



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).



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

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, D₃, 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 прямолинійно-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

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, D₃, 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 D₃, 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) 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*. Різницю 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, D₃, 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 рази ($P<0,001$) 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 рази ($P<0,001$) 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 Parameter	За нормальної температури At normal temperature	За теплового стресу Under heat stress conditions	Після згодовування комплексної добавки After feeding a complex supplement
Кортизол, нмоль/л / Cortisol, nmol/l	95,70±4,54	139,59±8,27 ^b	110,57±4,04**
Тироксин, нмоль/л / Thyroxine, nmol/l	56,01±2,76	64,68±1,65 ^a	54,44±1,77*
Тестостерон у плазмі крові, нг/мл Testosterone in blood plasma, ng/ml	11,47±0,93	8,98±0,52 ^a	11,82±1,06*
Тестостерон у плазмі сперми, нг/мл Testosterone in semen plasma, ng/ml	3,23±0,10	1,54±0,12 ^c	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;
^a — P<0,05, ^b — P<0,01, ^c — 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;
^a — P<0.05, ^b — P<0.01, ^c — P<0.001 — significant difference between the control group at normal temperature and under heat stress conditions.

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 Parameter	За нормальної температури At normal temperature	За теплового стресу Under heat stress conditions	Після згодовування комплексної добавки After feeding a complex supplement
Загальна рухливість / Total motility, %	86,70±2,06	72,92±1,92 ^c	81,77±1,68**
ППР* / Progressive motility, %	77,50±2,28	66,53±2,13 ^b	72,66±1,65**
Спермії з цитоплазматичними краплями, % Spermatozoa with cytoplasmic droplets, %	9,20±0,81	6,39±1,09	9,11±1,06
Дегенеровані спермії, % Degenerated spermatozoa, %	13,28±2,06	27,08±1,92 ^c	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 Parameter	За нормальної температури At normal temperature	За теплового стресу Under heat stress conditions	Після згодовування комплексної добавки 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 ^c	0,25±0,02***
КАТ, ммоль/хв × мг білка / AT, μmol/min × mg protein	1,56±0,09	1,28±0,04 ^c	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, D₃, 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 та їхньої морфології. Зокрема, після додавання до раціону кнурів-плідників вітамінів А, D₃, 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, D₃, 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, D₃, 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. *Onderstepoort 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
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, Naqui 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, Sokyрко 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, D₃, 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