

**Репродуктивная функция, эмбриогенез**

УДК 636.2:636.082:577.175.534

doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.301rus

**КОРТИЗОЛ КАК МАРКЕР ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССА  
У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ (*Bos taurus*)**А.И. АБИЛОВ<sup>1</sup>, А.А. ГУДИЛИНА<sup>1</sup>, Н.А. КОМБАРОВА<sup>2</sup> , В.В. ТУРБИНА<sup>1</sup>,  
Ю.А. КОРНЕЕНКО-ЖИЛЯЕВ<sup>1</sup>

Эндокринный механизм стресса у животных до сих пор окончательно не выяснен. Социальный стресс из-за иерархии в стаде увеличивает выработку кортизола, катехоламинов, может влиять на половое поведение и фертильность, снижать продуктивность. Несмотря на огромное значение проблемы для племенных предприятий, занимающихся получением и криоконсервацией спермы сельскохозяйственных животных в коммерческих и научных целях, нет специальных исследований, посвященных связи качественных и количественных характеристик эякулята и оплодотворяющей способности сперматозоидов с уровнем постэякулятивного кортизола. В представленной работе мы впервые показали, что результативность искусственного осеменения прямо пропорциональна концентрации кортизола в сыворотке крови быков-производителей после эякуляции. У молодых быков-производителей доминировал стресс, связанный с взятием крови, у взрослых особей половое возбуждение подавляло стресс от этой ветеринарной манипуляции. Впервые выявлена зависимость оплодотворяющей способности сперматозоидов крупного рогатого скота от уровня кортизола в сыворотке крови у быков-производителей после эякуляции. Мы определили динамику концентрации кортизола в крови 11 быков-производителей голштинской породы иностранной селекции в возрасте 29-71 мес (холдинг АО «ГЦВ», дочернее племенное предприятие АО «Уралплементр», Свердловская обл., 2018-2021 годы) после эякуляции при периодичности получения семени согласно установленной технологии и оценили влияние кортизола на оплодотворяющую способность полученных сперматозоидов после их криоконсервации. Как у молодых, так и у взрослых животных выявлена достоверная положительная динамика уровня кортизола при ежедневных ветеринарных манипуляциях по взятию крови в течение эксперимента. Средняя концентрация кортизола после эякуляции у молодых производителей ( $n = 6$ ) в условиях стресса, вызванного этими регулярными манипуляциями, увеличивалась равномерно и в дни трех последовательных дуплетных взятий семени с 4-5-суточными интервалами составила 70,8; 91,1 и 144,7 нмоль/л. У взрослых быков ( $n = 5$ ) старше 4 лет максимальный уровень кортизола (172,5 нмоль/л) зафиксирован после второго взятия семени, а к третьему отмечалось его незначительное снижение (на 5%). С ростом концентрации кортизола после эякуляции увеличивается количество выделенных сперматозоидов. У молодых быков после трех последовательных дуплетных взятий семени с 4-5-суточными интервалами за одну эякуляцию получили соответственно 4,0; 5,5 и 6,2 млрд сперматозоидов, у производителей старше 4 лет — 6,6; 7,3 и 7,5 млрд сперматозоидов. При оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов крупного рогатого скота в зависимости от уровня кортизола в сыворотке крови после эякуляции лучшие результаты (59-60%,  $p < 0,001$ ) дали замороженные сперматозоиды из эякулята, получение которых сопровождалось значительным выбросом кортизола в кровяное русло (концентрацией 162-216 нмоль/л).

**Ключевые слова:** быки-производители, кортизол, эякуляция, спермопродукция, стресс, искусственное осеменение.

При современных интенсивных технологиях, предполагающих узкую специализацию хозяйств и высокую плотность размещения поголовья, в большинстве случаев создаются условия, не отвечающие эволюционно сложившимся физиологическим особенностям domesticированных животных. Как следствие, обеспечение благополучия животных, в частности отсутствие хронического стресса, приобретает все большее значение. Стресс определяют как результат воздействия, создающего нагрузку на биологическую систему (1). Стрессы могут быть вызваны физическими (жара, шум, транспортировка, ограничение корма) и психологическими (отъем от матери, изоляция, перемещение из группы в группу) причинами (2, 3). Действие эндогенных и экзогенных стресс-факторов различается как по продолжительности, так и по характеру (4, 5).

R. Collier с соавт. (6) считают, что стресс вызывает у животных поведенческие, метаболические и физиологические изменения. При стрессе организм использует внутренние резервы, что служит защитной реакцией,

позволяющей пережить неблагоприятный период, во время которого происходят физиологические модуляции в работе нервной системы и включаются различные эндокринные реакции (7, 8).

До сих пор окончательно не выяснен эндокринный механизм стресса и его влияния на взаимодействие организма с окружающей средой (9). Экзогенные факторы (климат, условия кормления, содержание и промышленное использование животных) считаются основными источниками стресса, способными вызвать различные эпигенетические модификации признаков (10). Длительное или интенсивное воздействие стрессовых факторов физической, психологической либо иной природы вызывает избыточную ответную реакцию организма, при которой основные адаптивные эффекты трансформируются в повреждающие, а в сочетании с генетическими факторами приводят к ускорению и качественному искажению естественных механизмов биологического старения, формированию соматической патологии и даже к преждевременной смерти (11, 12).

Показано, что социальный стресс из-за иерархии в стаде активирует ось коры надпочечников, увеличивает выработку кортизола, катехоламинов и в долгосрочной перспективе может влиять на фертильность, подавлять иммунитет, вызывать неврологическую дисфункцию (13) и снижать продуктивность (14). При стрессе активность полового поведения угнетается и даже полностью подавляется, что обусловлено снижением секреции гонадотропинов гипофизом и зависит от гипоталамических релизинг-факторов. Продолжительный стресс приводит к серьезным нарушениям половой функции (15-19) вплоть до бесплодия (17, 20), вызывает физиологические изменения и снижает резистентность организма (18, 19, 21), активирует механизмы окисления, и половые клетки повреждаются агрессивными свободными радикалами (22).

Стресс провоцирует выработку глюкокортикоидов, которые влияют на обмен веществ и снижают чувствительность тканей к половым гормонам. У самцов хронический стресс приводит к истощению гонад, уменьшению продукции тестостерона и развитию вторичного бесплодия (23, 24). Наблюдаемое при стрессе уменьшение концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) приводит к нарушению сперматогенеза, замедлению дифференцировки и пролиферации клеток Сертоли и, как следствие, к осложнениям на поздних стадиях сперматогенеза. Со снижением уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) связано уменьшение синтеза тестостерона в клетках Лейдига. При этом формируется гипогонадотропный синдром (вторичный гипогонадизм), что провоцирует истощение резервных возможностей гонад (23, 24).

Кортизол рассматривают в качестве биомаркера стресса. По данным ряда авторов, как в целом у млекопитающих (23, 24), так и у быков-производителей (25) гормоны гипоталамо-гипофизарно-гонадной и тиреоидной эндокринной регуляции могут служить главным инструментом адаптации. Основной нейроэндокринной системой, которая контролирует реакции на стресс и регулирует многие процессы в организме, включая пищеварение, половые функции, накопление и расходование энергии, служит гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, обеспечивающая согласованное взаимодействие между железами, гормонами и частями среднего мозга, которые опосредуют общий адаптационный синдром (26, 27).

Когда адаптивные механизмы больше не могут справиться со стрессом, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось побуждает гипоталамус секретировать кортикотропин-релизинг-гормон и вазопрессин (28). Они, в свою очередь, индуцируют высвобождение гипофизом адренокорти-

котропного гормона (АКТГ). Под его влиянием в пучковой зоне коры надпочечников (*zona fasciculata*) из холестерина синтезируются глюкокортикоиды, в основном кортизол, который затем секретируется в кровоток (29-31). Факторы, стимулирующие высвобождение кортизола, — это стресс, гипогликемия и физические нагрузки. Все виды физического и психоэмоционального стресса через несколько минут от начала могут привести к экстремальному увеличению секреции АКТГ и, соответственно, кортизола. Эти реакции способны нивелировать воздействие системы отрицательной обратной связи и суточного ритма. Таким образом, физиологическая гиперсекреция кортикотропин-рилизинг-гормона и усиление функции всей гормональной оси гипоталамус—гипофиз—кора надпочечников возникает в стрессовых ситуациях либо при повышенной активности (32).

Кортизол, в свою очередь, связывается с глобулинами плазмы крови и особенно с альбумином и кортикостероид-связывающим глобулином (КСГ) и транспортируется системой кровообращения (33). Эффект воздействия кортизола зависит от того, как долго и в каком количестве секретируется кортизол, какое количество связывающих глобулинов присутствует в периферической крови, сколько рецепторов в тканях-мишенях, до какой степени подверглись расщеплению метаболиты глюкокортикоидов (34). При высоких концентрациях кортизола дальнейшее высвобождение кортизола корой надпочечников ингибируется по механизму отрицательной обратной связи с участием гипоталамуса и передней доли гипофиза, тем самым прекращается реакция на стресс (35).

Кортизол достаточно липофилен, чтобы проникнуть через плазматическую мембрану клеток-мишеней, он связывается с внутриклеточными глюкокортикоидными рецепторами, и образующиеся комплексы перемещаются в ядро, где они могут либо усиливать, либо уменьшать экспрессию различных генов.

Таким образом, кортизол может влиять на многие важные биохимические функции, включая высвобождение АКТГ, синтез ферментов, связанных с глюконеогенезом, расщепление мышечных белков, липолиз (29, 36).

К высокому уровню циркулирующего кортизола может привести длительный стресс. При этом возникает сложный гормональный каскад и надпочечники выделяют кортизол, который стимулирует поступление глюкозы как источника быстрой энергии для крупных мышц в реализации реакции на стресс. Надпочечники увеличивают секрецию кортизола в первую стадию развития стресса (стадия тревоги) в течение первых 6-48 ч под влиянием адреналина и норадреналина. На второй стадии (резистентность) высокий уровень кортизола сопровождается функциональными перестройками, обеспечивающими адаптацию к стрессору. Истощение коры надпочечников и, как следствие, снижение уровня кортизола наступает на третьей стадии, при этом опиоидные пептиды переводят организм в режим максимального энергосбережения (37).

Кортизол препятствует действию инсулина, по сути, делая клетки устойчивыми к нему. Организм остается резистентным к инсулину, когда уровень кортизола хронически повышен. Со временем поджелудочная железа с трудом справляется с высокой потребностью в инсулине, при этом уровень глюкозы в крови остается высоким, а клетки не могут получать необходимый им сахар (38).

Изменения обмена веществ, возникающие под влиянием кортизола, обуславливают успешную адаптацию к стрессу. При стрессе нервной ткани требуется большое количество энергии, которое обеспечивается синтезом глюкозы за счет неуглеводных субстратов (39). Часть белков скелетной

мускулатуры под действием кортизола распадается до начальных компонентов, из которых синтезируется глюкоза. В этом заключается катаболическое действие гормона, которое в период адаптации к стрессору помогает эффективно распределять энергетические ресурсы организма (40). Вместе с тем длительное сохранение такой перестройки обмена веществ негативно влияет на организм, потому существуют физиологические механизмы торможения синтеза кортизола. Они включают прежде всего уменьшение выработки кортиколиберина под действием самого кортизола (отрицательная обратная связь) и одновременное образование надпочечниками другого стероидного гормона — дегидроэпиандростерона (ДГЭА), который оказывает противоположное кортизолу действие. Постоянное содержание в крови определенного количества ДГЭА предотвращает развитие психологической дезадаптации и индуцируемых стрессом заболеваний (41).

Для кортизола как гормона стресса характерен циркадный ритм с повышением концентрации в утренние часы (25, 42, 43), доказана сложная взаимосвязь между сбоем циркадных ритмов и метаболизмом. Изменение цикла сон—бодрствование может привести к формированию метаболического синдрома (44).

Известно, что кортизол в плазме присутствует в трех формах. Основная часть (80-90 %) связана с кортикостероид-связывающим белком транскортином (альфа-2-глобулином), некоторое количество связано с альбумином, и менее 10 % гормона — это свободно циркулирующий кортизол. Биологическая активность кортизола обусловлена его свободной формой, которая непосредственно может воздействовать на клетки-мишени (36)

Кортизол и другие глюкокортикоиды у крупного рогатого скота регулируют баланс между анаболизмом и катаболизмом, а в условиях теплового стресса снижают экспрессию липопротеинлипазы, отвечающей за липолиз, снижают активность углеводного обмена, число лейкоцитов периферической крови, а также изменяют экспрессию генов, связанных с гликолизом и индуцированным инсулином усвоением глюкозы. Высокое содержание кортикотропин-рилизинг-гормона в тканях вне головного мозга может оказывать мощное воспалительное действие (1, 29).

При промышленном содержании крупного рогатого скота повышенная концентрация кортизола выявлена при кастрации бычков без местной анестезии (45), при мастите (46), при воспалительных заболеваниях копыт (47), при стрессе, вызванном вынужденным лежанием (48). У крупного рогатого скота длительное увеличение концентрации кортизола приводит к повышению уровня сахара в крови и развитию сахарного диабета, которым чаще болеют молодые животные (49). Также выявлена более высокая концентрация кортизола в сыворотке крови у коров с отрицательным энергетическим балансом по сравнению с коровами, получающими рацион *ad libitum* (50). У высокопродуктивных молочных коров ответная реакция на введение адренкортикотропного гормона в отношении синтеза кортизола менее выражена, чем у низкопродуктивных. Одной из причин лактационного кетоза может быть проблема с синтезом кортизола, когда потребность в энергии возрастает в период пиковой лактации (51). Низкий уровень кортизола выявлен у коров, страдающих спонтанным кетозом (52). В то же время у этих животных не была зафиксирована гипогликемия (53).

Отмечены эффекты кортизола в отношении адгезии и миграции лейкоцитов, а у хряков-производителей (независимо от породы) при снижении концентрации кортизола уменьшалось число сегментоядерных нейтрофилов (54). Увеличение концентрации кортизола в сыворотке крови ассоциируется с гипертриглицеринемией, усилением белково-липидного и углевод-

ного обменов (19).

Интересно влияние АКТГ на гонады: с одной стороны, гормон неспецифичен и способствует синтезу тестостерона в клетках Лейдига, а с другой стороны, он ингибирует его выделение. Этим объясняется феномен подавления секреции андрогенов у самцов в условиях нейрогенного стресса (55).

Глюкокортикоиды угнетают репродуктивную функцию у большинства изученных видов домашних животных (56). Высокая плотность посадки (1,2 м<sup>2</sup> на животное) приводит к резкому повышению концентрации кортизола в сыворотке крови быков и отставанию в росте по сравнению с особями, которые содержатся в более просторных стойлах (4,2 м<sup>2</sup> на животное).

При половой активности у мужчин установлена положительная взаимосвязь между содержанием кортизола и тестостерона при одновременном повышении их концентрации (57, 58). У взрослых самцов макак-резус в плазме крови после полового акта или в контроле (без эякуляции) средняя концентрация тестостерона и лютеинизирующего гормона существенно не повышалась, тогда как кортизола — увеличивалась в обоих случаях (59).

Сезонность выброса кортизола после электроэякуляции наблюдали у сирийских баранов породы авасси. Кортизол достигал максимальной концентрации через 20 мин после электроэякуляции без существенной разницы между двумя сезонами (60). Обнаружено повышение уровня кортизола во время возбуждения и эякуляции, а также после электроэякуляции на анестезированных животных в рутинной практике сбора семени у мясных быков (56). У лошадей и ослов концентрация кортизола скачкообразно возрастала через 30 мин после эякуляции (61, 62).

Таким образом, кратковременные выбросы кортизола необходимы, чтобы оправиться от последствий стресса и повысить уровень сахара как энергетического субстрата, в то время как чрезмерная половая нагрузка истощает пул гормонов и питательных веществ, одновременно увеличивая количество побочных продуктов метаболизма и гормонов стресса.

Несмотря на большой интерес к теме, нет специальных исследований, посвященных влиянию постэякулятивного кортизола на качественные и количественные характеристики эякулята и оплодотворяющую способность сперматозоидов. Проблема имеет огромное значение для племенных предприятий, занимающихся получением и криоконсервацией спермы сельскохозяйственных животных в коммерческих и научных целях, но остается малоизученной.

В представленной работе нами впервые выявлено, что результативность искусственного осеменения прямо пропорциональна концентрации кортизола в сыворотке крови быков-производителей после эякуляции. Также показано, что у молодых быков-производителей доминировал стресс, связанный с взятием крови, тогда как у взрослых особей половое возбуждение подавляло стресс от этой ежесуточной манипуляции.

Цель исследования — определить динамику концентрации кортизола в крови быков-производителей голштинской породы разных возрастных групп после эякуляции при периодичности получения семени согласно установленной технологии и оценить влияние кортизола на оплодотворяющую способность полученных сперматозоидов после их криоконсервации.

*Методика.* Работу выполняли в холдинге АО «ГЦВ» на дочернем племенном предприятии АО «Уралплемцентр» (Свердловская обл., 2018–2021 годы). Для ежесуточного определения концентрации кортизола в крови

отобрали 11 быков-производителей голштинской породы иностранной селекции в возрасте 29-71 мес. Животные имели нормальную заводскую кондицию, спокойный темперамент.

Кормление, содержание и эксплуатация быков-производителей соответствовали «Национальной технологии замораживания и использования спермы племенных быков-производителей» (63). В I группу ( $n = 6$ ) отобрали молодых животных 29-36-месячного возраста, во II группу ( $n = 5$ ) — быков старше 4 лет. Животные находились в одинаковых условиях с аналогичной половой нагрузкой. Длительность непрерывного эксперимента составила 14 сут.

Венозную кровь для контроля уровня кортизола брали ежедневно (кроме субботы и воскресенья) в течение 2 нед утром в одно и то же время (между 11<sup>00</sup> и 12<sup>00</sup>). Семя (за время эксперимента от 7 до 8 эякулятов от каждого быка) получали дуплетной садкой дважды в неделю согласно технологическому графику, не ранее чем за 30 мин до взятия крови.

Образцы крови (2018 год) отбирали в одноразовые вакуумные пробирки VacPlus с трикальевой солью EDTA («Shandong Chengwu Medical Products Factory», Китай). Сыворотку отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин, надсадок переносили в криопробирки объемом 20 мл и хранили в морозильной камере (от  $-18$  до  $-20$  °C) до передачи в лабораторию для определения эндогенных гормонов (2018 год). Концентрацию кортизола измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов согласно протоколу производителя (ЗАО «Иммунотех», г. Москва) на спектрофотометре УниПлан (АФГ-01) (ЗАО «Пикон», Россия) в 2-кратной аналитической повторности.

Эякуляты, полученные в дуплетных садках (2018 год), оценивали на соответствие установленным требованиям (ГОСТ 23745-2014 на сперму быков неразбавленную). Эякуляты, соответствующие стандартам, разбавляли криопротектором ORTIXcell («IMV Technology», Франция), фасовали в пайеты объемом 0,25 мл и криоконсервировали на оборудовании компании «IMV Technology» (Франция) в соответствии с протоколом производителя. Замороженные спермодозы хранили в жидком азоте при  $-196$  °C. После исследования на биологическую полноценность и бактериальную безопасность их по окончании карантинного периода (28 сут) использовали для осеменения коров в хозяйствах Свердловской области (2019-2021 годы).

Перед осеменением пайету оттаивали в течение 10 с при  $+38$  °C в водяном термостате (ПК «Венера-Вет», Россия).

После синхронизации охоты, коров осеменяли 2-кратно ректо-цервикальным способом, вводя биоматериал в шейку матки на глубину 6-8 см (инструмент ШО-3, Россия).

Исследование на стельность проводили на 45-е сут после осеменения УЗИ-сканированием с помощью портативного аппарата ультразвукового сканирования Easi-scan («BCF Technology», Шотландия) трансректальным методом. Под ручным контролем в прямую кишку коровы вводили УЗИ-датчик. Во время работы сканера при частоте 5 МГц действующую поверхность датчика направляли сначала в участок мочевого пузыря, затем отводили датчик вправо вперед и получали изображение матки. У стельных коров рога матки были приоткрыты, также визуализировались котиледоны плаценты. С 35-45-х сут стельности вокруг эмбриона определялись дугообразные эхопозитивные линии околоэмбриональной оболочки. Повторно стельность определяли на 60-е сут ректальным исследованием и вычисляли процент плодотворных осеменений.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием

компьютерной программы Microsoft Excel 2010. В таблицах приведены средние значения ( $M$ ) и ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Статистическую достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента (при уровнях значимости  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

**Результаты.** Все физиологические процессы подвержены биоритмам, которые предопределены генетически и регулируются нейрогуморально (25, 42). Поиск надежных и доступных индикаторов биоритмов и физиологического состояния организма остается актуальной проблемой (64). Известно, что основные гормоны стресса — кортикостероиды, в частности кортизол с циркадным ритмом синтеза и пиком концентрации с 6<sup>00</sup> до 8<sup>00</sup>. Биологической активностью обладает только свободная форма кортизола, которая составляет менее 10 % от его общего количества (65). Уровень кортизола можно определять в различных биологических жидкостях, тканях и даже в экскрементах. Считается, что содержание кортизола в слюне коррелирует с аналогичным показателем для свободного кортизола в плазме и сыворотке крови. Количественный анализ кортизола в волосах — метод ретроспективной оценки хронического стресса (66).

Для поставленных целей (определение пиков кортизола у быков-производителей в течение 30 мин после эякуляции), по нашему предыдущему опыту, наиболее подходящей биологической жидкостью является сыворотка венозной крови, несмотря на стресс, вызываемый отбором образцов.

В таблице 1 представлена вариабельность концентрации свободного кортизола у всех быков-производителей в эксперименте.

**1. Индивидуальная вариабельность концентрации кортизола (нмоль/л) в сыворотке крови у 11 голштинских быков-производителей (*Bos taurus*) в зависимости от возраста ( $n = 11$ ,  $M \pm SEM$ , холдинг АО «ГЦВ», дочернее племенное предприятие АО «Уралплементр», Свердловская обл., 2018 год)**

Уровень гормона	Возраст, мес										
	29	30	30	30	34	36	49	50	67	67	71
1	91,5±19,3	74,8±10,3	149,4±21,9	55,1±10,1	166,1±29,4	83,7±9,4	206,6±27,3	167,8±16,8	138,8±31,9	210,8±15,1	253,2±20,3
2	42	34,3	70,8	28	71,1	49,5	129,4	107,3	101,1	160,7	152,3
3	197,8	118,3	253,4	105,0	333,3	126,8	329,6	229,7	183,4	299,5	339

Примечание. 1 — среднее из 7-8 проб, 2 и 3 — соответственно минимальная и максимальная концентрация кортизола, нмоль/л.

Для определения посуточной динамики количества эндогенных гормонов за время опыта от каждого быка всего получали по 7-8 образцов крови. Из таблицы 1 видно, что концентрация кортизола не имеет прямой линейной зависимости от возраста быка-производителя и скорее обусловлена индивидуальной особенностью организма, однако с возрастом концентрация гормона увеличивается. Так, у молодых животных ( $n = 6$ ) в возрасте 29-36 мес уровень свободного кортизола варьировался от 28,0 до 333,3 нмоль/л со средними значениями от 55,1±10,1 до 149,4±21,9 нмоль/л. У быков старше 4 лет (49-71 мес) концентрация кортизола оказалась примерно в 2 раза выше, чем у молодых, в среднем от 138,8±31,9 до 253,2±20,3 нмоль/л с вариацией от 101,1 до 339 нмоль/л.

Отбор крови для животных — своеобразный эмоционально-болевого стресс. В нашем опыте такие ежесуточные манипуляции в течение 2 нед можно трактовать как пролонгированный привычный стресс. За этот период у быков-производителей трижды брали семя согласно установленному графику. В таблице 2 приведены средние значения концентрации кортизола в сыворотке крови на даты взятия семени у быков-производителей младшей

и старшей возрастных групп. Как видно из таблицы 2, изначально и на всех этапах эксперимента концентрация эндогенного кортизола у старшей возрастной группы производителей была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у младшей возрастной группы.

**2. Концентрация кортизола в сыворотке крови (нмоль/л) у голштинских быков-производителей на дату эксплуатации при дуплетном взятии семени в зависимости от возраста и продолжительности стресса ( $n = 11$ ,  $M \pm SEM$ , холдинг АО «ГЦВ», дочернее племенное предприятие АО «Уралплементр», Свердловская обл., 2018 год)**

Группа	Средний возраст, мес	1-е взятие семени (контроль)	2-е взятие семени; стресс 4-5 сут	3-е взятие семени, стресс 7-8 сут
I ( $n = 6$ )	31,6±1,1	70,8±14,6	91,6±19,5	144,7±38,1
II ( $n = 5$ )	60,8±4,7	153,1±20,7*	172,5±20,5*	163,8±36,5*

Примечание. I группа — молодые быки 29-36-месячного возраста, II группа — быки старше 4 лет.  
\* Различия с I группой статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Эмоционально-болевым стресс на 4-5-е сут ветеринарных манипуляций по взятию крови вызвал повышение концентрации кортизола у молодых животных на 23 %, у взрослых животных — на 11,3 %, что характеризуется как стадия мобилизации адаптационных возможностей организма. На этой стадии активизируется работа гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, возрастает уровень кортизола в крови, начинают преобладать процессы катаболизма для повышенного энергетического обеспечения нервной системы (1, 29, 67). При продолжении ветеринарных мероприятий по ежесуточному взятию крови в группе молодых животных концентрация кортизола выросла на 51 % и составила 144,7 нмоль/л против 70,8 нмоль/л в начале эксперимента. В группе взрослых производителей уровень кортизола снизился незначительно — на 4,8 % по сравнению со 2-м взятием.

В группе молодых животных продолжающееся действие стрессора формирует адаптивные механизмы, расход энергии становится меньше (8), однако количество вырабатываемых гормонов, в том числе кортизола, остается повышенным, тогда как в отношении взрослых животных можно сделать вывод, что адаптивные возможности их организма уже исчерпаны. Истощение надпочечников на этой стадии проявляется снижением уровня кортизола (68). Разница в концентрации эндогенного кортизола между группами молодых и взрослых производителей в начале эксперимента при первом взятии семени и крови составила 54 % ( $p < 0,05$ ). После второго взятия семени (на 4-5-е сут стрессовой нагрузки, связанной со взятием крови) разница между группами также была статистически значима и составила 47 % ( $p < 0,05$ ), к третьему, заключительному взятию семени (7-8-е сут) при непрерывных ежесуточных ветеринарных манипуляциях разница между группами сократилась до 12 % ( $p < 0,05$ ).

**3. Распределение (%) 96 образцов сыворотки крови по концентрации кортизола на дату взятия семени у голштинских быков-производителей разного возраста ( $n = 11$ , холдинг АО «ГЦВ», дочернее племенное предприятие АО «Уралплементр», Свердловская обл., 2018 год)**

Группа	Концентрация кортизола, нмоль/л					
	до 50	51-100	101-150	151-200	201-250	251 и выше
I ( $n = 6$ )	21,3	40,4	19,2	19,2	0	0
II ( $n = 5$ )	0	0	30,8	25,6	23,1	20,6

Примечание. I группа — молодые быки 29-36-месячного возраста, II группа — быки старше 4 лет.

Пробы крови 11 быков-производителей (всего 96) распределили в зависимости от возраста доноров (табл. 3). В I группу попали 47 образцов,

во вторую — 39 (средний возраст быков соответственно 31,6 и 60,8 мес). Таблица 3 наглядно демонстрирует процентные различия между группами по диапазону концентраций кортизола. Так, в I группе у молодых животных минимальная концентрация кортизола составила 28 нмоль/л, в то время как у быков старше 4 лет (II группа) зафиксировали минимальное значение 129,4 нмоль/л. Установлено, что в 62 % образцов сыворотки крови молодых быков-производителей концентрация кортизола не превышала 100 нмоль/л, и только для 38 % образцов составила от 101 до 200 нмоль/л. За время проведения эксперимента в течение 2 нед у молодых животных содержание кортизола выше 201 нмоль/л не регистрировали, тогда как у 44 % образцов сыворотки крови взрослых быков-производителей его концентрация превысила 201,0 нмоль/л.

Мы сопоставили средние концентрации кортизола на дату взятия семени с числом сперматозоидов в эякуляте и числом выбракованных эякулятов у молодых и взрослых животных за все время эксперимента (табл. 4).

**4. Концентрация кортизола (нмоль/л) в сыворотке крови на дату взятия семени и качество эякулятов в течение эксперимента у голштинских быков-производителей разного возраста ( $n = 11$ ,  $M \pm SEM$ , холдинг АО «ГЦВ», дочернее племенное предприятие АО «Уралплементр», Свердловская обл., 2018 год)**

Группа	1-е взятие (контроль)	2-е взятие, стресс 4-5 сут	3-е взятие, стресс 7-8 сут
Концентрация кортизола после эякуляции, нмоль/л:			
I ( $n = 6$ )	70,8±14,6	91,6±19,5	144,7±38,1
II ( $n = 5$ )	153,1±20,7*	172,5±20,7*	163,8±36,5*
Число сперматозоидов в эякуляте, $\times 10^9$ :			
I ( $n = 6$ )	4,0±0,7	5,5±0,5	6,2±0,9
II ( $n = 5$ )	6,6±1,3	7,5±1,3	7,3±1,2
Выбраковано эякулятов, %:			
I ( $n = 6$ )	25,0±8,8	16,7±7,6	58,3±10,1
II ( $n = 5$ )	60,0±10,9*	30,0±10,25	20,0±8,9*

Примечание. I группа — молодые быки 29-36-месячного возраста, II группа — быки старше 4 лет.  
\* Различия между группами статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Наибольшее число эякулятов, не соответствующих требованиям ГОСТ 23745-2014 по активности (60,0±10,9 % от общего числа), получили в начале эксперимента в группе быков-производителей старше 4 лет (см. табл. 4). Уровень кортизола и число сперматозоидов в эякуляте этих животных было минимальным и составило соответственно 153,1±20,7 нмоль/л и 6,6±1,3 млрд. У молодых быков, наоборот, наибольшее число некачественных эякулятов (58 %) в связи с астеноспермией зарегистрировали в последние сутки эксперимента при максимальном числе сперматозоидов в эякуляте 6,2±0,9 млрд и уровне кортизола 144,7±38,1 нмоль/л, в 2 раза превышающем первоначальный. Разница между группами на эту дату была статистически значима ( $p < 0,05$ ).

Минимальное число выбракованных эякулятов у быков старше 4 лет отмечали в последние сутки эксперимента (20,0±8,9 % от общего числа), когда концентрация кортизола была на 5 % ниже максимальной. В группе молодых производителей наименьшее число выбракованных эякулятов получили при втором взятии семени (на 4-5-е сут стресса), концентрация кортизола в этом случае выросла на 23 % от начала эксперимента и составила 91,6±19,5 нмоль/л, но не достигла максимальных значений.

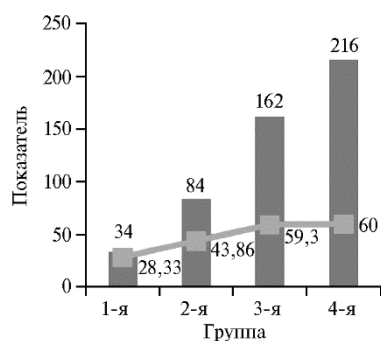
Возможно, у взрослых быков закрепленные условные половые рефлексы на взятие семени доминировали над краткосрочным стрессом от манипуляции по получению образцов крови, тогда как у молодых животных превалировал страх и стресс от ежесуточных ветеринарных манипуляций.

Отмечена прямая зависимость между числом эякулированных сперматозоидов и концентрацией кортизола в сыворотке крови после эякуляции

как у молодых, так и у взрослых быков-производителей.

Ранее было показано, что после дуплетной садки уровень кортизола у быков-производителей достоверно повышается в течение последующих 48 ч, особенно у животных в более возрастной группе (19). Аналогичные данные по увеличению концентрации кортизола после эякуляции у быков и хряков получены в работах К.Е. Borg с соавт. (69) и Bishop J.D. с соавт. (70).

Хотя известно, что возбуждение и эякуляция в значительной степени регулируются гормональной системой, знаний о влиянии уровня гормонов при эякуляции на оплодотворяющую способность сперматозоидов еще недостаточно. В нашем опыте эякуляты, в которых качественные и количественные характеристики семени соответствовали требованиям ГОСТ 26030-2015, были разбавлены, расфасованы, заморожены согласно национальной технологии (63) и использованы для искусственного осеменения коров в хозяйствах Свердловской области. Мы оценили результативность осеменений в зависимости от концентрации кортизола в сыворотке крови быков-производителей после эякуляции (рис.).



**Результативность искусственного осеменения коров (стельность, %; график) в зависимости от уровня кортизола в крови голштинских быков-производителей после эякуляции (нмоль/л, диаграмма): 1, 2, 3, 4 — группы быков в зависимости от концентрации кортизола после эякуляции (соответственно 22-45, 61-107, 140-216 и 216 нмоль/л) (хозяйства Свердловской области, 2019-2020 годы).**

Все производители были условно поделены на четыре группы в зависимости от концентрации кортизола после эякуляции. В 1-ю группу вошли молодые производители с уровнем кортизола 22-45 нмоль/л, всего их семенем покрыли 60 коров, из которых только 28,3 % оказались стельными. Во 2-ю группу отобрали производителей с уровнем гормона 61-107 нмоль/л, их семенем покрыли 57 коров, из них 43,9 % результативно ( $p < 0,01$  для различий с 1-й группой). В 3-ю группу вошли производители старше 60 мес с концентрацией кортизола от 140 до 216 нмоль/л, всего было осеменено 87 коров с результатом 59,3 % ( $p < 0,001$  для различий с 1-й группой). Разница между 1-й и 2-й, 2-й и 3-й группами составила соответственно 15,6 и 15,4 %. В 4-й группе у производителя старше 60 мес концентрация кортизола после эякуляции составила 216 нмоль/л, его закрепили за 20 матками, из них 60 % были плодотворно осеменены.

Отметим, что результативность искусственного осеменения оказалась прямо пропорциональна концентрации кортизола в сыворотке крови быков-производителей после эякуляции. Считаем, что количественные и качественные показатели семени у быков-производителей обусловлены как генотипом, так и индивидуальными особенностями метаболизма и гормонального статуса (25). Стимулы, вызванные стрессом полового возбуждения, последующей садки и эякуляции, передают сигналы в гипоталамус. Образующийся кортикотропин-рилизинг гормон направляется в гипоталамо-гипофизарную портальную систему, и в течение нескольких минут в крови появляется большое количество кортизола, что способствует мобилизации энергии и делает глюкозу более доступной для различных функций обмена веществ. Возможно, более высокий уровень кортизола в крови быков-производителей после взятия семени свидетельствует о сильном половом

возбуждении, которое можно расценить как положительную эмоцию с од- новременной значительной физической нагрузкой, сопровождающей садку и эякуляцию. В этом случае эякуляты наиболее сбалансированы за счет гармоничного сочетания секретов добавочных половых желез, а следо- вательно, наиболее полноценны и богаты углеводами, что лучше обеспечи- вает энергетический запас сперматозоидов и, как следствие, положительно влияет на результативность осеменения. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими экспериментами (25), а также исследованиями, про- веденными на мужчинах, у которых установлена положительная взаимосвязь между содержанием кортизола и тестостерона (57, 58). Сходные результаты получены у быков мясных пород (56), у лошадей и ослов (61, 62).

Итак, при стрессе от ежесуточного взятия крови у молодых произ- водителей ( $n = 6$ ) средняя концентрация кортизола после эякуляции равно- мерно увеличивалась в течение эксперимента, составив в дни трех после- довательных дуплетных взятий семени с 4-5-суточными интервалами со- ответственно 70,8; 91,1 и 144,7 нмоль/л. У быков старше 4 лет ( $n = 5$ ) после второго взятия семени зафиксирован максимальный уровень корти- зола (172,5 нмоль/л), но к третьему он незначительно (на 5 %) снижался. У молодых быков в 61,7 % образцов крови концентрация кортизола составила 100 нмоль/л и только в 19,2 % — до 150 нмоль/л. У производителей старше 4 лет в 30,8 % образцов крови концентрация кортизола находилась в пре- делах от 101 до 150 нмоль/л, остальные 69,2 % образцов варьировались по этому показателю от 151 до 251 нмоль/л и выше. С ростом концентрации кортизола после эякуляции увеличивается число сперматозоидов на эяку- лят. У молодых быков в трех последовательных дуплетных взятиях семени с 4-5-суточными интервалами оно составило соответственно 4,0; 5,5 и 6,2 млрд сперматозоидов, у взрослых производителей — 6,6; 7,3 и 7,5 млрд сперматозоидов. Доля эякулятов, отбракованных вследствие астеноспер- мии, не имеет прямой зависимости от уровня кортизола в крови после эяку- ляции. У молодых быков минимальное число отбракованных эякулятов (16,7 %) получено при среднем уровне кортизола  $91,6 \pm 19,5$  нмоль/л, у бы- ков старшего возраста (20,0 %) — при концентрации кортизола  $163,8 \pm 36,5$  нмоль/л. В то же время результативность осеменения прямо зависит от уровня кортизола после эякуляции: максимальный процент стельностей (59,3-60 %) отмечен при использовании семени быков с концентрацией кортизола 162 нмоль/л и выше. По нашему мнению, необходимы более детальное исследование физиологии половых рефлексов и их влияния на качественные и количественные характеристики эякулята, его сбаланси- рованность по пропорциям секретов добавочных половых желез и устойчи- вость к криоконсервации. Возможно, анализ содержания стероидных гор- монов в момент и после эякуляции поможет объяснить причину астено- спермии в одном из эякулятов при дуплетной садке. Это позволит скоррек- тировать протоколы использования племенных быков и сократить число эякулятов, подлежащих выбраковке.

*<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60, e-mail: ahmed.abilov@mail.ru, v.turbina@oaohcr.ru, serafima\_venera@mtu-net.ru, info@vij.ru;*

*<sup>2</sup>АО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», 142143 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Быково, ул. Центральная, 3, e-mail: komnina@list.ru ✉, csio-secr@yandex.ru*

*Поступила в редакцию  
5 октября 2023 года*

## CORTISOL AS A MARKER OF PHYSIOLOGICAL STRESS IN *Bos taurus* SIREs

A.I. Abilov<sup>1</sup>, A.A. Gudilina<sup>1</sup>, N.A. Kombarova<sup>2</sup>✉, V.V. Turbina<sup>1</sup>,  
Yu.A. Korneenko-Zhilyaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail ahmed.abilov@mail.ru, v.turbina@oaochr.ru, serafima\_venera@mtu-net.ru, info@vij.ru;

<sup>2</sup>Head Center for Reproduction of Farm Animals AO, 3, ul. Tsentralnaya, pos. Bykovo, Podolsk Region, Moscow Province, 142143 Russia, e-mail komnina@list.ru (✉ corresponding author), csio-secr@yandex.ru

ORCID:

Abilov A.I. orcid.org/0000-0001-6236-8634

Turbina V.V. orcid.org/0000-0003-1039-0375

Kombarova N.A. orcid.org/0000-0003-3861-4465

Kornienko-Zhilyaev Yu.A. orcid.org/0000-0003-3554-2240

Gudilina A.A. orcid.org/0000-0002-7962-5315

The authors declare no conflict of interests

Final revision received October 5, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.301eng

Accepted November 3, 2023

### Abstract

The endocrine mechanism in animal stress has not yet been fully elucidated. Social stress due to hierarchy in the herd increases the production of cortisol, catecholamines, can affect sexual behavior and fertility, and reduce productivity. Despite the enormous importance of the problem for breeding enterprises involved in the production and cryopreservation of sperm of farm animals for commercial and scientific purposes, there are no special studies to investigate the connection of the qualitative and quantitative parameters of the ejaculate and its fertilizing ability with the post-ejaculatory cortisol level. In the presented work, we revealed for the first time that the effectiveness of artificial insemination is directly proportional to the concentration of blood cortisol in stud bulls after ejaculation. In young stud bulls, stress associated with blood sampling dominated; in adult bulls, sexual arousal suppressed stress caused by this veterinary manipulation. For the first time, we find out the dependence of the fertilizing capability of the bull sperm on the post-ejaculation blood cortisol level. We assessed the pattern of post-ejaculation cortisol concentration in 11 Holstein bulls of foreign selection aged 29–71 months (holding JSC GCV, a subsidiary breeding enterprise of JSC Uralplemtsentr, Sverdlovsk region, 2018–2021) which are exploited according to approved technology and determined the fertilizing rate of the cryopreserved resulting sperm as influenced by the blood cortisol level. In both young and adult animals, there was a significant positive dynamics of cortisol in response to blood sampling. The average blood cortisol concentration in young sires ( $n = 6$ ) under stress from this regular manipulation increased evenly and reached 70.8; 91.1 and 144.7 nmol/l on the days of three consecutive doublet collections of semen after 4–5-day intervals. In bulls ( $n = 5$ ) older than 4 years, the peak concentration of cortisol (172.5 nmol/l) occurred in the second semen collection, and by the third collection, there was a slight decrease in the cortisol level, by 5 %. As post-ejaculation blood cortisol increases, the number of spermatozoa per ejaculate increases. In young bulls, after three consecutive double collections of semen at 4–5 day intervals, 4.0, 5.5 and 6.2 billion spermatozoa per ejaculation were obtained, in sires over 4-year old, 6.6, 7.3 and 7.5 billion sperm. The sperm from sires with the highest post-ejaculation levels of cortisol released into the bloodstream (162–216 nmol/l) exhibited the best fertilizing rate, 59–60 % ( $p < 0.001$ ).

Keywords: sires, cortisol, ejaculation, sperm production, stress, artificial insemination.

### REFERENCES

1. Collier R.J., Renquist B.J., Xiao Y. A 100-year review: stress physiology including heat stress. *J. Dairy Sci.*, 2017, 100(12): 10367–10380 (doi: 10.3168/jds.2017-13676).
2. Lynch E.M. *Characterisation of Physiological and immune-related biomarkers of weaning stress in beef cattle. Ph.D. Thesis.* National University of Ireland, Maynooth, Ireland, 2010.
3. Brown E.J., Vosloo A. The involvement of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis in stress physiology and its significance in the assessment of animal welfare in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2017, 84(1): e1–e9 (doi: 10.4102/ojvr.v84i1.1398).
4. Yukomzan E.V. *E-Scio*, 2022, 1(64): 309–324 (in Russ.).
5. Kosyachenko N.M., Kononov D.V., Il'ina A.V., Kononov D.V. *Ispol'zovanie stressoustoychivosti i povedencheskikh funktsiy krupnogo rogatogo skota pri sovremennykh tekhnologiyakh proizvodstva moloka: monografiya* [Use of stress resistance and behavioral functions of cattle under modern milk production technologies: a monograph]. Yaroslavl', 2013 (in Russ.).
6. Collier R.J., Gebremedhin K.G. Thermal biology of domestic animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2015, 3(1): 513–532 (doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110659).

7. Etim N.N., Williams M.E., Evans E.I., Offiong E.E. Physiological and Behavioural Responses of Farm Animals to Stress: Implications to Animal Productivity *American Journal of Advanced Agricultural Research (AJAAR)*, 2013, 1(2): 53-61.
8. Bova T.L., Chiavaccini L., Cline G.F., Hart C.G., Matheny K., Muth A.M., Voelz B.E., Kesler D., Memili E. Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2014, 12: 58 (doi: 10.1186/1477-7827-12-58).
9. Kolesnikova L.R., Makarova O.A., Natyaganova L.V., Dolgikh M.I., Korytov L.I. *Acta Biomedica Scientifica*, 2018, 3(6): 15-22 (doi: 10.29413/ABS.2018-3.6.2) (in Russ.).
10. Shchuko A.G., Veselov A.A., Yur'eva T.N., Volkova N.V., Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Pochtarenko T.V. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 2017, 37(4): 26-36 (in Russ.).
11. Chu B., Marwaha K., Sanvictores T., Ayers D. *Physiology, stress reaction*. StatPearls Publishing, 2019.
12. Sharypova N.V., Sveshnikov A.A. *Polovaya funktsiya u muzhchin i sostoyanie menstrual'nogo tsikla u zhenshchin pri khronicheskom deystvii stress-faktorov chrezvychaynoy intensivnosti: monografiya* [Sexual function in men and the state of the menstrual cycle in women under chronic stress factors of extreme intensity: monograph]. Izdatel'skiy dom «Akademiya Estestvoznaniya», Penza, 2013 (in Russ.).
13. Sapolsky R.M. The influence of social hierarchy on primate health. *Science*, 2005, 308(5722): 648-652 (doi: 10.1126/science.1106477).
14. Val-Laillet D., de Passille A.M., Rushen J., von Keyserlingk M.A.G. The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 2008, 111(1): 158-172. (doi: 10.1016/j.applanim.2007.06.001).
15. Sel'e G. *Ocherki ob adaptatsionnom sindrome* [Essays on adaptation syndrome]. Moscow, 1960 (in Russ.).
16. Ernst L.K., Dzhaparidze T.G., Varnavskiy A.N. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*, 2008, 4: 5-8 (in Russ.).
17. Lenzi A., Lombardo F., Salacone P., Gandini L., Jannini E.A. Stress, sexual dysfunctions, and male infertility. *J. Endocrinol. Invest.*, 2003, 26(3 Suppl): 72-76.
18. Abilov A.I., Eskin G.V., Kombarova N.A. Blood estradiol level in bull sires influences sperm count and effectiveness of artificial insemination. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2016, 51(6): 830-836 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.830eng).
19. Abilov A.I., Mityashova O.S., Mymrin S.V., Gudilina A.A., Pyzhova E.A., Kombarova N.A., Levina G.N. Endogenous hormone level in bull sires in relation to age, autoimmune status, and production performance of maternal ancestors. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2018, 53(4): 743-752 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.743eng).
20. Silva W.C., Silva J.A.R., Camargo-Júnior R.N.C., Silva É.B.R., Santos M.R.P., Viana R.B., Silva A.G.M., Silva C.M.G., Lourenço-Júnior J.B. Animal welfare and effects of per-female stress on male and cattle reproduction — a review. *Front. Vet. Sci.*, 2023, 10: 1083469 (doi: 10.3389/fvets.2023.1083469).
21. Gusakova E.A., Gorodetskaya I.V. *Vestnik VGMU*, 2020, 19(1): 24-35 (doi: 10.22263/2312-4156.2020.1.24) (in Russ.).
22. Kovyazina N.A., Alkhutova N.A. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2019, 64(3): 140-144 (doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-3-140-144) (in Russ.).
23. Xiong X., Wu Q., Zhang L., Gao S., Li R., Han L., Fan M., Wang M., Liu L., Wang X., Zhang C., Xin Y., Li Z., Huang C., Yang J. Chronic stress inhibits testosterone synthesis in Leydig cells through mitochondrial damage via Atp5a1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022, 26(2): 354-363 (doi: 10.1111/jcmm.17085).
24. Al'-Shukri S.Kh., Borovets S.Yu., Toropov V.A. *Urologicheskie vedomosti*, 2016. VI(1): 21-28 (doi: 10.17816/uroved621-28) (in Russ.).
25. Abilov A.I., Kombarova N.A., Amerkhanov Kh.A., Shemetuk S.A., Shamshidin A.S., Mymrin S.V., Pyzhova E.A., Bogolyubova N.V., Gudilina A.A., Abilova S.F., Kombarov P.G., Mityashova O.S. Metabolic profiles and sperm production in imported holstein bull sires under different climatic and geochemical conditions of Russia and Kazakhstan. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2021, 56(4): 730-751 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.730eng).
26. Ermakova I.V. *Novye issledovaniya*, 2014, 4(41): 77-86 (in Russ.).
27. Malenka R.C., Nestler E.J., Hyman S.E. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience (2<sup>nd</sup> ed.)*. McGraw-Hill Medical, New York, 2009: 246-259.
28. Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda V., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S., Veissier I. Exploration of the hypothalamic—pituitary—adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 2007, 92(3): 317-339 (doi: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003).
29. Chen Y., Arsenault R., Napper S., Griebel P. Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. *Animals*, 2015, 5(4): 1268-1295 (doi: 10.3390/ani5040411).
30. Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 2016, 42(1): 15-31 (doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002).

31. Binsiya T., Sejian V., Bagath M., Krishnan G., Hyder I., Manimaran A., Lees A., Gaughan J., Bhatta R. Significance of hypothalamic—pituitary—adrenal axis to adapt to climate change in livestock. *International Research Journal of Agricultural and Food Sciences*, 2017, 2(1): 1-20.
32. Khol Dzh. E. *Meditsinskaya fiziologiya po Gaytonu i Kholu* [Medical physiology by Guyton and Hall]. 2-e izd. Moscow, 2018 (in Russ.).
33. Caldwell J.D., Jirikowski G.F. Sex hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin as major effectors of steroid action. *Steroids*, 2014, 81: 13-16 (doi: 10.1016/j.steroids.2013.11.010).
34. Burdick N.C., Randel R.D., Carroll J.A., Welsh T.H. Interactions between temperament, stress, and immune function in cattle. *International Journal of Zoology*, 2011, 2011: Article ID 373197 (doi: 10.1155/2011/373197).
35. Kim L.U., D'Orsogna M.R., Chou T. Onset, timing, and exposure therapy of stress disorders: mechanistic insight from a mathematical model of oscillating neuroendocrine dynamics. *Biology Direct*, 2016, 11: article number 13 (doi: 10.1186/s13062-016-0117-6).
36. Artemova E.V. *Ozhirenie i metabolizm*, 2017, 2017, 14(2): 48-52 (doi: 10.14341/omet2017248-52) (in Russ.).
37. Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Pey Zhan-ming, Kolar F., Zhang I., Portnichenko A.G., Vang Kh. *Vestnik RAMN*, 2012, 6: 73-92 (doi: 10.15690/vramn.v67i6.287) (in Russ.).
38. Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V. *Sakharnyy diabet*, 2014, 2: 29-34 (doi: 10.14341/DM2014229-40) (in Russ.).
39. Viru A., Viru M. Cortisol — essential adaptation hormone in exercise. *Int. J. Sports Med.*, 2004, 25(6): 461-464 (doi: 10.1055/s-2004-821068).
40. *Encyclopedia of human behavior (2nd ed.)*. V.S. Ramachandran (ed.). Academic Press, 2012.
41. Morozov V.N., Khadartsev A.A. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2010, XVII(1): 5-17 (in Russ.).
42. Suarez-Trujillo A., Hoang N., Robinson L., McCabe C.J., Conklin D., Minor R.C., Townsend J., Plaut K., George U.Z., Boerman J., Casey T.M. Effect of circadian system disruption on the concentration and daily oscillations of cortisol, progesterone, melatonin, serotonin, growth hormone, and core body temperature in periparturient dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2022, 105(3): 2651-2668 (doi: 10.3168/jds.2021-20691).
43. Fatima N., Rana S. Metabolic implications of circadian disruption. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 2020, 472(5): 513–526 (doi: 10.1007/s00424-020-02381-6).
44. Amstislavskaya T.G. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya*, 2008, 8(1-2/1): 2271-2279 (in Russ.).
45. Thüer S., Mellema S., Doherr M.G., Wechsler B., Nuss K., Steiner A. Effect of local anaesthesia on short- and long-term pain induced by two bloodless castration methods in calves. *Vet. J.*, 2007, 173: 333-342 (doi: 10.1016/j.tvjl.2005.08.031).
46. Huszenicza G., Jánosi S., Gáspárdy A., Kulcsár M. Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004, 82-83: 389-400 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.029).
47. Almeida P.E., Weber P.S., Burton J.L., Zanella A.J. Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, 34(1): 89-99 (doi: 10.1016/j.domaniend.2006.11.006).
48. Forslund K.B., Ljungvall O.A., Jones B.V. Low cortisol levels in blood from dairy cows with ketosis: a field study. *Acta Vet. Scand.*, 2010, 52(1): 31 (doi: 10.1186/1751-0147-52-31).
49. Ciobotaru E. Spontaneous diabetes mellitus in animals. In: *Diabetes mellitus — insights and perspectives*. O.O. Oguntibeju (ed.). Intech, 2013: 271-296 (doi: 10.5772/48170).
50. Beerda B., Kornalijnslipjer J.E., van der Werf J.T., Noordhuizen-Stassen E.N., Hopster H. Effects of milk production capacity and metabolic status on HPA function in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87(7): 2094-2102 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)70027-2).
51. de Boer G., Trenkle A., Young J.W. Glucagon, insulin, growth hormone, and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 1985, 68(2): 326-337 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(85)80829-8).
52. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th Edition*. Elsevier Saunders, London, 2007.
53. Moyes K.M., Drackley J.K., Salak-Johnson J.L., Morin D.E., Hope J.C., Looor J.J. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J. Dairy Sci.*, 2009, 92: 4301-4316 (doi: 10.3168/jds.2009-2170).
54. Dzhaparov E.K., Derkho M.A. *Uchenye zapiski KGAVM im. N.E. Bauman*, 2019, 3: 110-117 (doi: 10.31588/2413-4201-1883-239-3-110-117) (in Russ.).
55. Kubasov R.V. Gormonal'nye izmeneniya v otvet na ekstremal'nye faktory vneshney sredy *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*, 2014, 69(9-10): 102-109 (doi: 10.15690/vramn.v69i9-10.1138) (in Russ.).

56. Fernandez-Novo A., Pérez-Garnelo S.S., Villagrà A., Pérez-Villalobos N., Astiz S. The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle — a review. *Animals*, 2020, 10(11), 2096 (doi: 10.3390/ani10112096).
57. Kuznetsova E.A., Adamchik A.S., Goncharov N.P., Katsiya G.V. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*, 2016, 17(1): 26-31 (doi: 10.17650/2070-9781-2016-17-1-28-33) (in Russ.).
58. van der Meij L., Demetriou A., Tulin M., Méndez I., Dekker P., Pronk T. Hormones in speed-dating: the role of testosterone and cortisol in attraction. *Hormones and Behavior*, 2019, 116: 104555 (doi: 10.1016/j.yhbeh.2019.07.003).
59. Phoenix C.H., Dixon A.F., Resko J.A. Effects of ejaculation on levels of testosterone, cortisol, and luteinizing hormone in peripheral plasma of rhesus monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1977, 91(1): 120-127 (doi: 10.1037/h0077300).
60. Alomar M., Soukouti A., Alzoabi M.A., Zarkawi M. Testosterone and cortisol patterns and the effects of electro-ejaculation and copulation in Awassi rams. *Archives Animal Breeding*, 2016, 59(1): 139-144 (doi: 10.5194/aab-59-139-2016).
61. Veronesi M.C., Tosi U., Villani M., Govoni N., Faustini M., Kindahl H., Carluccio A. Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F(2 $\alpha$ ), luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and cortisol *Theriogenology*, 2010, 73(4), 460-467 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.09.028).
62. Veronesi M.C., De Amicis I., Panzani S., Kindahl H., Govoni N., Probo M., Carluccio A. PGF(2 $\alpha$ ), LH, testosterone, oestrone sulphate, and cortisol plasma concentrations around sexual stimulation in jackass. *Theriogenology*, 2011, 75(8): 1489-1498 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.010).
63. *Natsional'naya tekhnologii zamorazhivaniya i ispol'zovanie spermy plemennykh bykov-proizvoditeley / Pod redaktsiyey A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoy* [National technology of freezing and use of semen of bulls sires. A.I. Abilov, N.M. Reshetnikova (eds.)]. Moscow, 2008 (in Russ.).
64. Khabarov S.V., Sterlikova N.A. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2022, 29(3): 17-31 (doi: 10.24412/1609-2163-2022-3-17-31) (in Russ.).
65. Thun R., Eggenberger E., Zerobin K., Lüscher T., Vetter W. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*, 1981, 109(6): 2208-2212 (doi: 10.1210/endo-109-6-2208).
66. Lee D.Y., Kim E., Choi M.H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports*, 2015, 48(4): 209-216 (doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.275).
67. Lightman S.L., Birnie M.T., Conway-Campbell B.L. Dynamics of ACTH and cortisol secretion and implications for disease. *Endocrine Reviews*, 2020, 41(3): bnaa002 (doi: 10.1210/endrev/bnaa002).
68. Huang Y.M., Chi C.W., Wu P.S., Tai H.C., Chien M.N., Chen Y.J. Adrenal gland irradiation causes fatigue accompanied by reactive changes in cortisol levels. *J. Clin. Med.*, 2022, 11(5): 1214 (doi: 10.3390/jcm11051214).
69. Borg K.E., Esbenshade K.L., Johnson B.H. Cortisol, growth hormone, and testosterone concentrations during mating behavior in the bull and boar. *Journal of Animal Science*, 1991, 69(8): 3230-3240 (doi: 10.2527/1991.6983230x).
70. Bishop J.D., Malven P.V., Singleton W.L., Weesner G.D. Hormonal and behavioural correlates of emotional states in sexually trained boars. *Journal of Animal Science*, 77(12), 3339-3345 (doi: 10.2527/1999.77123339x).