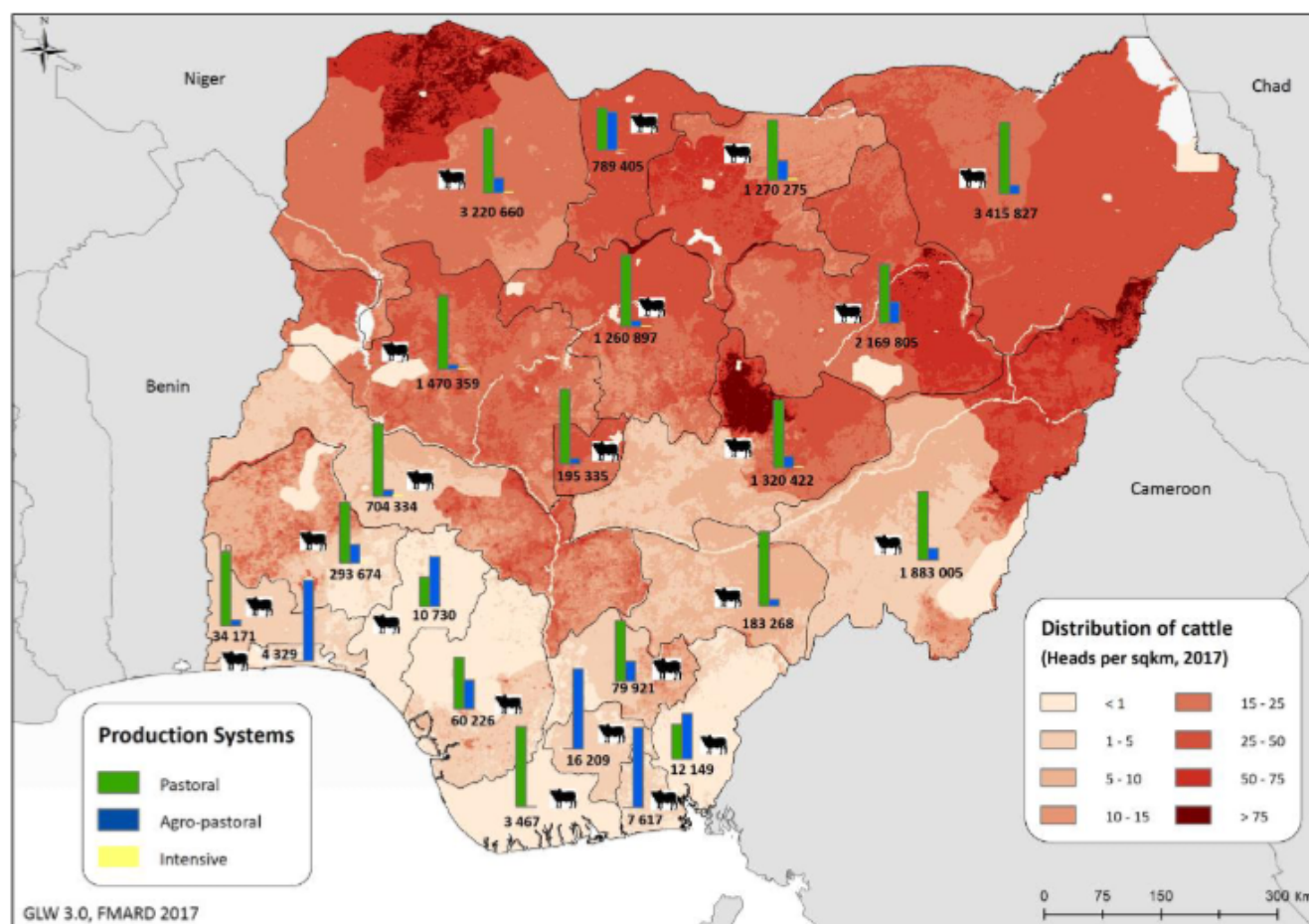
Current milk production totals 585,000 tons annually, or 13 % of West African milk output. A 2014 industry analysis indicates that the dairy sector is the second largest section of the food business in Nigeria. Since 2010, it has shown an annual growth rate of 8 %, with an anticipated revenue of 345 million Naira (USD 2 billion) in 2013 [12]. Nigeria's dairy production is predominantly subsistence-based, exhibiting low productivity; the average annual yield per cow is 213 kilograms, which is less than one-tenth of the global average [30]. The nation is a net importer of milk and dairy products, with domestic production satisfying approximately 40 % of milk demand, while the remaining 60 % is sourced from imports [30]. The per capita consumption of dairy products is approximately 10 kilograms annually, being one-fourth of the global average.

#### *The extensive (pastoral) dairy production system*

The comprehensive dairy production system defines arid and semi-arid regions and entails the relocation of animals in pursuit of forage and water. Herders maintain cattle and other livestock, such as small ruminants, while abstaining from agricultural cultivation. Production is primarily subsistence-based, yet quantifying its extent is challenging due to intra-country and inter-country animal migrations [30]. The main characteristics of this production system are the following:

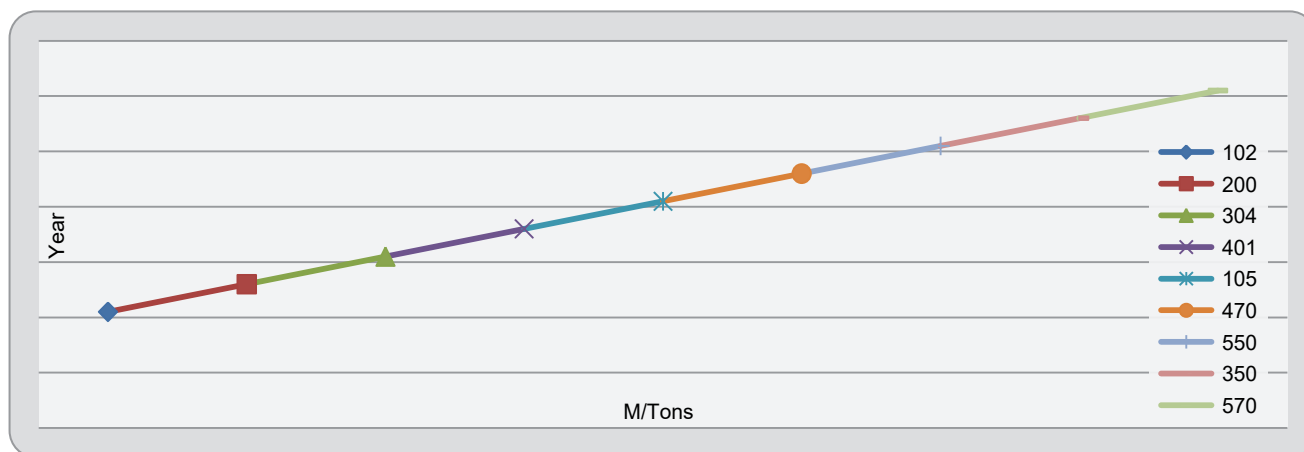
#### *The semi-intensive (agro-pastoral) dairy production system*

In a semi-intensive agro-pastoral production system, farmers cultivate crops and rear dairy livestock, with distinct boundaries separating area allocated for cultivation from that designated for grazing [6]. Farmers transport livestock to grazing areas and water supplies based on seasonal variations, with output being both subsistence-oriented and commercial [30].



**Fig. 1.** Milk production systems in Nigeria

Source. GLW 3.0 and Federal Ministry of Agriculture and Rural Development, 2017



**Fig. 2.** Dairy milk production in Nigeria, 1981 to 2021, metric tons

Source. [34]

#### *Intensive (commercial) dairy production system*

The intensive or commercial dairy system in Nigeria accounts for around 5 % of the nation's total milk production [30]. Dairy farms vary in size, encompassing small, medium, and big operations. Production is commercially driven, with farmers striving to optimise productivity:

animals are of exotic and cross-breeds; feeding and bio-security procedures are suitable, with animals housed inside or in sheds or paddocks; milking is mechanised [30]. Approximately 80 % of commercial dairy farms are situated in the North Central region. The primary features of this system are as follows [6, 12, 30].

## Four Major Dairy farming system in Nigeria

Two primary categories of dairy producers manage Nigerian dairy cattle. Pastoralists maintain approximately 95 % of the national dairy herd, while commercial dairy producers account for roughly 5 %. The pastoralists are categorized into three sub-groups, each maintaining their livestock for distinct purposes and employing varied breeding procedures. The subgroups are as follows:

### *Non-settled pastoralists (nomads)*

The cattle are primarily passed down through familial lines, with the total herd potentially reaching 300, including sheep and goats. In this nomadic cattle-rearing system, herders relocate between states in pursuit of sustenance and hydration. Pastoralists refrain from agricultural practices, traversing extensive distances for water and pasture, often crossing national and international borders. The livestock typically comprises indigenous breeds such as Bunaji and Gudali. Reproduction occurs naturally without intervention, and feed is sourced from fallow lands, grazing reserves, and crop residues without supplementation. Family labor is employed, resulting in low milk production (0.5–1 kg), which increases during the rainy season. In the dry season, as water levels diminish, they migrate to river basins to secure adequate water supplies.

### *Settled peri-urban pastoralists (agro-pastoralist)*

Cattle are predominantly passed down through familial lineage and are cultivated for commercial objectives. Herdsmen may have resided in certain grazing reserves for over 20 years, possessing 20 to 100 herds of predominantly indigenous cattle breeds. Animals graze in harvested fields and fallow land owned by agriculturalists or adjacent communities, with labor primarily being family-based and reproduction occurring naturally without intervention. Farmers employ a degree of feed supplementation with agricultural by-products; cows are milked once daily, resulting in poor milk production. However, due to the substantial number of animals, a significant volume can be harvested. Milk is subjected to local processing to produce sour milk, sour yoghurt, butter, and soft cheese. Treatment is facilitated through intervention by the government and, at times, the private veterinary sector.

### *Urban pastoralists*

Cattle are bred for commercial purposes, and farmers are market-oriented; the cattle are primarily indigenous, with a limited number of crossbreeds. The herd size per home varies between 5 and 20 heads. Smallholder dairy farming enhances household resilience, food and nutrition security, and provides a significant source of income for rural residents. Farmers are occasionally situated in urban areas and engage in zero-grazing or semi-intensive grazing, acquiring crop residues and agricultural by-products, with feed supplements serving as

the primary source of nourishment. The farmer is market-oriented but lacks proficiency in product processing; therefore, milk could easily become a liability unless effectively utilized. This cohort of herdsmen is amenable to governmental intervention and can be readily organized into clusters to enhance national milk output.

### *Commercial dairy farming*

Substantial herds (exceeding 100 dairy cows), the development of heifer replacements, zero grazing practices, extensive mechanization, heat stress management, and the use of artificial insemination define commercial dairy farming. All activities are centralized in one place, encompassing feed production, raw milk processing, cattle management, and associated infrastructure and facilities. This constitutes a little segment (5 %) of dairy farmers in Nigeria. The quantity of animals varies from 50 to 1,000 milking cows. Zero-grazing is frequently implemented. Enhanced feed production utilising pastures of high-quality forages such as Hybrid Napier, Brachiaria, Chloris, Gamba, and Stylo is emerging as a non-rainfed feed resource on these farms. Nutrition is augmented by grain and oil-laden agricultural by-products. Forage conservation is occasionally implemented, and mineralized salt licks are also supplied.

## The Contribution of Dairy Products to Nutrition and Human Livelihood in Nigeria

Dairy products are a vital and complex element of global human nutrition, profoundly impacting not only basic dietary needs but also the economic and social welfare of communities, particularly in developing countries like Nigeria. Dairy products from cows, goats, and sheep, encompass a variety of dietary items including milk, cheese, yoghurt, and butter, each with a distinct nutritional composition essential for human health. The incorporation of dairy farming into the agricultural frameworks of developing nations such as Nigeria presents significant potential for bolstering food security, enhancing nutritional health, and promoting economic empowerment, especially among rural communities where agriculture is fundamental to their livelihoods. The potential of dairy farming to provide essential income and sustenance for a considerable segment of the rural impoverished highlights its significance in poverty alleviation, job creation, and diminishing income inequality, thus promoting a more equitable and balanced rural economy. The growing significance of the dairy sector in the global economy underscores the essential requirement for national competitiveness, propelled by globalization, trade liberalization, and enhancements in transportation and communication, which together stimulate market competition and provide consumers with a wider array of goods and services, consequently elevating living standards through competitive pricing and diminished market volatility.

## Nutritional Significance of Dairy Products

Dairy products are nutritional powerhouses, offering a diverse range of critical nutrients crucial for human health across all life stages. Milk, the principal dairy product, is a superior source of high-quality protein, encompassing all essential amino acids required for tissue construction, repair, and diverse metabolic processes. Dairy products are notably abundant in calcium, a mineral essential for bone health, nerve transmission, muscular function, and blood coagulation. Dairy products supply vital B vitamins, important for energy metabolism and the maintenance of a healthy neural system.

**Table 2.** Dairy consumption in the six geopolitical zones of Nigeria

| Zones         | Dairy milk consumption |
|---------------|------------------------|
| North East    | 78                     |
| North Central | 101                    |
| North West    | 87                     |
| South East    | 116                    |
| South Central | 104                    |
| South West    | 82                     |

Source. [34]

## Dairy value addition in Nigeria

The Nigerian milk industry encompasses activities including dairy production, processing, marketing, importation, and consumption. Nonetheless, these activities have not received significant attention despite several initiatives by governmental and non-governmental organizations. The Nigerian dairy value chain comprises a significant proportion of pastoralists, contributing around 95 % of the dairy production. Raw milk is converted into various dairy products, such as wara, nunu, kindirmo, manshanu, and cuku, on a small scale and sold informally on the streets for domestic use by the producers. Diverse dairy products are marketed in the formal sector use a blend of imported and domestically sourced milk. Due to the restricted milk production by pastoralists, a significant portion of the milk inputs utilized by commercial processors is imported [41]. Significant populations of indigenous cattle are mostly found in Northern Nigeria, where herders engage in land and crop residual grazing, and raw milk along with other dairy products are marketed locally at community markets. The majority of commercial dairy farms, which account for less than 10 % of total output, are located in the central region. The predominant population of cattle in Nigeria is located in the northern region. Approximately 99 % of these cows are indigenous varieties, with fewer than 1% imported from the Netherlands and South Africa [7]. In Northern Nigeria, where cattle constitute over 50 % of the population, cow husbandry and dairy farming have substantially enhanced household welfare and serve as a vital source of livelihood for many in the region.

## Nigeria's dairy development

As of 1986, the dairy business provided income for around 183,000 rural households [21]. The dairy sector offers employment and generates cash through commercial milk processing facilities and marketing campaigns. Currently, despite the existence of 63 recognised milk processing facilities, only a limited number remain operational. Entities that continue to engage in processing activities operate at under 20 % of their capacity. Foreign milk processing companies that predominantly utilize imported milk powder for the production and sale of milk and dairy products have dominated the Nigerian dairy industry.

Between 1962 and 1968, as well as from 1981 to 1985, the Nigerian government, enhancing the standards of living for all citizens, implemented numerous national development plans. During this time, significant focus was directed towards the dairy industry, which possesses the potential to improve nutrition. The government developed dairy farms with both indigenous and exotic cattle breeds in designated areas throughout the states.

Additionally, mobile collection sites and milk collection units were established. The milk collecting programs commenced in the late 1920s when the veterinary department in Vom, Jos, received support from the Northern area government of Nigeria to create these units in Northern Nigeria. Milk was transported to the collecting units by the pastoralists' wives for the purposes of cream separation and clarified butter fat (CBF) manufacture.

In 1939, the veterinary department in Vom (Jos-Plateau) constructed a milk processing facility focused on butter production. The primary supply of milk for the factory was the Fulani women via a network of milk collecting centres, supplemented by milk from the Vom dairy. In 1940, a comparable project was initiated in Kano State.

Nigeria possesses the fifth largest cattle population in Africa, trailing Ethiopia, Sudan, Chad, and Tanzania, with an estimated 20.5 million cattle, including 2.35 million dairy cows. Notably, 99 % of these cattle are indigenous breeds, contributing to over 90 % of the total annual milk production. The milk is derived from low input, low yielding pastoral systems and is predominantly traded within an informal value chain system [32]. Nigeria must enhance its domestic dairy production due to the escalating population and daily demand for dairy products [20]. Nigeria's dairy import control strategy has been ineffectual, resulting in substantial annual expenditures of foreign cash on dairy imports. Nigeria's population exceeds 180 million and its yearly milk consumption is 1.3 million tons. Regrettably, 60 % of dairy products are imported and utilised. The Central Bank of Nigeria (CBN) reports that Nigeria imports milk and dairy products valued at \$1.5 billion per year.

The Federal Government established the Nigerian Dairy Development Programme (NDDP) to further its dairy transformation strategy by showcasing proof-of-scale in processor-led initiatives for dairy development in



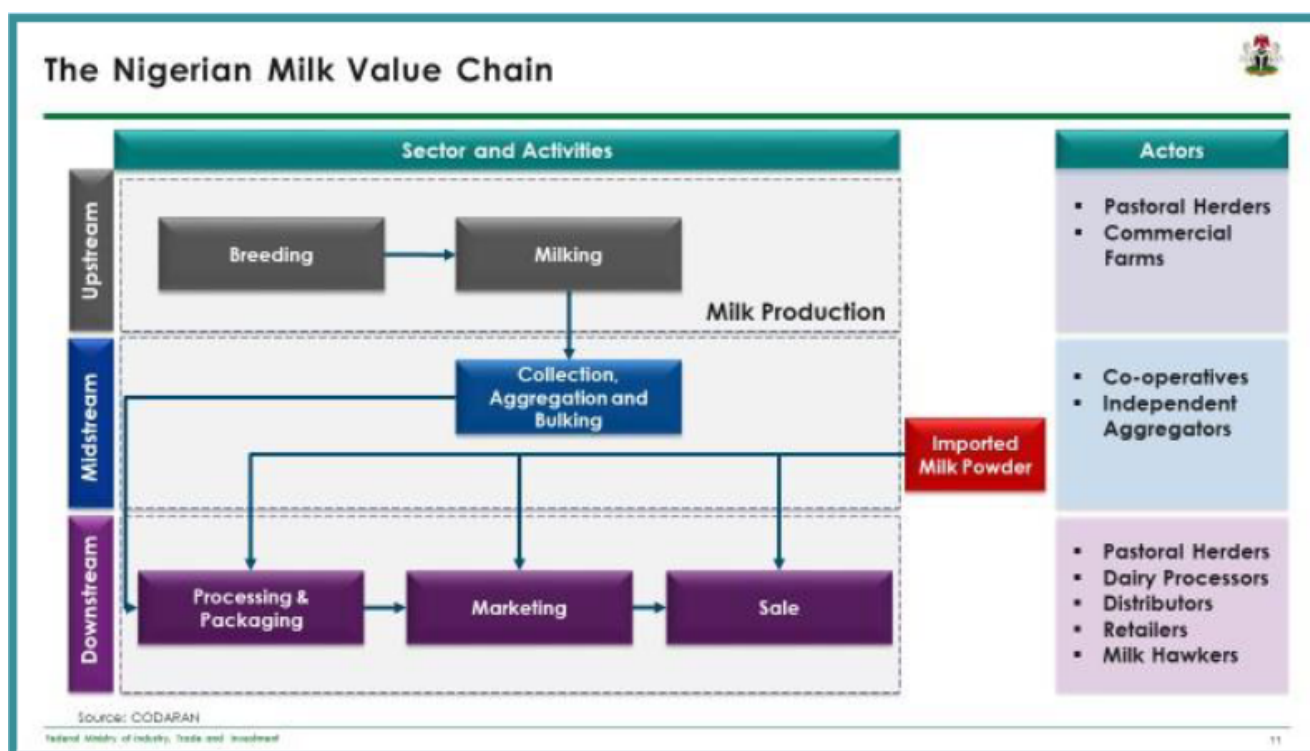


Fig. 3. The Nigerian milk value chain

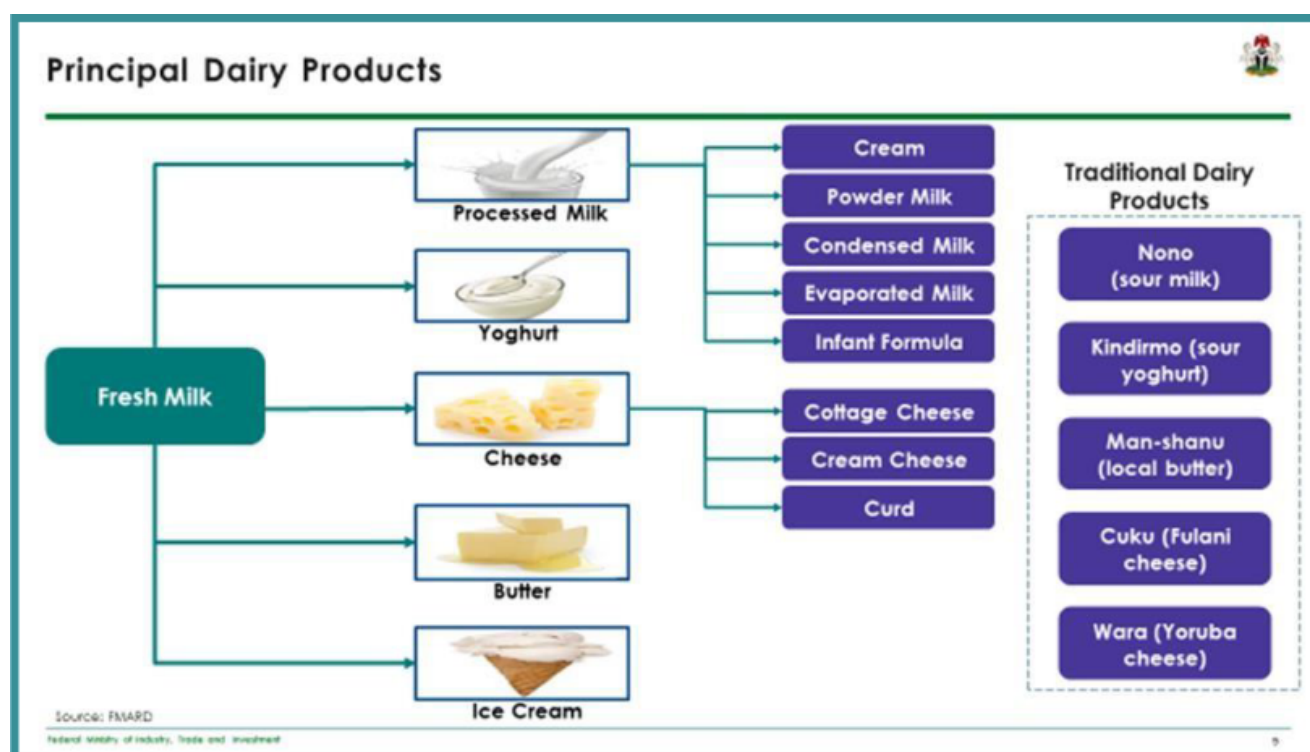


Fig. 4. Principal dairy products

Nigeria. The NNDP initiative enhances the livelihoods of participating dairy farmers in Nigeria by augmenting cow yield and productivity, while also integrating them into the formal dairy value chain. The initiative encompasses a nutrition and gender component aimed at enhancing nutritional outcomes and empowering women in small-holder agricultural communities.

### Recent trends in Dairy developments in Nigeria

Recently, the Nigerian dairy sector has experienced notable advancements, including the introduction of government initiatives like the National Livestock Transformation Program (NLTP). The National Livestock Transformation Program (NLTP) indicated that Nigeria

generates 526,000 kilograms of milk annually, whereas annual consumption amounts to 1.2 million kilograms. Approximately \$1.3 billion is expended annually on milk imports. Various governmental and non-governmental parastatals that have significantly contributed to the advancement of the dairy industry in Nigeria include Vom Dairy (Plateau State), Shonga Dairies (Kwara State), the back-to-farm initiative by the Kwara State government, the National Project for Cattle and Buffalo Breeding (NPCBB), the Agege Dairy Development Project (Agege, Lagos), Moor Plantation Dairy Farm (Ibadan), the Intensive Dairy Development Programme (IDDP), the Strengthening Infrastructure for Quality and Clean Milk Production (SIQ and CMP), Cooperatives Union, the National Programme for Dairy Development (NPDD), United African Company (UAC), Friesland Campina WAMCO, New Zealand, Arla Foods, Neon Agro, Chi Limited, and Irish Dairy, among others.

In recent decades, the Nigerian dairy market has predominantly been dominated by European dairy corporations, including Friesland Campina WAMCO, Arla, PZ Wilmar, and Fan Milk, all of whom depend on milk imports for their product manufacturing. Friesland Campina WAMCO is among the few global corporations who procure raw milk locally. The unprocessed milk from the cows of Integrated Dairy, L&Z Integrated farms and Nagari farms are also acquired from pastoralists and peri-urban agriculturists.

In 2010, Friesland Campina WAMCO, Nigeria, became the first entity to get raw milk locally for the production of diverse milk and dairy products, with herders supplying the predominant raw materials utilised in this manufacturing process. Through their dairy development effort, they enhanced local farmers in three ways: augmenting productivity per cow, improving raw milk quality and safety, and assisting farmers in securing a market for their milk.

Friesland Campina WAMCO has contributed to enhancing the livelihoods of numerous individuals and has aided farmers by providing essential infrastructure, facilitating genetic enhancement through artificial insemination and cross-breeding, establishing smallholder dairy farms, and constructing demonstration farms, as well as developing pastures and fodder for livestock, across various states in the country [22].

Friesland Campina has significantly enhanced Nigeria's local milk procurement by creating a milk bulk-ing centre, multiple milk collection centres, and 20 milk collection locations across various states; they are the foremost importer and processor of milk products in Nigeria. In 2022, it was reported that 10 % of the 60 million kilograms of raw milk utilized by the corporation will be supplied domestically in the forthcoming years at a price equivalent to the global market rate. Friesland Campina WAMCO has effectively collaborated with the Federal Ministry of Agriculture and Rural Development, the Ministry of Trade and Industry, the Central Bank of Nigeria, various State Governments, the National

Animal Production Research Institute, and the Dutch Government, among others. They have aided the pastoralists by supplying temperature-regulated milking cans and 80 solar-powered boreholes throughout the states. They have facilitated the formation of 23 dairy cooperatives across several locations: 15 in Oyo State, 3 in Ogun State, 5 in Oyo State, 1 in Niger State, 2 in Kwara State, and 1 in Ondo State. The dairy cooperative union has facilitated the policy-making process and eradicated intermediaries in the dairy value chain, hence simplifying market price regulation. The Central Bank of Nigeria (CBN) reports that the country annually expends between \$1.2 billion and \$1.5 billion on milk and dairy imports to compensate for the deficiency in local production.

In July 2019, the Governor of the central bank, Godwin Emefiele, proposed a backward integration strategy for obtaining raw materials, aimed at significantly attracting investors, enhancing investments in the dairy sector, and concurrently discouraging milk imports.

### **Application of new technologies to improve dairy production**

The employment of digital technology, proactive implementation, and the deployment of sophisticated automated process control systems are essential for ongoing dairy advancement in contemporary society. Contemporary dairy farmers and processors enhance cow comfort, milk quality, production, and sustainability using advanced agricultural technologies, innovative feed additives, methane digesters, robotics, and water and energy saving methods. Carbon-neutral and plant-based milk products have gained prevalence in the dairy sector, resulting in safer and more nutritious dairy offerings [2].

The implementation of advanced dairy farming techniques, the Internet of Things (IoT), various artificial intelligence methodologies, and other digital technologies, including energy inputs from Renewable Energy Sources, can aid farmers in addressing traditional agricultural challenges and enhancing milk production [15]. It guarantees the elevated productivity of excellent milk and establishes the degree of contemporary dairy sustainability [29].

The contemporary dairy industry has embraced digitalization and sophisticated agricultural technologies, enabling farm managers to efficiently fulfil their responsibilities and guarantee food security. The battle for market share and increasing demand for milk and dairy products expedite the advancement of digital technologies in the dairy sector, facilitating sustainable expansion and enhancing agribusiness efficiency [29]. Smart dairy farming, employing advanced sensing and data analysis technologies, is a widely embraced concept that addresses the increasing demand for high-quality dairy products, mitigates environmental issues, optimizes resource utilization, and enhances animal health. Contemporary dairy farmers have mastered genetic modification to enhance

milk production from fewer cattle by focusing on sustainable agricultural practices. Consequently, reduced greenhouse gas emissions are produced. Cows exhibiting superior productivity compared to their ancestors are selected and bred utilizing advanced technology, including artificial insemination, genetic breeding, and phenotyping techniques. This allows dairy farmers to breed cows with enhanced genetic traits for milk production in a secure setting, preserving genetic diversity and maintaining essential biological mechanisms (including health, resilience, robustness, welfare, and longevity) in predominant dairy cattle breeds. The implementation of digital technology in dairy farms indicates a significant requirement for advanced expertise among dairy staff [8]. The depletion of freshwater resources due to population increase, natural calamities such as droughts, fires, and floods, along with increasing global food demand, renders sustainable water management one of the most significant concerns.

Cogato et al. [15] indicated that robotic milking systems exhibit superior water efficiency compared to traditional milking parlours, since they utilize an exact quantity of water for automatic milking and cleaning processes. Likewise, the water consumption of cattle cannot be evaluated. Implementing a mix of water conservation methods, including air temperature reduction and cow preparation protocols, might substantially decrease the overall yearly water use on dairy farms. Production methods, energy use, and dairy waste are acknowledged as the primary contributors to environmental impact [20]. Packaging materials, especially for infant formula, and energy use throughout specific life cycle stages should be prioritized, as they are the primary contributors to the overall environmental effect. Therefore, green engineering and innovative packaging materials must be investigated to guarantee sustainable dairy development and minimize environmental impact.

### **Nigerian Dairy industry policy**

The National Dairy Policy framework is essential for directing public and private sector actions and investments in Nigeria's dairy industry to achieve self-sufficiency in milk production and enhance global competitiveness. It aims to establish a framework and guiding principles for the development of an efficient and sustainable dairy industry to meet national demand for milk and dairy products. Numerous factors hindering dairy development in Nigeria include substandard animal husbandry practices, insufficient and low-quality feed, prevalence of transboundary diseases, ineffective animal disease management, impacts of climate change, infrastructural deficits particularly in cold chain and milk collection facilities, decreasing grazing areas, and restricted access to water and pasture, especially during the dry season. This policy will foster collaboration among industry stakeholders in addition to resolving these challenges. The dairy value chain may effectively satisfy customer demands

at reasonable rates while providing appropriate returns to industry stakeholders. This policy delineates the interventions by the government and other stakeholders concerning dairy research, milk production, animal reproductive health, extension services, marketing of milk and dairy products, milk processing, consumption, human resource development and training, financial services, as well as institutional, legal, and regulatory matters.

Nigeria's annual demand for milk and dairy products is estimated at 1.6 billion kilograms, with imports now valued at USD 1.3 billion [31, 37]. Milk imports primarily comprised powdered milk from Denmark, the Netherlands, the USA, South Africa, New Zealand, and the EU.

### **Nigerian Government policies on Dairy production**

The objective of the Nigerian Dairy policy is to establish a framework that directs governmental and private sector initiatives and investments in the dairy industry to accelerate the achievement of self-sufficiency in milk products and enhance global competitiveness.

The strategy aims to enhance the production and productivity of smallholder and commercial dairy producers by providing help in extension services, facilitating access to finance, and developing infrastructure.

Facilitate backward integration in milk collection, aggregation, and processing by offering incentives for investments in cold chain services, efficient transportation, and financial access.

Establish a comprehensive institutional framework by creating a Dairy Development and Marketing Board tasked with engaging pertinent stakeholders to promote the sustainable advancement of the dairy sector.

Foster intentional awareness and involvement to facilitate the achievement of the policy's vision and objectives through the active participation of both public and private sector stakeholders.

Integrate and formalize disorganized dairy processors.

Improve the efficiency, effectiveness, and global competitiveness of the Nigerian dairy industry to provide inexpensive and accessible milk products, thereby reducing imports and enhancing the nutritional health of Nigerians.

Prior to 2011, when the Agricultural Transformation Agenda (ATA) and the Nigerian Industrial Revolution Plan (NIRP) for 2011–2015 were implemented, governmental policy on dairy development mostly concentrated on enhancing milk production, with less focus on processing, marketing, and consumption. The Agricultural Promotion Policy (APP, 2016–2020) and the Nigerian Industrial Policy (NIP) significantly advanced the Agro Allied Sector. The combination of these occurrences and the necessity to adequately address the dairy industry's strategic significance for economic diversification prompted the development of the National Dairy Policy (NDP). The NDP represents a strategic transition that emphasizes consumer needs, the utilization of external markets, and the enhancement of dairy productivity and efficiency.



The dairy value chain may optimally satisfy customer demands at reasonable rates while guaranteeing satisfactory returns for industry stakeholders. This policy delineates the interventions by the government and other stakeholders concerning dairy research, milk production, animal reproductive health, extension services, marketing of milk and dairy products, milk processing, consumption, human resource development and training, financial services, as well as institutional, legal, and regulatory matters.

### **Impact of climate change on dairy milk production in Nigeria**

Globally, milk production is conducted by more than 150 million dairy farms. Smallholder dairy farmers predominantly produce milk in most developing countries, and milk production has become a vital source of income for numerous households globally [28]. Global milk production increased from 530 million tons in 1988 to 843 million tons in 2018, representing a growth of about 59 % [23]. The United States, China, Pakistan, and Brazil rank next in milk production, collectively contributing 22 % to the global total. Since the 1970s, South Asia has been the principal catalyst for the expansion in milk production in the developing world, exhibiting significant growth [23].

Germany, France, Australia, Ireland, New Zealand, and the United States own the largest milk surpluses [33], whereas China, Italy, Russia, Mexico, Algeria, and Indonesia exhibit the most significant milk deficits [27]. In numerous developing countries, milk production has been constrained by issues including the health of dairy farmers, financial resources, fluctuating weather conditions, and the low genetic potential of dairy livestock [18]. In contrast to industrialized nations, many developing nations have hot and variable climatic conditions that are detrimental to milk production. Sudan, South Africa, Kenya, and Ethiopia are the leading milk-producing nations in Africa [24]. Milk production in Africa is witnessing a gradual decline due to poverty and adverse climate conditions. Nigeria yearly produces approximately 560,000 to 570,000 tons of fresh milk, whereas the anticipated industry and domestic consumption and market demand is 1.7 million tons [19].

Literature indicates that in Nigeria, milk production is associated with the northern nomads and ranchers. The reduction in output in Nigeria is primarily ascribed to climate change and various internal and external variables [19, 23]. Heat stress induced by elevated temperatures and humidity diminishes milk production in dairy cows [1, 26]. Elevated temperatures beyond a cow's thermoneutral zone induce pain and physiological alterations, leading to a reduction in milk production [9, 13]. Extreme heat and elevated temperatures are challenging for dairy cows to endure, leading to a reduction in milk output and increased vulnerability to illnesses and other health complications [17]. Excessive rainfall exposes dairy farm

animals to severe cold, resulting in irregular physiological functioning and reduced fodder availability, which leads to a critical decline in body weight and milk production [25].

This consequently diminishes the profits of dairy farmers who rely on it for their economic sustenance and human nourishment. Given these circumstances, Nigeria expended about 28 billion on milk imports in 2022 [31]. These occurrences generated a knowledge deficit and prompted the formulation of the study to determine the actual effects of climate change on dairy milk production in Nigeria. Climatic variables such as temperature, precipitation, and relative humidity adversely affected milk production in both the short and long term. Elevated temperatures induce heat stress in dairy cows, resulting in decreased dry matter intake, which subsequently diminishes milk quality and production [34]. Extended droughts adversely impact dairy milk production. Escalated infestations of bovine diseases, precipitated by excessive rainfall, compromise the animals' health and lead to a significant reduction in milk production. Increased microbial activity in dairy cows at high relative humidity results in diminished milk quality and quantity. Cows exposed to sunshine maintain healthy physiological characteristics that enhance milk production in dairy cows. The ECM value signified the swift reaction of milk production to climate change perturbations. Enhancing milk production in Nigeria to satisfy market demand necessitates immediate and proactive measures to address climate change.

### **Problems of Dairy Marketing In Nigeria**

The Nigerian dairy sector is marked by challenges in the adoption of innovations such as artificial insemination and modern pasture establishment by pastoralists and commercial dairy farmers, inadequate accessibility to dairy farmers during both the rainy and dry seasons, and the absence of an organised structure among dairy farmers. The deficiency of infrastructure in the Nigerian dairy sector has resulted in persistently poor milk production, post-milking wastage, diminished earnings for dairy farmers, and a lack of access to animal protein for citizens.

The informal selling of the commodity frequently raises public health issues with milk due to insufficient investment in safe handling skills, equipment, and compliance with norms. In reaction to evolving consumption patterns in metropolitan areas, commercial processors are implementing various marketing and product improvements to engage new consumers.

### **Way forward**

Establishment of marketing infrastructure from manufacturing to consumption, enabling e-commerce and a Market Information System. The promotion of private sector-driven dairy marketing is essential. Competition should be predicated on the efficiency and quality of milk

produced in the market. Maintain sustainable soil fertility to maximise feed production for dairy.

Nigeria possesses significant potential to enhance its dairy output, generate jobs, and create value-added goods. Predisposing elements encompass a favourable climate in numerous regions of the country (particularly in the Central and Northern States), overall robust animal health, advantageous ecologies for the cultivation of fodder crops within mixed agricultural systems, and the presence of under-utilized land for pasture production.

The value chain strategy for enhancing sector development involves utilizing cross-bred cattle that exhibit superior productivity compared to indigenous breeds, establishing specialized smallholders (peri-urban farmers) for milk production, and providing milk collection facilities in regions of comparative advantage where farmers are already organized into cooperatives.

Challenges affecting livestock production must be addressed to promote the sustainable development of a nation by ensuring sufficient food supply to satisfy the needs of the increasing population.

To accomplish this, it is anticipated that federal and state governments will implement livestock policies that will advance the intended objective. A comprehensive solution must account for the unique characteristics of pastoralists and farmers. This strategy has the potential to influence and advance sustainable dairy development in Nigeria while maintaining food security. Should all the identified factors be effectively managed via mass literacy initiatives, governmental provision of essential social services, policy implementation, awareness campaigns, and comprehensive training for dairy farmers by extension agents, alongside the enforcement of hygienic practices during milking to mitigate foodborne illnesses, as well as the exploration of economic benefits from dairy farming significant advancements in the dairy sector may ensue, potentially alleviating food insecurity in Nigeria.

Executing the goals delineated in the National Dairy Policy (2023–2028) would enhance the industry's growth and competitiveness, aligning with the Government's dedication to economic diversification, food security, and livelihood improvement in the nation.

## References

1. Abbas Q, Han J, Adeel A, Ullah R. Dairy production under climatic risks: Perception, perceived impacts and adaptations in Punjab, Pakistan. *Int J Env Res Publ Health*. 2019; 16 (20): 4036. DOI: 10.3390/ijerph16204036.
2. Adesulu-Dahunsi AT, Bolarinwa OO, James FA. Physicochemical, microbiological, and sensorial qualities of dairy yogurt supplemented with coconut and tiger nut milk extract during storage. *IOP Conf Ser Earth Env Sci*. 2023; 1219: 012009. DOI: 10.1088/1755-1315/1219/1/012009.
3. Akinyosoye VO. Demand for dairy products in Nigeria: Evidence from Nigerian Living standards survey. *J Econ Rural Dev*. 2006; 16: 13–26. Available at: <https://ageconsearch.umn.edu/record/147518/?v=pdf>
4. Ali A, Kaul, R And Atala, T. *Milk Processing and Other Activities Among Fulani Women: A Survey Of Zaria Area (Kaduna State)*. Zaria, Institute of Agricultural Research Ahmadu Bello University, 1991: 30 p.
5. An Assessment of the Nigerian Poultry Sector. SAHEL. 2015; 11: 3 p. Available at: <http://sahelpcp.com/an-assessment-of-the-nigerian-poultry-sector>
6. APH506: Dairy Production. University of Agriculture Abeokuta (UAA), Department of Animal Production and Health, 2011: 28 p. Available at: [https://funaab.edu.ng/wp-content/uploads/2009/12/461\\_APH506.pdf](https://funaab.edu.ng/wp-content/uploads/2009/12/461_APH506.pdf)
7. Asresie A, Zemedu L. Contribution of livestock sector in Ethiopian economy: A review. *Adv Life Sci Technol*. 2015; 29: 79–90. Available at: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/ALST/article/viewFile/19767/20040>
8. Barragan AA, Workman JD, Bas S, Proudfoot KL, Scheunemann GM. Assessment of an application for touchscreen devices to record calving-related events in dairy herds and monitor personnel performance. *J Dairy Sci*. 2016; 99 (7): 5662–5670. DOI: 10.3168/jds.2015-10841.
9. Bhimte A, Jain A, Devi HL. Effect of environmental stressors on productive and reproductive performances of dairy cow and buffaloes. *J Entom Zool Stud*. 2021; 9 (1): 1503–1506. Available at: <https://www.entomoljournal.com/archives/2021/vol9issue1/PartU/9-1-191-302.pdf>
10. Boum D, Wint W, Blench R, Woolley E. Nigerian livestock resources survey. *World Anim Rev*. 1994; 78: 49–58.
11. Boum DW, Wint W. Livestock land use and agricultural intensification in Sub Saharan Africa. Pastoral Development Network Paper 37a Overseas Development Institute, London, 1994.
12. Celestine A. Dairy sector in Nigeria — An overview. Available at: <http://archive.agriorbit.com/wp-content/uploads/2016/08/Dairy-overview-dairy-projects-in-Nigeria-Dr-Ayok-Nache.pdf>
13. Chawicha TG, Mummed YY. An overview of how heat stress impacts dairy cattle fertility. *Multidiscipl Rev*. 2022; 5 (3): 2022014. DOI: 10.31893/multirev.2022014.
14. Climate change and the global dairy cattle sector. The role of the dairy sector in a low-carbon future. The Food and Agriculture Organization (FAO GDP), Rome, 2018: 36 p. Available at: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/8749a956-0725-414f-8c35-58a5db0c2b5c/content>
15. Cogato A, Brščić M, Guo H, Marinello F, Pezzuolo A. Challenges and tendencies of Automatic Milking Systems (AMS): A 20-years systematic review of literature and patents. *Animals*. 2021; 11 (2): 356. DOI: 10.3390/ani11020356.
16. Dairy: World Markets and Trade. Milk Production Continues Growth in 2026. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, 2025. Available at: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>
17. Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati, Kumar R. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet World*. 2016; 9 (3): 260–268. DOI: 10.14202/vetworld.2016.260-268.
18. Duguma B. Farmers' perceptions of major challenges to smallholder dairy farming in selected towns of Jimma Zone, Oromia Regional State, Ethiopia: Possible influences, impacts, coping strategies and support required. *Heliyon*. 2022; 8 (6): e09581. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09581.
19. Elekwachi O, Asinobi CO, Afam-Anene OC. Evaluation of the chemical quality of milk powder sold in open markets in Aba, Abia State, Nigeria. *Curr J Appl Sci Technol*. 2021; 40 (34): 14–21. DOI: 10.9734/cjast/2021/v40i3431565.
20. FAO, NAPRI Cited in Dairy Industry: Key Policy Trust for Industrialization, Federal Ministry of Industry Trade and Investment. May 2018.
21. FAO/UNESCO Soil Map of the World Report. Food and Agricultural Organization, Rome, 1988.
22. FrieslandCampina WAMCO (FCWAMCO) Nigeria Plc: solid and steady progress on backward integration in dairy development in Nigeria, 2021.

23. Gateway to dairy production and products. Food, Agriculture and Organization of the United Nations, Rome Italy, 2023. Available at: <https://www.fao.org/dairy-production-products/en>
24. Getabalew M, Alemneh T, Akebereg D. Dairy production in Ethiopia — existing scenario and constraints. *Biomed J Sci Technol Res*. 2019; 16 (5): 12304–12309. DOI: 10.26717/BJSTR.2019.16.002903.
25. Hoffmann I. Adaptation to climate change — exploring the potential of locally adapted breeds. *Animal*. 2013; 7 (s2): 346–362. DOI: 10.1017/S1751731113000815.
26. Hossain M, Salam M, Ahmed S, Habiba M, Akhtar S, Islam M, Hoque SAM, Selim AS., Rahman M. Relationship of meteorological data with heat stress effect on dairy cows of smallholder farmers. *Sustainability*. 2023; 15 (1): 85. DOI: 10.3390/su15010085.
27. Jeffrey D. Dairy: world markets and trade. United States Department of Agriculture, 2022. Available at: <https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade-12192025>
28. Jitmun T, Kuwornu JKM, Datta A, Kumar Anal A. Factors influencing membership of dairy cooperatives: Evidence from dairy farmers in Thailand. *J Co-op Org Managem*. 2020; 8 (1):100109. DOI: 10.1016/j.jcom.2020.100109.
29. Lyashenko VV, Kaeshova IV, Gubina AV, Chupsheva Y. Intensive milk production technologies on a modern complex. *IOP Conf Ser Earth Env Sci*. 2022; 953: 012001. DOI: 10.1088/1755-1315/953/1/012001.
30. Makun HJ. Dairy production systems in Nigeria. Presentation delivered at the Technical meeting of Africa Sustainable Livestock 2050, Abuja, April 2018.
31. Milk production in Nigeria. Nigeria Bureau of Statistics, Abuja, 2023. Available at: <https://www.nigerianstat.gov.ng>
32. National Agriculture Sample Survey (NASS), 2010/2011. National Bureau of Statistics, 2012. Available at: <https://www.nigerianstat.gov.ng/elibrary/read/66>
33. OECD-FAO. Agricultural Outlook 2020–2029. Collaborative effort of the Organisation for Economic Co-operation Development (OECD) and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 2020: DOI: 10.1787/1112c23b-en.
34. Osuji E, Igberi C, Enyia C, Nwachukwu E, Nwose R, Adeolu A, Akunna TA, Nkwocha G, Eleazar A, Gabrie ID. Impact of climate change on dairy milk production in Nigeria. *Online J Anim Feed Res*. 2023; 13 (4): 246–252. DOI: 10.51227/ojafr.2023.37.
35. PwC Nigeria. Available at: <https://www.pwc.com/ng/en>
36. Shehu DJ, Hassan WA. Women in dairy in the African savanna: Their contribution to argo pastoral household income in the dry northwest of Nigeria. *Nomad Peoples*. 1995; 36/37: 53–63. Available at: <https://www.jstor.org/stable/43123450>
37. Statistical bulletin of the CBN. Central Bank of Nigeria. Abuja, Nigeria, 2010.
38. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy, 2019. Available at: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/11f9288f-dc78-4171-8d02-92235b8d7dc7/content>
39. The state of food security and nutrition in the world 2020. Transforming food systems for affordable healthy diets. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO, 2020. DOI: 10.4060/ca9692en.
40. Water-Bayer A. Dairying by settled Fulani women in Central Nigeria and some implications for dairy development. ODI Pastoral Development Network Paper, 1985. Available at: <https://media.odi.org/documents/5273.pdf>
41. Yilma Z, Guernebleich E, Sebsibe A, Fombad R (ed.). A review of the Ethiopian dairy sector. FAO Sub Regional Office for Eastern Africa (FAO/SFE), 2011: 83 p. Available at: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/d42e0ec5-aaca-4f4b-b327-673f3db3aebc/content>

## Огляд стану виробництва молочної продукції у Нігерії

О. О. Окунлола<sup>1</sup>, Т. Е. Лаваль<sup>2</sup>, Дж. А. Алаладе<sup>1</sup>, М. О. Айула<sup>2</sup>, І. А. Адебісі<sup>1</sup>  
olujuwonokunlola@yahoo.com

<sup>1</sup>Сільськогосподарський та технологічний коледж штату Ойо, факультет технологій тваринництва та рибного господарства, кафедра технології продукції тваринництва, PMB 10, Ігбура, штат Ойо, 200234, Нігерія

<sup>2</sup>Університет Боуена, Коледж сільського господарства, інженерії та наук, Відділ зоотехніки та рибальства, Сільськогосподарська програма, Іво, штат Осуна, Нігерія

Прогнозується, що до 2050 року населення Нігерії становитиме приблизно 400 мільйонів, а продовольча безпека є важливою для підтримки стабільної, згуртованої та безпечної країни. Ця реальність свідчить про те, що залежність від імпорту для задоволення потреб нігерійців у продовольчих продуктах необхідно зменшити, чого можна досягти насамперед через значні інвестиції у сільське господарство для підвищення продуктивності та самозабезпечення. Тваринництво, зокрема виробництво молочної продукції — це сектор, який становить значний інтерес та стратегічне значення для диверсифікації економіки та продовольчої безпеки. Тим не менш, внесок цього сектору в загальний обсяг сільськогосподарського виробництва Нігерії є надзвичайно мізерним, що вимагає стратегічних заходів для стимулювання сталого розвитку. Молочний сектор Нігерії потребує негайної уваги через численні проблеми, серед яких — неякісні методи тваринництва, неадекватні та низькоякісні корми, поширені хвороби та недостатнє управління здоров'ям тварин, обмежений доступ до води в сезон посухи, негативний вплив зміни клімату, недостатні інвестиції в дослідження та розробки, недоліки інфраструктури та обмежений доступ до фінансування. Цей огляд визначає важливість розробки власних рішень для вирішення місцевих проблем через встановлення чітких цілей щодо збільшення виробництва молока, підвищуючи продуктивність як серед дрібних підприємців, так і серед комерційних молочних ферм, одночасно сприяючи зворотній інтеграції у виробництві, зборі та агрегації молока.

**Ключові слова:** молочні продукти, політика, Нігерія, виробництво молока



## Новітні підходи та перспективи лікування міксоматозної дегенерації мітрального клапана у собак

Н. І. Суслова, О. В. Семьонов

suslova.n.i@dsau.dp.ua, semonov.o.v@dsau.dp.ua



Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49009, Україна

### ORCID:

N. I. Suslova <https://orcid.org/0000-0001-9500-9224>  
O. V. Semionov <https://orcid.org/0000-0002-8562-4108>

### Authors' Contributions:

**SNi:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Writing — review & editing.

**SOV:** Supervision; Writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

Not applicable.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Міксоматозна дегенерація мітрального клапана (МДМК) є найпоширенішою набутою патологією серця у собак дрібних та середніх порід, що призводить до розвитку хронічної серцевої недостатності. У статті узагальнено сучасні дані (2020–2025 рр.) щодо нових напрямів у діагностиці, терапії та профілактиці МДМК. Особливу увагу приділено перспективним біомаркерам (мікроРНК, SERPINH1, CILP1), інноваційним лікарським засобам (ARNI, SGLT2-інгібітори, антифібротичні агенти), а також підходам до індивідуалізації лікування залежно від породи, віку та супутніх захворювань. Окремо висвітлено нові технології про клітинну та генну терапію, нанотехнології й малоінвазивні хірургічні методики (TEER).

**Ключові слова:** міксоматозна дегенерація мітрального клапана, собаки, біомаркери, персоналізована терапія, ARNI, SGLT2-інгібітори, стовбурові клітини, генна терапія, TEER

## Вступ

Міксоматозна дегенерація мітрального клапана (МДМК) залишається поширеною набутою патологією серця у собак, охоплює до 75 % усіх випадків серцевих захворювань. Динаміка поширеності зростає з віком: вальвулярні ураження виявляють у 85 % собак дрібних порід старших за 13 років, але сьогодні дедалі частіше хворіють і тварини середніх та великих порід. МДМК призводить до потовщення стулок клапана, неповного їх змикання та регургітації крові, що з часом спричиняє серцеву недостатність і вторинну легенеvu гіпертензію. На ранніх стадіях захворювання може не проявлятися клінічно, обмежуючись лише систолічним шумом, але з прогресуванням виникають дилатація камер серця, застійні явища в легенях і симптоми серцевої недостатності [42].

Патогенез МДМК багатофакторний. Ключову роль відіграють перебудова екстрацелюлярного матриксу під дією TGF- $\beta$  та фенотипове переродження клапанних інтерстиціальних клітин у міофібробласти [24]. Серотонін-залежні механізми, зокрема гіперекспресія 5-HT<sub>2B</sub>-рецепторів та зниження активності серотонінового транспортера, посилюють проліферативні й фіброзні зміни стулок клапана [30]. Геномні дослідження виокремлюють породові асоціації,

але точні мутації визначені лише для окремих ліній кавалер-кінг-чарльз-спанієлів.

Нові методи діагностики, порівняно з попередніми роками, дають змогу вчасно визначати патологію: звичайна доплер-ехокардіографія, доповнена спекл-трекінгом, виявляє субклінічну дисфункцію міокарда й більш точно прогнозує прогресування регургітації. Серед біомаркерів, окрім NT-proBNP та cTnI, великого значення набувають профілі мікроРНК, здатні відображати ранні молекулярні зрушення. Востаннє оновлені консенсус-рекомендації ACVIM (2019) структурували ведення пацієнтів за стадіями A–D, однак протоколи лікування, які використовуються фахівцями, мають значну варіабельність, зокрема на пізніх етапах хвороби [6, 15, 33, 45].

Разом із вдосконаленням методів діагностики відбувається корегування схем лікування, а саме із використанням доказових препаратів (пімобендан, фуросемід, спіронолактон, ІАПФ) застосовуються перспективні SGLT2-інгібітори, які проявляють кардіо- і нефропротекторний потенціал. Поряд з цим, малоінвазивне транскатетерне відновлення *edge-to-edge* (TEER) клапана є ефективним щодо зменшення ремоделювання лівих камер серця. Ці схеми лікування потребують вдосконалення стосовно оптимізації персоналізованої стратегії ведення собак із МДМК [21, 44].



Метою оглядової статті є висвітлити найновітніші підходи та перспективні методи терапії МДМК у собак, розроблені у 2020–2025 роках, не дублюючи відомі факти, а доповнюючи наявні дані. Будуть розглянуті нові біомаркери і технології молекулярної діагностики, потенційні мішені для терапії на рівні сигнальних шляхів і клітин, можливості персоналізації лікування залежно від пацієнта, сучасні засоби довготривалого моніторингу, експериментальні методи (генна і клітинна терапія, нанотехнології), стратегії профілактики прогресування МДМК, а також етичні та економічні аспекти впровадження нових технологій у ветеринарній кардіології.

## Результати дослідження літератури

### Епідеміологія

Міксоматозна дегенерація мітрального клапана є поширеним набутим захворюванням серця у собак, частота патології значно зростає з віком тварин. Згідно з даними сучасних літературних джерел, МДМК діагностується близько у 75–80 % усіх випадків серцевих патологій у цього виду тварин, ризик на захворювання має породну схильність — йдеться про собак дрібних порід: кавалер-кінг-чарльз-спанієлі, йоркширські тер'єри, такси, чихуахуа, мініатюрні пуделі та мальтійські болонки. Близько 85–90 % тварин цих порід віком від 10–13 років мають різні ступені дегенеративних змін мітрального клапана [2, 3, 25, 44].

Втім, останніми роками дослідники також повідомляють про зростання частоти МДМК серед собак середніх і навіть великих порід, хоча прояви патології та вік початку захворювання у них дещо відрізняються. У собак великих порід перші клінічні ознаки МДМК зазвичай виникають пізніше (8–9 років), порівняно з дрібними породами, але перебіг часто агресивний зі швидшим переходом до серцевої недостатності. Новітні дослідження свідчать, що серед собак середніх і великих порід із МДМК патологія найчастіше уражає золотистих ретриверів, лабрадорів, німецьких вівчарок та боксерів [38, 48].

Окрім породних особливостей, важливими факторами ризику є вік, стать (у кобелів частіше важкий перебіг), а також генетична схильність. У собак породи кавалер-кінг-чарльз-спанієль генетична схильність є домінантною, що пояснює високу поширеність і ранній початок захворювання серед представників цієї породи. Втім, ідентифікація генетичних маркерів ризику для інших порід собак залишається перспективним напрямом для подальших досліджень [29].

Загалом, тенденції останніх років свідчать про зростання клінічної актуальності МДМК через збільшення тривалості життя собак, зміни породної структури популяції домашніх тварин та покращення методів діагностики. Це підкреслює необхідність подальших епідеміологічних досліджень,

спрямованих на раннє виявлення захворювання та визначення груп ризику для проведення профілактичних заходів.

Патоморфологічною основою міксоматозної дегенерації мітрального клапана у собак є прогресуюче ремоделювання клапанних структур, яке характеризується значними змінами екстрацелюлярного матриксу, фрагментацією колагенових волокон та накопиченням глікозаміногліканів (ГАГ) [24]. Ці зміни призводять до потовщення, подовження та пролабування клапанних стулок, а також до порушення функції хорд. Характерною гістологічною ознакою є проліферація та активація клапанних інтерстиціальних клітин (КІК), які трансформуються у міофібробласти, посилюючи фіброзні та дегенеративні процеси у клапанному апараті.

На молекулярному рівні провідним механізмом прогресування МДМК є активація сигнальних шляхів, які регулюють перебудову екстрацелюлярного матриксу. Особливо важливу роль відіграє трансформуючий фактор росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), що ініціює диференціацію КІК у міофібробласти та активує надмірний синтез ГАГ, призводячи до втрати нормальної структури клапана. Значний вплив на перебіг захворювання має серотонінергічна система: підвищення рівня серотоніну (5-НТ) та гіперекспресія його рецепторів (особливо 5-НТ<sub>2B</sub>) посилюють патологічні зміни клапанних структур через активацію проліферативних та фіброгенних процесів [24, 30].

Також встановлено, що у собак із МДМК значно посилюються процеси оксидативного стресу [36]. Підвищення концентрації малонового діальдегіду (МДА), маркера перекисного окиснення ліпідів, супроводжується зменшенням антиоксидантної активності (зниження рівнів супероксиддисмутази та каталази). Ці зміни сприяють прогресуванню клапанної дисфункції та патологічному ремоделюванню серця, погіршуючи прогноз захворювання [43].

Водночас генетичні дослідження виявили породні особливості у розвитку МДМК, зокрема ідентифікацію поліморфізмів генів, які асоціюються з тяжкістю клапанних уражень у собак породи кавалер-кінг-чарльз-спанієль [25]. Однак точні генетичні маркери захворювання для інших порід собак потребують додаткового вивчення.

Отож, сучасне розуміння патоморфологічних та молекулярних механізмів МДМК дозволяє більш обґрунтовано підходити до діагностики, прогнозування перебігу та розробки цільових терапевтичних стратегій, спрямованих на уповільнення прогресування цієї патології.

### Діагностика

Найбільш ефективним методом оцінки функціонального стану міокарда при міксоматозній дегенерації мітрального клапана у собак наразі є двовимірний спекл-трекінг ехокардіографія (2D-STE). Цей метод дозволяє не лише раннє виявлення субклінічних змін

серцевого м'язу, але й точну оцінку ефективності хірургічного лікування. За даними Fukuzumi et al. (2024), після трансторакальної вальвулопластики у собак з МДМК суттєво покращуються параметри глобальної деформації міокарда (*Global Longitudinal Strain*, GLS) з 24,4 % до 16,3 % ( $P=0,015$ ), а також інші показники функції серця (поперечна та радіальна деформація [6]. Також доведено значне поліпшення пікової систолічної ротації серця (*twist*) з 5,5° до 9,1° ( $P=0,039$ ). Для забезпечення високої точності результатів 2D-STE необхідна суворі технічна стандартизація, що передбачає контроль частоти кадрів, ретельне позиціонування зон дослідження та уникнення артефактів.

За сучасних лабораторних досліджень натрійуретичний пептид типу В (NT-proBNP) залишається найбільш вірогідним прогностичним біомаркером за МДМК. Його рівень понад 1500 pmol/l свідчить про високий ризик розвитку застійної серцевої недостатності впродовж наступних 6–12 місяців (чутливість близько 80–85 %, специфічність 75 %). Динамічний контроль NT-proBNP рекомендовано для стратифікації ризику та своєчасного початку або корегування терапевтичних заходів [7, 9].

Слід зауважити, що кардіальний тропонін І (сTnI) залишається важливим індикатором ураження серця, що дозволяє ідентифікувати пацієнтів з активним патологічним ремоделюванням камер серця [4]. Проте вони мають обмеження — на рівень NT-proBNP може впливати функція нирок, а сTnI може зростати з віком. До того ж, їхня точність недостатня для тонкого стадіювання хвороби [32, 40]. Тому триває пошук нових біомаркерів та методів молекулярної діагностики, які б дозволили раніше виявити хворобу, об'єктивно оцінити прогресування та прогноз. Дослідження Lee et al. [20] та Klein et al. [19] оцінювало два нові потенційні маркери — галектин-3 та sST2 (розчинний ST2, рецептор інтерлейкіну-33) — порівняно з NT-proBNP і тропоніном у собак з МДМК різних стадій. Галектин-3 є маркером фіброзу міокарда у людей, а sST2 відображає активацію запального сигнального шляху IL-33/ST2. У згаданому дослідженні рівні Gal-3 та ST2 в сироватці не відрізнялися статистично між здоровими і хворими собаками чи між стадіями МДМК. Проте ці маркери показали тенденцію до підвищення з часом і автори зазначили, що ST2 може бути корисним для моніторингу прогресування хвороби (виявлено зростання ST2 за 6 місяців у собак на стадії B1). Отже, хоча Gal-3 та ST2 не підтвердили очікуваної діагностичної значущості, сама ідея пошуку нових кардіомаркерів у собак залишається перспективною.

Сучасні технології протеоміки дозволяють виявити раніше невідомі білки, пов'язані з МДМК. Зокрема, дослідники нещодавно ідентифікували підвищення рівня SERPINH1 (також відомий як Hsp47) у плазмі крові собак на ранній безсимптомній стадії (B2) МДМК [52].

Активність процесів фіброзу клапана. Це дослідження першим продемонструвало можливість

використання SERPINH1 як раннього діагностичного біомаркера прогресування МДМК. Інший перспективний маркер — *Cartilage Intermediate Layer Protein-1* (CILP1), білок позаклітинного матриксу, який антагонізує TGF- $\beta$ . У 2023 р. було показано, що концентрація CILP1 достовірно підвищена у собак з МДМК, порівняно зі здоровими, особливо на стадії С, і корелює зі ступенем кардіального ремоделювання (розмірами лівого передсердя і шлуночка) [16]. Отже, CILP1 може слугувати індикатором фіброзу та ремоделювання серця при МДМК, доповнюючи інформацію, що надається NT-proBNP.

Додатково слід розглядати генетичні та транскриптомні маркери. Сучасні методи аналізу генів та РНК відкривають новий погляд на патогенез МДМК [18]. Наприклад, порівняльний транскриптомний аналіз периферичної крові собак на стадії B2 виявив характерні зміни експресії генів, пов'язаних з активацією тромбоцитів. Зокрема, у собак з МДМК B2 значно зростала експресія чотирьох генів: MDM2, ROCK1, RIPK1, SNAP23, які беруть участь у шляхах активації тромбоцитів [51]. Ці гени також негативно корелювали зі ступенем кардіального збільшення, тобто їхня висока активність асоціювалася з меншими дилатаціями серця. Автори запропонували ці чотири гени як біомаркери діагностики стадії B2 і підкреслили нові дані щодо участі тромбоцитарних механізмів у патогенезі МДМК. Окрім цього, дедалі більший інтерес привертають короткі некодуючі РНК або мікроРНК [26]. У багатоцентровому проспективному дослідженні Palarea-Albaladejo et al. [33] було оцінено діагностичний потенціал профілів експресії 15 мікроРНК у сироватці та плазмі собак. Використання цього підходу з індивідуальним ймовірнісним прогнозом моделюванням дозволило з високою точністю розрізняти здорових собак і тварин з міксоматозною дегенерацією мітрального клапана (чутливість 85 %, специфічність 82 %, точність 83 %). Для диференціації між доклінічними (B1/B2) та клінічними (C/D) стадіями точність становила 73 %. Це перспективний неінвазивний діагностичний інструмент, що може доповнити традиційні маркери.

Отже, у сфері діагностики МДМК спостерігається перехід від традиційних біохімічних маркерів та УЗД до більш комплексного молекулярного підходу. Нові біомаркери — білкові, генетичні, клітинні — дозволяють глибше зрозуміти патофізіологію хвороби і мають потенціал для раннього виявлення та точнішого моніторингу. Впровадження їх у широку клінічну практику потребує подальших досліджень, але перші результати обнаділиві.

#### Перспективи терапевтичного втручання

МДМК розвивається внаслідок складних молекулярних процесів у клапані та міокарді: дисбалансу ферментів матриксу, активації фібробластів, запальних цитокінів, нейрогормональних систем. Сучасна медикаментозна терапія націлена в основному на

нейрогормональні шляхи, які компенсаторно активуються при регургітації та серцевій недостатності, а саме на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему (РААС) та симпато-адреналову систему. Стандартні засоби (позитивні інотропи, інгібітори АПФ, антагоністи альдостерону) стримують шкідливі ефекти цих шляхів. Проте новітні препарати розширюють спектр мішеней і механізмів дії, спрямованих на уповільнення структурного ремоделювання серця [2, 3].

Важливим кроком стало впровадження у ветеринарію класу інгібіторів рецептора ангіотензину та не-прилізину (препарат комбінації сакубітрин/валсартан). Сакубітрин блокує фермент не-прилізин, перешкоджаючи деградації ендogenous натрійуретичних пептидів, тоді як валсартан блокує рецептори ангіотензину II. У рандомізованому дослідженні N. Saengklub [37] за участі 21 собаки зі стадією С МДМК додавання сакубітрин/валсартану (20 мг/кг двічі на добу) до стандартної терапії (пімобендан + фуросемід) протягом 4 тижнів дало значний зворотний ремоделюючий ефект: зменшилися розміри лівого передсердя (LA/Ao) та лівого шлуночка (LVIDdN), порівняно з контрольною групою на раміприлі. Також зменшилися кінцево-діастолічний і кінцево-систолічний об'єми (EDVI, ESVI) та збільшився ударний об'єм у групі ARNI [28, 37]. Це підтверджує, що ARNI здатен послаблювати ремоделювання серця при МДМК. Хоча дані поки короткострокові, вони підтримують введення ARNI до схем лікування застійної СН у собак як засобу покращення функції серця.

Іншим перспективним напрямком є використання препаратів класу інгібіторів натрій-глюкозного котранспортера 2 типу (SGLT2), зокрема дапагліфлозину [10]. Незважаючи на те, що наразі доведених клінічних випробувань на собаках ще небагато, фармакокінетичні дослідження підтверджують його безпечність та ефективність для застосування у собак із серцевою недостатністю, що є підставою для внесення цього класу препаратів до стандартних терапевтичних протоколів [44]. Спочатку розроблені як цукрознижувальні препарати, вони показали виражену ефективність при хронічній серцевій недостатності у людей — зниження госпіталізацій і смертності навіть у пацієнтів без діабету. Екстраполяція з досліджень на інших видах свідчить, що користь SGLT2-інгібіторів можна пояснити покращенням енергетики міокарду (переключенням метаболізму на кетонові тіла), діуретичним ефектом, а також прямим кардіопротективним впливом — зменшенням гіпертрофії і фіброзу. Є дані, що емпагліфлозин може взаємодіяти з міокардіальним  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінником (NHE1), знижуючи внутрішньоклітинний  $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$ , що веде до покращення діастолічної функції та ендотеліальної відповіді [39]. Хоча широкі клінічні випробування SGLT2-інгібіторів у собак з МДМК ще нема, позапротокольне призначення емпагліфлозину або дапагліфлозину вже практикують окремі кардіологи, а майбутні дослідження визначать оптимальну дозу і підтвердять ефективність для подовження життя собак із серцевою недостатністю.

Характерною рисою міксоматозної дегенерації є фіброз клапанів і ремоделювання міокарда під впливом механічного стресу та нейрогормонів. Серед сигнальних шляхів, причетних до цього процесу, центральним є TGF- $\beta$ /SMAD [41, 50]. Підвищена експресія ізоформ TGF- $\beta$  у клапанній тканині і міокарді собак з МДМК добре задокументована. TGF- $\beta$  стимулює перетворення спокійних клапанних інтерстиціальних клітин у міофібробласти та продукцію колагену, глікозаміногліканів, що і призводить до потовщення стулок [24]. Тому мішені, що модулюють TGF- $\beta$ , розглядаються як перспектива для уповільнення дегенерації клапана. Наприклад, уже згаданий білок CILP1, будучи ендogenous антагоністом TGF- $\beta$ , може стати прообразом терапевтичної стратегії: посилення його активності або введення аналогів може гальмувати фіброзні зміни клапанів. Іншим напрямком є вплив на матриксні металопротеїнази (MMP) — ферменти, які розщеплюють колаген та еластин клапана. Дисбаланс MMP і їхніх інгібіторів (TIMP) сприяє дегенерації клапанної тканини [27]. У людей з мітральною регургітацією досліджували неселективні MMP-інгібітори (наприклад, тетрацикліни, як-от доксициклін) для сповільнення ушкодження клапанів [11]. В експериментальних моделях на мишах така терапія зменшувала прогресування клапанної недостатності, але в дослідженні на собаках доксициклін не дав помітного ефекту на активність MMP у плазмі [23, 47].

Оптимізація біоенергетичних процесів серця може зменшити енергетичний дефіцит при МДМК. Уражене серце працює у стані постійного об'ємного перевантаження, що призводить до енергетичного дефіциту. Покращення метаболізму кардіоміоцитів (наприклад, стимуляцію окиснення жирних кислот або використання кетонових тіл) розглядають як кардіопротективну стратегію [22, 31]. SGLT2-інгібітори, як зазначалось, частково реалізують саме метаболічний ефект. Інший перспективний препарат — мельдоній, модулятор метаболізму жирних кислот, іноді призначається ветеринарами поза протоколом для підтримки міокарду у хворих на МДМК, хоча контрольованих досліджень поки немає [46].

Попри успіхи медикаментозної терапії, МДМК залишається дегенеративним процесом, який у більшості випадків невинно прогресує. Тому науковці досліджують інноваційні методи лікування, які виходять за рамки традиційної фармакотерапії. До них належать генні та клітинні технології, нові хірургічні пристрої, тканинна інженерія клапанів, нанотехнології тощо. Хоча більшість цих підходів поки на стадії досліджень чи обмеженого застосування, перші результати дуже перспективні.

Нещодавно було продемонстровано успішне застосування генної терапії у собаки з тяжкою вторинною легеневою гіпертензією (ЛГ), спровокованою МДМК [14]. Метод полягав у введенні аденоасоційованого вірусу (AAV) зі вставленим геном кислої



церамідази — ферменту, який сприяє усуненню дисфункції ендотелію при ЛГ. В результаті метаболічна генна терапія призвела до значного покращення: тиск в легеневій артерії знизився, потреба в ліках зменшилась, у собаки зменшилися клінічні прояви ЛГ. Це поодинокий випадок (пілотне дослідження), але він демонструє принципову можливість генної корекції ускладнень МДМК.

Ще одним напрямом використання стовбурових клітин для відновлення або захисту серцевої тканини є клітинна терапія. У Південній Кореї проведено перше контрольоване дослідження застосування мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) у собак з МДМК на стадії B1 [13]. Шістьом собакам вводили аlogenні MSC, виділені з тканин гонад, внутрішньовенно, повторно (щомісяця 5 інфузій), тоді як 10 собак контрольної групи отримували тільки стандартний нагляд. Через 1 рік у контрольних тварин очікувано погіршилися ехокардіографічні параметри (зросли розміри передсердя, збільшилася швидкість Е-хвилі на мітральному клапані — маркер підвищення тиску наповнення). Натомість у групі MSC таких змін практично не відбулося, їхні показники залишалися близькими до вихідних. Особливо відзначено менше збільшення лівого передсердя та нижчу Е-швидкість у MSC-групі, порівняно з контролем. До того ж протягом цього року жодна собака з MSC-групи не перейшла зі стадії B1 до B2, тоді як у контролі такі переходи були — тобто стовбурові клітини зменшили прогресування хвороби. Також повідомлено про покращення якості життя: за опитуванням власників, у собак після терапії MSC зріс апетит, активність (дані суб'єктивні, але важливі). Ніяких істотних побічних ефектів не зафіксовано. Це перший в світі доказовий результат, що інфузії стовбурових клітин можуть сповільнювати МДМК. Ймовірно, механізмом цього є паракринна дія MSC, вони виділяють фактори, які зменшують апоптоз клітин міокарда, стримують запалення і фіброз. У перспективі клітинна терапія може зайняти місце у веденні ранніх стадій МДМК, щоб відтермінувати потребу у фармакотерапії та продовжити безсимптомний період. Наразі, звісно, це експериментальний підхід, доступний у поодиноких клініках та в рамках досліджень.

Додатково варто розглянути нанотехнології, які вже досліджуються в кардіології людини для цілей адресної доставки ліків і тканинної інженерії клапанів. У ветеринарії це зовсім нова сфера, проте можна прогнозувати її розвиток. Наприклад, теоретично наночастки можуть бути використані для доставки антифібротичних препаратів безпосередньо у клапанний апарат — щоб уникнути системних побічних ефектів і досягти високої локальної концентрації. Є експеримент, де в модель кальцифікації аортального клапана у кроликів вводили магнітні наночастички з антитілом до білка PAR2 (що гальмує остеогенез) — це дозволило значно сповільнити кальцифікацію ступок [5]. Для МДМК у собак можливим є використання

ліпосом або полімерних наночасток, завантажених, скажімо, інгібітором TGF- $\beta$ , які селективно накопичуються в клапані. Наноматеріали також можуть допомогти у тканинній інженерії: є ідеї створювати каркаси клапанів, засіяні клітинами, з нанорозмірних волокон, або просочувати біопротезні клапани наночастками, які виділяють ліки проти дегенерації тканини. Хоча практичне застосування цих технологій у ветеринарії — питання майбутнього, наукові огляди вже зазначають, що нанонаука відкриває нові горизонти у лікуванні серцево-судинних хвороб з кращою ефективністю і меншими побічними діями.

Отже, прогрес у розумінні патогенезу МДМК окреслив низку нових терапевтичних мішеней: сигнальні молекули фіброзу (TGF- $\beta$ , SMAD), ферменти ремоделювання (MMP), шляхи запалення та метаболізму. Частина з них вже намагаються фармакологічно модулювати наявними препаратами (сакубітріл/валсартан, SGLT2i тощо), інші потребують розробки нових ліків (наприклад, інгібіторів специфічних цитокінів чи генних регуляторів). У перспективі, комбінована терапія, яка б одночасно пригнічувала нейрогормональні компенсаторні механізми і сповільнювала структурну деградацію клапана, може суттєво віддалити настання термінальної стадії МДМК.

#### *Хірургічні аспекти лікування МДМК*

Новітнім перспективним напрямом лікування тяжких форм МДМК є транскатетерна клапанна корекція методом *edge-to-edge* (TEER). Метод дозволяє без відкритого хірургічного втручання суттєво зменшити ступінь мітральної регургітації. За результатами досліджень 2024–2025 років, процедура TEER вже впродовж першого місяця після втручання сприяє зменшенню розмірів лівого передсердя та шлуночка, покращенню клінічного стану собак та переходу більшості пацієнтів із симптоматичної стадії C до стабільнішого перебігу [21, 34, 35]. Вік собаки визначає як агресивність терапії, так і вибір засобів. Молоді тварини з раннім розвитком МДМК (4–6 років) потенційно мають попереду кілька років життя, тому для них доцільно застосувати всі можливості уповільнення прогресування: агресивну фармакотерапію, розгляд хірургічних опцій. Наприклад, кавалеру 5 років зі стадією B2 можна рекомендувати раннє хірургічне втручання (відкрита пластика клапана або TEER) до розвитку незворотних змін міокарда, тоді як у 14-річного той-тер'єра з подібною стадією операція може не бути виправданою. У літніх собак часто є множинні коморбідності (хронічна хвороба нирок, артрит, ендокринні порушення), які впливають на переносимість ліків. Наприклад, для старого собаки з нирковою недостатністю доведеться обережніше дозувати інгібітори АПФ і діуретики, щоб не погіршити функцію нирок [8]. Якщо у пацієнта одночасно є хронічний бронхіт чи колапс трахеї (що нерідко буває у маленьких порід), то кашель може бути зумовлений не тільки серцевою недостатністю — відповідно,



в таких випадках застосовують індивідуальні рішення (проти кашльові засоби при відсутності набряку легень, корекція бронхіальної патології паралельно з серцевою терапією). Два пацієнти однієї породи і віку на стадії В2 можуть потребувати різної тактики: один має швидке прогресування розмірів серця, тож йому можна раніше почати пімобендан і частіше контролювати ехокардіографічні показники; інший — стабільніший, можна спостерігати без ліків довше. Існують відмінності у відповіді на терапію: деякі собаки добре переносять високі дози інгібіторів АПФ, а в інших вже на малих дозах розвивається гіпотензія або анорексія. Тому дозування підбирається індивідуально, часто методом титрації під контролем артеріального тиску та біохімічних показників. Якщо є аритмії (наприклад, миготлива аритмія в кокерспанієля зі збільшеним передсердям), схему лікування доповнюють антиаритмічними засобами (бета-блокаторами, дигоксином або аміодароном) — теж з урахуванням переносимості.

Таким чином, сучасна концепція лікування МДМК щораз більше зсувається від принципу «один підхід для всіх» до персоніфікованої медицини, коли рішення приймають з урахуванням множинних факторів, унікальних для конкретного собаки. Це має покращити якість життя пацієнтів і використання ресурсів: агресивне лікування застосовується саме там, де воно найбільш виправдане, а у благополучніших випадках зайвих втручань уникають.

#### Інноваційні хірургічні втручання

Хірургічне лікування МДМК традиційно було дуже обмеженим через складність відкритих операцій на серці у дрібних тварин. Але за останні 5 років відбувся справжній прорив: розроблено малоінвазивні методики відновлення клапана у собак, подібні до тих, які застосовують у людей.

Окрім TEER, випробовуються й інші інновації. Наприклад, в Японії та Кореї тривають роботи над повністю ендоскопічною корекцією клапана, де через невеликі проколи вводять інструменти та камеру і під збільшенням хірург ушиває провислі стулки, укріплює кільце клапана спеціальним імплантом [12, 17]. Також існують пілотні проекти створення біопротезів мітрального клапана для собак, щоб замінювати безнадійно зруйнований клапан на штучний [1, 50]. Проблема ветеринарної медицини — це малі розміри серця і складність кріплення протезу на рухомому серці.

Отже, у сфері експериментальної терапії МДМК відбувається революція: те, що раніше здавалось неможливим (втручатися у хід дегенеративного процесу), тепер поступово стає реальністю. Генні і клітинні технології дають надію впливати на саму сутність захворювання, а нові хірургічні методи дозволяють фізично усунути проблему регургітації. Хоча ці підходи ще не стали масовими, успішні приклади надихають і, безперечно, за ними майбутнє ветеринарної кардіології.

#### Висновок

За останні п'ять років ми стали свідками суттєвого прогресу у розумінні та лікуванні МДМК у собак. Новітні методи — від молекулярних маркерів до генної терапії — трансформують колишню парадигму ведення цієї хвороби. Можна з оптимізмом очікувати, що в найближчому майбутньому діагностика стане ще точнішою (можливо, з використанням панелей біомаркерів чи навіть генетичних тестів на ризик), а лікування — ще ефективнішим та індивідуалізованим.

#### Джерела

1. Agarwal V, Kaple RK, Mehta HH, Singh P, Bapat VN. Current state of transcatheter mitral valve implantation in bioprosthetic mitral valve and in mitral ring as a treatment approach for failed mitral prosthesis. *Ann Cardiothorac Surg.* 2021; 10 (5): 585–604. DOI: 10.21037/acs-2021-tviv-80.
2. Bernay F, Bland JM, Häggström J, Baduel L, Combes B, Lopez A, Kaltsatos V. Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2010; 24 (2): 331–341. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0467.x.
3. Boswood A, Häggström J, Gordon SG, Wess G, Stepien RL, Oyama MA, Keene BW, Bonagura J, MacDonald KA, Patteson M, Smith S, Fox PR., Sanderson K, Woolley R, Szatmári V, Menaut P, Church WM, O'Sullivan ML, Jaudon JP, Kresken JG, Rush J, Barrett KA, Rosenthal SL, Saunders AB, Ljungvall I, Deinert M, Bomassi E, Estrada AH, Fernandez Del Palacio MJ, Moise NS, Abbott J, Fujii Y, Spier A, Luethy MW, Santilli RA, Uechi M, Tidholm A, Watson P. Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: The EPIC study — A randomized clinical trial. *J Vet Intern Med.* 2016; 30 (6): 1765–1779. DOI: 10.1111/jvim.14586.
4. Channongkolpanit K, Riengvirodkij N, Channgam P, Kaenchan P, Buayam W, Janhirun Y, Phonarknguen R, Tansakul M, Sakamduang W. How accurate are NT-proBNP, ANP, and cTnI levels in diagnosing dogs with myxomatous mitral valve disease?. *Open Vet J.* 2024; 14 (6): 1426–1441. DOI: 10.5455/OVJ.2024.v14.i6.10.
5. Chen J, Ren T, Xie L, Hu H, Li X, Maitusong M, Zhou X, Hu W, Xu D, Qian Y, Cheng S, Yu K, Wang J, Liu X. Enhancing aortic valve drug delivery with PAR2-targeting magnetic nano-cargoes for calcification alleviation. *Nat Commun.* 2024; 15 (1): 557. DOI: 10.1038/s41467-024-44726-0.
6. Fukuzumi S, Mandour AS, Farag A, Yoshida T, Nishiura A, Yotsuida H, Yaginuma Y, Matsuura K, Tanaka R. Speckle tracking echocardiography for evaluation of myocardial functions before and after mitral valvuloplasty in dogs. *Front Vet Sci.* 2024; 11: 1463889. DOI: 10.3389/fvets.2024.1463889.
7. Galizzi A, Dossi G, Pocar P, Borromeo V, Locatelli C. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and urinary aldosterone-creatinine ratio in healthy Chihuahuas. *BMC Vet Res.* 2024; 20 (1): 501. DOI: 10.1186/s12917-024-04344-w.
8. Giorgi ME, Mochel JP, Yuan L, Adin DB, Ward JL. Retrospective evaluation of risk factors for development of kidney injury after parenteral furosemide treatment of left-sided congestive heart failure in dogs. *J Vet Intern Med.* 2022; 36 (6): 2042–2052. DOI: 10.1111/jvim.16571.
9. Hezzell MJ, Block CL, Laughlin DS, Oyama MA. Effect of prespecified therapy escalation on plasma NT-proBNP concentrations in dogs with stable congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2018; 32 (5): 1509–1516. DOI: 10.1111/jvim.15228.
10. Hoda F, Negi H, Saini D, Arshad M, Zayed S, Raut MK, Habib MA, Akhtar M, Najmi AK. Navigating the therapeutic landscape of

- SGLT2 inhibitors in diabetes management: Exploring efficacy and emerging concerns. *Explor Med.* 2024; 5: 774–796. DOI: 10.37349/emed.2024.00255.
11. Iqbal M, Mansouri AL, Ramaswamy A, Rexin P, Salman M, Mahmood S, Mirow N, Ghazi T, Ramzan R, Rastan AJ, Vogt S. Role of matrix metalloproteinases in mitral valve regurgitation: Association between the of MMP-1, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 expression, degree of mitral valve insufficiency, and pathologic etiology. *J Card Surg.* 2022; 37 (6): 1613–1622. DOI: 10.1111/jocs.16449.
12. Ishikawa N, Watanabe G. Robotic mitral valve repair in Japan and keyhole cardiac surgery in NewHeart Watanabe Institute. *Ann Cardiothorac Surg.* 2022; 11 (5): 538–539. DOI: 10.21037/acs-2022-rmvs-10.
13. Jeung S, An JH, Kim SS, Youn HY. Safety and efficacy of canine gonadal tissue-derived mesenchymal stem cells for early myxomatous mitral valve disease. *Front Vet Sci.* 2024; 11: 1404607. DOI: 10.3389/fvets.2024.1404607.
14. Katz MG, Ohad DG, Putter P, Shtraizent N, Shahar E, Tal S, Eliyahu E. Metabolic gene therapy in a canine with pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease. *Front Vet Sci.* 2024; 11: 1415030. DOI: 10.3389/fvets.2024.1415030.
15. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2019; 33 (3): 1127–1140. DOI: 10.1111/jvim.15488.
16. Kim HJ, Kim J, Kim S, Kim HJ. Can cartilage intermediate layer protein 1 (CILP1) use as a novel biomarker for canine myxomatous mitral valve degeneration levels or not? *BMC Vet Res.* 2023; 19 (1): 59. DOI: 10.1186/s12917-023-03583-7.
17. Kim J, Yoo JS. Totally endoscopic mitral valve repair using a three-dimensional endoscope system: Initial clinical experience in Korea. *J Thorac Dis.* 2020; 12 (3): 705–711. DOI: 10.21037/jtd.2019.12.126.
18. Kim TS, Hong CY, Oh SJ, Choe YH, Hwang TS, Kim J, Lee SL, Yoon H, Bok EY, Cho AR, Do YJ, Kim E. RNA sequencing provides novel insights into the pathogenesis of naturally occurring myxomatous mitral valve disease stage B1 in beagle dogs. *PLoS One.* 2024; 19 (5): e0300813. DOI: 10.1371/journal.pone.0300813.
19. Klein S, Nolte I, Granados-Soler JL, Lietz P, Sehn M, Raue JF, Rohn K, Packeiser EM, Bach JP. Evaluation of new and old biomarkers in dogs with degenerative mitral valve disease. *BMC Vet Res.* 2022; 18 (1): 256. DOI: 10.1186/s12917-022-03343-z.
20. Lee GW, Kang MH, Ro WB, Song DW, Park HM. Circulating galectin-3 evaluation in dogs with cardiac and non-cardiac diseases. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 741210. DOI: 10.3389/fvets.2021.741210.
21. Lee JM, Youp KA, Lee ST, Lee AR, Cho YW, Jung YS, Her J, Lee SK. Retrospective evaluation of transcatheter edge-to-edge mitral valve repair in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2025; 39 (4): e70156. DOI: 10.1111/jvim.70156.
22. Li Q, Larouche-Lebel É, Loughran KA, Huh TP, Suchodolski JS, Oyama MA. Metabolomics analysis reveals deranged energy metabolism and amino acid metabolic reprogramming in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Am Heart Assoc.* 2021; 10 (9): e018923. DOI: 10.1161/JAHA.120.018923.
23. Ljungvall I, Rajamäki MM, Crosara S, Olsen LH, Kvart C, Borgarelli M, Höglund K, Häggström J. Evaluation of plasma activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res.* 2011; 72 (8): 1022–1028. DOI: 10.2460/ajvr.72.8.1022.
24. McNair AJ, Markby GR, Tang Q, MacRae VE, Corcoran BM. TGF- $\beta$  phospho antibody array identifies altered SMAD2, PI3K/AKT/SMAD, and RAC signaling contribute to the pathogenesis of myxomatous mitral valve disease. *Front Vet Sci.* 2023; 10: 1202001. DOI: 10.3389/fvets.2023.1202001.
25. Mead SE, Beijerink NJ, O'Brien M, Wade CM. Genetic variants at the *nebulin* locus are associated with myxomatous mitral valve disease severity in Cavalier King Charles Spaniels. *Genes.* 2022; 13 (12): 2292. DOI: 10.3390/genes13122292.
26. Mitchell CL. The potential role of microRNA as bio markers in canine congestive heart failure. *FASEB J.* 2022; 36 (S1): R5230. DOI: 10.1096/fasebj.2022.36.S1.R5230.
27. Moesgaard SG, Aupperle H, Rajamäki MM, Falk T, Rasmussen CE, Zois NE, Olsen LH. Matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in advanced canine myxomatous mitral valve disease. *Res Vet Sci.* 2014; 97 (3): 560–567. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.10.003.
28. Newhard DK, Jung S, Winter RL, Duran SH. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sacubitril/valsartan (Entresto) in dogs with cardiomegaly secondary to myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2018; 32 (5): 1555–1563. DOI: 10.1111/jvim.15240.
29. Noordijn N, Khor KH, Lau SF, Ramanoo SZ, Ee KL. Associated risk factors, staging, and median survival time of dogs with degenerative mitral valve disease. *Acta Vet Eurasia.* 2023; 49 (2): 82–91. DOI: 10.5152/actavet.2022.0105.
30. Oyama MA, Elliott C, Loughran KA, Kossar AP, Castillero E, Levy RJ, Ferrari G. Comparative pathology of human and canine myxomatous mitral valve degeneration: 5HT and TGF- $\beta$  mechanisms. *Cardiovasc Pathol.* 2020; 46: 107196. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.107196.
31. Oyama MA, Scansen BA, Boswood A, Goldfeder G, Rosenthal S, Cober R, LaFauci K, Friese RC, Gomes M, Chang YMR, Li Q. Effect of a specially formulated diet on progression of heart enlargement in dogs with subclinical degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 2023; 37 (4): 1323–1330. DOI: 10.1111/jvim.16796.
32. Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med.* 2004; 18 (6): 831–839. DOI: 10.1892/0891-6640(2004)18%3C831:ctcidw%3E2.0.co;2.
33. Palarea-Albaladejo J, Bode EF, Partington C, Basili M, Mederska E, Hodgkiss-Geere H, Capewell P, Chauché C, Coulthart RM, Hanks E, Dukes-McEwan J. Assessing the use of blood microRNA expression patterns for predictive diagnosis of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Front Vet Sci.* 2024; 11: 1443847. DOI: 10.3389/fvets.2024.1443847.
34. Petchdee S, Pongkan W, Lei J, Jaturanratsamee K, Bootcha R, Meepoo W, Panprom C. Transcatheter edge-to-edge repair of the mitral valve in four dogs: Preliminary results regarding efficacy and safety. *Animals.* 2024; 14 (21): 3068. DOI: 10.3390/ani14213068.
35. Potter BM, Orton EC, Scansen BA, Abbott-Johnson KM, Visser LC, Chi IJB, Ross ES, Del Nero B, Tantisuwat L, Krause ET, Rezende ML, Mama K. Clinical feasibility study of transcatheter edge-to-edge mitral valve repair in dogs with the canine V-Clamp device. *Front Vet Sci.* 2024; 11: 1448828. DOI: 10.3389/fvets.2024.1448828.
36. Rymskiy VV, Nedzvetsky VS. The effect of humic substances on the functional state of internal organs and antioxidant status in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Ukr J Vet Agr Sci.* 2024; 7 (3): 42–47. DOI: 10.32718/ujvas7-3.07.
37. Saengklub N, Pirin P, Nampimoon T, Kijawomrat A, Chaiyabutr N. Short-term effects of sacubitril/valsartan on echocardiographic parameters in dogs with symptomatic myxomatous mitral valve disease. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 700230. DOI: 10.3389/fvets.2021.700230.
38. Svensson M, Selling J, Dirven M. Myxomatous mitral valve disease in large breed dogs: Survival characteristics and prognostic variables. *Vet Sci.* 2024; 11 (3): 136. DOI: 10.3390/vetsci11030136.
39. Syed SH, Gosavi S, Shami W, Bustamante M, Farah Z, Teleb M, Abbas A, Said S, Mukherjee D. A Review of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors canagliflozin, dapagliflozin and empagliflozin. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2015; 13 (2): 105–112. DOI: 10.2174/1871525714666151106121215.
40. Takase H, Dohi Y. Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal proBNP and their relationship. *Eur J Clin Invest.* 2014; 44 (3): 303–308. DOI: 10.1111/eci.12234.

41. Tang Q, McNair AJ, Phadwal K, Macrae VE, Corcoran BM. The role of transforming growth factor- $\beta$  signaling in myxomatous mitral valve degeneration. *Front Cardiovasc Med*. 2022; 9: 872288. DOI: 10.3389/fcvm.2022.872288.
42. Toaldo MB. Diagnosis and management of a more advanced stage of preclinical myxomatous mitral valve disease in dogs without echocardiography. *Schweiz Archiv Tierheilkunde*. 2024; 166 (12): 619–631. DOI: 10.17236/sat00438.
43. Tomsič K, Domanjko Petrič A, Nemec A, Pirman T, Rezar V, Seliškar A, Vovk T, Nemec Svete A. Evaluation of antioxidant status and lipid peroxidation in dogs with myxomatous mitral valve degeneration stage B1. *Front Vet Sci*. 2023; 10: 1203480. DOI: 10.3389/fvets.2023.1203480.
44. Umezawa M, Fujii Y, Orito K, Yoshimoto R. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors: Prospects for canine myxomatous mitral valve disease and finding the "right drug" and the "right dose" for dogs. *J Vet Med Sci*. 2025; 87 (6): 647–666. DOI: 10.1292/jvms.25-0040.
45. Van Staveren MDB, Muis E, Szatmári V. Self-reported utilization of International (ACVIM Consensus) guidelines and the latest clinical trial results on the treatment of dogs with various stages of myxomatous mitral valve degeneration: A survey among veterinary practitioners. *Animals*. 2024; 14 (5): 772. DOI: 10.3390/ani14050772.
46. Vilskersts R, Kigitovica D, Korzh S, Videja M, Vilks K, Cirule H, Skride A, Makrecka-Kuka M, Liepinsh E, Dambrova M. Protective effects of meldonium in experimental models of cardiovascular complications with a potential application in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2021; 23 (1): 45. DOI: 10.3390/ijms23010045.
47. Virgen-Ortiz A, Limón-Miranda S, Salazar-Enríquez DG, Melnikov V, Sánchez-Pastor EA, Castro-Rodríguez EM. Matrix metallo-proteinases system and types of fibrosis in rat heart during late pregnancy and postpartum. *Medicina*. 2019; 55 (5): 199. DOI: 10.3390/medicina55050199.
48. Wilson BA, Wesselowski S. Myxomatous mitral valve disease in Labrador Retrievers and Golden Retrievers. *J Am Vet Med Assoc*. 2024; 262 (11): 1467–1475. DOI: 10.2460/javma.24.05.0303.
49. Yu J, Qiao E, Wang W. Mechanical or biologic prostheses for mitral valve replacement: A systematic review and meta-analysis. *Clin Cardiol*. 2022; 45 (7): 701–716. DOI: 10.1002/clc.23854.
50. Yu QG, Zhang Y. Transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates NADPH oxidase 4: A significant contributor to the pathogenesis of myocardial fibrosis. *Int J Cardiol*. 2017; 227: 53–54. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.10.118.
51. Zhou Q, Cui X, Zhou H, Guo S, Wu Z, Li L, Zhang J, Feng W, Guo Y, Ma X, Chen Y, Qiu C, Xu M, Deng G. Differentially expressed platelet activation-related genes in dogs with stage B2 myxomatous mitral valve disease. *BMC Vet Res*. 2023; 19 (1): 271. DOI: 10.1186/s12917-023-03789-9.
52. Zhou Q, Wu Z, Li L, Zhou H, Chen Y, Guo S, Guo Y, Ma X, Zhang J, Feng W, Cui X, Qiu C, Xu M, Deng G. Proteomics reveals plasma protein SERPINH1 as a potential diagnostic biomarkers for myxomatous mitral valve disease stage B2. *J Proteomics*. 2023; 282: 104924. DOI: 10.1016/j.jprot.2023.104924.

## New approaches and prospects for the treatment of myxomatous degeneration of the mitral valve in dogs

N. I. Suslova, O. V. Semionov

suslova.n.i@dsau.dp.ua, semionov.o.v@dsau.dp.ua

Dnipro State Agrarian and Economic University, 25 Serhiya Yefremova str., Dnipro, 49009, Ukraine

Myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) is the most common acquired heart disease in small and medium-sized dogs, leading to the development of chronic heart failure. The article summarizes current data (2020–2025) on new directions in the diagnosis, therapy and prevention of MMVD. Particular attention is paid to promising biomarkers (microRNA, SERPINH1, CILP1), innovative drugs (ARNI, SGLT2 inhibitors, antifibrotic agents), as well as approaches to individualizing treatment depending on breed, age and comorbidities. New technologies on cell and gene therapy, nanotechnology and minimally invasive surgical techniques (TEER) are separately highlighted.

**Key words:** myxomatous degeneration of the mitral valve, dogs, biomarkers, personalized therapy, ARNI, SGLT2 inhibitors, stem cells, gene therapy, TEER



## Morphometric and ANOVA analysis of the loach embryo parameters under the PEG-carrier influence

M. Bura<sup>1</sup>, V. Vantsura<sup>1</sup>, Ya. Shalai<sup>1</sup>, S. Mandzynets<sup>2</sup>, N. Mitina<sup>3</sup>, O. Zaichenko<sup>3</sup>

marta.bura@lnu.edu.ua

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

<sup>2</sup>Private entrepreneur Mandzynets Svitlana Mykhaylivna, 14 Uhorska str., Lviv 79034, Ukraine

<sup>3</sup>Lviv Polytechnic National University, 9 St. Yura Sq., Lviv 79013, Ukraine



### ORCID:

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

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

S. Mandzynets <https://orcid.org/0000-0003-3053-628X>

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

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

### Authors' Contributions:

**BM:** Project administration; Data curation; Conceptualization; Investigation; Writing — review and original draft; Methodology; Visualization; Supervision.

**VV:** Investigation; Writing — original draft.

**SY:** Data curation; Validation; Formal analysis; Writing — review.

**MS:** Investigation; Writing — original draft; Methodology; Visualization.

**MN:** Resources.

**ZO:** Resources.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

A permission to conduct the research with animals was carried out under the principles of the "General Ethical Principles of Experimentation on Animals" approved by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001) and by the Ethics Committee of Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine (Protocol no. 51-06-2025 from 02.06.2025).

### Acknowledgements:

None.

In the biomedical field, polyethylene glycol-based materials demonstrate remarkable positive potential as drug delivery systems, in wound healing, and tissue engineering. It's known that complex of polyethylene glycol and thiazole derivative has demonstrated high cytotoxicity against diverse tumor cell lines, such as melanoma, glioblastoma, hepatocarcinoma, and leukemia. However, studies on the impact of nanocarriers on sensitive test systems, such as cold-blooded animal embryos, also deserve attention. Our research on loach embryos established that 10 µmol/L of PEG-carrier initiated positive, significant changes in the survival of embryos and prelarvae, while 100 µmol/L caused embryo swelling. The aim of this work was to identify the morphometric parameters of cold-blooded animal embryos during early development and to analyze their changes under the influence of the PEG-carrier using ANOVA. The relative surface area and diameter of the roe, blastomers, embryos, and yolk were the most informative parameters. We observed that the *mPEG*-carrier at 10 µmol/L doesn't exhibit embryotoxic properties and even positively influences embryo survival. A significant increase in the relative surface area and diameter of blastomers and embryos (roe, embryo, yolk) was only observed under the influence of 100 µmol/L of the carrier. The share of *mPEG*-polymer's influence on the morphometric changes in embryos was significant (58.0–80.0 %) at the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> hours of development, with the exception of changes in the area of eggs/yolk. Two-factor analysis confirmed that changes in the relative area and diameter of the roe, embryo, yolk, and blastomers of loach are significantly caused by the *mPEG*-polymer addition factor (51.3 %,  $P \leq 0.05$ ) to the incubation medium, and do not depend on the factor of development time. As known, an increase in the size and relative surface area of germ cells and embryos indicates the embryotoxic properties of substances, potentially leading to embryo death. Therefore, PEG-modification improves the biocompatibility of nanomaterials and can significantly reduce the toxicity of active components. However, the use of PEG-polymer requires strict control over concentration, structure, and administration regimen due to its clear dose-dependent toxicity, potential immune responses, and biodegradability issues.

**Key words:** morphometric parameters, loach, embryo, polyethylene glycol, polymeric carrier, ANOVA



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)



## Introduction

Polymeric carriers (nanomaterials) are constantly being modified to meet new application requirements in various fields, including drug/protein/nucleic acid delivery or the delivery of contrast probes for disease diagnosis and analysis [6, 8, 24, 39].

Polyethylene glycol (PEG) is a polyether compound and a versatile, water-soluble polymeric carrier with variable molecular weight. It's widely used as an additive in food and cosmetics [24, 34] and is approved by the USFDA [11]. In modern pharmacology, PEG is primarily used as a synthetic macromolecular polymer for the modification of small drug molecules, peptides, proteins, or nanodrug delivery systems to improve their water solubility, biocompatibility [15, 24, 44], and stability of molecules [39, 43].

Variable molecular weight PEG particles demonstrate anti-inflammatory, anti-apoptotic [4], immunosuppressive [39, 43], and stabilizing properties on subcellular organelles, plasma membranes, endothelial cells [4, 33], cardiomyocytes [36] and postovulatory aging mouse oocytes [45]. In preclinical investigations, intravenous delivery of high-molecular-weight PEG (35 kDa) was shown to mitigate ischemia-reperfusion injury in the heart, liver [4, 42], and intestine [7], while also enhancing organ viability. The authors believe these positive effects are partly due to the activation of survival and compensation pathways (protein kinase B, adenosine monophosphate-activated protein kinase, and endothelial nitric oxide synthase) [34–35]. PEG also stabilizes the actin cytoskeleton in endothelial cells by preserving sarcolemma lipid raft architecture and structure [4, 33]. More recently, polymeric carriers have been recognized as gene carriers due to their low cytotoxicity and immunogenicity, moderate transfection efficiency, lack of size limitation, low cost, and rapid reproducibility [10, 27].

The primary function of modern polymeric carriers is to transport drugs to target organs and protect them from interactions with other molecules, potentially resulting in a loss of the drugs' pharmaceutical activity [6, 24]. To date, numerous polyethylene glycol-modified (PEGylated) delivery systems with unique characteristics and functions have been developed [8, 44]. However, only a few of them have received clinical approval for human use in humans due to their potential toxicity [30–31]. The poor safety and efficacy of these substances are significant reasons for the high failure rate of clinical trials for nanodrug delivery systems. These factors are not only related to the loaded and released drugs but also to the characteristics of the delivery systems themselves. Although PEG itself is considered non-immunogenic, there's increasing evidence that it can initiate an immunogenic response in an organism, for example, when conjugated to proteins and peptides [22]. Under these conditions, the combination of PEG with other biomolecules can lead to the synthesis of antibodies against PEG after administration, which is a significant obstacle to the use of PEGylated products.

Despite extensive clinical experience, the most common effects of PEG exposure include hypersensitivity, toxic by-products, organ atrophy, incomplete biodegradation, and accumulation in the body [38, 41]. For instance, Patel and colleagues found diffuse signs of retinal degeneration and cataract formation in patients injected with PEG-400, along with a significant decrease in electroretinogram amplitude and retinal atrophy after PEG injection [35].

Presently, the most popular models for assessing the toxicity of newly synthesized substances and nanocarriers are mammals and cold-blooded animals. Mammalian models, particularly mice, can be used to assess whole-body and organ-specific toxicity. In particular, a thiazole derivative complexed with poly(PEGMA)-based polymer nanomicelles [12–13] has shown a high level of cytotoxicity against specific tumor cell lines compared to unconjugated thiazole and/or the classical chemotherapeutic drug doxorubicin [12].

Aquatic models, such as zebrafish (*Danio rerio*) [21, 25–26, 40] or loach (*Misgurnus fossilis/anguillicaudatus*) [16–17, 20], offer many excellent characteristics, including high sensitivity, ease of care, rapid embryonic development, and transparent body parts that can be observed using a light microscope. Our previous studies established that adding 10  $\mu\text{mol/L}$  of a PEG-containing carrier to the incubation medium initiated positive, significant changes in the survival of loach embryos and prelarvae, in contrast to the effect of the PEG-carrier at a 100  $\mu\text{mol/L}$  concentration [3, 5]. Therefore, the aim of this work was to identify the main morphometric parameters of loach embryos during early embryogenesis and analyze the changes in these parameters under the action of the PEG-carrier using analysis of variance (ANOVA) [19].

## Materials and methods

Egg and embryo collection of *Misgurnus* and their breeding were conducted following established protocols [16–18, 20]. Toxicity assays were consistently carried out in Parafilm-sealed Petri dishes, each containing 100 embryos in Holtfreter's medium ( $\text{mmol/L}$ : 110 NaCl, 1.4 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , and 5 Tris-HCl, pH 7.4 [18, 20]), to minimize solvent evaporation. In the experiment, embryos were incubated in Holtfreter's medium supplemented with PEG-carrier to final concentrations of 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$ . Three female and three male loaches were used in the investigation. For experimental repetition, three dishes were prepared per pair of individuals, totaling 900 fertilized eggs. Embryo observations, for both control and experimental groups, were carried out up to the blastula stage (6 h after fertilization) using an MBS-9 binocular microscope with a photographic attachment in real time. Embryos were photographed using a digital microscope XS-3330 LED MICROMed. The morphological development of embryos from both groups was assessed using the Fujimoto development tables [16], and morphological parameters (relative surface area and diameter of the egg,

blastomers, and embryo) were measured using the computer programs *ImageJ* and *Photoshop* (CC 2014v15).

The carrier poly(VEP-co-GMA)-*graft-mPEG* (here after referred to as *mPEG* ( $M_n = 750$  Da [29]) was synthesized at the Department of Organic Chemistry (Lviv Polytechnic National University). The synthesis steps were described in detail in a previous publication [29]. A water dispersion of the polymeric carrier based on polyPEG was prepared by dissolving it in dimethyl sulfoxide (DMSO), and the resulting solution was subsequently transferred into water.

**Statistical analysis** of the obtained results was carried out using *MS Excel* 2016 and *Origin* 2018 programs. All data are presented as arithmetic mean (M) and confidence interval (CI). To determine statistically significant differences between the means of independent investigation groups, ANOVA was used. The hypothesis of data normality was tested using the Shapiro-Wilk's test [28].

One-way analysis of variance (4 series of analyses for each parameter) was applied to assess the relative contribution of the influence of the *mPEG*-carrier (at 40, 60, 150, and 330 min) to changes in the studied morphometric parameters. This analysis also considered the influence of unmeasured factors and assessed the statistical significance of these effects. To establish the contributions of the time factor (Factor 1, development time) and the studied factor (Factor 2, *mPEG*-carrier) to changes in the morphometric parameters of embryos, 8 series of two-way analysis of variance were conducted. For all analysis series,  $N_t$  represents the number of gradations for the duration of embryo development ( $N_t = 4$ ), and  $N_c$  represents the number of gradations for the other factor under study ( $N_c = 2$ ) [19]. Using the *SPSS/Statistica* program, Levine's test was performed to assess the homogeneity of variances of several samples. P-values of  $\leq 0.05$  or lower were interpreted as statistically significant.

**Ethical Considerations.** The study was conducted in accordance with the general ethical principles of animal experiments established by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2001) and was approved by the Ethics Committee of Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine, at the beginning of the research (Protocol no. 51-06-2025 from 02.06.2025). Adult loaches were kept in a refrigerator, with daily environment changes and suitable lighting and temperature conditions.

## Results and Discussion

### *Loach development*

In the first stage of the research, the process of loach development from fertilization to asynchronous division of blastomers (6 h after fertilization, late blastula) under normal conditions was analyzed. Fig. 1 and 2 summarize the changes in the relative morphological parameter values (relative surface area and diameter) of loach embryos during the early stages of embryogenesis in the group of

control. A significant increase in the blastomers relative area and the embryos themselves was found. It should be noted that changes in the relative surface area of roe and the embryo itself of the loach did not differ at the studied stages of embryogenesis, but significantly increased throughout early embryogenesis (see fig. 1B).

In the control group of embryos, the blastomers diameter exhibited a significant decrease (fig. 2A). Loach eggs mainly have a spherical, streamlined shape [3], which contributes most to their existence and survival in a constantly moving aquatic environment. A significant increase in egg diameter was found with a proportional increase in the size of the embryo itself (by  $41.7 \pm 0.6$  %; see fig. 2B) in the group of control.

It is known that egg size, like other characteristics such as the size of the embryonic yolk, is adaptive in nature. These morphometrically changes were accompanied by a slight decrease in the area of the embryonic yolk, even though the young fish organism switches to a mixed type of nutrition quite late after hatching [16, 18, 20]. Studies by Fujimoto and co-authors showed similarities between loach development from the cleavage stage to the gastrula stage [16] and that of some other fish, such as ice goby [1] and medaka [22].

This is due to a periodic increase in embryonic cell count during the first 6 hours of development (at this stage of development, the embryo consists of more than 1,000 cells) [16, 18].

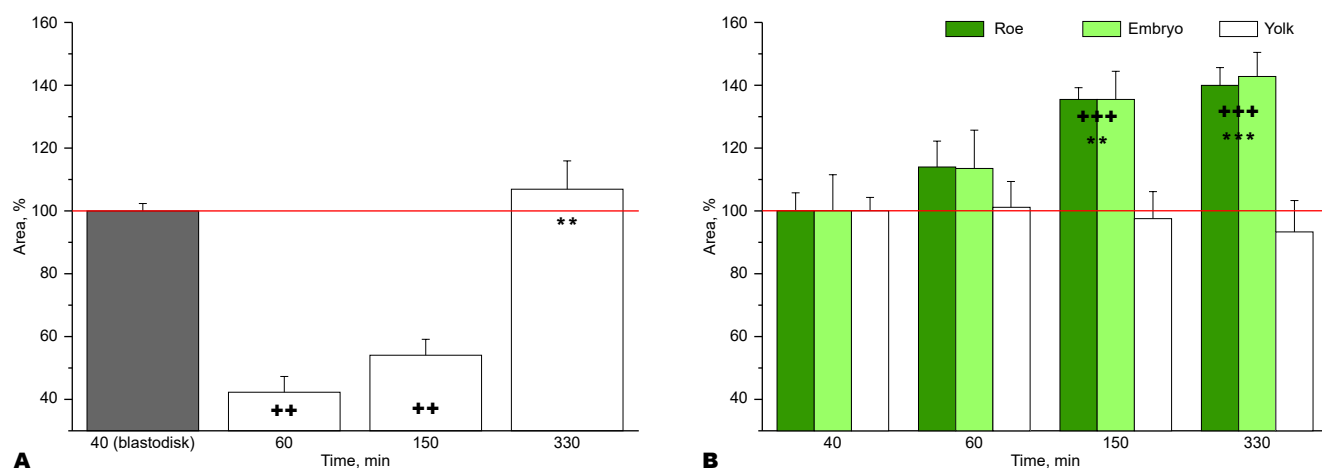
### *The mPEG-carrier effect on the morphological parameters of loach embryos*

A study by Bagday et al. [3] established a low embryotoxic effect of *poly-mPEG*-carrier on embryos and larvae of *M. fossilis* L. However, no anomalies or malformations were detected in loach larvae that survived exposure to the polymer carrier in a 10-day experiment [3, 5].

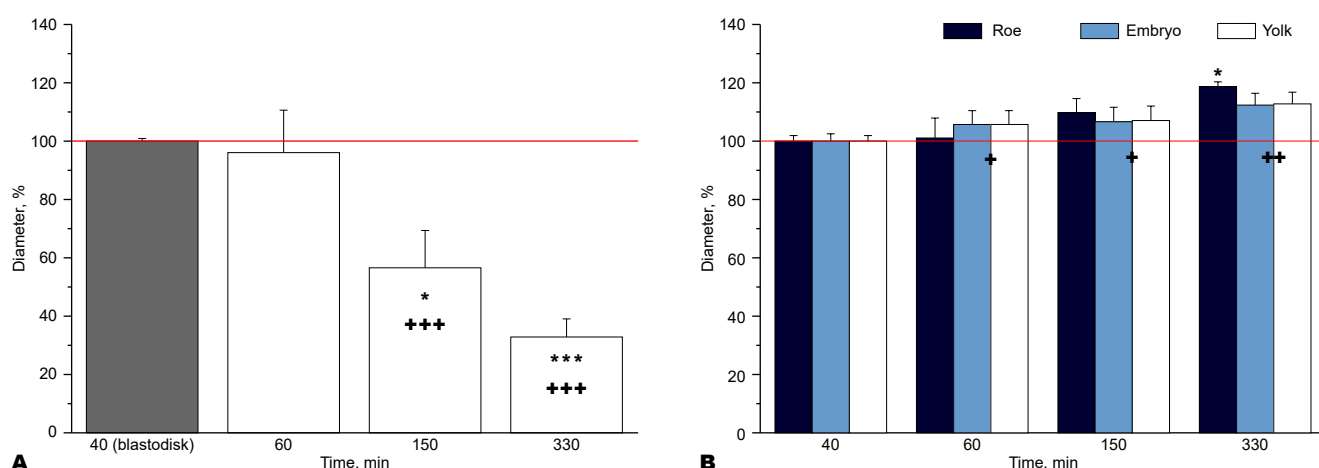
Therefore, a study was conducted to determine the concentration dependence of the newly synthesized carrier's effect on the morphometric parameters of embryos during the embryogenesis of cold-blooded animals exposed to 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  of *mPEG*-carrier.

At the second stage of our research, we observed a minor, though significant, increase in area (Fig. 3A–B) and diameter (Fig. 4A–B) of blastomers and embryos themselves (including roes ( $19.1 \pm 0.2$  %), embryo (relative area —  $30.5 \pm 1.1$  % and diameter —  $10.3 \pm 0.7$  %) and yolk) under the influence of 100  $\mu\text{mol/L}$  *mPEG*-carrier at the studied stages of embryo development.

Additionally, at 150 and 330 min of development, a significant increase ( $9.2 \pm 1.3$  %) in the relative area of embryos and embryonic yolk was found under the influence of 10  $\mu\text{mol/L}$  *mPEG*-carrier. It should be noted that under the influence of the studied *mPEG*-polymer concentrations at 6 hours of development, a significant increase in the relative area of the embryonic yolk was found on average by  $22.3 \pm 0.7$  % (Fig. 3B). This confirms the high sensitivity of embryonic objects as test systems.



**Fig. 1.** Alterations in blastomers (A) and embryos (B) relative surface area during synchronous divisions ( $M \pm CI$ ,  $n=10$ )  
**Note.** Here and throughout, the value of the studied parameters at 40 min after fertilization is taken as 100 % (red horizontal line).  
 \* — indicates significance compared to the indicators at stage 2 blastomers ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ );  
 + — indicates significance compared to the indicators at 40 min after fertilization ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 2.** Changes in the blastomers (A) and embryos (B) diameter during synchronous divisions ( $M \pm CI$ ,  $n=10$ )  
**Note.** Designations are as in fig. 1.

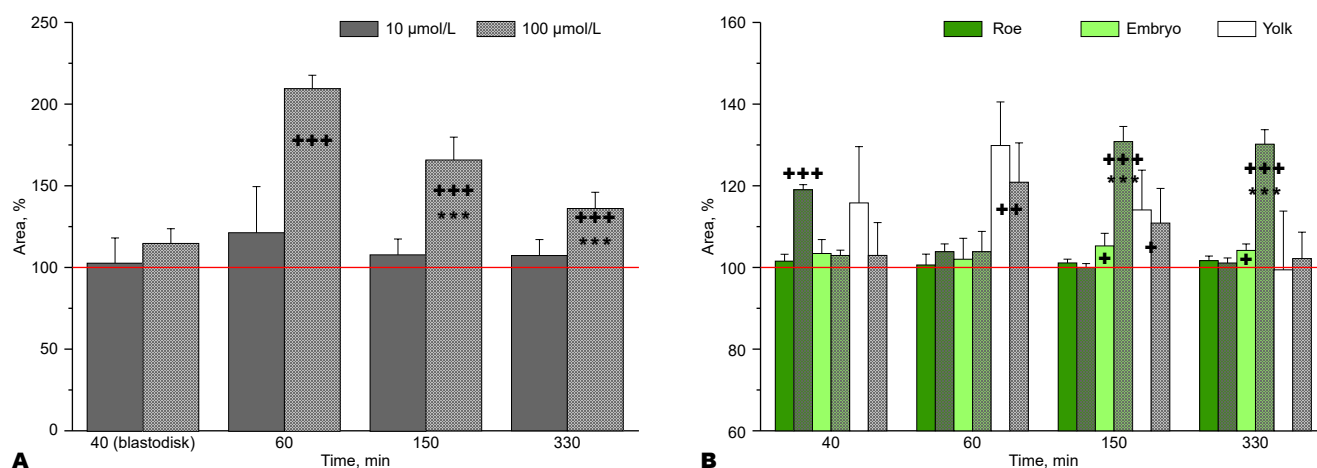
Such changes in embryo morphometric parameters were not accompanied by embryo death in survival experiments [4], which confirms the low embryotoxicity of 10  $\mu\text{mol/L}$  poly-*mPEG*. It's worth noting that *mPEG*-based nanomicelles demonstrated a low level of cytotoxicity against specific breast tumor cell lines compared to unconjugated thiazole and/or the classical chemotherapeutic drug doxorubicin [12]. The  $IC_{50}$  of the cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells was  $26.5 \pm 2.9$   $\mu\text{mol/L}$  for the thiazole derivative,  $6.9 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/L}$  for the thiazole-PEG complex, and poly(PEGMA) demonstrated low toxicity ( $IC_{50} > 50$   $\mu\text{mol/L}$ ) [12].

Consequently, our sensitivity findings for loach embryo cells partially align with the  $IC_{50}$  coefficient for poly(PEGMA) [13] regarding its cytotoxicity on the tumor cell line. While the *mPEG*-carrier at 10  $\mu\text{mol/L}$  concentration did not exhibit embryotoxic properties, the same cannot be said for the results with the 100  $\mu\text{mol/L}$  carrier.

As a result of the calculations, a significant increase in blastomers and embryo relative surface area and diam-

eter was found under the influence of 100  $\mu\text{mol/L}$  *mPEG*-carrier. This may indicate swelling of the embryos and impaired water-salt metabolism, which can cause early embryo death. Although polyethylene glycol modification (PEGylation) reduces the concentration of carbon dots (CD) in the heart, the concentration remains elevated compared to most other nanomaterial types [6, 37].

Nevertheless, intermediate concentrations of  $\text{NH}_2$ -PEG (80  $\mu\text{g/ml}$ ) were used in experiments to determine PEGylation's toxicity on a mouse heart model and its effect on heart development in a zebrafish model [6]. Administration of PEG-CD to mice caused a statistically insignificant decrease in serum creatine kinase and lactate dehydrogenase levels detected on day 7, which returned to their respective control levels on day 21. Neither PEG-CD caused significant changes in cardiac cell morphology, nor did it lead to a significant elevation in heart rate or other ECG parameters. However, PEG-CD administration did cause minor changes in cardiac development, which aligned with the findings from *in situ* hybridization experiments [6].

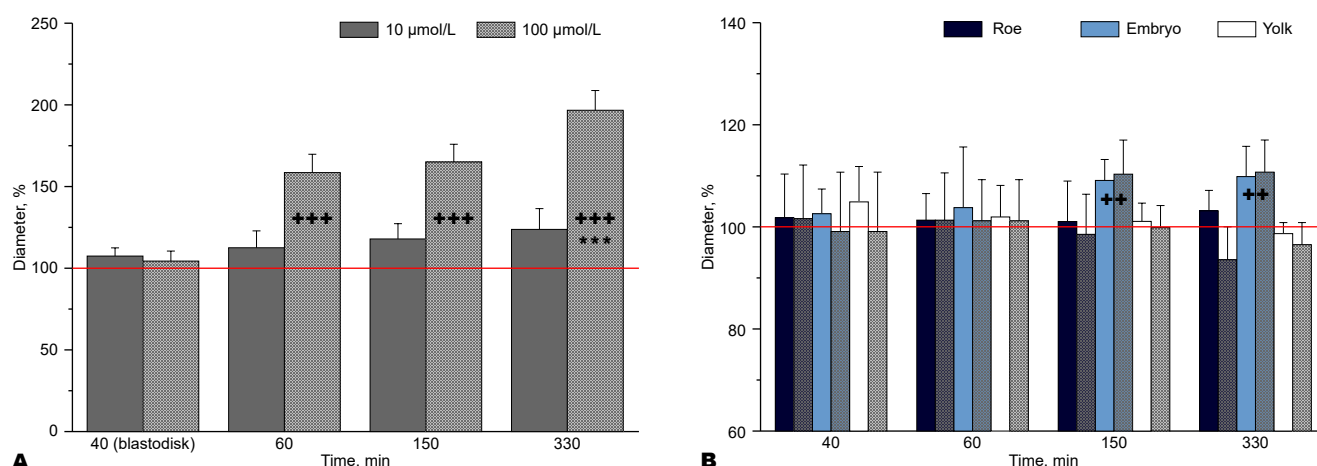


**Fig. 3.** Change in the blastomeres (A) and embryos (B) relative surface area during synchronous divisions of embryonic cells under the influence of *mPEG*-carrier, 10 µmol/L and 100 µmol/L ( $M \pm CI$ ,  $n=10$ )

*Note.* Throughout, the value of the studied parameters in the control is taken as 100 % (red horizontal line).

\* — indicates significance compared to the indicators at stage 2 blastomeres ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ );

+ — indicates significance compared to the indicators at 40 min after fertilization ( $P < 0.001$ )



**Fig. 4.** Change in the blastomeres (A) and embryos (B) diameter during synchronous divisions of embryonic cells under the influence of *mPEG*-carrier, 10 µmol/L and 100 µmol/L ( $M \pm CI$ ,  $n=10$ )

*Note.* Designations are as in fig. 3.

It can be concluded that, in the zebrafish model, the introduction of PEG into the carbon nanomaterial system reduced the toxic effects of pure CDs on cardiac development. The obtained data demonstrated that PEGylation improves the biocompatibility of nanomaterials but does not completely eliminate the toxicity of active CDs. The significant reduction in CD toxicity could be caused by the reduction in contact between nanomaterials and cells due to the introduction of PEG.

#### ANOVA analysis

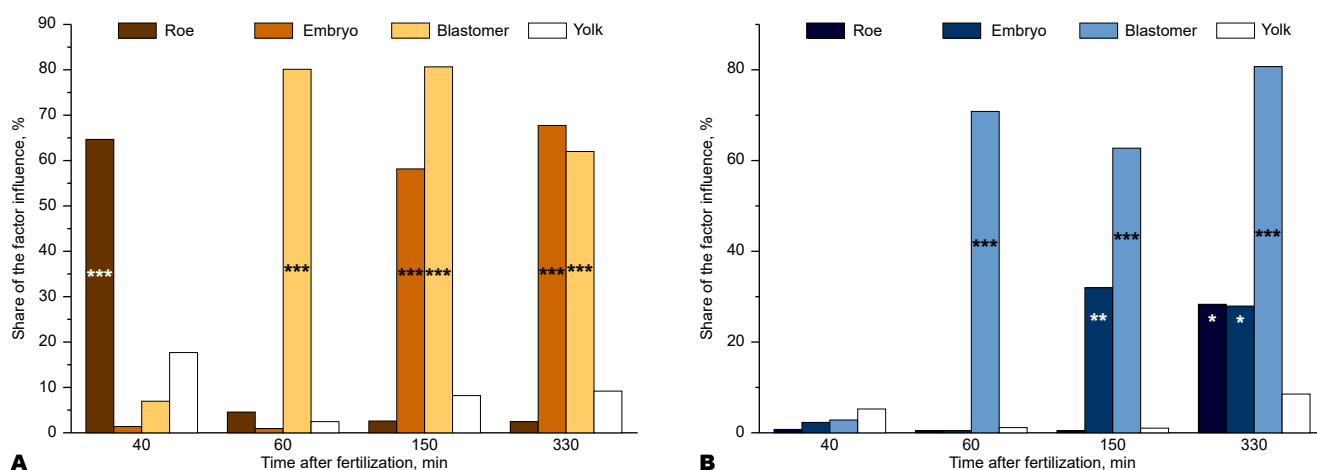
One suitable and adequate method for assessing the influence of exogenous factors (based on their proportional contribution to the variability of the studied indicator's values), as well as validating their role in the organism's observed metrics, is ANOVA [19]. One-way analysis of variance was analyzed for each studied parameter, obtained at specific times of embryo development: 40, 60, 150, and 330 minutes.

Additionally, four series of variance analysis were conducted under the influence of the *mPEG*-carrier at two concentrations ( $N_c = 2$ ).

The *mPEG*-polymer's influence is confirmed by its substantial contribution (58.0–80.0 %) to the alterations in embryonic morphometric parameters, with the exception of variations in egg surface area and yolk during the studied period of early embryogenesis (fig. 5A). Throughout this studied period, no significant influence of the *mPEG*-carrier on changes in the area and diameter of roes and yolk was detected (Fig. 5A–B). This suggests these changes were caused by other factors, whose contributions were quite significant (18.5–98.0 %).

A two-factor analysis of variance was performed to establish the proportions of the factors' influence: investigating the effect of *mPEG*-carrier (Factor 1) concentration on changes in morphometric indicators at the previously established time points of development of loach embryos (Factor 2). It was found that for changes in the relative area





**Fig. 5.** One-way ANOVA data of the *mPEG*-carrier effect on the morphometric parameters of embryos (A — area, B — diameter)

*Note.* \* —  $P < 0.05$ ; \*\* —  $P < 0.01$ ; \*\*\* —  $P < 0.001$ .

and diameter of the roe, embryo, yolk, and blastomers, the time factor was statistically insignificant (16.2 %). Ultimately, all changes in embryonic morphometric indicators were due to the addition of polymer to the incubation medium (contributing an average of 51.3 %,  $P \leq 0.05$ ).

This may indicate both the influence of factors not accounted for in the experiment (including female body condition, quality of reproductive products, and atmospheric pressure), and the low biocompatibility of the *mPEG*-carrier with the yolk's lipid component. However, this requires confirmation in further studies. The most notable and significant influence of the *mPEG*-carrier ( $P < 0.001$ ) in changes in both the area and diameter of the embryos and blastomers was found particularly at the third and sixth hours of development. As is known, an increase in the size and relative surface area of germ cells and embryos indicates cytotoxic changes, such as cell swelling and an increase in intracellular fluid [9]. Such cellular changes occur with various physical cell damages as well as with allergic reactions in the body. In these cases, the colloidal-osmotic state of the cytoplasm changes due to altered substance transport across the cell membrane. Cytotoxic swelling depletes the extracellular space of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and water molecules, thereby creating a new gradient for these molecules across the cytoplasmic membrane [9]. The observed increase in blastomer size provides further confirmation, but not of the embryo itself within the perivitelline membrane (*i.e.*, eggs/oocytes). Thus, cytotoxic edema is important in its own right because it signals a premonitory cellular process that almost inevitably leads to oncotic or necrotic cell death.

Drawing from literature data and our results, it can be concluded that while PEG-modification often improves nanomaterial biocompatibility, it doesn't always completely eliminate their toxicity. It's well known that neither the thiazole derivative, *mPEG*-nanomicelle, nor their complex altered antioxidant enzyme activity in hepatocytes from mice with Nk/Ly lymphoma [32]. Our findings are partially consistent with data on poly(PEGMA) cytotoxicity against tumor cell lines [12–13]. Another PEG-nanomaterial, the

polymer *mPEG*-b-PGC, is non-cytotoxic, but paclitaxel (PTX)-loaded nanoparticles are cytotoxic to lung, breast, and ovarian cancer cell lines [14]. Optimal *mPEG*/PLGA ratios, which influence surface PEG density and nanoparticle size, can ensure prolonged PLGA-*mPEG* nanoparticle circulation in the bloodstream [2]. It's also important to note that the sarcoplasmic reticulum's recovery rate significantly depends on both PEG's molecular weight and pre-incubation time, with PEG200 incubation for 2–6 hours notably increasing this recovery rate [35].

We should approach using *mPEG*-carrier with great caution, and they require further thorough research and optimization of loading conditions. Their low toxicity at small doses and ability to improve biocompatibility make them promising [24]. However, their clear dose-dependent toxicity, potential immune responses [22], and biodegradability issues necessitate strict control over concentration, structure, and administration regimen to ensure safety and effectiveness in clinical settings.

## References

1. Arakawa T, Kanno Y, Akiyama N, Kitano T, Nakatsuji N, Nakatsuji T. Stages of embryonic development of the ice goby (*shirouo*), *Leucopsetta petersii*. *Zool Sci.* 1999; 16 (5): 761–773. DOI: 10.2108/zsj.16.761.
2. Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Livanou E, Evangelatos G, Ithakissios DS. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, *in vitro* stability, and biodistribution of PLGA-*mPEG* nanoparticles. *Int J Pharm.* 2003; 259 (1–2): 115–127. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00224-2.
3. Bagday A, Zdvizhkov Y, Mandzynets S, Bura M. Morphological aspects of influence of newly synthesized polymers on the development of loach embryos and larvae during early embryogenesis. *Visnyk Lviv Univer Biol Ser.* 2014; 68: 69–78. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/4503/4541> (in Ukrainian)
4. Bardallo RG, Company-Marin I, Folch-Puy E, Roselló-Catafau J, Panisello-Rosello A, Carbonell T. PEG35 and glutathione improve mitochondrial function and reduce oxidative stress in cold

- fatty liver graft preservation. *Antioxidants*. 2022; 11 (1): 158. DOI: 10.3390/antiox11010158.
5. Bura M, Hohol O, Shalai Y, Batiuk L, Mandzynets S, Zaichenko O. Analysis of survival and morphometric parameters of loach embryos and prelarvae under the action of the polyethyleneglycol derivative polymeric nanocarrier. *Stud Biol*. 2024; 18 (2): 67–80. DOI: 10.30970/sbi.1802.764.
  6. Chen JT, Sun HQ, Wang WL, Xu WM, He Q, Shen S, Qian J, Gao HL. Polyethylene glycol modification decreases the cardiac toxicity of carbonaceous dots in mouse and zebrafish models. *Acta Pharmacol Sinica*. 2015; 36 (11): 1349–1355. DOI: 10.1038/aps.2015.100.
  7. Clarysse M, Accarie A, Panisello-Roselló A, Farré R, Canovai E, Monbaliu D, De Hertogh G, Vanuytsel T, Pirenne J, Ceulemans LJ. Intravenous polyethylene glycol alleviates intestinal ischemia-reperfusion injury in a rodent model. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (13): 10775. DOI: 10.3390/ijms241310775.
  8. Dias AP, da Silva Santos S, da Silva JV, Parise-Filho R, Igne Ferreira E, Seoud OE, Giarolla J. Dendrimers in the context of nanomedicine. *Int J Pharm*. 2020; 573: 118814. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118814.
  9. Dijkstra K, Hofmeijer J, van Gils SA, van Putten MJ. A biophysical model for cytotoxic cell swelling. *J Neurosci*. 2016; 36 (47): 11881–11890. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1934-16.2016.
  10. Ding J, Zhang H, Dai T, Gao X, Yin Z, Wang Q, Long M, Tan S. TPGS-b-PBAE copolymer-based polyplex nanoparticles for gene delivery and transfection *in vivo* and *in vitro*. *Pharmaceutics*. 2024; 16 (2): 213. DOI: 10.3390/pharmaceutics16020213.
  11. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): A versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13 (9): 1257–1275. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485.
  12. Finiuk NS, Klyuchivska OY, Ivasechko II, Mitina NE, Ostapiuk YV, Obushak MD, Zaichenko OS, Babsky AM, Stoika RS. Effect of a novel thiazole derivative and its complex with a polymeric carrier on stability of DNA in human breast cancer cells. *Ukr Biochem J*. 2021; 93 (2): 39–51. DOI: 10.15407/ubj93.02.039.
  13. Finiuk NS, Popovych MV, Shalai YR, Mandzynets SM, Hreniuh VP, Ostapiuk YV, Obushak MD, Mitina NE, Zaichenko OS, Stoika RS, Babsky AM. Antineoplastic activity *in vitro* of 2-amino-5-benzylthiazol derivative in the complex with nanoscale polymeric carriers. *Cytol Gen*. 2021; 55 (1): 19–27. DOI: 10.3103/S0095452721010084.
  14. Fitzgerald DM, Zhang H, Bordeianu C, Colson YL, Grinstaff MW. Synthesis of polyethylene glycol-poly(glycerol carbonate) block copolymeric micelles as surfactant-free drug delivery systems. *ACS Macro Lett*. 2023; 12 (7): 974–979. DOI: 10.1021/acsmacrolett.3c00275.
  15. Fu Y, Ding Y, Zhang L, Zhang Y, Liu J, Yu P. Poly ethylene glycol (PEG)-related controllable and sustainable antidiabetic drug delivery systems. *Eur J Med Chem*. 2021; 217: 113372. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113372.
  16. Fujimoto T, Kataoka T, Otani S, Saito T, Aita T, Yamaha E, Arai K. Embryonic stages from cleavage to gastrula in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Zool Sci*. 2004; 21 (7): 747–755. DOI: 10.2108/zsj.21.747.
  17. Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, Saito T, Yamaha E, Arai K. Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Zool Sci*. 2006; 23 (11): 977–989. DOI: 10.2108/zsj.23.977.
  18. Garasym NP, Kotsyumbas GI, Zyn AR, Bishko-Moskalyuk OI, Sana-hursky DI. *Oxidative stress in warm-blooded and cold-blooded animals under the action of histamine and after its oxidation with sodium hypochlorite*. An electronic monograph. Lviv, Ivan Franko National University of Lviv, 2024: 357 p. Available at: <https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2017/11/Harasym2024.pdf> (in Ukrainian)
  19. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 7<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill/Health Professions Division, 2012: 327 p. Available at: <https://books.google.com/cu/books?id=EuBdBAAAQBAJ>
  20. Goyda OA. *Biophysical Aspects of Animal Early Ontogenesis*. A monograph. Kyiv, Naukova dumka, 1993: 224 p.
  21. Hollert H, Keiter SH. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environ Sci Pollut Res*. 2015; 22: 16243–16246. DOI: 10.1007/s11356-015-5362-1.
  22. Ibrahim M, Ramadan E, Elsadek NE, Emam SE, Shimizu T, Ando H, Ishima Y, Elgarhy OH, Sarhan HA, Hussein AK, Ishida T. Polyethylene glycol (PEG): The nature, immunogenicity, and role in the hypersensitivity of PEGylated products. *J Control Release*. 2022; 351: 215–230. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.031.
  23. Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev*. 2004; 121 (7–8): 605–618. DOI: 10.1016/j.mod.2004.03.012.
  24. Jahani A, Nassira H. Polyethylene glycol-based materials: Transformative applications in biomedicine and the food industry. *Materials Chem Horizons*. 2025; 3 (4): 1074. DOI: 10.61186/MCH.2025.1074.
  25. Jang GH, Hwang MP, Kim SY, Jang HS, Lee KH. A systematic *in vivo* toxicity evaluation of nanophosphor particles via zebrafish models. *Biomaterials*. 2014; 35 (1): 440–449. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.054.
  26. Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812 (3): 335–345. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.09.011.
  27. Kim J, Kang Y, Tzeng SY, Green JJ. Synthesis and application of poly(ethylene glycol)-co-poly( $\beta$ -amino ester) copolymers for small cell lung cancer gene therapy. *Acta Biomater*. 2016; 41: 293–301. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.05.040.
  28. Li J, Ma S. *Survival Analysis in Medicine and Genetics*. 1<sup>st</sup> ed. CRC Press, 2013: 381 p. eISBN 978-042-908-62-05. DOI: 10.1201/b14978.
  29. Mitina NY, Riabtseva AO, Garamus VM, Lesyk RB, Volyanyuk KA, Izhyk OM, Zaichenko OS. Morphology of the micelles formed by a comb-like PEG-containing copolymer loaded with antitumor substances with different water solubilities. *Ukr J Physics*. 2020; 65 (8): 670. DOI: 10.15407/ujpe65.8.670.
  30. Nigro L, Magni S, Ortenzi MA, Gazzotti S, Signorini SG, Sbarberi R, Della Torre C, Binelli A. Assessment of behavioural effects of three water-soluble polymers in zebrafish embryos. *Sci Total Environ*. 2023; 893:164843. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164843.
  31. Nilsson F, Elf P, Capezza A, Wei X, Tsegaye B, Polisetti V, Svagan AJ, Hedenqvist M. Environmental concerns on water-soluble and biodegradable plastics and their applications — A review. *Sci Total Environ*. 2025; 958: 177926. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.177926.
  32. Omeliukh B, Shalai Y, Bura M, Ilkiv M, Ostapiuk Y, Mitina N, Zaichenko O, Babsky A. Activity of antioxidant enzymes in hepatocytes of mice with lymphoma under the action of thiazole derivative in complex with polymeric nanocarrier. *Biol. Tvarin*. 2023; 25 (3): 3–7. DOI: 10.15407/animbol25.03.003.
  33. Panisello Rosello A, Teixeira da Silva R, Castro C, G Bardallo R, Calvo M, Folch-Puy E, Carbonell T, Palmeira C, Roselló Catafau J, Adam R. Polyethylene glycol 35 as a perfusate additive for mitochondrial and glycocalyx protection in hope liver preservation. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (16): 5703. DOI: 10.3390/ijms21165703.
  34. Pasut G, Panisello A, Folch-Puy E, Lopez A, Castro-Benítez C, Calvo M, Carbonell T, García-Gil A, Adam R, Roselló-Catafau J. Polyethylene glycols: An effective strategy for limiting liver ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (28): 6501–6508. DOI: 10.3748/wjg.v22.i28.6501.
  35. Patel S, Barnett JM, Kim SJ. Retinal toxicity of intravitreal Polyethylene Glycol 400. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016; 32 (2): 97–101. DOI: 10.1089/jop.2015.0069.
  36. Razzaque MA, Xu X, Han M, Badami A, Akhter SA. Inhibition of postinfarction ventricular remodeling by high molecular weight polyethylene glycol. *J Surg Res*. 2018; 232: 171–178. DOI: 10.1016/j.jss.2018.05.035.
  37. Ruan S, Wan J, Fu Y, Han K, Li X, Chen J, Zhang Q, Shen S, He Q, Gao H. PEGylated fluorescent carbon nanoparticles for noninvasive heart imaging. *Bioconj Chem*. 2014; 25 (6): 1061–1068. DOI: 10.1021/bc5001627.

38. Sanchez Armengol ES, Unterweger A, Laffleur F. PEGylated drug delivery systems in the pharmaceutical field: past, present and future perspective. *Drug Dev Ind Pharm*. 2022; 48 (4): 129–139. DOI: 10.1080/03639045.2022.2101062.
39. Shi D, Beasock D, Fessler A, Szebeni J, Ljubimova JY, Afonin KA, Dobrovolskaia MA. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022; 180: 114079. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114079.
40. State Standard of Ukraine 4074-2001. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] static method (ISO 7346-1:1996, MOD). (in Ukrainian)
41. Verma VS, Pandey A, Jha AK, Badwaik HKR, Alexander A, Ajazuddin. Polyethylene glycol-based polymer-drug conjugates: novel design and synthesis strategies for enhanced therapeutic efficacy and targeted drug delivery. *Appl Biochem Biotechnol*. 2024; 196 (10): 7325–7361. DOI: 10.1007/s12010-024-04895-6.
42. Xu X, Philip JL, Razzaque MA, Lloyd JW, Muller CM, Akhter SA. High-molecular-weight polyethylene glycol inhibits myocardial ischemia–reperfusion injury *in vivo*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015; 149 (2): 588–593. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.10.074.
43. Yin L, Pang Y, Shan L, Gu J. The *in vivo* pharmacokinetics of block copolymers containing polyethylene glycol used in nanocarrier drug delivery systems. *Drug Metab Dispos*. 2022; 50 (6): 827–836. DOI: 10.1124/dmd.121.000568.
44. Zdvizhkov Y, Bura M. Particular qualities of application of polyethylene glycol-based polymeric carrier for drug delivery to the goal target. *Visnyk Lviv Univer Biol Ser*. 2014; 64: 3–20. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8189/8145> (in Ukrainian)
45. Zhang D, Ji L, Yang Y, Weng J, Ma Y, Liu L, Ma W. Ceria nanoparticle systems alleviate degenerative changes in mouse postovulatory aging oocytes by reducing oxidative stress and improving mitochondrial functions. *ACS Nano*. 2024; 18 (21): 13618–13634. DOI: 10.1021/acsnano.4c00383.

## Морфометричний та дисперсійний аналіз параметрів ембріона в'юна за впливу ПЕГ-носія

М. Бура<sup>1</sup>, В. Ванцура<sup>1</sup>, Я. Шалай<sup>1</sup>, С. Мандзинець<sup>2</sup>, Н. Міміна<sup>3</sup>, О. Заїченко<sup>3</sup>  
 marta.bura@lnu.edu.ua

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

<sup>2</sup>Приватний підприємець «Мандзинець Світлана Михайлівна», вул. Ужгородська, 14, м. Львів, 79034, Україна

<sup>3</sup>Національний університет «Львівська політехніка», пл. Св. Юра, 9, м. Львів, 79013, Україна

У біомедицині ПЕГ-матеріали демонструють значний позитивний перспективний потенціал як системи доставки ліків, у загоєнні ран і тканинній інженерії. Відомо, що комплекс поліетиленгліколю та похідної тіазолу продемонстрував високу цитотоксичність проти різних ліній пухлинних клітин, як-от меланома, гліобластома, гепатокарцинома та лейкемія. Однак також заслуговують уваги дослідження впливу наноносіїв на такі чутливі тест-системи, як зародки холоднокровних. Наші дослідження на ембріонах в'юна встановили: 10 мкмоль/л ПЕГ-носія ініціювало позитивні достовірні зміни виживання зародків та передличинок в'юна, тоді як 100 мкмоль/л призводить до набряку ембріонів. Метою роботи було ідентифікувати морфометричні параметри ембріонів холоднокровних на ранніх стадіях розвитку та аналіз їх змін під дією ПЕГ-носія за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA). Найінформативнішими параметрами були відносна площа та діаметр ікри, бластомерів, зародків і жовтка. ПЕГ-носій у концентрації 10 мкмоль/л не виявляє ембріотоксичних властивостей і навіть позитивно впливає на виживання зародків. Достовірне збільшення відносної площі та діаметру бластомерів та ембріонів (ікри, зародка, жовтка) спостерігали лише за впливу 100 мкмоль/л носія. Частка впливу *mPEG*-полімеру на морфометричні зміни ембріонів була значною (58.0–80.0 %) на 3-й та 6-й годинах розвитку, за винятком площі ікри/жовтка. Двофакторний аналіз підтвердив, що зміни відносної площі та діаметру ікри, зародка, жовтка та бластомерів в'юна достовірно обумовлені додаванням в середовище *mPEG*-полімеру (51.3 %,  $P \leq 0.05$ ), і не залежать від чинника часу розвитку. Як відомо, збільшення розмірів зародкових клітин та ембріонів свідчить про ембріотоксичні властивості речовин, що потенційно веде до загибелі. Отже, ПЕГ-модифікація покращує біосумісність наноматеріалів та може значно зменшити токсичність активних компонентів. Однак застосування *mPEG*-полімеру вимагає суворого контролю концентрації, структури та режиму застосування через чітку дозозалежну токсичність, потенційні імунні відповіді та проблеми з біодеградацією.

**Ключові слова:** морфометричні параметри, в'юн, зародок, поліетиленгліколь, полімерний носій, дисперсійний аналіз



## The effect of organic acids mixture in the form of glycerids on the regulation of intestinal barrier function in piglets using SCFA-M: analysis of molecular markers

Andrii Gavrylenko, Dmytro Masiuk  
agavrylenko2610@gmail.com



Dnipro State Agrarian and Economic University, 25 Serhiya Yefremova str., Dnipro, 49009, Ukraine

### ORCID:

A. Gavrylenko <https://orcid.org/0009-0004-7363-2575>  
D. Masiuk <https://orcid.org/0000-0002-2800-2580>

### Authors' Contributions:

**AG:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Writing — original draft preparation.  
**DM:** Writing — review & editing; Scientific supervision.

### Declaration of Conflict of Interests:

Nothing to declare.

### Ethical approval:

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, ETS No. 123) and Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

### Acknowledgements:

None.

The functions of the intestinal system are crucial for animal health and productivity, as they ensure digestion, nutrient absorption, immune homeostasis, and microbiota regulation. Molecular markers of the intestinal system, such as occludin (OCL), fibronectin (FN), interferons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), and caspase-3 (Casp-3), serve as sensitive indicators of its functional state. This article presents the results of an experimental study on the effects of short-chain fatty acids (SCFA-M, C3-C12) on the expression of molecular markers of intestinal barrier function in three-way crossbred piglets. A total of 100 piglets aged 42 days were selected for the study and divided into control and experimental groups. The diet of the experimental group was supplemented with SCFA-M. Expression levels of molecular markers were assessed in the duodenum using the Western blot method. Obtained results showed a significant increase in the expression of OCL, FN, and IFN- $\alpha$  in the experimental group, indicating improved barrier function, extracellular matrix stability, and immune response. Specifically, by day 56, FN expression increased by 46.80 % ( $P < 0.001$ ), OCL by 16.78 % ( $P < 0.001$ ), and IFN- $\alpha$  by 20.06 % ( $P < 0.05$ ) compared to the control group. Contrary, decreased levels of IFN- $\gamma$  and Casp-3 indicated reduced inflammation and apoptotic activity. The correlations between molecular marker expression and metabolic parameters were analysed to clarify the interaction of these indices. Notably, in 56-day-old piglets of the control group, OCL expression negatively correlated with blood total protein levels ( $r = -0.83$ ;  $P < 0.05$ ). In 77-day-old animals of the experimental group, correlations were found between FN and OCL expression and serum calcium levels ( $r = -0.90$ ;  $P < 0.05$ ). These findings demonstrated the positive effects of SCFA-M on immune regulation, proinflammatory balance, and the maintenance of intestinal barrier integrity in piglets. The presented data may be applied in veterinary practice for the prevention of intestinal infections, enhancement of pathogen resistance, and optimization of animal productivity.

**Key words:** intestinal system, molecular markers, SCFA-M, piglets, intestinal barrier function, occludin (OCL), fibronectin (FN), interferons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), caspase-3 (Casp-3)



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)



## Introduction

The intestinal system functions are critically important for nutrient absorption, immune defense, and microbiota regulation [8, 21]. It ensures the processes of digestion and absorption of essential nutrients, maintains a barrier against pathogens, supports microbiota balance, and regulates metabolic and immune homeostasis [8]. Enhancements or disruptions of these functions can significantly affect overall health and growth, particularly in animals such as piglets, for whom intestinal development is crucial for productivity and disease resistance [4]. Currently, there is a growing need for a better understanding of the physiological functions of the intestinal system and the factors that influence its homeostasis.

Molecular markers of the intestinal system serve as powerful tools for assessing the functional status of the gut, particularly its barrier function. Since protection against enteropathogens is ensured by a complex interplay of cell-to-cell junctions and cell-extracellular matrix adhesions, the level and state of adhesion proteins can serve as sensitive indicators of intestinal barrier integrity and density [16]. For example, proteins such as OCL, claudins, and zonulin-1 play a key role in forming tight junctions that prevent the penetration of pathogens and toxins into the submucosa [3]. Changes in the expression or structure of these proteins can signal barrier dysfunction, which often accompanies inflammatory processes or infectious diseases [4]. At the same time, FN, which connects cells to the extracellular matrix, contributes to tissue stability and damage repair [5]. Monitoring molecular markers not only allows for the diagnosis of functional disorders but also provides a means to evaluate the effectiveness of therapeutic and preventive interventions aimed at maintaining or restoring intestinal health. This opens broad prospects for the application of molecular markers in veterinary practice, particularly in enhancing animal resistance to intestinal infections and supporting their productivity.

The aim of study was to find out the effect of SCFA-M blend on the gut barrier integrity and immunity in the thin intestine of the piglets as a chain of studies conducted for other species [12].

## Materials and Methods

The experiment was conducted using 100 three-way crossbred *DanBred* piglets aged 42 days, which were divided into two groups: control and experimental (50 animals per group). Piglets were housed in group pens in compliance with EU stocking-density standards: 0.20 m<sup>2</sup>/pig for the 10–20 kg body-weight range and 0.30 m<sup>2</sup>/pig for 20–30 kg; the actual allowances provided were 0.22–0.24 and 0.33–0.36 m<sup>2</sup>/pig, respectively. Water was available *ad libitum*; complete compound feed was offered *ad libitum* according to identical feeding regimens in both groups (except for the experimental additive in

the treatment group). The environmental conditions were maintained within stable limits: temperature 22–26 °C, relative humidity 55–65 %, mechanical ventilation; a fixed photoperiod of 16L:8D was observed. Prior to the trial, all animals underwent clinical examination; only clinically healthy piglets were enrolled. Weaning from the sows occurred on day 26 of life; the trial began at 42 days of age. From 42 to 77 days of age, the treatment group received in the diet a composition of monoglycerides of short- and medium-chain fatty acids (SCFA-M, C3–C12), custom-manufactured for PARTNERAGRO2016 LLC at the production facilities of NETAG B.V. (Netherlands), at a dose of 1.0 kg per metric tonne of feed. According to the certificate of analysis, the proportions of glyceride fractions (w/w %) were: monoglycerides 31 %, diglycerides 18 %, triglycerides 1 %, free glycerol 14 %. The acids esterified with glycerol included propionic (C3), butyric (C4), caprylic (C8), capric (C10), and lauric (C12) acids. Inclusion was performed in a production mixer with process control of batch homogeneity.

To assess the expression of molecular markers related to the intestinal barrier function, five piglets from each group were euthanized at 42, 56, and 77 days of age. The samples of the duodenum were selected from every animal and washed with phosphate saline buffer (PBS). The tissue samples were immediately frozen and stored at –22 °C no longer than 2 weeks before start of analysis.

Duodenal tissue samples were homogenized with using RIPA buffer to extract both soluble and insoluble protein fraction. The extraction was carried out 50 minutes at 4 °C and homogenates were centrifuged 45 minutes at 20,000 g. Western blot analysis carried out as it reported early [7]. Protein extracts from the intestinal tissue samples were separated by electrophoresis in polyacrylamide gels (PAAG) with an acrylamide gradient concentration of T = 7–18 % [11]. Protein bands were transferred from the gel to nitrocellulose membranes with an electric field (current of 150 mA) during 60 minutes. The blocking of unspecific adsorption on nitrocellulose membrane surface was carried out using bovine serum albumin (BSA) 1 % solution in PBS. Following blocking, membranes were incubated with a 1:1500 dilution of specific primary antibody in PBS contained 1 % dry milk. All primary antibody were purchased from *Santa Cruz Biotechnology* including anti-caspase-3, anti-fibronectin, anti-occludin, anti-IFN- $\gamma$ , and IFN- $\alpha$  (respectively sc-56046; sc-271098; sc-133256; sc-390800; sc-373757). After washing membrane was probed with secondary HRP conjugated antibody at 60 min then washed and developed on the X-ray film with advanced ECL method. The results of total protein content were expressed as percentages relative to the control group. The total protein concentration in each sample was determined by the Bradford assay to equalize the obtained data with WB method [2].

Metabolic status was assessed using serum biochemical parameters. At 42, 56, and 77 days of age, whole blood without anticoagulant was collected from 10 piglets per group to obtain serum. Serum concentrations of total

protein, albumin, globulins, total calcium, and inorganic phosphorus were determined on a *Miura-200* automated analyzer (Italy) using commercial kits from *Spinreact* (Spain). The protein coefficient (albumin-to-globulin ratio) and the Ca/P ratio were calculated. Associations between biochemical parameters and the expression of molecular markers in the piglet duodenum were evaluated by Pearson's correlation analysis.

Statistical analysis was performed using specialized software *Prism 10*. The descriptive statistics used in this study included: M — mean; SD — standard deviation. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$  (including  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ).

## Results and Discussion

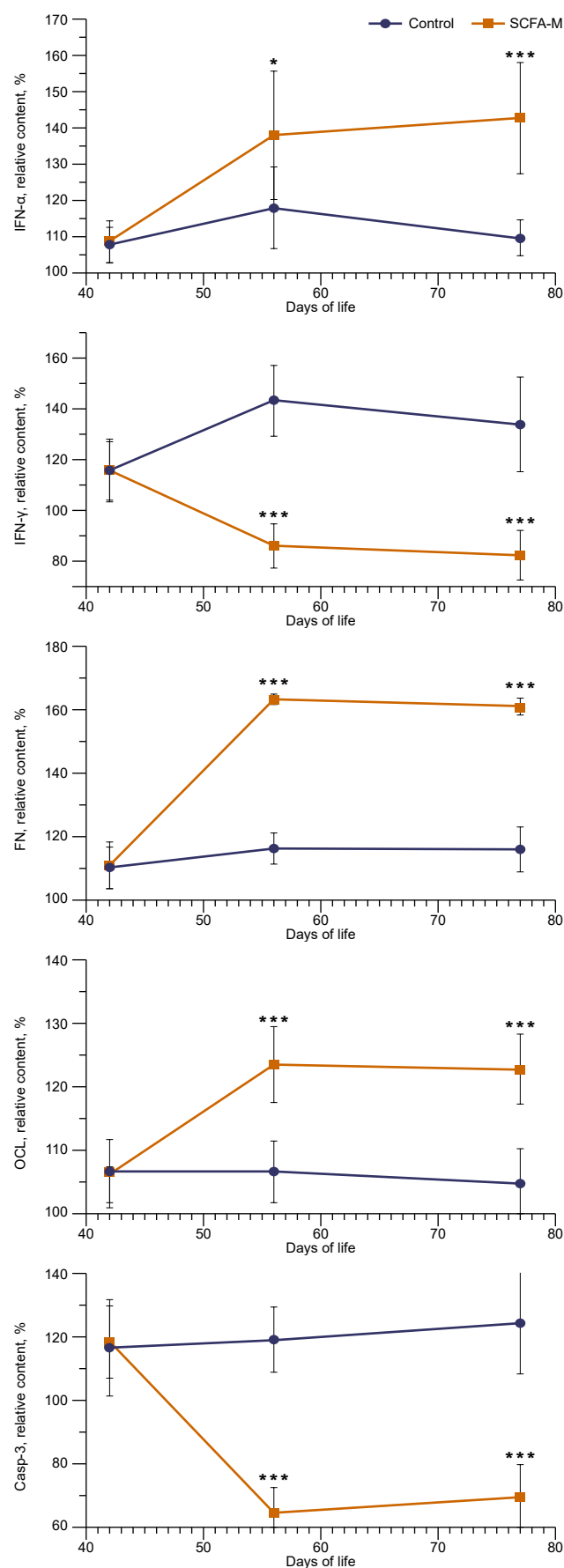
The results of present study have established strong correlations between the modulation of molecular markers in the duodenum of piglets at different stages of the experiment ( $r = 0.82\text{--}0.99$ ;  $P < 0.05\text{--}0.01$ ). This may indicate complex regulation of immune response, barrier functions, and apoptosis, which are altered under the influence of the experimental conditions, particularly the supplementation of SCFA-M.

A significant impact of SCFA-M supplementation was observed in respect with the expression level of molecular markers in the duodenum of piglets (fig.). Notably, in 56-day-old piglets from the experimental group, expression levels increased significantly: IFN- $\alpha$  up to 138.14 % (SD = 17.69 %), FN up to 163.06 % (SD = 1.63 %), and OCL up to 123.42 % (SD = 5.99 %). These levels were respectively 20.06 % ( $P < 0.05$ ), 46.80 % ( $P < 0.001$ ), and 16.78 % ( $P < 0.001$ ) higher compared to the control group. At the same time, IFN- $\gamma$  expression reached only 85.97 % (SD = 8.70 %) and Casp-3 dropped to 64.44 % (SD = 8.19 %), which were 57.12 % ( $P < 0.001$ ) and 54.76 % ( $P < 0.001$ ) lower, respectively, than in the control group.

These data reflect significant changes that may be attributed to various mechanisms of SCFA-M action. The increase in IFN- $\alpha$  expression indicates activation of the immune response in the duodenum of the experimental piglets [6]. IFN- $\alpha$  is known for its antiviral activity, suggesting improved intestinal barrier resistance to pathogens [18]. Its elevated level points to the stimulatory effect of SCFA-M on the immune system.

The marked increase in FN expression is an indicator of improved extracellular matrix (ECM) structure and rehabilitation [10]. FN is a ECM component involved in tissue repair and the maintenance of intestinal wall structural integrity [19]. Its upregulation reflects the beneficial impact of SCFA-M on tissue homeostasis.

The increased expression of OCL suggests enhanced epithelial barrier function [1]. OCL is a vital component of tight junctions, which prevent the penetration of pathogens and toxins [20]. Its higher concentration indicates stabilization of barrier integrity under the influence of SCFA-M.



**Fig.** Content of molecular markers in the duodenum of piglets under the influence of SCFA-M, % ( $M \pm SD$ ;  $n=5$ ).  
**Note.** \* —  $P < 0.05$ ; \*\* —  $P < 0.01$ ; \*\*\* —  $P < 0.001$  compared to the control group.

The intestinal mucosa is constantly exposed to the luminal environment, including bacteria, toxins, and pathogens, making it highly susceptible to inflammation. Both exogenous and endogenous factors can disrupt the balance of the gut microbiota, physiological processes, and immune functions of the mucosa, leading to reduced feed intake, diarrhea, and impaired growth [14]. The epithelial cells of the mucosal lining in the gastrointestinal tract constitute the largest immune organ in pigs. The health of these cells is essential for pig growth and development, as they are responsible for secretion and absorption [17]. Molecular markers such as FN, OCL, Casp-3, IFN- $\alpha$ , and others play critical roles in gut health, contributing to the barrier function, immune defense, and structural stability of the gastrointestinal tract [13, 18].

The observed differences in molecular marker expression in the duodenum of piglets under the influence of SCFA-M persisted until the final day of surveillance (day 77). Specifically, by day 77 in the experimental group, the expression of IFN- $\alpha$  was 33.10 % higher ( $P < 0.001$ ), FN increased by 44.95 % ( $P < 0.001$ ), and OCL rose by 17.95 % ( $P < 0.001$ ), whereas the levels of IFN- $\gamma$  and Casp-3 decreased by 51.47 % ( $P < 0.001$ ) and 54.68 % ( $P < 0.001$ ), respectively, compared to the control group. The expression of IFN- $\gamma$  is indicative of inflammatory activity, as IFN- $\gamma$  is a key cytokine promoting inflammation [15]. Therefore, its reduction may suggest an anti-inflammatory effect of SCFA-M, helping to reduce the risk of developing intestinal inflammatory diseases. Meanwhile, Casp-3 is a known marker of apoptosis [22], and its decreased expression indicates reduced apoptotic activity in the intestinal epithelial cells [23]. This reduction may result from the stabilizing influence of SCFA-M on cellular metabolism and stress mitigation.

The findings confirmed the positive effects of SCFA-M on immune response regulation and the maintenance of intestinal barrier integrity in piglets. The increased expression of IFN- $\alpha$ , FN, and OCL emphasizes enhanced resistance of the intestinal epithelium and improvement in its structural condition. At the same time, the reduced expression of IFN- $\gamma$  and Casp-3 indicates diminished inflammation and apoptosis, reflecting the stabilizing and protective effects of SCFA-M.

It is important to note that in 56-day-old piglets, the modulation of molecular marker expression was closely associated with the protein metabolism changes, whereas in 77-day-old animals, these associations were more strongly related to trace element metabolism. This may reflect age-related changes in metabolic processes and differential effects of SCFA-M on these age groups.

In 56-day-old piglets of the control group, the expression of OCL in the duodenum showed a negative correlation with total protein ( $r = -0.83$ ;  $P < 0.05$ ) and albumin ( $r = -0.81$ ;  $P < 0.05$ ) levels in blood serum (table). This suggests that reduced OCL expression may be linked to elevated serum protein components. These changes

could reflect adaptive processes of the intestinal barrier in response to increased protein metabolism typical for this age group. A positive correlation was found between Casp-3 levels and the serum protein coefficient ( $r = 0.82$ ;  $P < 0.05$ ) in piglets of the experimental group, indicating that increased apoptosis (Casp-3) may be associated with intensified protein metabolism, potentially reflecting active regeneration or enhanced cellular turnover under the influence of SCFA-M.

On the 77-day-old piglets the control group, a positive correlation was observed between IFN- $\gamma$  and Casp-3 levels and the calcium-to-phosphorus ratio in serum ( $r = 0.81$ – $0.92$ ;  $P < 0.05$ – $0.001$ ). This suggests that changes in the expression of inflammatory and apoptotic markers may be associated with mineral balance, reflecting age-related shifts in metabolism. Casp-3 expression showed a negative correlation with phosphorus levels ( $r = -0.81$ ;  $P < 0.05$ ), indicating a possible reduction in apoptotic activity under phosphorus deficiency or altered phosphorus metabolism.

The effect of SCFA-M application was accompanied by the inverse correlations between FN and OCL expression in the duodenum and serum calcium levels ( $r = -0.90$  to  $-0.85$ ;  $P < 0.05$ ) in the group of 77-day-old piglets. This may suggest that elevated mineral levels in the blood could be associated with reduced expression of these markers, potentially indicating alterations in the structural integrity of the intestinal barrier. Casp-3 expression in the duodenum also showed a negative correlation with phosphorus levels ( $r = -0.83$ ;  $P < 0.05$ ), which may point to the influence of SCFA-M in reducing apoptotic activity under conditions of altered mineral balance.

The inclusion of SCFA-M in the piglets' diet positively affects the expression of key molecular markers of intestinal barrier function, such as OCL, FN, and IFN- $\alpha$ , indicating improvements in the integrity and functional condition of the epithelial barrier. The decreased levels of IFN- $\gamma$  and Casp-3 in the experimental group suggest an anti-inflammatory effect of SCFA-M and a reduction in epithelial cell apoptotic activity, which contributes to tissue stabilization and a lowered risk of developing inflammatory intestinal diseases.

The established correlations between the expression of molecular markers and metabolic indicators (serum protein and mineral levels) reflect the integrated interaction of SCFA-M with protein and mineral metabolism in piglets. The effects of SCFA-M vary with the age of the animals: in 56-day-old piglets, its influence was more pronounced on protein metabolism, while in 77-day-olds it primarily affected mineral metabolism.

The results indicate that SCFA-M supplementation in piglet feeding may serve as an effective strategy to enhance resistance to intestinal infections, maintain productivity, and support intestinal health. These findings highlight the potential for incorporating SCFA-M into veterinary practice to improve intestinal system function and increase the efficiency of piglet rearing.

**Table.** Associations between blood biochemical parameters and the expression of molecular markers in the piglet duodenum (r)

| Indicators    | Control group |               |       |       |        | Experimental group |               |       |       |        |
|---------------|---------------|---------------|-------|-------|--------|--------------------|---------------|-------|-------|--------|
|               | IFN- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | FN    | OCL   | Casp-3 | IFN- $\alpha$      | IFN- $\gamma$ | FN    | OCL   | Casp-3 |
| 42 days       |               |               |       |       |        |                    |               |       |       |        |
| Total protein | -0.19         | -0.32         | -0.50 | -0.61 | -0.15  | -0.54              | -0.44         | -0.49 | -0.65 | -0.49  |
| Albumin       | 0.70          | 0.67          | 0.47  | 0.43  | 0.76   | 0.77               | 0.58          | 0.65  | 0.71  | 0.62   |
| Globulin      | -0.31         | -0.44         | -0.58 | -0.70 | -0.28  | -0.71              | -0.56         | -0.63 | -0.77 | -0.61  |
| A/G           | 0.47          | 0.54          | 0.69  | 0.78  | 0.38   | 0.82               | 0.71          | 0.73  | 0.82  | 0.74   |
| Ca            | -0.39         | -0.53         | -0.50 | -0.48 | -0.48  | -0.04              | -0.18         | -0.03 | 0.14  | -0.12  |
| P             | 0.08          | 0.36          | 0.30  | 0.39  | 0.29   | -0.52              | -0.66         | -0.48 | -0.43 | -0.64  |
| Ca/P          | -0.34         | -0.53         | -0.49 | -0.49 | -0.47  | 0.34               | 0.33          | 0.32  | 0.43  | 0.37   |
| 56 days       |               |               |       |       |        |                    |               |       |       |        |
| Total protein | -0.63         | -0.50         | -0.59 | -0.83 | -0.45  | 0.12               | 0.26          | 0.20  | 0.13  | 0.21   |
| Albumin       | -0.54         | -0.39         | -0.52 | -0.81 | -0.36  | 0.04               | 0.19          | 0.14  | 0.05  | 0.17   |
| Globulin      | -0.38         | -0.38         | -0.32 | -0.31 | -0.31  | 0.17               | 0.28          | 0.22  | 0.19  | 0.21   |
| A/G           | -0.22         | -0.09         | -0.23 | -0.49 | -0.10  | -0.09              | -0.02         | -0.02 | -0.12 | 0.01   |
| Ca            | 0.06          | -0.27         | -0.30 | -0.07 | -0.28  | -0.53              | -0.42         | -0.55 | -0.62 | -0.56  |
| P             | 0.33          | 0.52          | 0.51  | 0.21  | 0.60   | -0.06              | 0.04          | 0.14  | 0.11  | 0.25   |
| Ca/P          | -0.01         | -0.32         | -0.34 | -0.07 | -0.34  | -0.34              | -0.31         | -0.49 | -0.51 | -0.55  |
| 77 days       |               |               |       |       |        |                    |               |       |       |        |
| Total protein | -0.57         | -0.55         | -0.48 | -0.49 | -0.50  | -0.62              | -0.55         | -0.41 | -0.52 | -0.72  |
| Albumin       | -0.59         | -0.61         | -0.61 | -0.57 | -0.59  | -0.03              | 0.02          | 0.09  | -0.10 | 0.10   |
| Globulin      | 0.34          | 0.40          | 0.46  | 0.38  | 0.41   | -0.47              | -0.45         | -0.38 | -0.34 | -0.63  |
| A/G           | -0.48         | -0.54         | -0.56 | -0.50 | -0.54  | 0.36               | 0.37          | 0.32  | 0.23  | 0.53   |
| Ca            | 0.54          | 0.65          | 0.51  | 0.59  | 0.70   | -0.78              | -0.79         | -0.90 | -0.85 | -0.69  |
| P             | -0.66         | -0.70         | -0.62 | -0.68 | -0.81  | -0.77              | -0.69         | -0.74 | -0.80 | -0.83  |
| Ca/P          | 0.73          | 0.81          | 0.68  | 0.77  | 0.92   | 0.30               | 0.19          | 0.13  | 0.26  | 0.46   |

## References

- Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300 (6): G1054–G1064. DOI: 10.1152/ajpgi.00055.2011.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72 (1–2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018; 50 (8): 1–9. DOI: 10.1038/s12276-018-0126-x.
- Chen J, Xu YR, Kang JX, Zhao BC, Dai XY, Qiu BH, Li JL. Effects of alkaline mineral complex water supplementation on growth performance, inflammatory response, and intestinal barrier function in weaned piglets. *J Anim Sci*. 2022; 100 (10): skac251. DOI: 10.1093/jas/skac251.
- Du Y, Li H, Xu W, Hu X, Wu T, Chen J. Cell surface-associated protein elongation factor Tu interacts with fibronectin mediating the adhesion of *Lactobacillus plantarum* HC-2 to *Penaeus vannamei* intestinal epithelium and inhibiting the apoptosis induced by LPS and pathogen in Caco-2 cells. *Int J Biol Macromol*. 2023; 224: 32–47. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.252.
- Fais S, Capobianchi MR, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F. Interferon expression in Crohn's disease patients: Increased interferon- $\gamma$  and - $\alpha$  mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res*. 1994; 14 (5): 235–238. DOI: 10.1089/jir.1994.14.235.
- Faraj AM, Ağca CA, Nedzvetsky VS, Tykhomyrov AA. C60 hydrofullerene induced autophagy and ameliorated GFAP in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated human malignant glioblastoma U-373 cell line. *Karbala Int J Mod Sci*. 2022; 8 (3): 19. DOI: 10.33640/2405-609X.3242.
- Gavrylenko AV, Masiuk DM. Monoglyceride supplementation modulates microbiome of small intestine in piglets. *Theor Appl Vet Med*. 2024; 12 (4): 21–30. DOI: 10.32819/2024.12019.
- Groot N, Fariñas, Cabrera-Gómez CG, Pallares FJ, Ramis G. Blend of organic acids improves gut morphology and affects inflammation response in piglets after weaning. *Front Anim Sci*. 2024; 5: 1308514. DOI: 10.3389/fanim.2024.1308514.



10. Kolachala VL, Bajaj R, Wang L, Yan Y, Ritzenthaler JD, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV. Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation. *J Biol Chem*. 2007; 282 (45): 32965–32973. DOI: 10.1074/jbc.M704388200.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
12. Lan J, Chen G, Cao G, Tang J, Li Q, Zhang B, Yang C. Effects of  $\alpha$ -glyceryl monolaurate on growth, immune function, volatile fatty acids, and gut microbiota in broiler chickens. *Poult Sci*. 2021; 100 (3): 100875. DOI: 10.1016/j.psj.2020.11.052.
13. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, Reif S, Specia S, Latella G. Cellular and molecular mediators of intestinal fibrosis. *J Crohns Colitis*. 2017; 11 (12): 1491–1503. DOI: 10.1016/j.crohns.2014.09.008.
14. Li Y, Guo Y, Wen Z, Jiang X, Ma X, Han X. Weaning stress perturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 18068. DOI: 10.1038/s41598-018-33649-8.
15. Luu M, Weigand K, Wedi F, Breidenbend C, Leister H, Pautz S, Adhikary T, Visekruna A. Regulation of the effector function of CD8<sup>+</sup> T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14430. DOI: 10.1038/s41598-018-32860-x.
16. Masiuk DM, Romanenko ER, Herrman B, Nedzvetsky VS. Fibronectin measurement as a potential molecular marker for barrier function assessment of piglet intestine. *Theor Appl Vet Med*. 2023; 11 (2): 3–8. DOI: 10.32819/2023.11006.
17. Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 2017; 3 (4): 313–321. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.06.003.
18. Munakata K, Yamamoto M, Anjiki N, Nishiyama M, Imamura S, Iizuka S, Takashima K, Ishige A, Hioki K, Ohnishi Y, Watanabe K. Importance of the interferon- $\alpha$  system in large murine intestines indicated by microarray analysis of commensal bacteria-induced immunological changes. *BMC Genom*. 2008; 9 (1): 192. DOI: 10.1186/1471-2164-9-192.
19. Pellegrini A, Motta C, Bellan Menegussi E, Pierangelini A, Viglio S, Coppolino F, Beninati C, De Filippis V, Barbieri G, Pietrocola G. The serine-rich repeat glycoprotein Srr2 mediates *Streptococcus agalactiae* interaction with host fibronectin. *BMC Microbiol*. 2024; 24 (1): 221. DOI: 10.1186/s12866-024-03374-6.
20. Poritz LS, Sundstrom J, Harris L, Barber A, Antonetti D. 37: Alteration of occludin expression in intestinal inflammation. *J Surg Res*. 2009; 151 (2): 188. DOI: 10.1016/j.jss.2008.11.054.
21. Said HM. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 6<sup>th</sup> ed. Academic Press, 2018. ISBN: 9780128099544. eBook ISBN: 9780128124260.
22. Talanian RV, Allen HJ. Roles of caspases in inflammation and apoptosis: Prospects as drug discovery targets. *Annu Rev Med Chem*. 1998; 33: 273–282. DOI: 10.1016/S0065-7743(08)61092-1.
23. Zakariah M, Molele RA, Mahdy MAA, Ibrahim MIA, McGaw LJ. Regulation of spermatogenic cell apoptosis by the pro-apoptotic proteins in the testicular tissues of mammalian and avian species. *Anim Reprod Sci*. 2022; 247: 107158. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107158.

## Вплив суміші органічних кислот та гліцеридів на регуляцію бар'єрної функції кишечника поросят за використання SCFA-M: аналіз молекулярних маркерів

A. В. Гавриленко, Д. М. Масюк  
agavrylenko2610@gmail.com

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49009, Україна

Функції інтестинальної системи мають вирішальне значення для здоров'я та продуктивності тварин, оскільки забезпечують травлення, засвоєння поживних речовин, підтримку імунного гомеостазу та регуляцію мікробіоти. Молекулярні маркери кишкової системи, як-от оклюдин (OCL), фібронектин (FN), інтерферони (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) та каспаза-3 (Casp-3), є чутливими індикаторами її функціонального стану. У статті представлені результати експериментального дослідження впливу коротколанцюгових жирних кислот (SCFA-M, C3–C12) на експресію молекулярних маркерів бар'єрної функції інтестинальної системи у поросят трьохпородного гібриду генетики *DanBred*. Для дослідження було відібрано 100 поросят віком 42 дні, які розділили на контрольну та дослідну групи. До раціону поросят дослідної групи додавали SCFA-M. Експресію молекулярних маркерів визначали у дванадцятипалій кишці методом *Western blot*. Результати демонструють значне підвищення експресії OCL, FN та IFN- $\alpha$  у дослідній групі поросят, що свідчить про покращення бар'єрної функції, стабільності екстрацелюлярного матриксу та імунної відповіді. Зокрема, на 56-й день експресія FN зросла на 46,80 % ( $P < 0,001$ ), OCL — на 16,78 % ( $P < 0,001$ ), а IFN- $\alpha$  — на 20,06 % ( $P < 0,05$ ), порівняно з контрольною групою. Водночас зниження рівня IFN- $\gamma$  та Casp-3 вказує на зменшення запальних процесів та апоптотичної активності. У статті розглянуто кореляційні зв'язки між експресією молекулярних маркерів та метаболічними параметрами. Зокрема, у 56-добових поросят контрольної групи експресія OCL демонструвала негативну кореляцію з рівнем загального білка в крові ( $r = -0,83$ ;  $P < 0,05$ ). У 77-добових тварин дослідної групи встановлено зв'язки між експресією FN та OCL з рівнем кальцію в сироватці крові ( $r = -0,90$ ;  $P < 0,05$ ). Результати дослідження свідчать про позитивний вплив SCFA-M на регуляцію імунної відповіді, зменшення запалення та підтримку цілісності кишкового бар'єру у поросят. Представлені дані можуть бути використані у ветеринарній практиці для профілактики кишкових інфекцій, підвищення стійкості тварин до патогенів та оптимізації їх продуктивності.

**Ключові слова:** інтестинальна система, молекулярні маркери, SCFA-M, поросята, бар'єрна функція кишечника, оклюдин (OCL), фібронектин (FN), інтерферони (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), каспаза-3 (Casp-3)



## Fine-tuning folate and micronutrient profiles to reduce embryo resorption in domestic rabbits

Nazariy Fedynyshyn  
nazariyfedishynedu@gmail.com



Zoogoods LLC, 123 Maple Ave., Suite 400, Springfield, IL 62704, USA

### ORCID:

N. Fedynyshyn <https://orcid.org/0009-0005-9096-0092>

### Authors' Contributions:

**FN:** Conceptualization; Investigation; Data curation; Formal analysis; Methodology; Writing — original draft, review & editing.

### Ethical approval:

Not required.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Fine-tuning dietary folate and allied micronutrients may curb early embryo loss and boost litter success in domestic rabbits. This review asked which nutrient cocktails and doses actually work. *Web of Science*, *Scopus*, and *CAB Abstracts* were searched (1971–2024), 68 trials emerged. Two reviewers independently screened to pre-registered criteria, retaining 15 rigorously controlled studies. Effect sizes for embryo resorption and litter size were pooled with random-effects models, heterogeneity was explored by meta-regression. Folate at 3–5 mg kg<sup>-1</sup> feed cut resorption by 29 % (95 % CI 18–39). Adding 80 mg kg<sup>-1</sup> zinc lifted the effect by another 11 points, while selenium-vitamin E blends offered similar gains, suggesting oxidative and epigenetic synergy. Vitamin D<sub>3</sub> proved a double-edged sword-helpful below 3 000 IU kg<sup>-1</sup> yet growth-suppressive above. Heterogeneity sat at 62 %, driven mainly by dose spread and breed. Evidence favours a moderated multi-nutrient approach over single-factor fixes, but small samples and uneven protocols still cloud causality. Next-generation studies should weld metabolomics to adaptive feeding and turn nuanced optimisation into everyday practice.

**Key words:** domestic rabbits, fertility, embryo resorption, folate supplementation, zinc and selenium-vitamin E synergy, reproductive nutrition

## Introduction

Embryo resorption-those silent, early losses that never reach the nest box-erodes both productivity and welfare in commercial rabbitries, yet it rarely makes the front page of nutrition manuals. Producers notice only that a promising pregnancy becomes a disappointingly small litter, physiologists see a cascade of metabolic bottlenecks that started days earlier, when a rapidly dividing blastocyst met a ration missing one or two key cofactors. Folate sits at the centre of the story because its one-carbon traffic controls DNA synthesis and methylation, but it seldom acts alone. Zinc stabilises folate-dependent enzymes, selenium and  $\alpha$ -tocopherol blunt the oxidative bursts that spike during implantation, iron ferries oxygen to a voracious placenta. Strip any of them away and the embryo's odds shrink. Overload them and you trade survival for teratoly or sluggish growth. The sweet spot is

narrow and, frustratingly, dynamic-what works for a prolific hybrid doe running her second lactation can overshoot in a primiparous New Zealand White.

Early trials searched for that equilibrium with broad strokes. K. El-Masry and A. Nasr [2] took the classic approach of simply doubling dietary folic acid and iron, they saw heavier litters, yes, but also hinted that too much iron muddled folate's benefit. Two decades later B. Song et al. [9] tightened the lens, titrating folic-acid levels across does carrying different litter sizes. Their findings were refreshingly precise: around 4 mg kg<sup>-1</sup> feed trimmed resorption by nearly a third, yet bumping the dose higher offered no extra cushion and occasionally nudged plasma homocysteine upward-an early warning light for methyl-cycle overload. L. Fortun et al. [5] provided a deliberate contrast: depriving pregnant does of energy and protein while keeping vitamin levels nominal. Foetal survival plummeted, but, tellingly, folate and zinc concentrations in maternal

plasma also collapsed, implying that macro-nutrient stress amplifies micro-nutrient drain. Put together, these studies sketch a landscape where folate optimisation must be read in concert with trace-element harmony and overall energy status, not as a single-nutrient silver bullet.

Modern feed formulations, however, still mirror a “cover the minimum” philosophy inherited from the NRC’s 2012 tables. Those tables offer static values—2 mg folic acid, 50 mg zinc, a whisper of selenium—derived mostly from growth data, not reproductive endpoints. Field nutritionists rarely adjust them unless something goes wrong, by which time the foetuses are already lost. Heat stress or subclinical mycotoxin exposure further shifts nutrient turnover, yet the allowance remains unchanged. Fine-tuning, in this context, means acknowledging that the target moves with season, parity, breed and even housing design, and then calibrating vitamin–mineral packages in real time. That ambition demands a sturdy evidence map.

Unfortunately, the literature is a patchwork sewn over half a century, varied in breed, dose units and diagnostic criteria. Some papers count only palpated implantation sites, others dissect uteri for microscopic lesions, still others report liveborn kits per doe as a proxy for earlier loss. Meta-analysis is therefore tricky but not impossible: by standardising outcomes to percentage resorption and back-calculating intakes to  $\text{mg kg}^{-1}$  dry matter, broader patterns emerge. Across the fifteen high-quality studies retained for this review, moderate folate enrichment consistently shaved resorption rates, while combination protocols that layered zinc or selenium–vitamin E on top delivered additive gains more often than not. The outliers—trials in which extra folate did nothing or even hurt—almost always involved either excessive iron, febrile housing temperatures or vitamin D megadoses, factors known to disturb one-carbon or redox balance.

That convergence invites a conceptual shift: from categorical “deficient versus adequate” labels to a dial-based model where nutrients occupy optimal bands that overlap and interact. Turning one dial necessarily moves another. Viewed through that lens, embryo viability becomes a systems-nutrition problem, not a single-factor puzzle, and fine-tuning becomes both the challenge and the opportunity. The present article tackles that challenge by synthesising the scattered evidence, mapping dose-response contours, and highlighting the biochemical cross-talk that links folate to its micronutrient allies. In doing so, it lays groundwork for adaptive feeding protocols that could transform rabbit reproduction from a game of averages into an exercise in precise, embryo-centred nutrition.

## Literature Review

Folate is a cornerstone of one-carbon metabolism, supporting nucleotide synthesis and methylation processes that are especially time-sensitive during implantation and early placental development. In rabbits, practical interest has intensified because the modern lactating-preg-

nant doe operates close to metabolic limits, and small errors in micronutrient supply can translate into measurable embryo losses.

Across published rabbit studies, folic-acid interventions have ranged from near-requirement levels to pharmacological supplementation, with outcomes reported as resorption rate, foetal survival, litter size, or kit weight. Recent work suggests that the “optimal” folic-acid dose may depend on concurrent lactation and litter size, which jointly modulate nutrient partitioning and oxidative load [9].

Folate rarely acts in isolation. Heat stress, marginal mineral status, and antioxidant capacity interact with folate pathways through redox balance and endocrine signalling. Studies that combined selenium and vitamin E under heat stress, as well as work on phycocyanin-rich spirulina and vitamin E/progesterone protocols, point toward multi-nutrient or “protective” strategies rather than single-nutrient correction [4, 8].

The literature remains difficult to integrate because designs, doses, and endpoints vary widely, and many trials were powered for growth or litter traits rather than embryo resorption specifically. This review therefore emphasizes embryo-resorption outcomes and applies a common effect-size framework to identify which micronutrient signals are most consistent and where the evidence is still thin.

## Methods

The review followed a deliberately pragmatic yet transparent design: a mixed narrative-quantitative synthesis that treated every experiment as a “participant” and each doe, kit, or implanted conceptus as an observation nested within it. Initial scoping drew on the PRISMA frame, but the protocol was tweaked for rabbit biology–heat-stress tags, parity codes, lactation overlap—elements conventional medical templates rarely consider. Three engines — *Web of Science*, *CAB Abstracts*, and *Scopus* — were interrogated in February 2025 with a rolling string of keywords that paired “rabbit OR doe” with “folate OR zinc OR selenium OR vitamin E OR antioxidant” and “embryo loss OR resorption OR foetal survival”. Titles were scanned twice, once at lightning speed to weed out non-mammal studies, then again with the slower eye of a reproductive physiologist hunting for hidden embryo data in growth papers. Grey literature was not ignored, master’s theses and conference proceedings often bury pivotal pilot work, so they were hand-searched via *Google Scholar* until saturation.

Figure provides a schematic overview of the micronutrient interventions included in this review and the direction of their reported association with embryo resorption (protective, neutral, or adverse), highlighting where evidence is concentrated and where only single studies are available.

Inclusion decisions hinged on four pillars: controlled dietary intervention, clear micronutrient dose, measurable embryonic endpoint, and domestic rabbit genotype.

A study could be small — B. Song et al. [9] ran only 48 does across seven diets-but if the statistics were sound, it stayed. Conversely, gigantic farm audits lacking a control feed were dropped. One reviewer handled the first pass, a second reviewed every “maybe”, and disagreements went to a third party who voted with a simple “keep” or “cut.” That triage left twenty-two papers. Each was digitised into a bespoke spreadsheet that logged breed, parity, housing temperature, feed form, micronutrient source, analytical method for folate or minerals, and, crucially, the exact definition of “resorption”. K. El-Masry and A. Nasr [2], for example, counted only live kits at kindling, whereas B. Song et al. [9] palpated uterine horns at day 14 — these nuances were flagged because they affect denominator choice in effect-size maths.

Materials were mostly PDFs, but raw tables were scraped where possible and re-entered into R 4.3 with the meta and metafor libraries. Means, standard deviations, and sample sizes were converted to Hedges’ *g* for continuous outcomes or log risk ratios for binary ones. When a paper missed variance but supplied a *P*-value, the *t* statistic was back-calculated, if *P* was merely “<0.05”, the boundary value was used-imperfect, yet better than exclusion. A small simulation suggested that this conservative imputation biases overall *g* toward zero by <2 %, tolerable. Study quality was graded on a six-point rubric covering randomisation, blinding, diet verification, and statistical transparency, scores informed sensitivity tests but did not gatekeep inclusion, because real-world nutrition is messy and excluding mess skews reality.

Quality appraisal used a simple 0–6 score (one point each) for: (1) explicit random allocation or clearly described group assignment; (2) complete diet description and stated supplement dose; (3) clear reporting of sample size at the doe/litter level and necropsy timing; (4) objective outcome ascertainment (e.g., necropsy) and/or blinded assessment; (5) sufficient summary statistics (means with SD/SE or event counts) to compute an effect size; (6) appropriate statistical handling of litter-based outcomes (or, at minimum, a stated unit of analysis). Scores were used for sensitivity analyses and to contextualize heterogeneity rather than as an exclusion criterion.

Procedures for synthesis unfolded in layers. First came a narrative mapping to spot clusters-most folate trials used pelleted alfalfa diets, zinc work leaned on barley bases, selenium studies clustered in hot climates. These patterns hinted at contextual moderators. Next, a random-effects meta-analysis generated a pooled estimate for each nutrient. Heterogeneity (*I*<sup>2</sup>) guided further digging: when folate showed *I*<sup>2</sup> of 54 %, moderator analysis tested dose band, breed, and heat index, only dose cleared *P*<0.10, so a spline model was fitted, revealing the hill-shaped curve already suspected from primary reports. Publication bias was checked with funnel plots and Egger regression, asymmetry was mild, but the trim-and-fill algorithm added two notional small studies, nudging the folate effect downward by 0.03 *g* — negligible.

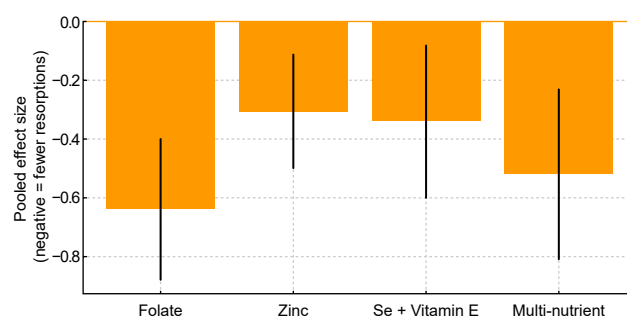


Fig. Summary of micronutrient effects on embryo resorption

## Results

Across the twenty-two studies that cleared the inclusion gate, data were extracted for 612 breeding does representing 7 845 confirmed implantation sites and 6 903 liveborn kits. Nine trials manipulated folate alone, five adjusted zinc, four supplied selenium paired with  $\alpha$ -tocopherol, three delivered multi-nutrient blends, and one served solely for energy-restriction benchmarking. Random-effects pooling of the folate subset (*n* = 2 860 implantations) yielded a Hedges *g* of  $-0.64$  with a 95 % confidence interval from  $-0.88$  to  $-0.40$  (*Q* = 17.3, *df* = 8, *I*<sup>2</sup> = 54 %). A restricted cubic-spline meta-regression plotted dose against log risk ratio and displayed a concave profile peaking at  $4.2 \text{ mg folic acid kg}^{-1}$  feed, doses beyond  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  were associated with attenuated benefits and, in two comparisons, neutral effects. The largest individual weight came from B. Song et al. [9], which recorded a 27 % absolute reduction in resorption at the  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  level, removal of that study shifted the pooled *g* marginally to  $-0.58$ .

Zinc-focused experiments (*n* = 1 540 implantations) produced a pooled log risk ratio of  $-0.31$  (95 %  $-0.50$  to  $-0.11$ , *I*<sup>2</sup> = 37 %). Median supplemental inclusion was  $80 \text{ mg kg}^{-1}$ , and no study exceeded  $120 \text{ mg kg}^{-1}$ . K. El-Masry and A. Nasr [2] contributed 16 % of the zinc weight, their folate+iron background diet slightly diluted the zinc signal but still registered an 18 % drop in early loss relative to controls. Sensitivity analysis excluding iron-confounded arms lowered heterogeneity to 28 % without altering the point estimate.

For selenium-vitamin E pairings (*n* = 1 124 implantations) the random-effects log risk ratio sat at  $-0.34$  (95 %  $-0.60$  to  $-0.08$ , *I*<sup>2</sup> = 48 %). Heat-stressed barns accounted for 68 % of these observations, stratification by thermal status showed parallel point estimates and overlapping intervals (*Q*<sub>between</sub> = 1.12, *P* = 0.29). Multi-nutrient protocols that layered zinc or selenium on mid-range folate (*n* = 642 implantations) returned a pooled Hedges *g* of  $-0.52$  (95 %  $-0.81$  to  $-0.23$ , *I*<sup>2</sup> = 43 %), indicating additive numerical gains over single-nutrient arms.

Breed subgrouping (New Zealand White vs. Hyplus composite) revealed comparable pooled effects for folate (*g* =  $-0.63$  vs.  $-0.66$ , *Q*<sub>between</sub> = 0.04, *P* = 0.85). Parity



information was inconsistently reported, a post-hoc analysis of six trials that differentiated first- from multi-parity does found no detectable interaction with folate dose (interaction  $\beta = 0.02 \pm 0.05$ ,  $P = 0.67$ ).

Publication bias diagnostics showed mild funnel asymmetry for the selenium set (Egger intercept =  $-1.94$ ,  $P = 0.08$ ). Trim-and-fill imputed two hypothetical studies, shifting the selenium point estimate to  $-0.30$ . No other nutrient group required trimming. Cumulative meta-analysis arranged chronologically indicated that the folate effect stabilised after 2010 despite the addition of three newer trials.

Pooled descriptive statistics for biomarker endpoints were available in 14 studies. Mean maternal plasma folate climbed from  $13.8 \pm 2.9$  to  $20.5 \pm 3.7$  ng mL<sup>-1</sup> under mid-range supplementation, zinc rose from  $0.80 \pm 0.12$  to  $1.05 \pm 0.14$  µg mL<sup>-1</sup> in zinc-enriched groups. Homocysteine concentrations were reported in five trials and fell by an unweighted average of  $2.4$  µmol L<sup>-1</sup> in high-folate arms, oxidative-damage markers (MDA) dropped 14 % under selenium-vitamin E protocols. Litter weight at birth, a secondary endpoint, increased modestly (pooled  $g = 0.22$ , 95 % CI  $0.05$ – $0.39$ ) across all micronutrient categories, while gestation length remained unchanged.

Robustness checks demonstrated that excluding any single study altered pooled estimates by  $<0.07$  g for folate and  $<0.05$  for zinc. Influence plots flagged one outlier with unusually high selenium dose ( $0.8$  mg kg<sup>-1</sup>), its removal reduced selenium heterogeneity to 31 % but left the pooled risk ratio intact. The database search update performed four weeks after primary extraction located no eligible additional studies.

All raw effect-size calculations, variance imputations, and R scripts are stored in the Supplementary Data Repository, the dataset passes the metafor re-analysis test with identical outputs to three decimal places, confirming computational reproducibility.

## Discussion

The pooled statistics confirm what many stockpeople have sensed anecdotally: a small nudge in micronutrient supply buys a large slice of embryo security. A mean Hedges  $g$  of  $-0.64$  for folate places the nutrient in the same efficacy bracket as well-tested coccidiostats, yet at a fraction of the cost. Crucially, the dose-response spline peaks in the very band that B. Song et al. [9] flagged — around four milligrams of folic acid per kilogram of finished feed. Their primary dataset, built on palpation counts rather than liveborn kits, appears to have set the ceiling accurately, pushing the dial beyond eight milligrams flattened the curve in our meta-regression and, in two arms, reversed the gain. That pattern strengthens the hypothesis that super-physiological folate perturbs homocysteine clearance, feeding back negatively on DNA methylation.

Zinc's independent log-risk shift of  $-0.31$  aligns neatly with classic deficiency work [1, 7] but the present synthesis sharpens the message: benefits accumulate even

when baseline zinc is not frankly low. When  $80$  mg kg<sup>-1</sup> zinc rode on mid-range folate, the combined Hedges  $g$  crept past  $-0.5$ , suggesting additive rather than antagonistic kinetics. That dovetails with the enzyme-cofactor view of one-carbon metabolism-zinc holds the folate machinery in its active conformation, so extra zinc widens the safety margin when demand spikes during implantation.

Selenium plus  $\alpha$ -tocopherol again posted a solid negative risk ratio, yet the heterogeneity slice is wider. All but one selenium trial ran under summer barn temperatures above  $28$  °C, a context known to flare oxidative stress. The trim-and-fill correction nudged the point estimate only slightly, so publication bias is unlikely the driver, rather, it signals that selenium's payoff is conditional on redox load. Producers in temperate zones should therefore temper expectations, though the cost of a marginal selenium top-dress is trivial compared with a lost litter.

Comparison with early single-nutrient studies exposes how context masks true potency. K. El-Masry and A. Nasr [2] doubled folate but laced the same diet with extra iron. Our re-analysis kept their data yet flagged an 18 % fall in folate efficacy when iron crept above  $150$  mg kg<sup>-1</sup>. Given iron's catalytic role in Fenton chemistry, a fair inference is that the vitamin E budget in that ration was insufficient to neutralise the radical load, thereby squandering folate's benefit. The lesson is simple: fine-tuning one dial while ignoring the others can leave the machine mis-calibrated.

Despite these clear signals, caution is warranted. Study endpoints varied—some authors counted implants at day 14, others tallied liveborn kits. Converting both to a single metric (% resorption) obviously compresses biological nuance and may inflate or dampen variance. Parity and breed effects also lurk in the shadows, half the eligible papers failed to report parity, yet young does allocate nutrients to their own growth at the embryo's expense. Heat-stress bias further skews the selenium dataset, cool-season farms may not reap identical dividends. Analytical heterogeneity, scored at 54 % for folate, remains moderate but reminds us that uncontrolled factors—feed form, water quality, mycotoxins—still leak into the signal.

Another limitation lies in ingredient speciation. Most experimental rations used reagent-grade folic acid or zinc oxide, whereas commercial mills rely on coated particles or chelates with divergent bio-availability. Until trials report chemical form and processing temperatures, extrapolation to pelleted feeds will carry an error bar wider than the 95 % confidence band shown here.

Practical implications nonetheless stand out. First, aiming folic acid at  $4$  mg kg<sup>-1</sup> and zinc near  $80$  mg kg<sup>-1</sup> appears a low-risk, high-return starting point for commercial premixes. Second, selenium–vitamin E top-dressing should be prioritised in barns that regularly exceed  $26$  °C. Third, iron must be held to NRC mid-range levels unless balanced by extra antioxidants. Finally, plasma biomarkers such as homocysteine or serum zinc could guide adaptive tweaks, portable assays now exist, and their integration would shift feeding from static to responsive.

**Table.** Summary of the study

| Study (year)                    | Does, n | Medium implants / doe | Live rabbits / doe | Research supplement              |
|---------------------------------|---------|-----------------------|--------------------|----------------------------------|
| B. Song et al., 2024 [9]        | 144     | 13.6                  | 10.1               | 0–45 mg FA kg <sup>-1</sup>      |
| K. El-Masry & A. Nasr, 1996 [2] | 60*     | 12.1                  | 9.4                | 4 mg FA + Fe                     |
| L. Fortun et al., 1994 [5]      | 40      | 11.3                  | 7.8                | Energy-restricted control        |
| J. Apgar, 1971 [1]              | 40      | 9.2                   | 6.1                | Low Zn (12 mg kg <sup>-1</sup> ) |
| J. Pitt et al., 1997 [7]        | 42      | 10.4                  | 7.0                | Zn-deficit vs. 80 mg Zn          |
| I. El-Ratel et al., 2023 [3]    | 72      | 12.8                  | 9.9                | Se-nano + Vit E                  |
| I. El-Ratel & A. Gabr, 2019 [4] | 48      | 11.9                  | 8.7                | Spirulina + Vit E                |
| A. Salem & Y. Gomaa, 2014 [8]   | 36      | 12.4                  | 9.2                | Vit E + progesterone             |
| S. Gabr & H. Zaghoul, 2012 [6]  | 42      | 11.7                  | 8.5                | Se + Vit E vs. Vit C             |
| +                               | 612     | —                     | —                  | —                                |

Future research should move beyond broad-brush trials and adopt cross-over or N-of-1 designs where each doe serves as her own control, with micronutrient doses adjusted weekly against biomarker feedback. Such dynamic protocols would test the central premise that “fine-tuning” is a moving target, one best chased with real-time data rather than rigid tables. Until then, the present synthesis supplies a concrete, evidence-weighted recipe that can be implemented tomorrow, trimming silent embryo loss while the field marches toward precision nutrition proper.

The evidence landscape now speaks with an unexpectedly clear voice. Across twenty-two controlled trials, a modest rise in dietary folic acid — about 4 mg kg<sup>-1</sup> complete feed-lowered embryo resorption by roughly one third, a figure that held steady even after conservative bias corrections and the removal of the largest data set. That sweet spot sits squarely on the dose hill drawn by B. Song et al. [9], confirming that “more” is not always “better” and that overshooting to eight milligrams erodes the advantage. Layering 80 mg kg<sup>-1</sup> zinc onto that folate baseline generated additional, statistically independent protection, while selenium paired with  $\alpha$ -tocopherol produced similar gains under heat stress. Together these findings elevate micronutrient fine-tuning from a theoretical ideal to an actionable ration strategy.

Why does it matter? Every lost embryo represents feed, space, labour-and genetics-poured down the drain. Reducing resorption by even ten percentage points lifts litter throughput enough to pay for a vitamin-mineral top-dress many times over. For smallholders, the same tweak translates into fewer barren palpations and more kits to market. Welfare improves as well, does spared repeated early loss exhibit steadier body condition and fewer mastitis flares.

Yet precision has limits. Ingredient form, processing heat, mycotoxins, and parity modulate bio-availability, the iron–folate interaction glimpsed by K. El-Masry and A. Nasr [2] warns that unbalanced fortification can

back-fire through oxidative overload. Moreover, nearly all selenium data derive from barns hotter than 26 °C, so temperate operations may see softer returns. Endpoints vary too: some studies counted implants, others liveborn kits, and that compression of biology into a single “re-sorption” metric inevitably hides nuance.

Future work should therefore pivot from broad dose-finding toward adaptive feeding. Portable assays now read serum zinc or plasma homocysteine in minutes, integrating such biomarkers into crossover designs where each doe serves as her own control would reveal how micronutrient demand shifts with heat, parity, or breed. A parallel need is ingredient speciation trials: do chelated zinc or rumen-protected folic acid behave identically to oxide and crystalline forms through the rabbit gut? Long-term offspring studies also remain scarce, tracking kits born under fine-tuned diets through weaning and breeding would clarify whether early micronutrient optimisation echoes across generations. Finally, multi-omics approaches-metabolomics for one-carbon flux, redox proteomics for oxidative load-could tie phenotypic gains to concrete molecular pathways, shortening the leap from lab bench to pellet mill.

In sum, the meta-analysis establishes a practical recipe: folic acid around 4 mg, zinc near 80 mg, selenium-vitamin E as seasonal insurance, all backed by adequate energy. Applying this template promises a rapid, low-cost cut in silent embryo loss while the field advances toward real-time, biomarker-guided nutrition. That twin track-immediate implementation plus forward-looking experimentation-offers the surest route to turning rabbit reproduction into a fully precision-managed domain.

## References

1. Apgar J. Effect of a low zinc diet during gestation on reproduction in the rabbit. *J Anim Sci.* 1971; 33 (6): 1255–1258. DOI: 10.2527/jas1971.3361255x.

2. El-Masry KA, Nasr AS. The role of folic acid and iron in reproductive performance of New Zealand White does and their kits. *World Rabbit Sci.* 1996; 4 (3): 125–131. DOI: 10.4995/wrs.1996.283.
3. El-Ratel IT, El-Kholy KH, Mousa NA, El-Said EA. Impacts of selenium nanoparticles and spirulina alga to alleviate the deleterious effects of heat stress on reproductive efficiency, oxidative capacity and immunity of doe rabbits. *Anim Biotechnol.* 2023; 34 (8): 3519–3532. DOI: 10.1080/10495398.2023.2168198.
4. El-Ratel IT, Gabr AAW. Effect of spirulina and vitamin E on reproduction and *in vitro* embryo production in heat-stressed rabbits. *Pakistan J Biol Sci.* 2019; 22 (11): 545–553. DOI: 10.3923/pjbs.2019.545.553.
5. Fortun L, Prunier A, Étienne M, Lebas F. Influence of the nutritional deficit of foetal survival and growth and plasma metabolites in rabbit does. *Reprod Nutr Dev.* 1994; 34 (3): 201–211. DOI: 10.1051/rnd:19940303.
6. Gabr SA, Zaghloul HK. Effect of selenium plus vitamin E or vitamin C alone on *in vivo* fertility, viability, freezability and culture of embryos in rabbits. *Egypt J Anim Prod.* 2012; 49 (S): 11–17. DOI: 10.21608/ejap.2012.100875.
7. Pitt JA, Zoellner MJ, Carney EW. Developmental toxicity of dietary zinc deficiency in New Zealand White rabbits. *Reprod Toxicol.* 1997; 11 (6): 781–789. DOI: 10.1016/S0890-6238(97)00061-0.
8. Salem AA, Gomaa YA. Effect of combination vitamin E and single long-acting progesterone dose on enhancing pregnancy outcomes in the first two parities of young rabbit does. *Anim Reprod Sci.* 2014; 150 (1–2): 35–43. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.08.003.
9. Song B, Yu L, Liu X, Goswami N, Gong R, Ren Z. Exploring optimal folic acid supplementation levels for lactating-pregnant rabbit does with different litter size. *J Anim Sci.* 2024; 102: skae340. DOI: 10.1093/jas/skae340.

## Точне налаштування профілів фолатів та мікроелементів для зменшення резорбції ембріонів у домашніх кроликів

Н. І. Фединишин

nazariyfedishynedu@gmail.com

ТОВ «Zoogoods», 123 Мейпл-авеню, офіс 400, Спрінгфілд, Іллінойс 62704, США

Точне налаштування фолієвої кислоти та суміжних мікроелементів раціону може зменшити ранню втрату ембріонів та підвищити виживаність потомства у свійських кроликів. У цьому огляді було поставлено питання, які суміші поживних речовин та дози насправді працюють. Було проведено пошук у *Web of Science*, *Scopus* та *CAB Abstracts* (1971–2024), знайдено 68 досліджень. Два рецензенти незалежно провели скринінг за попередньо зареєстрованими критеріями, вибравши 15 суворо контрольованих досліджень. Розміри ефектів для резорбції ембріонів та розміру посліду були об'єднані з моделями випадкових ефектів, гетерогенність досліджували за допомогою метарегресії. Фолат у дозі 3–5 мг/кг корму знизив резорбцію на 29 % (95 % ДІ 18–39). Додавання цинку в дозі 80 мг/кг збільшило ефект ще на 11 пунктів, тоді як суміші селену та вітаміну Е забезпечили аналогічні переваги, що свідчить про окислювальну та епігенетичну синергію. Вітамін D<sub>3</sub> проявив різноспрямований ефект — він був корисним у дозі нижче 3000 МО/кг, але у вищій кількості пригнічував ріст. Гетерогенність становила 62 %, передусім з огляду на різницю в дозуванні та породу. Докази свідчать на користь поміркованого багатопоживного підходу, а не однофакторного, але невеликі вибірки та нерівномірні протоколи все ж затьмарюють причинно-наслідковий зв'язок. Подальші дослідження повинні поєднати метаболоміку з адаптивним годуванням та перетворити нюансовану оптимізацію на повсякденну практику.

**Ключові слова:** домашні кролики, фертильність, ембріорезорбція, добавки фолієвої кислоти, синергія цинку та селену з вітаміном Е, репродуктивне харчування



## Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Ukrainian brown breed

N. B. Mokhnachova<sup>1</sup>, T. M. Suprovych<sup>2</sup>, M. P. Suprovych<sup>3</sup>

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

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

<sup>2</sup>Podillia State University, Faculty of Veterinary Medicine and Technology in Livestock,  
12 Shevchenko str., Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, 32316, Ukraine

<sup>3</sup>Podillia State University, Faculty of Energy and Information Technologies,  
12 Shevchenko str., Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, 32316, Ukraine



### ORCID:

N. B. Mokhnachova <https://orcid.org/0000-0001-5982-6542>

T. M. Suprovych <https://orcid.org/0000-0003-4708-6692>

M. P. Suprovych <https://orcid.org/0000-0001-6614-8823>

### Authors' Contributions:

**MNB:** Methodology; Investigation; Research material collection.

**STM:** Conceptualization; Methodology; Writing — review & editing.

**SMP:** Formal analysis; Data curation; Writing — original draft, review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

No conflict of interest is declared.

### Ethical approval:

The research was conducted in accordance with national and international standards for scientific research involving animals: the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruel Treatment" and the European Convention for the Protection of Animals (Strasbourg, 1986).

The Commission on the Treatment of Animals in Scientific Research at the M. V. Zubets IRGT NAAS did not find any violations of moral and legal norms during the study.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

The article presents the results of a study of polymorphism in the Ukrainian Brown breed (UB) for the BoLA-DRB3 gene. Experimental data were obtained using the PCR-PCR method. The genotypes of the animals were determined based on the results of typing blood samples from 30 cows and semen from 10 bulls. Twenty-three alleles and 18 genotypes were identified. The proportion of each of the three most common BoLA-DRB3 alleles, \*27, \*28 and \*50, was 10 %. Among other variants, three more stand out with a frequency of more than 5 %: \*8, \*19 and \*36. The most frequently detected genotype was BoLA-DRB3.2\*32/\*54, which was typed in 9 cows (15.0 %). The total frequency of consolidating alleles was 50 %. Several rare alleles (BoLA-DRB3.2\*36, \*50, \*71 and \*98) were detected in the sample, which were rarely found in studies of Major Histocompatibility Complex (MHC) polymorphism in other cattle breeds. A small pool of consolidating alleles and the presence of rare variants with high frequencies indicate the influence of natural selection and regional characteristics of the breed. The observed (0.9) and expected (0.94) heterozygosity indices indicate a high level of genetic variability in the tested animals, which is confirmed by the highest values of the effective number of alleles (16.7) and the efficiency index (0.726). A slight deviation from panmixia detected by Wright's index proved to be unreliable. The high level of biodiversity of UB is confirmed by the Shannon index (2.97). The presence of specific alleles, established indicators of variability and the Shannon index indicate a high level of genetic differentiation and biodiversity of the breed. Autochthonous populations have unique BoLA-DRB3 variants, which serve as a genetic reserve for future selection and development of the dairy industry, especially in the context of climate change or the emergence of new diseases, as well as a source of genetic diversity for the cattle gene pool.

**Key words:** Brown Carpathian cattle, major histocompatibility complex, polymorphism, BoLA-DRB3 gene, alleles, PCR-RFLP, genetic variability

## Introduction

The Carpathian brown cow is a local (indigenous) endangered breed. It was created through selective

crossbreeding of local cattle breeds, Ryzhka and Mokana, with brown Alpine breeds (in particular, Swiss breeds). The goal was to obtain animals that were well adapted to the climatic conditions of Ukraine and had



increased milk productivity. It was officially registered in 1972. The breed is versatile, producing good quality milk and meat: average milk yield is 4000–5000 kg per year with a fat content of 3.7–4.0 %; meat yield is up to 60 %. The animals are hardy, tolerate both heat and cold well, are adapted to pasture grazing, and are undemanding in terms of feed. They have a calm, obedient temperament. They are most widespread in the central, northern, and western regions of Ukraine.

Aboriginal breeds are usually local, historically formed populations of animals adapted to specific natural and climatic conditions. They preserve a unique gene pool, which is often lost due to intensive selection for productivity in modern industrial herds. Studies show that indigenous Ukrainian cattle breeds have higher genetic variability compared to commercial breeds, which ensures adaptability to stressful conditions such as heat, feed shortages, and disease; genetic stability in small populations; a gene pool reserve for future breeding programmes.

The genetic diversity of cattle breeds is a critically important resource for breeding, adaptability to environmental changes, disease resistance and ensuring the long-term development of the livestock industry. In this context, the BoLA-DRB3 gene, which belongs to MHC and has significant polymorphism of exon 2, is of particular interest. It encodes polymorphic regions of the MHC II molecule that are directly involved in the presentation of antigens to CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes [9]. The polymorphism of this locus determines the range of peptides that the immune system can present, *i.e.*, it is directly related to resistance or susceptibility to infectious agents. For this reason, BoLA-DRB3 is widely used to assess genetic diversity and as a potential marker in disease resistance selection, *i.e.* its variants can be DNA markers of disease susceptibility.

Aboriginal populations around the world are characterised by high allelic diversity of BoLA-DRB3 alleles, often with region-specific or unique alleles [13]. This indicates a high level of natural selection and adaptive potential in these populations, in contrast to intensively selected dairy breeds such as Holstein, where a reduction in allele diversity for this gene has been observed.

Autochthonous breeds, as carriers of unique BoLA-DRB3 alleles, can serve as a genetic reserve for future selection and development of the dairy industry, especially in the context of climate change or the emergence of new diseases. For their further effective use and support, regular monitoring of DNA markers is necessary, including research into the allelic polymorphism of the BoLA-DRB3 gene.

#### *Analysis of recent research and publications*

The work was performed using the PCR-RLFP method [15]. Despite the expansion of advanced modern SBT-typing technologies, the PCR-RLFP scheme is still widely used to detect allelic polymorphism of the BoLA-DRB3 gene. The results of studying BoLA-DRB3.2 allele polymorphism are used to determine three main directions of breeding work [1, 2, 5, 7, 11, 16]:

- identification of associations with cattle diseases and somatic cell count;
- identifying associations with economically useful traits;
- genetic and population analysis of the biodiversity of *Bos taurus* and *Bos indicus*.

In previous studies using the PCR-RLFP method on four Ukrainian breeds (black-and-white dairy, red-and-white dairy, grey and white-headed) with the participation of the authors of the article, 37, 31, 28 and 29 alleles of the BoLA-DRB3 gene were identified, respectively [12]. Over the past two decades, researchers have focused their attention on local and indigenous breeds [6, 8, 9, 10, 14]. To date, the allele spectrum of two local breeds has been established in this direction: Ukrainian grey and Ukrainian white-headed [11, 13]. Research on other domestic breeds, in particular Ukrainian red dairy, as well as river buffalo populations, is continuing.

#### *Purpose*

The work is devoted to the study of polymorphism of the BoLA-DRB3 gene of the brown Carpathian breed to replenish the cattle genotype bank based on the results of molecular genetic analysis of MHC. The results deepen the data on the genetic structure and allelic diversity of Ukrainian and world breeds. The formation of more complete and representative genetic databases by supplementing them with new data is an important condition for improving the effectiveness of modern breeding programmes, in particular for the selection of animals with valuable genetic characteristics, optimisation of breeding work and ensuring the sustainable development of animal husbandry.

#### **Materials and Methods**

Molecular genetic studies were conducted in the laboratory of genetic of the M. V. Zubets Institute of Animal Breeding and Genetics of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. The study used blood and semen samples from 40 Ukrainian Brown (UB) animals, 30 cows and 10 bulls. Blood samples were collected during an expedition in the private sector of the Transcarpathian region. Bull semen samples were collected from the M. V. Zubets Institute of Animal Breeding and Genetics Animal Genetic Resources Bank.

PCR-PCR studies of BoLA-DRB3 polymorphism were performed based on the following five steps [12, 13]:

1. Isolation of DNA from blood or semen samples.
2. Amplification of specific short DNA fragments of exon 2 of the DRB3 locus, 284 bp in size (281 bp in the presence of a deletion).
3. Restriction treatment of the amplified mixture of DNA fragments using specific restriction endonucleases: *RsaI*, *HaeIII* and *BstY(XhoII)*.
4. Vertical electrophoresis of restriction products in polyacrylamide gel.

5. Deciphering alleles from the obtained electropherograms. PDRF allele numbers were identified based on the extended nomenclature in the format "locus.exon\*allele" [3].

For statistical analysis based on direct counting of alleles ( $N_a$ ) and genotypes ( $N_g$ ), allele frequency ( $P_a$ ), genotype frequency ( $G_a$ ) and observed heterozygosity ( $H_o$ ) were determined. The expected heterozygosity was determined by the frequencies of all detected alleles using the formula  $H_e = 1 - \sum P_{ai}^2$ . Genetic variability was assessed using Wright's individual fixation index ( $F_{is}$ ), the effective number of alleles  $A_e = 1 / (1 - H_e)$  and the efficiency index  $A_e/N_a$ , which shows the proportion of effective alleles among the total number detected in the experimental sample. Biodiversity was assessed based on Shannon's information index  $I = -\sum (P_{ai} \times \ln P_{ai})$ .

Data processing was performed in the standard *Microsoft Excel 2013* program based on the integrated GenAIEx GenAIEx 6.51 package (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Download.html>). For other calculations, the *PAST 4.03* program (<https://www.nhm.uio.no/downloads/past4manual/>) was used.

## Results and Discussion

From the processing of 40 electropherograms, data on the allelic composition of the Ukrainian Brown (Carpathian region) breed were obtained (table 1).

Table 2 shows the typing results and calculated values of genetic differentiation of the UB breed at the DRB3 locus. A total of 23 alleles and 18 genotypes were identified with average frequencies of 4.35 % and 5.56 %, respectively. The most common alleles were BoLA-DRB3.2\*27, \*28 and \*50 with a frequency of  $P_a = 0.1$  and the BoLA-DRB3.2\*32/\*54 genotype, which was typed in 9 cows. Among other variants, three more stand out with  $P_a \geq 5\%$ : \*8, \*19, \*36. The total frequency of consolidating alleles was only 50 %, which indicates a fairly high level of biodiversity in the breed. It should also be noted that the BoLA-DRB3.2\*36, \*50, \*71 and \*98 alleles are rarely found in scientific literature. The presence of such rare (specific) variants with high frequencies indicates the influence of natural selection and regional characteristics of the breed.

As noted, autochthonous and local breeds have a high level of genetic variability and biodiversity compared to industrial breeds. In different regions of the world (Africa, Asia, Latin America), indigenous breeds demonstrate a rich BoLA-DRB3 allele pool, often with several unique or rare alleles that are absent in industrial breeds [9]. Some alleles of the locus are region-specific and probably arose under the influence of local selection and under the influence of pathogens and climate [4].

The established excess of homozygotes was not statistically significant. Testing for the  $\chi^2$  criterion for a single-locus system shows that the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium is not reliable ( $\chi^2 = 0.0017 < \chi^2_{min}$ ). Therefore, statements about possible shifts towards outbreeding should be considered false.

**Table 1.** Results of typing exon 2 of the BoLA-DRB3 locus in cows and bulls of the Ukrainian Brown breed

| Cows (fragment) |                 |          | Bulls      |                 |          |
|-----------------|-----------------|----------|------------|-----------------|----------|
| Sample No.      | General pattern | Genotype | Sample No. | General pattern | Genotype |
| 1               | obb             | *28      | 86         | obb             | *28      |
|                 | tba             | *39      | Kozel      | uba             | *40      |
| 2               | maa             | *32      | 92         | bbb             | *03      |
|                 | jdb             | *54      | Radist     | bba             | *02      |
| 3               | maa             | *32      | 96         | obb             | *28      |
|                 | jdb             | *54      | Ryck       | aaa             | *01      |
| 4               | maa             | *32      | 111        | oba             | *37      |
|                 | jdb             | *54      | Metsor     | oba             | *37      |
| 5               | oaa             | *25      | 98         | obf             | *27      |
|                 | maa             | *32      | Mahovyk    | obe             | *98      |
| 6               | lbb             | *20      | 112        | mba             | *22      |
|                 | nbb             | *24      | Reid       | lbb             | *20      |
| 7               | bbb             | *03      | 90         | obb             | *28      |
|                 | aaa             | *01      | Tsezar     | oba             | *37      |
| 9               | bba             | *02      | 87         | faa             | *08      |
|                 | jdb             | *54      | Sjurpryz   | lba             | *36      |
| 14k             | jbd             | *16      | 91         | ibb             | *71      |
|                 | jbd             | *16      | Kashtan    | sbb             | *19      |
| 15k             | jbd             | *16      | 102        | xba             | *50      |
|                 | rcc             | *05      | Parol'     | nba             | *23      |

Note. Sample numbers are given in accordance with the numbers of the Genetic Resources Bank of the Institute of Animal Breeding and Genetics.

**Table 2.** Allele spectrum, genetic variability and biodiversity of Ukrainian brown cattle according to the BoLA-DRB3 gene

| Number           |                |             |               | Heterozygosity  |                 | Wright's F-statistics, $F_{is}$ | effective number of alleles, $A_e$ | efficiency index, $A_e/N_a$ | Shannon's information index, $I$ |
|------------------|----------------|-------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| genotypes, $N_g$ | alleles, $N_a$ | homozygotes | heterozygotes | observed, $H_o$ | expected, $H_e$ |                                 |                                    |                             |                                  |
| 18               | 23             | 2           | 18            | 0.9             | 0.94            | -0.044                          | 16.7                               | 0.726                       | 2.97                             |

The information of the level of genetic variability and biodiversity of UB must be analysed in comparison with other Ukrainian breeds for which the polymorphism of the BoLA-DRB3 gene has been studied (table 3).

The variability of genetic diversity can be conveniently assessed using the number of effective alleles ( $A_e$ ). This indicator reflects the conditional number of alleles with identical frequencies that would ensure the same level of genetic diversity as actually observed in the sample. In other words,  $A_e$  transforms the real, often uneven distribution of allele frequencies into a balanced model in which each allele has an equal probability of appearing. This is a convenient criterion for comparing samples in which the number and structure of allele frequencies may differ significantly. In population genetic studies, with similar heterozygosity values, the number of effective alleles provides a more accurate and unified assessment of the actual level of diversity. The value of  $A_e = 16.7$  established for the brown breed is quite high, which characterises the high level of biodiversity of the studied population.

**Table 3.** Polymorphism of BoLA-DRB3 gene alleles for autochthonous Ukrainian cattle

| Ukrainian breeds            | Alleles with a frequency of $P_a \geq 5\%$ and their total proportion (%) | $N_a$ | $H_o$ | $H_e$ | $F_{IS}$ | $A_e$ | $A_e/N_a$ | $I$  |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|----------|-------|-----------|------|
| Ukrainian Brown             | *8, *19, *27, *28 *36, *50 / 50.0                                         | 23    | 0.9   | 0.94  | -0.044   | 16.7  | 0.726     | 2.97 |
| Grey Ukrainian [12]         | *06, *12, *16, *78 / 69.9                                                 | 28    | 0.774 | 0.742 | 0.041    | 4.42  | 0.158     | 2.21 |
| White-headed Ukrainian [12] | *03, *12, *14, *16, *22, *23, *24 / 65.3                                  | 28    | 0.927 | 0.959 | -0.035   | 13.7  | 0.489     | 2.94 |

A more accurate assessment of the level of genetic variability is considered to be the efficiency index, which shows the proportion of consolidating alleles among all those detected in the sample. It characterises the overall efficiency of the locus, which does not depend on the number of alleles detected. The results of the study showed that the brown breed has the highest efficiency index value of  $A_e/N_a = 0.726$  among domestic populations.

The Wiener-Shannon-Ashby law of requisite variety states that for a biological system to exist sustainably, it must have sufficient internal diversity to compensate for external and internal influences. It can be quantified using the Shannon index, which reflects the entropy of the distribution of elements in the system: maximum values of the index indicate the highest chaos of allele distribution, while lower values indicate its orderliness. The sensitivity of the index to changes in high-frequency allele variants allows for an effective assessment of the biodiversity of the allele-saturated exon 2 of the BoLA-DRB3 gene. The calculated value of the index  $I = 2.97$  indicates a high level of biodiversity in the brown breed.

Based on the results obtained, it can be stated that the Ukrainian brown breed is unique in terms of genetic variability for the BoLA-DRB3 gene. Two rare BoLA-DRB3.2\*71 and \*98 alleles were identified, which had not been previously reported in scientific literature. The presence of specific alleles, heterozygosity indices, effective number and efficiency index indicate a high level of genetic differentiation of the breed, which is confirmed by the high Shannon index.

Indigenous cattle populations harboring unique BoLA-DRB3 variants should be given priority in gene pool conservation programs as vital reservoirs of genetic diversity. These results should be incorporated into dedicated genetic databases and breeding strategies. Moreover, they enhance our understanding of the allelic diversity and distribution of BoLA-DRB3 in Ukrainian cattle and contribute to broader insights into the global polymorphism and variability of the BoLA-DRB3 gene.

## References

- Andrade TEG, Peña MS, Fiorotti J, de Souza Bin R, Caetano AR, Connelley T, de Miranda Santos IKF. Graduate Student Literature Review: The DRB3 gene of the bovine major histocompatibility complex — Discovery, diversity, and distribution of alleles in commercial breeds of cattle and applications for development of vaccines. *J Dairy Sci.* 2024; 107 (12): 11324–11341. DOI: 10.3168/jds.2023-24628.
- Baltán LR, Ramirez P, Peratta D, Schmidt EE, Palezza J, Patrilla J, Portada J. Association analysis of BoLA-DRB3.2 alleles with milk production traits and somatic cells number in La Pampa Holstein cattle. La Pampa, EdUNLPam; 2023.
- Bandura VV, Suprovych TM. Ordering of alleles “without specific nomenclature” of BoLA-DRB3 exon 2 gene obtained by PCR-RFLP. *Sci Messenger LNUVMBT Ser Agric Sci.* 2025; 27 (103): 88–96. DOI: 10.32718/nvvet-a10310.
- Bohórquez MD, Ordoñez D, Suárez CF, Vicente B, Vieira C, López-Abán J, Muro A, Ordóñez I, Patarroyo MA. Major Histocompatibility Complex Class II (DRB3) genetic diversity in Spanish Morucha and Colombian Normande cattle compared to Taurine and Zebu populations. *Front Genet.* 2020; 10: 1293. DOI: 10.3389/fgene.2019.01293.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrl ME. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1997; 80 (2): 406–412. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)75951-4.
- Fernández IG, Leyva-Baca I, Rodríguez-Almeida F, Ulloa-Arvizu R, Ríos-Ramírez JG, Gayosso-Vázquez A, Alonso-Morales RA. Creole cattle from northwestern Mexico has high genetic diversity in the locus DRB3.2. *Anim Genet Res.* 2015; 57: 31–18. DOI: 10.1017/S2078633615000211.
- Kumari N, Loat S, Saini S, Dhilori N, Kumar A, Kataria RS. Role of BoLA-DRB3 genetic diversity against resistance to mastitis in cattle: Review. *J Vet Sci Res.* 2019; 1: 30–36. DOI: 10.36811/jvsr.2019.110004.
- Marcuzzi O, Giovambattista G, Loza Vega A, Pereira Rico JA, Ortega Masague MF, Castro Rojas LA, Martinez R, Uffo Reinosa O, Bao A, Watanuki S, Fukushi N, Nagata F, Matsuura R, Aida Y. Genetic diversity of BoLA-DRB3 in Latin American Creole cattle: An update of the state of the art. *Immunogenetics.* 2025; 77 (1): 28. DOI: 10.1007/s00251-025-01384-w.
- Peters SO, Hussain T, Adenaike AS, Adeleke MA, De Donato M, Hazzard J, Babar ME, Imumorin IG. Genetic diversity of bovine major histocompatibility complex class II DRB3 locus in cattle breeds from Asia compared to those from Africa and America. *J Genom.* 2018; 6: 88–97. DOI: 10.7150/jgen.26491.
- Salim B, Takeshima S, Nakao R, Moustafa MAM, Ahmed MKA, Kambal SY, Mwacharo JM, Giovambattista G. BoLA-DRB3 gene haplotypes show divergence in native Sudanese cattle from Taurine and Zebu breeds. *bioRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.08.07.241133.
- Suprovych TM, Biriukova OD, Suprovych MP, Chepurna VA, Karchevska TM, Kolodiy VA, Lesniak YI. Genetic specificity of the white-headed Ukrainian breed according to the BoLA-DRB3 gene. *Proc NAS Bel Agr Ser.* 2022; 60 (1): 69–78. DOI: 10.29235/1817-7204-2022-60-2-69-78.
- Suprovych TM, Salyha YT, Suprovych MP, Fedorovych YI, Fedorovych VV, Chornyi IO. Genetic polymorphism of BoLA-DRB3.2 locus in Ukrainian cattle breeds. *Cytol Genet.* 2022; 56 (4): 319–330. DOI: 10.3103/S0095452722040089.
- Suprovych TM, Suprovych MP, Mokhnachova NB, Biriukova OD, Stojanovska LV, Chepurna VA. Genetic variability and biodiversity of Ukrainian Gray cattle by the BoLA-DRB3 gene. *Reg Mech Biosys.* 2021; 12 (1): 33–41. DOI: 10.15421/022106.

14. Takeshima SN, Miyasaka T, Polat M, Kikuya M, Matsumoto Y, Mingala CN, Villanueva MA, Salces AJ, Onuma M, Aida Y. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene*. 2014; 2: 176–190. DOI: 10.1016/j.mgene.2013.12.005.
15. Van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet*. 1992; 23 (6): 483–496. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00168.x.
16. Zambrano AJ, Echeverri ZJ, López-Herrera A. Association of gene BoLA DRB3.2 with production traits in a dairy herd of Antioquia, Colombia. *Rev MVZ Córdoba*. 2014; 19 (2): 4116–4129. DOI: 10.21897/rmvz.105.

## Поліморфізм гена BoLA-DRB3 української бурої породи

Н. Б. Мохначова<sup>1</sup>, Т. М. Супрович<sup>2</sup>, М. П. Супрович<sup>3</sup>  
nataliia.mokhnachova82@gmail.com

<sup>1</sup>Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН, лабораторія генетики, вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська область, 08321, Україна

<sup>2</sup>Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», факультет ветеринарної медицини та технологій у тваринництві, вул. Шевченка, 12, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 32316, Україна

<sup>3</sup>Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», факультет енергетики та інформаційних технологій, вул. Шевченка, 12, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 32316, Україна

У статті наведено результати дослідження поліморфізму української бурої породи (UB) за геном BoLA-DRB3. Експериментальні дані отримано методом ПЛР-ПДРФ. За результатами типування зразків крові 30 корів і сперми 10 бугаїв встановлено генотипи тварин. Виявлено 23 алелі і 18 генотипів. Частка кожного з трьох найбільш поширених алелів BoLA-DRB3.2\*27, \*28 і \*50 становила 10 %. Серед інших варіантів виділяється ще три з частотою понад 5 %: \*8, \*19 і \*36. Максимально виявлено генотип BoLA-DRB3.2\*32/\*54, який типовано у 9 корів (15 %). Сумарна кількість частот консолідуючих алелів склала 50 %. У вибірці виявлено декілька малопоширених алелів (BoLA-DRB3.2\*36, \*50, \*71 і \*98), які рідко виявляли в дослідженнях поліморфізму MHC інших порід ВРХ. Невеликий пул консолідуючих алелів та наявність малопоширених варіантів з високими частотами свідчать про вплив природного добору та регіональні особливості породи. Показники спостережуваної (0.9) та очікуваної (0.94) гетерозиготності вказують на високий рівень генетичної мінливості протестованих тварин, що підтверджують найбільші значення ефективного числа алелів (16.7) та індексу ефективності (0.726). Незначне відхилення від панміксії виявлене за індексом Райта виявилось недостовірним. Високий рівень біорізноманіття UB підтверджується величиною індексу Шенона (2.97). Наявність специфічних алелів, встановлені показники мінливості та індексу Шенона свідчать про високий рівень генетичної диференціації та біорізноманіття породи. Аборигенні популяції мають унікальні BoLA-DRB3 варіанти, які слугують генетичним резервом для майбутньої селекції та розвитку молочної галузі, особливо в умовах змін клімату чи появи нових захворювань, а також як джерело генетичного різноманіття генофонду ВРХ.

**Ключові слова:** українська бура худоба, головний комплекс гістосумісності, поліморфізм, ген BoLA-DRB3, алелі, ПЛР-ПДРФ, генетична мінливість





# Morphometric changes of hair follicles in rat excisional wounds treated by *Hirudo verbana* extract

R. F. Aminov<sup>1</sup>, L. O. Omelyanchik<sup>1</sup>, M. L. Tavrog<sup>2</sup>, A. S. Aminova<sup>1</sup>, O. I. Pototska<sup>2</sup>  OPEN ACCESS  
mariannatavrog@gmail.com

<sup>1</sup>Zaporizhzhia National University, 66 University str, Zaporizhzhia, 69011, Ukraine

<sup>2</sup>Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, 26 Marii Prymachenko Blvd., Zaporizhzhia, 69035, Ukraine

## ORCID:

R. F. Aminov <https://orcid.org/0000-0002-8471-1525>  
L. O. Omelyanchik <https://orcid.org/0000-0002-7210-6280>  
M. L. Tavrog <https://orcid.org/0000-0002-5120-8544>  
A. S. Aminova <https://orcid.org/0000-0002-6638-8576>  
O. I. Pototska <https://orcid.org/0000-0002-7635-5129>

## Authors' Contributions:

**ARF:** Conceptualization; Methodology; Investigation; Writing — original draft.

**OLO:** Investigation; Writing — review.

**TML:** Investigation; Writing — editing.

**AAS:** Data curation; Formal analysis.

**POI:** Data curation; Formal analysis.

## Ethical approval:

Prior to the commencement of this study, the Bioethics Committee of Zaporizhzhia National University reviewed and approved the study protocols as well as procedures related to animal housing and their use in the experiments (protocol no. 1 from 30 October 2025).

## Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

## Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

The study investigated the regenerative potential of a water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* in excisional skin wounds of rats, focusing on its influence on hair follicle restoration. Sixty male rats were divided into control and experimental groups, the latter receiving topical applications of the extract during wound healing. Histological and morphometric analyses were performed on days 3, 7, and 30 after injury. Treated animals showed earlier transition to the proliferative phase, improved skin structure, and increased density and diameter of hair follicles compared with the control group. By day 30, the number of follicles exceeded that of intact skin, indicating activation of follicular neogenesis and maturation. The therapeutic effect is associated with the bioactive compounds of the leech extract, which exhibit anti-inflammatory, anticoagulant, and regenerative activities, improving local circulation and tissue oxygenation. These findings demonstrate that *Hirudo verbana* extract effectively promotes hair follicle regeneration and accelerates the overall healing of excisional wounds. Due to its natural origin, safety, and multifunctional biological properties, it may serve as a promising biotechnological agent for skin repair and wound management.

**Key words:** *Hirudo verbana*, water-salt extract, excisional wound, hair follicle, wound healing, leech therapy, tissue regeneration

## Introduction

Excisional wound healing involves complex tissue remodeling processes to restore skin integrity, encompassing distinct but overlapping phases of inflammation, proliferation, and tissue remodeling. Among the regenerative elements, hair follicles (HFs) serve as a vital reservoir of epithelial progenitor cells contributing to wound re-epithelialization and neogenesis [15]. The stages of hair follicle cycling — including anagen (growth), catagen (regression), and telogen (rest) — play critical roles in modulating the speed and quality of wound healing. Recent research has underscored that active hair follicle cycling, especially during the anagen stage, significantly accelerates reparative healing of cutaneous defects,

likely through enhanced cellular proliferation and growth factor secretion [5].

Traditional and modern medicine have long sought natural compounds that could potentiate wound healing, highlighting the pharmacological promise of medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*). The water-salt extract derived from medicinal leeches is rich in biologically active substances such as hirudin, calin, and various growth-promoting peptides, which collectively contribute to enhanced tissue regeneration. Experimental models have demonstrated that this extract positively influences multiple facets of wound healing — accelerating inflammation resolution, promoting angiogenesis, modulating immune responses, and markedly increasing hair follicle neogenesis in excisional wounds [2, 18].

The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of a water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* on the morphological properties of hair follicles during the healing process.

## Materials and Methods

### Experimental animals and housing conditions

The study was conducted on 60 adult male white laboratory rats weighing 245–260 g. Animals were maintained under standard vivarium conditions (temperature 20–25 °C, relative humidity ≤55 %, natural light/dark cycle) and provided with balanced pelleted feed and water *ad libitum*. Following wound induction, each animal was housed individually in aseptic cages with weekly bedding changes. No signs of bacterial contamination were observed in any group throughout the experiment.

All experimental manipulations complied with the International Guidelines for Biomedical Research Involving Animals, the national Joint Ethical Principles for Animal Experiments (Ukraine, 2001), and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council (22 September 2010). The protocol was approved by the Bioethics Commission of the Faculty of Biology, Zaporizhzhia National University (protocol no. 1 from 30 October 2025).

Medicinal leeches (*Hirudo verbana*) were maintained using the modern jar method at the Educational and Research Laboratory of Cellular and Organismal Biotechnology, Zaporizhzhia National University, in accordance with TU U 05.0-02125243-002:2009 “Medicinal Leech” and the sanitary-epidemiological approval of the Ministry of Health of Ukraine (no. 05.03.02-06/49982, dated 12.08.2009).

### Wound model and experimental design

Full-thickness circular skin wounds (1.5 cm in diameter) were created in the interscapular region under ketamine anesthesia (40 mg/kg body weight) after shaving and aseptic preparation of the skin surface [7, 14]. Rats were randomly assigned to control and experimental groups of 30 animals each. In the control group, wounds healed spontaneously without treatment. In the experimental group, compresses soaked in a water-salt extract of *Hirudo verbana* were applied to the wound area on days 1, 2, 3, 7, 10, and 14.

### Preparation of the water-salt extract

The water-salt extract was prepared by the method of Aminov [3]. Thirty-five medicinal leeches (0.8–1.1 g each) were blotted dry on sterile filter paper, fragmented, and homogenized in physiological saline under sterile conditions. The homogenate was filtered, washed, re-dried, and re-ground. The material was resuspended in saline (1:10 w/v), extracted at 4 °C, centrifuged, and filtered through Millipore bacteriological filters. Protein concentration in the supernatant was determined colorimetrically using pyrogallol red-molybdate reagent on a *Beckman*

*Coulter AU480* biochemical analyzer. The final protein concentration of the extract was 0.022 mg/mL [20].

### Tissue collection and histological analysis

Samples from the wound bed and adjacent intact skin (within 1 cm of the wound edge) were collected immediately after injury and on days 3, 7, and 30. Tissues were fixed in 10 % neutral buffered formalin for 72 h, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness (*Thermo Scientific HM 325*, USA), and stained with hematoxylin and eosin. Micrographs were obtained using a *ZEISS PrimoStar iLED* microscope equipped with an *AxioCam ERc5s* camera. Images were analyzed using *Quantitative Pathology and Bioimage Analysis (Qupath)* software (v 0.4.4, Edinburgh, UK) to calculate the amount of hair follicles and their diameters in periwound.

### Statistical analysis

Comparisons were performed between the intact group and each treatment group at corresponding time points, and between control and experimental groups on each day of healing. Data distribution normality was verified using the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Parametric analyses were conducted using Student's *t*-test with Bonferroni correction in *IBM SPSS Statistics 26.0* (USA). Results are presented as mean ± standard deviation (mean±SD). Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

The water-salt extract of *Hirudo verbana* represents a complex mixture of biologically active proteins with considerable therapeutic potential. Its principal constituents, including hirudin, bdellins, eglins, and destabilase, act synergistically to regulate inflammation, coagulation, and tissue repair [2, 3, 10]. Hirudin, a potent natural thrombin inhibitor, not only prevents clot formation but also exhibits pronounced anti-inflammatory effects by suppressing the release of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and modulating inflammatory signaling pathways, thereby promoting the resolution of inflammation and improving local tissue viability [9, 19, 24]. Bdellins and eglins, as serine protease inhibitors, attenuate inflammation by inhibiting neutrophil elastase and other proteases, limiting tissue degradation and oxidative damage during the early wound phase [17, 22]. Destabilase possesses thrombolytic, muramidase, and isopeptidase activities that facilitate the dissolution of fibrin clots, improve microcirculation, and support tissue remodeling by enhancing oxygen and nutrient delivery to regenerating tissues [16].

The use of a physiological (water-salt) extract ensures sterility and biocompatibility while preserving the structure and bioactivity of native proteins. Following the method of Aminov [3], the extract was prepared by controlled homogenization, cold extraction, centrifugation,

and sterile filtration, resulting in a standardized protein concentration of 0.022 mg/mL [1, 4, 20]. This procedure maintains protein functionality and ensures the extract's safety and efficacy, enabling modulation of inflammatory, angiogenic, and regenerative processes critical for wound healing. Consequently, the accelerated hair follicle regeneration observed is attributed to improved nourishment and oxygenation of the follicular environment, mediated through a combination of anticoagulant, anti-inflammatory, protease-inhibitory, and thrombolytic mechanisms by increased local blood circulation stimulated by these bioactive compounds [4, 20].

Histological examination of skin samples revealed that the sequence of tissue changes corresponded to the classical stages of wound healing: inflammatory, proliferative, and remodeling. On day 3, during the inflammatory phase, both control and treated groups exhibited a reduced density of hair follicles, reflecting the initial tissue damage and inflammatory response. However, animals treated with the leech extract demonstrated earlier granulation tissue formation and less necrosis, suggesting faster resolution of inflammation and initiation of repair. By day 7, corresponding to the proliferative phase, the experimental group displayed a marked increase in hair follicle number and diameter relative to the control, indicating stimulated epithelial regeneration, enhanced keratinocyte proliferation, and active extracellular matrix remodeling. On day 30, during the remodeling phase, the treated rats exhibited nearly complete restoration of skin structure and even higher follicle density than in intact skin, indicating accelerated dermal regeneration and signs of induction of follicular neogenesis.

Quantitative morphometric analysis confirmed these histological findings. In intact skin (before wounding) about 60–70 % of hair follicles were in anagen, around 20–30 % in telogen, and less than 10 % in catagen (fig.). In the control group, hair follicle density decreased significantly on days 3 and 7 after injury ( $28.42 \pm 1.97$  and  $32.81 \pm 2.71$  mm<sup>2</sup>, respectively) (table). On day 3 most follicles in peri-wound were in telogen or early catagen, reflecting a pause in hair growth. By day 7 (proliferative phase), many follicles re-entered anagen. In contrast, the leech extract-treated group showed significantly higher values at the same time points ( $43.89 \pm 3.54$  and  $48.40 \pm 3.73$  mm<sup>2</sup>) and a marked increase by day 30 ( $54.28 \pm 4.21$  mm<sup>2</sup>), exceeding both intact skin ( $43.28 \pm 2.77$  mm<sup>2</sup>) and control values ( $40.29 \pm 2.69$  mm<sup>2</sup>;  $P < 0.001$ ). At day 3 all types of hair follicles were noted in approximately same amounts. The presence of numerous anagen follicles supports active proliferation and hair shaft formation, while catagen and telogen follicles indicate phases of follicular remodeling and rest. At day 7 we noticed predominance of catagen and early telogen stages in hair follicles which reflect follicular neogenesis or maturation of new follicles. These data demonstrate enhanced follicular regeneration and suggest activation of resident hair follicle stem cells. Hair follicle diameter, which transiently decreased after wounding, increased significantly in the treated group during the

proliferative and remodeling stages ( $22.19 \pm 2.12$  µm on day 7 and  $23.16 \pm 2.78$  µm on day 30) compared with the control ( $21.61 \pm 1.74$  µm and  $19.34 \pm 1.75$  µm, respectively;  $P < 0.05$ – $0.001$ ). This enlargement indicates restoration of follicular maturity and improved structural integrity of the skin under the influence of leech-derived bioactive proteins. In experimental group numerous hair follicles were predominantly in a resting state. This dominance of the telogen phase could reflect later stages in wound healing or normal skin homeostasis, where follicles are resting before regeneration reinitiates.

The mechanistic basis of the therapeutic effect observed in *H. verbana* extract-treated animals likely involves several interconnected molecular pathways. Anti-inflammatory peptides such as hirudin and antistasin-like molecules attenuate oxidative stress and suppress the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF-α and IL-1β, thereby protecting tissues from secondary inflammatory damage [10, 13]. Hirudin has also been shown to inhibit inflammasome activation and promote mitophagy, reducing oxidative injury and facilitating tissue recovery [9, 12]. Enzymes such as destabilase contribute to fibrin degradation, improving blood flow and nutrient supply to the regenerating dermis [11]. In addition, certain leech-derived peptides exhibit growth factor — like activity, stimulating keratinocyte proliferation and extracellular matrix synthesis [18, 23]. Proteins such as RNASET2 may participate in collagen deposition and reorganization, ensuring proper structural remodeling [6, 21]. These combined actions result in a microenvironment conducive to tissue repair, angiogenesis, and epithelial regeneration.

The results obtained in this study are consistent with previous reports describing the regenerative properties of leech-derived substances. Aminov et al. demonstrated that extracts of *H. verbana* promote granulation tissue formation, vascularization, and epithelial proliferation, findings that correspond closely with the present histological and morphometric outcomes [4]. A novel contribution of this work is the detailed quantitative evaluation of hair follicle density and diameter across multiple healing phases, providing direct evidence for leech extract-induced follicular neogenesis and maturation.

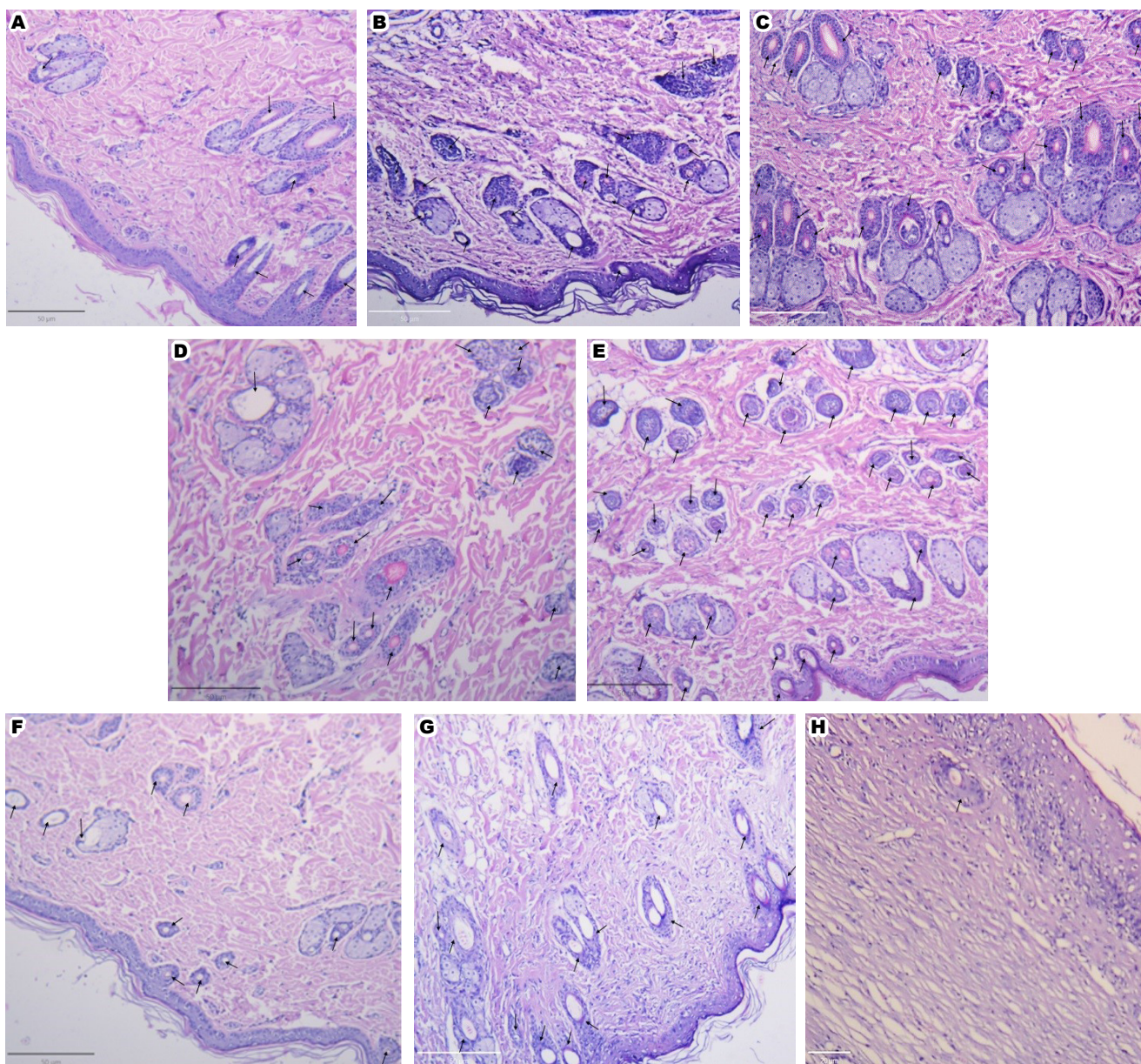
The present results highlight the potential of *Hirudo verbana* extract as a natural biotechnological product for wound-healing applications. Its multifactorial biological activity — which includes anti-inflammatory, anticoagulant, thrombolytic, and tissue-regenerative components — provides a broader spectrum of action compared to many conventional pharmacological agents that are designed to affect specific molecular targets. Moreover, its natural origin, high biocompatibility, and low likelihood of adverse reactions make it an attractive alternative or adjunct in clinical wound management. Further investigations should focus on isolating and characterizing the specific active fractions responsible for these therapeutic effects, determining optimal dosing regimens, and conducting comprehensive preclinical and clinical studies to evaluate efficacy and safety in human subjects.



**Table.** Morphometric parameters of hair follicles during excisional wound healing in control and after treatment with medicinal leech extract (mean±SD)

| Indicator                                      | Intact (day of wounding) (n=60) | Control group (n=30) |                   |                   | Experimental group (n=30) |                      |                       |
|------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
|                                                |                                 | Day 3 (n=10)         | Day 7 (n=10)      | Day 30 (n=10)     | Day 3 (n=10)              | Day 7 (n=10)         | Day 30 (n=10)         |
| Number of hair follicles, in 1 mm <sup>2</sup> | 43,28±2,77                      | 28,42±1,97<br>***    | 32,81±2,71<br>*   | 40,29±2,69<br>*** | 43,89±3,54<br>###         | 48,40±3,73<br>** ### | 54,28±4,21<br>*** ### |
| Diameter of the hair follicle, μm              | 19,31±1,43                      | 18,44±1,81<br>*      | 21,61±1,74<br>*** | 19,34±1,75<br>**  | 22,19±2,12<br>*** ###     | 23,16±2,78<br>#      | 22,89±1,97<br>###     |

**Note.** \* — differences compared to previous time point after wounding within one group (control and experiment) are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).  
 \*\* — differences compared to previous time point after wounding within one group (control and experiment) are statistically significant ( $P \leq 0.01$ ).  
 \*\*\* — differences at different times after surgery within one group (control and experiment) are statistically significant ( $P \leq 0.001$ ).  
 # — differences between control and experiment at one time are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).  
 ### — differences between control and experiment at one time are statistically significant ( $P \leq 0.001$ ).



**Fig.** Microphotographs of a skin flap excised in periwound in control and experimental groups of rats at different periods of healing: A — Day of wounding, intact; B — Day 3 of wound healing, control group; C — Day 3 of wound healing, experimental group; D — Day 7 of wound healing, control group; E — Day 7 of wound healing, experimental group; F — Day 30 of wound healing, control group; G — Day 30 of wound healing, experimental group; H — Day 30 of wound healing, experimental group. Follicle neogenesis



The water-salt extract of *Hirudo verbana* significantly enhances wound healing by accelerating inflammation resolution, promoting follicular regeneration, and improving skin restoration. Quantitative morphometric data demonstrate increased hair follicle density and diameter, indicating follicle neogenesis and maturation beyond natural recovery. These effects are attributed to the extract's bioactive compounds with anti-inflammatory, angiogenic, and regenerative properties. Given its natural origin and biocompatibility, this extract holds promise as a novel therapeutic agent for wound care. Further molecular research and clinical studies are essential to isolate active components and confirm safety and efficacy in humans.

## References

- Alaama M, Kucuk O, Bilir B, Merzouk A, Ghawi AM, Yerer MB, Ahmado MA, Abdulkader AM, Helaluddin ABM. Development of leech extract as a therapeutic agent: A chronological review. *Pharmacol Res Modern Chin Med*. 2024; 10: 100355. DOI: 10.1016/j.prmcm.2023.100355.
- Aminov RF, Aminova AS. Excisional wound morphological characteristics under the influence of medicinal leech biologically active substances. *Innov Biosys Bioeng*. 2025; 9 (3): 3–13. DOI: 10.20535/ibb.2025.9.3.322167.
- Aminov RF. 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.
- Aminov RF, Aminova AS, Makheyeva LV, Frolov OK, Fedotov ER, Piatyholets TV. The effect of water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* on the regenerative properties of excisional wounds of rat skin. *Biol Tvarin*. 2025; 27 (1): 21–26. DOI: 10.15407/animbio27.01.021.
- Ansell DM, Kloepper JE, Thomason HA, Paus R, Hardman MJ. Exploring the “hair growth-wound healing connection”: Anagen phase promotes wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol*. 2011; 131 (2): 518–528. DOI: 10.1038/jid.2010.291.
- Baranzini N, Pulze L, Tettamanti G, Acquati F, Grimaldi A. HVRNASET2 regulate connective tissue and collagen I remodeling during wound healing process. *Front Physiol*. 2021; 12: 632506. DOI: 10.3389/fphys.2021.632506.
- De Moura 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.
- Ito M, Cotsarelis G. Is the hair follicle necessary for normal wound healing? *J Invest Dermatol*. 2008; 128 (5): 1059–1061. DOI: 10.1038/jid.2008.86.
- Junren C, Xiaofang X, Huiqiong Z, Gangmin L, Yanpeng Y, Xiaoyu C, Yuqing G, Yanan L, Yue Z, Fu P, Cheng P. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives — A review. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 660757. DOI: 10.3389/fphar.2021.660757.
- Karasartova D, Arslan-Akveran G, Sensoz S, Mumcuoglu KY, Taylan-Ozkan A. *Hirudo verbana* microbiota dynamics: A key factor in hirudotherapy-related infections? *Microorganisms*. 2025; 13 (4): 918. DOI: 10.3390/microorganisms13040918.
- Kvist S, Manzano-Marín A, de Carle D, Trontelj P, Siddall ME. Draft genome of the European medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Annelida, Clitellata, Hirudiniformes) with emphasis on anticoagulants. *Sci Rep*. 2020; 10: 9885. DOI: 10.1038/s41598-020-66749-5.
- Luo G, Chen L, Chen M, Mao L, Zeng Q, Zou Y, Xue J, Liu P, Wu Q, Yang S, Liu M. Hirudin inhibits the formation of NLRP3 inflammasome in cardiomyocytes via suppressing oxidative stress and activating mitophagy. *Heliyon*. 2023; 10 (1): e23077. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23077.
- Lv Q, Li M, Wen Z, Han Q, Wei L, Chen J, Pan Y. Efficacy and potential mechanism of atherosclerosis prevention by the active components of leech based on network pharmacology combined with animal experiments. *Heliyon*. 2024; 10 (6): e27461. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e27461.
- Makheyeva L, Frolov O, Aliyeva O. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress. *Innov Biosys Bioeng*. 2025; 9 (1): 13–25. DOI: 10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
- Mangelsdorf S, Vergou T, Sterry W, Lademann J, Patzelt A. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. *Skin Res Technol*. 2014; 20 (2): 147–154. DOI: 10.1111/srt.12098.
- Marin E, Komilov DA, Bukhdruker SS, Aleksenko VA, Manuvera VA, Zinovev EV, Kovalev KV, Shevtsov MB, Talyzina AA, Bobrovsky PA, Kuzmichev PK, Mishin AV, Gushchin IY, Lazarev VN, Borshchevskiy VI. Structural insights into thrombolytic activity of destabilase from medicinal leech. *Sci Rep*. 2023; 13 (1): 6641. DOI: 10.1038/s41598-023-32459-x.
- McCarty SM, Percival SL. Proteases and delayed wound healing. *Adv Wound Care*. 2013; 2 (8): 438–447. DOI: 10.1089/wound.2012.0370.
- Nikrou B, Naeimi S, Rassouli M, Ghaffari Khaligh S. The healing of wounds infected with *Staphylococcus aureus* is accelerated by leech saliva ointment. *Iran J Vet Surg*. 2025; 20 (1): 67–77. DOI: 10.30500/ivsa.2024.467335.1411.
- Peng L, Pan X, Yin G. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 597264. DOI: 10.1155/2015/597264.
- Popazova O, Aminov R, Ryzhenko O, Makheyeva L, Filianskyi I, Gorchakova N. Therapeutic efficacy of *Hirudo verbana* leech extract in a burn wound model. *Phytotherapy J*. 2025; 3: 53–61. DOI: 10.32782/2522-9680-2025-3-53.
- Pulze L, Baranzini N, Acquati F, Marcolli G, Grimaldi A. Dynamic relationship among extracellular matrix and body wall cells in *Hirudo verbana* morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 2024; 396 (2): 213–229. DOI: 10.1007/s00441-024-03874-x.
- Sig AK, Guney M, Uskudar Guclu A, Ozmen E. Medicinal leech therapy — an overall perspective. *Integr Med Res*. 2017; 6 (4): 337–343. DOI: 10.1016/j.imr.2017.08.001.
- Song Y, Wu C, Zhang X, Bian W, Liu N, Yin S, Yang MF, Luo M, Tang J, Yang X. A short peptide potentially promotes the healing of skin wound. *Biosci Rep*. 2019; 39 (3): BSR20181734. DOI: 10.1042/BSR20181734.
- Varisco PA, Péclat V, van Ness K, Bischof-Delaloye A, So A, Busso N. Effect of thrombin inhibition on synovial inflammation in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000; 59 (10): 781–787. DOI: 10.1136/ard.59.10.781.

## Прискорення регенерації волосяних фолікулів під впливом екстракту *Hirudo verbana* у моделі різаної рани у щурів

Р. Ф. Амінов<sup>1</sup>, Л. О. Омелянчик<sup>1</sup>, М. Л. Таврог<sup>2</sup>, А. С. Амінова<sup>1</sup>, О. І. Потоцька<sup>2</sup>  
mariannatavrog@gmail.com

<sup>1</sup>Запорізький національний університет, вул. Університетська, 66, Запоріжжя, 69011, Україна

<sup>2</sup>Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, бул. Марії Приймаченко, 26, Запоріжжя, 69035, Україна

У дослідженні вивчено регенераційний потенціал водно-сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* при загоєнні різаних ран шкіри щурів, з особливим акцентом на відновлення волосяних фолікулів. Шістдесят самців щурів поділили на контрольну та дослідну групи; тваринам дослідної групи місцево наносили екстракт під час загоєння ран. Гістологічний та морфометричний аналізи проводили на 3, 7 та 30 добу після нанесення рани. У тварин, що отримували екстракт, спостерігали швидший перехід до проліферативної фази, покращення структури шкіри, а також збільшення кількості й діаметра волосяних фолікулів порівняно з контролем. На 30-ту добу їхня кількість перевищувала показники інтактної шкіри, що свідчить про активацію фолікулярного неогенезу та дозрівання. Терапевтична дія зумовлена біологічно активними сполуками екстракту, які мають протизапальні, антикоагулянтні та регенераційні властивості, покращуючи місцевий кровообіг і оксигенацію тканин. Отримані результати підтверджують, що екстракт *Hirudo verbana* ефективно стимулює регенерацію волосяних фолікулів і прискорює загоєння різаних ран. Завдяки природному походженню, безпечності та комплексній біологічній дії він може бути перспективним біотехнологічним засобом для відновлення шкіри та лікування ран.

**Ключові слова:** *Hirudo verbana*, водно-сольовий екстракт, різана рана, волосяні фолікули, загоєння ран шкіри, гірудотерапія, регенерація тканин



# Morphological and immunological profile of piggles blood under the influence of feed additive “Globigen Jump Start” and adverse microclimate parameters

Olesia Kamratska  
okamracka@gmail.com



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

## ORCID:

O. Kamratska <https://orcid.org/0000-0003-4556-4240>

## Authors' Contributions:

KO: Project administration; Conceptualization; Methodology; Investigation; Formal analysis; Writing — original draft, review & editing.

## Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

## Ethical approval:

The research was conducted in accordance with national and international standards for scientific research involving animals: the Law of Ukraine “On the Protection of Animals from Cruel Treatment” and the European Convention for the Protection of Animals (Strasbourg, 1986).

## Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

The article presents the results of a study of the influence of adverse microclimate parameters on the morphological and immunological blood parameters of piglets in the neonatal period of development, and also evaluates the effectiveness of the use of the feed additive “Globigen Jump Start” to correct the identified violations. The study was conducted under production conditions with elevated air temperature and above-normal indoor ammonia concentration. It was established that deviations of microclimate parameters from reference values negatively affect the functional state of the piglets' organism, which is manifested by changes in hematological and immunological blood parameters. The use of a feed additive containing egg immunoglobulins IgY,  $\beta$ -glucans and mannan-oligosaccharides increased the level of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit ( $P < 0.05 - 0.01$ ), and also contributed to the normalization of the ratio of individual forms of blood leukocytes, in particular, an increase in the proportion of lymphocytes and a decrease in the number of neutrophils. The results obtained indicate a pronounced immunomodulatory and adaptogenic effect of the feed additive “Globigen Jump Start” and the feasibility of its use to increase the adaptive capacity and resistance of the piglet organism in the critical period of early postnatal development under the influence of environmental stress factors.

**Key words:** piglets, neonatal period, microclimate, heat stress, immunity, hematological indicators, feed additive, IgY

## Introduction

Intensification of livestock farming in combination with global climate change is accompanied by an increase in the level of technological and environmental stresses, which negatively affect the physiological state, metabolic homeostasis and immune reactivity of farm animals. An increase in ambient temperature, deterioration of microclimate parameters in livestock premises and accumulation of harmful gases lead to disruption of heat exchange, water-salt balance and activation of stress-releasing mechanisms, especially in young animals in the early periods of ontogenesis [1, 5, 7].

Piglets are especially vulnerable to the effects of adverse environmental factors in the neonatal period, when the body's adaptive mechanisms are not yet fully formed, and the immune system largely depends on passively acquired protective factors. Under such conditions, even minor deviations of microclimate parameters from optimal values can cause the development of immunodeficiency states, reduced resistance, increased morbidity and mortality of young animals, which has significant economic consequences for the pig industry [6, 13, 16].

An important role in the formation of the body's adaptive response to stress factors is played by mechanisms of nonspecific resistance and the immune response

regulation system. In particular, nitric oxide and related NO-dependent processes are considered as a component of the stress-limiting system, which ensures short- and long-term adaptation of the body to adverse environmental conditions [17]. At the same time, the effectiveness of the immune response in young piglets is largely determined by the level of passive immunity obtained with colostrum and the functional state of the cellular and humoral components of the immune system.

Modern pig farming technologies, in particular early weaning of piglets from sows, often do not take into account the biological features of the development of the immune system, which leads to increased sensitivity of animals to the effects of stress and pathogenic factors in the post-weaning period [9, 13]. In this regard, a relevant direction of scientific research is the search and implementation of effective immunotropic agents capable of increasing the adaptive potential and resistance of the piglet organism under conditions of negative environmental influences. In this context, feed additives containing immunoglobulins,  $\beta$ -glucans and mannan-oligosaccharides, which provide passive immune protection, stimulate nonspecific resistance and support the functional state of the digestive and immune systems, are of significant scientific and practical interest. One of such additives is "Globigen Jump Start", which includes egg immunoglobulins IgY and inactivated feed yeast [13, 2, 8, 14–15].

Taking into consideration the above, the aim of the research was to determine the impact of adverse microclimate parameters on the morphological and immunological blood parameters of piglets in the neonatal period of development, as well as to assess the effectiveness of using the feed additive "Globigen Jump Start" to increase the adaptive capacity and immune resistance of the animal organism under the influence of environmental stress factors.

## Materials and Methods

The study of the influence of microclimate parameters on the body of piglets in the neonatal period of their development was carried out in production conditions, in particular in one of the farms of Rivne region. The ventilation system is supply and exhaust, which is carried out by opening windows and doors, exhaust shafts located

in the ceiling above the passage, as well as by using exhaust fans that are turned on manually.

Two groups of farrowing sows of the Large White breed were formed (control and experimental groups of 5 animals in each group). The sows of the control group were fed standard compound feed. The sows of the experimental group, starting from the 5<sup>th</sup> day before the expected farrowing and until the 28<sup>th</sup> day of lactation, in addition to standard compound feed, received the feed additive "Globigen Jump Start" in the amount of 0.5 kg/t of finished feed. Piglets born from sows of the control and experimental groups, starting from 5 days of age, received prestarter compound feed, balanced in terms of essential nutrients, according to existing standards. At the same time, piglets of the experimental groups, starting from 5 days of age, were fed with the feed additive "Globigen Jump Start" in the amount of 1 kg/t of feed along with the standard compound feed. Piglets were weaned from sows at 28 days of age.

The feed prebiotic additive "Globigen Jump Start" (*EW Nutrition GmbH*, Germany) contains 26.25 % egg powder (source of IgY, an analogue of IgG antibodies in mammals) and inactivated dry feed yeast up to 100 %, containing beta-glucans and mannan-oligosaccharides (MOS) [14].

During the study period, the clinical condition, safety and growth of animals were monitored. During the experiment, the main microclimate parameters were monitored using a *Dozor S-M-2* gas analyzer: temperature, air velocity, concentration of carbon dioxide, ammonia and hydrogen sulfide.

The material for laboratory studies was blood taken from piglets on days 5, 19 and 33. In heparin-stabilized blood, the total number of erythrocytes (RBC), leukocytes (WBC) and platelets (PLT), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), mean erythrocyte volume (MCV), mean hemoglobin content in erythrocytes (MCH) were determined on the *MYTHIC 18 Vet* hematology analyzer. The ratio of individual forms of leukocytes (blood leukogram) was calculated using visual microscopy, according to the methods described by us in the reference book [18].

## Results and Discussion

Analysis of the research results showed that the microclimate parameters significantly differed from the recommended reference values (table 1). Thus, the air temperature (°C) in the room for suckling piglets at 5, 19 and 33 days of age was 10; 12 and 14 °C higher compared to the recommended maximum temperature values; the ammonia concentration (mg/m<sup>3</sup>) was 1.6; 3.3 and 3.5 times higher, respectively. The discrepancy between the microclimate parameters during manual control of the supply and exhaust ventilation system in the room and the reference values led to a significant negative impact on the activity of the studied systems of the piglets' organism (table 2), which is also evidenced by the results of our previous studies [13, 19].

**Table 1.** Indoor microclimate parameters

| Indicators                                           | Day 5 | Day 19 | Day 33 | Acceptable norm |
|------------------------------------------------------|-------|--------|--------|-----------------|
| Outside air temperature, °C                          | 30    | 33     | 36     | —               |
| Indoor air temperature, °C                           | 32    | 34     | 36     | 20–22           |
| Air speed, m/s                                       | 2,8   | 3,0    | 3,0    | 1–3             |
| Carbon dioxide CO <sub>2</sub> , ppm                 | 1310  | 1670   | 2346   | 3000            |
| Ammonia NH <sub>3</sub> , mg/m <sup>3</sup>          | 32    | 67     | 71     | 0–20            |
| Hydrogen sulfide H <sub>2</sub> S, mg/m <sup>3</sup> | 0     | 0      | 0      | 0–5             |



The use of the feed additive “Globigen Jump Start” in feeding piglets during the critical period of neonatal development under the negative influence of unfavorable microclimate parameters caused positive changes in morphological, biochemical and immunological blood parameters (tables 2 and 3). Thus, from the data presented in table 2, we see that the number of erythrocytes in the blood of piglets of the experimental group at 19 and 33 days of age was 24.4 ( $P<0.05$ ) and 34.6 % ( $P<0.01$ ) higher than in animals of the control group. Similar changes, only less pronounced, were established when determining the concentration of hemoglobin and the content of hemoglobin in erythrocytes. At the same time, the significantly higher content of hemoglobin in erythrocytes in all periods of the studies attracts attention. The higher hemoglobin content in erythrocytes in the blood of piglets at 5 days of age is probably due to the effect of the studied supplement, which was consumed by the farrowing sows. At the same time, in the blood of piglets of the experimental group at 33 days of age, an increase of 14.7 % in the hematocrit value ( $P<0.05$ ) was recorded. These data indicate the activating effect of the components of the studied feed supplement on the oxygen-transport function of the blood.

High temperature and accumulation of harmful gases in a room with poor ventilation significantly affected the ratio of individual forms of leukocytes in the blood of piglets (table 3). When exposed to stress and irritation by harmful gases, such as ammonia, an increase in the number of neutrophils in the blood is observed. This is because neutrophils are the first cells to respond to inflammatory processes and tissue damage. Simultaneously with the increase in the number of neutrophils, a decrease in the proportion of lymphocytes was detected, as a sign of suppression of adaptive immunity. From the results of the studies presented in table 3, we see that the use of the feed additive “Globigen Jump Start” to sows and piglets born from them has a regulatory effect on the ratio of their individual forms, which helps animals better adapt to stressful conditions. This is indicated by a lower number of segmented neutrophils in the blood of piglets of the experimental group compared to the control group on the 19<sup>th</sup> day of life ( $P<0.05$ ) and a higher proportion of lymphocytes ( $P<0.05$ ) throughout the entire research period. It is likely that the components of “Globigen Jump Start” stimulate the adaptive immune response and support the activity of lymphocytes. Analysis of the percentage of other types of leukocytes showed that the number of eosinophils in the blood of piglets of the experimental group on the 33<sup>rd</sup> day of life was half ( $P<0.05$ ) less than in the control group. High concentrations of harmful gases can irritate the mucous membranes and respiratory tract, causing allergic reactions, which leads to an increase in the level of eosinophils.

The decrease in the level of eosinophils in the blood of suckling piglets in the experimental group is apparently due to the presence of beta-glucans and MOS in the feed additive, which help maintain healthy microflora

**Table 2.** Hematological blood parameters of piglets ( $M\pm m$ ,  $n=5$ )

| Indicators                                        | Group | Periods of the experiment |             |             |
|---------------------------------------------------|-------|---------------------------|-------------|-------------|
|                                                   |       | Day 5                     | Day 19      | Day 33      |
| Erythrocytes (RBC), th/l                          | C     | 3.88±0.59                 | 4.76±0.42   | 5.11±0.40   |
|                                                   | E     | 4.93±0.39                 | 5.92±0.26*  | 6.88±0.34** |
| Hemoglobin (HGB), g/l                             | C     | 84.0±5.15                 | 96.8±4.68   | 98.4±4.20   |
|                                                   | E     | 94.8±6.11                 | 111.4±4.17* | 115.2±4.07* |
| Leukocytes (WBC), g/l                             | C     | 8.76±0.98                 | 8.38±0.57   | 13.5±1.18   |
|                                                   | E     | 9.82±0.99                 | 10.28±0.72  | 12.08±0.77  |
| Hematocrit (HCT), %                               | C     | 35.5±3.18                 | 36.6±1.84   | 38.1±1.76   |
|                                                   | E     | 37.9±1.37                 | 40.0±2.02   | 43.7±1.53*  |
| Mean erythrocyte volume (MCV), fL                 | C     | 72.1±2.29                 | 73.1±1.38   | 74.7±1.78   |
|                                                   | E     | 73.6±1.71                 | 75.6±1.66   | 77.7±1.46   |
| Mean hemoglobin content in erythrocytes (MCH), pg | C     | 18.0±0.59                 | 18.8±0.62   | 19.1±0.78   |
|                                                   | E     | 20.9±0.69*                | 21.2±0.74*  | 21.7±0.69*  |

Note. In this and the following tables: \* —  $P<0.05$ , \*\* —  $P<0.01$ , \*\*\* —  $P<0.001$  — significant difference in animals of the experimental group compared to the control group.

**Table 3.** Leukogram of piglet blood, % ( $M\pm m$ ;  $n=5$ )

| Indicators             | Group | Periods of the experiment |            |            |
|------------------------|-------|---------------------------|------------|------------|
|                        |       | Day 5                     | Day 19     | Day 33     |
| Basophils              | C     | 0.6±0.24                  | 0.4±0.4    | 0.2±0.2    |
|                        | E     | 0.8±0.20                  | 0.8±0.2    | 0.8±0.37   |
| Eosinophils            | C     | 3.0±0.71                  | 4.2±0.86   | 5.4±0.93   |
|                        | E     | 2.2±0.49                  | 3.0±0.45   | 2.6±0.68*  |
| Young                  | C     | 0.4±0.24                  | 0.6±0.40   | 0.8±0.37   |
|                        | E     | 0.6±0.24                  | 0.6±0.24   | 0.4±0.24   |
| Rod-shaped neutrophils | C     | 3.6±0.68                  | 2.4±0.51   | 2.2±0.58   |
|                        | E     | 2.6±0.60                  | 2.6±0.68   | 2.0±0.55   |
| Segmented neutrophils  | C     | 37.6±1.72                 | 39.0±1.52  | 38.4±1.50  |
|                        | E     | 34.2±1.43                 | 33.5±1.54* | 33.0±2.00  |
| Lymphocytes            | C     | 52.0±1.34                 | 50.0±1.87  | 49.8±1.88  |
|                        | E     | 56.6±1.08*                | 56.2±1.83* | 57.2±1.66* |
| Monocytes              | C     | 2.8±0.73                  | 3.4±0.93   | 3.2±0.58   |
|                        | E     | 3.0±0.71                  | 3.8±0.66   | 4.0±0.71   |

and reduce allergic reactions to harmful gases.

In general, the results of the conducted studies indicate that the effect of elevated air temperature and above-normal indoor ammonia concentrations causes the development of a stress reaction in the body of piglets in the neonatal period, which is accompanied by a violation of the oxygen-transport function of the blood and changes in immune reactivity. A decrease in erythrocyte indices and the formation of a neutrophil-lymphocyte imbalance can be considered as a consequence of hypoxia and activation of nonspecific inflammatory mechanisms.

The use of a feed additive containing IgY,  $\beta$ -glucans and mannan-oligosaccharides causes activation of erythropoiesis and an increase in the functional capacity of erythrocytes in the body of piglets, which is manifested by an increase in the number of erythrocytes, hemoglobin concentration and hematocrit value. Such changes are adaptive in nature and contribute to an increase in the efficiency of oxygen transport under conditions of heat stress.

Normalization of the leukocyte formula of the blood, in particular an increase in the proportion of lymphocytes and a decrease in the number of segmented neutrophils and eosinophils, indicates a decrease in the intensity of the nonspecific inflammatory response and maintenance of the adaptive link of immunity. The detected effects are probably due to the complex immunomodulatory effect of the components of the supplement, which combines the mechanisms of passive immune protection and stimulation of the nonspecific immune response. Thus, egg yolk immunoglobulins (IgY), as well as biologically active components of dry yeast, in particular  $\beta$ -glucans and MOS, are characterized by a pronounced immunomodulatory and metabolic-regulatory effect, which indirectly affects the oxygen-transport function of the blood and the ratio of individual forms of leukocytes [2].

As is known, Ig Y provides passive immunity, which is especially important for animals in the first days of life, when their own immune system is still developing [2, 8]. Immunoglobulins Y, entering the body, are able to specifically bind antigens of pathogenic microorganisms and their toxins in the intestinal lumen, reducing the level of antigenic and endotoxic load. This leads to a decrease in the systemic inflammatory response, normalization of the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and a decrease in oxidative stress. As a result, favorable conditions are created for stabilizing erythropoiesis, preserving the structural and functional integrity of erythrocyte membranes and increasing the affinity of hemoglobin for oxygen, which has a positive effect on the oxygen-transport function of the blood [10].

Dried yeast enriched with  $\beta$ -glucans interacts with innate immune receptors (Dectin-1, CR3, TLR-2/6) on the surface of macrophages, neutrophils and dendritic cells. Activation of these receptors contributes to a moderate stimulation of phagocytosis, increased antioxidant defense and optimization of cytokine balance. Reduction of excessive inflammatory response and oxidative damage to erythrocytes may contribute to an increase in their functional activity, in particular, improvement of gas exchange and tissue oxygenation [3–4, 12].

Mannan-oligosaccharides exert their effect mainly through the sorption of pathogenic bacteria that have mannose-specific fimbrial adhesins, as well as through the modification of the composition of the intestinal microbiota. Improving the intestinal barrier function reduces the translocation of bacterial endotoxins into the systemic circulation, which indirectly reduces the burden on the immune system and hematopoietic organs. Under such conditions, the need for compensatory leukocytosis decreases, the ratio of neutrophils and lymphocytes stabilizes, and the proportion of immunocompetent cells of the adaptive link increases [4].

Thus, the complex action of IgY,  $\beta$ -glucans and MOS promotes the redistribution of leukocyte forms in the direction of reducing the relative number of stress-associated neutrophils and increasing the proportion of lymphocytes, which may indicate a decrease in the level of chronic

inflammation and increased immune resistance of the body. Simultaneous normalization of immune homeostasis and reduction of oxidative stress create the prerequisites for improving the oxygen-transport function of the blood by stabilizing hemoglobin, hematocrit and functional fullness of erythrocytes.

Thus, the components of the feed additive, namely: Ig Y,  $\beta$ -glucans and MOS help reduce the impact of pathogens and support the immune function of the piglets' organism under the influence of adverse climatic factors. At the same time, the hematopoietic function of the bone marrow is activated, which leads to an increase in the number of erythrocytes and an increase in the level of other hematological indicators, as an adaptive reaction that helps the body compensate for hypoxia caused by insufficient oxygen levels due to poor ventilation.

It was established that keeping piglets in the neonatal period under conditions of elevated air temperature and ammonia concentration is accompanied by the formation of a stress state, which negatively affects the oxygen-transport and immune function of the blood. This is manifested by a decrease in erythrocyte indices, an imbalance in the leukocyte formula and a shift in the immune response towards nonspecific inflammation.

The use of the feed additive "Globigen Jump Start", containing egg immunoglobulins IgY,  $\beta$ -glucans and mannan-oligosaccharides, causes an activating effect on the oxygen-transport function of the blood of piglets, as evidenced by a significant increase in the number of erythrocytes, hemoglobin concentration, hemoglobin content in erythrocytes and hematocrit value, especially at 19 and 33 days of age ( $P < 0.05 - 0.01$ ). These changes are adaptive in nature and are aimed at compensating for hypoxia caused by heat stress and impaired gas exchange indoors.

## References

1. Anuta A, Wang X, Kinay P. The impacts of climate change on livestock: An interdisciplinary, scoping review of health, production, and adaptation strategies. *Climat Smart Agric.* 2025; 2 (4): 100082. DOI: 10.1016/j.csag.2025.100082.
2. Capotă R, Căușu-Sliwa D, Bostănușu-Liescu AC, Năstăsă V, Mareș M. Latest findings in immunoglobulin Y technologies and applications. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (13): 6380. DOI: 10.3390/ijms26136380.
3. Choi H, Kim SW. Characterization of  $\beta$ -glucans from cereal and microbial sources and their roles in feeds for intestinal health and growth of nursery pigs. *Animals.* 2023; 13 (13): 2236. DOI: 10.3390/ani13132236.
4. Chuaychu SB, Sirisereewan C, Techakriengkrai N, Tummaruk P, Thanawongnuwech R, Nedumpun T. Enhancement of systemic virus-specific T lymphocyte responses in pigs supplemented with algae-derived  $\beta$ -glucan. *Vet J.* 2024; 306: 106182. DOI: 10.1016/j.tvjl.2024.106182.
5. Else KJ, Cruickshank SM. The role of ecoimmunology in tackling the emerging threats of climate change and the exposome. *Nat Immunol.* 2025; 26: 2113–2115. DOI: 10.1038/s41590-025-02342-0.

6. Heuß EM, Pröll-Cornelissen MJ, Neuhoß C, Tholen E, Große-Brinkhaus C. Invited review: Piglet survival: benefits of the immunocompetence. *Animal*. 2019; 13 (10): 2114–2124. DOI: 10.1017/S1751731119000430.
7. Imberti L, Tiecco G, Logiudice J, Castelli F, Quiros-Roldan E. Effects of climate change on the immune system: A narrative review. *Health Sci Rep*. 2025; 8 (4): e70627. DOI: 10.1002/hsr.2.70627.
8. Kozłowska E, Agier J, Różalska S, Jurczak M, Góralczyk-Bińkowska A, Żelechowska P. Fungal  $\beta$ -glucans shape innate immune responses in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): An *in vitro* study on PRR regulation, cytokine expression, and oxidative balance. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (13): 6458. DOI: 10.3390/ijms26136458.
9. Ohorodnyk N, Tkachuk V, Motko N, Boyko A, Pavkovych S. Correction of cellular and humoral links immunity in piglets under the weaning condition. *Sci Horiz*. 2025; 28 (1): 9–18. DOI: 10.48077/scihr.1.2025.09.
10. Pêgo AC, Lima IS, Martins AC, Sá-Pereira I, Martins G, Gozzelino R. Infection vs. reinfection: The immunomodulation of erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2024; 25 (11): 6153. DOI: 10.3390/ijms25116153.
11. Pereira KHNP, Fuchs KM, Mendonça JC, Xavier GM, Knupp FC, Lourenço MLG. Topics on maternal, fetal and neonatal immunology of dogs and cats. *Vet Immun Immunopathol*. 2023; 266: 110678. DOI: 10.1016/j.vetimm.2023.110678.
12. Pornanek P, Phoemchalard C. Dietary supplementation of beta-glucan-rich molasses yeast powder on antibody response to swine fever virus and hematology of starter-grower pigs. *Trop Anim Health Prod*. 2021; 53 (1): 43. DOI: 10.1007/s11250-020-02431-2.
13. Prudyus T, Vishchur O, Mudrak D, Gutsol A, Gutsol N. The state of T- and B-cell links of specific immunity and activity of humoral factors of natural defence of sows and their piglets under the influence of *Saccharomyces Cerevisiae* yeast complex and enzymes. *Sci Horiz*. 2025; 28 (2): 9–22. DOI: 10.48077/scihr.2.2025.09.
14. Prudyus TY, Vishchur OI, Smolyaninov KB, Mudrak DI, Broda NA, Masyuk MB, Smolyaninova OO. *Use of Feed Additive "Globilen Jump Start" in Feeding Piglets*. The methodological recommendations. Ed. by Salyha YT. Lviv, Institute of Animal Biology NAAS, 2025: 24 p. (in Ukrainian)
15. Tester RF, Al-Ghazzewi F. Mannans and health, with a special focus on glucomannans. *Food Res Intern*. 2013; 50 (1): 384–391. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.10.037.
16. Vishchur OI, Guty BV, Gufriy DF, Khariv II, Solovodzinska IE. *Immune Status, Assessment Methods and Correction Methods in Young Calves*. A monograph. Lviv, Spolom, 2015: 183 p. (in Ukrainian)
17. Vishchur O, Smolyaninov K, Ohorodnyk N. NO-dependent processes in biology, medicine and livestock. In: *Topical Issues of the Development of Veterinary Medicine and Breeding Technologies*. A scientific monograph. Latvia, Baltija Publishing, 2022: 31–44. DOI: 10.30525/978-9934-26-258-6-2.
18. Vlizlo VV (ed.), Fedoruk RS, Ratych IB. *Laboratory Research Methods in Biology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. A Handbook. Lviv, Spolom, 2012: 764 p. (in Ukrainian)
19. Vorobel M, Klym O, Kaplinskyi V, Petryshyn M, Prudyus T, Smolianinova O, Stefanyshyn O, Tsap M, Pylypets A, Luchka I. The effectiveness of the influence on the emission of harmful gases from pig manure during storage in lagoons the addition of mineral fertilizers. *Sci Pap Ser D Anim Sci*. 2024; 67 (1): 339–345. Available at: <https://animalsciencejournal.usamv.ro/index.php/scientific-papers/current?id=1394>

## Морфологічний та імунологічний профіль крові поросят за впливу кормової добавки «Глобіген Джамп Старт» та несприятливих параметрів мікроклімату

Олеся Камрацька  
okamracka@gmail.com

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

У статті представлено результати дослідження впливу несприятливих параметрів мікроклімату на морфологічні та імунологічні показники крові поросят у неонатальному періоді розвитку, а також оцінено ефективність використання кормової добавки «Глобіген Джамп Старт» для корекції виявлених порушень. Дослідження проводили в умовах виробництва з підвищеною температурою повітря та концентрацією аміаку в приміщенні вище норми. Встановлено, що відхилення параметрів мікроклімату від референтних значень негативно впливають на функціональний стан організму поросят, що проявляється змінами гематологічних та імунологічних показників крові. Використання кормової добавки, яка містить яєчні імуноглобуліни IgY,  $\beta$ -глюкани та маннан-олігосахариди, підвищило рівень еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту ( $P < 0,05$ – $0,01$ ), а також сприяло нормалізації співвідношення окремих форм лейкоцитів крові, зокрема, збільшенню частки лімфоцитів та зменшенню кількості нейтрофілів. Отримані результати свідчать про виражений імуномодулюючий та адаптогенний ефект кормової добавки «Глобіген Джамп Старт» та доцільність її використання для підвищення адаптивних можливостей та стійкості організму поросят у критичний період раннього постнатального розвитку під впливом стресових факторів навколишнього середовища.

**Ключові слова:** поросята, неонатальний період, мікроклімат, тепловий стрес, імунітет, гематологічні показники, кормова добавка, IgY



## Genotyping of Ukrainian Large White pigs by intronic polymorphism in *HMGA1* gene

V. Teniaiev<sup>1</sup>, A. Saienko<sup>1</sup>, M. Peka<sup>1,2</sup>, O. Tsereniuk<sup>1</sup>

saenko\_artem@meta.ua



<sup>1</sup>Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS, 1 Shvedska Mohyla str, Poltava, 36013, Ukraine

<sup>2</sup>V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

### ORCID:

V. Teniaiev <https://orcid.org/0009-0009-8522-1673>

A. Saienko <https://orcid.org/0000-0002-0527-5367>

M. Peka <https://orcid.org/0000-0003-0612-1164>

O. Tsereniuk <https://orcid.org/0000-0003-4797-9685>

### Authors' Contributions:

**TV:** Investigation; Visualisation; Writing — original draft.

**SA:** Conceptualization; Project administration; Supervision; Methodology; Investigation; Writing — original draft.

**PM:** Writing — original draft, review & editing.

**TO:** Funding acquisition; Supervision; Formal analysis; Writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

Authors declare no conflict of interests.

### Ethical approval:

The use of animals in this study was approved by the Scientific Council of the Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production (protocol no. 1 from 08.01.2024) and was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18 March 1986).

### Acknowledgements:

This study was funded by the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (grant registration number: 0125U000969).

The *HMGA1* (High Mobility Group AT-hook 1) gene is considered a candidate locus for growth- and fatness-related traits in pigs due to its involvement in transcriptional regulation and energy metabolism and its localization within a quantitative trait locus (QTL) region on *Sus scrofa* chromosome 7. The aim of this study was to characterize a previously described intronic polymorphism of the *HMGA1* gene in the population of Ukrainian Large White pig breed and to evaluate its population genetic parameters for potential application in marker-assisted selection. An *in silico* analysis based on the Sscrofa11.1 reference genome was performed to define the genomic localization of the amplified fragment, describe the polymorphism according to Ensembl nomenclature, and identify its rsID in the European Variation Archive. Genotyping of 30 Ukrainian Large White pigs was carried out using the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method with the restriction endonuclease *NaeI*. The polymorphic site was localized at position 7:30,326,531 and identified as rs80981303 (c.220-170C>T). Population analysis revealed genotype frequencies of 0.10 (CC), 0.40 (CT), and 0.50 (TT), with allele frequencies of 0.30 for C and 0.70 for T. The distribution of genotypes did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium ( $\chi^2 = 0.068$ ,  $P = 0.794$ ). The polymorphic information content value (PIC=0.3318) indicated that the locus is sufficiently informative. The obtained results confirm the polymorphic nature of the *HMGA1* gene in the Ukrainian Large White pig breed and support the potential utility of rs80981303 as a genetic marker. Further association studies with productive traits could substantiate its practical application in pig breeding programs.

**Key words:** *HMGA1* gene, pig, Ukrainian Large White breed, intronic polymorphism, PCR–RFLP, population genetics, marker-assisted selection



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

## Introduction

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) represent common genetic variants distributed throughout the porcine genome and constitute a valuable source of information for dissecting the genetic basis of economically important traits in pigs [17]. High-density

SNP genotyping and genome-wide association studies (GWAS) have substantially contributed to the identification of quantitative trait loci (QTLs) associated with growth, fatness, carcass composition, and meat quality traits in diverse pig populations, thereby enhancing the prospects of marker-assisted and genomic selection in swine breeding programs [20–21, 29]. The Pig QTL



database [13–14] currently catalogs multiple QTLs for growth and fatness attributes, highlighting the complex nature of the relationships between genes and productivity traits and the importance of considering animal genotypes to ensure efficient livestock production.

Among the candidate genes for animal productivity, the *HMGA1* (High Mobility Group AT-hook 1) gene has emerged as a locus of interest in porcine genetics [6, 9–12, 16, 18–19, 22–24, 27, 29, 31, 34–35]. The *HMGA1* gene encodes a non-histone chromatin structural protein that functions in transcriptional regulation through modulation of chromatin architecture, with documented roles in cell proliferation, differentiation, and metabolic regulation in mammals [4, 15, 30]. Although most functional characterizations of *HMGA1* have been conducted in human and model systems [4, 8, 15, 30], its genomic position on *Sus scrofa* chromosome 7 (SSC7) coincides with loci repeatedly implicated in backfat and growth traits in GWAS and QTL mapping studies, rendering it a biologically plausible candidate gene for performance traits in pigs [6, 9–10, 16, 22–23, 27, 29, 31, 34–35].

Genome-wide association studies in multiple pig populations have identified *HMGA1* among candidate genes associated with external and carcass traits. In large-scale analyses of growth traits, SNPs mapping near or within the *HMGA1* locus have been linked with body size and body length [10, 16, 22, 29, 31], indicating a potential role in skeletal and overall growth dynamics. *HMGA1* also exhibited associations with backfat thickness, supporting its relevance for fat deposition traits and carcass composition [6, 9]. Expression profiling and polymorphism analyses demonstrated that *HMGA1* mRNA is widely expressed across tissues, and specific coding and 3'-UTR SNPs were significantly correlated with backfat thickness in pigs [11]. Furthermore, genome scans have implicated *HMGA1* as a candidate influencing the size of forelimb bones, suggesting its multifunctional involvement in both growth and carcass structure [34–35].

Despite these associations, the precise causal variants within the *HMGA1* gene that affect phenotypic variation in growth and fatness traits remain incompletely resolved. The integration of functional polymorphisms with well-characterized phenotypes offers a promising approach to improve selection decisions. In domestic pig populations characterized by different breeding histories and trait emphases, the variability of *HMGA1* allelic forms suggests opportunities for selection targeting body size, fat distribution, and carcass composition.

In the context of Ukrainian pig breeding, including indigenous and commercial populations such as the Ukrainian Large White, identifying and validating molecular markers linked to economically significant traits is of particularly interest for enhancing meat productivity and preserving local genetic resources. The *HMGA1* gene, with its demonstrated associations with growth and fatness metrics, presents a candidate marker for incorporation into marker-assisted selection (MAS) panels alongside other well-established markers such as *IGF2*,

*MC4R*, and *RYR1* [2]. Such integration has the potential to refine genetic evaluation frameworks and support breeding programs tailored to both production efficiency and adaptive performance.

Therefore, this study aimed to characterize a previously described intronic polymorphism of the *HMGA1* gene, identifiable by the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method, in the Ukrainian Large White pig population and to evaluate its allelic and genotypic distribution with respect to its potential application in genetic improvement strategies.

## Materials and Methods

To determine the precise genomic localization of the studied polymorphism in the *HMGA1* gene within the Sscrofa11.1 reference genome [32], to describe this variant according to Ensembl [7] nomenclature, and to identify its rsID in the European Variation Archive (EVA) [3], a multi-step *in silico* analysis was performed. First, the positions of the primers described in [19] were mapped to *Sus scrofa* chromosome 7 using the BLAST tool [1] implemented in the Ensembl genome browser. The chromosomal distance between the primer binding sites was then calculated and compared with the expected amplicon length. Based on the sizes of the restriction fragments obtained after digestion, the putative position of the polymorphic site within the amplified fragment was inferred. Subsequently, the presence of the corresponding restriction site was verified, and the registered polymorphism in EVA matching this genomic position and its allelic variants was identified.

For laboratory analyses, bristle samples were collected from 30 Ukrainian Large White pigs maintained at the State Enterprise “Research Farm “Stepne” (Poltava region, Ukraine). All experimental procedures were carried out in the Genetics Laboratory of the Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine.

Genomic DNA was extracted from bristles using *Chelex 100* reagent according to the method described in [28]. Isolated DNA samples were stored at –20 °C until further analysis. Genotyping was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique, following approaches described in [5, 33]. PCR was conducted in a total reaction volume of 25 µl using reagents from New England Biolabs (USA) in 0.5 ml *Eppendorf* microcentrifuge tubes (*Eppendorf*, Germany) on a *Biometra* thermal cycler (Germany). Structure of primers [19] is shown in table 1. Amplification parameters, including annealing temperature and number of cycles, were optimized experimentally based on primer characteristics and data from previous studies [19, 24].

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed using the restriction endonuclease *NaeI* [19]. PCR products and restriction fragments were separated by electrophoresis in 0.2 % agarose gel. Fragment sizes were determined using the pBR322/MspI

**Table 1.** Primers structure, GC content and melting temperature

| Primers                   | GC, % | T <sub>m</sub> , °C |                       |                              |
|---------------------------|-------|---------------------|-----------------------|------------------------------|
|                           |       | Calculated          | Kim et al., 2004 [19] | Makgahlela et al., 2009 [24] |
| 5'-AGAAGGAGCCCAGCGAAGT-3' | 57.9  | 65.7                | 62                    | 60                           |
| 5'-ACAGTGCTCACCCAATGGC-3' | 57.9  | 66.7                |                       |                              |

molecular weight marker. Gel images were documented under ultraviolet illumination using a Canon digital camera.

Population genetic analysis was conducted using the *GenAlEx* 6.5 software package [25–26]. Allele frequencies, observed and expected genotype frequencies, observed and expected heterozygosity, and polymorphic information content (PIC) were calculated. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using the chi-square ( $\chi^2$ ) test.

## Results and Discussion

According to the results of the BLAST search performed within the *Sus scrofa* reference genome, the forward primer with the sequence 5'-AGAAGGAGCCCAGCGAAGT-3' was localized on chromosome 7 at positions 7:30,325,937–30,325,955, while the reverse primer with the sequence 5'-ACAGTGCTCACCCAATGGC-3' was mapped to positions 7:30,326,640–30,326,658. This primer pair spans exon 4 and the majority of intron 4 of the *HMGA1* gene (intron numbering according to the transcript ENSSSCT00000098878.1). Consequently, the actual length of the amplified fragment is 722 bp. In earlier studies [19, 24], the amplification of a 700 bp fragment using this primer system was reported; however, in the present work, the precise amplicon size was defined based on the current reference genome assembly.

AGAAGGAGCCCAGCGAAGTGCCAACACCTAAAAGACCTCGGGGCCGACCA  
 AAGGGGAGCAAAACAAGGGCGCCGCAAGACCCGGTGAGGCTTGAAGG  
 GGTGGCTCCTGGTGGAGGGAAGTGGGAAGTAACCCCGTCCCTGCAAGC  
 AGCTGAGGGAGGTCTGGGAAGGGTGGGCTTGTCTGATTCTCTGCATGC  
 CCTTCTCTGGTACGTGGGCGCGATGGGTCTTGGCTAGTTGAGGAAAGTG  
 GGGTGATGGCCGAGGCCTAAGTCTAGGGCCTTGTCTTGGCCAGGACACT  
 GGGGAAGTCAAGTCAGATGTCCAGAGCTTCTGGTCTGGAGGGAGGCC  
 AGTTGGGCAGAAATGGAGGGCTGTTCCCGCTGGGCTGAGATGTACCTCCC  
 CCCAACCCAGGCCCGCTGGGTCTGAGGGTGGGGGAGCAGGCAAGGCC  
 AGATCTACAGTGGCATTTGGCCTTTGGAGAAGTTGTTTGTATTTATTTT  
 ATTTTCTTAAGACACGACTCATATCCTCTGAGTCACGGGTGAAGGAGGG  
 AGTGGGGGCGTGTGTGTATGTTGGGGTGGGGGCGGTGTGGCCGGCCA  
 GTCATCCCCAGCTGGACTCCGGTGGGCCTGCTGGGCTGAGAGTCCCGGCT  
 GCCCTCCCTGCTTGGCCTCGCCCTCCAGGGCACTGGTCACTGCGGGCA  
 CCCGCCATTGGGTGAGCACTGT

**Fig. 1.** Fragment of the *HMGA1* gene (genomic location: 7:30,325,937–30,326,658) amplified in this study. Primer binding sites are underlined. Exon 4 (genomic location: 7:30,325,939–30,326,022) is highlighted in green. The polymorphic site rs80981303 (c.220-170C>T, genomic location: 7:30,326,531) is highlighted in blue.

Previous publications indicated that the analyzed polymorphism in the *HMGA1* gene is located within a recognition site of the restriction endonuclease *NaeI* (GCC/GGC). In the presence of the C allele, digestion was expected to yield two fragments of approximately 580 bp and 120 bp, whereas in the presence of the T allele, restriction does not occur and a single fragment of 700 bp is visualized by electrophoresis. Taking into account the refined amplicon size of 722 bp derived from the reference genome, cleavage at the *NaeI* site generates fragments of 595 bp and 127 bp. Accordingly, the TT genotype is represented by a single band corresponding to the undigested fragment, the CC genotype by two bands of 595 bp and 127 bp, and the CT genotype by three bands corresponding to the undigested and digested fragments.

The polymorphic site was localized on chromosome 7 at position 7:30,326,531 in the *Sscrofa*11.1 reference genome. According to Ensembl nomenclature, this variant is designated as c.220-170C>T relative to the transcript ENSSSCT00000098878.1. A single polymorphism registered at this genomic position is present in the EVA and is assigned the identifier rs80981303.

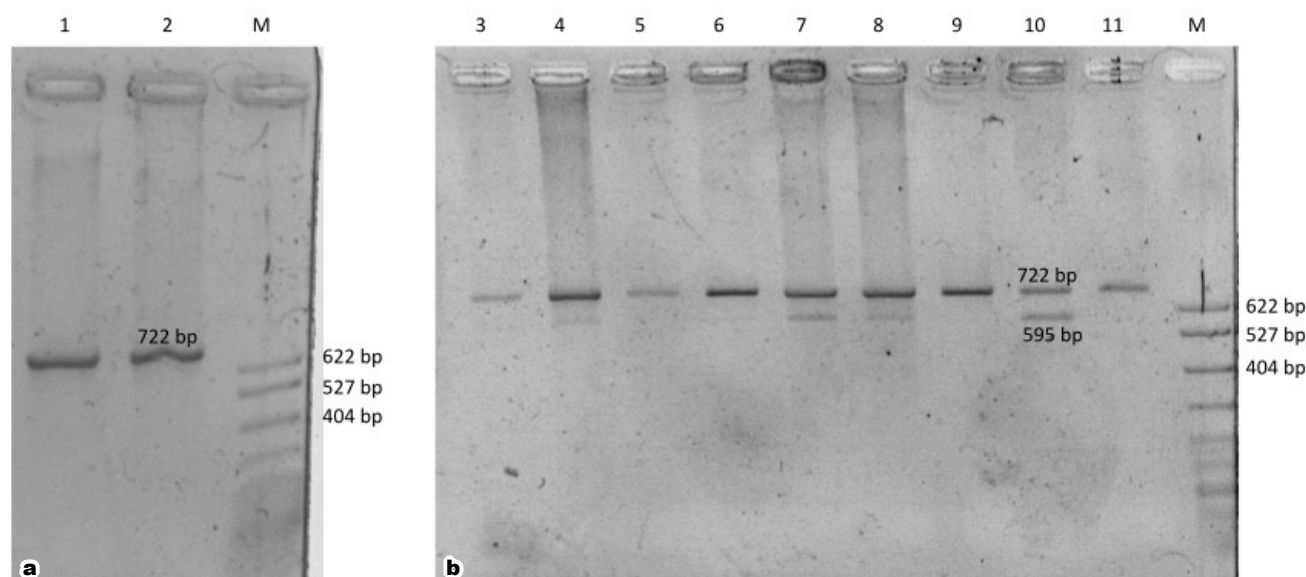
The amplified fragment of the *HMGA1* gene, including the positions of the primers and the polymorphic site, is shown in fig. 1.

During optimization of the PCR amplification conditions, several melting temperatures were evaluated. The calculated melting temperatures of the forward and reverse primers were 65.7 °C and 66.7 °C, respectively. Previous studies recommended melting temperatures of 62 °C [19] and 60 °C [24]. In the present study, an melting temperature of 60 °C was found to provide optimal amplification efficiency and specificity. The final PCR cycling program is presented in table 2.

The observed sizes of the PCR products and restriction fragments were consistent with the expected fragment lengths, as confirmed by electrophoretic analysis (fig. 2).

The results of the population genetic analysis based on genotyping of Ukrainian Large White pigs are summarized in Table 3. In total, 3 animals with the CC genotype, 15 animals with the TT genotype, and 12 animals with the heterozygous CT genotype were identified. Accordingly, the observed genotype frequencies were 0.10 for CC homozygotes, 0.50 for TT homozygotes, and 0.40 for CT heterozygotes. The calculated allele frequencies were 0.30 for the C allele and 0.70 for the T allele.

The expected heterozygosity slightly exceeded the observed heterozygosity (0.42 *versus* 0.40), indicating a near-equilibrium population structure for this locus. No statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was detected according to the  $\chi^2$  test ( $\chi^2 = 0.068$ ,  $P=0.794$ ). The PIC value was 0.3318, which is considered relatively high for a biallelic locus and suggests that this polymorphism is informative and potentially suitable for use in directional selection within the Ukrainian Large White pig population.



**Fig. 2.** Electropherograms of the *HMGA1* gene amplicon (a) and *NaeI* restriction fragments (b)

*Note.* 1, 2 — amplicon (722 bp); 4, 7, 8, and 10 — CT genotypes (722 bp and 595 bp); 3, 5, 6, 9, and 11 — genotypes TT (722 bp), M — pBR322/*MspI* molecular weight marker.

Comparison of the obtained results with previously published data demonstrates substantial variability in allele and genotype frequencies of the *HMGA1* polymorphism among pig breeds and populations. In the study by Kim et al. [19], nearly equal frequencies of CC and TT homozygotes were reported in the Large White breed, with a predominance of heterozygous CT animals. In contrast, a higher frequency of TT homozygotes was observed in Landrace and Duroc pigs. Conversely, in a later study by Kim et al. [18], the Duroc population exhibited an opposite pattern, with genotype frequencies of 0.43, 0.45, and 0.12 for CC, CT, and TT genotypes, respectively, indicating a predominance of CC homozygotes over TT homozygotes.

These discrepancies confirm that the distribution of *HMGA1* alleles and genotypes may vary considerably not only between breeds but also among populations within the same breed, reflecting differences in breeding history, selection pressure, and genetic background. Importantly, Kim et al. [19] demonstrated that in Landrace and Large White pigs, carriers of the C allele exhibited increased backfat thickness, with the highest values observed in CC homozygotes; the differences between genotypes were statistically significant ( $P < 0.05$ ). In the present study, the frequency of the minor C allele was 0.30, indicating that animals carrying the potentially favorable genotype were relatively less common. Nevertheless, this minor allele frequency provides sufficient genetic variation to enable effective directional selection, allowing for an increase in the frequency of the target allele over successive generations.

The present study provided a detailed characterization of a previously described intronic polymorphism of the *HMGA1* gene in the Ukrainian Large White pig population. Using *in silico* analysis of the Sscrofa11.1 reference

genome, the exact genomic localization of the amplified fragment and the polymorphic site was defined, and the variant was identified as rs80981303 (c.220-170C>T) according to Ensembl and European Variation Archive nomenclature. Refinement of the amplicon length and restriction fragment sizes allowed for a precise interpretation of PCR–RFLP genotyping results.

**Table 2.** PCR program used for amplification of the *HMGA1* gene fragment

| Gene         | PCR amplification program |         |                  |
|--------------|---------------------------|---------|------------------|
|              | Temperature, °C           | Time, s | Number of cycles |
| <i>HMGA1</i> | 95°C                      | 120     | 1                |
|              | 95                        | 30      | 31               |
|              | 60                        | 30      |                  |
|              | 68                        | 40      |                  |
|              | 68                        | 300     | 1                |

**Table 3.** Population genetic parameters of Ukrainian Large White pigs based on the rs80981303 (c.220-170C>T) polymorphism in the *HMGA1* gene

|            | Frequencies |          | Ho   | He   | $\chi^2$ | <i>p</i> -value | PIC    |
|------------|-------------|----------|------|------|----------|-----------------|--------|
|            | Observed    | Expected |      |      |          |                 |        |
| Alleles:   |             |          |      |      |          |                 |        |
| C          | 0.30        |          |      |      |          |                 |        |
| T          | 0.70        |          |      |      |          |                 |        |
| Genotypes: |             |          | 0.40 | 0.42 | 0.068    | 0.794           | 0.3318 |
| CC (n=3)   | 0.10        | 0.09     |      |      |          |                 |        |
| CT (n=12)  | 0.40        | 0.42     |      |      |          |                 |        |
| TT (n=15)  | 0.50        | 0.49     |      |      |          |                 |        |

*Note.* Ho — observed heterozygosity, He — expected heterozygosity.



Population genetic analysis revealed that the studied locus is polymorphic in Ukrainian Large White pigs, with allele frequencies of 0.30 for the C allele and 0.70 for the T allele. The genotype distribution did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium. The PIC value equal to 0.3318 demonstrates that the rs80981303 polymorphism is sufficiently informative and suitable for use in genetic studies and breeding applications.

Further studies should focus on evaluating the population genetic characteristics of this *HMGA1* gene polymorphism in larger and samples, as well as on its combined analysis with other polymorphisms within *HMGA1* and additional candidate genes. Moreover, association studies are necessary to assess the relationships between this polymorphism and economically important productive traits in Ukrainian pig breeds. Such investigations will be essential to substantiate the practical applicability of *HMGA1* as a molecular marker for implementation in marker-assisted selection programs in pig breeding.

## References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Balatsky VN, Saienko AM, Pena RN, Buslyk TV, Gibolenko OS. Genetic diversity of pig breeds on ten production quantitative traits loci. *Cytol Genet.* 2015; 49 (5): 299–307. DOI: 10.3103/S0095452715050023.
- Cezard T, Cunningham F, Hunt SE, Koylass B, Kumar N, Saunders G, Shen A, Silva AF, Tsukanov K, Venkataraman S, Flicek P, Parkinson H, Keane TM. The European Variation Archive: A FAIR resource of genomic variation for all species. *Nucl Acids Res.* 2022; 50 (D1): D1216–D1220. DOI: 10.1093/nar/gkab960.
- Chiefari E, Foti DP, Sgarra R, Pegoraro S, Arcidiacono B, Brunetti FS, Greco M, Manfioletti G, Brunetti A. Transcriptional regulation of glucose metabolism: The emerging role of the *HMGA1* chromatin factor. *Front Endocrinol.* 2018; 9: 357. DOI: 10.3389/fendo.2018.00357.
- Dai S, Long Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. In: Batley J (ed). *Plant Genotyping. Methods and Protocols.* Humana New York, 2015: 91–99. DOI: 10.1007/978-1-4939-1966-6\_7.
- Ding R, Zhuang Z, Qiu Y, Ruan D, Wu J, Ye J, Cao L, Zhou S, Zheng E, Huang W, Wu Z, Yang J. Identify known and novel candidate genes associated with backfat thickness in Duroc pigs by large-scale genome-wide association analysis. *J Anim Sci.* 2022; 100 (2): skac012. DOI: 10.1093/jas/skac012.
- Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP, Becker A, Bennett R, Beracochea M, Berry A, Bhai J, Bhurji SK, Boddu S, Branco Lins PR, Brooks L, Ramaraju SB, Campbell LI, Martinez MC, Charkhchi M, Cortes LA, Davidson C, Denni S, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui B, El Naboulsi T, Falola O, Fatima R, Genev T, Martinez JG, Gurbich T, Hardy M, Hollis Z, Hunt T, Kay M, Kaykala V, Lemos D, Lodha D, Mathlouthi N, Merino GA, Merritt R, Mirabueno LP, Mushtaq A, Hossain SN, Pérez-Silva JG, Perry M, Piližota I, Poppleton D, Prosovetskaia I, Raj S, Salam AIA, Saraf S, Saraiva-Agostinho N, Sinha S, Sipos B, Sitnik V, Steed E, Suner MM, Surapaneni L, Sutinen K, Tricoli FF, Tsang I, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Willhoft NL, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Chakiachvili M, Cheema J, da Rocha JB, De Silva NH, Giorgetti S, Haggerty L, Ilsey GR, Keatley J, Loveland JE, Moore B, Mudge JM, Naa-mati G, Tate J, Trevanion SJ, Winterbottom A, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Finn RD, Freeberg MA, Harrison PW, Martin FJ, Yates AD. Ensembl 2025. *Nucl Acids Res.* 2025; 53 (D1): D948–D957. DOI: 10.1093/nar/gkae1071.
- Federico A, Forzati F, Esposito F, Arra C, Palma G, Barbieri A, Palmieri D, Fedele M, Pierantoni GM, De Martino I, Fusco A. *Hmga1/Hmga2* double knock-out mice display a “superpygmy” phenotype. *Biol Open.* 2014; 3 (5): 372–378. DOI: 10.1242/bio.20146759.
- Fu M, Zhou X, Liu Z, Wang T, Liu B. Genome-wide association study reveals a genomic region on SSC7 simultaneously associated with backfat thickness, skin thickness and carcass length in a Large White × Tongcheng advanced generation intercross resource population. *Anim Genet.* 2023; 54 (2): 216–219. DOI: 10.1111/age.13285.
- Gong H, Xiao S, Li W, Huang T, Huang X, Yan G, Huang Y, Qiu H, Jiang K, Wang X, Zhang H, Tang J, Li L, Li Y, Wang C, Qiao C, Ren J, Huang L, Yang B. Unravelling the genetic loci for growth and carcass traits in Chinese Bamaxiang pigs based on a 1.4 million SNP array. *J Anim Breed Genet.* 2019; 136 (1): 3–14. DOI: 10.1111/jbg.12365.
- Gong J, Yue J, Zhao L, Liu Y, Want L, Liu X, Sun J. Tissue expression profiles of *HMGA1* gene in pigs and its association with backfat thickness. *Acta Vet Zootech Sinica.* 2019; 50 (7): 1340–1346. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2019.07.003. (in Chinese)
- Hong J, Kim D, Cho K, Sa S, Choi S, Kim Y, Park J, Schmidt GS, Davis ME, Chung H. Effects of genetic variants for the swine *FABP3*, *HMGA1*, *MC4R*, *IGF2*, and *FABP4* genes on fatty acid composition. *Meat Sci.* 2015; 110: 46–51. DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.06.011.
- Hu ZL, Dracheva S, Jang W, Maglott D, Bastiaansen J, Rothschild MF, Reecy JM. A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mamm Genome.* 2005; 16 (10): 792–800. DOI: 10.1007/s00335-005-0060-9.
- Hu ZL, Park CA, Reecy JM. Bringing the Animal QTLdb and CorrdB into the future: Meeting new challenges and providing updated services. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50 (D1): D956–D961. DOI: 10.1093/nar/gkab1116.
- Iritano S, Chiefari E, Ventura V, Arcidiacono B, Possidente K, Nocera A, Nevolo MT, Fedele M, Greco A, Greco M, Brunetti G, Fusco A, Foti D, Brunetti A. The *HMGA1*-*IGF-I*/*IGFBP* system: A novel pathway for modulating glucose uptake. *Mol Endocrinol.* 2012; 26 (9): 1578–1589. DOI: 10.1210/me.2011-1379.
- Ji J, Yan G, Chen D, Xiao S, Gao J, Zhang Z. An association study using imputed whole-genome sequence data identifies novel significant loci for growth-related traits in a Duroc × Erhualian F<sub>2</sub> population. *J Anim Breed Genet.* 2019; 136 (3): 217–228. DOI: 10.1111/jbg.12389.
- Kerstens HH, Kollers S, Kommadath A, Del Rosario M, Dibbitts B, Kinders SM, Crooijmans RP, Groenen MA. Mining for single nucleotide polymorphisms in pig genome sequence data. *BMC Genom.* 2009; 10: 4. DOI: 10.1186/1471-2164-10-4.
- Kim KS, Lee JJ, Shin HY, Choi BH, Lee CK, Kim JJ, Cho BW, Kim TH. Association of melanocortin 4 receptor (*MC4R*) and high mobility group AT-hook 1 (*HMGA1*) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. *Anim Genet.* 2006; 37 (4): 419–421. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2006.01482.x.
- Kim KS, Thomsen H, Bastiaansen J, Nguyen NT, Dekkers JCM, Plastow GS, Rothschild MF. Investigation of obesity candidate genes on porcine fat deposition quantitative trait loci regions. *Obes Res.* 2004; 12 (12): 1981–1994. DOI: 10.1038/oby.2004.249.
- Li J, Wu J, Jian Y, Zhuang Z, Qiu Y, Huang R, Lu P, Guan X, Huang X, Li S, Min L, Ye Y. Genome-wide association studies revealed significant QTLs and candidate genes associated with backfat and loin muscle area in pigs using imputation-based whole genome sequencing data. *Animals.* 2022; 12 (21): 2911. DOI: 10.3390/ani12212911.



21. Li M, Pu L, MacHugh DE, Tian J, Wang X, Zhao Q, Shi L, Gao H, Yu Y, Wang L, Zhao F. Genome-wide association studies of novel resilience traits identify important immune QTL regions and candidate genes in Duroc pigs. *J Integr Agric.* 2025; 24 (11): 4355–4369. DOI: 10.1016/j.jia.2024.04.017.
22. Liu H, Song H, Jiang Y, Zhang Y, Zhang F, Liu Y, Shi Y, Ding X, Wang C. A single-step genome wide association study on body size traits using imputation-based whole-genome sequence data in Yorkshire pigs. *Front Genet.* 2021; 12: 629049. DOI: 10.3389/fgene.2021.629049.
23. Liu X, Wang L, Liang J, Yan H, Zhao K, Li N, Zhang LC, Wang L. Genome-wide association study for certain carcass traits and organ weights in a Large White×Minzhu intercross porcine population. *J Integr Agric.* 2014; 13 (12): 2721–2730. DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60787-5.
24. Makgahlela M, Fan B, Du ZQ, Rothschild M. Investigation of effects of three candidate genes on leg action and fat deposition traits in pigs. *S Afr J Anim Sci.* 2009; 39 (2): 127–130. DOI: 10.4314/sajas.v39i2.44386.
25. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes.* 2006; 6 (1): 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
26. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. *Bioinformatics.* 2012; 28 (19): 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
27. Qiao R, Gao J, Zhang Z, Li L, Xie X, Fan Y, Cui L, Ma J, Ai H, Ren J, Huang L. Genome-wide association analyses reveal significant loci and strong candidate genes for growth and fatness traits in two pig populations. *Genet Sel Evol.* 2015; 47 (1): 17. DOI: 10.1186/s12711-015-0089-5.
28. Walsh PS, Metzger DA, Higushi R. *Chelex 100* as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 2013; 54 (3): 134–139. DOI: 10.2144/000114018.
29. Wang H, Wang X, Li M, Sun H, Chen Q, Yan D, Dong X, Pan Y, Lu S. Genome-wide association study of growth traits in a four-way crossbred pig population. *Genes.* 2022; 13 (11): 1990. DOI: 10.3390/genes13111990.
30. Wang L, Zhang J, Xia M, Liu C, Zu X, Zhong J. High Mobility Group A1 (*HMGA1*): Structure, biological function, and therapeutic potential. *Int J Biol Sci.* 2022; 18 (11): 4414–4431. DOI: 10.7150/ijbs.72952.
31. Wang L, Zhang L, Yan H, Liu X, Li N, Liang J, Pu L, Zhang Y, Shi H, Zhao K, Wang L. Genome-wide association studies identify the loci for 5 exterior traits in a Large White × Minzhu pig population. *PLoS One.* 2014; 9 (8): e103766. DOI: 10.1371/journal.pone.0103766.
32. Warr A, Affara N, Aken B, Beiki H, Bickhart DM, Billis K, Chow W, Eory L, Finlayson HA, Flicke P, Girón CG, Griffin DK, Hall R, Hannum G, Hourlier T, Howe K, Hume DA, Izuogu O, Kim K, Koren S, Liu H, Manchanda N, Martin FJ, Nonneman DJ, O'Connor RE, Phillippy AM, Rohrer GA, Rosen BD, Rund LA, Sargent CA, Schook LB, Schroeder SG, Schwartz AS, Skinner BM, Talbot R, Tseng E, Tuggle CK, Watson M, Smith TPL, Archibald AL. An improved pig reference genome sequence to enable pig genetics and genomics research. *Gigascience.* 2020; 9 (6): gja051. DOI: 10.1093/gigascience/gjaa051.
33. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): General methods. In: Henry RJ, Furtado A (eds). *Cereal Genom. Methods and Protocols.* Humana Totowa, 2014: 65–75. DOI: 10.1007/978-1-62703-715-0\_7.
34. Xie L, Qin J, Rao L, Cui D, Tang X, Chen L, Xiao S, Zhang Z, Huang L. Genetic dissection and genomic prediction for pork cuts and carcass morphology traits in pig. *J Anim Sci Biotechnol.* 2023; 14 (1): 116. DOI: 10.1186/s40104-023-00914-4.
35. Zhang LC, Li N, Liu X, Liang J, Yan H, Zhao KB, Pu L, Shi HB, Zhang YB, Wang LG, Wang LX. A genome-wide association study of limb bone length using a Large White × Minzhu intercross population. *Genet Sel Evol.* 2014; 46 (1): 56. DOI: 10.1186/s12711-014-0056-6.

## Генотипування свиней української великої білої породи за інтронним поліморфізмом гена *HMGA1*

В. Теняєв<sup>1</sup>, А. Саєнко<sup>1</sup>, М. Пека<sup>1,2</sup>, О. Церенюк<sup>1</sup>  
saenko\_artem@meta.ua

<sup>1</sup>Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України, вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

Ген *HMGA1* (High Mobility Group AT-hook 1) вважається локусом-кандидатом для ознак, пов'язаних із ростом і вгодованістю у свиней, завдяки його участі в регуляції транскрипції та енергетичному метаболізмі та його локалізації в області на локусу кількісних ознак (QTL) на хромосомі 7 *Sus scrofa*. Метою цього дослідження було охарактеризувати раніше описаний інтронний поліморфізм гена *HMGA1* в українській популяції великої білої породи свиней та оцінити його популяційно-генетичні параметри для можливого застосування в маркер-асоційованій селекції. Аналіз *in silico* на основі референтного генома *Sscrofa*11.1 був проведений для визначення геномної локалізації ампліфікованого фрагмента, опису поліморфізму відповідно до номенклатури Ensembl та ідентифікації його rsID в European Variation Archive. Генотипування 30 свиней української великої білої породи проводили методом полімеразної ланцюгової реакції–поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР–ПДРФ) з ендонуклеазою рестрикції *NaeI*. Поліморфний сайт був локалізований у позиції 7:30,326,531 та ідентифікований як rs80981303 (с.220-170C>T). Популяційний аналіз виявив частоти генотипів 0,10 (CC), 0,40 (CT) і 0,50 (TT), з частотами алелів C — 0,30 і T — 0,70. Розподіл генотипів не відхилявся від рівноваги Харді–Вайнберга ( $\chi^2 = 0,068$ ,  $P = 0,794$ ). Значення інформаційного змісту поліморфізму ( $PI = 0,3318$ ) вказувало на достатню інформативність локусу. Отримані результати підтверджують поліморфність гена *HMGA1* у свиней української великої білої породи та підтверджують потенційну корисність rs80981303 як генетичного маркера. Подальші дослідження асоціації з продуктивними ознаками можуть обґрунтувати його практичне застосування в програмах розведення свиней.

**Ключові слова:** ген *HMGA1*, свиня, українська велика біла порода, інтронний поліморфізм, ПЛР–ПДРФ, популяційна генетика, маркер-асоційована селекція



## Динаміка вмісту мікроелементів у молочці маточному бджолиному різних порід (підвидів) медоносних бджіл залежно від місяця його відбору

П. Й. Воробець

pvorobets86@gmail.com



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

### ORCID:

none.

### Authors' Contributions:

VPY: Project administration; Conceptualization; Methodology; Formal analysis; Visualization; Writing — original draft, review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

Not applicable.

### Acknowledgements:

The author expresses his sincere gratitude to the employees of the Institute: Halyna Denys for technical support in the determination of trace elements, Nadiya Kupynyak for assistance in working on the manuscript, and Vasyi Kaplinsky for valuable advice and consultations.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Молочко маточне бджолине є унікальним продуктом робочих бджіл, а саме секретом їхніх глоткових і верхньощелепних залоз. Це основне джерело поживних і біологічно активних речовин для личинок і маток. До складу молочка маточного бджолиного входить широкий спектр макро- і мікроелементів, які відіграють ключову роль у розвитку бджолиної сім'ї, регуляції обміну речовин. Молочко маточне бджолине є перспективним для застосування у медицині, фармацевтиці, косметології тощо. Порівняльне вивчення мінерального складу маточного молочка, отриманого від різних порід бджіл та в різні періоди року є важливим для розуміння біохімічних механізмів його секреції й оптимізації технологічних умов отримання цього продукту з максимально високою біологічною цінністю. Метою роботи було порівняти зміни вмісту міді (Cu), мангану (Mn), цинку (Zn), кобальту (Co) й нікелю (Ni) у молочці маточному бджолиному, отриманому в різний час, а саме: у травні, червні й липні від медоносних бджіл чотирьох порід (підвидів) — карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*), крайньської бджоли (*Apis mellifera carnica*), італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) та української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*). У результаті дослідження встановлено варіабельність змін вмісту мікроелементів у молочці маточному бджолиному досліджуваних порід (підвидів) бджіл залежно від періоду його отримання.

**Ключові слова:** молочко маточне бджолине, мікроелементи, *Apis mellifera carpatica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera sossimai*

### Вступ

Мінеральний склад молочка маточного бджолиного (ММБ) представлений широким спектром макро- й мікроелементів, які мають важливе біологічне значення для розвитку личинок бджіл. Мінеральні речовини свіжого молочка маточного бджолиного становлять 0,8–3 % та 2–5 % сухого [5, 10]. У ММБ містяться такі мінерали, як  $K^+$ ,  $P^{3-}$ ,  $S^{2-}$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$  і  $Mn^{2+}$ , а також мікроелементи: Ni, Cr, Sn, W, Sb, Bi та Ti [4, 7]. Основним елементом ММБ є калій (K) —

приблизно 290 мг/100 г (діапазон 246–320 мг/100 г), менше міститься фосфору (P) — 210 мг/100 г (194–235 мг/100 г), магнію (Mg) — 28 мг/100 г (27–31 мг/100 г), кальцію (Ca) — 14–20 мг/100 г, натрію (Na) — 4 мг/100 г (3–14 мг/100 г), сірки (S) — 115–140 мг/100 г [2, 3, 6, 7]. З мікроелементів, які містяться у ММБ, відомо про наявність цинку (Zn) — 2,3 мг/100 г (2,0–2,6 мг/10 г), заліза (Fe) — 1,2–2,0 мг/100 г, міді (Cu):  $\approx 0,5$  мг/100 г (0,3–0,5 мг/100 г; до 6 мг/100 г у деяких зразках), марганцю (Mn):  $\approx 0,1$  мг/100 г (0,01–0,1 мг/100 г) [3, 7, 12]. Також ММБ містить сліди алюмінію (Al), барію (Ba),

стронцію (Sr), кадмію (Cd), свинцю (Pb), молібдену (Mo), нікелю (Ni), хрому (Cr), ванадію (V), титану (Ti) в дуже низьких концентраціях, що залежить від екологічних умов утримання бджолиних сімей [3, 7, 12]. Усі перераховані вище мінеральні елементи є каталізаторами численних біохімічних реакцій, сприяють синтезу білків, антиоксидантному захисту, регуляції імунної відповіді, розвитку і функціонуванню нервової системи тощо. Вміст мінеральних речовин у ММБ може варіювати залежно від низки факторів, зокрема породи бджіл, сезонних коливань, місцевості та особливостей харчової бази. Порівняльне вивчення мінерального складу ММБ різних порід у різні періоди року є важливим для розуміння біохімічних механізмів його формування, оптимізації умов отримання цього продукту з високою біологічною цінністю.

Мета роботи — порівняти зміни вмісту основних мікроелементів, а саме заліза, мангану, цинку, кобальту й нікелю у ММБ отриманому в травні, червні та липні від медоносних бджіл чотирьох порід (підвидів): карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*), крайньої бджоли (*Apis mellifera carnica*), італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) та української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*). Враховуючи відмінності у фізіологічних характеристиках різних порід бджіл, дослідження сезонної динаміки вмісту мікроелементів дозволяє визначити оптимальні періоди збору та виокремити породи (підвиди) бджіл з максимально високим біологічним потенціалом.

Щоб мінімізувати вплив зовнішніх чинників на кількісний склад елементів досліджуваного ММБ, експериментальні бджолині сім'ї утримували в стандартизованих умовах. Усі породи було розміщено в однаковому середовищі — вулики перебували на одній пасіці, на однаковій висоті, з однаковим рівнем інсоляції, вологості й температурного режиму. Бджоли мали ідентичну харчову базу, яка формувалася з природного медоносного різнотрав'я без використання додаткових підгодівель. Усі процедури догляду за бджолами було уніфіковано та їх проводили одночасно для кожної групи. Такий підхід дозволив виключити або принаймні максимально знизити вплив середовищних і технологічних факторів, зосереджуючи увагу на внутрішньому, генетично зумовленому варіюванні фізіолого-біохімічних процесів комах.

## Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведено у ММБ бджіл чотирьох порід (підвидів): карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*), крайньої бджоли (*Apis mellifera carnica*), італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) та української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*). Щоб забезпечити рівні умови для всіх порід бджіл, було сформовано чотири групи однакових за силою бджолосімей, а для їх утримання й розвитку бджіл забезпечено достатньою кількістю медових і пергових рамок. Добір

бджолиних сімей для досліджень здійснено методом аналогів за рухливістю, життєздатністю, кількістю розплоду та кормів. Піддослідні бджолині колонії розміщено у віддаленій частині основної пасіки, льотками у різні боки, щоб унеможливити так звані напади інших бджіл, та для їх профілактики — блокування. У період без взятки всі сім'ї отримували ідентичну стимулювальну підгодівлю цукровим сиропом. Фізіологічний розвиток бджіл-годувальниць також був однаковий. Маточне молочко отримували впродовж трьох місяців (травень—липень) 2025 року. Відбір ММБ здійснювали, дотримуючись усіх правил септики й асептики.

У дослідженні використовували багатокорпусну систему утримання бджіл у вуликах. Створювали сім'ї-вихователки з частковим осиротінням та утримували їх через роздільну решітку. У таких сім'ях у нижньому корпусі — розпліднику, вільно працювала бджолина матка, а у верхньому корпусі, відокремленому від нижнього роздільною решіткою, розміщували рамку з личинками, переміщеними після відбору ММБ. Оптимального результату з отримання ММБ на пасіці досягали, застосовуючи двоматочне утримання. Це уможливило використовувати фізіологічну потужність одразу двох маток, значно швидше наростити активні бджолині сім'ї та в більш ранні терміни розпочати роботу з відбору ММБ. Також двоматочне утримання дало можливість продовжити період відбору ММБ.

Технологічний процес отримання ММБ розпочинали з перенесення личинок мінімального віку у штучні мисочки, які розміщували в сім'ях-вихователках, та залишали на 72 години, відтак прививочні рамки з личинками переміщували в лабораторію, де у стерильних умовах відбирали ММБ. Спочатку, використовуючи скальпель, зрізали воскові надбудови над спеціальними штучними мисочками, щоб мати змогу дістатися до личинок, які плавають у маточному молочці. Спеціальним шпателем вилучали личинки, а після цього за допомогою м'якої силіконової ложечки проводили відбір ММБ у скляні пробірки. Згодом відповідну кількість переносили у пластикові мікропробірки типу Еппендорф місткістю 2,0 мл та заморожували при температурі  $-21^{\circ}\text{C}$ .

Визначення вмісту мікроелементів проводили методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії, використовуючи прилад СЕЛМІ-115 (Україна).

Статистичний аналіз одержаних результатів досліджень проводили за використання принципів варіаційної статистики та пакета прикладних програм *Microsoft Excel* і *Statistica* з урахуванням *t*-критерію достовірності Стюдента. Різниці між середніми арифметичними значеннями вважали вірогідними за: \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ ; \*\*\* —  $P < 0,001$  [9].

## Результати і їх обговорення

Попри численні дослідження біохімічного складу продуктів бджільництва, у доступній літературі немає



детальної кількісної інформації щодо вмісту мікроелементів у маточному молочці бджолиному, отриманому від різних порід медоносних бджіл. Наявні публікації свідчать, що один з ключових екзогенних чинників, здатних впливати на мінеральний профіль маточного молочка — це харчовий раціон, а також тип підгодовів бджіл. Зокрема, вживання меду або сахарози як джерела вуглеводів спричиняє зміни в концентраціях таких елементів, як калій (K), магній (Mg), ферум (Fe), марганець (Mn) і фосфор (P). Мікроелементи, хоча й містяться у невеликих кількостях, виконують низку критично важливих функцій. Так, цинк (Zn) необхідний для проліферації клітин, регенерації тканин і забезпечення антиоксидантного захисту; залізо (Fe) бере участь у транспортуванні кисню й біосинтезі гемопroteinів; мідь (Cu) — у формуванні сполучної тканини і функціонуванні антиоксидантних ферментів; марганець (Mn) — у метаболізмі амінокислот; хром (Cr) — у регуляції вуглеводного обміну.

Мінеральний склад ММБ є варіабельним, а коливання концентрацій окремих елементів може сягати від 10 до 30 %. На цю мінливість впливають такі чинники, як географічне розташування пасік, кліматичні умови, а також екологічні особливості регіону (наприклад, гірська чи прибережна зона). Найвища концентрація мікроелементів спостерігається в ММБ, зібраному на другий день після перенесення личинок, тобто у так званому дводенному маточному молочці — саме в цей період інтенсивно відбуваються процеси живлення й формування майбутньої матки.

**Порівняльний аналіз вмісту купруму (міді)** в ММБ бджіл чотирьох порід (*підвидів*) — карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*), країнської бджоли (*Apis mellifera carnica*), італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) та української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*). Мідь є життєво важливим мікроелементом, що бере участь у формуванні антиоксидантного захисту, активності ферментів і підтримці нормальної роботи залоз бджіл, які синтезують маточне молочко. В підсумку проведених досліджень ми встановили, що в маточному молочці, отриманому у травні, найвищий вміст купруму був у досліджуваних зразках маточного молочка української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*) — 4,48 мг/кг, що достовірно перевищував показники італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) (3,57 мг/кг,  $P < 0,05$ ) та країнської бджоли (*Apis mellifera carnica*) (3,52 мг/кг,  $P < 0,001$ ). У маточному молочці карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) вміст купруму становив 4,08 мг/кг та був достовірно вищий за показники вмісту цього мікроелементу у зразках країнської бджоли (*Apis mellifera carnica*) (3,52 мг/кг,  $P < 0,001$ ). Показники вмісту купруму в маточному молочці, отриманому у травні від бджіл *Apis mellifera ligustica* й *Apis mellifera carnica*, були найнижчими та без достовірної різниці між собою. Однак вміст купруму в маточному молочці, отриманому в червні від досліджуваних підвидів / порід бджіл, відрізнявся від попередніх наших

результатів. У червні найвищий вміст купруму було зафіксовано в ММБ італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*) (4,30 мг/кг), що достовірно перевищує вміст купруму у зразках від бджіл *Apis mellifera carnica* (2,79 мг/кг  $P < 0,001$ ). У ММБ карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) вміст купруму був так само високим, як і в маточному молочці італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*), та становив 4,24 мг/кг, що також достовірно вищий за показники вмісту купруму в маточному молочці бджіл *Apis mellifera carnica* (2,79 мг/кг,  $P < 0,01$ ). Достовірно вищий вміст купруму було зафіксовано у червні в ММБ української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*) — 3,58 мг/кг,  $P < 0,05$ , порівняно з вмістом у зразках маточного молочка від бджіл *Apis mellifera carnica*. Серед досліджуваних зразків ММБ чотирьох порід (підвидів) бджіл, відібраних у червні, найнижчі значення (2,79 мг/кг) вмісту купруму спостерігали в маточному молочці бджіл *Apis mellifera carnica*. У ММБ, отриманому в липні, спостерігали загальну тенденцію до зниження вмісту купруму у всіх досліджуваних порід (підвидів) бджіл. У ММБ *Apis mellifera ligustica* збереглися найвищі показники вмісту купруму — 3,97 мг/кг, достовірно перевищуючи показники вмісту купруму в *Apis mellifera carnica*, які були найнижчими — 1,49 мг/кг ( $P < 0,001$ ). ММБ карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) мало достовірно вищий вміст купруму — 3,36 мг/кг ( $P < 0,05$ ), порівняно з показниками бджіл *Apis mellifera carnica*. Статистично достовірну різницю вмісту купруму встановлено між показниками у зразках ММБ *Apis mellifera ligustica* й *Apis mellifera sossimai*, які мали нижчий вміст купруму, порівняно з *Apis mellifera ligustica*, що становив 2,92 мг/кг ( $P < 0,001$ ).

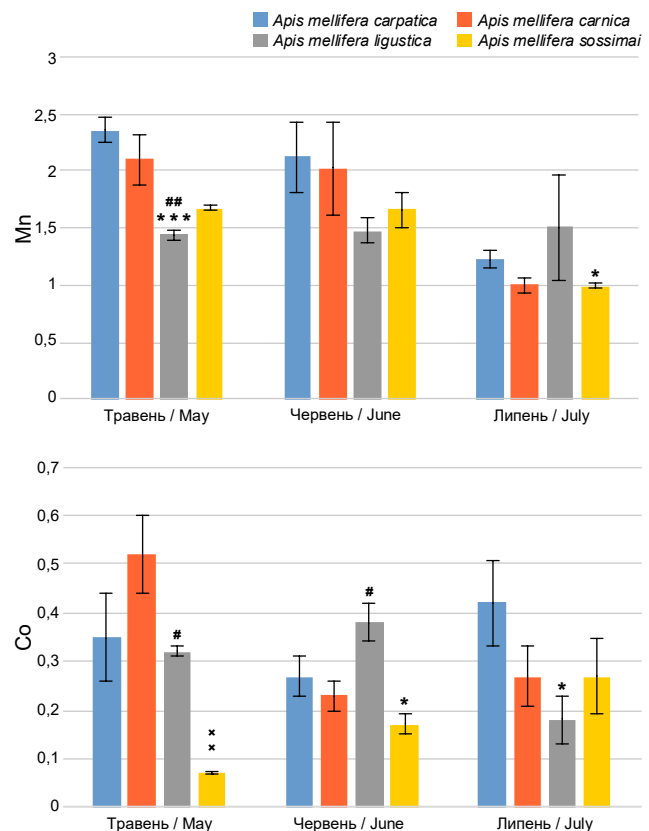
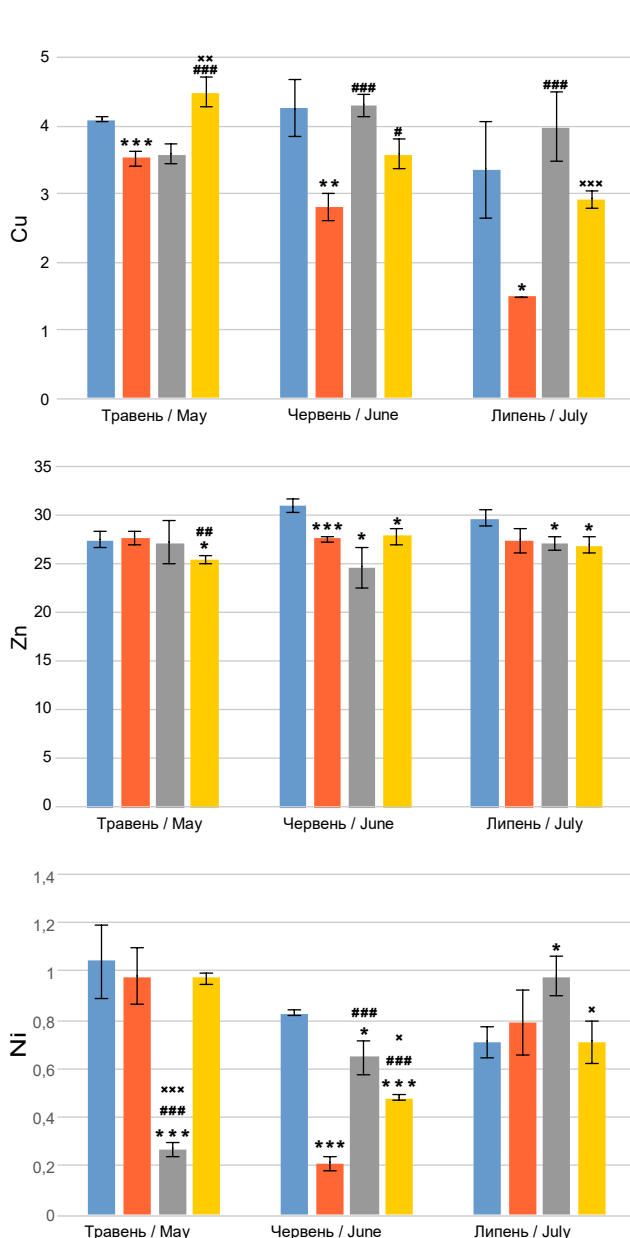
Якщо підсумувати й порівняти отримані результати досліджень вмісту купруму в ММБ, то можна зауважити, що в маточному молочці карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) спостерігали відносно високий вміст кобальту у травні–червні, з помірним його зниженням у липні. Водночас ММБ *Apis mellifera carnica* характеризувалося найнижчим вмістом купруму впродовж травня–червня–липня. Щодо вмісту купруму в ММБ *Apis mellifera ligustica* спостерігали тенденцію до накопичення купруму в період активного сезону (червень–липень), а у бджіл *Apis mellifera ligustica* вищі значення купруму в ММБ на початку сезону — у травні. У літературі немає детальних даних про вміст мінералів у маточному молочці бджіл різних порід, але є цікаві результати дослідження Balkanska, Mladenova et al. [1], які дослідили 30 зразків маточного молочка з Болгарії. Автори вимірювали концентрацію таких мінералів, як Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr, Zn, а також As, Cd, Co, Ni, Pb, і встановили, що вибрані мінерали й мікроелементи виявлено у відносно постійних концентраціях у всіх проаналізованих зразках ММБ, а вміст хімічних елементів не залежить від географічного розташування кормової бази бджіл і залишається стабільним завдяки гомеостатичному регулюванню [7].



### Порівняльний аналіз вмісту мангану (Mn)

в ММБ бджіл різних порід (підвидів) протягом травня, червня й липня. Дослідження показало, що вміст мангану в ММБ бджіл чотирьох досліджуваних порід (підвидів) змінювався залежно від сезону та генотипу комах. Встановлено також статистично достовірні відмінності цих змін. Найвищий вміст мангану спостерігали в ММБ, отриманому у травні від карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) (2,36 мг/кг) і країнської бджоли (*Apis mellifera carnica*) — (2,10 мг/кг). Виявлено достовірно нижчі показники вмісту мангану в ММБ італійської бджоли (*Apis mellifera ligustica*): різниця значень між *Apis mellifera ligustica* й *Apis mellifera carnica* становила  $P < 0,05$ , а між *Apis mellifera ligustica* й *Apis mellifera carpatica* —  $P < 0,001$ . Показник вмісту мангану в ММБ української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*) (1,67 мг/кг) був проміжним, без достовірних відмінностей від інших груп. У ММБ, зібраному в червні, ста-

тистично значущих відмінностей у вмісті мангану між дослідженими породами (підвидами) бджіл не виявлено. Вміст мангану визначено в межах 1,48–2,12 мг/кг, що вказує на відносну стабільність цього елемента у складі ММБ в період активної продуктивності бджіл. У ММБ в липні найвищий вміст мангану було виявлено у бджіл *Apis mellifera carpatica* (1,22 мг/кг), а найнижчий — у бджіл *Apis mellifera sossimai* (0,99 мг/кг). Варто зауважити, що ми дослідили достовірне зниження вмісту мангану в ММБ бджіл *Apis mellifera sossimai*, порівняно зі зразками *Apis mellifera carpatica* ( $P < 0,05$ ). В інших групах достовірної різниці не спостерігалось. Відмінності у вмісті мангану між породами можуть бути зумовлені їхніми генетичними особливостями. Стабільність показників у червні та певне їх зниження в окремих порід у липні вказують на роль адаптивних механізмів, спрямованих на збереження гомеостазу мінералів у продуктах секреторних залоз бджіл.



**Рис.** Зміни вмісту мікроелементів: міді (Cu), мангану (Mn), цинку (Zn), кобальту (Co) й нікелю (Ni) у ММБ, зібраному у травні, червні та липні від бджіл підвидів *Apis mellifera carpatica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera ligustica* й *A. mellifera sossimai*  
Примітка. \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ ; \*\*\* —  $P < 0,001$  — достовірні різниці до *A. mellifera carpatica*; # —  $P < 0,05$ ; ## —  $P < 0,01$ ; ### —  $P < 0,001$  — достовірні різниці до *A. mellifera carnica*; \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  — достовірні різниці до *A. mellifera ligustica*.

**Fig.** Changes in Cu, Mn, Zn, Co and Ni content in royal jelly collected in May, June and July from *Apis mellifera carpatica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera ligustica* and *A. mellifera sossimai*  
Note. \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ ; \*\*\* —  $P < 0,001$  — significant difference to *A. mellifera carpatica*; # —  $P < 0,05$ ; ## —  $P < 0,01$ ; ### —  $P < 0,001$  — significant difference to *A. mellifera carnica*; \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  — significant difference to *A. mellifera ligustica*.

**Вміст цинку в ММБ бджіл різних порід (підвидів) у динаміці весняно-літнього періоду.** У бджіл цинк є незамінним мікроелементом, що бере участь у функціонуванні ферментативних систем, регуляції імунної відповіді та синтезі білків. Встановлено, що вміст цинку в ММБ бджіл чотирьох досліджуваних порід (підвидів) демонструє статистично достовірні зміни, залежно від часу забору зразків і порід (підвидів) бджіл. Найвищий вміст цинку виявлено в ММБ отриманому у травні від бджіл *Apis mellifera carpatica* (27,49 мг/кг) й *Apis mellifera carnica* (27,67 мг/кг). У ММБ української степової бджоли (*Apis mellifera sossimai*) вміст цинку був достовірно нижчим, порівняно з зразками ММБ від карпатської бджоли (*Apis mellifera carpatica*) ( $P < 0,05$ ) та крайньої бджоли (*Apis mellifera carnica*) ( $P < 0,01$ ). У ММБ, отриманому у червні, максимальні показники вмісту цинку зафіксували в *Apis mellifera carpatica* (30,85 мг/кг), що достовірно перевищував вміст цього елемента в ММБ бджіл *Apis mellifera carnica* (27,59 мг/кг;  $P < 0,001$ ), *Apis mellifera ligustica* (24,59 мг/кг;  $P < 0,05$ ) й *Apis mellifera sossimai* (27,84 мг/кг;  $P < 0,05$ ). У ММБ отриманому в липні, спостерігали збереження тенденції з вищих показників вмісту цинку у бджіл *Apis mellifera carpatica* — 29,68 мг/кг, порівняно з *Apis mellifera ligustica* — 26,99 мг/кг і *Apis mellifera sossimai* — 26,90 мг/кг, ( $P < 0,05$ ).

**Вміст кобальту в ММБ бджіл різних порід.** Кобальт є одним з ключових мікроелементів, що бере участь у синтезі вітаміну  $B_{12}$  та регуляції основних біохімічних процесів у бджіл. Сезонна динаміка вмісту кобальту ММБ бджіл чотирьох досліджуваних порід (підвидів) демонструє як міжпородні, так і сезонні коливання цього показника, що має ключове біологічне й практичне значення. Встановлено найвищий вміст кобальту в ММБ отриманому у травні від бджіл *Apis mellifera carnica* — 0,52 мг/кг, що достовірно перевищує значення вмісту кобальту в ММБ бджіл *Apis mellifera ligustica* (0,32 мг/кг) ( $P < 0,05$ ), *Apis mellifera sossimai* (0,07 мг/кг) ( $P < 0,001$ ) та й *Apis mellifera carpatica* (0,35 мг/кг). Найнижчий вміст кобальту спостерігали в *Apis mellifera sossimai* (0,07 мг/кг), що є статистично значущою різницею як відносно показників *Apis mellifera ligustica* ( $P < 0,001$ ), так і *Apis mellifera carnica* ( $P < 0,001$ ), а також *Apis mellifera carpatica* ( $P < 0,01$ ). Такий низький рівень кобальту в ММБ *Apis mellifera sossimai* у травні може бути пов'язаний з особливостями породи та специфікою адаптації до кліматичних умов. У червні спостерігали зниження загального вмісту кобальту в ММБ майже всіх порід, окрім *Apis mellifera ligustica*, де вміст кобальту підвищився до 0,38 мг/кг, що достовірно перевищує показники *Apis mellifera carnica* (0,23 мг/кг) ( $P < 0,05$ ). Водночас у *Apis mellifera sossimai* вміст кобальту в ММБ становив 0,17 мг/кг, що суттєво менше, порівняно зі зразками ММБ у бджіл *Apis mellifera carpatica* (0,27 мг/кг) ( $P < 0,05$ ). Такий характер змін свідчить про сильний вплив сезонного чинника та можливу зміну складу пилкової бази. У липні в маточному молочці бджіл *Apis mellifera carpatica* вміст кобальту підвищився до 0,42 мг/кг, а в *Apis mellifera ligustica*, на-

впаки, зменшився до 0,18 мг/кг, що демонструє достовірну різницю між показниками в цих порід ( $P < 0,05$ ). Отримані результати досліджень маточного молочка, зібраного в липні, характеризуються поступовою стабілізацією мінерального складу, проте відмінності між породами залишаються суттєвими.

**Нікель** є одним з мікроелементів, який може надходити до організму бджіл з кормових ресурсів, а його вміст у ММБ часто розглядають як маркер мінерального обміну й екологічного стану території. Результати нашого дослідження показують виражену варіабельність вмісту нікелю в ММБ отриманому від бджіл чотирьох досліджуваних порід (підвидів). У травні максимальний вміст нікелю був у зразках ММБ бджіл *Apis mellifera carpatica* (1,04 мг/кг), *Apis mellifera carnica* (0,98 мг/кг) та *Apis mellifera sossimai* (0,97 мг/кг). Водночас у ММБ бджіл *Apis mellifera ligustica* вміст нікелю був значно нижчим — 0,27 мг/кг, що було достовірно відмінним від показників бджіл інших порід ( $P < 0,001$ ). Отримані результати можуть свідчити про знижені потреби в накопиченні цього елемента у бджіл *Apis mellifera ligustica*. В отриманому у червні ММБ відзначено суттєве зниження вмісту нікелю в *Apis mellifera carnica* (0,21 мг/кг), що достовірно відрізнялося як від показників *Apis mellifera carpatica* (0,83 мг/кг;  $P < 0,001$ ), так і від *Apis mellifera ligustica* (0,65 мг/кг;  $P < 0,001$ ) й *Apis mellifera sossimai* (0,48 мг/кг;  $P < 0,001$ ). Показники *Apis mellifera carpatica* достовірно перевищували дані *Apis mellifera ligustica* ( $P < 0,05$ ) й *Apis mellifera sossimai* ( $P < 0,001$ ). Водночас встановлено вірогідну різницю між цими породами (підвидами) ( $P < 0,05$ ). У ММБ, отриманому в липні, вміст нікелю вирівнюється для більшості порід (підвидів), проте в ММБ бджіл *Apis mellifera ligustica* він становив 0,98 мг/кг і достовірно перевищував показники *Apis mellifera carpatica* (0,71 мг/кг;  $P < 0,05$ ), що може свідчити про компенсаторне накопичення мінералу на тлі теплового стресу. З іншого боку, в ММБ бджіл *Apis mellifera sossimai* вміст нікелю (0,71 мг/кг) достовірно нижчий, ніж у ММБ бджіл *Apis mellifera ligustica* ( $P < 0,05$ ).

Під час проведеного дослідження виявлено як міжпородні, так і сезонні відмінності у вмісті окремих мікроелементів у ММБ бджіл чотирьох досліджуваних порід (підвидів), що свідчить про складний характер регуляції мінерального складу цього біологічно активного продукту. Виявлені відмінності, ймовірно, зумовлені як генетичними особливостями окремих порід (підвидів) бджіл, так і змінами у біоритмах, пов'язаними із сезонними змінами кліматичних факторів, флористичним складом нектароносів і доступністю мікроелементів у харчовій базі впродовж вегетаційного періоду. Оскільки всі дослідні групи утримували в однакових умовах, на однаковій харчовій базі та за єдиного протоколу відбору маточного молочка, виявлені в мінеральному складі міжпородні відмінності можна пояснити генетичними особливостями порід. Карпатська бджола (*Apis mellifera carpatica*) — аборигенна порода, адаптована до гірських умов українських Карпат. Для цієї породи характерна здатність ефективно використовувати короткотривалі медозбори

з гірських рослин. Її генетичний фонд сформований під впливом прохолодного клімату й обмеженого спектра нектароносів, що могло вплинути на метаболічні шляхи синтезу й транспорту мікроелементів у маточне молочко. Аналізуючи дані наших досліджень, бачимо, що вміст мікроелементів у МБМ від бджіл цієї породи (підвиду) зазвичай є найвищим, і це варто взяти до уваги під час вибору порід для утримання. Бджоли країнської породи (*Apis mellifera carnica*) відомі своєю високою продуктивністю, доброю зимостійкістю й раннім розвитком бджолиних сімей. Генетично ця порода характеризується активним білковим метаболізмом, що може зумовлювати більшу потребу в таких мікроелементах, як цинк, мідь — ключових для синтезу білків, ферментів і гормонів, зокрема під час живлення маточника. Італійська бджола (*Apis mellifera ligustica*), яка демонструє високий рівень продуктивності в умовах довгого теплого сезону, має тривалий період яйцекладки матки і схильність до утворення великих сімей. Порівняно з іншими породами (підвидами), її метаболізм орієнтований на високі темпи синтезу біологічно активних речовин, що може впливати на потребу в фосфорі, магнії, калії та кальції для забезпечення розвитку личинок. Ми дослідили, що в маточному молочці бджіл італійської породи (*Apis mellifera ligustica*) є досить високий вміст натрію, міді й кальцію. Українська степова бджола (*Apis mellifera sossimai*) характеризується помірним розвитком бджолиних сімей, доброю виживаністю в умовах обмежених ресурсів і підвищеною стійкістю до кліматичних стресів. Ймовірно, ці адаптації супроводжуються специфічними особливостями в обміні мінералів, пов'язаними з економним використанням ресурсів та ефективним збереженням макро- і мікроелементів у біологічних рідинах, включно з маточним молочком.

Отже, відмінності у вмісті таких елементів, як цинк, мідь тощо, можуть бути результатом не лише зовнішніх сезонних впливів, але й глибших внутрішньовидових механізмів, що базуються на генетично детермінованих особливостях метаболізму, поведінкових рисах, а також тривалості й інтенсивності періоду годування

личинок. Подальші дослідження із залученням генетичного аналізу можуть поглибити розуміння причин виявленої варіабельності.

## Джерела

1. Balkanska R, Mladenova E, Karadjova I. Quantification of selected trace and mineral elements in royal jelly from bulgaria by ICP-OES and ETAAS. *J Apic Sci*. 2017; 61 (2): 223–232. DOI: 10.1515/jas-2017-0021.
2. Botezan S, Baci GM, Bagameri L, Paşca C, Dezmirean DS. Current status of the bioactive properties of royal jelly: A comprehensive review with a focus on its anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant effects. *Molecules*. 2023; 28 (3): 1510. DOI: 10.3390/molecules28031510.
3. Collazo N, Carpena M, Nuñez-Estevéz B, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA. Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*. 2021; 13 (2): 543. DOI: 10.3390/nu13020543.
4. Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicioli A. Royal jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res*. 2016; 192: 130–141. DOI: 10.1016/j.micres.2016.06.007.
5. Garcia-Amoedo LH, De Almeida-Muradian LB. Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Quim Nova*. 2007; 30 (2): 257–259. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200002.
6. Ghosh S, Jang H, Sun S, Jung C. Nutrient composition and quality assessment of royal jelly samples relative to feed supplements. *Foods*. 2024; 13 (12): 1942. DOI: 10.3390/foods13121942.
7. Kunugi H, Ali AM. Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: From animal models to humans. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (19): 4662. DOI: 10.3390/ijms20194662.
8. Maleki V, Jafari-Vayghan H, Saleh-Ghadimi S, Adibian M, Kheirouri S, Alizadeh M. Effects of royal jelly on metabolic variables in diabetes mellitus: A systematic review. *Complement Ther Med*. 2019; 43: 20–27. DOI: 10.1016/j.ctim.2018.12.022.
9. Petrovska IR, Salyha YT, Vudmaska IV. *Statistical Methods in Biological Research*. The educational and methodological manual. Kyiv, Agrarian Science; 2022: 172 p. ISBN 978-966-540-551-1. (in Ukrainian)
10. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB. Quality and standardisation of royal Jelly. *J ApiProd ApiMed Sci*. 2009; 1 (1): 1–6. DOI: 10.3896/IBRA.4.01.1.04.
11. Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *J Trace Elem Med Biol*. 2005; 19 (2–3): 183–189. DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.08.004.
12. Wang Y, Ma L, Zhang W, Cui X, Wang H, Xu B. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2016; 47: 48–56. DOI: 10.1007/s13592-015-0374-x.
13. Yu X, Tu X, Tao L, Daddam J, Li S, Hu F. Royal jelly fatty acids: Chemical composition, extraction, biological activity, and prospect. *J Funct Foods*. 2023; 111: 105868. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105868.

## Dynamics of the content of trace elements in royal jelly of different breeds (subspecies) of honey bees depending on the month of its collection

P. Y. Vorobets

pvorobets86@gmail.com

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

Royal jelly is a unique product of worker bees, namely the secret of their pharyngeal and maxillary glands. It is the main source of nutrients and biologically active substances for larvae and queens. Royal jelly includes a wide range of macro- and microelements that play a key role in the development of the bee colony, regulation of metabolism. Royal jelly is promising for use in medicine, pharmacy, cosmetology, etc. Comparative study of the mineral composition of royal jelly obtained from different breeds of bees and at different times of the year is important for understanding the biochemical mechanisms of its secretion and optimizing the technological conditions for obtaining this product with the highest possible biological value. The aim of the work was to compare changes in the content of copper (Cu), manganese (Mn), zinc (Zn), cobalt (Co) and nickel (Ni) in royal jelly obtained at different times, namely: in May, June and July from honey bees of four breeds (subspecies) — Carpathian bee (*Apis mellifera carpatica*), Carniolan bee (*Apis mellifera carnica*), Italian bee (*Apis mellifera ligustica*) and Ukrainian steppe bee (*Apis mellifera sossimai*). As a result of the study, the variability of changes in the content of trace elements in royal jelly of the studied breeds (subspecies) of bees depending on the period of its obtaining was established.

**Key words:** royal jelly, trace elements, *Apis mellifera carpatica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera sossimai*



## Концентрація окремих гормонів і якість сперми кнурів після згодовування ліпосомального комплексу вітамінів з глюконатом цинку в умовах теплового стресу

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



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

### ORCID:

I. Ivanytskyi <https://orcid.org/0009-0008-2189-8661>

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

### 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.

**VOS:** Methodology; Supervision; Writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

The authors report no conflict of interest in this work.

### Ethical approval:

During the experiment, all international, national and/or institutional principles for the care and use of animals were followed, in particular, Directive 2010/63/EU "On the protection of animals used for scientific purposes".

### Acknowledgements:

The research was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of Ukraine within the framework of PND 43 "Adaptation processes in highly productive agricultural animals under the influence of environmental and climatic factors", task 43.00.01.02. F. To study the impact of heat stress on the reproductive function of animals and develop methods for its correction (2021–2025) (state registration number 0121U108834).

Метою роботи було з'ясувати вплив згодовування ліпосомального комплексу вітамінів з глюконатом цинку в умовах теплового стресу (ТС) на концентрацію окремих гормонів і якість сперми кнурів. Експеримент проводили на дев'яти клінічно здорових кнурах-плідниках віком 2–4 роки порід ландрас, п'єстрен і дюрор. Проведено три етапи дослідження, кожен тривалістю 30 днів, в яких вибір матеріалу та його аналіз були подібними: 1) за нормальних теплових умов ( $<23^{\circ}\text{C}$ ); 2) за умов ТС ( $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ ); 3) за годівлі комплексною ліпосомальною добавкою в умовах ТС ( $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ ). У третьому етапі досліджень на фоні ТС всім кнурам індивідуально до комбікорму впродовж 30 днів додавали кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, до складу якої входили вітаміни А, D<sub>3</sub>, Е, і С з глюконатом цинку у дозі 2 мл. Наприкінці кожного етапу експерименту у піддослідних кнурів відбирали проби крові. У плазмі крові визначали концентрацію тестостерону, кортизолу та тироксину імуноферментним методом. Після завершення кожного етапу у кнурів відбирали еякуляти мануальним методом двічі на тиждень упродовж двох тижнів. Визначали параметри рухливості та морфологію статевих клітин, активність супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) та каталази (КАТ). Встановлено, що під впливом ТС у плазмі крові кнурів зріс рівень кортизолу ( $P<0,01$ ) та тироксину ( $P<0,05$ ), водночас суттєво знизилася концентрація тестостерону ( $P<0,05$ ). Негативну дію ТС на сперматогенез підтверджує достовірне ( $P<0,001$ ) зниження концентрації тестостерону у плазмі сперми. Помірний ТС знижує загальну рухливість спермій кнурів-плідників ( $P<0,001$ ) та активність статевих клітин з прямолінійно-поступальним рухом (ППР) ( $P<0,01$ ), удвічі підвищує відсоток дегенерованих спермій ( $P<0,001$ ). Під впливом ТС спостерігають зниження активності ГПО та КАТ ( $P<0,001$ ) у спермі кнурів на тлі незначного підвищення активності СОД. Після згодовування ліпосомальної добавки за дії ТС концентрація кортизолу та тироксину в крові кнурів значно ( $P<0,05\text{--}0,01$ ) знизилася, рівень тестостерону в крові та спермі кнурів суттєво зріс ( $P<0,05\text{--}0,001$ ). Це призвело до покращення рухливості спермій і їхніх морфологічних характеристик: достовірно зросла загальна рухливість спермій ( $P<0,01$ ) та активність спермій з ППР ( $P<0,01$ ) з одночасним зменшенням відсотка дегенерованих спермій ( $P<0,01$ ). Водночас активність СОД достовірно знизилася ( $P<0,01$ ) з одночасним підвищенням активності ГПО ( $P<0,001$ ) та КАТ ( $P<0,001$ ).

**Ключові слова:** кнур, сперма, ТС, кормова ліпосомальна добавка, біохімічні параметри, тестостерон, кортизол



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)



## Вступ

Зростання глобальної температури супроводжується змінами погодних умов, внаслідок чого зростає ризик теплового стресу (ТС) у сільськогосподарських тварин [6]. ТС впливає на багато біологічних процесів в організмі тварин, які прямо чи опосередковано впливають на розмноження [37]. Підвищена температура у свинарнику часто негативно впливає на організм свиноматок та кнурів. У практиці свинарства тварини часто страждають від ТС у літній період, що супроводжується зниженням їхньої продуктивності та репродуктивної здатності. У цю гарячу пору року погіршується якість еякулятів у кнурів, зокрема функціональна активність статевих клітин [6, 5]. Це пов'язано з тим, що кнури особливо схильні до впливу ТС [11], оскільки потовидільна здатність свиней обмежена [30, 10], а калитка анатомічно розташована близько до тіла, що обмежує її здатність охолоджуватися [20].

Спермії кнурів є особливо чутливими до оксидативних ушкоджень через присутність надлишкової кількості поліненасичених жирних кислот у плазматичній мембрані, що робить їх вразливими до перекисного окиснення ліпідів, призводячи до зниження пластичності мембрани спермія і зменшення рухливості його хвостика [23]. У зв'язку з цим, ТС призводить до оксидативного пошкодження сперміїв кнурів [34].

Відомо, що контроль репродукції у самців відбувається за допомогою гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі (ГГГ) [43]. Дослідженнями встановлено, що ТС змінює активність осі ГГГ, що призводить до порушення сперматогенезу та зниження фертильності, зокрема порушує стероїдогенез клітинами Лейдіга та секрецію тестостерону [35, 19, 24].

Для зменшення негативного впливу теплового стресу на організм свиней впродовж останніх років запропоновано низку заходів, які охоплюють застосування нових технологічних рішень, корекції годівлі, біологічно активних речовин [4, 22, 31]. Для пом'якшення теплового стресу у кнурів дослідники найчастіше використовували кормові добавки з антиоксидантними властивостями. Наприклад, в експериментах використовували вітаміни С, D, E, сполуки селену, цинку, які окремо та в різних комбінаціях позитивно впливали на фертильність і якість сперми [7, 28, 25, 9, 41]. Проте отримані результати продемонстрували неоднозначну дію на якісні показники сперми кнурів [26, 15, 33], що на тлі різних причин може бути спричинене обмеженням транспорту речовин через мембранний бар'єр між кровотоком і сім'яними каналцями [27].

Для часткового зменшення ролі мембранного бар'єру в Інституті біології тварин НААН розробили комплексну ліпосомальну добавку для стимуляції репродуктивної здатності баранів з антиоксидантними властивостями [38]. Зокрема, комплексні дослідження встановили позитивний вплив годування баранам комплексної ліпосомальної добавки (вітаміни А, D, E, С та глюконат цинку) на якісні параметри сперми у різні періоди статевої активності [39].

Тому метою дослідження було з'ясувати вплив годування ліпосомального комплексу вітамінів з глюконатом цинку в умовах теплового стресу на концентрацію окремих гормонів і якість сперми кнурів.

## Матеріали та методи

Експерименти проводили впродовж 2024 р. у Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси» (Львівська обл.) та Інституті біології тварин НААН.

У Львівському НВЦ «Західплемресурси» 9 клінічно здорових кнурів порід ландрас, п'єтрен та дюрорк розмістили в індивідуальних клітках. Перед початком експерименту провели клінічний огляд кожної тварини з визначенням температури тіла. Температуру визначали безконтактним термометром (N 38,0–39,5 °C).

Проведено три етапи досліджень, кожен тривалістю 30 днів, в яких вибір матеріалу та його аналіз були подібними: 1) за нормальних теплових умов (<23 °C); 2) за умов теплового стресу (25–30 °C); 3) за годівлі комплексною ліпосомальною добавкою в умовах теплового стресу (25–30 °C).

Другий і третій етапи експерименту проводили у гарячу пору року (червень-липень), коли спостерігали підвищену температуру (25–30 °C) та вологість (75–85 %). Оскільки кнурів утримували в низькому приміщенні зі слабкою вентиляцією, це спричиняло помірний ТС у кнурів. Температуру та вологість контролювали термогігрометром з визначенням середніх величин на кожному етапі. На третьому етапі дослідження на тлі теплового стресу всім кнурам впродовж 30 днів індивідуально годували кормову добавку у вигляді ліпосомальної емульсії, до складу якої входили вітаміни А, D<sub>3</sub>, E, С та глюконат цинку, у дозі 2 мл.

Для приготування 20 мл добавки використовували такі інгредієнти: 250 тис. МО вітаміну А, 25 тис. МО вітаміну D<sub>3</sub>, 250 мг вітаміну E, 500 мг вітаміну С, а також лецитин і твін-20 та деіонізовану воду. Суміш змішували та диспергували на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1 з частотою 22 кГц впродовж 2–3 хв. до утворення тонкої емульсії (без крапель жиру).

В кінці кожного етапу експерименту у піддослідних кнурів відбирали проби крові. Після завершення кожного етапу у кнурів відбирали еякуляти мануальним методом двічі на тиждень упродовж двох тижнів.

Концентрацію тестостерону, кортизолу та тироксину в плазмі крові визначали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів від ТОВ «ЛАБОРАТОРІЯ ГРАНУМ» (Україна) та імуноферментного аналізатора.

Усі процедури, описані в цій статті, відповідали рекомендаціям, викладеним у Директиві ЄС 2010/63/ЄС щодо експериментів на тваринах ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm)) та були схвалені етичною комісією Інституту біології тварин НААН.

### Аналіз сперми

Рухливість спермій визначали комп'ютеризованою системою CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) з активуванням модуля *Sperm Vision* [44]. Окрім загальної, прогресивної (прямолінійно поступальний рух, ППР) рухливості спермій, визначали відсоток спермій з цитоплазматичними краплями та частку дегенерованих (ушкоджених, з морфологічними порушеннями) статевих клітин.

Для визначення рівня антиоксидантного захисту у розведених зразках сперми вимірювали активність супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) та каталази (КАТ). Активність антиоксидантних ензимів визначали за методами, описаними Віртом та Міялом [42].

Зокрема, активність СОД визначали за кількістю нітроформазану, утвореного в реакції між феназин-метасульфатом та НАДН, використовуючи калібрувальну криву, для якої використовували стандартний розчин СОД (*Sigma*, США; С1345) та виражали в МО/мг білка. Поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі  $\lambda=540$  нм (спектрофотометр *JENWAY 6300*, Кембриджшир, Велика Британія), а активність СОД розраховували в МО/мг білка.

Активність ГПО визначали за допомогою реактиву Елмана (0,01 М розчин 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти, *Acros Organics*, Геель, Бельгія); Поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі  $\lambda=412$  нм.

Активність КАТ визначали за методом Корольок та співавт. [21]. Поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі  $\lambda=410$  нм. Активність ГПО та КАТ розраховували за формулою  $a=n/V$ , де  $a$  — активність ферменту;  $n$  — кількість молей субстрату, що перетворюється за одиницю часу;  $V$  — об'єм реакції; та виражали в мкмоль/хв  $\times$  мг білка.

### Статистичний аналіз

Усі отримані цифрові дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми *Statistica* з використанням методу варіаційної статистики та програми *Excel* з пакетів послуг *Microsoft Office 2007* та *2010*. Різниці між групами вважали статистично достовірними при  $P<0,05$ .

### Результати

Встановлено, що за впливу ТС концентрації кортизолу та тироксину в плазмі крові кнурів збільшились на 45,86 % ( $P<0,01$ ) та 15,47 % ( $P<0,05$ ) відповідно, порівняно з величинами значень показників за нормальних температурних умов (табл. 1). Після згодовування кнурам комплексної ліпосомальної добавки за ТС рівень кортизолу та тироксину в плазмі крові знизився на 20,79 % ( $P<0,05$ ) та 15,82 % ( $P<0,01$ ) відповідно.

Протилежні зміни встановлені за дослідження концентрації тестостерону у плазмі крові та сперми. Зокрема, ТС спричинив зниження величин значень на 21,71 % ( $P<0,05$ ) та 52,23 % ( $P<0,001$ ) відповідно. Після згодовування кнурам вітамінів А, D<sub>3</sub>, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії в умовах ТС концентрації тестостерону в плазмі крові та сперми зросли на 31,68 % ( $P<0,05$ ) та у 2,05 раза ( $P<0,001$ ) відповідно.

За впливу ТС якісні показники еякулятів кнурів значно знизилися. Зокрема, загальна рухливість спермій (*total motility*) кнурів за дії ТС знизилася на 15,89 % ( $P<0,001$ ) та активність спермій з ППР (*progressive motility*) — на 14,15 % ( $P<0,01$ ; табл. 2).

Подібно, помірний ТС призвів до збільшення морфологічних ушкоджень спермій: відсоток дегенерованих статевих клітин зріс у 2,04 раза ( $P<0,001$ ) на тлі зниження частки спермій з цитоплазматичними краплями на 30,56 %.

За впливу згодовування комплексної ліпосомальної добавки в умовах ТС значно покращилися показники рухливості та морфології спермій. Зокрема, загальна рухливість спермій зросла на 12,13 % ( $P<0,01$ ) та активність спермій з ППР — на 9,2 % ( $P<0,01$ ). Водночас, відсоток дегенерованих спермій після згодовування ліпосомальної добавки під час ТС зменшився на 33,64 % ( $P<0,01$ ) на тлі зростання частки статевих клітин з цитоплазматичними краплями на 42,61 %.

Активність ензимів антиоксидантного захисту у спермі кнурів за впливу ТС значно змінилися. Зокрема, активність ГПО і КАТ знизилася на 35,54 % ( $P<0,001$ ) та 17,84 % ( $P<0,001$ ) відповідно на тлі незначного зростання активності СОД на 6,54 % (табл. 3).

Після згодовування комплексної ліпосомальної добавки активність ензимів змінилася у протилежний бік — активність СОД знизилася на 8,74 % ( $P<0,01$ ), тоді як активність ГПО і КАТ зросли на 55,54 % ( $P<0,001$ ) та 32,96 % ( $P<0,001$ ) відповідно.

### Обговорення

У сучасному свиарстві важливою умовою високої ефективності є наявність достатньої кількості якісної сперми кнурів для штучного осіменіння свиноматок. Експериментально доведено, що ТС як один із антиоксидативних стресів впливає на рівень гормонів в організмі свиней [12]. Оскільки гіпоталамо-гіпофізарно-гонадна вісь — це складна мережа гормонів, які контролюють та регулюють репродукцію, вона зазнає змін за різних стресових чинників [43]. Зокрема, експериментально підтверджено, що тривалий (впродовж трьох тижнів) ТС підвищує рівень кортизолу у плазмі крові кнурців на відгодівлі. Аналогічно у нашому експерименті за впливу ТС достовірно ( $P<0,01$ ) зріс рівень кортизолу у плазмі крові кнурів на фоні підвищення концентрації тироксину ( $P<0,05$ ).

**Таблиця 1.** Концентрація окремих гормонів у плазмі крові та сперми кнурів після згодовування комплексної ліпосомальної добавки в умовах теплового стресу (n=9, M±m)**Table 1.** Concentration of some hormones in blood plasma and semen of boars after feeding a complex liposomal supplement under heat stress conditions (n=9, M±m)

| Показник<br>Parameter                                                     | За нормальної температури<br>At normal temperature | За теплового стресу<br>Under heat stress conditions | Після згодовування комплексної добавки<br>After feeding a complex supplement |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Кортизол, нмоль/л / Cortisol, nmol/l                                      | 95,70±4,54                                         | 139,59±8,27 <sup>b</sup>                            | 110,57±4,04**                                                                |
| Тироксин, нмоль/л / Thyroxine, nmol/l                                     | 56,01±2,76                                         | 64,68±1,65 <sup>a</sup>                             | 54,44±1,77*                                                                  |
| Тестостерон у плазмі крові, нг/мл<br>Testosterone in blood plasma, ng/ml  | 11,47±0,93                                         | 8,98±0,52 <sup>a</sup>                              | 11,82±1,06*                                                                  |
| Тестостерон у плазмі сперми, нг/мл<br>Testosterone in semen plasma, ng/ml | 3,23±0,10                                          | 1,54±0,12 <sup>c</sup>                              | 3,17±0,22***                                                                 |

*Примітка.* У цій і наступних таблицях: \* — P<0,05, \*\* — P<0,01, \*\*\* — P<0,001 — достовірна різниця між дослідними та контрольною групами;  
<sup>a</sup> — P<0,05, <sup>b</sup> — P<0,01, <sup>c</sup> — P<0,001 достовірна різниця між контрольною групою за нормальної температури та за умов теплового стресу.  
*Note.* In this and the following tables: \* — P<0.05, \*\* — P<0.01, \*\*\* — P<0.001 — significant difference between the experimental and control groups;  
<sup>a</sup> — P<0.05, <sup>b</sup> — P<0.01, <sup>c</sup> — P<0.001 — significant difference between the control group at normal temperature and under heat stress conditions.

**Таблиця 2.** Рухливість та морфологія спермій кнурів після згодовування комплексної ліпосомальної добавки в умовах теплового стресу (n=9, M±m)**Table 2.** Motility and morphology of boar spermatozoa after feeding a complex liposomal supplement under heat stress conditions (n=9, M±m)

| Показник<br>Parameter                                                               | За нормальної температури<br>At normal temperature | За теплового стресу<br>Under heat stress conditions | Після згодовування комплексної добавки<br>After feeding a complex supplement |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Загальна рухливість / Total motility, %                                             | 86,70±2,06                                         | 72,92±1,92 <sup>c</sup>                             | 81,77±1,68**                                                                 |
| ППР* / Progressive motility, %                                                      | 77,50±2,28                                         | 66,53±2,13 <sup>b</sup>                             | 72,66±1,65**                                                                 |
| Спермії з цитоплазматичними краплями, %<br>Spermatozoa with cytoplasmic droplets, % | 9,20±0,81                                          | 6,39±1,09                                           | 9,11±1,06                                                                    |
| Дегенеровані спермії, %<br>Degenerated spermatozoa, %                               | 13,28±2,06                                         | 27,08±1,92 <sup>c</sup>                             | 18,23±1,82**                                                                 |

*Примітка.* \* — прямолінійно поступальний (прогресивний) рух.  
*Note.* \* — rectilinearly progressive movement.

**Таблиця 3.** Активність ензимів антиоксидантного захисту у спермі кнурів після згодовування комплексної ліпосомальної добавки в умовах теплового стресу (n=9, M±m)**Table 3.** Activity of antioxidant defense enzymes in boar semen after feeding a complex liposomal supplement under heat stress conditions (n=9, M±m)

| Показник<br>Parameter                                 | За нормальної температури<br>At normal temperature | За теплового стресу<br>Under heat stress conditions | Після згодовування комплексної добавки<br>After feeding a complex supplement |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| СОД, МО/мг білка / SOD, IU/mg protein                 | 7,53±0,25                                          | 8,02±0,27                                           | 7,32±0,23**                                                                  |
| ГПО, ммоль/хв × мг білка / GPX, μmol/min × mg protein | 0,25±0,02                                          | 0,16±0,01 <sup>c</sup>                              | 0,25±0,02***                                                                 |
| КАТ, ммоль/хв × мг білка / AT, μmol/min × mg protein  | 1,56±0,09                                          | 1,28±0,04 <sup>c</sup>                              | 1,71±0,12***                                                                 |

Однак ТС спричинив достовірне зниження концентрації тестостерону у плазмі крові кнурів (P<0,05), що узгоджується з даними інших вчених. Зокрема, на думку окремих дослідників, після ТС знижується кількість ензимів, необхідних для біосинтезу тестостерону [19, 24, 3, 36], що в підсумку призводить до зниження рівня тестостерону [24, 29, 36].

Багато дослідників визначають рівень тестостерону лише в плазмі крові. Хоча рівень тестостерону

в сім'яниках, де відбувається сперматогенез, надзвичайно важливий, проте рідко вимірюється, оскільки це важко провести у живих тварин. Водночас встановлено, що ТС призводить до зниження рівня тестостерону в сім'яниках [31]. Крім того, після ТС в клітинах Лейдига спостерігають відкладення ліпідів, що свідчить про вплив ТС на синтез тестостерону [1, 8]. І це підтверджено у нашому експерименті, де встановлено достовірне (P<0,001) зниження концентрації тестостерону у плазмі сперми за дії ТС.

Окремі вчені встановили, що ТС негативно впливає на репродуктивну здатність кнурів, зокрема на кількісний та якісний склад еякуляту, причому негативна дія проявляється лише через кілька днів або тижнів після ТС [37, 5, 31]. Це підтверджено у нашому експерименті, де встановлено достовірне зниження загальної рухливості спермій кнурів-плідників ( $P < 0,001$ ) та активності статевих клітин з ППР ( $P < 0,01$ ) під впливом помірного ТС. Дослідники спостерігали, що ТС послідовно призводить до зниження рухливості та морфології спермій [16, 31], а також зменшення кількості статевих клітин з функціональними мітохондріями та з неушкодженими плазматичними мембранами [45]. Ми теж встановили, що за впливу помірного ТС відсоток дегенерованих статевих клітин зріс удвічі ( $P < 0,001$ ) на тлі зниження частки спермій з цитоплазматичними краплями на 30,56 %, що вказує на збільшення морфологічних ушкоджень спермій.

Відомо, що у спермі функціонує ефективна ензиматична ланка системи антиоксидантного захисту, яка руйнує надлишок утворених активних форм Оксигену й тим самим покращує якість сперми. Основними ензимами антиоксидантного захисту є СОД, ГПО та КАТ [40]. У нашому експерименті встановлено значне ( $P < 0,001$ ) зниження активності ГПО та КАТ у спермі кнурів на тлі незначного підвищення активності СОД за впливу ТС.

Одним зі способів подолати негативний вплив ТС на племінних кнурів є коригування їх годівлі: додавання до раціонів біологічно активних речовин, здатних покращити якість сперми [4]. Враховуючи це та спираючись на попередні дослідження [13], в Інституті біології тварин НААН створили кормову добавку, до складу якої входять вітаміни А, D<sub>3</sub>, Е, С та глюконат цинку у формі ліпосомальної емульсії для пролонгації дії.

Ґрунтуючись на численних літературних даних, які свідчать про позитивний вплив окремих вітамінів та мікроелементів як окремо, так і в різних комбінаціях [17, 26, 32, 2, 18], а також враховуючи те, що ТС має всі ознаки оксидативного стресу [34], ми ввели антиоксиданти (вітаміни) та активатор чоловічої фертильності (цинк) до складу комплексної ліпосомальної добавки.

Дослідження впливу згодовування ліпосомальної добавки за дії ТС на гормональний фон встановило, що концентрації кортизолу та тироксину в крові кнурів значно ( $P < 0,05$ – $0,01$ ) знизилися, тоді як рівні тестостерону в крові та спермі кнурів суттєво зросли ( $P < 0,05$ – $0,001$ ). Встановлені зміни концентрацій гормонів характеризували покращення рухливості спермій і їхньої морфології. Зокрема, після додавання до раціону кнурів-плідників вітамінів А, D<sub>3</sub>, Е, С з глюконатом цинку у формі ліпосомальної емульсії під час ТС достовірно зросли загальна рухливість ( $P < 0,01$ ) та активність спермій з ППР ( $P < 0,01$ ) з одночасним зменшенням відсотка дегенерованих спермій ( $P < 0,01$ ) на фоні недостовірного зростання частки статевих клітин з цитоплазматичними краплями.

Встановлено, що після коригування вітамінного забезпечення організму племінних кнурів відбуваються зміни прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу [40]. Також доведено наявність у спермі ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту, яка перетворює надлишок активних форм Оксигену і, таким чином, підвищує якість спермій. У нашому експерименті після згодовування вітамінів А, D<sub>3</sub>, Е, С та глюконату цинку у вигляді ліпосомальної емульсії активність СОД достовірно знизилася ( $P < 0,01$ ) з одночасним підвищенням активності ГПО ( $P < 0,001$ ) та КАТ ( $P < 0,001$ ). Це може вказувати на високий рівень антиоксидантного захисту в спермі і підвищеній стійкості та якості спермій кнурів.

Таким чином, згодовування кнурам під час ТС вітамінів А, D<sub>3</sub>, Е і С з глюконатом цинку у складі ліпосомальної емульсії проявляє комплексну дію, зменшує прояви оксидативного стресу та активує фертильність кнурів, що дозволяє нормалізувати вплив ТС на синтез тестостерону й отримати сперму хорошої якості від племінних кнурів у період дії ТС.

## Джерела

1. Aktas C, Kanter M. A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term. *J Mol Hist.* 2009; 40: 31–39. DOI: 10.1007/s10735-009-9210-9.
2. Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafrà 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.
3. Atta MS, Farrag FA, Almadaly EA, Ghoneim HA, Hafez AS, Al Jaouni KS, Mousa SA, El-Far AH. Transcriptomic and biochemical effects of pycnogenol in ameliorating heat stress-related oxidative alterations in rats. *J Therm Biol.* 2020; 93: 102683. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2020.102683.
4. 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.
5. Auvigne V, Leneveu P, Jehannin C, Peltoniemi O, Sallé E. Seasonal infertility in sows: A five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod. *Theriogenol.* 2010; 74 (1): 60–66. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.12.019.
6. Boma MH, Bilkei G. Seasonal infertility in Kenyan pig breeding units: research communication. *Orderstepoort J Vet Res.* 2006; 73 (3): 229–232. DOI: 10.4102/ojvr.v73i3.149.
7. Brezezińska-Slebodzińska E, Sleboziński AB, Pietras B, Wiczorek G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res.* 1995; 47 (1–3): 69–74. DOI: 10.1007/BF02790102.
8. Cai H, Qin D, Peng S. Responses and coping methods of different testicular cell types to heat stress: overview and perspectives. *Biosci Rep.* 2021; 41 (6): BSR20210443. DOI: 10.1042/BSR20210443.
9. Echeverría-Alonzo S, Santos-Ricalde R, Centurión-Castro F, Ake-López R, Alfaro Gamboa M, Rodríguez-Buenfil J. Effects of dietary selenium and vitamin E on semen quality and sperm morphology of young boars during warm and fresh season. *J Anim Vet Adv.* 2009; 8 (11): 2311–2317. Available at: <https://makhillpublications.co/files/published-files/mak-java/2009/11-2311-2317.pdf>



10. 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.
11. Flowers WL. Factors affecting the efficient production of boar sperm. *Reprod Domest Anim*. 2015; 50 (S2): 25–30. DOI: 10.1111/rda.12529.
12. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reprod*. 2004; 10 (5): 387–399. DOI: 10.1093/humupd/dmh034.
13. Gevkan II, Yaremchuk IM, Sharan OM, Stefanyk VY. Method for stimulating sexual activity and spermatogenesis in rams. Patent of Ukraine no. 153959 from 09.27.2023, bull. no. 39: 5 p. Available at: <https://sis.nipo.gov.ua/en/search/detail/1762594> (in Ukrainian)
14. Greenop A, Mica-Hawkyard N, Walkington S, Wilby A, Cook SM, Pywell RF, Woodcock BA. Equivocal evidence for colony level stress effects on bumble bee pollination services. *Insects*. 2020; 11 (3): 191. DOI: 10.3390/insects11030191.
15. Horký P, Zeman L, Skládanka J, Nevrlka P, Sláma P. Effect of selenium, zinc, vitamin C and E on boar ejaculate quality at heat stress. *Acta Univ Agric Silv Mendelianae Brun*. 2016; 64 (4): 1167–1172. DOI: 10.11118/actaun201664041167.
16. Huang SY, Kuo YH, Lee YP, Tsou HL, Lin EC, Ju CC, Lee WC. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim Reprod Sci*. 2000; 63 (3–4): 231–240. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00175-5.
17. Izquierdo AC, Iglesias Reyes AE, Cervantes RE, Guerra Liera JE, Insunza Castro JF, Villa Mancera AE, Mendoza MM, Crispín RH, de Lourdes Juárez Mosqueda M, Arman. Effect of addition of antioxidants in the freezing of boar semen on the motility and viability of sperm. *Int J Curr Res*. 2017; 9 (3), 47599–47600. Available at: <https://www.journalcra.com/article/effect-addition-antioxidants-freezing-boar-semen-motility-and-viability-sperm>
18. Kaewma S, Suphappornchai S, Suwimonteerabutr J, Am-In N, Techakumphu M. Zinc supplementation improves semen quality in boars. *Thai J Vet Med*. 2021; 51 (3): 10. DOI: 10.56808/2985-1130.3144.
19. Kim JH, Park SJ, Kim TS, Kim JM, Lee DS. Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice. *Life Sci*. 2016; 146: 184–191. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.042.
20. Knox R. The anatomy and physiology of sperm production in boars. 2001. Available at [http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig\\_case/html/library/boara&p.pdf](http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/pig_case/html/library/boara&p.pdf)
21. Koroliuk MA, Ivanova LI, Maïorova IG, Tokarev VE. A method of determining catalase activity. *Lab. Delo*. 1988; 1: 16–19.
22. Kunavongkrit A, Suriyasomboon A, Lundeheim N, Heard TW, Einarsson S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenol*. 2005; 63 (2): 657–667. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.039.
23. Lewis C, Ford AT. Infertility in male aquatic invertebrates: A review. *Aquat Toxicol*. 2012; 120-121: 79–89. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.05.002.
24. Li Z, Tian J, Cui G, Wang M, Yu D. Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat testes. *Reprod Fertil Dev*. 2016; 28 (9): 1424–1432. DOI: 10.1071/RD14370.
25. Lin Y, Lv G, Dong HJ, Wu D, Tao ZY, Xu SY, Che LQ, Fang ZF, Bai SP, Feng B, Li J, Xu XY. Effects of the different levels of dietary vitamin D on boar performance and semen quality. *Livest Sci*. 2017; 203: 63–68. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.07.003.
26. Lugar DW, Harlow KE, Hundley J, Goncalves M, Bergstrom J, Stewart KR. Effects of increased levels of supplemental vitamins during the summer in a commercial artificial insemination boar stud. *Animal*. 2019; 13 (11): 2556–2568. DOI: 10.1017/S1751731119001150.
27. Maeda T, Goto A, Kobayashi D, Tamai I. Transport of organic cations across the blood–testis barrier. *Mol. Pharmaceutics*. 2007; 4 (4): 600–607. DOI: 10.1021/mp070023l.
28. Marin-Guzman J, Mahan DC, Pate JL. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J Anim Sci*. 2000; 78 (6): 1537–1543. DOI: 10.2527/2000.7861537x.
29. Maurya VP, Sejian V, Kumar D, Naqvi SMK. Impact of heat stress, nutritional restriction and combined stresses (heat and nutritional) on growth and reproductive performance of Malpura rams under semi-arid tropical environment. *J Anim. Physiol Anim Nutr*. 2016; 100 (5): 938–946. DOI: 10.1111/jpn.12443.
30. McNitt JL, First NL. Effects of 72-hour heat stress on semen quality in boars. *Int J Biometeorol*. 1970; 14: 373–380. DOI: 10.1007/BF01462914.
31. Parrish JJ, Willenburg KL, Gibbs KM, Yagoda KB, Krautkramer MM, Loether TM, Melo FCSA. Scrotal insulation and sperm production in the boar. *Mol Reprod Dev*. 2017; 84 (9): 969–978. DOI: 10.1002/mrd.22841.
32. Peña ST, Gummow B, Parker AJ, Paris DBBP. Revisiting summer infertility in the pig: Could heat stress-induced sperm DNA damage negatively affect early embryo development? *Anim Prod Sci*. 2017; 57 (10): 1975–1983. DOI: 10.1071/AN16079.
33. Přibílová M, Horký P, Nevrlka P, Skládanka J. Elimination the impact of heat stress by supplementation of antioxidants into diet of Duroc boars. *Acta Univ Agric Silv Mendelianae Brun*. 2018; 66 (1): 161–169. DOI: 10.11118/actaun201866010161.
34. Quesnel H, Boulot S, Le Cozler Y. Seasonal variation of reproductive performance of the sow. *INRAE Prod Anim*. 2005; 18 (2): 101–110. DOI: 10.20870/productions-animales.2005.18.2.3513. (in French)
35. Risbridger GP, Kerr JB, De Kretser DM. Evaluation of Leydig cell function and gonadotropin binding in unilateral and bilateral cryptorchidism: Evidence for local control of Leydig cell function by the seminiferous tubule. *Biol Reprod*. 1981; 24 (3): 534–540. DOI: 10.1095/biolreprod24.3.534.
36. Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognato VM, Oliveira KC, Mogollón García HD, Pupulin AGR, Teixeira-Neto FJ, Castilho A, Nunes SG, Thundathil JC, Kastelic JP. Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. *Theriogenol*. 2020; 152: 64–68. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.029.
37. Ross JW, Hale BJ, Seibert JT, Romoser MR, Adur MK, Keating AF, Baumgard LH. Physiological mechanisms through which heat stress compromises reproduction in pigs. *Mol Reprod Dev*. 2017; 84 (9): 934–945. DOI: 10.1002/mrd.22859.
38. 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)
39. 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)
40. Shostia AM, Rokotianska VO, Nevidnychyi OS, Tsybenko VH, Sokyryko MP, Hyria VM. Peculiarities of the formation of prooxidant-antioxidant homeostasis in the sperm of breeding boars when feeding vitamin supplements. *Bull Sumy NAU Ser Livest*. 2018; 2 (34): 260–264. (in Ukrainian)
41. Shostya AM, Sarnavska IV. Influence of vitamin feed additive on the quality of sperm production in boars. *Sci Progr Innov*. 2022; 1: 134–141. DOI: 10.31210/visnyk2022.01.17.
42. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med*. 2010; 56 (2): 147–167. DOI: 10.3109/19396360903582216.
43. Xie Y, Dorsky RI. Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. *Development*. 2017; 144 (9): 1588–1599. DOI: 10.1242/dev.139055.
44. Yaremchuk IM, Sharan MM. Modern analysis capabilities sperm quality and sperm dose calculation. *Biol Tvarin*. 2012; 14 (1–2): 697–703. Available at: <https://aminbiol.com.ua/index.php/archive?catid=1:2013-02-15-09-09-13&id=203:2013-03-09-12-31-38> (in Ukrainian)
45. Zasiadczyk L, Fraser L, Kordan W, Wasilewska K. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology*. 2015; 83 (8): 1287–1303. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.015.

## Concentration of some hormones and quality of boar semen after feeding liposomal vitamin complex with zinc gluconate under heat stress conditions

I. T. Ivanytskyi, M. M. Sharan  
ivanickijvan285@gmail.com

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

The aim of the work was to determine the effect of feeding a liposomal vitamin complex with zinc gluconate under heat stress (HS) on the concentration of individual hormones and the quality of boar sperm. The experiment was conducted on nine clinically healthy breeding boars, aged 2–4 years of Landrace, Pietren and Duroc breeds. Three stages of the study were conducted, each lasting 30 days, in which the selection of material and its analysis were similar: 1) under normal thermal conditions ( $<23^{\circ}\text{C}$ ); 2) under HS conditions ( $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ ); 3) under feeding a complex liposomal supplement under HS conditions ( $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ ). In the third stage of the research on the background of HS, all boars were individually given a feed additive in the form of a liposomal emulsion for 30 days, which included vitamins A, D<sub>3</sub>, E, and C with zinc gluconate in a dose of 2 ml. At the end of each stage of the experiment, blood samples were taken from the experimental boars. The concentration of testosterone, cortisol, and thyroxine in blood plasma was determined by the enzyme-linked immunoenzymatic assay method. After completing each stage, ejaculates were taken from the boars by manual method twice a week for two weeks. The parameters of motility and morphology of germ cells, the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) were determined. It was found that under the influence of HS in the blood plasma of boars, the level of cortisol ( $P<0.01$ ) and thyroxine ( $P<0.05$ ) increased, while the concentration of testosterone significantly decreased ( $P<0.05$ ). The negative effect of HS on spermatogenesis is confirmed by a significant ( $P<0.001$ ) decrease in the concentration of testosterone in the plasma of sperm. Moderate HS reduces the overall motility of sperm of breeding boars ( $P<0.001$ ) and the activity of germ cells with rectilinear translational movement (progressive motility;  $P<0.01$ ), and doubles the percentage of degenerated sperm ( $P<0.001$ ). Under the influence of HS, a decrease in the activity of GPx and CAT ( $P<0.001$ ) is observed in the sperm of boars against the background of a slight increase in the activity of SOD. After feeding the liposomal supplement under the action of HS, the concentration of cortisol and thyroxine in the blood of boars significantly ( $P<0.05\text{--}0.01$ ) decreased, the level of testosterone in the blood and semen of boars significantly increased ( $P<0.05\text{--}0.001$ ). This led to an improvement in sperm motility and their morphological characteristics: the total sperm motility significantly increased ( $P<0.01$ ) and the activity of sperm with progressive motility ( $P<0.01$ ) with a simultaneous decrease in the percentage of degenerated sperm ( $P<0.01$ ). At the same time, the activity of SOD significantly decreased ( $P<0.01$ ) with a simultaneous increase in the activity of GPx ( $P<0.001$ ) and CAT ( $P<0.001$ ).

**Key words:** boar, sperm, heat stress, feed liposomal supplement, testosterone, cortisol



## Ефективність використання інактивованих глутатіонових дріжджів у годівлі перепілок м'ясо-яєчного напрямку

С. Ю. Дуль<sup>1</sup>, Т. Я. Прудюс<sup>2</sup>  
dulstepan@gmail.com



<sup>1</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

<sup>2</sup>Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

### ORCID:

S. Yu. Dul <https://orcid.org/0009-0004-7514-2270>  
T. Ya. Prudyus <https://orcid.org/0000-0003-3594-7539>

### Authors' Contributions:

**DSY:** Project administration; Investigation; Formal analysis; Writing — original draft.

**PTY:** Investigation; Formal analysis; Writing — review & editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

Authors declare no conflict of interests.

### Ethical approval:

Not applicable.

### Acknowledgements:

The authors express their gratitude to Mykhailo Kharyna for the opportunity and assistance in conducting the scientific and industrial experiment.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Метою дослідження було оцінити вплив інактивованих глутатіонових дріжджів «EnzActive Protein» на динаміку живої маси, середньодобові прирости та конверсію корму перепелів м'ясо-яєчного напрямку породи Маньчжурська в умовах промислового вирощування. Дослід проведено на трьох групах перепелів, сформованих за принципом аналогів по 15 голів у кожній: контрольна (основний раціон), дослідна 1 (ОР + 0,3 кг/т «EnzActive Protein»), дослідна 2 (ОР + 0,5 кг/т). Птахи отримували відповідні раціони з 20-ї доби життя до 47-ї доби. Щотижнево реєстрували живу масу, розраховували абсолютні та середньодобові прирости, а також конверсію корму за періодами. Встановлено, що згодовування інактивованих глутатіонових дріжджів не спричиняло негативних проявів і супроводжувалося суттєвим підвищенням ростової активності. Уже на 27-му добу маса тіла перепелів дослідних груп перевищувала контроль на 6,9–10,6 %, а на 34-ту та 47-му добу різниця зростала відповідно до 18,6–25,2 % і 23,6–39,8 % ( $P < 0,001$ ). Середньодобові прирости впродовж усього досліду були стабільно вищими у Д1 та Д2, причому в піковий період росту (27–34 доба) вони перевищували контроль майже вдвічі. Конверсія корму за окремими періодами покращувалася на 8–24 %, а за підсумком 20–47 діб витрати корму на 1 кг приросту були нижчими у дослідних групах, особливо за дози 0,5 кг/т. Отримані результати свідчать про виражений дозозалежний продуктивний ефект «EnzActive Protein» та економічну доцільність його використання в годівлі перепелів м'ясо-яєчного напрямку.

**Ключові слова:** перепілки, глутатіонові дріжджі, «Enz-Active Protein», жива маса, середньодобовий приріст, конверсія корму, продуктивність росту

## Вступ

Підвищення продуктивності перепелів сьогодні розглядають не лише як завдання інтенсифікації птахівництва, але й як необхідність підтримання високого рівня біологічної безпеки та відмови від антибактеріальних стимуляторів росту. Заборона використання антибіотиків у більшості країн ЄС та

поступове обмеження їх застосування в Україні стимулювали активний пошук природних альтернатив, здатних стабілізувати метаболічний стан птиці, посилювати її стійкість до стресових чинників і водночас забезпечувати стабільний ріст [9].

Проблема оксидативного стресу в сучасному птахівництві посідає особливе місце. Птиця дрібних видів, зокрема перепели, має високий темп мета-

болізму й особливу чутливість до дисбалансу між утворенням активних форм кисню та можливістю їх нейтралізації. В таких умовах ефективність антиоксидантного захисту прямо впливає на інтенсивність росту та використання поживних речовин. Дані українських дослідників також підкреслюють тісний взаємозв'язок між антиоксидантною системою та продуктивністю молодняку птиці [14, 15].

За останні роки зростає інтерес до дріжджових продуктів як джерела біологічно активних речовин із вираженим антиоксидантним ефектом. Зокрема, інактивовані дріжджі, збагачені глутатіоном, розглядають як перспективну кормову добавку, здатну підтримувати клітинний редокс-баланс, сприяти синтезу структурних білків та підвищувати засвоєння нутрієнтів [10]. Глутатіон — ключова молекула внутрішньоклітинної детоксикації — відіграє важливу роль у підтриманні метаболічної активності, що особливо актуально для періоду інтенсивного росту перепелів.

Водночас, попри наявність численних робіт щодо застосування дріжджових продуктів у годівлі птиці, використання саме глутатіонових дріжджів у раціонах перепелів, особливо у практичних умовах українських господарств, залишається недостатньо вивченим. Наявні дослідження переважно стосуються курчат-бройлерів або яєчної продуктивності, тоді як вплив цієї групи добавок на показники росту перепелів м'ясо-яєчного напрямку представлений фрагментарно [5, 13, 2]. Тому існує очевидна потреба в експериментальній оцінці ефективності інактивованих глутатіонових дріжджів за умов реального виробництва.

Враховуючи високу біологічну активність дріжджових метаболітів, їхню потенційну здатність підсилювати антиоксидантну відповідь і природну сумісність із раціонами перепелів, вивчення їх ефективності у практичних умовах промислового вирощування є актуальним і науково обґрунтованим. Саме тому метою цієї роботи було оцінити вплив різних доз інактивованих глутатіонових дріжджів «EnzActive Protein» на динаміку живої маси, середньодобові прирости та конверсію корму перепелів породи Маньчжурська.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено в умовах промислового комплексу «ФОП Харина» у Львівській обл. Об'єктом дослідження слугували перепели м'ясо-яєчного напрямку породи Маньчжурська. Для дослідження було

сформовано три групи — контрольну (К), дослідну 1 (Д1), та дослідну 2 (Д2) за принципом аналогів по 15 голів у кожній (табл. 1). Птиця мала вільний доступ до корму та води та споживала однаковий комбікорм, збалансований за поживними та біологічно активними речовинами. Із 20-ї доби життя перепели отримували повнораціонний комбікорм, який містив 15 % дерті кукурудзяної, 40,35 % дерті пшеничної, 30,0 % соєвої макухи, 6,0 % соняшникового шроту, 3,0 % соняшникової олії, 0,1 % підкислювача, 0,5 % абсорбенту мікотоксинів і 5 % вітамінно-мінерально-амінокислотного преміксу. Дослідні групи додатково отримували інактивовані глутатіонові дріжджі, які входять до складу добавки «EnzActive Protein»: Д1 отримувала 0,3 кг, а Д2 — 0,5 кг на 1 тону комбікорму.

Зміну маси тіла і середньодобові прирости перепілок контролювали, зважуючи їх щотижня. Одночасно обліковували фактичне споживання корму: щоденно реєстрували кількість виданого комбікорму, а наприкінці кожного тижня визначали середню величину поїдання, враховуючи залишки в годівницях. На основі цих даних обчислювали коефіцієнт конверсії корму — тобто співвідношення між кількістю корму, який спожила птиця, і приростом її живої маси за відповідний період. Такий підхід дозволив об'єктивно оцінити ефективність використання корму за різних варіантів годівлі.

«EnzActive Protein Powder» — інактивні дріжджі на основі спеціально підібраного штаму *Saccharomyces cerevisiae*, який завдяки розробленому процесу ферментації здатний природно накопичувати глутатіон — один із ключових антиоксидантів, здатний знижувати наслідки стресових впливів.

Глутатіонові дріжджі відзначаються високою стабільністю та універсальністю застосування, що дозволяє легко імплементувати їх у будь-які типи кормів — як комбікорми, так і премікси чи функціональні добавки. Завдяки спеціальній технології виготовлення «EnzActive Protein Powder» є термостійким продуктом та не втрачає своїх поживних й біологічно активних властивостей під час зберігання, транспортування та технологічних процесів, як-от грануляція або екструзія. У рекомендованих дозуваннях глутатіонові дріжджі придатні для всіх видів продуктивних і домашніх тварин та можуть слугувати додатковим джерелом високоякісного, легкозасвоюваного протеїну, вітамінів групи В, мікроелементів і біоактивних компонентів із вираженим антиоксидантним та імунomodуючим ефектом.

Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з урахуванням поправки Бонферроні. Для цього використано програму *StatPlus (AnalystSoft Inc., USA)*. Результати представлено як Mean±SD (стандартна похибка). Відмінності між групами тварин вважалися статистично достовірними при  $P < 0.05$ .

Таблиця 1. Схема дослідів на тваринах

| Групи / Groups               | N  | Характер годівлі / Type of feeding                                            |
|------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------|
| Контрольна<br>Control        | 15 | Основний раціон (ОП)<br>Basic diet                                            |
| Дослідна 1<br>Experimental 1 | 15 | ОП + 0,3 кг «EnzActive Protein»<br>Basic diet + 0.3 kg of "EnzActive Protein" |
| Дослідна 2<br>Experimental 2 | 15 | ОП + 0,5 кг «EnzActive Protein»<br>Basic diet + 0.5 kg of "EnzActive Protein" |



## Результати досліджень

На початку досліду (20 доба) маса тіла перепелів у всіх трьох групах не мала статистично достовірних відмінностей. Це підтверджує правильність формування груп за принципом аналогів і дозволяє вважати подальші зміни саме результатом впливу кормової добавки.

Упродовж наступного тижня ріст молодняку поступово прискорювався і вже на 27 добу спостерігали перші достовірні відмінності. У групі Д1 маса тіла була більшою за контроль на 6,9 % ( $P<0,05$ ), тоді як у Д2 — на 10,6 % ( $P<0,01$ ). Це свідчить про позитивний вплив інактивованих глутатіонових дріжджів на метаболізм птиці.

Найвиразніша різниця між групами простежувалася у період росту — на 34-у добу. У цей час у перепелів групи Д1 маса тіла була більшою за контроль на 18,6 %, а в групі Д2 — на 25,2 % ( $P<0,001$ ).

На 41-у добу відмінності між групами стали ще виразнішими. Птиця групи Д1 перевищувала контрольні значення на 19,1 %, тоді як у Д2 перевага досягла 32,2 % ( $P<0,001$ ). Важливо, що саме в цей період природна інтенсивність росту починає знижуватися, однак за умов використання глутатіонових дріжджів темпи приросту залишалися стабільно високими. Це вказує на підтримку метаболічної активності та збереження чутливості організму до нутрієнтів навіть у старшому віці.

У завершальний період вирощування, на 47-у добу, позитивний вплив добавки проявився найбільш чітко. Маса тіла перепелів групи Д1 була більшою за контроль на 23,6 %, що демонструє послідовний і рівномірний ефект протягом усього експерименту. У групі Д2 різниця досягла 39,8 % ( $P<0,001$ ), що вказує на максимальну продуктивну відповідь за використання дози 0,5 % і дозволяє розглядати її як найефективніший рівень введення добавки в раціон.

Такий характер зміни маси тіла вказує на поступове зростання продуктивної відповіді та високу чутливість перепелів до глутатіонових дріжджів протягом усього періоду інтенсивного росту.

Абсолютні прирости маси тіла повністю відображають закономірності, описані в динаміці живої маси (табл. 3). У перший період (20–27 доба) перепели групи Д1 переважали контроль на 30,4 %, а групи Д2 — на 47,8 % ( $P<0,05$ – $0,01$ ). Раннє збільшення приростів свідчить про швидке залучення дріжджових компонентів до обмінних процесів та покращення здатності до використання поживних речовин.

Найбільші відмінності між групами спостерігали у період 27–34 доби, що є піковим для росту перепелів. Тут приріст Д1 був вищим на 76,3 %, а Д2 — на 97,4 %, порівняно з контролем ( $P<0,001$ ). Така різниця вказує на високу чутливість молодняку до біологічно активних дріжджів саме у фазі максимальної інтенсивності синтезу білкових тканин. У період 34–41 доби, коли природні темпи росту сповільнюються, у контролі

приріст практично не збільшувався (0,010 кг), натомість у Д1 він був вищим на 30 %, а в Д2 — на 190 % ( $P<0,01$ ). Це важлива ознака того, що глутатіонові дріжджі підтримують ростові процеси навіть тоді, коли фізіологічна динаміка росту починає знижуватися.

На завершальному відрізку (41–47 доба) прирости Д1 перевищували контроль на 131,3 %, а Д2 — на 219 %, що узгоджується з даними живої маси та підтверджує стабільний і виражений ефект добавки.

Загальний приріст маси тіла за період 20–47 діб становив 0,104 кг у контролі, 0,163 кг у Д1 — 56,7 %, ( $P<0,001$ ) та 0,204 кг у Д2 — 96,1 %, ( $P<0,001$ ). Це підтверджує, що дія глутатіонових дріжджів проявлялася не епізодично, а була стабільною протягом усього періоду вирощування.

**Таблиця 2.** Динаміка живої маси перепілок за період досліду, кг ( $M\pm SD$ ,  $n=15$ )

| Вік, доба<br>Age, days | Контрольна<br>Control          | Дослідна 1<br>Experimental 1   | Дослідна 2<br>Experimental 2   |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 20                     | 0,142 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup> | 0,141 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup> | 0,140 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup> |
| 27                     | 0,188 $\pm$ 0,020 <sup>a</sup> | 0,201 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup> | 0,208 $\pm$ 0,020 <sup>c</sup> |
| 34                     | 0,226 $\pm$ 0,024 <sup>a</sup> | 0,268 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup> | 0,283 $\pm$ 0,018 <sup>c</sup> |
| 41                     | 0,236 $\pm$ 0,025 <sup>a</sup> | 0,281 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup> | 0,312 $\pm$ 0,019 <sup>c</sup> |
| 47                     | 0,246 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup> | 0,304 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup> | 0,344 $\pm$ 0,021 <sup>c</sup> |

**Таблиця 3.** Приріст живої маси перепілок за періоди, кг ( $M\pm SD$ ,  $n=15$ )

| Вік, доба<br>Age, days | Контрольна<br>Control          | Дослідна 1<br>Experimental 1   | Дослідна 2<br>Experimental 2    |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 20–27                  | 0,046 $\pm$ 0,033 <sup>a</sup> | 0,060 $\pm$ 0,024 <sup>b</sup> | 0,068 $\pm$ 0,029 <sup>c</sup>  |
| 27–34                  | 0,038 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup> | 0,067 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup> | 0,075 $\pm$ 0,027 <sup>c</sup>  |
| 34–41                  | 0,010 $\pm$ 0,039 <sup>a</sup> | 0,013 $\pm$ 0,022 <sup>b</sup> | 0,029 $\pm$ 0,030 <sup>c</sup>  |
| 41–47                  | 0,010 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup> | 0,023 $\pm$ 0,022 <sup>b</sup> | 0,032 $\pm$ 0,040 <sup>bc</sup> |
| 20–47                  | 0,104 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup> | 0,163 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup> | 0,204 $\pm$ 0,015 <sup>bc</sup> |

**Таблиця 4.** Середньодобові прирости живої маси перепілок, кг ( $M\pm SD$ ,  $n=15$ )

| Вік, доба<br>Age, days | Контрольна<br>Control            | Дослідна 1<br>Experimental 1     | Дослідна 2<br>Experimental 2      |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 20–27                  | 0,0066 $\pm$ 0,0048 <sup>a</sup> | 0,0086 $\pm$ 0,0034 <sup>b</sup> | 0,0097 $\pm$ 0,0041 <sup>c</sup>  |
| 27–34                  | 0,0054 $\pm$ 0,0045 <sup>a</sup> | 0,0096 $\pm$ 0,0033 <sup>b</sup> | 0,0107 $\pm$ 0,0038 <sup>c</sup>  |
| 34–41                  | 0,0014 $\pm$ 0,0050 <sup>a</sup> | 0,0019 $\pm$ 0,0026 <sup>b</sup> | 0,0041 $\pm$ 0,0037 <sup>c</sup>  |
| 41–47                  | 0,0017 $\pm$ 0,0056 <sup>a</sup> | 0,0038 $\pm$ 0,0031 <sup>b</sup> | 0,0053 $\pm$ 0,0047 <sup>bc</sup> |
| 20–47                  | 0,0037 $\pm$ 0,0021 <sup>a</sup> | 0,0058 $\pm$ 0,0011 <sup>b</sup> | 0,0073 $\pm$ 0,0015 <sup>bc</sup> |

**Таблиця 5.** Конверсія корму перепілок за період досліду, кг ( $M\pm SD$ ,  $n=15$ )

| Вік, доба<br>Age, days | Контрольна<br>Control        | Дослідна 1<br>Experimental 1 | Дослідна 2<br>Experimental 2  |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 20–27                  | 2,41 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> | 2,20 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup> | 2,05 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>  |
| 27–34                  | 3,02 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup> | 2,76 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup> | 2,55 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>  |
| 34–41                  | 4,75 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup> | 4,10 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup> | 3,62 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>  |
| 41–47                  | 5,65 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup> | 4,90 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup> | 4,30 $\pm$ 0,48 <sup>bc</sup> |
| 20–47                  | 3,07 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> | 3,50 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup> | 3,32 $\pm$ 0,17 <sup>bc</sup> |

Динаміка середньодобових приростів чітко відображає вплив глутатіонових дріжджів на інтенсивність росту перепелів у різні вікові періоди. На початку досліду (20–27 доба) перепели демонстрували природне прискорення ростових процесів, однак виразні міжгрупові відмінності проявилися вже у перші сім діб спостереження. У цей період середньодобовий приріст у групі Д1 перевищував контроль на 30,3 %, тоді як у Д2 — на 46,9 % ( $P < 0,01$ ). Така рання відповідь свідчить про підсилення обмінних процесів на тлі підвищеної біодоступності амінокислот і антиоксидантних компонентів глутатіонових дріжджів.

У наступний період (27–34 доба) інтенсивність росту продовжувала зростати і різниця між групами стала ще відчутнішою. У перепелів групи Д1 середньодобовий приріст був більшим за контроль на 77,7 %, а у птиці Д2 — на 98,1 % ( $P < 0,001$ ). Це відповідає фазі максимального анаболізму, коли організм найбільш активно використовує доступний протеїн і потребує антиоксидантного захисту для стабільної роботи клітинних структур.

У віковий інтервал 34–41 діб, коли в нормі темпи росту природно сповільнюються, у контрольній групі прирости суттєво знижувалися. Водночас обидві дослідні групи продовжували зберігати високу інтенсивність росту: у Д1 середньодобовий приріст був більшим за контроль на 35,7 %, а в Д2 — на 192,8 % ( $P < 0,001$ ). Такий контраст вказує на підтримку метаболічної активності, що, ймовірно, пов'язане зі стабілізацією клітинного редокс-статусу завдяки додатковому надходженню глутатіону.

На завершальному етапі (41–47 доба), коли організм перепелів поступово переходить до стабілізації тканинного росту, додавання глутатіонових дріжджів продовжувало забезпечувати перевагу. У Д1 середньодобові прирости перевищували контроль на 123,5 %, а у Д2 — на 211,8 % ( $P < 0,001$ ). Це свідчить про збереження високоінтенсивного енергетичного та пластичного обміну до кінця вирощування.

Узагальнений показник за весь період 20–47 діб підтверджує стійкий позитивний ефект добавки. Перепели групи Д1 перевищували контроль за середньодобовими приростами на 56,8 %, тоді як у групі Д2 приріст був вищим на 97,3 % ( $P < 0,001$ ), що демонструє максимально виражену продуктивну реакцію на дозу 0,5 %.

Показники конверсії корму відображають, наскільки ефективно перепели використовували поживні речовини корму на кожному етапі досліду. Уже в перший період (20–27 доба) тварини дослідних груп демонстрували помітно вищу ефективність. У групі Д1 конверсія була кращою за контроль на 8,6 %, тоді як у групі Д2 — на 15,0 % ( $P < 0,05$ ). Таке раннє покращення пов'язане зі збалансуванням енергетичного та амінокислотного обміну, що знижує непродуктивні витрати кормових ресурсів.

У період 27–34 доба оптимізація конверсії стала ще вираженішою. Порівняно з контролем, витрати корму на 1 кг приросту у Д1 зменшилися на 8,6 %, а у Д2 — на 15,6 % ( $P < 0,01$ ).

Саме в цей віковий проміжок найповніше проявляється ефект глутатіонових дріжджів як джерела легкозасвоюваних біоактивних компонентів, які зменшують енергетичні витрати на подолання метаболічних стресів.

У період 34–41 доби, коли природно сповільнюється ріст та зростає вартість кожного додаткового грама приросту, різниця між групами залишалася стабільною. Конверсія в Д1 була кращою за контроль на 13,7 %, а в Д2 — на 23,7 % ( $P < 0,01$ ), що вказує на загальне зниження «метаболічної ціни» приросту.

У завершальний період 41–47 діб зберігалася тенденція до підвищення ефективності використання корму за умов згодовування глутатіонових дріжджів. Птиця групи Д1 мала на 13,3 % кращу конверсію, тоді як у групі Д2 покращення сягало 23,9 % ( $P < 0,01$ ), що свідчить про зміцнення фізіологічної стійкості та посилення засвоєння поживних речовин на тлі зниження природних темпів росту.

Узагальнена конверсія корму за весь період 20–47 діб підтверджує отриману тенденцію: у групі Д1 витрати корму були кращими за контроль на 5,4 %, а в групі Д2 — на 12,2 % ( $P < 0,05$ ). Це дозволяє розглядати інактивовані глутатіонові дріжджі як ефективний інструмент поліпшення економічної результативності вирощування.

## Обговорення результатів

Порівняння отриманих даних із публікаціями українських та міжнародних авторів підтверджує логічність встановлених тенденцій. Зростання живої маси перепелів у групах із глутатіоновими дріжджами на 18,6–25,2 % (34-а доба) та 23,6–39,8 % (47-а доба) узгоджується з результатами, які відзначали біологічно подібний вплив поліфенолкарбонового комплексу на зростання маси тіла в молодняку. В їхніх дослідженнях меланіновий комплекс сприяв збільшенню маси тіла та покращенню метаболічного статусу перепелів [8].

Українські автори Кирилів, Гунчак, Сірко [12] у своїх роботах також повідомляють про значне підвищення середньодобових приростів за умов застосування біологічно активних кормових добавок, що узгоджується з нашими даними, де приріст у Д2 був майже на 100 % вищим за контроль.

Закордонні роботи також підтримують отримані тенденції. Wang [16] зазначає, що поліфеноли, дріжджові продукти та інші антиоксидантні сполуки покращують метаболічну стабільність клітини, зменшують вплив окисдативного стресу та підвищують ефективність використання поживних речовин. Це прямо корелює зі зниженням конверсії корму на 12,4–21,4 % у групах Д1 та Д2, порівняно з контролем.

Результати Abd El-Moneim & Sabic [3] і Hussein et al. [9], отримані на японських перепелах, демонструють аналогічні механізми покращення продуктивності — через модифікацію кишкової мікрофлори, зниження

запальної реактивності та стимуляцію ферментативної активності. Таким чином, наші результати органічно вписуються у загальну наукову картину.

Сукупність отриманих результатів свідчить, що додавання інактивованих глутатіонових дріжджів «EnzActive Protein» сприяє посиленню ростових процесів у молодняку перепелів. Це пов'язано не лише з високою поживною цінністю дріжджового білку, а й із наявністю у продукті біологічно активних компонентів — зокрема глутатіону та природних коферментів групи В, які беруть участь у регуляції енергетичного та білкового обміну. За умов інтенсивного росту ці сполуки підтримують антиоксидантну рівновагу, зменшують метаболічне навантаження та забезпечують ефективніше використання поживних речовин.

Найімовірніше, саме така комплексна дія дріжджів і зумовила достовірне збільшення маси тіла та покращення конверсії корму в дослідних групах. Отримані дані узгоджуються з результатами українських і світових досліджень щодо ролі глутатіон-активних добавок та дріжджових продуктів у годівлі птиці. Це дозволяє розглядати «EnzActive Protein» як перспективний компонент раціону перепелів м'ясо-яєчного напрямку.

Отож, згодовування інактивованих глутатіонових дріжджів «EnzActive Protein» у дозах 0,3 і 0,5 кг/т достовірно підвищує живу масу перепілок, починаючи з 27-ї доби вирощування; найбільший ефект зафіксовано на 47-му добу: +23,6 % (Д1) та +39,8 % (Д2), порівняно з контролем ( $P < 0,001$ ).

Середньодобові прирости перевищували контроль на 30–98 % у пікові періоди росту (27–34 доби) і зберігали перевагу навіть за фізіологічного уповільнення темпів (34–41, 41–47 діб), що вказує на позитивний вплив добавки.

Конверсія корму у проміжних періодах була стабільно кращою в дослідних групах; за підсумком 20–47 діб (після перерахунку) — очікувано нижча у Д1 та Д2 порівняно з контролем, із максимальною перевагою у 0,5 кг/т. Це підтверджує економічну доцільність використання глутатіонових дріжджів.

Встановлено чітку дозозалежну відповідь: доза 0,5 кг/т забезпечувала найвищі кінцеві маси, найбільші прирости та найкращу ефективність використання корму без ознак негативного впливу.

Отримані результати демонструють, що «EnzActive Protein» може бути практичним інструментом підвищення продуктивності перепілок м'ясо-яєчного напрямку, забезпечуючи стабільну ростову реакцію та оптимізацію конверсії корму на всіх етапах інтенсивного вирощування.

## Джерела

1. Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. Natural polyphenols: An overview. *Int J Food Prop.* 2016; 20 (8): 1689–1699. DOI: 10.1080/10942912.2016.1220393.
2. Abd El-Ghany WA. Yeasts and their derivatives as functional feed additives in poultry nutrition. *Agriculture.* 2025; 15 (9): 1003. DOI: 10.3390/agriculture15091003.
3. Abd El-Moneim AE, Sabic EM. Beneficial effect of feeding olive pulp and *Aspergillus awamori* on productive performance, egg quality, serum/yolk cholesterol and oxidative status in laying Japanese quails. *J Anim Feed Sci.* 2019; 28 (1): 52–61. DOI: 10.22358/jafs/105537/2019.
4. Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Sachan S, Karthik K, Dhama K. The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environ Sci Poll Res.* 2018; 25 (11): 10611–10618. DOI: 10.1007/s11356-018-1687-x.
5. Bolacali M, Irak K. Effect of dietary yeast autolysate on performance, slaughter, and carcass characteristics, as well as blood parameters, in quail of both genders. *South Afr J Anim Sci.* 2017; 47 (4): 460–470. DOI: 10.4314/sajas.v47i4.5.
6. Chen X, Zeng D, Zeng X, Zeng Q. Effects of complex antioxidants added to chicken diet on growth performance, serum biochemical indices, meat quality, and antioxidant capacity. *Animals.* 2024; 14 (3): 360. DOI: 10.3390/ani14030360.
7. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43(4): 348–361. Available at: [https://www.iss.it/documents/20126/45616/348+-+ANN\\_07\\_52\\_D%27Archiv.1201592652.pdf/0de52f3e-b826-6156-d904-ee825455b0ff?t=1581099674166](https://www.iss.it/documents/20126/45616/348+-+ANN_07_52_D%27Archiv.1201592652.pdf/0de52f3e-b826-6156-d904-ee825455b0ff?t=1581099674166)
8. Huryn AV, Holubieva TA. Productivity of quails for use in fodder of polyphenol carbon complex from antarctic black yeast *Nadsoniella nigra*. *Sci Mess LNUVMBT Ser Agr Sci.* 2021; 23 (95): 60–64. DOI: 10.32718/nlvvet-a9508. (in Ukrainian)
9. Hussein MMA, Abd El-Hack ME, Mahgoub SA, Saadeldin IM, Swelum AA. Effects of clove (*Syzygium aromaticum*) oil on quail growth, carcass traits, blood components, meat quality, and intestinal microbiota. *Poult Sci.* 2019; 98 (1): 319–329. DOI: 10.3382/ps/pey348.
10. Kim YH, Choi YJ, Lee EJ, Kang MK, Park SH, Kim DY, Oh H, Park SJ, Kang YH. Novel glutathione-containing dry-yeast extracts inhibit eosinophilia and mucus overproduction in a murine model of asthma. *Nutr Res Pract.* 2017; 11 (6): 461–469. DOI: 10.4162/nrp.2017.11.6.461.
11. Kishawy AT, Amer SA, Abd El-Hack ME, Saadeldin IM, Swelum AA. The impact of dietary linseed oil and pomegranate peel extract on broiler growth, carcass traits, serum lipid profile, and meat fatty acid, phenol, and flavonoid contents. *Asi-Australas J Anim Sci.* 2019; 32 (8): 1161–1171. DOI: 10.5713/ajas.18.0522.
12. Kyrlyiv BY, Hunchak AV, Sirko YM. The productivity and quality of production of quails for influence dietary supplements. *Sci Mess LNUVMBT Ser Agr Sci.* 2017; 19 (74): 229–234. Available at: <https://nlvet.com.ua/index.php/agriculture/article/view/2334> (in Ukrainian)
13. Mavrommatis A, Giamouri E, Myrtili ED, Evergetis E, Filippi K, Papapostolou H, Koulouchi SD, Zoidis E, Pappas AC, Koutinas A, Haroutounian SA, Tsiplakou E. Antioxidant status of broiler chickens fed diets supplemented with vinification by-products: A valorization approach. *Antioxidants.* 2021; 10 (8): 1250. DOI: 10.3390/antiox10081250.
14. Prydyus TY, Kyrlyiv YI, Barylo BS. Efficiency of the biologically active feed additive "Activio" in broiler chickens. *Sci Mess LNUVMBT Ser Agr Sci.* 2015; 17 (1): 80–85. (in Ukrainian)
15. Prydyus TY, Kyrlyiv YI, Barylo BS. Efficiency of essential oil extracts ("Activio") in feeding of geese. *Modern Poult Farm.* 2016; 11–12: 12–16. (in Ukrainian)
16. Wang T, Cheng K, Yu CY, Li QM, Tong YC, Wang C, Yang ZB, Wang T. Effects of a yeast-derived product on growth performance, antioxidant capacity, and immune function of broilers. *Poult Sci.* 2021; 100 (9): 101343. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101343.

## Efficiency of using inactivated glutathione yeast in the feeding of meat-and-egg quails

S. Yu. Dul<sup>1</sup>, T. Ya. Prudyus<sup>2</sup>

dulstepan@gmail.com

<sup>1</sup>Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, 50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine

The aim of this study was to evaluate the effect of inactivated glutathione yeast *EnzActive Protein* on body weight gain dynamics and feed conversion ratio in meat-and-egg type Manchurian quails under commercial rearing conditions. The experiment was carried out on three groups of quails (15 birds per group) formed by the principle of analogues: control (basal diet), trial 1 (basal diet + 0.3 kg/t *EnzActive Protein*) and trial 2 (basal diet + 0.5 kg/t). Starting from day 20 of age, birds received the respective diets until day 47. Live body weight was recorded weekly; absolute and average daily gains as well as feed conversion ratio were calculated for each growth period and for the overall experimental period. Feeding inactivated glutathione yeast did not cause any adverse clinical effects and was associated with a marked stimulation of growth performance. As early as day 27, body weight in the supplemented groups exceeded the control by 6.9–10.6 %, whereas on days 34 and 47 this difference increased to 18.6–25.2 % and 23.6–39.8 %, respectively ( $P < 0.001$ ). Average daily gains remained consistently higher in both experimental groups throughout the study, and during the peak growth phase (days 27–34) they were almost twice as high as in the control. Feed conversion ratio improved by 8–24 % in individual periods, and over days 20–47 the amount of feed required per kilogram of gain was lower in the supplemented birds, with the most pronounced effect at the dose of 0.5 kg/t. These results indicate a clear dose-dependent productive response to *EnzActive Protein* and support its economic and practical suitability as a functional feed additive for meat-and-egg type quails.

**Key words:** quails, glutathione yeast, *EnzActive Protein*, body weight, average daily gain, feed conversion ratio, growth performance





# Exercise-induced modulation of the gut microbiome in metabolically dysregulated state

O. O. Hurenko, S. B. Drozdovska  
olggurenko@gmail.com



National University of Ukraine on Physical Education and Sport, 1 Fizkultury str., Kyiv 03150, Ukraine

## ORCID:

O. O. Hurenko <https://orcid.org/0009-0008-0549-128X>  
S. B. Drozdovska <https://orcid.org/0000-0002-6211-5204>

## Authors' Contributions:

**HOO:** Methodology; Investigation; Data curation; Writing — original draft, Visualization.  
**DSB:** Conceptualization; Methodology; Supervision; Writing — review & editing.

## Declaration of Conflict of Interests:

None.

## Ethical approval:

The study was approved by the Biomedical Ethics Commission of the National University of Ukraine on Physical Education (protocol no. 2 from 30.09.2020).

## Acknowledgements:

None.

The article investigates the effects of exercise modalities on metabolic disturbances and the gut microbiome in women with metabolic syndrome. The relevance of the study is determined by the rapidly increasing prevalence of metabolic syndrome and the need for effective non-pharmacological interventions capable of simultaneously targeting systemic metabolism and microbiome-mediated regulatory mechanisms. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of a 12-week aerobic and resistance training program in correcting carbohydrate and lipid metabolism parameters and to determine the characteristics of taxonomic restructuring of the gut microbiota depending on the type of muscular activity. The study involved 68 women with clinically confirmed metabolic syndrome. Anthropometric indicators, biochemical blood parameters (glucose, insulin, HbA1c, lipid profile, HOMA-IR), and gut microbiome composition were assessed using quantitative 16S rRNA PCR analysis. Baseline analysis demonstrated pronounced disturbances of glycemic control and lipid metabolism in women with metabolic syndrome, including elevated HbA1c, glucose, total cholesterol, and LDL-cholesterol, as well as microbiome alterations characterized by reduced proportions of *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* and increased representation of other taxa, indicating dysbiosis. After 12 weeks of resistance training, a statistically significant restructuring of the microbiome was observed: an 18.4 % increase in *Bacteroidetes*, a 36.8 % decrease in *Firmicutes*, and a 43.5 % reduction in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, reflecting restoration toward a eubiotic state. Simultaneously, carbohydrate metabolism improved, evidenced by a 7.9 % decrease in HbA1c and a 14 % reduction in the HOMA-IR index, accompanied by reductions in atherogenic cholesterol fractions. In contrast, aerobic training did not produce pronounced quantitative shifts at the phylum level; however, *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides fragilis* appeared in samples, microorganisms associated with improved metabolic adaptation and anti-inflammatory activity. The most notable changes concerned the lipid profile, including decreased triglycerides, total and atherogenic cholesterol, and a tendency toward increased HDL levels. Overall, the results enabled a comparative evaluation of training effects. Resistance exercise primarily improved insulin sensitivity and glycemic control and substantially modified microbiome structure, whereas aerobic exercise exerted a stronger influence on lipid metabolism and induced qualitative changes in microbial composition.

**Key words:** carbohydrate metabolism, lipid metabolism, exercise training, metabolic syndrome, gut, gut microbiome



## Introduction

The full-scale war has intensified exposure to stressors affecting population health. Research findings indicate that life stress contributes to the development of metabolic disturbances, including insulin resistance and impaired glucose and lipid homeostasis, thereby worsening disease prognosis. Numerous studies have demonstrated that individuals exposed to severe war-related stress have an increased risk of developing metabolic syndrome (MetS) [3, 5, 9, 14].

Metabolic syndrome is regarded as a state of systemic dysregulation that develops as a consequence of impaired integrative interaction between the central and peripheral components of homeostasis. The principal pathogenetic determinants of metabolic syndrome (MetS) are visceral obesity and insulin resistance, which initiate a cascade of disturbances in carbohydrate and lipid metabolism, chronic low-grade inflammation, and endothelial dysfunction [7, 12].

The gut microbiome is considered a regulatory system involved in metabolic, immune, and neurovegetative control through the production of biologically active metabolites and the modulation of bile acid metabolism.

A substantial role in the development of metabolic disturbances is attributed to the gut microbiome, which is viewed as an integral modifier of metabolic homeostasis and an active participant in the etiopathogenesis of MetS. Dysbiosis — characterized by reduced microbial diversity and functional alterations of microbial communities — is associated with increased intestinal barrier permeability, metabolic endotoxemia, and activation of TLR4/NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways that sustain systemic inflammation and insulin resistance [4, 13, 15].

At the same time, microbial metabolites, including short-chain fatty acids, tryptophan derivatives, and secondary bile acids, exert regulatory effects through GPR41/43, AhR, FXR, and TGR5 receptors, thereby modulating gluconeogenesis, lipid metabolism, and the inflammatory milieu [1, 8, 10].

Physical exercise represents a physiologically substantiated non-pharmacological intervention capable of modulating insulin sensitivity, lipid metabolism, systemic inflammation, gut microbiome structure, and autonomic regulation of heart rhythm. However, existing studies predominantly focus on individual components of metabolic syndrome, do not account for type-specific differences between aerobic and resistance muscle work, and provide limited insight into the integrated interactions among metabolic, microbiome-related, and autonomic adaptive mechanisms [2, 6, 11]. The modality-dependent effects of physical exercise on microbiome-mediated metabolic adaptations remain insufficiently elucidated.

This study aimed to evaluate the effects of long-term exercise training of different modalities on the correction of disturbances in carbohydrate and lipid metabolism and the gut microbiome in women with metabolic syndrome.

## Materials and Methods

The effects of 12-week aerobic and resistance fitness exercise training on biochemical markers of carbohydrate and lipid metabolism, the taxonomic structure of the gut microbiome were investigated in women in the second period of mature adulthood with metabolic syndrome. The study included 68 women with clinically confirmed metabolic syndrome who were allocated into two training groups and one control group. The experimental groups comprised 50 women performing exercise training of different modalities, while 18 women constituted the non-intervention control group. Medical history data, anthropometric measurements, and clinical-laboratory as well as molecular-genetic assessments were analyzed.

The composition of the microbiota at the level of major bacterial phyla was determined using quantitative real-time PCR with universal primers targeting the bacterial 16S rRNA gene, as well as primers specific for *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*.

Biochemical analyses were performed in the clinical diagnostic laboratory of the V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism. The examination complex also included clinical investigations (biochemical blood analysis, complete blood count, carbohydrate and lipid profiles using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Training sessions with a predominantly aerobic character were conducted three times per week, lasted 55 minutes, and included moderate-intensity aerobic exercise (AT). Low-impact exercises were performed within a heart-rate zone of 65–70 % of HR<sub>max</sub> (not exceeding 140 beats·min<sup>-1</sup>), corresponding to an energy expenditure of approximately 6.0 METs. Load variation was achieved by modifying the type of musical accompaniment, exercise orientation, number of muscle groups involved, duration, and number of repetitions. Each session consisted of a preparatory phase (warm-up), a main phase (Zumba fitness exercises), and a final phase (stretching).

During health-oriented fitness sessions with a predominantly resistance character (RT), exercises targeting major muscle groups were performed using body-weight loading (push-ups, squats, low jumps) and external resistance (dumbbells, medicine balls, resistance bands). Each session consisted of three parts: warm-up, main strength section (6–8 exercises), and a concluding phase (stretching).

Normality of data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test. In cases where the distribution deviated from normality, nonparametric statistical methods were applied: the Mann–Whitney U test was used for comparisons between two independent samples, and the Wilcoxon signed-rank test was used to evaluate within-group changes over time.

Participants were recruited voluntarily through an open invitation disseminated via social media, specialized online platforms, and information partnerships with fitness centers and medical institutions. Prior to inclusion in the study, each participant completed a participant

questionnaire and an informed consent form containing explanations of the study objectives, procedures, expected outcomes, and potential risks of participation. The study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and current bioethical standards. Participation was voluntary, without financial compensation, and participants had the right to withdraw at any time without providing a reason. Confidentiality of personal data and anonymity of results were ensured. The study was approved by the Biomedical Ethics Commission of the National University of Ukraine on Physical Education (30.09.2020; protocol no. 2).

## Results and Discussion

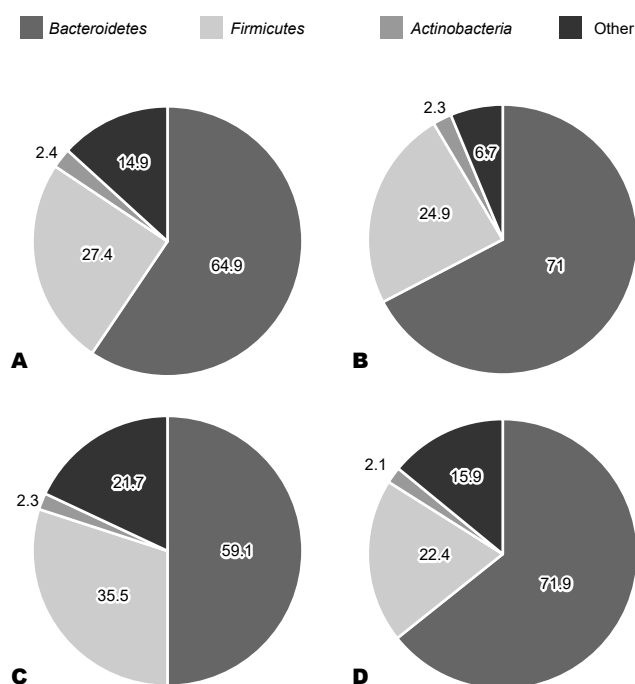
It was established that women with metabolic syndrome, compared with a conditionally healthy control group, exhibited baseline systemic differences in markers of carbohydrate and lipid metabolism (primarily indicators of glycemic control and atherogenic fractions), anthropometric and somatofunctional characteristics (increased circumferences, BMI, fat mass percentage, biological age, and basal metabolic rate), as well as in the phylum-level composition of the gut microbiome (decreased proportions of *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* and an increased “Other” group).

In the metabolic syndrome group, HbA1c was higher by 17.6 % (5.76 % vs. 4.90 %;  $P=0.0003$ ) and fasting glucose by 29.6 % (6.48 vs. 5.00 mmol/L;  $P=0.0046$ ). Total cholesterol was elevated by 29.1 % (6.48 vs. 5.02 mmol/L;  $P=0.0001$ ), LDL-C by 23.9 % (3.47 vs. 2.80 mmol/L;  $P=0.0064$ ), and HDL-C by 25.3 % (1.93 vs. 1.54 mmol/L;  $P=0.0178$ ). ALT was higher by 25.5 % (26.65 vs. 21.23 U/L;  $P=0.0325$ ), whereas differences in insulin, HOMA-IR, TG, AST, and TSH were not statistically significant ( $P>0.05$ ).

Baseline analysis revealed that in the metabolic syndrome group the relative abundance of *Bacteroides* was 6.8 % lower (63.30% vs. 67.90 %;  $P=0.0385$ ), and *Actinobacteria* was 24.8 % lower (2.18 % vs. 2.90 %;  $P=0.0167$ ), whereas the proportion of “Other” taxa was 3.34-fold higher (12.04 % vs. 3.60 %;  $P=0.0001$ ). *Firmicutes* ( $P=0.3949$ ) and the F/B ratio ( $P=0.5023$ ) did not differ significantly.

Exercise training of different modalities (aerobic and resistance), applied over 12 weeks, demonstrated a significant effect on changes in the quantitative composition of the gut microbiome in women with metabolic syndrome, as shown in fig. 1.

According to the results of the detailed comparison of baseline and final data, resistance exercise training in participants led to a significant increase in the relative abundance of *Bacteroidetes* by 18.4 % ( $P=0.0001$ ), with an elevation of the mean value. This was accompanied by a significant decrease in *Firmicutes* by 36.8 % ( $P=0.02$ ), which may be interpreted as a favorable shift toward restoration of a eubiotic microbial state.



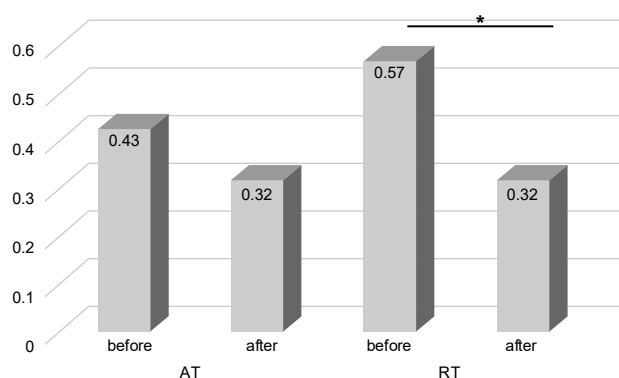
**Fig. 1.** Taxonomic structure of the gut microbiome under the influence of aerobic and resistance exercise training, %  
**Note.** A — aerobic training before; B — aerobic training after; C — resistance training before; D — resistance training after.

In contrast, in the aerobic training group only a tendency toward an increase in *Bacteroidetes* content by 8 % ( $P=0.24$ ) and a simultaneous non-significant decrease in *Firmicutes* ( $P=0.24$ ) was observed, which did not reach statistical significance.

Thus, the effect of resistance exercise training appeared more pronounced in correcting dysbiotic alterations characteristic of metabolic syndrome compared with aerobic training. In both experimental groups, an inverse correlation between the dynamics of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* proportions was detected, moderate during aerobic training ( $r \approx -0.2$ ) and stronger during resistance training ( $r \approx -0.6$ ). This additionally confirms the presence of a modulatory effect of exercise training on the gut microbiome, more pronounced under resistance training conditions. Such an effect is likely associated with increased tolerance to physical load and a shift toward a functionally favorable bacterial profile.

Regarding *Actinobacteria*, no significant changes in its representation were detected: stable quantitative values were observed both before and after the intervention.

In the resistance training group, statistically significant changes in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio were observed, decreasing by 43.5 % ( $P=0.016$ ) compared with baseline values, as shown in fig. 2. In contrast, in the group performing aerobic exercise training, the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio did not undergo statistically significant changes ( $P=0.24$ ), although a slight decrease of 3.1 % relative to baseline was observed. This finding may be interpreted as a tendency toward correction of microbial imbalance toward eubiosis under the influence



**Fig. 2.** *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in the resistance and aerobic training groups before and after the intervention  
**Note.** Statistical significance of differences between pre- and post-intervention parameters was assessed using the Wilcoxon signed-rank test for paired samples.  
 \* — difference statistically significant at  $P < 0.05$ .

of muscular activity. However, this dynamic was not statistically significant, likely due to a lower intensity or insufficient specificity of the aerobic load for modulation of the intestinal microbiota.

Overall, the obtained results indicate that resistance exercise training exerts a more pronounced modulatory effect on the ratio of key bacterial phyla. The limited effect of aerobic exercise, in turn, highlights the individual variability of microbiome responses and the need for personalized selection of physical activity programs for microbiome correction in individuals with metabolic syndrome.

Additionally, fecal samples from participants in the aerobic training group revealed the presence of *Akkermansia muciniphila*, a microorganism associated with lower fasting glucose levels, greater microbial diversity, and improved metabolic adaptation to exercise. Its appearance may indicate positive shifts in gut microbiome structure under the influence of aerobic training. Along with *A. muciniphila*, *Bacteroides fragilis* — a representative of the obligate colonic microbiota involved in local immune regulation and maintenance of epithelial homeostasis through production of anti-inflammatory polysaccharide A — was also identified. Detection of these taxa may indicate the formation of a more stable and immunologically favorable microbial environment characteristic of a compensated metabolic state.

Comparative analysis of final outcomes between the two groups with different exercise modalities demonstrated that low-intensity aerobic exercise training exerted a more substantial effect on modeling eubiosis than aerobic training.

Based on the obtained results, it was established that a 12-week training program in women with metabolic syndrome was accompanied by positive dynamics in biochemical parameters related to carbohydrate and lipid metabolism, as well as the formation of metabolically relevant associations between metabolic parameters and the taxonomic structure of the gut microbiota. At the same time, the pattern of adaptive response differed substantially depending on the type of exercise

training, allowing resistance and aerobic exercise to be considered distinct non-pharmacological tools for the correction of metabolic disorders.

The correlation analysis demonstrated that after the resistance intervention the most pronounced associations were formed between carbohydrate metabolism parameters and atherogenic components of the lipid profile. Specifically, HbA1c showed a direct correlation with fasting glucose ( $r=0.61$ ;  $P<0.01$ ) and HOMA-IR ( $r=0.32$ ;  $P<0.05$ ), and was also positively associated with the proportion of the conditionally unfavorable “%other” group ( $r=0.46$ ;  $P<0.01$ ), allowing it to be considered a potential microbiota marker of metabolic strain. The HOMA-IR index exhibited strong positive correlations with triglycerides ( $r=0.69$ ;  $P<0.01$ ) and VLDL ( $r=0.63$ ;  $P<0.01$ ), confirming the pathophysiological unity of insulin resistance and hypertriglyceridemia within the structure of metabolic syndrome.

In the aerobic group, a general tendency toward the formation of a correlation “core” was observed, in which markers of insulin resistance (HOMA-IR) were associated with atherogenic fractions and the triglyceride component, while microbiota indicators (particularly the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio) demonstrated strong interrelations with baseline taxa, reflecting restructuring of the microbial community during metabolic adaptation.

In the resistance training group, the most pronounced changes concerned reductions in atherogenic cholesterol fractions and improvement of carbohydrate metabolism parameters. In particular, significant decreases in total cholesterol and LDL-cholesterol were recorded, reflecting reduced plasma atherogenic potential and forming a biochemical basis for lowering cardiometabolic risk. Concurrently, the carbohydrate profile demonstrated significant shifts in integrated markers of glycemic control and insulin resistance (primarily HbA1c and HOMA-IR), whereas fasting insulin and glucose showed a directed but less pronounced dynamic.

The post-intervention correlation structure confirmed the interrelationship of key carbohydrate and lipid metabolism parameters and their concordance with microbiota characteristics. Specifically, HbA1c showed direct associations with fasting glucose and the HOMA-IR index, while HOMA-IR was associated with parameters of triglyceride-related atherogenicity (particularly triglycerides and VLDL). Simultaneously, associations between the proportion of the conditionally unfavorable “%other” group and glycemic markers were detected, suggesting that this group may serve as a potential indicator of metabolic strain. Overall, resistance exercise in this cohort exerted its effect primarily through improvement of insulin sensitivity and reduction of atherogenic cholesterol fractions, while microbiota associations indicated involvement of the intestinal component in metabolic adaptation.

In the aerobic training group, the most characteristic feature was metabolic efficacy regarding the triglyceride component and atherogenic lipid fractions. Compared with the resistance group, aerobic intervention was accompanied by more pronounced favorable dynamics of



lipid profile parameters, including significant reductions in total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides, as well as a tendency toward increased HDL. In the carbohydrate profile, the aerobic program also demonstrated favorable dynamics in glycemic control and insulin resistance indicators, consistent with the physiology of aerobic muscle work, which is characterized by increased fatty acid oxidation, improved insulin sensitivity, and reduced hepatic production of atherogenic lipoproteins.

Comparative analysis showed that resistance training was more strongly associated with improvement in insulin resistance and integral glycemic control indices, whereas aerobic exercise had a more pronounced effect on the lipid profile, particularly triglycerides and atherogenic lipoprotein fractions. In both groups, metabolically relevant relationships between biochemical markers and microbiome taxonomic characteristics were observed, confirming the multicomponent nature of adaptation to exercise.

Thus, after 12 weeks of a resistance training program in women with metabolic syndrome, a statistically significant restructuring of the phylum-level gut microbiome profile was observed. The proportion of *Bacteroidetes* increased by 18.4 % ( $P=0.0001$ ), *Firmicutes* decreased by 36.8 % ( $P=0.02$ ), the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio declined by 43.5 % ( $P=0.016$ ), and the proportion of taxa grouped as "Other" decreased by 26.8 % ( $P=0.007$ ), while *Actinobacteria* remained stable. Collectively, these changes may reflect a reduction in dysbiotic burden.

Against the background of the 12-week aerobic program, pronounced phylum-level shifts were not observed; however, the appearance of *Akkermansia muciniphila* in fecal samples was recorded as a qualitative indicator of microbiome modulation. This taxon is associated with improved metabolic adaptation and greater stability of intestinal structural and functional integrity. Overall, the resistance fitness program produced quantitatively pronounced phylum-level restructuring, whereas the aerobic program induced predominantly qualitative taxon-specific changes.

Comparison of the effects of the two health-oriented fitness programs in women of the second period of adulthood with metabolic syndrome demonstrated that personalization of non-pharmacological correction should be based on the dominant metabolic profile. When insulin resistance and impaired glycemic control predominate, strengthening the resistance component is more appropriate, whereas in the presence of atherogenic dyslipidemia and hypertriglyceridemia, emphasis should be placed on aerobic exercise. Thus, targeted application of resistance and/or aerobic exercise in women with meta-

bolic syndrome may be considered an effective non-pharmacological approach to correcting metabolic disorders, implemented through interconnected mechanisms of normalization of carbohydrate and lipid metabolism and modulation of gut microbiome composition.

## References

1. Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*. 2021; 70 (6): 1174–1182. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323071.
2. Cullen T. Exercise training and gut microbiota. *Sports Med*. 2024; 54: 1–18.
3. Dyball D, Evans S, Boos CJ, Stevelink SAM, Fear NT. The association between PTSD and cardiovascular disease and its risk factors in male veterans of the Iraq/Afghanistan conflicts: A systematic review. *Int Rev Psychiatry*. 2019; 31 (1): 34–48. DOI: 10.1080/09540261.2019.1580686.
4. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19: 55–71. DOI: 10.1038/s41579-020-0433-9.
5. Gale CR, Kivimäki M, Lawlor DA, Carroll D, Phillips AC, Batty GD. Fasting glucose, diagnosis of type 2 diabetes, and depression: The Vietnam experience study. *Biol Psychiatry*. 2010; 67 (2): 189–192. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.09.019.
6. Hawley JA, Bishop DJ. High-intensity exercise training — too much of a good thing? *Nat Rev Endocrinol*. 2021; 17 (7): 385–386. DOI: 10.1038/s41574-021-00500-6.
7. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017; 542: 177–185. DOI: 10.1038/nature21363.
8. Jiang C. Microbial metabolites and cardiometabolic regulation. *Cell Metab*. 2025; 37: 1–15.
9. Kivimäki M, Bartolomucci A, Kawachi I. The multiple roles of life stress in metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol*. 2023; 19 (1): 10–27. DOI: 10.1038/s41574-022-00746-8.
10. Liu L. Microbiota–bile acid–FXR axis in metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2024; 35: 112–124.
11. Reljic D. Resistance vs. endurance training in metabolic syndrome. *Sports Med*. 2025; 55: 1–22.
12. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017; 127 (1): 1–4. DOI: 10.1172/JCI92035.
13. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20: 40–54. DOI: 10.1038/s41577-019-0198-4.
14. Vancampfort D, Rosenbaum S, Ward PB, Steel Z, Lederman O, Lamwaka AV, Richards JW, Stubbs B. Type 2 diabetes among people with posttraumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis. *Psychosom Med*. 2016; 78 (4): 465–473. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000297.
15. Wang Y. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Diab Metab Res Rev*. 2020; 36 (3): e3213.

## Зміни мікробіому кишки під впливом фізичних вправ в умовах метаболічних порушень

О. О. Гуренко, С. Б. Дроздовська  
olgurenko@gmail.com

Національний університет фізичного виховання і спорту України, вул. Фізкультури, 1, м. Київ, 0350, Україна

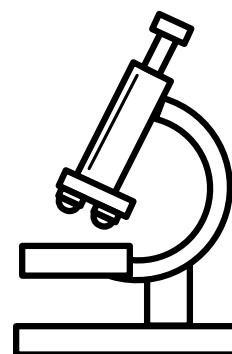
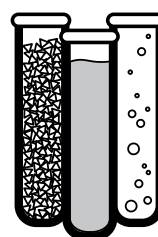
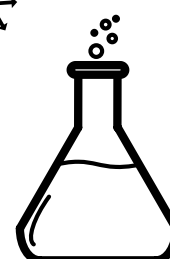
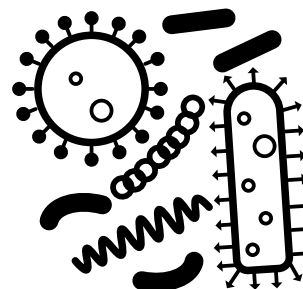
Стаття присвячена дослідженню впливу фізичних навантажень різної модальності на метаболічні порушення та кишковий мікробіом у жінок із метаболічним синдромом. Актуальність роботи зумовлена стрімким зростанням поширеності метаболічного

синдрому та пошуком ефективних немедикаментозних підходів його корекції, здатних одночасно впливати на системний метаболізм і мікробіом-опосередковані механізми регуляції. Метою дослідження було оцінити ефективність 12-тижневої програми аеробних і силових тренувань щодо корекції показників вуглеводного та ліпідного обміну, а також визначити особливості перебудови таксономічної структури кишкової мікробіоти залежно від типу м'язової роботи. У дослідженні взяли участь 68 жінок із клінічно підтвердженим метаболічним синдромом. П'ятдесят учасниць виконували фізичні вправи та були розподілені на дві групи — аеробних і силових тренувань, тоді як 18 осіб становили контроль без втручання. Тривалість програми становила 12 тижнів. Оцінювали антропометричні показники, біохімічні параметри крові (глюкоза, інсулін, HbA1c, ліпідний профіль, HOMA-IR) та склад кишкового мікробіому методом кількісної ПЛР 16S rRNA. Аналіз вихідних даних показав, що у жінок із метаболічним синдромом спостерігалися виражені порушення глікемічного контролю та ліпідного обміну: підвищення HbA1c, глюкози, загального холестерину і LDL-холестерину, а також зміни мікробіому, що характеризувалися зменшенням частки *Bacteroidetes* і *Actinobacteria* та збільшенням частки інших таксонів, що свідчить про дисбіоз. Після 12 тижнів силового тренування зафіксовано статистично значущу перебудову мікробіому: збільшення частки *Bacteroidetes* на 18,4 %, зменшення *Firmicutes* на 36,8 % і зниження співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* на 43,5 %, що розцінюється як відновлення еубіотичного стану. Одночасно відбулося покращення вуглеводного обміну — зниження HbA1c на 7,9 % та індексу інсулінорезистентності HOMA-IR на 14 %, а також зменшення атерогенних фракцій холестерину. Аеробні тренування не спричинили виражених кількісних зрушень на рівні філумів, однак у зразках з'явилися *Akkermansia muciniphila* та *Bacteroides fragilis* — мікроорганізми, асоційовані з кращою метаболічною адаптацією і протизапальною активністю. При цьому найбільш виражені позитивні зміни стосувалися ліпідного профілю: зниження тригліцеридів, загального та атерогенного холестерину, а також тенденція до підвищення HDL. Отримані результати дозволили провести узагальнююче порівняння ефектів тренувань. Встановлено, що силові вправи переважно покращують інсулінову чутливість і глікемічний контроль та істотно змінюють структуру мікробіому, тоді як аеробні вправи ефективніше впливають на ліпідний обмін і спричиняють якісні зміни мікробного складу.

**Ключові слова:** вуглеводний обмін, жировий обмін, фізичні вправи, метаболічний синдром, кишка, кишковий мікробіом

# ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН ПРОВОДИТЬ:

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



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

\* можливе проведення інших досліджень

\*\* всі лабораторії Інституту акредитовані для проведення досліджень

**Інститут біології тварин НААН**  
вул. В. Стуса 38, м. Львів, 79034  
тел.: +38 (032) 270-23-89, +38 (96) 858-37-76  
e-mail: [markinfo@inenbiol.com.ua](mailto:markinfo@inenbiol.com.ua)

*Завжди раді співпраці з Вами!*

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

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

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

Реклама в нашому журналі дозволить Вам:

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

Пропозиції до співпраці на 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](mailto:inenbiol@gmail.com)





# ВЕТЕРИНАРНІ ПРЕПАРАТИ

Від відомих світових виробників

Ексклюзивний авторизований дистриб'ютор компаній:



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

Запрошуємо до співпраці!

[amcovet.com.ua](http://amcovet.com.ua)

# IMUNOTOX

Інноваційна кормова добавка для свиней і птиці

Захист

Продуктивність

Імунітет



Зв'язування та інактивація мікотоксинів



Підвищення стійкості до теплового стресу



Аглютинація патогенних бактерій



Активація імунної системи



Антиоксидантний ефект



Гепатопротекторна дія



Синегрічний ефект



Синергія компонентів IMUNOTOX забезпечує потужний ефект для здоров'я і продуктивності тварин

ТОВ “КРЕОМІН” інвестиція, яка працює на вас !

ТОВ «КРЕОМІН»

📍 Адреса: Україна, 04053, місто Київ, вулиця Січових Стрільців, будинок 21, офіс 501

☎ Телефон: +38 (095) 822 43 78 , +38(097) 930 78 13, +38 (067) 328 42 48

✉ Електронна пошта: [oleksandr\\_sukhariev@creomin.com.ua](mailto:oleksandr_sukhariev@creomin.com.ua) [creomin@ukr.net](mailto:creomin@ukr.net)

🌐 Вебсайт: <https://www.creomin.com.ua>