РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ТРУДЫ

ВСЕРОССИЙСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Том XLIII

Боровск, 2004

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ТРУДЫ

ВСЕРОССИЙСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Том XLIII

ВНИИФБиП с.-х. животных

BIFIP

Боровск, 2004

УДК 636.084:577.1:579.6
ББК 45/46+28.9
Т 78

Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных. Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2004, т.43, 376 с.

Редакционная коллегия: Матвеев В.А., Тараканов Б.В., Черепанов Г.Г.

Адрес: 249013 Боровск, Калужской области, ВНИИФБиП
Телефон: (095) 546-34-15
Факс: (08438) 4-20-88

ISBN 5-901656-08-3

© Коллектив авторов
© ВНИИФБиП с.-х. животных

ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ И СУПЕРОВУЛЯЦИЯ: I. РЕГУЛИРОВАНИЕ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ВЫЗЫВАНИИ СУПЕРОВУЛЯЦИИ В СЕРЕДИНЕ ЛЮТЕАЛЬНОЙ ФАЗЫ ПОЛОВОГО ЦИКЛА

В.П. Рябых
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

Результаты исследований по изучению состояния популяции антральных фолликулов в яичниках коров и выяснению возможности регулирования фолликулогенеза в середине лютеальной фазы полового цикла в связи с вызыванием суперовуляции показали, что увеличение дозы ГСЖК, вводимой коровам-донорам, до 6000-7000 И.Е. не оказало положительного влияния на процесс фолликулогенеза, что свидетельствует о более сложных механизмах регулирования процессом фолликулогенеза, чем простое повышение уровня гонадотропинов в крови коров-доноров.

Отмечено, что популяция поверхностных антральных фолликулов в яичниках коров на 11-й день полового цикла достоверно многочисленнее в марте, чем в мае. Это различие обусловлено разной численностью популяций фолликулов диаметром 1-2 мм.

Установлено, что предварительное введение экзогенных гонадотропинов в лютеальную фазу цикла на фоне активно функционирующего желтого тела (7-й день цикла) не увеличивает к 10-му дню популяцию фолликулов диаметром 4-5 мм и 6-10 мм, тогда как достоверно увеличивает численность популяции мелких фолликулов (1-3 мм). Введение коровам препарата ХГ в период, предшествующий вызыванию суперовуляции, вызывает уменьшение численности нормальных фолликулов в яичниках обработанных коров за счет лютеинизации и атрезии фолликулов не зависимо от их размера, что приводит к снижению эффективности суперовуляции. Экзогенные гонадотропины, введённые животным в начальный период лютеальной фазы полового цикла (2-5-й дни), вызывают в яичниках коров рост популяции мелких антральных фолликулов и переход их в категорию фолликулов средних размеров, которые при вызывании суперовуляции на 10-й день полового цикла могут достигать предовуляторного состояния и овулировать. Этот установленный факт позволяет усовершенствовать схему вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота в середине лютеальной фазы с предобработкой животных гонадотропинами в начале полового цикла.

Введение

Основой для развития новых более сложных биоинженерных технологий получения животных с заданными признаками (трансгеноз и клонирование) послужила технология трансплантации эмбрионов. К настоящему времени технология трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота широко используется в практике сельского хозяйства. Однако отдельные этапы этой технологии до сих пор остаются недостаточно разработанными.

Одной из важнейших проблем в технологии трансплантации эмбрионов является получение достаточного количества полноценных эмбрионов. Известные методы вызывания суперовуляции у коров позволяют получать в среднем 2-4 полноценных эмбриона на одну гормональную обработку. Предполагается, что различия в реакции яичников коров на одну и ту же дозу гонадотропина обусловлены разным состоянием популяции антральных фолликулов в момент введения гонадотропинов. Ещё в 70-80-х годах появились статьи под заглавием: «Суперовуляция - предел для трансплантации?» (Saumande L. et al., 1977), «Внутрияичниковый контроль фолликулогенеза предел для суперовуляции» (Moor R. et al. 1984). В 1999 году вышла проблемная статья того же Мура с соавторами (Webb R. et al.,1999), в которой анализируются причины *отсутствия прогресса* в повышении выхода полноценных эмбрионов при вызывании суперовуляции у коров.

В начальный период разработки технологии трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота вызывание суперовуляции у коров проводили в фолликулярную фазу полового цикла, путём введения препаратов СЖК на 16-й день цикла. После открытия лютеолитического действия простагландина $F_{2\alpha}$ на желтое тело у крупного рогатого скота, наибольшее распространение получили различные варианты вызывания суперовуляции у коров-доноров в середине лютеальной фазы полового цикла (9-11-й день), что позволило до некоторой степени повысить эффективность этой реакции. Однако результаты многочисленных исследований показали, что при вызывании суперовуляции в лютеальную фазу полового цикла только часть коров-доноров хорошо реагирует на гормональную обработку и имеет высокую степень суперовуляции. Значительная часть коров плохо реагирует суперовуляцией на гормональную обработку, в связи с этим возникает необходимость в выяснении причин низкой ответной реакции и поиске путей регулирования процессом фолликулогенеза у крупного рогатого скота для повышения эффективности вызывания суперовуляции.

Основной причиной высокой вариабельности суперовуляции и низкого выхода полноценных эмбрионов, исходя из имеющихся

знаний, является большое разнообразие популяции антральных фолликулов в яичниках коров-доноров на момент начала стимуляции их экзогенными гонадотропинами с целью вызывания суперовуляции. Поэтому исследования, направленные на повышение эффективности суперовуляции, должны быть сосредоточены на разработке способов регулирования процесса фолликулогенеза, позволяющих создавать в яичниках коров-доноров к моменту гормональной обработки более многочисленную и однородную популяцию поверхностных антральных фолликулов. Только в этом случае может появиться возможность повысить эффективность суперовуляции.

Материал и методы

Принимая во внимание тот факт, что в яичниках коров содержится несколько десятков тысяч фолликулов, а при вызывании суперовуляции в лютеальную фазу полового цикла у значительной части коров образуется всего несколько желтых тел, была предпринята попытка вызвать у коров развитие большего числа фолликулов за счет увеличения дозы вводимых гонадотропинов. Для решения этой задачи была проведена первая серия опытов.

Группа коров и телок случного возраста в количестве 15 голов была обработана средней дозой ГСЖК (4000 И.Е.). По результатам вызванной суперовуляции все животные были разделены на 2 группы – с низкой реакцией (3,8±0,8) и с высокой (11,6±0,4 овуляций).

С целью повышения эффективности вызывания суперовуляции у животных с низкой реакцией были проведены повторные обработки их при последовательном увеличении дозы ГСЖК до 6000-7000 И.Е. на 1 донора. На животных с высокой реакцией яичников были испытаны как пониженные (2400 И.Е.), так и повышенные (6000 И.Е.) дозы препарата. Повторные гормональные обработки доноров обеих групп проводили, предварительно пропустив у них 2-3 полноценных половых цикла после извлечения эмбрионов от предыдущих гормональных обработок.

Вторая серия опытов, направленная на выяснение взаимосвязи между морфофункциональным состоянием яичников у крупного рогатого скота и уровнем половых гормонов в период, предшествующий вызыванию суперовуляции, была проведена на 20 выранжированных коровах с нормальной воспроизводительной функцией. Для удобства в работе отобранные для опыта животные были синхронизированы простагландином $F_{2\alpha}$. После прихода животных в охоту со 2-го по 10-й день полового цикла у них были взяты образцы крови для определения концентрации половых гормонов. На 11-й день полового цикла животные были убиты. Полученные от них яичники были исследованы визуально с целью

изучения популяции поверхностных фолликулов. Были определены их размер, количество и состояние.

Опыт был проведен в два этапа. Первые 10 коров находились под опытом в марте (I группа), а остальные 10 – в мае (II группа).

Третья серия опытов, направленная на выяснение возможности нормализации популяции антральных фолликулов в яичниках коров-доноров, была проведена на нелактирующих коровах и телках черно-пестрой породы, которые в течение двух лет многократно использовались для вызывания суперовуляции и получения эмбрионов. Опыт был проведен на 4-х группах животных по 6 голов в группе, которые были подвергнуты гормональным обработкам для вызывания суперовуляции по следующим схемам (таблица 1).

*Таблица 1.**Схема гормональных обработок (третья серия опытов)*

№ групп	Дни полового цикла				
	7-й	8-й	10-й	11-й	12-й
I			ГСЖК 3000 И.Е.		ПГФ
II	ФСГ 16мг		ГСЖК 3000 И.Е.		*П ГФ*
III		ФСГ 16 мг	ФСГ 14 мг	ГСЖК 1200И.Е.	ПГФ
IV		ГСЖК 1000 И.Е.	ГСЖК 750 И.Е.	ГСЖК 600 И.Е.	ГСЖК 500 И.Е.

Для того чтобы вызвать интенсивный рост мелких фолликулов и к моменту введения основной дозы ГСЖК перевести их в разряд средних фолликулов, было проведено предварительное введение ФСГ на 7-й (II гр.) и на 8-10-й (III гр.) дни полового цикла. Предполагалось, что развившиеся фолликулы средних размеров должны овулировать в индуцированную охоту при вызывании суперовуляции и тем самым увеличить выход эмбрионов. Введение препарата ФСГ, а не ГСЖК обусловлено тем, что препарат ФСГ не обладает пролонгированным действием. На 8-10-й дни после индуцированной охоты у подопытных животных оценивалась степень реакции суперовуляции, и проводилось нехирургическое извлечение эмбрионов. Начиная с 5-го дня полового цикла и до момента индуцированной охоты, у всех подопытных животных были взяты образцы крови для анализа в них эстрадиола-17β и прогестерона. Для выяснения морфологических изменений в яичниках коров под влиянием обработки экзогенными гонадотропинами в период, предшествующий вызыванию суперовуляции, был проведен 2-й опыт на 10 коровах, разделенных на 2 группы – опытную (I) и контрольную (II) по 5 голов в группе. На 7-й день полового цикла, индуцированного простагландином $F_{2\alpha}$, животным опытной группы было введено 1600 И.Е. гонадотропина

СЖК (фоллигон), а на 10-й день цикла коровы обеих групп были убиты, и в яичниках животных было определено состояние популяции антральных фолликулов.

На основании анализа результатов третьей серии опытов было сделано предположение, что численность популяции средних фолликулов в яичниках животных-доноров к 10-му дню полового цикла может быть увеличена, путем предварительной стимуляции животных в начальный период лютеальной фазы полового цикла. Потому что в это время ещё не произошёл отбор доминантного фолликула, и желтое тело окончательно еще не достигло нормальной активности, а промежуток времени (5-7 дней) может оказаться достаточным для развития мелких фолликулов до размеров средних. С целью проверки этого предположения была проведена четвёртая серия опытов.

Подопытные животные были разбиты на 4 группы по 7 голов в каждой группе и обработаны гормональными препаратами по следующей схеме (табл.2).

Таблица 2. ***Схема гормональных обработок животных-доноров (четвёртая серия опытов)***

Группы животных	Дни полового цикла				
	3	5	7	10	12
I	—	—	—	СЖК	ПГЛ
II	—	—	ХГ	СЖК	ПГЛ
III	СЖК	—	ХГ	СЖК	ПГЛ
IV	—	СЖК	ХГ	СЖК	ПГЛ

Животным всех групп СЖК вводили в дозе 4000 И.Е. Однако животным III и IV групп общее количество СЖК было введено в 2 приема по 1200 И.Е. на 3-й или 5-й дни, соответственно, и остальные 2800 И.Е. на 10-й день цикла. Эта предварительная обработка животных-доноров в начале цикла имела цель усилить рост популяции мелких фолликулов и довести их к 10-му дню, т.е. к моменту введения основной дозы СЖК, до среднего размера (5-6 мм), в результате чего они должны овулировать при вызывании суперовуляции под действием предовуляторного выброса ЛГ. Однако, принимая во внимание тот факт, что под действием предварительной обработки коров-доноров гонадотропинами СЖК, к 6-7-ому дню цикла в их яичниках могут усиленно развиться крупные доминирующие фолликулы, отрицательно влияющие на развитие других групп фолликулов, возникла необходимость в уменьшении отрицательного действия этих фолликулов. С целью *возможного устранения* отрицательного действия крупных фолликулов на популяцию следующих за ними более мелких фолликулов, была предпринята попытка

лютеинизировать крупные фолликулы в яичниках коров с помощью хорионического гонадотропина человека (ХГ), который обладает сильным лютеинизирующим действием. Хорионический гонадотропин вводили животным-донорам внутривенно в дозе 1500 И.Е. на 7-й день цикла.

Результаты исследований четвёртой серии опытов по изучению влияния предварительной обработки коров-доноров гонадотропными препаратами на 3-й или 5-й день полового цикла, с последующим введением им ХГ, показали, что, несмотря на увеличение количества фолликулов, развивающихся под влиянием гонадотропинов СЖК, не наблюдалось повышения эффективности суперовуляции. Было сделано предположение, что в этом эксперименте отрицательное влияние могло оказать введение ХГ.

С целью выяснения действия ХГ на популяцию фолликулов в яичниках коров была проведена *пятая* серия опытов на 20 выранжированных коровах с нормальной воспроизводительной функцией по следующей схеме. На 7-й день полового цикла подопытным животным внутривенно был введен хорионический гонадотропин в следующих дозах: I гр. –150 И.Е., II гр. –300 И.Е., III гр. –750 И.Е., IV гр. – 1500 И.Е., с целью возможной лютеинизации крупных (доминирующих) фолликулов и устранения их отрицательного действия на процесс развития многочисленной однородной популяции средних фолликулов. На 10-й день цикла все подопытные животные были убиты. Морфофункциональное состояние яичников всех животных было проанализировано по методу Kruip, Dieleman (1982) в нашей модификации.

Исходя из результатов четвёртой и пятой серий опытов, которые показали, что введение коровам-донорам ХГ, после предварительной обработки их гонадотропином СЖК в начальный период лютеальной фазы полового цикла, приводит к уменьшению количества нормальных фолликулов среднего размера и снижает выход эмбрионов при вызывании суперовуляции, была предпринята попытка провести предварительную обработку коров-доноров гонадотропином СЖК на 3-й и 5-й дни полового цикла, но без последующего введения ХГ (шестая серия опытов).

Шестая серия опытов была проведена на телках случного возраста и первотелках, выранжированных в хозяйстве. Всего под опытом находилось 57 животных. Из них у 40 животных была вызвана суперовуляция, а 17 были убиты с целью изучения фолликулогенеза. Все подопытные животные были разбиты на 3 группы и подвергнуты гормональным обработкам по следующим схемам: I гр.(контрольная)- на 10-й день 2800 И.Е. ГСЖК; IIгр.– на 3-й день полового цикла 600 И.Е. и на 10-й – 2800 И.Е. ГСЖК; IIIгр.– на 5-й день цикла 600 И.Е. и

на 10-й– 2800 И.Е. ГСЖК. Простагландин животным всех групп вводили на 12-й день полового цикла.

Животные, обработанные гормонами с целью изучения фолликулогенеза, были убиты на 10-11-й день полового цикла. В яичниках этих животных была определена численность поверхностных антральных фолликулов и их функциональное состояние. Остальные животные в группах были обработаны гормонами на 10-й день цикла с целью вызывания суперовуляции, эффективность которой была оценена через 8-10 дней после индуцированной охоты.

Во всех сериях опытов по изучению фолликулогенеза и совершенствованию способов вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота проводился контроль динамики половых и гонадотропных гормонов путем определения их в периферической крови животных-доноров. Прогестерон и эстрадиол-17β в крови подопытных животных определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов фирмы CIS (Франция) или Института биоорганической химии БССР. При определении эстрадиола-17β в плазме крови коров с целью его концентрирования проводили экстракцию эстрадиола из 1 мл плазмы и хроматографию полученных экстрактов крови на колонках с сефадексом LH-20 (Рябых и др., 1983). Коэффициент вариации при определении прогестерона составлял: в пределах опыта 12,3 и между опытами 16,2%, а при определении эстрадиола-17β - соответственно 8,6 и 12,1%.

Лютеинизирующий гормон определяли радиоиммунологическим методом (Niswender J. D. et. al., 1969) в нашей модификации (Рябых и др.1978). Антисыворотку к ЛГ получали в результате иммунизации кроликов. Полученная антисыворотка связывала 50% добавленного меченого ЛГ в разведении 1:60000. ЛГ метили изотопом I^{125} (Greenwood et. al., 1963). Для мечения использовали высокоочищенный препарат ЛГ крупного рогатого скота LER - 1716-2. Разделение связавшегося меченого ЛГ от не связавшегося проводили с помощью вторых антител.

Качество фолликулов в яичниках коров определяли визуально-микроскопическим методом (Kruip, Dieleman, 1982) в нашей модификации (в отражённом свете, при боковом освещении).

Результаты и обсуждение

Как показали исследования *первой* серии опытов (таблица 3) последовательное увеличение дозы ГСЖК (4000, 6000 и 7000 И.Е.) у доноров с низкой реакцией вызвало незначительное и недостоверное повышение числа овуляций (3,8±0,86; 4,8±0,97 и 7,0±1,82) и извлеченных яйцеклеток и эмбрионов (1,8±1,1; 2,0±1,85 и 2,8±2,04).

При дозе 7000 И.Е. общее число стимулированных к росту фолликулов было в среднем 10,6, но только 66% из них овулировали. Однако полноценных эмбрионов в этом случае получено не было. У доноров с высокой реакцией уменьшение дозы ГСЖК до 2400 И.Е. вызвало снижение реакции яичников (5,6±1,02 овуляций на 1 донора) и числа извлеченных яйцеклеток и эмбрионов (1,4±0,92). Введение коровам 6000 И.Е. СЖК вызвало у них незначительное увеличение количества жёлтых тел, по сравнению с инъекцией 4000 И.Е. СЖК (8,2±1,5 против 11,6±0,4), однако вызвало рост второй волны фолликулов, которые были обнаружены в яичниках коров в виде крупных неовулировавших фолликулов на 7-10-й день после вызванной суперовуляции.

Таблица 3. ***Эффективность вызывания суперовуляции у животных с различной реакцией на обработку***

Реакция суперовуляц.	Показатели	Порядковый номер обработки		
		первая	вторая	третья
Низкая	Доза ГСЖК И.Е.	4000	6000	7000
	Число животных	5	5	5
	Реакция яичников:			
	- число желтых тел	3,8±0,86	4,8±0,97	7,0±1,82
	-число неовулировавших фолликулов	0	0	3,6±1,7
	Извлечено в среднем на 1 донора:			
	- яйцеклеток и эмбрионов	1,8±1,1	2,0±1,35	2,8±2,04
	- в том числе эмбрионов	0,5±0,28	1,5±1,5	0
Высокая	Доза ГСЖК И.Е.	4000	2400	7000
	Число животных	7	7	5
	Реакция яичников:			
	- число желтых тел	11,6±0,42	5,6±1,02	8,2±1,48
	- число неовулировавших фолликулов	0,6±0,42	0,15±0,14	7,2±3,46
	Извлечено в среднем на 1 донора:			
	- яйцеклеток и эмбрионов	4,7±1,62	1,4±0,92	2,75±1,1
	- в том числе эмбрионов	3,5±1,7	1,4±0,92	1,0±1,0

Необходимо отметить, что повышение дозы ГСЖК у всех обработанных животных как с низкой, так и с высокой реакцией вызвало заметную гипертрофию яичников. При ректальной пальпации у всех этих животных обнаруживали крупные, переразвитые яичники с большим количеством неовулировавших фолликулов. После подобной обработки у многих животных-доноров надолго задерживалось восстановление нормальных половых циклов.

Таким образом, увеличение дозы ГСЖК, вводимой коровам-донорам, до 6000-7000 И.Е. не оказало положительного влияния на процесс фолликулогенеза при вызывании суперовуляции у животных

как с низкой, так и с высокой степенью суперовуляции, что свидетельствует о более сложных механизмах регулирования процессом фолликулогенеза, чем простое повышение уровня гонадотропинов в крови коров-доноров. Результаты этой серии опытов показали, что простое увеличение дозы экзогенных гонадотропинов, при вызывании суперовуляции у коров, не способствует увеличению выхода полноценных эмбрионов, и дали еще больше оснований считать, что степень суперовуляции зависит от состояния популяции антральных фолликулов в яичниках животных-доноров в день введения гонадотропинов. Поэтому для повышения эффективности суперовуляции необходимо знать состояние популяции поверхностных антральных фолликулов в яичниках коров в этот период.

В связи с тем, что изменения, происходящие с популяцией антральных фолликулов, вызывают изменение концентраций половых гормонов в периферической крови, была предпринята попытка выявить возможную взаимосвязь между морфофункциональным состоянием яичников и уровнем половых гормонов в крови коров-доноров в период со 2-го по 10-й день цикла. Наличие этой взаимосвязи позволит в определённой степени судить о состоянии популяции антральных фолликулов в этот период по концентрации половых гормонов в крови.

Анализ результатов *второй* серии опытов (табл. 4) показал, что на 11-й день полового цикла, синхронизированного ПГ-$F_{2\alpha}$, популяция поверхностных фолликулов в яичниках коров, убитых в марте (I группа), существенно отличалась от таковой у животных, убитых в мае (II группа). Эти отличия были обусловлены, главным образом, наличием у животных I группы многочисленной популяции мелких фолликулов (8,7 фолликулов на пару яичников) диаметром 1 мм, тогда как у животных II группы эта популяция фолликулов почти полностью отсутствовала (0,1 фолликула на пару яичников). Более многочисленной у животных I группы, по сравнению с животными II группы, была и популяция фолликулов диаметром 2 мм (9,2 против 5,4 фолликулов на пару яичников). В популяциях фолликулов остальных размеров в яичниках животных I и II групп различия были незначительными. Различия в числе фолликулов диаметром 1-2 мм в яичниках коров I и II групп обусловили и общую достоверную разницу ($P< 0,05$) в числе фолликулов в яичниках коров этих групп (38,7±4,8 против 27,7±1,6 фолликулов на пару яичников), соответственно. Отмеченные различия в количественном и качественном составе популяции фолликулов в яичниках коров в марте и мае месяце, по-видимому, можно объяснить явлением изменения фотопериодизма, который для крупного рогатого скота благоприятнее в марте, чем в мае. Влияние сезонных изменений на реакцию суперовуляции у крупного рогатого скота было замечено Гордоном ещё в 1975г.(Gordon, 1975),

который отметил, что коровы лучше реагируют суперовуляцией на гормональные обработки с февраля по апрель. Он выдвинул предположение, что возможно в это время в яичниках коров развивается больше антральных фолликулов, способных отвечать на экзогенную стимуляцию гонадотропными гормонами.

Анализ данных по динамике уровня эстрадиола-17β в периферической крови у животных этих групп (табл. 5) не выявил существенных различий в период со 2-го по 9-й день полового цикла. В обеих группах при расчете на все поголовье было отмечено снижение уровня эстрадиола-17β с 6-го на 7-й день цикла с последующим незначительным снижением к 9-му дню, что, по-видимому, обусловлено атрезией крупных и части средних фолликулов.

Таблица 4. ***Состояние популяции поверхностных антральных фолликулов в яичниках коров на 11-й день полового цикла (число фолликулов на пару яичников)***

Гр.	Число животных	Диаметр фолликулов, (мм)									Общее количество фолликулов на пару яичников
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	10	8,7 ±2,0	9,2 ±4,6	9,2 ±1,2	4,4 ±0,4	2,4 ±0,4	1,2 ±0,4	0,8 ±0,2	0,9 ±0,2	1,9 ±0,3	38,7±4,8
II	10	0,1 ±0,1	5,4 ±1,6	9,7 ±1,3	5,1 ±1,2	3,6 ±0,7	1,1 ±0,4	0,3 ±0,1	0,7 ±0,2	1,7 ±0,2	27,7±1,6

Таблица 5. ***Динамика уровня эстрадиола-17β в крови коров с 3-го по 9-й день полового цикла (пг/мл)***

Гр.	Дни полового цикла						
	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й
I	4,25±0,72	4,6±0,81	4,1±0,59	4,4±0,50	3,8±0,54	3,6±0,28	3,5±0,58
II	3,8±0,85	4,8±0,86	5,2±0,74	5,8±0,76	4,3±0,44	4,0±0,29	4,0±0,46

Более детальный анализ динамики эстрадиола-17β в крови отдельных животных показал, что не у всех коров его уровень снижался с 6-го к 9-му дню цикла, у определенной части животных было отмечено повышение концентрации эстрадиола-17β в крови к 9-

му дню. Сопоставление популяции антральных фолликулов в яичниках животных, имеющих понижающийся и повышающийся к 9-му дню уровень эстрадиола (таблица 6), не выявило существенных различий в численности средних и мелких фолликулов. Исключение составляет популяция мелких фолликулов (1-3 мм диаметром), которая была достоверно ($P<0,05$) более многочисленной у животных с повышающимся уровнем эстрадиола-17β (28,7±5,4 против 14,3±2,6 фолликулов на пару яичников). Различия, отмеченные в динамике уровня эстрадиола-17β у этих двух групп животных, обусловлены, по-видимому, не количественным составом популяции фолликулов, а функциональным состоянием популяции крупных и средних фолликулов, т.е. их развитием или атрезией.

Таблица 6. ***Состояние популяции фолликулов в яичниках и уровень эстрадиола в крови коров разных групп (число фолликулов на пару яичников) (эстрадиол-17β, пг/мл)***

Группы животных	**Диаметр фолликулов, мм**				Дни полового цикла (эстрадиол)					
	1-3	4-5	6-8	> 8	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й
С постоянным уровнем эстрадиола-17β	28,7 ±5,4	6,9 ±1,3	2,7 ±0,55	1,9 ±0,55	3,67 ±1,1	3,11 ±0,67	3,25 ±0,47	3,4 ±0,67	3,43 ±0,3	3,9 ±0,5
С понижающимся уровнем эстрадиола-17β	14,3 ±2,6	9,1 ±1,9	1,9 ±0,55	1,6 ±0,14	5,74 ±0,46	6,45 ±0,5	6,4 ±0,52	4,11 ±0,55	3,28 ±0,3	3,4 ±0,6

Таким образом, результаты второй серии опытов показали, что популяция поверхностных антральных фолликулов в яичниках коров на 11-й день полового цикла достоверно многочисленнее в марте, чем в мае. Это различие обусловлено популяцией фолликулов диаметром 1-2 мм.

У животных, имеющих уровень эстрадиола в крови, понижающийся с 6-го к 9-му дню цикла, достоверно ниже была численность мелких фолликулов (1-3 мм) в яичниках, по сравнению с животными, имевшими повышающийся уровень эстрадиола.

Анализ общего числа фолликулов в яичниках коров на 11-й день полового цикла, т.е. в один из дней начала гормональной обработки с целью вызывания суперовуляции показал, что общее число всех фолликулов диаметром свыше 5мм колеблется в довольно широких пределах, при этом популяция этих фолликулов очень неоднородна. Результаты этого эксперимента дали основание считать, что основной причиной высокой вариабельности суперовуляции и низкого выхода полноценных эмбрионов, является большое

разнообразие популяции антральных фолликулов в яичниках животных-доноров на момент начала стимуляции их экзогенными гонадотропинами. Поэтому исследования по совершенствованию методов суперовуляции должны быть направлены, в первую очередь, на создание в яичниках коров-доноров к моменту гормональной обработки с целью вызывания суперовуляции более многочисленной и однородной популяции антральных фолликулов среднего размера. Исходя из этого, была предпринята попытка выяснить возможность регулирования популяции антральных фолликулов в яичниках коров-доноров в период, предшествующий вызыванию суперовуляции.

Анализ результатов третьей серии опытов показал (таблица 7), что ни предварительное введение 16 мг ФСГ на 8-й день цикла (II гр.), ни частичная замена препарата ФСГ гонадотропином СЖК (III гр.), ни дробное введение ГСЖК не улучшили степень суперовуляции, по сравнению с контрольной группой (I гр.). При этом у животных III и IV групп отмечена тенденция снижения числа желтых тел в яичниках и увеличение числа неовулировавших фолликулов.

Таблица 7. ***Реакция суперовуляции у коров при различных схемах гормональной обработки***

Показатели	Группы			
	I	II	III	IV
Желтые тела	10,4±2,7	8,9±2,4	6,8±1,9	6,0±1,1
Неовулировавшие фолликулы	2,6±0,6	2,5±1,2	3,3±1,1	3,6±1,0

Анализ динамики уровней эстрадиола-17β в крови подопытных животных (таблица 8) показал, что ни предварительное введение препарата ФСГ (II и III гр.), ни дробное введение ГСЖК на фоне функционирующего желтого тела, не вызывало повышения уровня эстрадиола-17β в крови животных II, III и IV групп на 8-12-й дни цикла, вплоть до введения простагландина $F_{2\alpha}$ и начала регрессии желтого тела. Эти результаты свидетельствует о том, что на фоне активно функционирующего жёлтого тела под влиянием экзогенных гонадотропинов не произошло увеличения численности нормальных фолликулов средних и крупных размеров (4-10мм).

Таблица 8. ***Динамика уровней эстрадиола-17β в крови коров при разных схемах гормональной обработки***

№	Дни полового цикла							
гр	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й	12-й	13-й	14-й
I	9,6±5,4	6,7±4,1	5,4±1,0	4,2±1,2	3,2±0,8	21,3±6,1	44,1±13,7	71,5±18,0

II	9,3±1,2	7,7±1,9	5,9±1,6	5,6±2,2	3,7±1,4	26,0±3,5	48,7±3,5	62,2±5,2
III	7,8±2,5	6,8±3,8	4,5±2,2	4,4±1,2	3,7±1,7	12,6±3,2	30,1±15,7	60,7±16,7
IV	4,8±0,7	6,1±1,5	5,0±0,8	#	6,8±1,6	36,6±4,9		#

#-отсутствие данных в некоторых ячейках таблицы обусловлено нецелесообразностью определения эстрадиола в эти дни эксперимента

Этот факт полностью подтверждается морфологическими исследованиями, проведенными с целью изучения динамики популяции антральных фолликулов в яичниках коров, предварительно обработанных гонадотропинами в период, предшествующий вызыванию суперовуляции (опыт 2). Анализ результатов этого опыта (табл.9) показывает, что предварительное введение ГСЖК на 7-й день цикла не увеличивает к 10-му дню популяцию фолликулов диаметром 4-5 мм и 6-10 мм, тогда как достоверно увеличивает численность популяции мелких фолликулов (2-3 мм).

Результаты этих экспериментов с морфологической и эндокринологической позиций подтверждают предположение Мура с соавт. (Moor et al., 1984), сделанное на основании результатов эксперимента французских исследователей (Monniaux et al.,1983), согласно которому в лютеальную фазу цикла на фоне активно функционирующего желтого тела экзогенные гонадотропины не вызывают увеличения численности средних и крупных фолликулов, а только сдерживают их атрезию.

Таблица 9. ***Влияние стимуляции коров экзогенными гонадотропинами в лютеальную фазу полового цикла на изменение популяции антральных фолликулов в яичниках***

Группы	Категории фолликулов	Диаметр фолликулов (мм)			
		2-3	4-5	6-7	> 8
Опытная	нормальные	4,2±1,1	3,2±1,0	2,0±0,4	0,6±0,02
	атретические	4,6±1,1	2,2±0,4	0,6±0,02	0,8±0,02
	лютеинизирующие	3,4±1,3	2,0±0,4	0,3±0,02	0,2±0,01
Контроль	нормальные	0,7±0,5	3,7±1,4	4,2±0,7	0,2±0,02
	атретические	1,2±0,7	2,0±0,5	1,7±0,02	0,7±0,02
	лютеинизирующие	1,7±0,7	1,0±0,2	0,7±0,02	0,2±0,01

Наиболее детальное изучение краткосрочного действия экзогенных гонадотропинов на популяцию фолликулов в яичниках коров было проведено французскими исследователями. Было установлено, что введение коровам ГСЖК значительно увеличивает митотический индекс в преантральных и очень мелких антральных фолликулах, но не оказывает влияния на популяцию крупных

антральных фолликулов (Monniaux et al., 1983). Из этого исследования следует, что введение ГСЖК увеличивает количество преантральных и очень мелких антральных фолликулов (диаметром < 1,7 мм), но число более крупных нормальных антральных фолликулов остается неизменным. Возникает вопрос: «Каким же образом происходит суперовуляция и увеличение числа овуляторных антральных фолликулов?» По мнению Мура с соавторами (Moor et al., 1984) экзогенные гонадотропины препятствуют или изменяют процесс атрезии средних и крупных антральных фолликулов. Уменьшение степени атрезии внутри этих классов фолликулов увеличивает число фолликулов, способных в полной мере отвечать на действие гонадотропинов своим развитием и овулировать. Однако авторы отметили, что, несмотря на увеличение числа реактивных фолликулов, некоторые атретические фолликулы скорее лютеинизируют, чем овулируют под влиянием экзогенных гонадотропинов и поэтому не имеют ценности для суперовуляции. Становится понятным, что увеличение числа преантральных фолликулов после инъекции ГСЖК не способствует увеличению показателей суперовуляции во время того цикла, в который проводилась обработка.

В последнее время удалось несколько улучшить реакцию суперовуляции путём использования препаратов, содержащих ФСГ вместе с Гн-РГ, инъецируемых в точные стадии эстрального цикла (Straigmiller et al., 1992; Murphy et al., 1998; Kohram et al., 1998). Однако существующая врожденная вариабельность нормы овуляций и качества эмбрионов сдерживают развитие большого числа овуляторных фолликулов и эффективность суперовуляции.

Так как экзогенные гонадотропины не увеличивают общего числа антральных фолликулов путем дополнительного набора из пула преантральных фолликулов, то, очевидно, их действие распространяется на относительно небольшую популяцию антральных фолликулов. Кроме того, становится понятным, что количество реагирующих фолликулов у коров ограниченно и вариабельно. Существование такого ограничения для овариальной стимуляции все еще является самой серьезной проблемой для практического использования трансплантации эмбрионов у малоплодных видов животных.

Таким образом, попытка увеличения популяции средних фолликулов в яичниках коров-доноров к 10-му дню полового цикла путем предварительного введения небольших доз гонадотропных гормонов на 7-8-й дни показала, что на фоне активно функционирующего желтого тела мелкие антральные фолликулы за короткий период времени (2-3 дня) не успевают развиться и перейти в разряд средних фолликулов к моменту начала основной гормональной обработки. Следовательно, к этому времени не увеличивается

численность фолликулов средних размеров, т.е. тех фолликулов, которые могут овулировать в эту индуцированную охоту. Тогда как эти мелкие фолликулы, продолжая развиваться под действием остаточных количеств гонадотропинов СЖК, уже после овуляции I волны фолликулов на фоне низкого уровня прогестерона, создают популяцию крупных неовулировавших фолликулов, которые обнаруживаются в яичниках коров-доноров на 7-10-й дни после вызывания овуляции, т.е. являются фолликулами следующей неовуляторной волны.

Исходя из этих фактов, было сделано предположение, что численность популяции средних фолликулов в яичниках животных-доноров к 10-му дню полового цикла может быть увеличена путем предварительной стимуляции животных в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-5-й день). Потому что, в это время ещё не произошёл отбор доминантного фолликула, и желтое тело еще не достигло нормальной активности, а промежуток времени (5-7 дней) может оказаться достаточным для развития мелких фолликулов до размеров средних. Эта предварительная обработка животных-доноров в начале цикла может усилить рост популяции мелких фолликулов и довести их к 10-му дню, т.е. к моменту введения основной дозы СЖК, до среднего размера (5-6 мм), в результате чего они должны овулировать при вызывании суперовуляции под действием предовуляторного выброса ЛГ.

Однако, принимая во внимание тот факт, что под действием предварительной обработки коров-доноров гонадотропинами СЖК, к 6-7-ому дню цикла в их яичниках могут усиленно развиться крупные доминирующие фолликулы, отрицательно влияющие на развитие других групп фолликулов, возникла необходимость в уменьшении отрицательного действия этих фолликулов. С целью возможного устранения отрицательного действия крупных фолликулов на популяцию следующих за ними более мелких фолликулов была предпринята попытка лютеинизировать крупные фолликулы в яичниках коров с помощью хорионического гонадотропина человека (ХГ), который обладает сильным лютеинизирующим действием. С этой целью и была проведена четвёртая серия опытов.

Анализ результатов *четвёртой* серии опытов (табл.10) показал, что наибольшее число фолликулов (19±3,6), развившихся в результате гормональных обработок, было отмечено у животных III группы, которым на 3-й день цикла предварительно было введено 1200 И.Е. ГСЖК. Однако у животных IV группы, которым также предварительно вводили ГСЖК, но только на 5-й день цикла, общее количество развившихся фолликулов (10,8±2,1) было почти в два раза ниже, чем у животных III группы. Такая существенная разница в количестве развившихся фолликулов может быть объяснена только разными сроками введения ГСЖК (3-й и 5-й дни цикла), предусмотренными

методикой. Животным III группы ГСЖК вводили на 3-й день цикла, когда желтое тело еще не начало функционировать в полную силу, и уровень прогестерона в крови животных был невысоким. Этот гормональный статус более благоприятен для роста мелких фолликулов, чем статус с более высоким содержанием прогестерона, который наблюдается у животных IV группы, т.к. этим животным ГСЖК вводили на 5-й день цикла, когда желтое тело начинает функционировать более интенсивно. Наименьшее количество фолликулов (8,2±2,8) развивалось у животных II группы, которым на 7-й день цикла вводили ХГ. По всей видимости, хорионический гонадотропин, введенный животным без предварительной стимуляции процесса фолликулогенеза гонадотропином СЖК, вызвал лютеинизацию и атрезию определенной части крупных и средних фолликулов и к 10-му дню цикла, когда вводили основную дозу ГСЖК, в яичниках этих животных оставалась только немногочисленная популяция мелких фолликулов, поэтому и общее количество фолликулов, развившееся в результате воздействия экзогенных гонадотропинов, оказалось невысоким.

Таблица 10. ***Влияние различных схем гормональных обработок на процесс фолликулогенеза у животных-доноров***

№ групп	Количество желтых тел на 1 животное		Количество крупных неовулировавших фолликулов		Общее количество развившихся фолликулов на 1 животное	
	M±м	lim	M±м	lim	M±м	lim
I	10,4±2,0	6-16	4,0±1,0	3-8	14,4±2,8	8-21
II	5,6±1,9	3-9	2,6±0,9	0-8	8,2±2,8	3-13
III	17,6±3,4	4-40	1,4±0,3	0-7	19,0±3,6	4-40
IV	9,4±1,8	2-25	1,4±0,3	1-3	10,8±2,1	3-26

Характерной особенностью животных всех групп, которым вводили ХГ (II, III, IV групп), является значительно меньшее количество в яичниках неовулировавших фолликулов (таблица 10) по сравнению с животными контрольной группы. При этом во II и III группах фолликулы такого типа были обнаружены только у одного животного из группы, тогда как у каждого из животных-доноров I группы было в яичниках по 1-3 крупных неовулировавших фолликула. По-видимому, ХГ, введенный на 7-й день цикла, в течение 2-3 дней вызывал значительное уменьшение численности здоровых мелких фолликулов и к 10-му дню цикла, т.е. к моменту введения экзогенных гонадотропинов, популяция этих фолликулов в яичниках животных-доноров становится малочисленной и поэтому количество

неовулировавших фолликулов второй волны существенно уменьшается.

Это предположение подтверждают результаты анализа половых стероидных гормонов в периферической крови у животных-доноров. Так, у животных III группы после введения ХГ уровень эстрадиола-17β достоверно снизился (P <0,05), а уровень прогестерона достоверно увеличился к 9-му дню полового цикла, тогда как у животных I (контрольной) группы уровень эстрадиола в крови существенно повышался с 7-го к 10-му дню цикла, что свидетельствует о наличии в яичниках этих животных крупных фолликулов в момент экзогенной стимуляции гонадотропинами, которые в дальнейшем способствовали образованию крупных неовулировавших фолликулов.

При извлечении эмбрионов было обнаружено, что у отдельных животных разных групп, особенно тех, которые имели высокую степень фолликулогенеза, чаще всего не удавалось получить ни эмбрионов, ни неоплодотворенных яйцеклеток.

Результаты исследований по изучению влияния предварительной обработки коров-доноров гонадотропными препаратами на 3-й или 5-й день полового цикла с последующим введением им ХГ показали, что, несмотря на увеличение количества фолликулов, развивающихся под влиянием гонадотропинов СЖК, не наблюдалось повышения эффективности суперовуляции. Было сделано предположение, что в этом эксперименте отрицательное влияние могло оказать введение ХГ.

С целью выяснения действия ХГ на популяцию фолликулов в яичниках коров была проведена пятая серия опытов.

Анализ результатов *пятой* серии опытов (таблица 11) показал, что в среднем популяция поверхностных антральных фолликулов на пару яичников во всех 4-х группах составляла 30-34 фолликула. Самой многочисленной являлась популяция фолликулов диаметром 3-5 мм (21-27 фолликулов на пару яичников).

Введение различных доз ХГ подопытным животным вызвало лютеинизацию фолликулов в яичниках животных всех групп. При этом лютеинизации подвергались не только фолликулы крупных размеров, но и в значительной мере фолликулы 3-5 мм в диаметре и даже 1-2 мм. Этот факт дает основание предполагать, что лютеинизации выборочно подверглись фолликулы с наметившимися отклонениями в развитии. С увеличением доз ХГ степень лютеинизации фолликулов имеет тенденцию к увеличению (28,7% лютеинизированных фолликулов в яичниках животных II группы, против 42,3% у животных III группы), однако эти различия недостоверны по отдельным классам фолликулов. С увеличением дозы ХГ уменьшается и число нормальных фолликулов в яичниках животных разных групп.

Анализ результатов определения половых гормонов в крови животных разных групп (таблицы 12 и 13) свидетельствует, что уровень прогестерона после введения ХГ у животных всех групп повышается с 7-го на 8-й и последующие дни. Следует предположить, что это повышение содержания прогестерона обусловлено не синтезом его в лютеинизирующих фолликулах, а увеличением функциональной активности желтого тела под влиянием ХГ, т.к. мало вероятно, что образование и функционирование лютеиновой ткани в лютеинизированных фолликулах может произойти в такой короткий срок, как 24 часа между 7 и 8-м днями цикла.

Данные по содержанию эстрадиола-17β в крови животных I,II и III групп дают основание считать, что лютеинизации подверглись, главным образом, фолликулы с наметившимися отклонениями в развитии, т.к. уровень эстрадиола-17β в крови животных этих групп после введения ХГ (7-й день) существенно не снизился, а, как известно, способностью синтезировать эстрогены обладают только «здоровые» фолликулы (Jreland J. ,Roche J., 1983)

Таблица 11. ***Популяция поверхностных антральных фолликулов на 10-й день цикла у коров, обработанных разными дозами хорионического гонадотропина человека***

№ групп	Вид фолликулов	Всего на пару яичников		Диаметр фолликулов, мм							
				1-2		3-5		6-8		>8	
			%	M±м	%	M±м	%	M±м	%	M±м	%
I	Общее число	34	100	4,5±4,2	100	24,5±4,5	100	3,2±0,2	100	1,7±0,5	100
	Нормальные	17	49	3,7±3,4	83	11,0±3,8	45	1,5±0,6	46	0,2±0,2	14
	Атретические	7,8	22,8	0,2±0,2	6	5,7±1,3	23	0,8±0,5	23	1,0±0,4	57
	Лютеинизирующие	9,8	28,7	0,5±0,5	11	7,7±1,2	32	1,0±0	31	0,5±0,3	29
II	Общее число	30	100	4,4±0,7	100	21,0±2,1	100	2,6±0,5	100	2,0±0,4	100
	Нормальные	12	40	3,8±0,4	36	7,2±1,0	34	0,8±0,4	30	0,2±0,2	10
	Атретические	8	27	—	—	5,65±2,6	27	0,6±0,2	23	1,8±0,5	90
	Лютеинизирующие	10	33	0,6±0,4	14	8,1±0,6	39	1,2±0,5	46	—	—
III	Общее число	30,2	100	1,4±0,5	100	23,8±3,3	100	3,4±1,1	100	1,6±0,8	100
	Нормальные	7,4	24,5	1,0±0,6	71	5,2±2,9	22	1,0±0,5	29	0,2±0,2	13
	Атретические	13,6	45,0	0,2±0,1	14	10,2±1,7	43	1,8±0,6	53	1,4±0,6	88
	Лютеинизирующие	9,2	30,5	0,2±0,2	15	8,4±2,7	35	0,6±0,2	18	—	—
IV	Общее число	32,5	100	1,7±1,7	100	27,0±4,8	100	1,5±0,6	100	2,0±0,7	100
	Нормальные	10,2	31,5	1,71,7	100	7,5±2,3	28	0,5±0,3	33	0,5±0,5	25
	Атретические	8,5	26,2	—	—	7,7±1,9	28	0,25±0,2	17	0,5±0,5	25
	Лютеинизирующие	13,8	42,3	—	—	12,0±2,1	44	0,8±0,4	50	1,0±0,4	50

Таблица 12. ***Содержание прогестерона в период с 5-го по 10-й день цикла в крови коров, обработанных на 7-й день различными дозами ХГ (нг/мл)***

№ групп	Дни цикла					
	5	6	7	8	9	10
I	2,8±0,75	3,3±0,62	3,7±0,58	4,4±0,81	4,4±0,72	4.8±0,64
II	2,8±0,94	2,6±0,53	3,3±0,25	4,3±0,48	4,4±0,47	4,9±0,58
III	3,5±0,02	3,8±0,03	4,0±0,03	5,1±0,03	5,3±0,52	5,0±0,49
IV	3,0±0,24	3,4±0,59	4,4±0,46	4,4±0,32	4,9±0,41	5,2±0,61

Таблица 13. ***Содержание эстрадиола-17β в период с 5-го по 10-й день цикла в крови коров, обработанных на 7-й день различными дозами ХГ (пг/мл)***

№ групп	Дни цикла					
	5	6	7	8	9	10
I	7,0±3,83	5,3±0,13	3,6±1,43	4,7±1,29	5,0±0,98	5,2 ±0,87
II	7,3±2,31	7,9±1,81	3,8±1,21	3,4±0,68	4,2±1,12	4,9± 0,82
III	6,3±2,7	5,6±1,26	8,8±3,22	6,3±1,46	4,8±0,80	5,2±1,30
IV	3,4±0,45	5,6±0,93	4,8±0,86	4,3±0,72	5,3±0,69	6,8±2,00

Таким образом, результаты этого эксперимента свидетельствуют, что в период, предшествующий вызыванию суперовуляции, возможно вызывание лютеинизации определенной части антральных фолликулов с помощью экзогенных лютеотропных факторов. При этом лютеинизации подвергаются фолликулы из популяций разных размеров. С увеличением дозы ХГ в пределах от 150 И.Е. до 1500 И.Е., наблюдается тенденция увеличения лютеинизирующих и атретических и уменьшения числа нормальных фолликулов в яичниках подопытных животных.

Наши исследования по изучению влияния ХГ на процесс фолликулогенеза были проведены в 1982-1985 г.г. (Рябых, 1987). Позднее другими исследователями предпринимались попытки использования ХГ для формирования в яичниках коров дополнительных желтых тел путем введения его на 4-й день полового цикла (Bremell et al., 1989; Price, Webb, 1989) на 5-й день – (Walton et al., 1990; Schmith et al., 1996) на 6-й день (Fricke et al., 1993), на 7-й день цикла (Sinangama, Rajamahendran, 1992, 1996). Однако, только в одном из этих исследований (Sinangama, Rajamahendran, 1996), наряду с формированием дополнительных желтых тел изучалось влияние ХГ на фолликулогенез.

В большинстве вышеприведенных исследований авторы наблюдали образование дополнительных желтых тел в яичниках коров, обработанных ХГ. В одном исследовании (Diaz et al., 1998), методом ультразвуковой эхографии, было отмечено, что после введения коровам ХГ и лютеинизации крупного фолликула, в яичниках коров происходил набор фолликулов новой волны. Однако авторы не дали полной характеристики этой волны (численность фолликулов, их размер и, особенно, состояние фолликулов), т.к. методом ультразвуковой эхографии этого сделать не возможно.

Наши исследования, проведенные с убоем животных и с визуально-микроскопическим анализом фолликулов в яичниках коров, показали, что введение коровам препарата ХГ вызывает уменьшение численности нормальных фолликулов в яичниках обработанных коров за счет лютеинизации и атрезии фолликулов независимо от их размера, что приводит к снижению эффективности суперовуляции. О снижении выхода оплодотворенных яйцеклеток и эмбрионов в аналогичном эксперименте с использованием ХГ было сообщено японскими исследователями в 1998 г. (Otoi et al., 1998), которые через 15 лет после наших экспериментов также попытались введением ХГ на 7-й день полового цикла вызвать лютеинизацию доминирующих фолликулов в яичниках коров-доноров.

В то время (1982-83 г.г.), когда нами проводились эксперименты по изучению возможности лютеинизации фолликулов с помощью ХГ, почти ничего не было известно о влиянии ЛГ на инициацию процесса мейоза в ооцитах. Появившиеся позднее исследования по дозреванию ооцитов крупного рогатого скота in vitro показали, что несвоевременное введение ЛГ в среду дозревания вызывало в ооцитах преждевременную инициацию мейоза и нарушение синхронности в созревании ядра и цитоплазмы, которые приводили к аномальному развитию яйцеклетки, а затем и эмбриона (Moor et al., 1984). Кроме того, исследованиями последних лет показано, что ооцит способен вырабатывать вещества, которые оказывают мощное влияние на клетки стенки фолликула и через них определяют дальнейшую судьбу самого фолликула (Buccione et. al. 1990, Vanderhyden et.al. 1990, 1992, 1993, Ralph et.al. 1995).

Анализ результатов исследований четвёртой и пятой серий опытов, с позиций вышеприведенных новых данных, наводит на мысль о том, что введение коровам хорионического гонадотропина человека, обладающего сильным ЛГ-подобным действием, приводило не только к лютеинизации определенной части фолликулов, но и вызывало преждевременную инициацию мейоза в ооцитах значительной части фолликулов, которые затем подвергались атрезии. Это предположение и подтвердили результаты наших экспериментов, свидетельствующие о снижении числа нормальных фолликулов в яичниках коров,

обработанных ХГ, и низком выходе эмбрионов при вызывании суперовуляции (табл. 10).

Как свидетельствуют литературные данные, идея использования ХГ с целью лютеинизации крупных фолликулов и устранения их отрицательного действия на более мелкие фолликулы вызывает интерес у исследователей до самого последнего времени. Однако наши исследователи первыми показали (Рябых, 1987), что ХГ является слишком сильным эндокринным фактором, который действует не только на отдельные крупные фолликулы, но и вызывает преждевременную инициацию мейоза в ооцитах, находящихся в средних и мелких фолликулах и через неё атрезию этих фолликулов. Это действие ХГ значительно снижает эффективность суперовуляции.

Исходя, из результатов пятой серии, была предпринята попытка провести предварительную обработку коров-доноров гонадотропином СЖК на 3-й и 5-й дни полового цикла, но без последующего введения ХГ.

Анализ результатов *шестой* серии экспериментов показал (таблица 14), что предварительная стимуляция коров-доноров гонадотропином СЖК в начальный период лютеальной фазы полового цикла (особенно на 3-й день – II гр.), вызывала к 10-му дню цикла в их яичниках увеличение общей численности антральных фолликулов средних размеров (4-5 и 6-10 мм в диаметре), по сравнению с контрольной группой (I гр.).

Таблица 14. ***Влияние гонадотропной стимуляции коров в различные периоды лютеальной фазы полового цикла на изменение общей численности антральных фолликулов в яичниках***

№ гр.	n	Численность фолликулов разных размеров (на пару яичников)			
		1-3 мм	4-5 мм	6-10 мм	>10 мм
I	5	9,3±3,2	12,3±4,2	2,0±0,7	1,0±0,2
II	6	12,2±3,0	21,0±5,1	5,7±1,4	1,3±0,2
III	6	15,0±3,6	19,2±4,7	0,8±0,2	1,8±0,3

Визуально-микроскопическая оценка антральных фолликулов в яичниках животных свидетельствует (таблица 15), что на 10-й день полового цикла, т.е. к моменту вызывания суперовуляции, у животных, обработанных предварительно гонадотропинами в ранний период лютеальной стадии (II и III гр.), наблюдается достоверно ($P<0,05$) большее количество 4-5 и 6-10 мм фолликулов, оцененных как «нормальные», по сравнению с контрольной группой (14,0±4,4 и 8,2±3,9 против 4,3 ±0,7,соответственно). Достоверно больше было и число нормальных фолликулов диаметром 6-10мм в яичниках животных II

группы, по сравнению с контролем (5,2±1,5 против 1,3±1,3). Однако у животных III группы количество таких фолликулов было меньше, чем в контроле (1,3±1,3 против 0,5±0,5).

Таблица 15. ***Влияние гонадотропной стимуляции коров в различные периоды лютеальной фазы на состояние популяции антральных фолликулов в яичниках***

№ гр.	Категории фолликулов при визуальной оценке	Численность фолликулов разных размеров (на пару яичников)			
		1-3 мм	4-5 мм	6-10 мм	>10 мм
I	Нормальные	2,3±1,0	4,3±0,7	1,3±1,3	0,3±0,1
	Атретические	5,0±2,4	5,3±3,1	0,7±0,7	0,7±0,2
	Лютеинизирующие	2,0±1,5	2,7±0,7	0	0
II	Нормальные	5,5±1,2	14,0±4,4	5,2±1,5	0,8±0,2
	Атретические	2,7±1,9	6,0±1,5	0,5±0,2	0,5±0,2
	Лютеинизирующие	4,0±1,2	1,0±0,5	0	0
III	Нормальные	3,7±0,2	8,2±3,9	0,5±0,5	0,7±0,3
	Атретические	8,0±2,7	3,0±2,9	0	1,0±0,3
	Лютеинизирующие	3,3±1,0	3,0±1,0	0,3±0,2	0

Изменения, произошедшие в яичниках животных в результате гонадотропной стимуляции в ранний период лютеальной фазы полового цикла, в достаточной степени отражаются в динамике уровня эстрадиола-17β в крови животных-доноров (табл. 16).

Введение экзогенных гонадотропинов на 3-й и 5-й дни (II и III гр.) вызывает быструю ответную реакцию яичников на эти гонадотро-

Таблица 16. ***Динамика уровней эстрадиола-17β в крови животных-доноров при разных схемах гормональной обработки (пг/мл)***

№ гр.	Дни полового цикла						
	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й
I	1,8±1,2	2,6±0,8	2,5±1,6	3,3±2,1	2,5±1,6	1,4±0,6	1,1±0,2
II	5,1±0,8	7,9±1,4	8,5±1,5	7,6±2,2	6,4±2,5	3,5±1,5	1,9±0,5
III	2,1±0,5	3,1±0,7	5,3±0,9	6,3±1,7	7,9±1,3	5,8±1,6	5,2±2,1

пины, которая характеризуется ростом фолликулов средних размеров, о чем свидетельствует подъем уровня эстрадиола-17β в крови животных этих групп в течение 3-х дней (4-6-й дни – II гр. и 6-8-й дни – III гр.), а затем следует медленный спад уровня эстрадиола, что, по

всей видимости, обусловлено начавшейся атрезией этих фолликулов. При этом, у животных III группы уровень эстрадиола-17β в крови на 10-й день полового цикла оставался довольно высоким (5,2 пг/мл), что свидетельствует о наличии у них в яичниках крупного эстрогенсинтезирующего фолликула, который может играть роль доминирующего и в определённой степени подавлять развитие других фолликулов. Это предположение подтверждается и данными, представленными в таблицах 15 и 17.

Анализ выраженности реакции суперовуляции у животных разных групп показал (таблица 17), что достоверно ($P<0,05$) большее число желтых тел развилось в яичниках животных II группы. Неожиданным было несколько меньшее число жёлтых тел у животных III группы, по сравнению с контрольной группой. Общее количество извлечённых эмбрионов также оказалось выше во II группе, по сравнению с контрольной и III группой. Эта закономерность сохранилась и по количеству эмбрионов, оценённых как полноценные (2,8±1,7 против 1,8±1,0 и 1,9±0,8, соответственно).

Таблица 17. ***Реакция суперовуляции у коров-доноров при различных схемах гормональной обработки***

Состояние яичников	Группы животных		
	I	II	III
Желтые тела	4,6±1,6	8,0±1,0	3,3±1,3
Неовулировавшие фолликулы	0	0,8±0,1	0,3±0,1
Получено эмбрионов	2,9±1,6	4,6±2,2	2,5±1,1
Из них полноценных	1,8±1,0	2,8±1,7	1,9±0,8

Результаты шестой серии опытов (табл. 15) показали, что экзогенные гонадотропины, введённые животным в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-5-й дни), вызывают в яичниках коров рост популяции мелких антральных фолликулов и переход их в категорию фолликулов средних размеров, которые при вызывании суперовуляции на 10-й день полового цикла могут достигать предовуляторного состояния и овулировать. Однако в результате активизации доминантного фолликула и функции желтого тела в период с 5-го по 10-й день определенная часть этих фолликулов подвергается атрезии к моменту вызывания суперовуляции (9-10 дни цикла).

После того как было показано, что развитие фолликулов в яичниках коров в течение полового цикла происходит в 2 или 3 волны (Matton et al., 1981; Pirson, Ginther, 1987; Sirois, Fortune, 1988) и первая волна начинает развиваться сразу после эструса, были предприняты попытки увеличения числа фолликулов в первой волне путем предварительной обработки коров гонадотропными гормонами с 1-го по 3-й день полового цикла. Однако результаты, полученные разными исследователями, оказались не однозначными. Ко времени проведения нами данного эксперимента (1988) в двух исследованиях сообщалось о положительном влиянии предобработки ФСГ на результаты суперовуляции (Rajamajendran et al., 1987; Ware et al., 1988). Позднее положительное влияние предобработки было отмечено группой бельгийских исследователей (Touati et al., 1989, 1991). Однако в тоже время группой канадских исследователей не было отмечено положительного влияния предварительного введения ФСГ на эффективность суперовуляции (Grasso et al., 1989; Lussier et al., 1989; Guilbault et al., 1991). Но этой группой исследователей, как и в наших исследованиях, было отмечено увеличение числа средних фолликулов к 5-му дню цикла под влиянием предобработки препаратом ФСГ. Сопоставление методик проведения экспериментов различными группами исследователей показало, что канадские исследователи (Guilbault et al., 1991) использовали одну инъекцию препарата ФСГ на 1-й день эстрального цикла, тогда как бельгийские исследователи (Touati et al., 1989; 1991) вводили ФСГ в течение 2-х дней в период со 2-го по 4-й. По-видимому, эти различия в методике проведения эксперимента и послужили причиной получения разных результатов.

В нашем эксперименте количество желтых тел и полученных эмбрионов было выше у коров II группы, по сравнению с животными других групп, однако в этом эксперименте обнаруживаются некоторые различия между числом фолликулов, оцененных на 10-й день как нормальные и числом желтых тел, обнаруженных в яичниках коров после вызывания суперовуляции. Это несоответствие, по-видимому, обусловлено действием используемого гонадотропного препарата. В наших экспериментах для предобработки был использован препарат ГСЖК, обладающий пролонгированным действием и содержащий значительные количества ЛГ-активности. Видимо, более пролонгированное действие гонадотропинов СЖК оказало положительное влияние на процесс фолликулогенеза и на эффективность суперовуляции (особенно при введении препарата на 3-й день цикла). Однако длительное воздействие (с 3-го по 10-й день) повышенных количеств ЛГ-активности могло вызвать преждевременную активацию мейоза в ооцитах и повлиять на дальнейший рост фолликулов. Принимая во внимание результаты исследований Мура с соавторами (Moor et al., 1984),

свидетельствующие о преждевременной активации ооцита под влиянием ЛГ, определить начавшиеся изменения, происходящие в фолликулах, содержащих преждевременно активированные ооциты, визуально-микроскопическим методом, по-видимому, оказалось не возможным. Но при вызывании суперовуляции эти изменения перешли в завершающую стадию и фолликулы с преждевременно активированными ооцитами уже не могли дать полноценных яйцеклеток и развиться в нормальные желтые тела. Следует предположить, что при использовании в нашем эксперименте очищенного препарата ФСГ были бы получены более обнадеживающие результаты, но во время проведения эксперимента мы не располагали таким препаратом.

Несмотря на то, что в этом эксперименте нами не было получено высоких результатов при вызывании суперовуляции, исследования по изучению фолликулогенеза позволили решить основную задачу. Было установлено, что предварительное введение экзогенных гонадотропинов в начале лютеальной фазы увеличивает численность популяции средних фолликулов к 10-му дню полового цикла, т.е. к моменту вызывания суперовуляции в середине лютеальной фазы. Этот установленный факт должен послужить основой для дальнейших исследований с использованием препаратов разной степени очистки, с различным соотношением ФСГ и ЛГ, а также с разной степенью пролонгации, которые позволят усовершенствовать схему вызывания суперовуляции в середине лютеальной фазы с предобработкой гонадотропинами в начале полового цикла.

Заключение

Выяснение возможности увеличения численности популяции фолликулов среднего размера к моменту вызывания суперовуляции в середине лютеальной фазы цикла, показало, что на фоне активно функционирующего желтого тела и доминирующего фолликула под влиянием предобработки экзогенными гонадотропинами мелкие фолликулы не успевают за 1-3 дня (с 7-го по 9-й) развиться до средних размеров к моменту основной гормональной обработки животных с целью вызывания суперовуляции (9-11-й день) и поэтому не повышают её эффективности. Однако при введении небольших доз гонадотропинов, обладающих ФСГ-активностью в начальный период полового цикла (3-й день), некоторая часть мелких фолликулов на фоне низкого уровня прогестерона успевает развиваться до средних размеров к моменту введения основной дозы гонадотропных препаратов и, тем

самым, способствует повышению эффективности вызывания суперовуляции.

Введение коровам препарата ХГ в период, предшествующий вызыванию суперовуляции, вызывает уменьшение численности нормальных фолликулов в яичниках обработанных коров за счет лютеинизации и атрезии фолликулов, независимо от их размера, что приводит к снижению эффективности суперовуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gordon I. Hroblems and prospects in cattle egg transfer. Irish Vet.J., 1975, 29: 21-62.
2. Grasso F., Guilbault L.A., Roy G.L., Lussier J.G. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in super-ovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. Theriogenology, 1989, 31: 1209-1220.
3. Greenwood F.,HunterW., Glover J. The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J. 1963, 89: 114-123.
4. Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., et al. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte an embryo quality in cattle. Theriogenology, 1995, 43: 41-50.
5. Guilbault, L. A., Grasso, F., Lussier, J. G., et al. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. Journal a Reproduction and Fertility, 1991, 91: 81-89.
6. Kohram, H., Bousquet, D., Durocher, J. et al. Alterations of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle a field trial. Theriogenology, 1998, 49: 1165-1174.
7. Kruip T.A.M.,DielemanS.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. Reprod. Nutr. Develop., 1982, 22(3): 465-473.
8. Lussier J.G., Carruthers T.D. Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid. Theriogenology, 1989, 31: 779-794.
9. Matton, P., Adelakoun, V., Couture, Y. et al. Growth and replacement of the bovine ovanar follicles during the estrous cycle. Journal of Animal Sciences, 1981, 52: 813-820.
10. Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology, 1983 , 19: 55-81.
11. Moor, R. M., Kruip, T. A. M. and Green, D. Intraovanan control of folliculogenesis limits to superovulation[7]. Theriogenology, 1984, 21: 103-116 .
12. Murphy, M. G., Boland, M. P. and Roche, J. F. The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. Theriogenology, 1998, 49: 557-569.
13. Niswender G., Reicherrt L., Midgley O. et al. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. Endocrinology, 1969, 84: 1166-1173.

14. Pierson R.A., Ginther O.J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. 111. Time of selection of the ovulatorv follicle. Anim. Reprod. Sci. 1988, 16: 81-95.
15. Rajamajendran R., Canseco R.S., Denbow C.J., et al. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. Theriogenology, 1987, 28: 59-65.
16. Saumande J., Chupin D. Superovulation: a limit to egg transfer in cattle. Therriogenology, 1977, 7: 141-149.
17. Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. Biol Reprod, 1988, 39: 308-317.
18. Staigmiller R. B., Bellows R. A., Anderson, G. B., et al. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. Theriogenology, 1992, 37: 1091-1099.
19. Touati K., Van Der Zwalnen, Eetors F.S. et al. Low doses of FSH early in estrous cycle enhances superovulatory response in heifers. Theriogenology, 1989, 31: 269 (Abstract).
20. Ware C.B., Northey D.L., Boland M.P., First N.L. Early cycle FSH-P priming as a prelude to superovulating gonadotropin administration in ewes and heifers. Anim. Reprod. Sci., 1988, 16: 97-105.
21. Webb, R. and Armstrong, D. G. Control of ovarian function, effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle a review. Livestock Production Science, 1998, 53: 95-112.
22. Webb, R. and Armstrong, D. G. Control of ovarian function, effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle a review. Livestock Production Science, 1998, 53: 95-112.
23. Рябых В. и др. Специфичность антисывороток к ЛГ крупного рогатого скота при различных способах иммунизации. Тезисы докладов IV Международного симпозиума по иммунологии воспроизведения, Варна, 1978, 19-22 сентября.
24. Рябых В.П., Никитина В.Н., Стрельников А.И. Динамика половых гормонов в крови тёлок-доноров и реципиентов в период, предшествующий извлечению и пересадке эмбрионов. Труды ВНИИФБиП, 1983, XXVII: 22-34.

ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ И СУПЕРОВУЛЯЦИЯ: II. РЕГУЛИРОВАНИЕ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА И ВЫЗЫВАНИЕ СУПЕРОВУЛЯЦИИ У КОРОВ-ДОНОРОВ В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ЛЮТЕАЛЬНОЙ ФАЗЫ ПОЛОВОГО ЦИКЛА

В.П. Рябых, А.Г. Логинов
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

При сравнительном изучении состояния популяции фолликулов в яичниках коров в начале и середине лютеальной фазы полового цикла (3-й и 10-й дни) и выяснении возможности вызывания суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла, установлено, что общее число поверхностных антральных фолликулов в яичниках животных на 3-й и 10-й дни цикла было практически одинаковым (32,7±0,4 и 29,0±0,4, соответственно). Однако на 3-й день цикла в яичниках животных было достоверно больше фолликулов всех размеров, оцененных как «нормальные», чем на 10-й день (24,5±0,4 против 14,1±0,5). Также, на 3-й день было достоверно больше, чем на 10-й день, нормальных фолликулов диаметром от 4 до 10 мм (15,8±0,4 против 9,2±0,3).

Вызывание суперовуляции у коров-доноров, путём введения ГСЖК на 3-й день и простагландина $F_{2\alpha}$ на 6-й день цикла, дало лучшие результаты, по сравнению с вызыванием её в середине лютеальной фазы цикла (10-й день). Исходя из этих данных, с морфологической точки зрения, популяция фолликулов, имеющаяся в яичниках коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-й день), в большей степени подходит для вызывания суперовуляции, по сравнению с популяцией, имеющейся в середине лютеальной фазы цикла (10-й день).

Установленные факты свидетельствуют о принципиальной возможности вызывания суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-й день) с эффективностью, превышающей общепринятый способ вызывания ее в середине лютеальной фазы полового цикла (10-й день).

Введение

Результаты наших предыдущих исследований (статья I) показали, что при предварительном введении экзогенных гонадотропинов в лютеальную фазу полового цикла (7-8-й день), на фоне активно функционирующего желтого тела, к 10-11-му дню не происходит увеличения численности фолликулов средних размеров за счет роста мелких фолликулов (1-2 мм) и перехода их в разряд средних

фолликулов. При предварительном введении небольших доз экзогенных гонадотропинов на 3-й день полового цикла, когда желтое тело еще не начало активно функционировать, происходит интенсивный рост мелких фолликулов и переход их в категорию фолликулов средних размеров. Однако, под влиянием развивающегося доминирующего фолликула значительная часть этих фолликулов подвергается атрезии к 10-му дню полового цикла и поэтому не происходит существенного повышения эффективности суперовуляции.

Исходя из результатов этих исследований, возникло предположение о возможности регулирования фолликулогенеза и вызывания суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла. Для проверки этого предположения представлялось целесообразным решить следующие задачи:

- провести сравнительное изучение состояния популяции фолликулов в яичниках коров в начале и середине лютеальной фазы полового цикла (3-й и 10-й дни);
- изучить возможность вызывания суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла.

Материал и методы

Для выяснения возможности вызывания суперовуляции у коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла необходимо было провести изучение популяции фолликулов в яичниках коров и телок на 3-й день полового цикла и сопоставление ее с популяцией фолликулов на 10-й день полового цикла, на который общепринято вызывать суперовуляцию по существующим схемам.

Первая серия опытов была проведена на телках случного возраста. Половой цикл всех животных был синхронизирован путем двойной обработки их препаратом простагландина $F_{2\alpha}$ с интервалом в 10 дней. Подопытные животные были разделены на 2 группы: I группа – 12 голов и II группа – 10 голов. Животные I группы были убиты на 3-й день полового цикла, а II группы на – 10-й. Качество поверхностных антральных фолликулов определяли под микроскопом МБИ – 9 при боковом освещении.

Результаты сравнительного изучения популяции фолликулов в начале и середине лютеальной фазы показали, что на 3-й день полового цикла в яичниках коров было достоверно больше нормальных фолликулов среднего размера, по сравнению с 10-м днем полового цикла.

Исходя из этих исследований, было сделано предположение, что вызывание суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла (2-3 дни) может оказаться более

эффективным, по сравнению с общепринятым способом вызывания ее в середине лютеальной фазы (8-12-й дни).

Для проверки этого предположения была проведена *вторая* серия опытов на коровах и телках черно-пестрой породы, которые в течение двух лет многократно использовались для вызывания суперовуляции и получения эмбрионов. Опыт проведен на 7 группах животных от 5 до 9 голов в группе, которые были подвергнуты гормональным обработкам с целью вызывания суперовуляции по следующим схемам (таблица 1).

Таблица 1. ***Схемы гормональных обработок при вызывании суперовуляции в начальный период лютеальной фазы полового цикла***

№	Дни полового цикла								
групп	0	1	2	3	4	5	6	10	12
I								ГСЖК 2500 И.Е.	ПГ
II			ГСЖК 2500 И.Е.		ПГ				
III			ГСЖК 2000 И.Е.			ПГ			
IV		ХГ 1500 И.Е.	ГСЖК 2000 И.Е.		ПГ				
V	ХГ 1000 И.Е.		ГСЖК 2000 И.Е.		ПГ				
VI		ХГ 1500 И.Е.		ГСЖК 2000 И.Е.		*Г*			
VII				ГСЖК 2000 И.Е.			***ПГ***		

На 8-10-й дни после индуцированной охоты у подопытных животных оценивалась степень реакции суперовуляции, и проводилось нехирургическое извлечение эмбрионов. День проявления охоты считали нулевым днем.

Начиная с 1-го дня полового цикла до момента индуцированной охоты у подопытных животных II, III и VII групп были взяты образцы крови для анализа в них эстрадиола-17β радиоиммунологическим методом.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов *первой* серии опытов показал (табл.2), что общее число поверхностных антральных фолликулов в яичниках животных на 3-й и 10-й день цикла было практически одинаковым (32,7±0,4 и 29,0±0,4, соответственно). Однако на 3-й день цикла в

яичниках животных было достоверно больше фолликулов всех размеров, оцененных как «нормальные», чем на 10-й день (24,5±0,4 против 14,1±0,5). Также на 3-й день было достоверно больше, чем на 10-й день нормальных фолликулов диаметром от 4 до 10 мм, т.е. тех фолликулов, которые развиваются до предовуляторного состояния под действием экзогенных гонадотропинов при вызывании суперовуляции и овулируют (15,8±0,4 против 9,2±0,3, соответственно). Кроме того, на 3-й день по сравнению с 10-м днем цикла в яичниках телок было достоверно меньше атретических (3,9±0,1 против 5,4±0,1) и лютеинизирующих (4,3±0,1 против 9,5±0,3) фолликулов.

Таблица 2. ***Популяция антральных фолликулов в яичниках коров на 3-й и 10-й дни полового цикла***

Диаметр фолликулов в (мм)	1 группа			2 группа		
	нормальные	атретиче-ские	лютеинизирующие	нормальные	атретиче-ские	лютеинизирующи
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
1	0	0	0	0	0	0
2	4,9±0,6	0	2,0±0,3	2,0±0,3	0	0
3	3,3±0,6	1,0±0,1	1,0±0,1	3,4±1,1	0,3±0,1	5,3±0,6
4	5,8±0,7	0,9±0,1	1,1±0,1	4,3±1,0	1,4±0,3	2,6±0,8
5	6,0±0,7	0,9±0,1	0,1±0,1	2,9±0,6	2,5±0,6	0,6±0,1
6	2,1±0,3	0,6±0,3	0	1,0±0,3	0,5±0,2	0,7±0,4
7	0,6±0,1	0,1±0,1	0	0,6±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1
8	0,6±0,1	0	0	0,1±0,1	0,1±0,1	0,2±0,1
9	0,3±0,2	0,3±0,1	0	0,2±0,1	0,1±0,1	0
10	0,4±0,2	0	0	0,1±0,1	0,4±0,1	0
>10	0,5±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1	0,9±0,1	0	0
Всего:						
n	24,5	3,9	4,3	14,1	5,4	9,5
%	74,9	11,9	13,2	48,6	18,6	32,8

Таким образом, проведенные исследования показали, что с точки зрения морфофункционального состояния популяция антральных фолликулов, имеющаяся в яичниках коров на 3-й день полового цикла, в большей степени подходит для воздействия на нее гонадотропинами с целью вызывания суперовуляции, чем на 10-й день цикла.

Установленный нами факт подтверждается результатами, полученными позднее другими исследователями, о компетентности ооцитов, выделенных из фолликулов разных размеров и в разные периоды полового цикла, развиваться in vitro до бластоцисты. Было установлено, что выход бластоцист значительно выше при дозревании in vitro ооцитов, полученных из яичников коров на 2-й день цикла, чем на 7-й или 15-й (Hagemann et al., 1999). В другом эксперименте выход бластоцист из ооцитов, аспирированных из всех крупных фолликулов на 2-й, 5-й и 8-й дни полового цикла, составил 27, 29 и 15%, соответственно (Hendriksen et al., 2000).

Результаты этих исследований свидетельствуют не только о лучшем состоянии популяции фолликулов, но и о лучшем состоянии ооцитов в начальный период лютеальной фазы полового цикла, когда еще не развился доминантный фолликул первой волны и не сформировалось желтое тело.

Таким образом, проведенные исследования показали, что как состояние популяции фолликулов, так и качество ооцитов в этих фолликулах в начальный период лютеальной фазы полового цикла у коров в большей степени подходят для вызывания суперовуляции. Однако для более эффективного использования этого состояния яичников необходимо разработать схемы гормональной обработки коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла.

Анализ результатов *второй* серии исследований показал (табл. 3), что введение коровам-донорам на 2-й день полового цикла ГСЖК в дозе 2400 И.Е. (II гр.) вызывало развитие в их яичниках большого числа фолликулов диаметром свыше 10 мм, по сравнению с животными контрольной группы (Iгр.), которым гонадотропин вводили на 10-й день цикла (11,4±3,2 против 6,2±1,2). Однако, только незначительная часть развившихся фолликулов овулировала (2,7±3,21 и 1,7±0,7). Этот факт привел к мысли о необходимости снижения дозы гонадотропина, т.к. введение его проводится на фоне низкого уровня прогестерона, продуцируемого еще не сформировавшимся желтым телом. Снижение дозы вводимого на 2-й день цикла ГСЖК до 2000 И.Е.(III гр.) уменьшило число развившихся фолликулов (6,9±1,3) и несколько увеличило число овуляций (3,0±1,5).

Несмотря на то, что введение ГСЖК на 2-й день цикла и простагландина $F_{2\alpha}$ на 4-5-й дни (II и III гр.) вызывало большее число овуляций, по сравнению с животными контрольной группы, использовать эти схемы гормональных обработок для вызывания суперовуляции у коров-доноров оказалось нецелесообразным, т.к. у животных этих групп были слабо выражены признаки охоты и у значительной части этих животных весьма сложно было определить время осеменения. В результате этого большая часть яйцеклеток,

получаемых от животных этих двух групп, оказывалась неоплодотворенной. В связи с этим возникло предположение, что слабая выраженность признаков охоты обусловлена еще недостаточной степенью развития желтого тела у этих животных к 4-5-му дню цикла и его относительно низкой чувствительностью к простагландину $F_{2\alpha}$ в данный период.

Таблица 3. ***Влияние сроков гормональной стимуляции коров-доноров на процессы фолликулогенеза и суперовуляции***

№ гр.	Число животных	Количество фолликулов			Получено полноценных эмбрионов
		овулировавших	неовулировавших	развилось всего	
I	9	1,7±0,7	4,5±1,7	6,2±1,2	0,8±0,6
II	4	2,7±3,2	8,7±3,4	11,4±3,2	0
III	9	3,0±1,5	3,9±1,1	6,9±1,3	0,3±0,3
IV	5	0	5,8±0,9	5,8±0,9	0
V	5	0,8±0,6	2,6±1,8	3,4±0,9	0
VI	5	0,4±0,4	2,6±1,8	3,0±0,8	0
VII	15	4,4±0,7	0,8±0,9	5,2±1,1	1,9±0,7

Исходя из этого предположения, была предпринята попытка усилить функцию желтого тела и его более быстрое развитие в начальный период лютеальной фазы цикла. С этой целью подопытным животным в день охоты (IV гр.) или на первый день цикла (V и VI гр.) был введен хорионический гонадотропин человека (ХГ) в дозах 1000-1500 И.Е.на голову, а затем на 2-й или 3-й день цикла по 2000 И.Е. ГСЖК. Анализ результатов этого опыта показал, что у животных этих групп в яичниках почти не было желтых тел (от 0 до 0,8±0,45) при небольшом количестве неовулировавших фолликулов диаметром свыше 10 мм, которые были обнаружены в яичниках животных на 8-10 дни после индуцированной охоты. По всей вероятности, хорионический гонадотропин, в используемых дозах, вызвал лютеинизацию и атрезию фолликулов средних размеров, и в яичниках просто не осталось нормальных фолликулов, которые могли бы развиться под действием ГСЖК и овулировать. А те крупные фолликулы, которые были обнаружены в яичниках коров на 10-й день после индуцированной охоты, развились значительно позднее из популяции мелких фолликулов под действием остаточных количеств ГСЖК.

Таким образом, попытка ускорить развитие желтого тела с помощью хорионического гонадотропина привела к атрезии и лютеинизации основной массы фолликулов средних размеров и к

отрицательным результатам при вызывании суперовуляции, что ещё раз подтвердило ранее выдвинутое нами положение (см. статью 1) об осторожном использовании ХГ при регулировании фолликулогенеза у крупного рогатого скота.

После неудачного эксперимента с использованием хорионического гонадотропина, была предпринята попытка несколько сдвинуть сроки введения гормональных препаратов, но с таким условием, чтобы введение ГСЖК пришлось все же на период развития многочисленной популяции фолликулов средних размеров (2-3-й дни полового цикла), а введение простагландина $F_{2\alpha}$ на период сформировавшегося желтого тела. Введение ГСЖК на 3-й день и введение простагландина $F_{2\alpha}$ на 6-й день цикла (VII гр.) дало определенный положительный эффект. При применении данной схемы гормональной стимуляции, в яичниках животных VII группы было обнаружено практически такое же число фолликулов, как и у животных I группы (контрольной), но число овулировавших фолликулов у животных VII группы было выше, чем у животных контрольной группы (4,4±0,7 против 1,7±0,68). По числу овуляций на пару яичников животные VII группы превосходили животных всех остальных групп.

Результаты этой серии экспериментов дают основание заключить, что к третьему дню полового цикла на фоне слабо функционирующего желтого тела и отсутствия доминантного фолликула в яичниках коров формируется относительно однородная популяция антральных фолликулов средних размеров, которые способны к развитию и овуляции под влиянием экзогенных гонадотропинов при вызывании суперовуляции. Введение препаратов простагландина $F_{2\alpha}$ на 6-й день полового цикла приходится на период заключительного этапа формирования желтого тела и повышения его чувствительности к простагландину $F_{2\alpha}$, в результате чего подопытные животные проявляли четкие признаки охоты.

В то время, когда нами были получены результаты этого эксперимента, появилось сообщение ирландских исследователей (Goulding et al., 1990) о вызывании суперовуляции в начальный период лютеальной фазы полового цикла. При этом гормональная обработка коров проводилась понижающимися дозами препарата ФСГ-Р на 2-й, 4-й, 5-й и 6-й дни полового цикла, а простагландин вводили на 5-й и 6-й дни. Результаты этого эксперимента показали, что число овуляций и полученных эмбрионов было ниже при вызывании суперовуляции на 2-й день, чем на 9-11-й. Однако авторы не сочли возможным сделать окончательный вывод о преимуществах той или иной схемы, т.к. в этом эксперименте ФСГ не вводили на 3-й день цикла, т.е. был допущен перерыв на целые сутки при введении препарата ФСГ, что могло

существенно повлиять на результаты суперовуляции. В последующей работе этой группы исследователей, о которой сообщает в своей статье Boland (1991) как о неопубликованных данных, была отмечена более низкая эффективность вызывания суперовуляции в начальный период лютеальной фазы цикла, чем в середине фазы (10-й день). Был сделан вывод, что на 2-3-й дни цикла яичник еще не способен отвечать быстро на гормональную стимуляцию. Однако позднее появилось сообщение американских исследователей (Friche et al., 1994), которые проводили обработку коров препаратом ФСГ-Р со 2-го по 7-й день цикла и получили лучшие результаты по выходу эмбрионов, чем при вызывании суперовуляции в середине лютеальной фазы (10-й день). Таким образом, результаты этого исследования подтверждают установленный нами факт об эффективности вызывания суперовуляции у коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла.

Значительные различия в результативности вызывания суперовуляции в начальный период лютеальной фазы, отмеченные разными группами исследователей, свидетельствуют о том, что пока еще только показана принципиальная возможность вызывания суперовуляции в этот период полового цикла. Но для получения стабильных результатов еще требуются исследования по выяснению влияния различных факторов на процесс фолликулогенеза в этот период и по совершенствованию схем гормональной обработки.

Таким образом, установленные факты свидетельствуют о принципиальной возможности вызывания суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-й день) с эффективностью, превышающей общепринятый способ вызывания ее в середине лютеальной фазы полового цикла (10-й день).

Заключение

Исследованиями, направленными на выяснение периода времени полового цикла, в течение которого в яичниках коров развивается более многочисленная и относительно однородная популяция фолликулов, способных овулировать под действием экзогенных гонадотропинов при вызывании суперовуляции, установлено, что в начальный период нового полового цикла (3-й день) на фоне низкого уровня прогестерона и отсутствия доминирующего фолликула в яичниках коров происходит набор первой волны фолликулов диаметром ≥ 3 мм. Из фолликулов этой волны выделяется доминирующий фолликул, который, судя по уровню синтезируемого им эстрадиола, достигает пика своего развития к 6-9-му дню, после чего наступает его атрезия и начинается набор новой II волны фолликулов. По общей численности и по количеству нормальных фолликулов средних размеров I фолликулярная волна значительно

превосходит популяцию фолликулов, имеющуюся в яичниках коров на 10-й день полового цикла (II волна), т.к. набор и развитие фолликулов II волны происходит на фоне активно функционирующего желтого тела и остаточного действия доминирующего фолликула. Исходя из этих данных, с морфологической точки зрения, популяция фолликулов, имеющаяся в яичниках коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла (3-й день), в большей степени подходит для вызывания суперовуляции, по сравнению с популяцией, имеющейся в середине лютеальной фазы цикла (10-й день).

Установленные факты о более многочисленной популяции фолликулов в яичниках коров на 3-й день полового цикла, по сравнению с 10-м днем, и о более интенсивном развитии мелких фолликулов на фоне низкого содержания прогестерона, позволили предложить схему вызывания суперовуляции в начальный период лютеальной фазы цикла. Не исключено, что эффективность суперовуляции была бы значительно выше, если бы для гонадотропной стимуляции использовали препарат высокоочищенного ФСГ, а не ГСЖК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boland M.P., Murphy M.G., Roche J.F. The use of ultrasound to monitor ovarian function in farm animals. Agricul. Biotech. News, 1990, 2: 841-844.
2. Friche P.M., Kirsch J.D., Redmer D.A. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. Theriogenology, 1994, 42, 1: 43-53.
3. Goulding D., Williams D.H., Boland M.P. et al. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or et mid luteal phase of the estrous cycle. Theriogenology, 1990, 33, 1: 239-249.
4. Hagemann L.J., Deaumont S.E., Berg M. et al. Development during sIVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. Mol. Reprod. Dev., 1999, 53: 451-458.
5. Hendriksen P.J.,Vos P.L., Dileman S.J. et al. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology, 2000, 53, 4: 53-68.

ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ И СУПЕРОВУЛЯЦИЯ: III. РЕГУЛИРОВАНИЕ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА И ВЫЗЫВАНИЕ СУПЕРОВУЛЯЦИИ У КОРОВ-ДОНОРОВ ПРЕПАРАТАМИ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ФСГ И ЛГ

В.П. Рябых, К.И. Бахитов, А.Г. Логинов
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

В исследованиях по выяснению происхождения крупных неовулировавших фолликулов в яичниках коров-доноров после суперовуляции, вызванной препаратами ГСЖК, и выяснению влияния на процессы фолликулогенеза и овогенеза гонадотропных препаратов с различным содержанием ЛГ установлено, что включение подкожной инъекции антисыворотки к ГСЖК в схему гормональной обработки доноров достоверно снизило число неовулировавших фолликулов за счет связывания и элиминирования остаточных количеств ФСГ-активности ГСЖК. Уровень эстрадиола-17β в крови животных-доноров, обработанных антисывороткой к ГСЖК, резко снижался в период после охоты, в отличие от животных, необработанных анти-СЖК. Эти исследования экспериментально доказали, что крупные неовулировавшие фолликулы, обнаруженные в яичниках коров-доноров после вызывания суперовуляции, развиваются из популяции мелких фолликулов под воздействием остаточных количеств гонадотропина СЖК.

При обработке постоянных коров-доноров препаратом ФСГ-супер, содержащим следовые количества ЛГ, получен высокий выход полноценных эмбрионов на одного донора (8,1±1,4), который достоверно превышает выход полноценных эмбрионов (3,8±0,8) после обработки животных препаратами ФСГ-п, содержащими высокие уровни ЛГ. При одноразовом использовании коров в послеотельный период, выход полноценных эмбрионов как в расчёте на одного обработанного донора, так и на одного прореагировавшего - был достоверно выше при вызывании суперовуляции высокоочищенным препаратом ФСГ-супер, чем препаратами ФСГ-п (4,4 и 5,0 против 2,8 и 3,6, соответственно).

Полученные результаты дают основание заключить, что более высокий выход полноценных эмбрионов при вызывании суперовуляции у коров с помощью высокоочищенного препарата ФСГ-супер обусловлен более низким содержанием в нём примеси ЛГ, который вызывает преждевременную инициацию мейоза у определённой части ооцитов в крупных фолликулах, и приводит в дальнейшем к гибели эмбрионов.

Введение

Как показали многочисленные исследования, при вызывании суперовуляции с помощью препаратов, изготовленных на основе СЖК, в яичниках коров-доноров в день извлечения эмбрионов (7-10-й день после индуцированной охоты) всегда обнаруживаются крупные неовулировавшие фолликулы. Согласно предположению некоторых авторов (Booth, 1975; Moor, 1982), в процессе своего развития эти фолликулы выделяют повышенные количества эстрогенов, вызывая дисбаланс половых гормонов в организме животного в период после оплодотворения яйцеклеток, что может отрицательно влиять на жизнеспособность эмбрионов, снижать их качество и вызывать гибель на ранних стадиях развития. Исследования (Shams,1978) показали, что препараты СЖК и ГСЖК обладают значительным пролонгированным действием, а остаточные количества ФСГ–активности сохраняются в крови коров до 12 суток. Исходя из этого факта, возникло предположение, что большая часть крупных неовулировавших фолликулов, обнаруживаемых в яичниках коров-доноров через 7-10 дней после вызывания суперовуляции, развивается из мелких фолликулов второй волны, и рост их вызван остаточными количествами ФСГ-активности препаратов СЖК уже после предовуляторного выброса ЛГ и овуляции фолликулов I волны.

От знания механизма происхождения этих фолликулов зависит стратегия исследований, направленных на совершенствование способов вызывания суперовуляции у коров-доноров. Если, в действительности, эти неовулировавшие фолликулы происходят из популяции мелких фолликулов второй волны, то для вызывания суперовуляции необходимо использовать гонадотропные препараты, не обладающие пролонгированным действием. А если эти фолликулы являются предовуляторными фолликулами первой волны, неовулировавшими под действием предовуляторного выброса ЛГ, то это говорит о том, что предовуляторный выброс ЛГ был недостаточным, и для того чтобы вызвать овуляцию этих фолликулов, необходимо в период индуцированной охоты дополнительно вводить препараты, обладающие лютеинизирующим действием.

С целью проверки этого предположения была предпринята попытка выяснить влияние остаточных количеств гонадотропинов СЖК на процесс фолликулогенеза после вызванной суперовуляции и установить происхождение крупных неовулировавших фолликулов в яичниках коров-доноров. Кроме того, изучение действия остаточных количеств гонадотропинов СЖК на популяцию фолликулов в период не сформировавшегося жёлтого тела и низкого уровня прогестерона, может быть хорошей моделью для выяснения возможности

регулирования фолликулогенеза у коров в начальный период лютеальной фазы полового цикла.

На первом этапе работ по трансплантации эмбрионов, во всем мире для вызывания суперовуляции использовали препараты, изготовленные из сыворотки жеребых кобыл (СЖК). Однако при вызывании суперовуляции препаратами СЖК от коров-доноров получали в среднем 1,5 - 2,0 полноценных эмбриона на одну гормональную обработку. В связи с этим возникла потребность в высококачественных стандартизированных препаратах, обладающих фолликулостимулирующей активностью, для вызывания суперовуляции у животных-доноров эмбрионов.

С появлением в середине 80-х годов на мировом рынке препаратов фолликулостимулирующего гормона, полученных из гипофизов сельскохозяйственных животных (ФСГ-п), выход полноценных эмбрионов на одну корову-донора увеличился до 3-4. Но стоимость этих препаратов в 1986-1988 годах была достаточно высокой и равнялась 25 долларам за одну дозу для вызывания суперовуляции у коров (50 ед. арморовского стандарта). В связи с этим, по инициативе Агропрома СССР в 1987 году была предпринята попытка, наладить выпуск отечественного препарата ФСГ. ВНИИФБиП в содружестве с научно-производственным кооперативом "Биосервис" (в дальнейшем АО "Союзагромед") также были привлечены к разработке технологии получения препарата ФСГ.

Приступая к разработке технического задания, творческий коллектив руководствовался следующими научными фактами и гипотезами, которые были установлены и выдвинуты к тому времени:

1. Лучшие коммерческие препараты ФСГ-п американских фирм "Шеринг" и "Биотек" наряду с ФСГ содержат примеси лютеинизирующего гормона (ЛГ). При этом содержание ЛГ в разных партиях препарата превышает содержание ФСГ в 2-8 раз (Donaldson, 1987). Это обусловлено тем, что молекулы ФСГ и ЛГ имеют большое сходство в своем строении и поэтому разделение этих двух гормонов общепринятыми биохимическими методами сильно затруднено. Кроме того, в гипофизах сельскохозяйственных животных, из которых получают препарат ФСГ, содержится больше ЛГ, чем ФСГ.

2. Исследованиями по дозреванию ооцитов крупного рогатого скота in vitro было установлено, что ЛГ способствует активации мейоза в ооцитах. Поэтому было выдвинуто предположение, что наличие примеси ЛГ в препаратах ФСГ должно вызывать преждевременную инициацию мейоза в ооцитах, находящихся в крупных фолликулах. В результате чего, в них происходит отставание темпов созревания цитоплазмы от темпов созревания ядра и, как следствие этого - снижение выхода полноценных эмбрионов при вызывании суперовуляции у коров-доноров с помощью этих препаратов.

Исходя из этих теоретических посылок, была сделана ставка на разработку технологии получения высокоочищенного препарата ФСГ, содержащего минимально возможное количество примеси ЛГ.

На основе созданных авторским коллективом комплексных сорбентов с высокими разрешающими свойствами была разработана технология получения высокоочищенного препарата *ФСГ-супер*, который содержал 1 ед. ЛГ на 1000-1500 ед. ФСГ, в отличие от препаратов ведущих зарубежных фирм, содержащих от 2 до 8 ед. ЛГ на 1 ед. ФСГ.

С целью проверки вышеприведенных теоретических положений и качества вновь полученного препарата, возникла необходимость в сравнительных испытаниях препарата ФСГ-супер и лучших коммерческих препаратов зарубежных фирм.

Материал и методы

Первая серия экспериментов, направленная на выяснение происхождения крупных неовулировавших фолликулов в яичниках коров-доноров после вызванной суперовуляции, была проведена по схеме, приведенной в таблице 1. Подопытные животные были разбиты на 3 группы. Животным I и II групп на 10-й день полового цикла вводили по 3000 И.Е. ГСЖК, а животным III группы с 9-го по 13-й дни полового цикла дважды в сутки вводили по 5 мг ФСГ из гипофизов свиней фирмы « Биотек ». На 12-й день цикла животным всех групп вводили препарат простагландина $F_{2\alpha}$ (эстрофан). Через 5-6 часов от начала индуцированной охоты животным II группы подкожно вводили по 5 мл антисыворотки к СЖК, полученной в нашей лаборатории, путем иммунизации коз. Тестирование биологической активности антисыворотки к СЖК проводили на мышах и телках, обработанных СЖК. Антисыворотка к СЖК в дозе 5 мл почти полностью нейтрализовала стимулирующее действие 3000 И.Е. СЖК. Динамику половых гормонов контролировали путем определения их в периферической крови животных-доноров. Методы определения гормонов изложены в статье 1 (стр. 6).

Вторая серия экспериментов, направленная на проведение сравнительных испытаний препарата ФСГ-супер и лучших коммерческих препаратов ФСГ-п американских фирм «Шеринг» и «Биотек», была проведена на высокопродуктивных коровах. При этом в одном хозяйстве и на виварии ВНИИФБиП для вызывания суперовуляции были использованы постоянные коровы-доноры, а в остальных хозяйствах для обработки были взяты коровы без установленной эмбриопродуктивности при одноразовом использовании их в послеотельный период. Обработку коров американскими препаратами ФСГ-п проводили в соответствии со схемами,

рекомендованными в наставлениях по применению этих препаратов. Схему введения препарата ФСГ-супер уточняли в процессе испытаний, поэтому на начальных этапах исследований данный препарат вводили по четырехдневной схеме, с понижением активной дозы препарата, начиная с 10-12-го дня полового цикла (8-7-6-4 ед. арморовского стандарта на 1 инъекцию, по 2 инъекции в сутки). К концу сравнительных испытаний была выявлена оптимальная схема введения препарата ФСГ-супер, позволяющая в большей степени использовать преимущества высокоочищенного препарата ФСГ с минимальным содержанием примеси ЛГ. По этой схеме ФСГ-супер вводили в течение 5-ти дней равными дозами дважды в день, по 5 ед. арморовского стандарта за инъекцию с интервалом 12 часов. Препарат простагландина $F_{2\alpha}$ вводили на 4-е сутки от начала введения ФСГ.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов *первой* серии экспериментов (таблица 1) свидетельствует, что при введении телкам-донорам СЖК в дозе 3000 И.Е. в их яичниках обнаружено 7,9±1,0 желтых тел, образовавшихся из овулировавших фолликулов и 4,3±0,9 неовулировавших фолликулов. Включение в схему гормональной обработки доноров подкожной инъекции антисыворотки к СЖК в день осеменения (II гр.) достоверно ($P<0,05$) снизило число неовулировавших фолликулов за счет связывания и элиминирования остаточных количеств ФСГ-активности СЖК,

Таблица 1. ***Влияние различных схем гормональной обработки коров- доноров на реакцию суперовуляцией и процесс фолликулогенеза***

№№ гр.	Схема гормональной обработки	Число животных	Реакция яичников			Извлечено яйцеклеток и эмбрионов на 1 донора
			желтые тела	неовулировавшие фолликулы	процент неовулировавших фолликулов	
			M±м	M±м		M±м
I	***СЖК+ПГФ***	28	7,9±1,0	4,3±0,93	35,3	1,9±0,51
II	СЖК+ПГФ +анти-СЖК	21	10,7±0,84	1,3±0,57	10,8	2,7±0,7
III	ФСГ-ПГФ	14	12,6±3,35	2,1±0,62	14,7	4,0±1,1

которая пролонгируется за счет n-сиаловой кислоты. Примерно такой же процент неовулировавших фолликулов от числа развившихся был отмечен и у животных-доноров III группы, обработанных ФСГ-п в

общей дозе 50 армор. ед. на одного донора. Следует отметить, что яичники у телок-доноров, которым в день осеменения вводили антисыворотку к СЖК, были умеренной величины, твердыми на ощупь, с четко выраженными желтыми телами. В то же время яичники у доноров I группы в большинстве случаев были гипертрофированы, округлой формы, относительно мягкой консистенции за счет наличия больших неовулировавших фолликулов.

Анализ динамики уровня эстрадиола-17β в крови животных подопытных групп показал (табл.2), что предовуляторный подъем этого гормона в плазме крови у доноров I и II групп был приблизительно на уровне одного порядка (37,2-47,2 пг/мл). Через одни сутки после осеменения его концентрация в крови у доноров II группы резко снижалась (2,9пг/мл) и оставалась на низком уровне (5,4 пг/мл) на третьи сутки после осеменения. У животных, которым не вводили антисыворотку к СЖК (I группа), секреция эстрадиола-17β оставалась повышенной как на 1-й, так и на 3-й день после осеменения (20,0 и 15,5 пг/мл, соответственно). Этот факт свидетельствует о наличии в яичниках животных этой группы популяции крупных растущих фолликулов, способных секретировать эстрадиол-17β. Уровень эстрадиола-17β в крови животных-доноров, обработанных антисывороткой к СЖК (II группа), резко снижался в период после охоты, в отличие от животных, необработанных анти-СЖК (I группа), что свидетельствует о значительном сокращении популяции растущих антральных фолликулов у животных II группы в данный период.

Таблица 2. Изменения концентрации эстрадиола-17β в плазме крови у животных-доноров при различных схемах гормональной обработки (пг/мл)

№№ групп	Сроки взятия образцов крови			
	13-й день цикла	день охоты	1-й день после суперовуляции	3-й день после суперовуляции
I	18,1±5,6	37,2±5,6	20,0±13,4	15,5±2,1
II	43,0±11,6	47,2±8,0	2,9±0,9	5,4±4,0
III	6,8±2,65	22,8±8,1	3,3±1,2	7,4±5,5

В секреции прогестерона у животных-доноров разных групп заметной разницы не обнаружено (таблица 3). Некоторое увеличение концентрации этого гормона в плазме крови у доноров было отмечено после введения им СЖК, по сравнению с уровнем его на 10-й день естественного полового цикла. В группе животных-доноров, которым вводили ФСГ, увеличение концентрации прогестерона на 12-й день цикла было менее значительным. В день проявления охоты после инъекции $ПГФ_{2\alpha}$ концентрация прогестерона в плазме крови у доноров всех групп была самой низкой за исследуемый период (1,66-2,23 нг/мл).

После суперовуляции (на 3-й день) концентрация прогестерона в плазме крови у этих животных резко возросла.

Таблица 3. ***Динамика прогестерона в плазме крови у доноров при различных схемах вызывания суперовуляции***

Сроки взятия образцов крови	Концентрация прогестерона, нг/мл		
	I группа	II группа	III группа
До суперовуляции			
10-й день цикла	3,51±0,39	4,00±0,71	3,04±0,12
12-й день цикла	5,52±1,80	5,24±0,35	3,59±0,15
В день охоты	1,66±0,08	2,23±0,12	1,72±0,06
После суперовуляции			
3-й день цикла	4,56±0,60	4,71±1,76	3,66±0,86

Таким образом, эти исследования экспериментально доказали, что крупные неовулировавшие фолликулы, обнаруженные в яичниках коров-доноров после вызывания суперовуляции, развиваются под воздействием остаточных количеств гонадотропина СЖК из популяции мелких фолликулов. В период гормональной обработки под влиянием высоких доз ГСЖК мелкие фолликулы увеличиваются в размерах до среднего уровня, но за 4-5 дней не успевают развиться до предовуляторного состояния и овулировать. Однако после овуляции фолликулов первой предовуляторной волны, имевших на момент начала гормональной обработки средний и крупный размеры, на фоне низкого уровня прогестерона и достаточно высоких остаточных количеств СЖК эти фолликулы II волны развиваются до крупных размеров и обнаруживаются в яичниках коров-доноров на 7-10-й дни после вызывания суперовуляции. Введение животным-донорам в начальный период охоты антисыворотки к СЖК в количестве, связывающем 50% ФСГ-активности СЖК, вводимой донору для вызывания суперовуляции, достоверно (более чем в 3 раза) снижало число неовулировавших фолликулов в яичниках коров-доноров в период после овуляции и обозначило тенденцию к увеличению выхода эмбрионов на 1-го донора. По своему физиологическому действию на яичники животных-доноров, в период после охоты, схема гормональной обработки с использованием антисыворотки к СЖК (II группа) приближается к схеме, основанной на использовании ФСГ (III группа).

Таким образом, результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что для вызывания суперовуляции целесообразно использовать гонадотропные препараты, не обладающие пролонгированным действием.

Анализ результатов второй серии исследований показал (табл. 4), что при обработке постоянных коров-доноров препаратом ФСГ-супер получен высокий выход полноценных эмбрионов на одного донора - 9,3±1,5 (СКНИИЖ) и 8,1±1,4 (ВНИИФБиП), который достоверно превышает выход полноценных эмбрионов (3,8±0,8) после обработки животных препаратом ФСГ-п (Шеринг).

Таблица 4. ***Результаты вызывания суперовуляции различными препаратами ФСГ у постоянных коров-доноров***

Показатели	СКНИИЖ®	ВНИИФБиП	
	ФСГ-супер	ФСГ-п	ФСГ-супер
Обработано животных (всего)	10	10	18
- из них прореагировало суперовуляцией	8	8	15
- % прореагировавших	80	80	83,3
Получено эмбрионов на 1-го донора:	11,7±1,8	6,4±0,9	10,7±1,6
- из них полноценных	9,3±1,5	3,8±0,8	8,1±1,4
- % полноценных эмбрионов	80	60	76

®-эксперимент проведен Белевичем В.П.

Анализ результатов сравнительных испытаний препарата ФСГ-супер и лучших коммерческих препаратов зарубежных фирм, на коровах без установленной эмбриопродуктивности при одноразовом использовании их в послеотельный период, свидетельствует (табл.5), что

Таблица 5. ***Результаты вызывания суперовуляции различными препаратами ФСГ у коров при одноразовом использовании их в послеотельный период***

Исследуемые показатели	ФСГ-п (США)	ФСГ-супер (Россия)
1. Обработано животных (всего):	22	38
- из них прореагировало суперовуляцией	17	33
- % прореагировавших	77,3	86,8
2. Получено эмбрионов (всего)	116	261
3. Число эмбрионов на одного обработанного животного:	5,3± 1,0	6,8± 1,1
- из них полноценных	2,8 ±0,6	4,4± 0,5
- % полноценных эмбрионов	52,8	64,7
4. Число эмбрионов на одного прореагировавшего донора:	7,0 ±0,9	8,0± 1,0
- из них полноценных	3,6 ±0,5	5,0 ±0,6
- % полноценных	51,4	62,5

число полноценных эмбрионов, полученных как в расчёте на одного обработанного донора, так и на одного прореагировавшего ─ было

достоверно выше при вызывании суперовуляции с помощью высокоочищенного препарата ФСГ-супер (4,4 и 5,0 против 2,8 и 3,6, соответственно).

Полученные результаты (табл. 4 и 5) дают основание предположить, что более высокий выход полноценных эмбрионов при вызывании суперовуляции у коров с помощью высокоочищенного препарата ФСГ-супер, по сравнению с коммерческими препаратами ФСГ-п, обусловлен более низким содержанием примеси ЛГ в этом препарате. Повышенное содержание ЛГ в препаратах ФСГ-п, по-видимому, вызывает преждевременную инициацию мейоза у определённой части ооцитов в крупных фолликулах, что ведёт к нарушению синхронности созревания ядра и цитоплазмы, которое и приводит в дальнейшем к гибели эмбрионов, развившихся из этих яйцеклеток после их оплодотворения.

Таким образом, проведенные исследования показали, что высокоочищенный препарат ФСГ, содержащий минимальное количество примеси ЛГ, более благоприятно влияет на процесс фолликулогенеза в яичниках коров при вызывании суперовуляции и достоверно повышает выход полноценных эмбрионов, по сравнению с препаратами ФСГ, содержащими большее количество примеси ЛГ.

Анализ результатов вызывания суперовуляции показал, что около 55% эмбрионов, полученных в результате вызывания суперовуляции у коров-доноров, на 8-й день имеют аномалии развития (Newcomb, 1982). Выдвинуто предположение, что причиной этих аномалий являются неблагоприятные условия, создающиеся в маточной среде под влиянием чрезвычайно искаженных уровней стероидных гормонов в крови этих животных (Booth et al., 1975). Но нельзя исключить и такое предположение, что качество яйцеклеток может зависеть от неблагоприятного взаимодействия между экзогенными гонадотропинами и клетками фолликулов. Дальнейшие эксперименты подтвердили это предположение. Результаты экспериментов, проведенных на овцах и кровах, показали, что высокоочищенные препараты ФСГ стимулируют развитие фолликула, но не активируют преждевременно ооцит, тогда как препараты ГСЖК, содержащие высокие уровни ЛГ-активности, не только стимулируют развитие фолликулов, но и вызывают преждевременную активацию значительной части ооцитов в этих фолликулах (Moor et al., 1984). Авторы этого исследования предполагают, что преждевременная активация является важным механизмом снижения качества эмбрионов при вызывании суперовуляции.

Исследования последних лет в определенной степени подтверждают это предположение. Установлено, что не только клетки фолликула оказывают влияние на ооцит, но сам ооцит играет критическую роль в развитии и функционировании окружающих его

клеток (Buccione et al., 1990; Vanderhyden et al., 1990, 1992). Факторы, секретируемые ооцитом, обнаруженные впервые у грызунов, позднее были найдены в ооцитах свиней (Vanderhyden, 1993) и крупного рогатого скота (Ralph et al., 1995). Не исключено, что преждевременная активация ооцитов экзогенными гонадотропинами может оказывать влияние на секрецию ооцитами факторов, влияющих на клеточное окружение ооцита, и на дальнейшую судьбу самого фолликула. Таким образом, эксперименты показали, что при вызывании суперовуляции экзогенные гонадотропины могут вызывать преждевременную активацию ооцитов и тем самым снижать качество яйцеклеток и эмбрионов. При этом отмечено, что ГСЖК в большей степени нарушают физиологическую функцию ооцитов, по сравнению с ФСГ.

Различия в гормональном действии на ооцит препаратов ГСЖК и ФСГ объясняются их химическими свойствами. Хорошо установлено, что эти гонадотропины имеют большое сходство. Они состоят из структурно подобных α - субъединиц и биологически специфичных β - субъединиц. В дополнение к этому каждый гормон имеет характерный углеводный комплекс, состоящий из нейтральных сахаров, гексозаминов и очень изменчивого состава n-сиаловой кислоты, которая определяет период полужизни молекул гормонов. Очень низкое содержание сиаловой кислоты в молекуле ЛГ и несколько повышенное – в ФСГ обуславливает их периоды полужизни – 30 и 110 мин для ЛГ и ФСГ, соответственно (Gay et al., 1970). В противоположность этому ГСЖК имеет высокое содержание сиаловой кислоты, которая значительно удлиняет период полужизни гонадотропной активности в препаратах ГСЖК. По своему действию в организме крупного рогатого скота ГСЖК разделяется на 2 составляющих: быструю ($t_{1/2}$=40-50 час) и медленную ($t_{1/2}$=118-123 час) (Schams et al., 1978). Методом радиорецепторного анализа установлено, что ЛГ-подобная активность в ГСЖК преобладает над ФСГ-подобной активностью (Schams et al., 1978; Stewart et al., 1976; Papkoff, 1978).

Длительное воздействие высоких уровней ЛГ-активности на фолликулы в ходе их развития вызывает преждевременную активацию ооцитов в фолликулах и дальнейшее нарушение в развитии эмбрионов. Существует предположение, что за счет манипулирования соотношением ФСГ и ЛГ в гонадотропных препаратах можно снизить степень преждевременной активации ооцитов в стимулированных фолликулах (Moor et al., 1984).

Заключение

Проведенные исследования показали, что крупные неовулировавшие фолликулы, обнаруженные в яичниках коров-доноров после вызывания суперовуляции гонадотропинами СЖК,

развиваются из популяции мелких фолликулов под воздействием остаточных количеств ФСГ-активности ГСЖК. Высокое содержание сиаловой кислоты в препаратах ГСЖК значительно удлиняет период полужизни гонадотропной активности в этих препаратах. В период гормональной обработки под влиянием высоких доз ГСЖК мелкие фолликулы увеличиваются в размерах до среднего уровня, но за 4-5 дней не успевают развиться до предовуляторного состояния и овулировать. Однако после овуляции фолликулов первой предовуляторной волны, имевших на момент начала гормональной обработки средний и крупный размеры, на фоне низкого уровня прогестерона и достаточно высоких остаточных количеств ГСЖК эти фолликулы II волны развиваются до крупных размеров и обнаруживаются в яичниках коров-доноров на 7-10-й дни после вызывания суперовуляции.

Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что для вызывания суперовуляции целесообразно использовать гонадотропные препараты, не обладающие *сильным* пролонгированным действием.

Более высокий выход полноценных эмбрионов при вызывании суперовуляции у коров с помощью высокоочищенного препарата ФСГ-супер, по сравнению с коммерческими препаратами ФСГ-п, обусловлен более низким содержанием примеси ЛГ в этом препарате. Повышенное содержание ЛГ в препаратах ФСГ-п вызывает преждевременную инициацию мейоза у определённой части ооцитов в крупных фолликулах, что ведёт к нарушению синхронности созревания ядра и цитоплазмы, которое и приводит в дальнейшем к гибели эмбрионов, развившихся из этих яйцеклеток после их оплодотворения.

Длительное воздействие высоких уровней ЛГ-активности, содержащейся в препаратах ГСЖК, вызывает более жёсткую преждевременную активацию ооцитов в фолликулах и дальнейшее нарушение развития эмбрионов, по сравнению с препаратами ФСГ.

Проведенные исследования показали, что высокоочищенный препарат ФСГ, содержащий минимальное количество примеси ЛГ, более благоприятно влияет на процесс овогенеза и фолликулогенеза в яичниках коров при вызывании суперовуляции и достоверно повышает выход полноценных эмбрионов, по сравнению с препаратами ФСГ, содержащими большее количество примеси ЛГ, и препаратами ГСЖК.

На сегодняшний день пока точно не установлены механизмы, определяющие набор фолликулов в волну и отбор из них доминирующего фолликула. Также все еще неизвестны механизмы атрезии фолликулов. Не выяснены и механизмы доминантности предовуляторного фолликула. Изучение всех этих механизмов требует дальнейших исследований, т.к. они являются основополагающими в разработке эффективных способов вызывания реакции суперовуляции у коров-доноров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Booth W.D., Newcomb R., Rowson I.E.A. et al. Plasma oestrogen end progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Rec., 1975, 97: 366-374.
2. Buccione R., Vanderhyden B. C., Caron P. J. et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulusoophorus in vitro is dependent upon a specific for secreted by the oocyte. Developmental Biology, 1990, 138: 16-25.
3. Donaldson L. E. and Perry B. Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. Theriogenology, 1983, 20: 163-168.
4. Gay V.L., Midgley A.R., Niswender G.D. Patterns of gonadotrophic secretion associated with ovulation. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol., 1970, 29: 1880-1887.
5. Moor R. M., Cahill L. P. and Stewart F. Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer. IXth international congress on animal reproduction and artificial insemination. Madrid, 1982: 43-54.
6. Moor R. M., Kruip T. A. M. and Green D. Intraovarian control of folliculogenesis limits to superovulation[7]. Theriogenology, 1984, 21: 103-116.
7. Newcomb R. Egg recovery and transfer in cattle. In Mammalian Egg Transfer, ed. Adams C.E., 1982: 81-118.
8. Papkoff H. Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. In Control of Reproduction in the cow, ed. Sreenan J.H., 1978: 73-86.
9. Ralph J. H., Wilmut I. and Telfer E. E. In vitro growth of bovine preantral follicles and the influence of FSH on follicular and oocyte diameters. Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series, 1995, 15: 6 (abstr)
10. Schams D., Mencer C., Schallenberger E. et al. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In Control of Reproduction in the cow, ed. Sreenan J.H., 1978: 122-130.
11. Stewart F., Allen W.R., Moor R.M. Pregnant mare serum gonadotrophin: Ratio of follicle stimulating hormone and luteinising hormone activities measured by radioreceptor assay. J.Endocr., 1976, 71: 377-382.
12. Vanderhyden, B. C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 98: 219-227.
13. Vanderhyden B. C., Caron P. J., Buccione R. et al. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion − enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. Developmental Biology, 1990, 140: 307-317.

СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНА αS1-КАЗЕИНА БЫКА И СТРУКТУРНОГО ГЕНА ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

В.А. Езерский, Л.Б. Иванова, В.Г. Шевченко.
Лаборатория молекулярной биологии

Проведено конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащий ген лактоферрина человека под контролем регуляторных областей гена αS1-казеина быка. кДНК лактоферрина была выделена из плазмиды pCMV-LF и клонирована в плазмиду, содержащую промоторную область гена αS1-казеина быка. В дальнейшем, в полученную плазмиду был клонирован 3'- регуляторный район, обуславливающий терминацию транскрипции трансгена. Достоверность клонирования подтверждена рестриктным картированием. Нуклеотидная последовательность регуляторных областей была определена ранее. Созданная плазмида обозначена ***pαs1LF*** *и может быть использована в разработке технологий по получению трансгенных сельскохозяйственных животных, продуцирующих с молоком лактоферрин человека.*

Введение

Молочная железа трансгенных животных является реальным источником производства рекомбинантных белков. Она физиологически обладает огромным потенциалом для синтеза белков. Кроме того, молоко имеет высокий гигиенический стандарт, а рекомбинантные белки могут быть извлечены с помощью имеющихся технологий.

Необходимым условием для направленной экспрессии рекомбинантных белков в молочной железе трансгенных животных является использование в генных конструкциях регуляторных элементов генов белков молока, т.к. именно они обеспечивают тканеспецифичную экспрессию рекомбинантных белков в молочной железе. Одним из белков – кандидатов для экспрессии в молочной железе сельскохозяйственных животных – является лактоферрин человека (hLF). Лактоферрин представляет собой гликопротеид с высоким сродством к железу и состоит из одной полипептидной цепи длиной 703 аминокислотных остатков и имеет массу около 80 кД. Молекула лактоферрина организована в два домена, каждый из которых имеет сайты связывания железа и N-гликозилирования (Metz-Boutiguel et al., 1984; Derisbourg et al.,1990). Более того, в молоке была обнаружена высокая РНК-азная активность (Das et al., 1976).

Кроме молока лактоферрин присутствует в нейтрофильных лейкоцитах крови (Baggliolini et al., 1970). *hLF* обеспечивает транспорт железа и его абсорбцию у новорожденных и поэтому может служить источником железа как для новорожденных, так и взрослых, страдающих анемией. Лактоферрин способен подавлять рост нескольких групп потенциально патогенных бактерий как в молочной железе матери, так и в желудочно-кишечном тракте ребенка.

Доказано, что *hLF* оказывает противовоспалительное действие посредством связывания токсичных оксигенных радикалов, подавляет продукцию цитокинов и ингибирует комплементарную активацию (Lonnerdal et al., 1995). *hLF* индуцирует активность естественных киллерных клеток и усиливает антителозависимую клеточную цитотоксическую активность (Saiki et al., 1988). В молоке человека *hLF* присутствует в концентрации 1,7 г/л, в то время как в молоке КРС его содержание составляет 0,02 г/л. В России он вырабатывался до настоящего времени лишь из природного сырья – женского молока первых дней лактации – источника, объем которого стремительно сокращается.

В последние годы интерес к лактоферрину обусловлен еще его ролью как антиоксиданта, подавляющего свободнорадикальные процессы, которые являются одной из причин онкозаболеваний. Поэтому его можно использовать для профилактики в качестве активной пищевой добавки.

Более того, *hLF* как хорошо всасывающийся естественный метаболит может накапливаться в местах локализации опухолевого образования в период развития и построения локальной автономной опухолевой кровеносной системы. Поэтому при вторичной радиоэмиссии железа в лактоферрине он может быть использован в качестве радиодиагностического препарата для обнаружения образования онкоопухолей на самых ранних стадиях малигнизации онкоклеток. Особенно это важно для диагностики опухолей молочной железы и простаты, которые рентгенотрицательные и не регистрируются при традиционной рентгеновской маммографии. Кроме того, радиоактивное железо, концентрируясь в окружении опухолевых клеток, при соответствующих подобранных дозах может разрушать их, т.е. служить радиотерапевтическим противоопухолевым препаратом.

В мировом биотехнологическом бизнесе конкурируют в основном два направления получения рекомбинантного лактоферрина. Одна группа компаний пытается получить этот белок в процессе ферментации, используя в качестве продуцента микроскопические грибы рода Aspergillus (Ward et al., 1997), другая - добиться его экскреции в молоке трансгенных животных.

Фирма Aggenix Inc. (Houston, USA) , используя Aspergillius ssp., добилась уровня синтеза *hLF* 1 г/л. Но даже и при большем уровне синтеза всегда будет стоять вопрос об аллергенной безопасности пищевого и фармакологического препарата, полученного с использованием микроскопических грибов, и преимущество останется за рекомбинантным лактоферрином из молока как естественного пищевого продукта.

Harvetelt с соавторами (Harvetelt et al., 1997) получили трансгенных мышей с интегрированной кДНК hLF, однако уровень экспрессии в молоке был довольно низкий и составлял 0,1-36 мкг/мл. Лучшие результаты были достигнуты Kim et al. (1999), который сообщил о получении трансгенных мышей, экспрессирующих с молоком лактоферрин человека с уровнем более чем 500мкг/мл.

Последняя работа, проведенная в данном направлении, свидетельствует о получении трансгенного крупного рогатого скота (van Berkel et al., 2002), продуцирующего лактоферрин человека, идентичный по своим свойствам нативному, и достигающем до грамма на литр молока.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось конструирование векторной кассеты, включающей структурный ген лактоферрина человека под контролем регуляторных элементов гена αS1-казеина быка.

Материал и методы

Гидролиз ДНК рестриктазами и лигирование проводили стандартными методами (Бергквист, 1990). Для проведения рестрикции брали 0,2-1 мкг плазмидной ДНК. Добавляли к раствору ДНК соответствующий буфер 10-кратной концентрации. Затем добавляли рестриктазу из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК. Доводили объем раствора до 30 мкл и инкубировали пробы 2 часа при 37°С.

В зависимости от того, какие концы имеют фрагменты ДНК, реакцию лигирования проводили в различных условиях. Молярное отношение вектора и вставки составляло 1:2 при лигировании по "липким" концам, концентрация ДНК составляла 20 мкг/мкл. Лигазу добавляли из расчета 0,5 ед. на 1 мл. Для отбора необходимых рекомбинантных молекул лигазную смесь брали на трансформацию клеток E.co1i. Трансформацию проводили по методу Кушнера (Blin et al., 1976) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия.

Плазмидную ДНК выделяли из клеток E.co1i щелочным методом (Кузнеделов, 1990). Выделенную плазмидную ДНК растворяли в буфере ТЕ и центрифугировали в градиенте хлористого цезия. После центрифугирования отбирали фракцию, содержащую суперскрученную

форму плазмидной ДНК. Освобождались от бромистого этидия, переосаждали ДНК этанолом и растворяли в буфере ТЕ.

Секвенирование плазмидной ДНК проводили в соответствии с рекомендацией к секвенирующему набору фирмы «Promega». Реакционные смеси разделяли в 8%-ом полиакриламидном геле, содержащем 100 мМ трис-боратный буфер, pH 8,3 и 5 М мочевину. Высушенные гели экспонировали при комнатной температуре с пленкой Hyperfilm-βmax (Amersham).

Результаты и обсуждение

Для выполнения поставленной задачи по конструированию рекомбинантной плазмиды, содержащей последовательности гена лактоферрина человека под контролем регуляторных областей гена αs1-казеина быка, была использована плазмида, содержащая ген лактоферрина человека, любезно предоставленная Институтом СХБ (Луниным В.Г.). Данная плазмида pCMV-Lf содержит кДНК лактоферрина под промоторной областью цитомегаловируса.

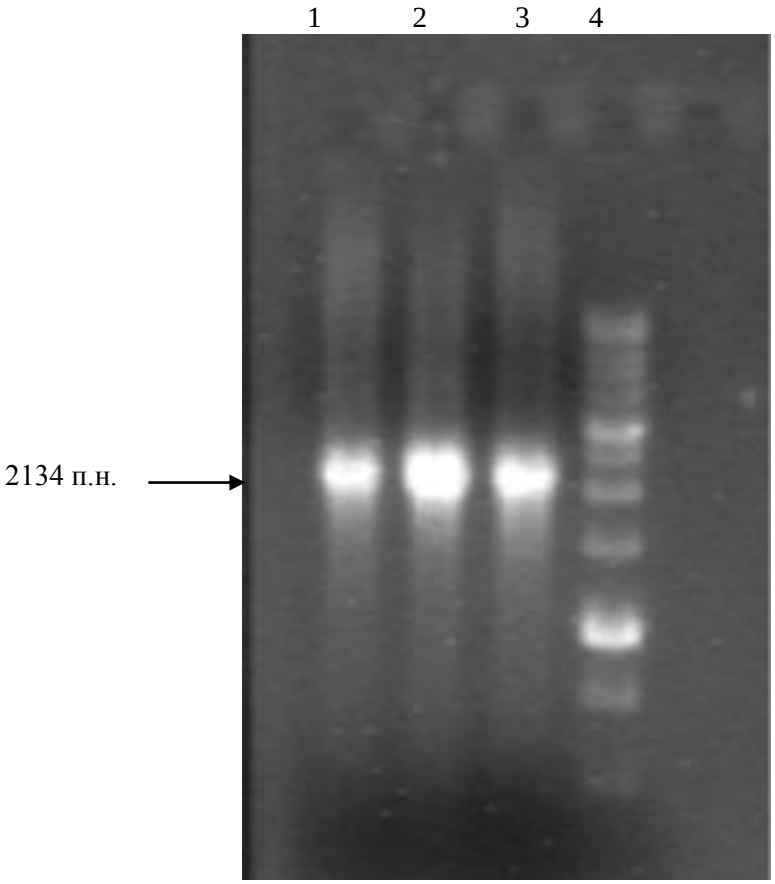


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных в результате проведения полимеразно-цепной реакции с pCMV-Lf. Температура отжига праймеров LF1/LF2: 1 дорожка - 56^{0}C, 2 дорожка - 57^{0}C, 3 дорожка - 58^{0}C, 4 дорожка - маркер длин ДНК (1000 п.н.)

Чтобы выделить последовательность лактоферрина была подобрана пара праймеров. В состав direct - праймера LF1 включали стартовый кодон *hLF* , а также сайт рестрикции для эндонуклеазы SacI. Обратный праймер LF2 (reverse) содержал терминирующий кодон гена лактоферрина и сайт рестрикции для эндонуклеазы HindIII.

Праймеры имеют следующую структуру:

LF1 5`-atg gag ctc atg aaa ctt gtc ttc ctc gtc-3` (30)

LF2 5`-atg aag ctt tta ctt cct gag gaa ttc aca-3` (30)

В процессе предварительных экспериментов были подобраны оптимальные условия проведения PCR, что дало возможность выделить кДНК лактоферрина человека. Установлен следующий температурно-временной режим проведения амплификации:

Денатурация ДНК 94°С - 1 мин.
Отжиг праймеров - 58°С - 45 сек
Синтез 72°С - 2 мин.
Элонгация 72°С - 5 мин.

В результате проведения полимеразно-цепной реакции был синтезирован фрагмент LF1/LF2 (рис. 1). Размер полученного фрагмента ДНК соответствовал предполагаемому около 2100 п.н. (2134 п.н.).

Ниже приведена последовательность кДНК лактоферрина, амплифицированная с предоставленной плазмиды pCMV-Lf:

1 atgaaacttg tcttcctcgt cctgctgttc ctcggggccc tcggactgtg tctggctggc
61 cgtaggagaa ggagtgttca gtggtgcacc gtatcccaac ccgaggccac aaaatgcttc
121 caatggcaaa ggaatatgag aagagtgcgt ggccctcctg tcagctgcat aaagagagac
181 tcccccatcc agtgtatcca ggccattgcg gaaaacaggg ccgatgctgt gacccttgat
241 ggtggtttca tatacgaggc aggcctggcc ccctacaaac tgcgacctgt agcggcggaa
301 gtctacggga ccgaaagaca gccacgaact cactattatg ccgtggctgt ggtgaagaag
361 ggcggcagct ttcagctgaa cgaactgcaa ggtctgaagt cctgccacac aggccttcgc
421 aggaccgctg gatggaatgt gcctataggg acacttcgtc cattcttgaa ttggacgggt
481 ccacctgagc ccattgaggc agctgtggcc aggttcttct cagccagctg tgttcccggt
541 gcagataaag gacagttccc caacctgtgt cgcctgtgtg cggggacagg ggaaaacaaa
601 tgtgccttct cctcccagga accgtacttc agctactctg gtgccttcaa gtgtctgaga
661 gacggggctg gagacgtggc ttttatcaga gagagcacag tgtttgagga cctgtcagac
721 gaggctgaaa gggacgagta tgagttactc tgcccagaca acactcggaa gccagtggac
781 aagttcaaag actgccatct ggcccgggtc ccttctcatg ccgttgtggc acgaagtgtg
841 aatggcaagg aggatgccat ctggaatctt ctccgccagg cacaggaaaa gtttggaaag
901 gacaagtcac cgaaattcca gctctttggc tcccctagtg ggcagaaaga tctgctgttc
961 aaggactctg ccattgggtt ttcgagggtg cccccgagga tagattctgg gctgtacctt
1021 ggctccggct acttcactgc catccagaac ttgaggaaaa gtgaggagga agtggctgcc
1081 cggcgtgcgc gggtcgtgtg gtgtgcggtg ggcgagcagg agctgcgcaa gtgtaaccag
1141 tggagtggct tgagcgaagg cagcgtgacc tgctcctcgg cctccaccac agaggactgc
1201 atcgccctgg tgctgaaagg agaagctgat gccatgagtt tggatggagg atatgtgtac

1261 actgcaggca aatgtggttt ggtgcctgtc ctggcagaga actacaaatc ccaacaaagc
1321 agtgaccctg atcctaactg tgtggataga cctgtggaag gatatcttgc tgtggcggtg
1381 gttaggagat cagacactag ccttacctgg aactctgtga aaggcaagaa gtcctgccac
1441 accgccgtgg acaggactgc aggctggaat atccccatgg gcctgctctt caaccagacg
1501 ggctcctgca aatttgatga atatttcagt caaagctgtg cccctgggtc tgacccgaga
1561 tctaatctct gtgctctgtg tattggcgac gagcagggtg agaataagtg cgtgcccaac
1621 agcaatgaga gatactacgg ctacactggg gctttccggt gcctggctga gaatgctgga
1681 gacgttgcat ttgtgaaaga tgtcactgtc ttgcagaaca ctgatggaaa taacaatgag
1741 gcatgggcta aggatttgaa gctggcagac tttgcgctgc tgtgcctcga tggcaaacgg
1801 aagcctgtga ctgaggctag aagctgccat cttgccatgg ccccgaatca tgccgtggtg
1861 tctcggatgg ataaggtgga acgcctgaaa caggtgctgc tccaccaaca ggctaaattt
1921 gggagaaatg gatctgactg cccggacaag ttttgcttat tccagtctga aaccaaaaac
1981 cttctgttca atgacaacac tgagtgtctg gccagactcc atggcaaaac aacatatgaa
2041 aaatatttgg gaccacagta tgtcgcaggc attactaatc tgaaaaagtg ctcaacctcc
2101 cccctcctgg aagcctgtga attcctcagg aagtaa

Амплификат LF1/LF2 был очищен с использованием MicroSpin Columns фирмы «Promega» (рис. 2).

Затем выделенный фрагмент LF1/LF2 был клонирован в промежуточный вектор pGEM-T «Promega» . Отбор рекомбинатных клонов проводили на селективной среде, содержащей X-gal. Белый клон-трансформант рассевали для препаративного выделения плазмидной ДНК, которую затем обрабатывали эндонуклеазами SacI и HindIII в течение 4 часов при 37^0C (рис. 3).

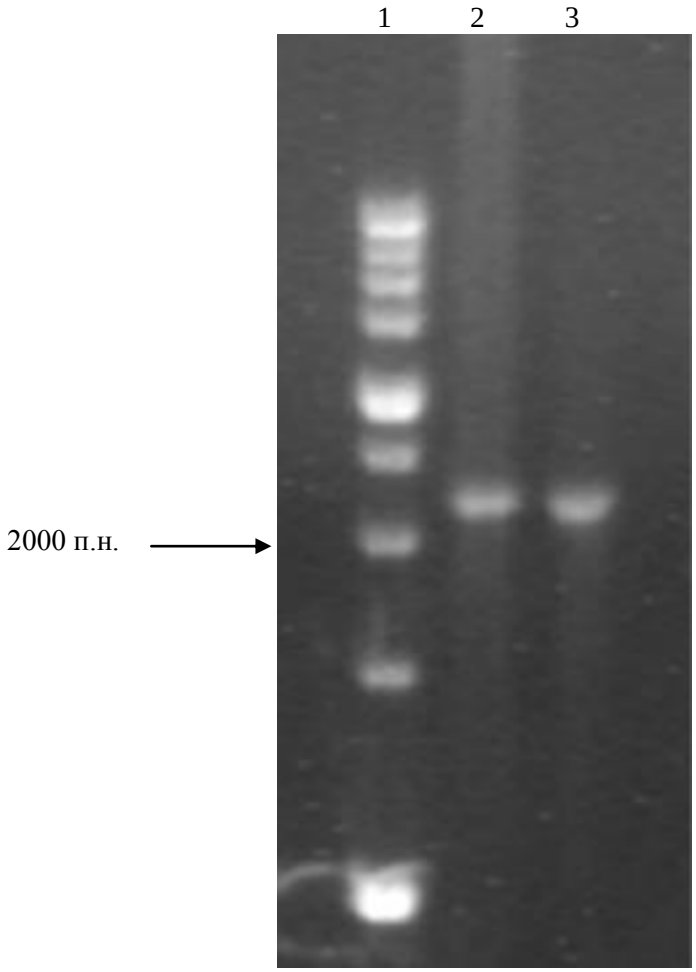


Рис. 2. На 1% агарозном геле представлен амплификат LF1/LF2 до очистки (дорожка 2) и после очистки на миниколонке фирмы "Promega" (дорожка 3).

После разделения рестрикционной смеси в 1% агарозном геле, был элюирован и подготовлен для клонирования фрагмент LF/SacI+HindIII.

В качестве вектора использовали ранее созданную плазмиду *p5'αS1LTau*. Данная плазмида содержит промоторную область гена *αS1*- казеина быка и структурную область гена тауматина. При гидролизе ферментами SacI и HindIII из плазмиды выщепляется фрагмент, содержащий ген тауматин, в то время как векторная часть плазмиды и промоторная область казеина остаются (рис.4). Лигирование проводили, используя набор фирмы «Fermentas».

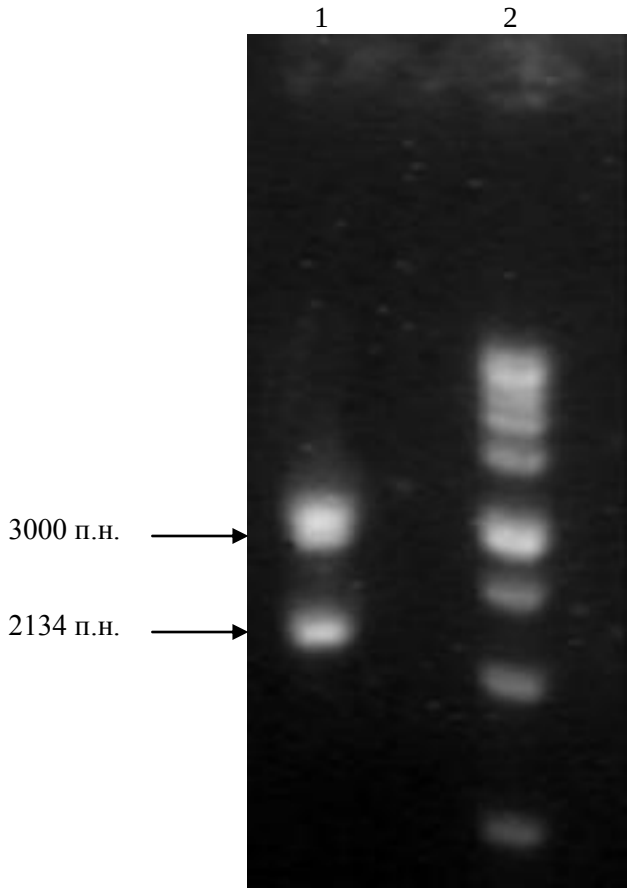


Рис.3. Электрофореграмма фрагментов рестрикции плазмидной ДНК белого клона на наличие LF1/LF2. Дорожка 1 - гидролиз ДНК рестриктазами SacI+HindIII

Лигазную смесь трансформировали в штамм JM 109 E.coli по стандартной методике. Селекцию вели по ампициллину. Выросшие после трансформации клоны рассевались. Затем выделяли и анализировали ДНК каждого клона. Клоны, дающие положительный ответ при проведении ПЦР с праймерами LF1/LF2, подвергались рестриктному анализу (рис. 5).

Таким образом, была получена рекомбинантная плазмида *p5SLF*. Данная плазмида содержит промоторную область гена *αS1*-казеина быка и кДНК лактоферрина человека.

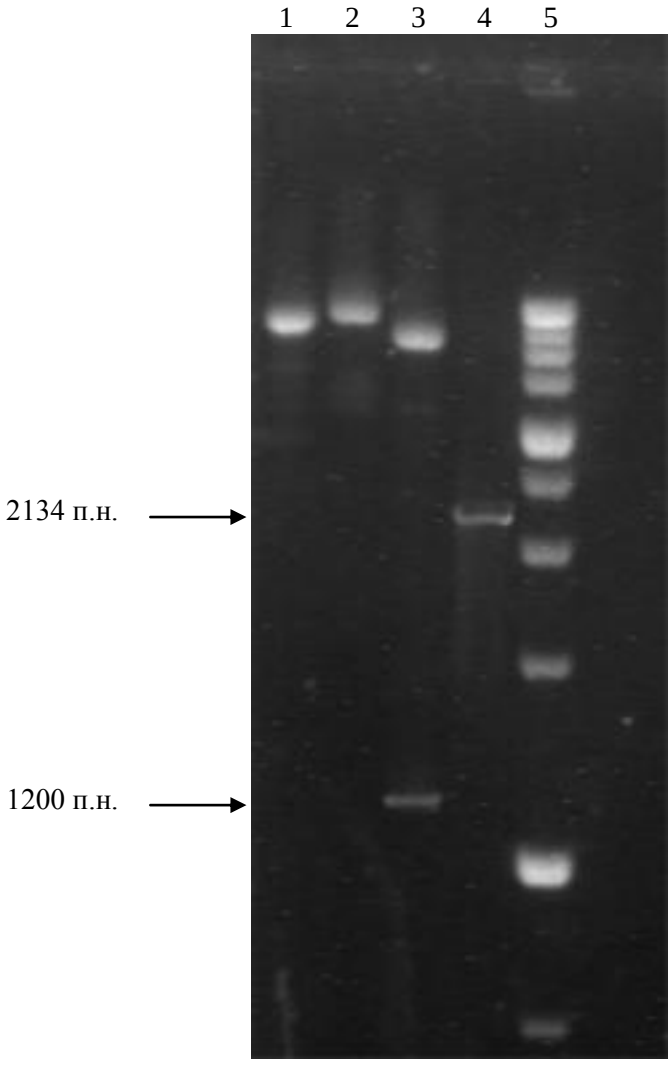


Рис.4. Электрофореграмма продуктов гидролиза плазмиды p5'αS1LTau ферментами: 1 - SacI, 2 - HindIII, 3 - SacI и HindIII, 4 - LF/SacI + HindIII, 5 - маркер длин ДНК (1000 н.п.)

Однако, с целью более полной имитации функционирования чужеродного гена в организме трансгенного животного, в генную конструкцию следовало ввести нуклеотидную последовательность 3'-фланкирующего района гена *αS1*- казеина быка, обеспечивающего возможность процессинга, транспорта и терминации транскрипта, что было и сделано в дальнейшем.

Для этого необходимо выделить последовательность, содержащую сигналы сплайсинга и полиаденилирования гена *αS1*-казеина быка, и клонировать полученный фрагмент ДНК в созданную плазмиду, содержащую лактоферрин человека.

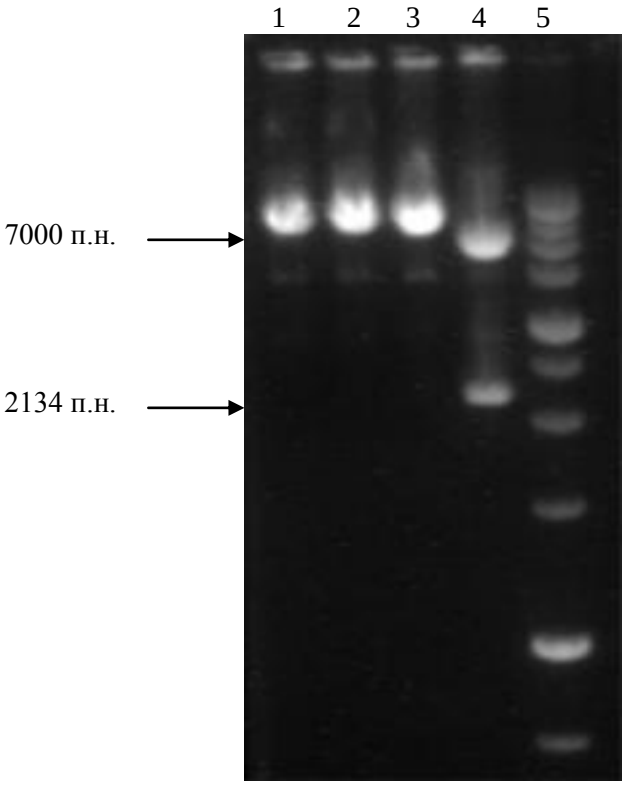


Рис.5. Электрофореграмма продуктов гидролиза рекомбинантной p5SLF следующими ферментами: 1- SacI, 2- HindIII, 3- BamHI, 4- LF/SacI + HindIII, 5- маркер длин ДНК (1000 н.п.)

Указанная последовательность была выделена, клонирована и секвенирована в промежуточном векторе pGEM-T «Promega» нами ранее (Отчет НИР лаборатории молекулярной биологии за 2002 год). Кроме того, сайты рестрикции BamHI и HindIII, введенные на концевых участках фрагмента 1S3/2S3, наиболее предпочтительны для последующего клонирования (рис. 6).

После соответствующей рестрикции был элюирован фрагмент 1S3/2S3 с “липкими” по BamHI и HindIII концами. Лигирование данного фрагмента с вектором *p5SLF*, также имеющего BamHI/HindIII –“липкие” концы, проводили согласно рекомендациям фирмы «Fermentas». Трансформацию E. coli лигазной смесью проводили в

стандартных условиях. Плазмидная ДНК выросших клонов анализировалась на наличие фрагмента. Скрининг трансформантов осуществляли с использованием полимеразно-цепной реакции и рестрикции. После проведенных исследований отобран клон, содержащий рекомбинантную плазмиду, которая была обозначена *pαS1LF* .

-

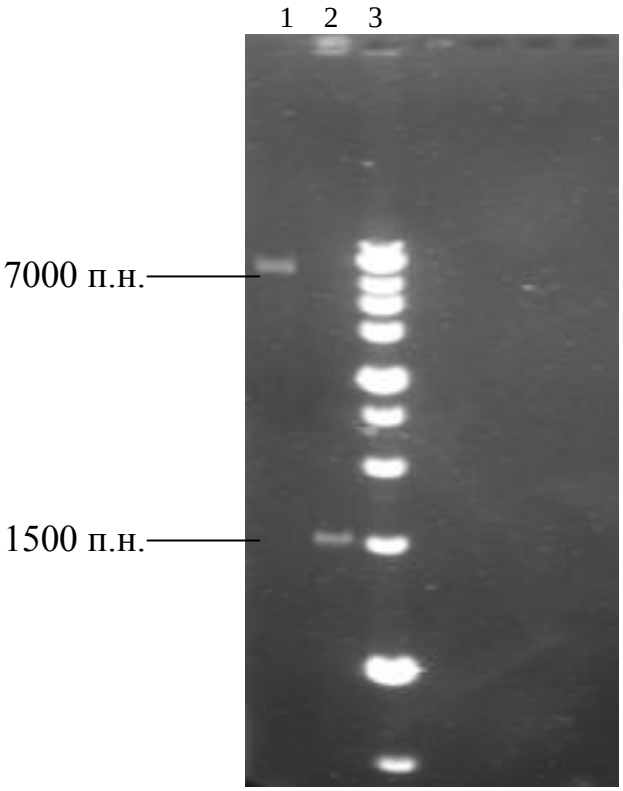


Рис.6. Электрофоретическое разделение вектора и фрагмента для клонирования: 1 - p5SLF/ BamHI+HindIII, 2 - 1S3/2S3 с липкими по BamHI и HindIII концами, 3 - маркер длин ДНК (1000 н.п.)

Достоверность выполненного клонирования контролировали проведением рестрикционного анализа плазмиды *pαS1LF*. Для этого полученную рекомбинантную плазмиду *pαS1LF* подвергали воздействию рестриктаз, сайты рестрикции которых были предположительно известны. При обработке плазмиды рестриктазой EcoRV, имеющей два сайта рестрикции на данной плазмиде, рекомбинантная ДНК расщепляется на два фрагмента длинной приблизительно 6,5 и 2,3 т.п.н. (рис. 7).

Рестриктаза SmaI имеет уникальный сайт рестрикции, поэтому кольцевая плазмидная ДНК при воздействии данной рестриктазой приобретает линейную форму.

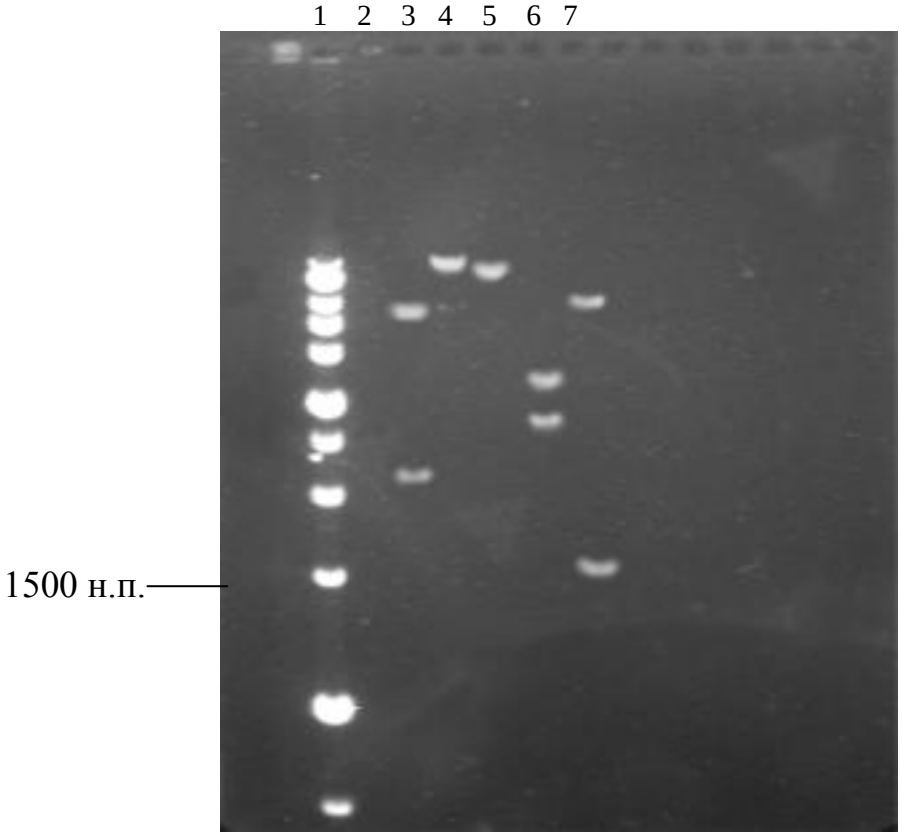


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов рестрикции полученной плазмиды pαS1LF: 1- маркер длин ДНК (1000 н.п.), 3 - pαS1LF/EcoRV, 4 - pαS1LF/SmaI, 5 - pαS1LF/ NdeI, 6- pαS1LF/EcoRI, 7 - pαS1LF/BamHI+HindIII

Наличие двух сайтов NdeI, расположенных на расстоянии около 200 н.п., позволяют расщепить полученную ДНК данной рестриктазой на два фрагмента - около 8,8. и 0,2 т.п.н, причем последний из них не детектируется в 1% агарозном геле.

При обработке плазмидной ДНК рестриктазой EcoRI, выщепляются два фрагмента размерами - 4,5 и 3,6 т.п.н., а также два фрагмента по 300 н.п.

При двойном гидролизе плазмиды рестриктазами BamHI и HindIII выщепляется фрагмент около 1,5 т.п.н., содержащий 3'-область гена *αs1*-казеина быка.

На основании экспериментальных данных была построена рестриктная карта плазмиды *pαS1LF* (рис. 8).

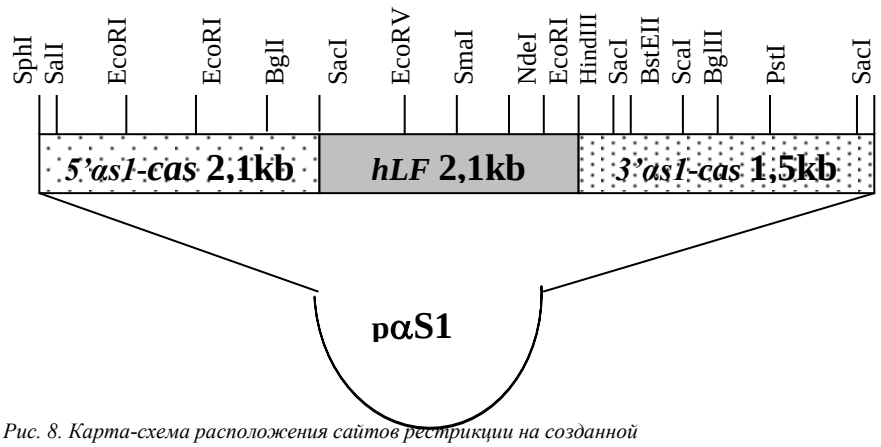


Рис. 8. Карта-схема расположения сайтов рестрикции на созданной плазмиде ***pαs1LF*** *(указаны величины клонированных фрагментов).*

- промоторная область гена *αS1*-казеина Bos taurus

- нуклеотидная последовательность гена лактоферрина человека

- 3' область гена *αS1*-казеина Bos taurus

Таким образом, согласно проведенным исследованиям, показано, что нами сконструирована плазмида ***pαs1LF*** (рис.9), которая содержит в своем составе кДНК структурного гена *hLF* (протяженностью 2100 н.п.), кодирующий белок лактоферрин человека. Ассоциированные с геном *hLF* функциональные участки гена *αs1*-казеина быка (промоторная область протяженностью 2100 н.п. и 3'-фланкирующая область протяженностью 1500 н.п.) позволяют обеспечивать тканеспецифическую экспрессию этого гена в тканях молочной железы трансформированных животных.

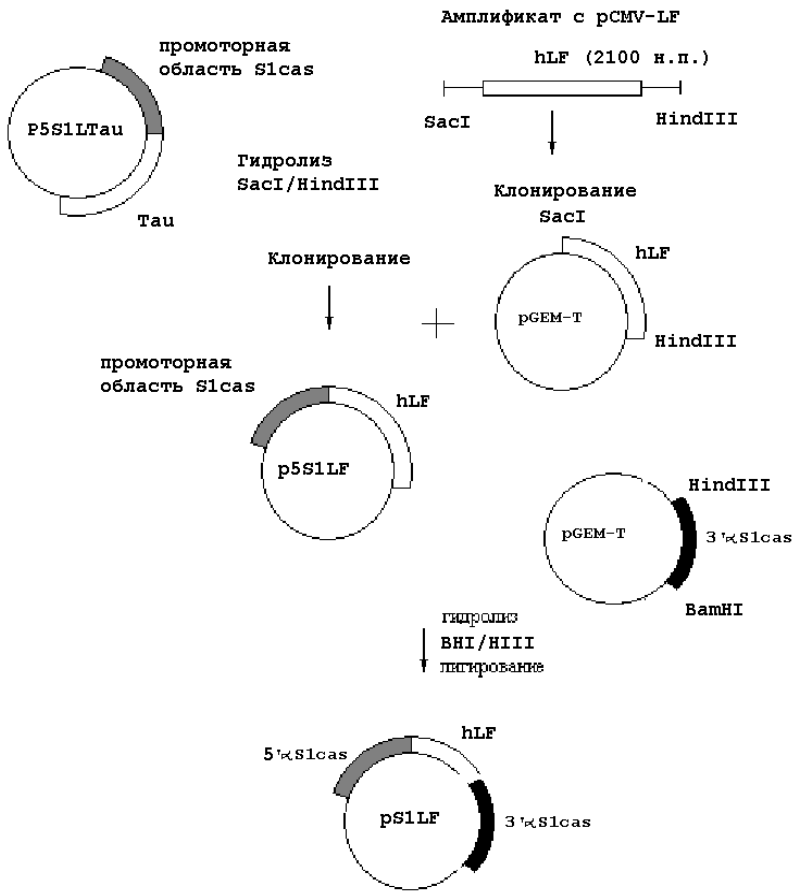


Рис.9. Основные этапы получения рекомбинантной плазмиды pαs1LF, содержащей ген лактоферрина человека и регуляторные области гена αs1-казеина быка

Заключение

Проведено конструирование рекомбинантной плазмиды ***pαs1LF***, содержащей нуклеотидную последовательность гена лактоферрина под контролем регуляторных элементов гена *αs1*-казеина быка. Полученная рекомбинантная ДНК включает необходимые регуляторные последовательности для тканеспецифичной экспрессии трансгена в клетках молочной железы животных.

Сконструированная плазмида может найти применение не только при проведении исследований в области трансгеноза, но и в

дальнейших молекулярно-генетических работах по молекулярному клонированию с целью создания новых векторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Metz-Boutigue M.-H., Jolles J., Mazurier J., Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P.Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur. J. Biochem., 1984, v.145, p. 659-663
2. Derisbourg P., Wieruszesky J.M., Montreuil J., Spik G., Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideraemia. Biochem.J., 1990, v. 269, p. 821-825
3. Das M.R., Padhy L.S., Koshy R., Sirsat SM, Rich MA. Human milk samples from different ethnic groups contain RNase that inhibits, and plasma membrane that stimulates, reverse transcription**.**Nature, 1976, v. 262, p. 802
4. Baggliolini M., DeDuve C., Masson P. L., Heremans F., Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. J Exp. Med., 1970, v. 131, p. 559
5. Lonnerdal B., Iyer S., Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annu. Rev. Nutr., 1995, v. 15, p. 93-110
6. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, v.239, p. 487-491
7. Ward P.P., Cunningham G.A., Conneely O.M. Biotechnol. Genet. Engl. Res., 1997, v. 14, p. 303-319
8. Hartevelt PP, de Boer HA, van Veen HA, Pieper FR. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. J Biol Chem 1997 Mar 28;272(13):8802-7
9. Kim SJ, Sohn BH, Jeong S, Pak KW, Park JS, Park IY, Lee TH, Choi YH, Lee CS, Han YM, Yu DY, Lee KK. High-level expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using genomic lactoferrin sequence. J Biochem (Tokyo) 1999 Aug;126(2):320-5
10. van Berkel H.P., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat. Biotechnol., 2002, 20(5), 484-487
11. Бергквист П.А. Плазмиды. Методы. М.: Мир, 1990,С.84-85
12. Blin N., Stafford D.V. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, p 2303-2308.
13. Кузнеделов К.Д. Методы молекулярной генетики и генной инженерии, М.: Наука, 1990, С.61-65.
14. Wilcox G., Studnicka G.M., Expression of foreign proteins in microorganisms, Biotechnol. Appl. Biochem, 1988, 10(6). 500-509.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ 6-й ХРОМОСОМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В.А. Езерский, Т.Ю. Шмидт, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии

Проведено генотипирование коров черно-пестрой породы отечественной селекции с использованием микросателлитных маркеров BMS360, BM415, AFR227, CSN3, BMS4203 шестой хромосомы. Изучено распространение и частота встречаемости различных аллельных вариантов исследованных микросателлитных локусов у потомства двух быков стада ГУП ПНО «Пойма». Оценен уровень полиморфизма и степень гетерозиготности тестированных маркеров, и дана оценка возможности их использования в дальнейших анализах сцепления с локусами хозяйственно-полезных признаков. Установлено, что исследованные микросателлиты могут быть использованы в селекционной практике в качестве маркеров для работы с линиями, популяциями, породами.

Введение

На данном этапе развития агропромышленного комплекса перед зоотехнической наукой стоит задача совершенствования существующих и разработка новых методов селекции и разведения сельскохозяйственных животных. Одно из направлений повышения эффективности селекционного процесса заключается в установлении ассоциативных связей локусов генома с хозяйственно-полезными признаками. Благодаря наличию насыщенных маркерами генетических карт и разработке новых методов определения полиморфизма на уровне ДНК, появилась возможность поиска сцепления между ДНК-маркерами и локусами количественных признаков (QTL). В настоящее время среди ДНК-маркеров наибольшее распространение получили микросателлитные последовательности.

Микросателлиты относятся к классу тандемных повторов и составляют 23% генома крупного рогатого скота (Perret et al., 1990). Микросателлитные блоки достаточно равномерно распределены по всему эухроматину и присутствуют в составе как транскрибируемых, так и нетранскрибируемых областей хроматина (Soller, 1990). Микросателлитам свойственно менделевское наследование, множественность аллелей и высокая гетерозиготность. Такие свойства как кодоминантное выражение и стабильность наследования, селективная нейтральность, отсутствие плейотропного эффекта в отношении хозяйственно-важных признаков, простота и надежность

тестирования делают эти полиморфные последовательности инструментом для картирования и анализа генома. Основная единица повторов обычно образована 1-6 нуклеотидами, в большинстве случаев они представлены в виде моно- (поли (G), поли (A)), ди- (поли (TG), поли (TC)), три- (поли (CAC), поли (GAC)) или тетрануклеотидных мотивов (поли (GATC)) (Soller, 1990). Повторение этих мотивов (от 2 до 200 раз) и лежит в основе их высокого полиморфизма, со средним значением PIC - 0,6 (Vainman et al., 1994). Находясь внутри уникальных последовательностей, микросателлиты могут быть легко амплифицированы с помощью пар фланкирующих уникальных олигонуклеотидов (Weber et al., 1989).

Микросателлитные маркеры могут быть использованы для выявления внутри- и межродного полиморфизма, определения характера генетических различий, связанных с породообразованием и племенными качествами. Особенно важным является тот факт, что за последнее время с помощью микросателлитов удалось осуществить маркировку некоторых генетических локусов, связанных с продуктивностью (Georges et al., 1995).

Исследования, проведенные M.Georges с соавторами в 1995 году легли в основу работ по генетическому картированию локусов, влияющих на молочную продуктивность крупного рогатого скота. В результате генотипирования быков голштинской породы было показано наличие на пяти хромосомах - 1, 6, 9, 10 и 20 микросателлитных маркеров, ассоциированных с молочной продуктивностью (Georges et al., 1995). На 12 полусибсовых семьях айширской породы Velmera R.J. с соавторами в 1999 году было проведено сканирование 6-й хромосомы. Для идентификации QTL, влияющих на молочную продуктивность, использовалось 11 микросателлитных маркеров и казеиновых гаплотипов. Результаты подтвердили наличие двух QTL, ассоциированных с молочной продуктивностью, расположенных на 6 хромосоме, причем один из них локализован рядом с казеиновым кластером. В пользу наличия QTL, ответственных за молочную продуктивность, на 6, 14 и 20 хромосомах свидетельствует работа, выполненная Grisart B. с коллегами (1998) на 23 полусибсовых линиях бельгийского красного и белого скота. В этой работе QTL белковомолочности наблюдался в казеиновом регионе 6 хромосомы. У норвежского скота локусы, отвечающие за величину удоя, были картированы на 6 и 18 хромосомах (Vage et al., 1998).

Как следует из изложенного в случае генетики количественных признаков, полученные результаты правомочны только для конкретно изученных пород и не допускают однозначного переноса на другие породы. Поэтому прежде чем приступить к поиску локусов, отвечающих за формирование хозяйственно-полезных признаков, необходимо изучить полиморфизм маркеров непосредственно в той

популяции животных, в которой будут проводиться последующие исследования связи ДНК-маркеров с локусами, ассоциированными с хозяйственными признаками. Последнее указывает на необходимость проведения работ по отбору микросателлитных маркеров 6 хромосомы и изучению их полиморфизма у отечественных пород крупного рогатого скота, в частности, у черно-пестрой породы. При отборе из ранее созданной базы данных маркеров для последующего анализа сцепления с локусами хозяйственно-полезных признаков учитывались следующие показатели: степень полиморфизма, уровень гетерозиготности не менее 60% и предельная генетическая дистанция между маркерами, на которой достоверно определяется сцепление (около 10 сМ).

В результате анализа базы данных для исследований были выбраны 5 микросателлитных маркеров, расположенных в районе казеинового кластера 6 хромосомы и имеющих следующую маркировку и хромосомную локализацию: BMS360 - 66,5cM.; BM415 - 76,3cM; AFR227 - 90,4cM; CSN3 - 82,6cM; BMC4203 -112,9cM.

Исходя из вышеизложенного, целью исследований явилось изучение пяти указанных маркеров шестой хромосомы по уровню полиморфизма, степени гетерозиготности, частоте встречаемости аллельных полиморфов в популяции коров черно-пестрой породы отечественной селекции.

Материал и методы

Для исследования полиморфизма микросателлитных локусов было проведено генотипирование 215 и 71 коров черно-пестрой породы - дочерей быков Погожего 4131 и Иона 103, принадлежащих ПНО ”Пойма” Луховицкого района Московской области.

Подбор животных в группы проводили с учетом продолжительности лактации, возраста, условий лактирования. Для выполнения работ по генотипированию из образцов крови животных фенольно-детергентным методом была выделена ДНК (Маниатис и др., 1984; Williams et al., 1997). Полученные образцы использовались для ПЦР-амплификации, продукты которой были проанализированы в 5% денатурирующем полиакриламидном геле на аппарате “Poker Fase”(Hoefer Scientific Instruments, USA), в соответствии с рекомендациями фирмы производителя, с последующей авторадиографией. Фрагмент электрофореграммы представлен на рисунке 1.

Основные характеристики популяции, такие как частоты генотипов, частоты аллелей, их отклонения рассчитывали по стандартным методикам (Животовский, 1991; 1998). Уровень гетерозиготности и расчет PIC изучаемых маркеров проводили по

методикам, предложенным J.L.Weber, исходя из частот аллелей в популяции (1990). Для оценки разности средних использовали критерий Стьюдента-Фишера (Лакин, 1990).

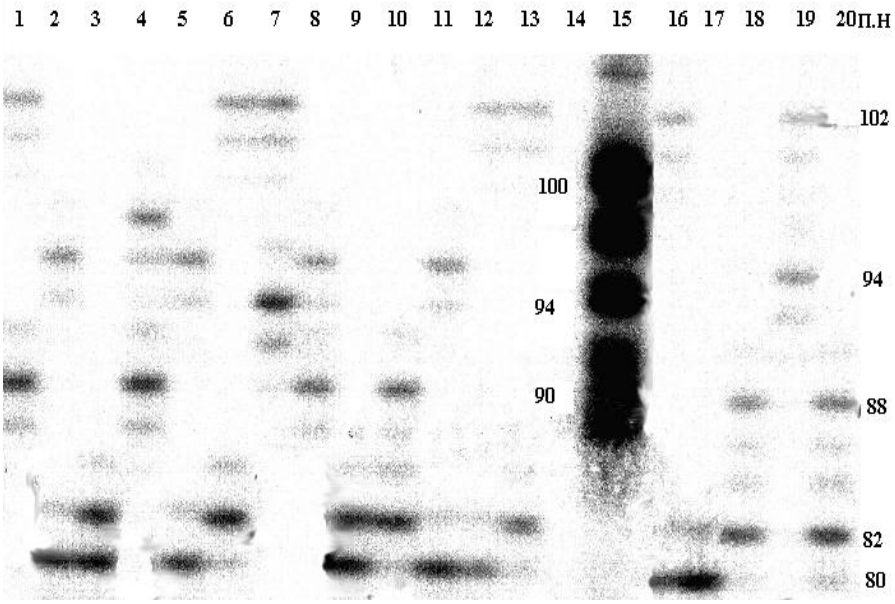


Рис. 1. Анализ продуктов амплификации с использованием праймеров к локусу BMS360 в 5% денатурирующем ПААГе: (1-13 и 16-20)-ДНК коров черно-пестрой породы, дочерей быков Иона103 и Погожего4131, (14)-отрицательный контроль, (15)-маркер длины (п.н.).

Результаты и обсуждение

Полиморфизм микросателлитных локусов заключается в количестве повторенных единиц и напрямую связан с длиной повтора (Soler, 1990; Weber, 1990). В литературе количество повторов зачастую используется для обозначения аллельных вариантов микросателлитных локусов. В представленной работе для обозначения аллельных вариантов микросателлитных локусов были использованы данные о размере в нуклеотидах, полученные в результате секвенирования, и в соответствии с номенклатурой, принятой в международных базах данных EMBL и GeneBank.

1. *Полиморфизм локуса BMS 360*

Для локуса BMS360 известно 11 аллелей с минимальным и максимальным размерами 74 и 102 п.н. (Stone et al., 1995). Нами было обнаружено 8 аллельных вариантов этого локуса с размерами 80-84, 88, 92-96 и 102 у дочерей быка Погожего4131 и 12 у коров линии Иона 103. Наименьший и наибольший размер аллелей этого локуса у дочерей быка Погожего4131 составил – 80 и 102 п. н., а у потомков Иона103 – 80 и 108 п.н. (табл.1).

Наиболее распространенными аллелями в группе дочерей Погожего4131 были: 80 п. н.(0,37); 102 – (0,249) и в группе дочерей Иона103: 80 - (0,352); 88 -(0,338).

Таблица 1. **Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BMS 360**

У коров принадлежащих линии Погжего4131					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
80	0,370±0,023	159	92	0,019±0,007	8
82	0,147±0,017	63	94	0,116±0,016	50
84	0,0023±0,0023	1	96	0,0023±0,0023	1
88	0,095±0,014	41	102	0,249±0,021	107
У коров принадлежащих линии Иона103					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
80	0,352±0,04	50	94	0,099±0,025	14
82	0,127±0,028	18	96	0,021±0,021	3
84	0,007±0,007	1	98	0,007±0,007	1
86	0,007±0,007	1	100	0,007±0,007	1
88	0,338±0,0039	48	102	0,021±0,021	3
90	0,007±0,007	1	108	0,007±0,007	1

Распределение генотипов животных по этому локусу представлено в таблице (табл.2).

Среди исследованных животных линии Иона103 наиболее часто встречались носители генотипов: 82\80 (0,127), 88\80 (0,169), 88\82 (0,127), 94\80 (0,141). А у коров линии Погожего4131 наиболее распространенными были следующие генотипы: 82\80 (0,214), 94\80 (0,116), 102\88 (0,116), 102\94 (0,112).

Гетерозиготности этого маркера в группе коров, принадлежащих линии Иона103 составили 78,9%, а у дочерей Погожего4131 87,4%, что значительно превышает величину, приведенную в базе данных – 59%.

Таблица 2. ***Распределение генотипов по локусу BMS 360 среди исследованных животных***

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего4131	N
1	80\80	0,113	8	0,102	22
2	82\80	0,127	9	0,214	46
3	84\80	-	-	0,005	1
4	88\80	0,169	12	0,74	16
5	88\82	0,127	9	-	-
6	88\84	0,014	1	-	-
7	88\86	0,014	1	-	-
8	88\88	0,099	7	-	-
9	90\88	0,014	1	-	-
10	92\80	-	-	0,014	3
11	94\80	0,141	10	0,116	25
12	94\80	0,056	4	-	-
13	96\80	0,014	1	-	-
14	96\88	0,028	2	-	-
15	98\80	0,014	1	-	-
16	100\88	0,014	1	-	-
17	102\80	0,014	1	0,112	24
18	102\82	-	-	0,079	17
19	102\88	0,028	2	0,116	25
20	102\91	-	-	0,005	1
21	102\92	-	-	0,023	5
22	102\94	-	-	0,112	24
23	102\96	-	-	0,005	1
24	102\102	-	-	0,023	5
25	108\88	0,014	1	-	-

2. Полиморфизм локуса BM 415

В результате анализа ДНК было выявлено 8 аллельных вариантов локуса у коров линии Погожего4131 (153-167) и 7 у дочерей Иона103. У коров этой группы отсутствовал аллель 157 п.н. Распределение аллелей локуса BM415 по частотам встречаемости в исследуемой популяции представлено в таблице 3.

Наиболее распространенными аллелями в обеих группах оказались 161 и 163, с частотами: 0,034, 0,43 у дочерей быка Погожего4131 и 0,401, 0,451 у коров линии Иона103 (табл.3). В базе данных зарегистрировано 13 аллелей этого локуса с наибольшим и наименьшим размерами 141 и 171п.н. (Bishop et al., 1994).

Таблица 3. **Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BM415**

У коров принадлежащих линии Погжего4131					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
153	0,012±0,005	5	161	0,0344±0,023	148
155	0,021±0,007	9	163	0,426±0,024	183
157	0,0023±0,0023	1	165	0,077±0,013	33
159	0,044±0,001	19	167	0,074±0,013	32
У коров принадлежащих линии Иона103					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
153	0,007±0,007	1	163	0,451±0,042	64
155	0,021±0,012	3	165	0,07±0,021	10
159	0,028±0,014	4	167	0,021±0,012	3
161	0,401±0,041	57			

Наиболее распространенным сочетанием аллелей в генотипах у коров, принадлежащих линии Погожего4131было следующее: 163\162 – 0,290; 1603\163 – 0,153; 165\161 – 0,107 и 167\163 – 0,116. В группе дочерей Иона103 чаще всего встречались животные с генотипами: 163\161 – 0,381; 163\163 – 0,211; 165\161 – 0,126; 161\161 – 0,113 (табл. 4).

Таблица 4. ***Распределение генотипов по локусу BM 415 среди исследованных животных***

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего4131	N
1	161\153	-	-	0,005	1
2	161\155	0,028	2	0,028	6
3	161\157	-	-	0,005	1
4	161\159	0,014	1	0,033	7
5	161\161	0,113	8	0,093	20
6	163\153	0,014	1	0,019	4
7	163\155	0,014	1	0,014	3
8	163\159	0,042	3	0,056	12
9	163\161	0,380	27	0,290	63
10	163\163	0,211	15	0,153	33
11	165\161	0,126	9	0,107	23
12	165\163	0,014	1	0,047	10
13	167\161	0,028	2	0,033	7
14	167\163	0,014	1	0,116	25

Гетерозиготность этого локуса по данным генотипирования коров линии Погожего4131 составила – 75,4%, а у дочерей Иона103 – 74,5%, что превышает значение, приведенное в базе данных (72%).

3. Полиморфизм локуса AFR 227

Также у исследованных животных линии Погожего4131 было определено 10 аллей локуса AFR227, отличающихся друг от друга на 2 нуклеотида: 96-100; 108-122 с частотами встречаемости: 96 п.н. – 0,01; 98– 0,06; 100 – 0,07; 108 – 0,01; 110 – 0,43; 112 – 0,32; 114 – 0,1; 116 – 0,08; 120 – 0,01; 122 – 0,02 (табл.5).

Таблица 5. **Частота встречаемости аллельных вариантов локуса AFR 227**

У коров принадлежащих линии Погжего4131					
.Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
96	0,023±0,023	1	112	0,321±0,023	138
98	0,063±0,012	27	114	0,005±0,003	2
100	0,07±0,012	30	116	0,079±0,013	34
108	0,023±0,002	1	120	0,009±0,005	4
110	0,426±0,024	183	122	0,023±0,007	10
У коров принадлежащих линии Иона103					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
96	0,014±0,001	2	114	0,007±0,007	1
98	0,014±0,001	2	116	0,049±0,018	7
100	0,049±0,182	7	120	0,07±0,021	10
110	0,317±0,039	45	122	0,092±0,024	13
112	0,387±0,041	55			

У коров, принадлежащих линии Иона103 было установлено 9 аллелей этого локуса таких же размеров, что и у дочерей Погожего4131, за исключением аллеля-108 п.н. (табл. 5)

В группе дочерей Иона103, как и в группе дочерей Погожего4131, самыми распространенными были аллельные варианты 110 и 112. Частоты встречаемости этих аллелей составили: 0,317 и 0,387 у дочерей Иона103 и 0,426; 0,321 у дочерей Погожего4131, соответственно (табл. 5).

В базе данных для этого микросателлитного маркера приведено 11 аллелей с наименьшим и наибольшим размерами 96 и 120 п.н. (Jorgensen et al., 1995).

Наибольшее распространение среди животных обеих групп получили генотипы: 110\110, 112\110 и 112\112 с частотами встречаемости 0,205; 0,181; 0,102 у дочерей Погожего4131 и 0,113;

0,197; 0,127 у коров линии Иона103, соответственно. Распределение животных обеих групп по генотипам локуса AFR 227 представлено в таблице 6.

Таблица 6. ***Распределение генотипов по локусу AFR 227 среди исследованных животных***

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встреча-емости у дочерей Погожего4131	N
1	110\96	0,014	1	0,005	1
2	110\98	-	-	0,042	9
3	110\100	-	-	0,088	19
4	110\110	0,113	8	0,205	44
5	110\112	-	-	0,005	1
6	112\96	0,014	1	-	-
7	112\98	0,028	2	0,084	18
8	112\100	0,099	7	0,051	11
9	112\108	-	-	0,005	1
10	112\110	0,197	14	0,181	39
11	112\112	0,127	9	0,102	22
12	114\110	0,014	1	-	-
13	114\112	-	-	0,009	2
14	116\110	0,014	1	0,093	20
15	116\112	0,04	3	0,065	14
16	116\116	0,014	1	-	-
17	120\110	0,099	7	0,005	1
18	120\112	0,042	3	0,014	3
19	122\110	0,070	5	0,023	5
20	122\112	0,099	7	0,023	5
21	122\116	0,014	1	-	-

Уровень гетерозиготности данного микросателлитного маркера в обеих группах был ниже приведенного в базе данных (79%) и составил 69,3% у коров, принадлежащих линии Погожего4131 и 47,9% у дочерей быка Иона103.

4. Полиморфизм локуса CSN3

Таблица 7. ***Частота встречаемости аллельных вариантов локуса CSN3***

У коров принадлежащих линии Погжего4131		
Аллели	Частота	N
216	0,279±0,008	12
218	0,470±0,241	202
220	0,502±0,024	216
У коров принадлежащих линии Иона103		
Аллели	Частота	N
216	0,035±0,015	5

218	0,50±0,04	71
220	0,465±0,046	66

Нами было установлено только три аллельных варианта этого локуса: 220 п.н. – 0,50; 218 – 0,47 и 216 – 0,03 у дочерей быка Погожего4131 и столько же у коров линии Иона103 с частотами: 0,47; 0,50 и 0,035, соответственно (табл.7). В базе данных представлено 5 аллелей локуса CSN3 с наименьшим и наибольшим размерами 216 и 226 п.н..

Наиболее распространенными комбинациями аллелей в генотипы у животных обеих линий были 218\218, 220\218 и 220\220 с частотами встречаемости 0,220, 0,460 и 0,256 у дочерей Погожего4131 и 0,268, 0,408, 0,254 у коров линии Иона103, соответственно (табл. 8).

Таблица 8. *Распределение генотипов по локусу CSN 3 среди исследованных животных*

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего4131	N
1	218\216	0,056	4	0,028	6
2	218\218	0,268	19	0,220	48
3	218\220	-	-	0,005	1
4	220\216	0,014	1	0,028	6
5	220\218	0,408	29	0,460	99
6	220\220	0,254	18	0,256	55

Величина индекса гетерозиготности локуса CSN 3 у исследованных животных была ниже приведенной в базе данных (69%) и составляла 52,1% у коров линии Погожего4131 и 59,2% у дочерей Иона103.

5. Полиморфизм локуса BMC 4203

Полиморфизм локуса BMC 4203 у коров, принадлежащих линии Погожего4131 был представлен семью аллелями: 156 п.н. –0,002; 158 – 0,019; 160 – 0,32; 162 – 0,54; 164 – 0,06; 166 – 0,06; 168 – 0,01 (табл. 9), тогда как у дочерей быка Иона103 было обнаружено только 5 аллельных вариантов этого локуса с размерами 158-166 п.н., отличающихся на два нуклеотида. Наиболее широко представленными в локусе BMC4203 у дочерей Иона103 оказались аллели 162 (0,704) и 160 (0,176) (табл. 9). В базе данных зарегистрировано 8 аллелей этого локуса с минимальным и максимальным размерами 146 – 170 п.н. (Snone).

Таблица 9. ***Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BMC 4203***

У коров принадлежащих линии Погжего4131					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
156	0,002±0,002	1	164	0,058±0,011	25
158	0,009±0,005	4	166	0,063±0,012	27
160	0,323±0,023	139	168	0,009±0,005	4
162	0,535±0,024	230			
У коров принадлежащих линии Иона103					
Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
158	0,021±0,012	3	164	0,063±0,02	9
160	0,176±0,032	25	166	0,035±0,015	5
162	0,704±0,038	100			

Среди наблюдаемых вариантов генотипов наибольшее распространение в группе дочерей Погожего4131 имели следующие комбинации аллелей: 162\160 – 0,298 и 162\162 – 0,316. У коров линии Иона103 чаще всего встречались генотипы: 162\160 – 0,352, 162\162 – 0,408 и 164\162 – 0,127 (табл. 10).

Уровень гетерозиготности этого маркера в группе дочерей Погожего4131 и группе дочерей Иона103 составил 60,9% и 67,6%, соответственно. Это несколько ниже индекса гетерозиготности локуса BMC 4203, приведенного в базе данных (69%).

5. Уровень гетерозиготности изученных маркеров

В вопросах динамики генетического состава популяций важным параметром является гетерозиготность. Мутационный процесс, различные типы отбора, дрейф генов, неслучайное скрещивание и другие факторы популяционной динамики нередко влияют на гетерозиготность популяций (Левонтин,1978; Ли, 1978). Поэтому ее оценка в настоящее время необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях.

На первой конференции, посвященной статистическим методам в генетическом картировании, наибольшие дебаты вызвал вопрос: на что делать первоочередной упор молекулярным биологам ─ на заполнение карты и сокращение промежутков между маркерами или обратить внимание на качество маркеров (т.е. гетерозиготность H-70%) (Ott et al., 1994). В результате обсуждения было определено, что

первоначальный скрининг генома для определения сцепления и высокая гете-

Таблица 10. ***Распределение генотипов по локусу BMC 4203 среди исследованных животных***

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего4131	N
1	160\156	-	-	0,005	1
2	160\158	-	-	0,014	3
3	160\160	-	-	0,093	20
4	160\162	-	-	0,009	2
5	162\158	0,042	3	0,005	1
6	162\160	0,352	25	0,298	64
7	162\162	0,408	29	0,316	68
8	164\160	-	-	0,083	18
9	164\162	0,127	9	0,033	7
10	166\160	-	-	0,037	8
11	166\162	0,070	5	0,088	19
12	168\160	-	-	0,014	3
13	168\162	-	-	0,005	1

розиготность маркеров являются задачей первостепенной важности, так как высокая гетерозиготность обеспечивает большое количество информативных мейозов (случаев рекомбинации), что повышает эффективность тестов сцепления.

Таблица 11. ***Уровень полиморфизма изучаемых локусов***

Локусы	Значение базы данных	Дочери Иона		PIC	Дочери Погожего		PIC
		гетерозиготность			гетерозиготность		
		фактическая	ожидаемая		фактическая	ожидаемая	
BMS360	59	78,9	76,2	0,72	87,4	80,1	0,77
BM415	72	67,6	63,6	0,57	75,4	70,0	0,65
AFR227	79	74,6	74,7	0,71	69,3	71,6	0,67
CSN3	69	47,9	53,4	0,43	52,1	52,7	0,42
BMC 4203	69	59,2	50,4	0,47	59,1	60,9	0,54

Как следует из анализа результатов данных, представленных в таблице 11, уровень гетерозиготности всех изучаемых микросателлитных последовательностей, за исключением CSN3 у коров, принадлежащих линии Иона103, превысил 50%. Это дает возможность использовать протестированные микросателлитные маркеры 6 хромосомы в дальнейших исследованиях сцепления с локусами хозяйственно-полезных признаков, а именно, молочной продуктивностью.

Средняя гетерозиготность по пяти изученным микросателлитным маркерам у коров, принадлежащих линии Иона103, составила – 65,6%, а у дочерей быка Погожего4131 – 68,7%. Гетерозиготность всей изучаемой популяции по пяти маркерам шестой хромосомы равнялась 67,15%. Такая высокая гетерозиготность популяции подтверждает высокий полиморфизм изучаемых микросателлитных маркеров. А также может объясняться тем, что предыдущий план племенной работы закреплял для племобъединения стадо ГУП ПНО «Пойма» в качестве полигона по испытанию молодых быков-производителей. Вместе с этим одновременно и в смежные годы к стаду подбирались производители голштинских линий разных эколого-географических групп, происходящих из США, Канады, Германии, Англии, Японии и России (Попов и др.,2000), что обеспечило высокую изменчивость популяции.

Значения уровня гетерозиготности микросателлитов шестой хромосомы, приведенные в базе данных, были получены при изучении полиморфизма этих маркеров на панелях референтных семей, т.е. это усредненный показатель для животных различных пород. Значения фактической гетерозиготности, полученные нами, в той или иной мере приближаются к данным, полученным на референтных семьях.

Теоретическая гетерозиготность оценивает собственно не гетерозиготность как таковую, а уровень аллельного разнообразия (Животовский, 1991). Теоретическая гетерозиготность определяется по частотам аллелей в предположении, что скрещивания в популяции происходят случайно (Айала и др., 1988). В наших исследованиях не было обнаружено значимого отклонения фактической гетерозиготности от теоретически ожидаемой.

Гетерозиготность служит мерой генетической изменчивости популяции, она определяется как средняя частота особей, гетерозиготных по определенным локусам (Айала и др., 1988). Это надежная мера изменчивости, поскольку она служит оценкой вероятности того, что два аллеля данного локуса, взятые наугад из генофонда популяции, окажутся различными (каждая гамета любого организма несет в каждом локусе аллель, который можно рассматривать в качестве случайно изъятого из популяции). Как уже отмечалось ранее, для анализов ассоциации ДНК-маркеров с локусами хозяйственно-полезных признаков необходимо, чтобы бык-производитель был гетерозиготным по изучаемым локусам. Именно поэтому прежде чем приступить к поиску локусов, отвечающих за формирование хозяйственно-полезных признаков, необходимо изучить полиморфизм маркеров, которые будут использованы в этих исследованиях.

Все изученные микросателлитные маркеры в той или иной мере могут быть использованы в дальнейших поисках ассоциации с

локусами хозяйственно-полезных признаков. Считается, что чем больше величина PIC для данного локуса, тем информативнее он оказывается в качестве маркера. Принято, что при PIC>0,5 локус очень информативен, при 0,5> PIC >0,25 достаточно информативен и PIC<0,25 слегка информативен (Свердлов, 1995). В результате анализа наших данных было установлено, что у коров, принадлежащих линии Иона103, достаточно информативными оказались маркеры CSN3 и BMC 4203, а у дочерей Погожего4131 – CSN3. Все остальные изученные микросателлитные последовательности имели PIC > 0,5 в обеих группах животных (табл. 11), следовательно, эти маркеры могут с наибольшим успехом быть использованы в дальнейших исследованиях.

Следует подчеркнуть, что собранные данные являются универсальными и могут использоваться в дальнейшем для поиска и локализации генов, ответственных за любой исследованный признак, фенотипическое проявление которого у изучаемых животных описано. Поэтому немаловажной частью такой работы является сбор и описание всех характеристик отобранных животных. Неизбежность части работы, посвященной изучению полиморфизма микросателитных маркеров в данной популяции и оценке пригодности использования их в работах по выявлению локусов хозяйственно-полезных признаков вызвана тем, что в случае генетики количественных признаков полученные результаты правомочны только для конкретно изученных объектов (пород) и не допускают однозначного переноса на другие объекты.

В результате проведенных исследований был установлен высокий уровень полиморфизма данных гипервариабельных районов, характеризующихся наличием аллелей разных размеров и достаточно высоким уровнем гетерозиготности и PIC.

Заключение

Были проведены исследования по изучению пяти микросателлитных маркеров шестой хромосомы крупного рогатого скота черно-пестрой породы, как одного из критериев их отбора для дальнейшего использования в анализах сцепления маркеров с локусами хозяйственно-полезных признаков. При этом изучался уровень полиморфизма микросателлитов, частота встречаемости аллельных вариантов полиморфов, степень их гетерозиготности в популяции коров черно-пестрой породы.

Как следует из амплификационного анализа ДНК коров наблюдаемой популяции, по всем исследованным микросателлитным маркерам уровень их полиморфизма колеблется в пределах от 3-х до 12 аллелей в зависимости от маркера. Эти величины лежат достаточно

близко к уровню полиморфизма, зарегистрированному в международной базе данных, где суммированы сведения о различных породах скота. Необходимо отметить, что по этому показателю дочери Погожего4131 во всех случаях превосходили коров, принадлежащих линии Иона103.

Изучение меры генетической изменчивости популяции по показателю гетерозиготности свидетельствует, что средний уровень гетерозиготности всей изучаемой популяции по исследованным маркерам шестой хромосомы составил около 67,15%, подтверждая тем самым высокий полиморфизм тестируемых маркеров. А оценка информативной ценности полиморфизма по величине PIC> 0,5 предполагает отнесение изученных локусов к очень информативным.

Таким образом, совокупность полученных данных указывает на возможность успешного использования протестированных пяти микросателлитных маркеров шестой хромосомы в дальнейших исследованиях по поиску их ассоциации с хозяйственно-полезными признаками в популяции черно-пестрого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Perret, Y-C, Scia, R. Fries et al. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. Genomics, 1990, 6: 482-490.
2. Soller M. Genetic mapping of the Bovine Genome Using Deoxyribonucleic Acid-Level Markers to Identify Loci Affecting Quantitative Traits of Economic Importance. J. Dairy Sci., 1990, 73: 2682-2646.
3. Vainman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi et al. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. Mammalian genome. 1994, 5: 288-297.
4. Weber J.L. and P.E. May. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be tyred using the polymerase chain reaction. Am. J. Human Genetics, 1989, 44: 388.
5. Georges M.D., Nielsen M., Mackinnnon M. et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. Genetics. 1995, 139: 907-920.
6. Velmala R.J., Vilkki H.J., Elo K.T., et al. A search for quantitative trait loci for milk produktion traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. Anim. Genet. 1999, 30: 2136-2143.
7. Grisart B., Coppieters W., Arranz J.-J. et al. QTL mapping on candidate chromosomes 6, 14 and 20 using a red and white cattle grand-daughter design. Anim. Genet., 1998, 29 (Suppl.1): 62.
8. Vage D.I., Gomez-Raya L., Klungland H., et al. Mapping quantitative trait loci in Norwegian cattle. Anim. Genet., 1998, 29(Suppl. 1): 62.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984: 479с.

10. Williams J., Usha A.P., Urquhart B.G., Kirloy M. Verification of identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. Vet. Rec., 1997, 140: 446-449.
11. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991: 271с.
12. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях. Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНИТИ, 198, 8: 76-104.
13. Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)n·(dc-dt)n polymorphism. Genomics. 1990, 7: 524-530.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990: 352с.
15. Stone R.T. et al., A smalle – insert bovine genomic library highly enric microsatellite repeat sequences. Mamm. Genome, 1995, 6: 714-724.
16. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. et al. A genetic lincage map for cattle. Genetics, 1994, 136: 619-639.
17. Jorgensen CB, Konfortov BA, Barendse W, Miller JR. Two polymorphic bovine microsatellite loci (AFR227 and AFR2215). Anim Genet., 1995, 26(2):132
18. Stone R.T., G19110 cow STS BMC4203, ...[gi:1226227] GenBank
19. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978: 351с
20. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978: 526с.
21. Ott J., Donis-Keller H. Statistical methods in genetic mapping. Genomics. 1994, 22: 496.
22. Попов Н.А. и др. План племенной работы с крупным рогатым скотом черно-пестрой породы ГУП ПНО «Пойма» Луховицкого района Московской области на 2000-2007 гг.
23. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988, 3: 335с.
24. Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1995, 2: 3-15.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ СУБСТРАТОВ В СОСТАВЕ ОБМЕННОЙ ЭНЕРГИИ ДЛЯ МОЛОЧНЫХ КОРОВ

Е.Л Харитонов
Лаборатория пищеварения

На основании полученных экспериментальных данных обоснованы оптимальные потребности коров в основных субстратах (ацетате, пропионате, аминокислотах, глюкозе и высших жирных кислотах) для достижения эффективной биоконверсии питательных веществ корма в молочную продукцию.

Введение

Существующие системы нормирования питательных веществ и энергии базируются на различных способах учета конверсии корма в

организме животных и в целом правильно отражают реальные потребности животных в среднем по большому числу наблюдений, с учетом необходимого страховочного допуска. Необходимость учета метаболических аспектов питания вызвана тем обстоятельством, что в реальных условиях наблюдаются значительные отклонения от средней тенденции, которые связаны с особенностями обмена веществ у животных, получающих разные рационы в пределах существующих норм кормления.

При совершенствовании систем питания должны учитываться принципы субстратно - балансовой оценки обеспеченности организма питательными веществами, ориентированные на учет метаболических особенностей при разном физиологическом состоянии, уровне продуктивности и состоянии окружающей среды. Они позволяют, исходя из знаний количественной оценки метаболических преобразований питательных веществ кормов в процессе пищеварения и межуточного обмена, подбирать рационы, адекватные физиологическим потребностям животного в данных конкретных условиях. Разработка способов количественной оценки образования и расходования субстратов на продуктивные цели является предметом интенсивных разработок, ведущихся в США, Великобритании, Германии, Дании.

Главной целью таких работ является установление потребности животных в метаболитах, образующихся при переваривании корма и в процессах межуточного обмена, для более полной реализации генетического потенциала продуктивности животных на основе субстратного обеспечения метаболизма. В задачи исследований входило: разработка практических способов оценки потребностей животных в энергетических и пластических субстратах, совершенствование и разработка новых способов оценки кормов и рационов по критериям образования из них субстратов.

Материал и методы

Исследования выполнены на лактирующих коровах с канюлями рубца, двенадцатиперстной кишки, канюлями на воротной вене, выведенной под кожу сонной артерией и датчиками кровотока на воротной вене и срамной артерии с целью изучения основных этапов превращения питательных веществ корма в различных участках пищеварительного тракта, поступления их в кровь и использования в синтезе компонентов молока. Эффективность использования обменной энергии на синтез молока оценивали по отношению суммарной энергии субстратов, поглощенных молочной железой, к энергии, выделенной с молоком, а также по отношению энергии, выделенной с молоком, к продуктивной обменной энергии (обменная энергия минус затраты на

поддержание). Эффективность использования протеина корма оценивали по отношению выделенного белка с молоком к потребленному, переваренному или усвоенному протеину. Обменную энергию, переваримый и усвоенный протеин определяли в балансовых опытах. Затраты на поддержание принимали из расчета 0,45МДж на кг метаболической массы тела (живая масса в степени 0,75). Суммарную энергию субстратов, поглощенных молочной железой, определяли по артерио-венозной разнице отдельных метаболитов и скорости кровотока через молочную железу.

Результаты и обсуждение

Об удовлетворении потребностей лактирующих коров в основных субстратах-метаболитах обычно судят по четырем основным критериям: 1) по эффективности использования обменной энергии (ОЭ); 2) эффективности использования обменного протеина; 3) по наименьшей разнице в действительных затратах субстратов на энергетические и пластические цели и возможностью их обеспечения за счет кормов рациона; 4) по состоянию гормонального статуса организма коров в разные фазы лактации.

Изучение эффективности синтеза компонентов молока в зависимости от соотношения составляющих обменную энергию субстратов показало, что наименьшее теплоприращение происходит при увеличении в составе обменной энергии готовых предшественников компонентов молока. Так, увеличение в составе обменной энергии высокомолекулярных жирных кислот (ВЖК) всегда приводило к снижению общей теплопродукции на килограмм выделенного молока и соответственно к повышению эффективности молокообразования (табл.1). Наиболее эффективный синтез молока происходил при содержании в составе ОЭ 12-13% ВЖК, т.к. синтез молочного жира из низкомлекулярных предшественников – ацетата и кетоновых тел наиболее энергозатратен. Поставка в молочную железу готовых высших жирных кислот приводила к снижению потребности в энергии на 10–15%, в результате чего эффективность синтеза повышалась. При этом эффективность использования обменного протеина на синтез молочного белка не изменялась у коров до 90-го дня лактации (табл.1), но заметно снижалась с увеличением стадии лактации, что связано с ингибированием секреции соматотропного гормона повышенным поступлением жиров. Роль же этого гормона как раз начинает возрастать с 90 дня лактации (Casper, 1989).

Таблица 1. ***Эффективность использования обменной энергии и протеина на образование молока у коров в середине лактации (удой 15-20-25кг молока в сут) при разном уровне ВЖК***

Уровень ВЖК в составе ОЭ	Эффективность использования ОЭ	Азот молока/принятый азот
7,5	61,0±0,3	22,3±0,62
7,0	62,5±1,1	23,0±1,0
7,5	59,0±0,96	22,0±1,0
8,1	62,0±1,6	25,0±0,8
9,7	64,4±0,8	22,0±0,2
12,0	63,3±1,2	25,0±1,0
12,5	66,8±2,1	25,9±1,7
13,0	72,0±2,6	22,3±0,69

В то же время до 90-го дня лактации у коров, в связи с особенностями метаболизма в этот период, значительны потребности в высших жирных кислотах (ВЖК), которые удовлетворяются за счет жировых депо. Так, у коров в начале лактации повышение в составе ОЭ доли ВЖК не приводило к изменению эффективности использования энергии и протеина на молоко (табл.2), но снижало темпы и размеры мобилизации.

Таблица 2. ***Эффективность использования обменной энергии и протеина на образование молока у коров в начале лактации***

Уровень ВЖК в составе ОЭ	Эпр/Эпр + ТП - Эпод	Азот молока/принятый азот
6,5	72,5±3,5	27,2
8,4	72,7±2,79	26,5
10,6	73,0±1,99	26,8

В результате опытов установили, что повышение жирности молока и, соответственно, выхода молочного жира (от 6,6 до 16%) в основном происходит за счет увеличения поглощения секреторными клетками молочной железы пальмитиновой кислоты и короткоцепочных жирных кислот. При этом, за счет сокращения затрат на синтез жирных кислот, эффективность использования ОЭ на молокообразование увеличивается в среднем с 62 до 65 % (табл.3).

Таблица 3. ***Эффективность использования обменной энергии на образование молока у коров в разгаре лактации при разном составе ВЖК***

Уровень ВЖК в составе ОЭ	Преобладание вида ВЖК в составе смеси	Эпр/Эпр + ТП - Эпод	Азот молока/принятый азот
12	С16	68	27,5
12	С10	68	29,9
12	С18:1	64	29,0

12	смесь	67	26,0

При повышении эффективности использования ОЭ на молоко потребности в глюкозе на синтез молочного жира снижаются на 12-17%. В результате на образование 100г молочного жира, на рационах с энергетической долей ВЖК в ОЭ 6%, требуется 32,5г глюкозы, а на рационах, обеспечивающих долю ВЖК в ОЭ 10% - 28г глюкозы. Исходя из этих цифр можно корректировать расчет потребности в глюкозе на образование молока при различных кормовых ситуациях.

В целях практической реализации установленных закономерностей для повышения использования ОЭ на синтез молочного жира и определения потребности молочных коров в начале лактации в липидных компонентах, проведен опыт на коровах с 40-го по 70-й день лактации с удоем 22 кг и жирностью 4,1% при разном уровне ввода в рацион жира (3,2; 3,9 и 4,5% общего жира от СВ рациона), на изокалорийных и изопротеионовых рационах. В качестве источника ВЖК был выбран говяжий жир, имеющий повышенное содержание пальмитиновой кислоты и пониженное олеиновой. Нами установлено, что при включении в рационы коров говяжьего жира, по сравнению со свиным, меньше ВЖК используется в энергетическом обмене на теплопродукцию, но больше их участвует в обеспечении процессов биосинтеза молочного жира и в результате этого с молоком их выводится на 150г больше при том же удое. Эффективность использования ОЭ на молокообразование составляет при применении говяжьего жира 68%, а свиного - 64,6% (табл.2).

Результаты исследований показали, что повышение уровня липидов в рационе коров от 3,2 до 4,5% от сухого вещества рациона, или энергетической доли липидов от 6,6 до 10,3 % от обменной энергии, при одинаковом уровне энергетического и протеинового питания, в начале лактации приводит к снижению темпов мобилизации субстратов из жировой и мышечной тканей.

Увеличение доли других компонентов ОЭ – ацетата, глюкозы, пропионата, аминокислот – не приводило к достоверному изменению ни эффективности энергетического синтеза молока, ни к повышению эффективности использования обменного белка на продуктивные цели (табл.4-6). Превышение уровня аминокислот выше 24% от ОЭ снижало эффективность использования протеина на 10-15%, что свидетельствует об избытке протеина в рационе и определяет оптимальный уровень аминокислот в пределах 22-24% от ОЭ (табл.6). Таким образом, при изменении содержания в составе ОЭ ацетата от 28 до 34% и глюкозы

Таблица 4. ***Эффективность использования обменной энергии и протеина на образование молока у коров в середине лактации (удой 15-20-25кг молока в сут) при разном уровне ацетата***

Уровень ацетата в составе ОЭ	Эпр/Эпр + ТП - Эпод	Азот молока/принятый азот
30,0	61,0±0,3	26,4±2,9
33,9	60,0±1,7	27,7±0,3
30,4	61,7±1,5	25,5±1,5
33,4	62,3±0,8	27,0±2,0
28,8	62,4±0,8	23,0±1,1
31,0	62,0±1,2	25,0±1,0
30,7	59,0±2,1	22,0±1,7
30,0	62,0±2,6	25,7±0,7
31,9	62,0±0,9	25,2±1,2

от 7,5 до 13 синтез компонентов молока протекает с постоянной эффективностью. В то же время с 90-го дня лактации у коров начинает значительно возрастать ответ инсулярного аппарата на поступление в организм глюкозы и для данного периода лактации следует обеспечивать в рационах уровень глюкозы на уровне 7-8% от ОЭ.

Таблица 5. ***Эффективность использования обменной энергии и протеина на образование молока у коров в середине лактации (удой 15-20-25кг молока в сут) при разном уровне глюкозы***

Уровень глюкозы в составе ОЭ	Эпр/Эпр + ТП - Эпод	Азот молока/принятый азот
9,0	61,0±0,3	26,4±2,9
13,1	61,0±1,7	27,5±0,7
9,2	61,7±1,5	25,5±1,5
12,9	62,3±0,8	23,0±2,0
8,3	62,4±0,8	23,0±1,1
8,5	62,0±1,2	25,0±1,0
7,9	59,0±2,1	22,0±1,7
7,6	62,0±2,6	25,7±0,7
8,7	62,0±0,9	25,2±1,2

Таблица 6. ***Эффективность использования обменной энергии и протеина на образование молока у коров в середине лактации (удой 15-20-25кг молока в сут) при разном уровне аминокислот***

Уровень аминокислот в составе ОЭ	Эпр/Эпр + ТП - Эпод	Азот молока/принятый азот
22,2	60,0±1,5	22,6±0,6
26,4	64,0±2,7	20,5±0,2
21,6	61,7±1,5	25,5±1,5
24,5	60,3±0,9	23,5±1,5
23,5	62,4±0,8	23,0±1,1
24,1	63,0±1,2	23,0±2,0

22,2	59,0±2,1	22,0±1,7
21,9	62,0±2,6	25,7±0,7
21,0	62,0±0,9	25,2±1,2

Процессы рубцового и кишечного пищеварения у коров обуславливают ряд дополнительных условий и возможностей эффективного использования кормов. Опыты показали, что скорость распада фракций клетчатки в рубце зависит от pH рубцового содержимого ($r=0,91;p<0,05$) и начинает снижаться при уровне pH ниже 6,3, от концентрации аммиака ($r=0,52;p>0,05$) и содержания жира в рационе, в случае добавления его свыше 4% от СВ рациона. Содержание липидов в рационе свыше 4%, при применении растительных масел, свиного и кормового жира, снижает переваривание клетчатки в рубце на 15-30% (рис. 1). В то же время включение в рацион говяжьего жира до уровня 4,5% не оказывало негативного влияния на скорость ферментации фракций клетчатки, что связано с особенностями его жирнокислотного состава. Таким образом, соотношение доступных питательных веществ в рационе должно обеспечивать в рубце уровень pH не ниже 6,3, концентрацию аммиака около 10мг%. Уровень липидов в рационах не должен превышать 4% от сухого вещества рациона для предотвращения снижения переваримости фракций клетчатки.

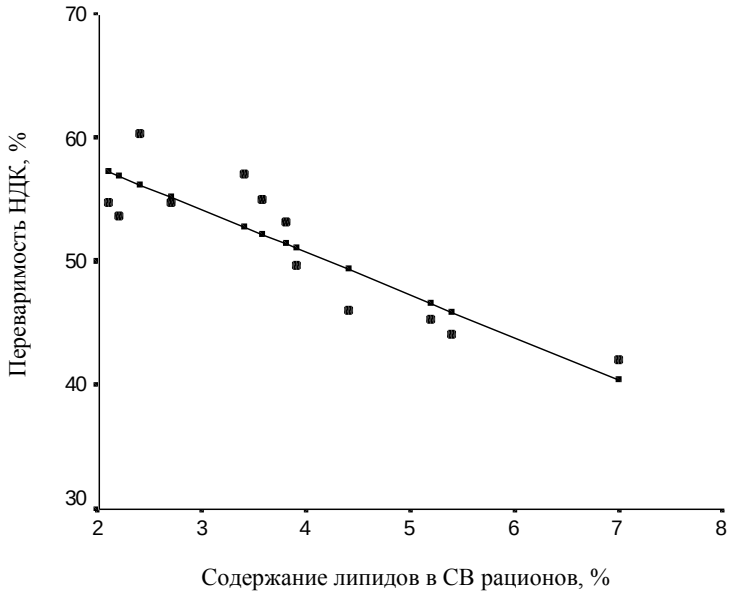


Рис. 1. Зависимость переваримости НДК от содержания липидов в рационе

Установлено так же снижение переваримости крахмала в кишечнике при повышении его поступления в диапазоне от 300 до 1000г (r= -0,885; p<0,05), (регрессия a=77,1±1,70, в= -0,008±0,002). Определено, что поступление в кишечник крахмала – основного источника глюкозы для жвачных свыше 1000 г, приводит к прогрессивному снижению его переваримости. В связи с этим содержание доступного крахмала в рационах коров должно обеспечивать поступление его в кишечник не более этого количества.

Таким образом, с учетом особенностей пищеварения жвачных, гормонального статуса коров в разные фазы лактации, уровня синтеза молока нами разработаны нормы потребности лактирующих коров в субстратах, составляющих обменную энергию (табл. 7, 8), которые позволяют более точно нормировать их питание.

Таблица. 7 ***Нормы обменной энергии и оптимальные соотношения основных субстратов (% в энергетических эквивалентах) для половозрелых молочных коров с 15 по 90 день лактации (содержание жира в молоке – 4%, белка – 3,4%)***

Показатели				
	Удой 15кг			
Живая масса, кг	350	400	450	
ОЭ, МДж	103,2	107,6	108,0	
ВЖК	13,5	13,5	12,0	
Аминокислоты	23,0	22,5	23,0	
Глюкоза	9,0	9,5	9,5	
Бутират	8,7	8,8	10,0	
Пропионат	18,0	17,5	16,0	
Ацетат	27,8	28,2	29,5	
	Удой 20кг			
Живая масса, кг	400	450	500	550
ОЭ, МДж	137,3	140,2	144,5	148,0
ВЖК	14,0	13,7	13,0	11,0
Аминокислоты	22,0	22,0	21,7	21,5
Глюкоза	8,4	8,2	9,0	8,8
Бутират	9,0	9,5	10,0	10,0
Пропионат	17,0	16,5	16,0	16,0
Ацетат	29,6	30,1	30,3	32,7
	Удой 25 кг			
Живая масса, кг	450	500	550	
ОЭ, МДж	155,0	160,5	164,4	
ВЖК	14,1	13,6	13,2	
Аминокислоты	23,5	23,1	23,0	
Глюкоза	8,5	8,0	8,0	
Бутират	9,2	9,5	10,0	
Пропионат	16,5	17,0	17,0	

Ацетат	28,2	28,8	28,8	
		Удой 30 кг		
Живая масса, кг	550	600	650	700
ОЭ, МДж	189,5	195,8	203,9	200,7
ВЖК	14,0	13,5	12,0	11,5
Аминокислоты	22,4	22,0	21,9	22,5
Глюкоза	7,3	7,0	7,5	7,8
Бутират	8,8	9,0	9,3	10,0
Пропионат	18,5	18,8	18,0	16,5
Ацетат	29,0	29,7	31,3	31,6
		Удой 35 кг		
Живая масса, кг	550	600	650	700
ОЭ, МДж	211,8	218,8	226,1	226,1
ВЖК	14,4	13,9	13,0	12
Аминокислоты	23,28	22,8	22,3	22,6
Глюкоза	6,6	6,4	6,7	6,7
Бутират	10,5	9,0	9,0	9,3
Пропионат	17,0	18,0	18,5	17,5
Ацетат	28,2	29,9	30,5	31,9

Таблица. 8. ***Нормы обменной энергии и оптимальные соотношения основных субстратов (% в энергетических эквивалентах) для половозрелых молочных коров с 90 по 180 день лактации (содержание жира в молоке – 4%, белка – 3,4%)***

Показатели		Удой 15кг		
Живая масса, кг	350	400	450	
ОЭ, МДж	112,7	116,5	120,2	
ВЖК	11,0	10,5	9,6	
Аминокислоты	21,0	21	20,7	
Глюкоза	9,0	9,3	9,0	
Бутират	10,0	10,0	11,0	
Пропионат	17,5	18,0	16,5	
Ацетат	31,5	31,2	33,2	
		Удой 20 кг		
Живая масса, кг	400	450	500	550
ОЭ, МДж	148,6	155,8	159,5	163,0
ВЖК	11	10,5	9,3	8,2
Аминокислоты	20,2	20,1	20,0	20,0
Глюкоза	7,0	7,0	7,2	7,0
Бутират	10,0	10,0	11,0	12,0
Пропионат	19,0	19,0	17,2	16,5
Ацетат	32,8	33,4	35,3	36,3
		Удой 25 кг		
Живая масса, кг	450	500	550	
ОЭ, МДж	171,1	174,7	178,2	
ВЖК	11,2	11,5	10,1	
Аминокислоты	21,3	21,2	21,1	
Глюкоза	7,0	7,5	7,2	
Бутират	10,0	10,0	11,0	
Пропионат	18,7	18,0	17,0	

Ацетат	31,8	31,8	33,6	
		Удой 30 кг		
Живая масса, кг	550	600	650	700
ОЭ, МДж	203,7	207,1	210,5	213,8
ВЖК	11,5	11,0	10,5	10,0
Аминокислоты	21,3	21,3	21,2	21,1
Глюкоза	7,0	7,0	7,3	7,2
Бутират	10,0	10,0	10,0	11,0
Пропионат	20,0	19,0	19,0	17,0
Ацетат	30,2	31,7	31,9	33,6
		Удой 35 кг		
Живая масса, кг	550	600	650	700
ОЭ, МДж	229,1	232,5	235,9	239,2
ВЖК	11,5	11,0	10,5	10,0
Аминокислоты	21,5	21,46	21,4	21,3
Глюкоза	6,1	6,0	6,5	6,4
Бутират	9,6	9,7	9,8	11,0
Пропионат	19,6	19,8	19,0	17,0
Ацетат	31,7	32,0	32,8	34,3

Заключение

В результате проведенной работы установлено, что парциальная энергетическая эффективность синтеза молока может варьировать при изменении соотношения субстратов, составляющих суммарную обменную энергию. При увеличении в составе обменной энергии доли ВЖК с 7 -8 до 12-13 % эффективность синтеза увеличивается с 62 до 68-72%, что объясняет отклонения в молочной продукции у коров, содержащихся на различных рационах в пределах существующих норм кормления. Изменение доли других субстратов в ОЭ, в изученных диапазонах, не приводит к модификации эффективности использования ОЭ и протеина рациона на молокообразование, и их содержание в ОЭ регламентируется пищеварительной способностью и гормональным ответом организма животного. Так установлено, что поступление крахмала в тонкий кишечник не должно превышать 1000г, а содержание липидов в СВ рациона 4% до 90 дня лактации и 800 г крахмала и 3,5 липидов после 90 дня лактации, что совадает с изменением в секреции инсулина и соматотропного гормона.

Применение указанных норм потребностей позволяет поддерживать лактационную кривую на более высоком уровне во все фазы лактации, полнее использовать генетический потенциал животных и повышать продуктивное действие кормов рациона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Casper D.P., Schingoethe D.J. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation dairy cows fed a high fat diet. J. Dairy Sci., 1989, 71:3327-3335.

ОБОСНОВАНИЕ НОРМ ПОТРЕБНОСТИ КОРОВ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, В.П. Лазаренко, В.П. Волобуев, Р.А. Волобуева, В.В. Михайлов, С.Ю. Гулюшин

В статье приведены экспериментальные данные по субстратной обеспеченности энергетического обмена у лактирующих коров с различным уровнем молочной продуктивности. Определены нормы потребности в энергетических субстратах для коров в начальный период лактации.

Введение

В новом издании справочного пособия «Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных» (2003г) введены дополнительные показатели, характеризующие обменную энергию, исходя из ее составляющих: теплопродукции и энергии продукции. Это позволяет рассчитывать эффективность использования обменной энергии на продукцию. Повышение эффективности в основном зависит от снижения затрат энергии на теплопродукцию, которые при несбалансированном кормлении и неудовлетворительных условиях содержания бывают значительно выше физиологических потребностей на основные функции, в том числе, на биосинтез компонентов продукции (Агафонов, Надальяк, 1991; Агафонов, 1995; Агафонов и др., 1999; Овчаренко, 1990; Petricova, 2001; Riis, Danfaer, 1990). Важным аспектом является субстратная характеристика суточной теплопродукции. Теплопродукция тканевого метаболизма отражает весь комплекс воздействий внутренних и внешних факторов на животных. В начальный период лактации лишь 18-25% теплопродукции образуется за счет окисления ацетата. Основным источником энергии у молочных коров в этот период являются высшие жирные кислоты, поступающие с кормом или за счет мобилизации из жировых депо организма. Этот механизм обеспечения энергией является весьма эффективным, особенно для синтеза компонентов молока. Установлено, что эффективность использования резервов жира в качестве источника обменной энергии на синтез молока достигает 82-

85%, а за счет обменной энергии, полученной с кормом ─ в среднем 62% (ARC, 1988; Petricova, 2001).

Альтернативное использование ЛЖК и ВЖК в энергетическом обмене или на синтез жира молока приводит к ограничению молочной продуктивности и жирномолочности, ввиду преимущественного использования этих субстратов в энергетическом обмене, по сравнению с биосинтезом (Овчаренко, 1990). Поэтому знание количественного использования ацетата, глюкозы, ВЖК и азотсодержащих субстратов в энергетическом обмене необходимо для сопоставления с количеством и соотношением субстратов, которые могут использоваться на синтез продукции (молоко, прирост) (Агафонов, 1999; Овчаренко, 1990; Agenas et al., 2000; Colin-Schoellen,2000; Petricova, 2001). Фонд субстратов, остающийся в качестве исходного для синтеза продукции, должен соответствовать химическому составу и количеству продукции, обусловленному генотипом животных и влиянием кормовых (субстратных) факторов (Агафонов,1995; 1999).

Можно предположить, что качество продукции (в частности, молока) будет во многом зависеть от состава субстратов, которые будут использованы в энергетическом обмене (Агафонов, 1995; Овчаренко, 1990). Четкое разделение потребностей в субстратах у коров по фазам лактации на энергетический обмен и для целей биосинтеза продукции позволит проводить оптимизацию исходных фондов субстратов на данные функции. Одной из конечных задач наших исследований является разработка норм потребности в энергетических субстратах для лактирующих коров в начальный период лактации, когда наблюдается характерная динамика их использования, в особенности ацетата и высших жирных кислот (Агафонов, 2000).

Материал и методы

Исследования проводили на лактирующих коровах в условиях вивария института (опыт 1) и в научно-хозяйственном опыте (опыт 2).

В первом опыте коровы были разделены на 2 группы, исходя из сроков отела. Коровы 1-й группы были включены в исследования с 20 по 100 день лактации; коровы 2-й – с 40 по 165 день лактации. Рационы коров различались по уровню концентратов в зависимости от молочной продуктивности. Основу рациона составляли сено и силос в количестве 45% и 50% от обменной энергии для коров 1-й и 2-й групп (табл. 1).

Таблица 1. ***Рационы лактирующих коров***

Корма, показатели питательности	Ед. измер.	Гр.1, №№1,7 ж.м – 470 кг удой – 22,5 кг	Гр.2, №№4,6,8 ж.м – 475 кг удой – 20,3 кг
Сено злаково-бобовых многол. трав	кг	4,225	4,230
Силос злаково-бобовых многол. трав	кг	20,900	20,933
Жом свекловичный сухой	кг	0,600	0,600
Комбикорм	кг	8,400	7,500
В рационах содержалось:			
Обменная энергия	МДж	161,8	157,8
Сухое вещество	кг	17,649	16,849
Сырой протеин	г	2505	2413
Сырая клетчатка	г	3488	3434
Крахмал	г	3150	2800
Сахар	г	400	360
Сырой жир	г	691	658
Субстратная оценка рационов			
Ацетат	г	3656	3877
Пропионат	г	1670	1555
Бутират	г	910	840
Сумма аминокислот	г	1510	1463
Сумма высших жирных кислот	г	500	475
Глюкоза, молочная кислота	г	484	242

Методы расчета субстратов, доступных для усвоения, изложены в отчетах за 1992-1993 г и в статье (Агафонов, 1995), приведенной в списке литературы.

Во втором опыте исследования проводили на высокопродуктивных лактирующих коровах с удоем 7-8 тыс. кг молока в год (совхоз «Пушкинский» Нижегородской области). Были сформированы две группы коров по 10 голов. В физиологический опыт были включены 8 коров (по 4 головы из группы) в период 60-90 дней лактации. Рационы коров включали кормосмесь, состоящую из сена, соломы ячменной, кукурузного силоса, с добавкой комбикорма. Количество кормосмеси в рационах было одинаковым – по 26 кг на голову в день для коров с различным уровнем молочной продуктивности. Кормосмесь раздавали два раза в сутки равными долями. Остальные корма: кормовую свеклу, патоку кормовую и комбикорм – нормировали в соответствии с уровнем молочной продуктивности (табл. 2).

Таблица 2. ***Рационы лактирующих коров контрольной и опытной групп***

Корма, показатели питательности	Ед. измер.	Суточный удой, кг 30	35	40
Сено козлятника с овсяницей	кг	2	2	2
Солома ячменная	кг	4	4	4

Силос кукурузный	кг	20	20	20
Свекла кормовая	кг	12	14	16
Патока кормовая	кг	1,5	2	2
Комбикорм	кг	11,5	13,25	15
Энергетическая и субстратная оценка рационов контрольной группы				
Обменная энергия	МДж	205,3	228,0	245,8
Ацетат	г	4226	4279	4257
Пропионат	г	1924	2145	2238
Бутират	г	1045	1195	1331
Сумма аминокислот	г	1662	1890	2035
Сумма высших жирных кислот	г	580	555	566
Глюкоза	г	1184	1225	1280
Энергетическая и субстратная оценка рационов опытной группы				
Обменная энергия	МДж	210,3	233,8	252,5
Ацетат	г	4224	4300	4310
Пропионат	г	2044	2236	2397
Бутират	г	1070	1227	1373
Сумма аминокислот	г	1700	1934	2134
Сумма высших жирных кислот	г	710	800	850
Глюкоза	г	720	1061	1365

Коровы опытной группы получали такое же, как в контроле, количество корма, но в состав комбикорма был введен кормовой жир из расчета 17,0 г/кг; дополнительное количество кукурузы и соевого шрота вводили с целью снижения распадаемости крахмала и сырого протеина в рубце. Следовательно, комбикорм коров опытной группы имел более высокую концентрацию обменной энергии и протеина, что необходимо для обеспечения высокого уровня молочной продуктивности.

Основные методы: исследования легочного газообмена масочным методом; газоанализ в аппарате Холдена; прямая калориметрия образцов корма, молока и др.; расчетные методы определения теплопродукции и субстратов, используемых в энергетическом обмене и в составе обменной энергии рационов (Агафонов и др., 1991, 1993; Агафонов, 1995; Метод. указания…, 1986; Riis et al.,1990).

Результаты и обсуждение

Энергетический обмен у коров в начальный период лактации. В период проведения балансового опыта коровы 1-й группы находились на 70-75 дне лактации, а коровы 2-й группы – на 135-140 дне лактации. Рационы кормления коров контролировали по фактическому потреблению корма.

В научных исследованиях за основу субстратной оценки рационов брали показатели балансов энергии (табл. 3).

Таблица 3. ***Балансы энергии у коров, МДж/сут***

Показатели	Группа 1	Группа 2
Валовая энергия корма	316,3±0,3	302,1±1,5
Содержание энергии в кале	106,3±2,2	98,2±2,5
Энергия переваримых пит. веществ	210,0±2,5	203,9±3,3
Потери энергии с метаном и теплотой ферментации	37,7±0,6	36,7±0,6
Суммарная энергия субстратов	172,3±2,3	167,2±3,1
Потери энергии с мочой	10,5±0,2	9,4±0,4
Обменная энергия рациона	161,8±1,8	157,8±3,1
Теплопродукция	83,3±3,1	88,5±4,0
Энергия суточного удоя	65,2±1,1	60,1±4,2
Отложено энергии	13,3±0,2	9,2±2,5

Кроме известных показателей ввели новый – «суммарную энергию субстратов», доступных для усвоения. Этот показатель является важнейшим при расчете образующихся в преджелудках ЛЖК и поступивших из тонкого кишечника в кровь аминокислот, высших жирных кислот и глюкозы. Расчетные данные субстратной оценки рационов приведены в таблице 1.

Вторым этапом в исследованиях являлась оценка энергетического обмена у коров. Из общего количества доступных для усвоения субстратов необходимо было выделить использованные непосредственно в энергетическом обмене. Для этого применяли расчетный метод, основанный на анализе суточной теплопродукции у коров. Исходя из дыхательного коэффициента провели расчет количества углеводов, ацетата и высших жирных кислот, вовлеченных в энергетический обмен (Агафонов и др., 1992-1993). На основе потерь азота с мочой рассчитали количество азотсодержащих веществ, использованных в энергетическом обмене (табл. 4). Принимали в расчет, что все оставшиеся субстраты рациона в трансформированной форме будут использованы на синтез компонентов продукции, в данном случае на молоко и прирост.

Таблица 4. ***Использование субстратов в энергетическом обмене***

Показатели	Ед. измер.	Гр.1	Гр. 2
		коровы №№ 1,7 ж.м. – 470 кг	коровы №№ 4,6,8 ж.м – 475 кг
Азотсодержащие вещества	г	710	655
Ацетат	г	2750	3570
Глюкоза	г	505	490
Высшие жирные кислоты, кетоны	г	486	330

У коров 1-й группы использование ацетата в энергетическом обмене составляло 48,36% от величины суточной теплопродукции, а использование ВЖК – 22,00%. У коров 2-й группы, соответственно ─

59,10% и 14,25%. Полученные данные характеризуют конкретную потребность коров в энергетических субстратах с учетом корректировки по фазе лактации, уровню молочной продуктивности, живой массе коров, структуре рационов.

На коровах 2-й группы были проведены систематические исследования легочного газообмена, уровня молочной продуктивности, потребления корма и, исходя из полученных данных, определена потребность в субстратах энергетического обмена (табл. 5).

Таблица 5. ***Динамика использования субстратов в энергетическом обмене у лактирующих коров***

Дней лактации	Суточная теплопродукция, МДж	ДК	Использование субстратов, % от ТП		
			азотсодержащие вещества	ацетат и глюкоза	ВЖК и кетон. тела
50	78,3	0,899±0,021	18	38	44
68	79,5	0,887±0,008	17	51	32
106	84,3	0,946±0,018	17	67	16
120	88,5	0,951±0,013	17	70	13

С учетом ранее проведенных исследований нами установлены следующие нормы потребности в энергетических субстратах для коров с 15 по 120 дни лактации (табл. 6).

В научно-хозяйственном опыте решалась задача возможности оптимизации рационов в начальный период лактации. При этом учитывались потенциальные возможности раздоя как за счет мобилизации резервов организма, так и путем компенсации потерь энергии и протеина из тканей за счет поступления с кормом дополнительного количества жира, а также за счет снижения распадаемости в рубце сырого протеина и крахмала.

Таблица 6. ***Нормы потребности лактирующих коров в энергетических субстратах (ж.м. 450-500 кг, удой – 20 кг)***

Показатели	Дни лактации					
	15	35	50	70	100	120
Обменная энергия, МДж	134	136	140	144	148	150
Теплопродукция, МДж	70	73	78	82	86	88
Аминокислоты и другие азотсодержащие вещества, г	800	800	780	790	810	830
Ацетат и глюкоза, г	1170	1460	1976	2788	3841	4107
ВЖК и кетоновые тела, г	1070	1035	950	730	380	330
Энергия суточного удоя, МДж	64	63	62	62	62	62

Получены достоверные различия по уровню молочной продуктивности у коров контрольной и опытной групп. При этом наблюдалось достоверное ($P<0,02$) повышение теплопродукции у коров

опытной группы. Имелась тенденция снижения калорийности 1 кг молока у коров опытной группы (табл. 7).

Таблица 7. ***Молочная продуктивность и теплопродукция у коров***

Дни лактации	Группы	Молочная продуктивность			Теплопродукция, МДж	Сумма ТП+Э удоя, МДж
		кг	МДж/кг молока	энергия удоя, МДж		
75	Контроль	29,5±1,9	2,939±0,100	86,7±7,9	96,9±6,2	183,6±5,1
74	Опыт	33,6±1,8	2,899±0,110	97,4±5,2	110,5±2,8	207,9±2,2
	P<	0,01	-	-	0,02	0,02

В данный период лактации (60-90 дней) сумму теплопродукции и энергию суточного удоя можно использовать в качестве показателя приближенного баланса энергии, так как отложения энергетических резервов в теле высокопродуктивных кров не наблюдалось. Расчеты показали высокую эффективность использования энергии корма на молоко: в контрольной группе – 68,26%, у коров опытной группы – 65,81%.

Использование субстратов в энергетическом обмене у высокопродуктивных коров значительно варьирует в зависимости от физиологического состояния организма, главным образом, от возможной еще в данный период лактации (60-90 дней) мобилизации резервного жира, а также от состояния упитанности, индивидуальных особенностей обмена, структуры рациона и т.д.

Средние показатели по использованию субстратов в энергетическом обмене у коров приведены в таблице 8.

Таблица 8. ***Субстраты, использованные в энергетическом обмене***

Корма, показатели питательности	Ед. измер.	Контроль	Опыт
Аминокислоты и другие азотсодержащие вещества	г	960	1100
Ацетат и глюкоза	г	3350	3600
Высшие жирные кислоты, кетоновые тела	г	800	975

У коров опытной группы в большем количестве, по сравнению с контролем, в энергетическом обмене использовались ВЖК и глюкоза. У коров контрольной группы 30,0% энергии было обеспечено за счет использования высших жирных кислот и 48,9% ─ за счет ацетата. Участие аминокислот и других азотсодержащих веществ в энергетическом обмене в обеих группах было примерно одинаковым

(18-18,5% от теплопродукции). При более низкой молочной продуктивности у коров контрольной группы лучше сохранялась упитанность и возможность мобилизации энергетических резервов.

Для высокопродуктивных коров схема норм будет отличаться от норм потребности в субстратах, приведенных в таблице 6, ввиду более значительной и длительной мобилизации энергетических резервов в начальный период лактации (табл. 9).

*Таблица 9.**Нормы потребности коров в энергетических субстратах в период 75-100 дней лактации (ж.м. – 600-650 кг)***

Показатели	Ед. измер.	Суточный удой, кг		
		25	30	35
Обменная энергия	МДж	166	190	212
Энергия удоя	МДж	76	90	102
Теплопродукция	МДж	90	100	110
Аминокислоты	г	875	950	1070
Ацетат и глюкоза	г	3073	3307	3750
ВЖК и кетоновые тела	г	760	900	930

Оптимизация энергетического питания у коров при изменении уровня липидного питания и при инфузии лимитирующих факторов. Рационы были сбалансированы в соответствии с детализированными нормами. На этом фоне в период 40-85 дней лактации изучали влияние различных уровней липидного питания у коров на молочную продуктивность и состав молока, с целью выяснения возможного лимитирования жирных кислот. При рекомендуемой норме сырого жира в рационах коров для молочной продуктивности 20-21 кг – 535 г, фактическое содержание варьировали до 800 г за счет добавления в состав комбикорма кормового жира. При этом содержание обменной энергии и сырого протеина в рационах не изменяли. В данной фазе лактации при нулевом балансе энергии, обменная энергия рациона используется только на образование молока и на обеспечение физиологических функций. В этом случае возможно использовать методику составления приближенного баланса энергии у коров, что необходимо для расчета эффективности использования обменной энергии на молокообразование.

Таблица 10. ***Влияние уровня липидов на молочную продуктивность и теплопродукцию у коров***

Содержание липидов в рационах, %	Молочная продуктивность			Затраты энергии		Сумма ТП+Э удоя	Эффект. использ. ОЭ на продукцию, %
	кг	МДж/кг молока	Энергия удоя, МДж	ТП, МДж	ДК		

3	20,9±1,0	3,058±0,046	63,9±2,7	75,8±3,3	0,890	139,7±4,8	68,12
5	20,7±1,1	3,321±0,044	68,9±4,4	77,4±2,4	0,894	146,3±4,2	68,63

При увеличении содержания липидов с 3 до 5% от сухого вещества калорийность суточного удоя возросла на 7,82%, при одновременном повышении теплопродукции у коров на 2,11% (табл. 10).

При балансировании липидного питания лактирующих коров необходимо учитывать сложные механизмы биосинтеза молочного жира. Лимитирующими факторами могут быть жирные кислоты как с короткой, так и со средней и длиной углеродной цепью.

Таблица 11. ***Влияние олеиновой, пальмитиновой и смеси кислот C_{10}-C_{14} на молочную продуктивность***

Молочная продуктивность						
кг	МДж/кг молока	Энергия суточного удоя, МДж	ТП, МДж/сут	Сумма ТП+Э удоя МДж	ДК	Эффект. использ. ОЭ на молоко, %
1. Инфузия олеиновой кислоты						
18,6±0,8	3,228±0,136	60,2±4,4	88,8±1,8	149,1±3,6	0,872	57,83
2. Инфузия пальмитиновой кислоты						
19,0±2,0	2,996±0,040	57,1±6,1	80,0±4,3	137,1±5,4	0,886	64,28
3. Инфузия смеси кислот C_{10}-C_{14}						
18,6±0,6	3,177±0,003	59,1±2,0	82,1±0,4	141,2±1,6	0,940	60,73

При инфузии олеиновой кислоты установлено повышение калорийности 1 кг молока на 9,02%, однако суточный удой снизился на 9,16% по сравнению с контролем. Эффективность использования обменной энергии на молоко снизилась до 57,83%. Дополнительное введение смеси кислот C_{10}-C_{14} не оказало влияния на молочную продуктивность коров. При инфузии пальмитиновой кислоты наблюдалось снижение калорийности 1 кг молока при одновременном снижении уровня теплопродукции. При этом эффективность использования обменной энергии на молоко оставалась высокой (табл. 11).

Положительное влияние на молочную продуктивность оказывали инфузии лизина; лизина с метионином; гистидина; глутамата. Особенно следует обратить внимание на нормализацию энергетического обмена у лактирующих коров, когда более 50% энергозатрат осуществляется за счет ЛЖК, главным образом, за счет использования ацетата (табл. 12).

Таблица 12. ***Обеспеченность энергетическими субстратами у коров***

Условия проведения опытов	Теплопродукция, МДж/сут	ДК	Использование субстратов в энергетическом обмене, % от ТП			
			азотсод. вещ-ва	ацетат	глюкоза	ВЖК и кетон. тела
Основной рацион (ОР)	88,5	0,951	17,72	59,10	8,93	14,25
ОР + кормовой жир 320 г	77,4	0,894	15,81	48,44	7,91	27,84
ОР + олеиновая кислота	88,8	0,872	17,10	39,00	8,55	35,35
ОР + пальмитиновая кислота	84,5	0,885	16,90	42,75	8,50	31,85
ОР + смесь C_{10}-C_{14} кислот	84,5	0,956	17,00	62,37	8,45	12,18
ОР + лизин – 10г	79,8	0,963	17,72	63,32	8,81	10,15
ОР + метионин –10г	86,6	0,913	14,78	53,12	7,39	24,71
ОР + лизин – 20 г	77,7	0,954	17,76	60,75	8,88	12,61
ОР + лизин – 20 г + метионин – 10 г	76,2	0,927	15,75	57,55	7,88	18,82
ОР + гистидин	78,0	0,914	16,53	51,28	8,27	23,92
ОР + глутамат	80,9	0,867	13,23	41,68	6,62	38,47
Научно-хозяйственный опыт						
Контроль (ОР)	96,9	0,890	18,00	42,93	9,00	30,07
Опыт (ОР + Жир + СП + Крахмал)	110,5	0,880	18,50	39,65	9,25	32,60

Заключение

Как было установлено ранее, энергетический обмен у лактирующих коров в начальный период лактации не соответствует сложившимся представлениям по характеру используемых субстратов. Установлено низкое использование ацетата в качестве энергетического субстрата, составляющие 18-25% суточной теплопродукции. Энергетический обмен осуществляется за счет мобилизации жировых депо, а именно – неэстерифицированных жирных кислот. В дальнейшем происходит постепенное увеличение вклада ацетата в энергетический обмен в течение 2-3 месяцев после отела. Соответственно, вклад жирных кислот в энергетическом обмене постепенно снижается до 20-10% от суточной теплопродукции. Для лактирующих коров с удоем 15-20 кг такие закономерности устанавливаются в более ранние фазы лактации, по сравнению с высокопродуктивными с удоем 25-30-35 кг в день. Соотношение

использования в энергическом обмене ацетата и высших жирных кислот рассчитывается по дыхательному коэффициенту (ДК). Введение в рацион избыточного количества жира ведет к снижению ДК, так как часть поступающего жира включается в энергетический обмен. Противоположное действие оказывают инфузии жирных кислот, например, смеси C_{10}-C_{14}. Таким путем можно регулировать включение в энергетический обмен основных субстратов. Регулирующим влиянием на величину ДК обладают аминокислоты. Следовательно, кормовыми факторами можно влиять на энергетический обмен и регулировать его эффективность.

Для высокопродуктивных молочных коров следует учитывать возможности увеличения выхода доступных для усвоения субстратов (аминокислот, глюкозы, ВЖК) за счет снижения распадаемости сырого протеина, крахмала в рубце, добавок кормового жира.

В результате проведенных исследований разработан проект норм потребности коров в энергетических субстратах:

- для коров с живой массой 450-500 кг, продуктивностью 20 кг молока/день в первые 120 дней лактации (табл. 6);

- для коров с живой массой 600-650 кг, продуктивностью от 25 до 35 кг молока/день в период 60-90 дней лактации (табл. 9).

Разработанные нормы потребности в энергетических субстратах являются логическим этапом развития принципов оценки питательности кормов и нормирования энергетического питания коров на основе обменной энергии и указывают на возможное совершенствование существующих детализированных норм, особенно для высокопродуктивных коров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В.И. Надальяк Е.А. Основные достижения в разработке принципов энергетического питания сельскохозяйственных животных. В сб. Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Боровск, 1991:12-24.
2. Агафонов В.И. Решетов В.Б. Структура фонда субстратов в желудочно-кишечном тракте у лактирующих коров. В сб. Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания с.-х. животных. Отчет ВНИИФБиП за 1990-1991 годы, Боровск, 1991: 103-104.
3. Агафонов В.И. Волобуев В.П. Методика расчета количества субстратов, образующихся в ЖКТ у коров. В сб. Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания с.-х. животных. Отчет ВНИИФБиП за 1992-1993 годы, Боровск, 1993: 148-148.
4. Агафонов В.И. Нормирование энергии у жвачных животных про принципу субстратной обеспеченности метаболизма. В сб. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Материалы II Международной конференции, Боровск, 1995: 97-105.

5. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П., Волобуева Р.А., Лазаренко В.П., Морозова Ю.А. Надальяк Е.А. Обеспеченность субстратами энергетических процессов у коров при различных уровнях кормления и продуктивности. В сб. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сб. трудов ВНИИФБиП, 1999: 375-384.
6. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Особенности использования энергии корма у коров в начальный период лактации. Тр. ВНИИФБиП, Боровск, 2000.39: 123-134.
7. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Методические указания, Боровск, 1986: 56 с.
8. Овчаренко Э.В. Физиологические основы питания и молокообразования у коров в ранний период лактации в связи уровнем и качеством энергии и протеина (Автореферат док. дисс.), 1990: 50 с.
9. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие М.: 2003: 456 с.
10. Физиологические потребности в питательных веществах и нормирование питания молочных коров. Боровск, 2000: 126 с.
11. Agenas S., Holtenius K., Jrenari M. and Burstedt E. Effects of Turnout to Pasture and Dietary Fat Supplementation of Milk Fat Composition and conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows. Doct. Thesis Swedish Univ. of. Agr. Sci., 2000: 25-33.
12. ARC. Energy allowances and feeding systems for ruminant. Refer.Book 433, London, 1988: 128 p.
13. Colin-Schoellen O., Jurjanz S., Laurent F. Metabolizable protein supply and restricted level of ruminally degradable nitrogen in total mixed ration: effect on milk production and composition and nitrogen utilization by dairy cows. Livestoc Production Science. 2000. 67: 41-53.
14. Petricova P. Principles of evaluation of Energy in Feed for Ruminants and of its utilization for Animal Products. J. of Farm Animal Sci. 2001. 34: 97-105.
15. Riis P.M., Danfaer A., Hvelpland T. et al. A model for the efficient use of new information within physiology, nutrition and breeding of dairy cows. Tryk. Frederiksberg Bogtrykneri a.s., 1990: 68 p.

ПОТРЕБНОСТЬ МОЛОЧНЫХ КОРОВ В МЕТИОНИНЕ И ЛИЗИНЕ В ПЕРВУЮ ФАЗУ ЛАКТАЦИИ

Л.В. Харитонов, О.Б. Брускова (ВНИИФБиП с-х.животных)
Ю.В. Сироткина, В.Н. Чичаева (Нижегородская ГСХА)

Изучение степени усвоения аминокислот и потребности в метионине и лизине молочных коров в первую фазу лактации методом инфузии препаратов метионина и лизина в двенадцатиперстную кишку, или путем скармливания защищенного от расщепления в рубце препарата метионина (смартамин), позволило уточнить нормы

потребности в аминокислотах, проверить и подтвердить их в производственных условиях на высокопродуктивных коровах.

Введение

Система питания высокопродуктивных коров на основе субстратного обеспечения метаболизма в организме этих животных, предусматривает установление потребности в отдельных субстратах, в том числе в аминокислотах, на основные функции организма животных. Применительно к лактирующим коровам предполагается поиск такого соотношения аминокислот и их уровня в крови, при котором бы наблюдалось эффективное использование аминокислот на образование компонентов молока и, в первую очередь, белка. Поступление аминокислот в кровь обеспечивается, в конечном итоге, набором кормов, включаемых в рацион животных.

Обеспечение организма животных аминокислотами складывается из количества и соотношения их в оттекающей от пищеварительного тракта крови, эффективности усвоения организмом, что в значительной мере зависит от уровня и доступности других метаболитов и субстратов, таких как сахара, липиды, витамины и минеральные вещества. Они изменяют эндогенную секрецию аминокислот, их метаболизм, величину кровотока в разных органах, сокращают или увеличивают использование аминокислот на энергетические цели.

В кишечник жвачных поступает смесь аминокислот, представленная белком микроорганизмов преджелудков, кормовым и эндогенным протеином. Микробный белок обеспечивает основное поступление аминокислот для организма животных, но высокопродуктивные коровы не могут удовлетворить продуктивные потребности в аминокислотах только за счет этого источника, поэтому возникает необходимость в скармливании таким животным белковых кормов с труднодеградируемым протеином или синтетических аминокислот (Новая система …,1998; Протеиновое питание…, 1998;Харитонов и др.,2001; Аитова, 1989; Guinard et al., 1994).

Нормы потребности молочных коров в отдельных аминокислотах, а также порядок их лимитирования имеют существенные колебания в системах питания для животных, принятых в разных странах. Это связано с различиями в подходах установления потребности, зависит от набора кормов и сбалансированности рационов по основным питательным веществам (Guinard et al., 1994; Bequette et al., 1998; Харитонов и др., 2003).

В связи с этим, основной задачей было уточнение потребности лактирующих коров в метионине и лизине в первую фазу лактации.

Материал и методы

Для выполнения поставленной задачи проведены две серии физиологических опытов на коровах в начале лактации в условиях вивария института методом периодов, а также научно-производственный опыт в учхозе НГСХА «Новинки» Нижегородской области.

В физиологических опытах использованы коровы по 2-3-й лактации, которым хирургическим путем были наложены канюли на рубец и двенадцатиперстную кишку, а также выведена под кожу сонная артерия. Канюли пищеварительного канала служили для инфузии отдельных субстратов и получения проб содержимого, а выведение сонной артерии под кожу позволяло получать артериальную («общую») кровь. Кроме того, у животных брали кровь из молочной вены и по артерио-венозной разности отдельных метаболитов судили о поглощении их выменем коров.

Первые 2 серии опытов проводили на фоне основного рациона, включающего около 50% концентрированных кормов и состоящего из 4,5 кг сена, 21 кг силоса, 7 кг комбикорма и 0,6 кг свекловичного жома. В состав комбикорма были включены ячмень – 45%, пшеница – 20, овес – 12, шрот соевый - 20, витаминно-минеральный премикс 1%.

Для уточнения потребности коров в метионине и лизине инфузировали препараты этих аминокислот в кишечник периодами по 5 дней в течение 12 часов в сутки (табл.1). На пятый день каждого периода у животных брали 2 раза в день пробы крови из сонной артерии и молочной вены для изучения уровня азотистых метаболитов – до утреннего кормления и через 3 часа после дневного кормления (через 8 ч после утреннего). Кормили коров в 8, 13 и 19 часов. Содержание животных привязное, поение – вволю из автопоилок.

В конце каждого периода в течение 2 суток собирали мочу, а во время основного контрольного периода, кроме того, собирали кал для вычисления баланса азота и переваримости питательных веществ.

Проводился учет молочной продуктивности и поедаемости кормов. Пробы кормов и молока анализировали на содержание общего азота, липидов и общих аминокислот, а в пробах цельной крови определяли содержание свободных аминокислот и мочевины. Методы анализа изложены в методических пособиях (Изучение пищеварения …, 1987; Методы биохим. анализа, 1997). Схема опытов представлена в таблице 1.

Таблица 1. ***Схема I и II серии опытов***

№ периодов	Периоды, вводимые вещества	
	I серия	II серия
1	Предварительный, ОР	Предварительный, ОР
2	ОР + Метионин, 10 г	ОР + Лизин, 10 г
3	ОР + Метионин 10 г + Лизин, 20 г	ОР + Лизин, 20 г
4	Контрольный ОР (балансовый опыт)	Контрольный ОР (балансовый опыт)

Производственная проверка уточненных норм аминокислотного питания проведена в учхозе «Новинки» Нижегородской области на 3-х группах коров, по 8 голов в каждой. При этом контрольная группа коров получала рацион, сбалансированный в соответствии с детализированными нормами (Нормы и рационы …, 1986). Животным 2-й группы с комбикормом задавали 10 – 12 г кормового метионина в защищенной форме (смартамин М) для доведения его уровня в рационе до уточненных нами норм. Через 2 месяца опыта добавку метионина увеличили до 18 г/сут, что по нашим расчетам превышало оптимальную потребность животных в этой аминокислоте. Коровам 3-й группы в течение всего опытного периода в рацион включали 250 г рыбной муки для оптимизации уровня обменного протеина, всасываемого лизина и других лимитирующих аминокислот.

Ежедекадно проводили контрольные дойки с анализом жира и белка в молоке. Через 1 и 2 месяца после начала опыта в крови яремной вены анализировали свободные аминокислоты и мочевину. Ежедекадно так же учитывали потребление корма и молочную продуктивность, один раз в две недели животных взвешивали. Опыты на виварии проводили совместно с сотрудниками других лабораторий института.

Статистическую обработку экспериментального материала проводили методом парных сравнений (Асатиани, 1965).

Результаты и обсуждение

Данные о молочной продуктивности коров по периодам опыта (1-я и 2-я серии) представлены в таблице 2.

При инфузии в кишечник коров 10 г метионина снизилась молочная продуктивность на 2,5 % и выделение белка с молоком на 5,5 % по сравнению с предварительным периодом, хотя это в определенной

Таблица 2. ***Молочная продуктивность коров***

Периоды опыта, вводимые вещества	Показатели продуктивности				
	удой, кг/сут	липиды, %	белок, %	выделено липидов, г	выделено белка, г

		I серия			
Предв. период, ОР	19,62	-	3,31	-	651
ОР + метионин	19,13	4,52	3,21	864	615
ОР + метионин + лизин	20,70	4,31	3,26	892	676
Контрольный период, ОР	20,50	4,41	3,30	901	672
		II серия			
Предв. период, ОР	19,6	-	3,1	-	605
ОР + лизин, 10 г	21,5	3,97	3,0	852	651
ОР + лизин, 20 г	21,3	3,56	3,17	746	671
Контрольный период, ОР	21,5	3,69	3,15	782	672

мере могло быть связано с процедурой инфузии. При сравнении с последующим контрольным периодом (балансовый опыт) в крови коров уровень свободных аминокислот был более высоким, в основном за счет валина и фенилаланина, а из заменимых – глицина и аланина (табл. 3).

Таблица 3. ***Концентрация свободных аминокислот в крови коров, мг%***

Амино-кислоты	Периоды опыта, вводимые вещества					
	I серия			II серия		
	метионин, 10 г	метионин + лизин	контроль	лизин 10 г	лизин 20г	контроль
Аспартат	1,34	0,95	1,18	1,14	1,34	1,16
Треонин	0,81	0,71	1,17	0,64	0,64	1,12
Серин	0,74	0,58	0,95	0,50	0,43	0,76
Глутамат	1,39	1,07	1,19	1,23	0,80	1,12
Глутамин	1,05	0,77	0,54	1,41	0,86	0,62
Глицин	2,82	3,25	2,66	3,46	3,26	2,48
Аланин	1,72	1,23	1,42	1,10	1,37	1,21
Цитруллин	0,86	0,78	0,79	0,89	1,00	0,79
Валин	2,01	2,06	1,79	1,87	1,84	2,02
Метионин	0,62	0,83	0,24	0,32	0,29	0,23
Изолейцин	1,16	1,31	1,29	1,13	1,48	1,24
Лейцин	1,28	1,18	1,55	1,59	1,55	1,43
Тирозин	0,79	0,74	0,86	0,83	0,81	0,68
Фенилаланин	0,88	0,89	0,56	0,88	0,85	0,68
Орнитин	0,53	0,65	0,80	0,89	0,86	0,79
Лизин	0,73	1,84	0,93	1,22	1,84	0,91
Гистидин	0,64	0,69	1,08	0,71	0,68	0,96
Аргинин	0,88	0,83	0,75	0,91	0,90	0,83

Концентрация метионина возросла в 3 раза. Сократилось поглощение молочной железой изолейцина, лейцина, фенилаланина, лизина и тирозина (табл. 4). Вместе с тем, не отмечено существенного изменения показателей азотистого обмена у животных опытной

группы: содержание мочевины в крови, а также выделение азота с мочой были сходными с контролем (табл. 5).

Таблица 4. ***Поглощение аминокислот молочной железой коров, г/час***

Амино-кислоты	Периоды опыта, вводимые вещества					
	I серия			II серия		
	метионин 10 г	метионин + лизин	контроль	лизин 10 г	лизин 20 г	контроль
Аспартат	0,60	0,52	0,60	0,36	1,00	0,64
Треонин	0,68	0,72	0,76	0,56	0,48	0,52
Серин	0,48	0,60	0,56	0,48	0,44	0,56
Глутамат	0,88	1,12	1,04	1,20	0,88	1,12
Глутамин	0,96	0,84	0,52	1,48	1,04	0,72
Глицин	0,68	0,64	0,64	0,76	0,56	0,60
Аланин	0,88	0,72	0,80	0,60	1,00	0,84
Валин	1,40	1,52	1,36	1,40	1,24	1,52
Метионин	0,64	0,80	0,48	0,56	0,44	0,40
Изолейцин	1,28	1,48	1,44	0,92	1,24	1,32
Лейцин	1,36	1,76	2,08	1,44	1,72	1,92
Тирозин	0,80	0,80	1,16	0,68	0,56	0,60
Фенилаланин	0,68	1,16	0,80	0,68	1,00	0,64
Лизин	1,00	1,72	1,36	1,52	1,92	1,44
Гистидин	0,60	0,60	0,56	0,56	0,36	0,52
Аргинин	1,56	1,44	1,68	1,48	1,32	1,56

Таблица 5. ***Концентрация мочевины в артериальной крови и выделение азота с мочой у коров (среднее за сутки)***

Показатели	Периоды опыта, вводимые вещества					
	I серия			II серия		
	метионин 10г	метионин + лизин	контроль	лизин 10 г	лизин 20 г	контроль
Мочевина крови, мг %	21,2	20,7	24,0	20,1	21,9	20,4
Азот мочи, г/гол/сут	114,1	126,2	123,3	117,1	118,6	115,2
% от принятого с кормом	28,6	31,4	30,9	29,3	29,5	28,8

Приведенные данные в определенной мере характерны для дисбаланса аминокислот в организме коров, возникшего под влиянием инфузии метионина сверх оптимальной потребности в нем, которая в этих условиях протеинового питания составляла около 30 г/сут на голову и была обеспечена за счет кормов рациона.

Таблица 6. ***Интенсивность поглощения свободных аминокислот молочной железой, %***

Амино-кислоты	Периоды опыта, вводимые вещества					
	I серия			II серия		
	метионин 10 г	метионин +лизин	контроль	лизин 10 г	лизин 20 г	контроль
Аспартат	11,2	13,7	12,7	7,9	18,6	13,8
Треонин	21,0	25,4	16,2	21,9	18,8	11,6
Серин	16,2	25,9	14,7	24,0	25,6	18,4
Глутамат	15,8	26,2	21,9	24,4	27,5	25,0
Глутамин	22,8	27,3	24,1	26,2	30,2	29,0
Глицин	6,0	4,9	6,0	5,5	4,2	6,0
Аланин	12,8	14,6	14,1	13,6	18,2	17,4
Цитруллин	4,6	3,8	6,3	3,9	8,0	7,6
Валин	17,4	18,4	19,0	18,7	16,8	18,8
Метионин	25,8	24,1	50,0	43,8	37,9	43,5
Изолейцин	27,6	28,2	27,9	20,4	20,9	26,6
Лейцин	26,6	37,3	33,5	22,6	29,0	33,6
Тирозин	25,3	27,0	33,7	20,5	17,3	22,0
Фенилаланин	19,3	32,6	35,7	19,3	29,4	23,5
Орнитин	16,9	16,9	15,0	13,4	23,2	16,4
Лизин	34,2	23,4	36,6	31,1	26,1	39,6
Гистидин	23,4	21,7	13,0	19,7	13,2	13,5
Аргинин	44,3	43,4	56,0	40,6	36,7	47,0

Добавление 20 г лизина к инфузируемому метионину в следующем периоде опыта привело к повышению удоя и выделению липидов и белка с молоком до уровня контрольного периода (табл. 2). При этом в крови снизился уровень главных глюкогенных аминокислот – глутамата, аланина, аспартата, а также ряда незаменимых аминокислот – треонина, лейцина и тирозина (табл. 3), что связано с усилением их использования молочной железой. Подтверждением этому служат показатели интенсивности поглощения (извлечения) этих аминокислот, величины поглощения (г/сут) и обеспеченности синтеза молочного белка (табл. 4, 6). В крови возросла концентрация свободного метионина и лизина, увеличилось поглощение этих аминокислот выменем, но интенсивность их поглощения снизилась (табл. 3, 4, 6). По сравнению с предыдущим периодом (инфузия 10 г метионина) повысилось на 10,6 % выделение азота с мочой, но мало отличалось от контрольного периода. При этом уровень мочевины в крови коров был ниже, чем в контроле и в период введения одного метионина (табл. 5).

Выявленные изменения молочной продуктивности и показателей обмена азота и аминокислот у коров при совместном введении в кишечник метионина и лизина могут быть расценены как частичное устранение дисбаланса аминокислот в организме, имевшего место при нагрузке метионином. Были созданы условия для проявления своего

действия обеих лимитирующих аминокислот – первой и второй. Вместе с тем, снижение уровня ряда заменимых аминокислот в крови может отражать недостаточное количество их для эффективного синтеза молочного белка, а также использование в реакциях глюконеогенеза в организме коров. Дополнительное поступление глюкозы или ее предшественников из пищеварительного тракта могло повысить эффективность использования инфузируемых метионина и лизина на синтез молочного белка.

Во второй серии опытов, проведенных на фистулированных коровах в условиях вивария, на фоне основного рациона животным инфузировали в кишечник разные дозы лизина – 10 и 20 г/сут для уточнения потребности в этой аминокислоте. Инфузия 10 г лизина увеличила выход молочного белка на 7,7 %, а 20 г – на 11 % по сравнению с предварительным периодом, достигнув уровня в контрольный период. Вместе с тем, не отмечено увеличения удоя и выделения липидов с молоком в период инфузии повышенной дозы аминокислоты (табл. 2), т.е. эффект снизился.

По сравнению с контрольным периодом (балансовый опыт) при введении 10 г или 20 г лизина в кишечник в артериальной крови коров повысилось содержание свободных аминокислот в основном за счет глутамата, глутамина и глицина, а также незаменимых – фенилаланина, тирозина, метионина, и естественно, лизина, причем с увеличением дозы вводимой аминокислоты ее уровень в крови нарастал в 1,5 раза (табл. 3). Возросла также концентрация аргинина, являющегося антагонистом лизина, и одного из продуктов его метаболизма – орнитина.

Под влиянием лизина (10 г) возросло поглощение молочной железой глутамата и глутамина, треонина, тирозина, фенилаланина и лизина. Эти показатели в основном снизились после увеличения дозы вводимого лизина.

Уровень мочевины в крови коров и выделение азота с мочой во все периоды опыта были сходными (табл. 5), что подтверждает высокую эффективность использования азотистых веществ в организме коров при добавке лизина и позволяет уточнить потребность подопытных животных в этой аминокислоте. Расчеты показали, что в доступном для всасывания белке должно содержаться 7,3 % лизина, или 3,5 г доступного лизина на 1 кг молока, вместо 2,95 г, предусмотренных существующими нормами (Новая система протеинового питания, 1998).

Для проверки уточненных норм метионина и лизина проведен научно-производственный опыт в учхозе «Новинки» Нижегородской области на коровах с 30-го по 90-й день лактации. Основной рацион был сбалансирован в соответствии с детализированными нормами и

включал сено 4 кг, сенаж 20 кг, кормовую свеклу 15 кг, комбикорм 13,5 кг (на корову с удоем 30 кг/сут).

Повышение уровня метионина в рационе коров до 2,3 % в составе обменного протеина, за счет добавки 12 г защищенного препарата метионина (смартамин М), привело к повышению молочной продуктивности коров в среднем на 1,1 кг в сутки за 2-месячный период опыта при увеличении жирности молока на 0,2 абс. % по сравнению с исходным периодом (табл. 7). При этом продукция молочного жира возросла на 9,8 %, а в сравнении с контрольной группой на 7,0 %. Дальнейшее увеличение дозы препарата метионина до 18 г в сутки на корову (II период) несколько снизило удой молока по сравнению с контролем, но разница в количестве молочного жира осталась прежней, за счет повышения жирности молока у коров опытной группы на 0,12 абс.%. Можно считать, что использованная доза метионина была предельной.

Включение в рацион коров (3-я группа) 250 г рыбной муки повысило среднесуточный удой на 1,2 кг и продукцию молочного жира на 10,9 % за 2-месячный период опыта по сравнению с исходной продуктивностью, и на 8,1 % против контроля (табл. 7). За счет введения в рацион рыбной муки на 7 % был увеличен уровень обменного протеина, а также потенциально лимитирующих аминокислот (лизина, метионина, гистидина и др.).

Таблица 7. ***Молочная продуктивность коров в учхозе «Новинки»***

Показатели	Группы коров		
	контрольная, ОР	ОР + метионин	ОР + рыбная мука
	Первый период		
Удой в начале опыта, кг/сут	29,8	30,1	29,6
Жирность молока, %	3,61	3,69	3,67
Продукция жира, г/сут	1076	1107	1086
Среднесуточный удой за 2 мес, кг/сут	30,02	31,2	30,8
Средняя жирность молока, %	3,66	3,89	3,91
Продукция жира, г/сут	1106	1214	1205
	Второй период		
Среднесуточный удой, кг/гол	27,9	27,2	27,5
Жирность молока, %	3,75	4,13	3,95
Продукция жира, г/сут	1048	1122	1086

Анализ крови подопытных коров показал, что скармливание метионина в первый период опыта привело к некоторому снижению уровня свободных аминокислот в крови в основном за счет валина, изолейцина, лейцина, тирозина, лизина и аргинина (табл. 8), что связано, вероятно, с их использованием на синтез молочного белка. Содержание свободного метионина возросло на 50 %. Низкий уровень

мочевины в крови (-30 % по сравнению с контролем), а также повышение молочной продуктивности позволяют считать, что использование аминокислот на синтез белка в организме коров, в том числе в молочной железе, было эффективным.

Таблица 8. ***Свободные аминокислоты крови коров, мг % (учхоз «Новинки»)***

Амино-кислоты	Группы коров					
	Контроль ОР		ОР + метионин		ОР + рыбная мука	
	I период	II период	I период	II период	I период	II период
Аспартат	1,69	3,40	1,50	2,90	1,43	2,95
Треонин	0,40	1,14	0,38	1,28	0,38	0,93
Серин	0,46	0,69	0,50	0,95	0,45	0,48
Глутамат	1,63	1,19	1,65	0,88	1,38	0,80
Глутамин	0,66	0,78	0,64	0,83	0,54	0,79
Глицин	5,20	2,25	4,95	2,94	4,03	2,70
Аланин	0,89	1,49	1,02	1,72	1,18	1,24
Цитруллин	0,56	0,64	0,39	0,71	0,48	0,80
Валин	1,53	2,37	1,32	2,25	1,46	1,89
Метионин	0,18	0,24	0,25	0,68	0,16	0,30
Изолейцин	0,54	1,48	0,48	1,57	0,42	1,00
Лейцин	0,73	1,28	0,61	1,66	0,58	1,10
Тирозин	0,79	0,98	0,59	1,18	0,60	0,83
Фенилаланин	0,48	0,65	0,42	0,87	0,41	0,71
Орнитин	0,50	0,92	0,38	1,23	0,43	0,64
Лизин	0,80	1,09	0,64	1,55	0,78	1,56
Гистидин	0,70	1,00	0,59	1,13	0,63	0,71
Аргинин	0,58	0,79	0,42	0,93	0,47	0,68
Сумма	18,32	22,38	16,73	25,26	15,81	20,11

В период скармливания повышенной дозы препарата метионина в крови у коров увеличилось содержание свободных аминокислот как по сравнению с I периодом, так и с контрольной группой (табл. 8). Возрос уровень лейцина, фенилаланина, лизина и особенно метионина (в 3 раза против контроля), что позволяет предполагать ухудшение использования этих аминокислот в синтетических процессах. Вместе с тем, не отмечено повышения уровня мочевины в крови и существенного снижения молочной продуктивности коров. Вероятно скармливаемое количество препарата метионина явилось предельной дозой, обеспечивающей потребность коров в данных условиях кормления в этой аминокислоте. Следует отметить улучшение воспроизводительной функции у коров опытной группы: сервис – период оказался меньше на 17 дней, или на 22 % по сравнению с контрольной группой (77 дней и 94 дня).

При включении в рацион коров рыбной муки в крови животных отмечен самый низкий уровень свободных аминокислот среди животных 3-й группы в оба периода опыта, обусловленный, по-видимому, интенсивным использованием аминокислот на образование

молока (табл. 8). Показатель концентрации мочевины в крови был ниже, чем у контрольных животных на 15,7 %. Относительное содержание отдельных аминокислот при этом изменилось незначительно, кроме увеличения % аланина, валина и снижения доли лейцина и тирозина. Таким образом, повышение количества обменного протеина в рационе коров за счет скармливания рыбной муки, содержащей протеин с низкой распадаемостью и с повышенным уровнем незаменимых лимитирующих аминокислот, улучшает обменные процессы в организме животных, повышает эффективность использования аминокислот на синтез компонентов молока и молочную продуктивность коров.

Обращает на себя внимание различие в действии сходной по величине дозы метионина, задаваемого коровам в опыте на фистулированных животных и в научно-производственном опыте. В последнем случае не отмечено отрицательного влияния на продуктивность коров скармливания 18 г смартамина, содержащего 12,6 г чистого метионина, в то время как инфузия в кишечник 10 г метионина уменьшила выделение молока и снизила эффективность использования аминокислот. В этих опытах продуктивность коров была почти в 1,5 раза ниже, чем у животных подопытных групп в учхозе «Новинки» и поэтому потребность в метионине была более низкой. Следует также учесть, что суточную дозу метионина инфузировали в течение 12 часов, таким образом, фактическая нагрузка аминокислотой в этот период возрастала в 2 раза.

Заключение

На оперированных коровах в первую фазу лактации изучены обмен аминокислот и обеспеченность ими организма животных для продукции компонентов молока при инфузии в кишечник метионина, лизина и гистидина с целью уточнения потребности коров в этих аминокислотах. Установлено, что оптимальная потребность коров в этот период составляет 2,3 % по метионину и 6,8 % по лизину от уровня обменного протеина.

Уточненные нормы потребности в лимитирующих аминокислотах для коров проверены и подтверждены в производственных условиях на высокопродуктивных коровах в учхозе «Новинки» Нижегородской области. Проведенный научно-производственный опыт показал целесообразность регулирования уровня легко- и труднораспадаемого протеина и незаменимых лимитирующих аминокислот в рационе лактирующих коров, особенно в период интенсивной лактации, когда повышена потребность организма в аминокислотах для синтеза белков молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, 1998: 105с.
2. Протеиновое питание молочных коров. Рекомендации по нормированию. Боровск, 1998: 28с.
3. Изучение пищеварения у жвачных. Методические указания. Боровск, 1987.
4. Методы биохимического анализа (справочное пособие). Боровск, 1997
5. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М,: 1965.
6. Аитова М.Д. Аминокислотная питательность кормов для жвачных животных и методы ее определения. Протеиновое питание и продуктивность жвачных животных. Сб. научных трудов. Боровск, 1989, 36: 110 – 118.
7. Харитонов Е.Л., Кальницкий Б. Д. Нормирование питания жвачных животных на принципах субстратной обеспеченности метаболизма. Материалы 3 Междунар. конф. «Актульные проблемы биологии в животноводстве». Боровск, 2001: 10 – 20.
8. Харитонов Е.Л., Харитонов Л.В. Физиологическое обоснование использования белковых кормов в питании молочного скота. Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Калуга, 2003, 5: 283 – 287
9. Guinard J., Rulquin H. Effects of graded amounts of duodenal infusions of lysine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. J. Dairy Sci., 1994, 77(12): 3565 – 76.
10. Bequette B.J., Backwell F.R.C. and Crompton L.A. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. J. Dairy Scie., 1998, 81, 9: 2540 – 2559.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА РАЦИОНА НА СКОРОСТЬ РАСПАДА СЫРОГО ПРОТЕИНА КОРМОВ

Е.Л. Харитонов, Н.Д. Мысник, Н.Н. Семина, И.А. Долгов

Лаборатория пищеварения

В опытах на коровах холмогорской породы установлено, что в зависимости от состава рациона, на фоне которого определяется распадаемость сырого протеина кормов методом in sacco, *получаемые показатели могут различаться. Наибольшие различия имеют место на рационах с разным уровнем потребления сухого вещества, и на рационах, благоприятствующих или нет целлюлозису в рубце. В связи с этим на таких рационах предлагается введение поправочных коэффициентов для показателя распадаемости протеина. Учет этих факторов, влияющих на распадаемость СП кормов, позволяет получать более точные значения показателя распадаемости СП кормов.*

Введение

Инкубация образцов корма в рубце животных, содержащихся в определенных условиях, позволяет получать показатели, характеризующие потенциальную способность этих кормов к перевариванию (Alderman, 1986). Это показатели растворимости, распадаемости и скорости распада. Однако, как было отмечено многими исследователями (Ganev, 1979; Lees, 1988; Newbold, 1988), при инкубации одного и того же корма в рубце животных, содержавшихся на рационах разного состава, эти показатели могут различаться. Если показатели растворимости и потенциальной распадаемости имеют относительно небольшие колебания, то, как было отмечено рядом авторов (Ерсков, 1985; Курилов, 1987), скорость распада подвержена наибольшему влиянию. Впервые это было замечено в опытах Ганева (1979) при содержании животных на рационах с преобладанием грубых кормов и концентратов. На рационе из грубых кормов сырой протеин (СП) растительных кормов имел более высокие скорости распада. Это явление не распространялось на корма животного происхождения. Было сделано предположение о зависимости скорости распада СП растительных кормов от целлюлозолитической активности рубцового содержимого. В исследованиях с инфузией бикарбоната натрия в рубец (Newbold, 1988) получены данные о возможности изменения скорости распада СП и кормов животного происхождения. К настоящему времени известен факт увеличения скорости распада СП при скармливании гранулированных кормов (Lees, 1988), скорости распада органического вещества (ОВ) (Thomson, 1972) и нейтрально- детергентной клетчатки (НДК) (Lees, 1988).

Поскольку нормирование протеинового питания высокопродуктивных коров осуществляется по показателям распадаемого и нераспадаемого протеина в кормах рациона, целью нашей работы являлось изучение влияния факторов кормления на скорость распада СП и, по возможности, выявление закономерностей и механизма этого влияния. В задачи исследований входило изучение влияния уровня кормления, типа, состава рациона и комбикормов и стадии лактации на распадаемость сухого вещества (СВ) и сырого протеина (СП) основных зерновых, белковых и грубых кормов.

Материал и методы

Опыты, направленные на решение поставленных задач, заключались в определении фракционной скорости распада кормов при скармливании коровам различных по составу рационов.

Для решения поставленных задач проводили опыты методом групп-периодов (по 3 головы в группе) на виварии института на коровах холмогорской породы в разной стадии лактации и на различных рационах. Все коровы имели фистулы рубца и 12- перстной кишки. Инкубацию образцов корма в рубце коров проводили методом in sacco (Orskov, 1977). Кормление коров трехразовое, равными порциями в 8, 13 и 20 часов. Поение из автоматических поилок. Инкубацию в рубце проводили в течение 12 ч для концентрированных кормов и в течение 24 ч для грубых. Для характеристики ферментативных и микробиологических процессов в рубце брали пробы рубцового содержимого за 1 час до утреннего кормления и через 3 и 5 ч после него. Во время опытов определяли потребление кормов. Фон рубцовой ферментации фиксировали по активности рубцовой микрофлоры (амилолитической и целлюлозолитической), количеству бактерий и инфузорий (Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных, 1977), концентрации основных конечных метаболитов (ацетата, пропионата, бутирата, NH_3, pH) (Изучение пищеварения у жвачных, 1987). Математическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (Лакин, 1982).

Результаты и обсуждение

Сравнение степени ферментации СВ и СП разных кормов на двух рационах, различающихся уровнем потребления СВ кормов (1-й рацион-14кг СВ, 2-й – 11кг СВ) показало, что на первом рационе СВ и СП почти всех кормов распадались значительно интенсивнее, чем на втором рационе в среднем на 10-15% для СП и 5-10% для СВ (табл.1). В то же время для некоторых кормов (ячмень и сено разнотравное) изменений в скорости распада не было обнаружено. Этот факт можно объяснить или незначительным содержанием в данных кормах нерастворимой распадаемой фракции, или высокой скоростью распада этой фракции, увеличить которую за счет усиления микробиологических процессов не представляется возможным. Для кормов с высокой долей распадаемой фракции и низкой скоростью распада (соевый шрот, сено, глютен, комбикорм) происходили наиболее существенные изменения (от 15 до 30% распадаемости) с увеличением уровня потребления СВ (табл.1). Таким образом, увеличение уровня потребления кормов рационов может приводить к

усилению микробной активности, что для большинства кормов сопровождается повышением скорости распада СВ и СП. Это касается как отдельных концентрированных кормов, так и комбикормов, и как грубых кормов. Однако, увеличение степени распада СВ и СП для разных кормов может быть различным, в зависимости от доли нерастворимой распадаемой фракции и скорости ее распада. Так, относительно небольшое увеличение распада СП силоса связано с невысоким содержанием распадаемой фракции (15%), за счет большой доли растворимой (55%), а у разнотравного сена по той же причине, но за счет высокой доли недоступной фракции (35%). Небольшое влияние на распад СП ячменя связано с высокой скоростью распада нерастворимой распадаемой фракции (7%/ч).

Таблица 1. ***Распадаемость в рубце СВ и СП кормов в зависимости от уровня потребления СВ (сено-силосно-концентратный рацион, 50% конц. кормов по питательности)***

Распадаемость кормов	1 рацион (14кг СВ)		2 рацион (11кг СВ)		% 2 к 1	
	СВ	СП	СВ	СП	СВ	СП
Гречневые отруби	50,9±1,6	61,2±1,2	48,8±1,3	50,4±1,1	95,5	82,3
Глютен 1 (23%СП)	54,4±2,2	68,6±1,6	51,1±1,8	61,5±1,3	93,9	89,5
Глютен 2 (63%СП)	23,9±1,3	14,8±1,0	12,4±0,9	1,97±0,3	51,8	13,2
Зародыши кукурузы	84,9±2,3	84,6±1,9	77,6±1,9	74,9±1,3	91,4	88,5
Шрот рапсовый	67,3±1,8	72,2±1,5	61,0±1,3	62,8±1,1	90,6	86,9
Комбикорм с высокой распадаемостью	76,6±1,6	70,2±1,2	69,2±1,5	60,7±1,0	96,4	83,6
Комбикорм с низкой распадаемостью	75,1±1,6	39,8±0,9	72,4±1,9	33,3±1,2	90,3	86,4
Шрот соевый	65,9±2,3	58,9±2,0	53,5±1,6	41,7±1,3	81,1	70,8
Ячмень	81,0±0,9	78,2±0,6	80,1±1,6	76,4±1,1	98,8	97,7
Сено овсяное	60,6±2,3	42,0±1,9	54,2±1,6	24,0±1,2	89,4	57,1
Сено разнотравно-злаковое	62,5±1,3	38,9±1,0	59,0±1,9	37,8±1,6	94,4	97,1
Силос разнотравный	68,2±0,9	58,5±0,6	65,0±1,5	51,4±1,1	95,3	87,8

Повышение скорости распада СП, при увеличении уровня потребления СВ, можно предположительно связать с естественным отбором микроорганизмов рубца, обладающих повышенной скоростью роста и более высокой метаболической активностью.

Тип рациона не оказал выраженного достоверного влияния на распадаемость протеина кормов (табл.2). Изменения распадаемости СВ

и СП для всех кормов носили незакономерный и недостоверный характер. Так, если распадаемость СП соевого шрота была наивысшей на сено-силосно-концентратном рационе (58,9%), то для СП ячменя - на силосно-концентратном (87,3%). Таким образом, значения скорости распада для различных кормов можно применять для всех типов рационов.

Таблица 2. ***Распадаемость в рубце СВ и СП кормов в зависимости от типа рациона (50% конц. кормов по питательности при потреблении 13,5кг СВ)***

Корма		Рационы		
		сено-силосно-конц.	силосно-конц.	сено-конц.
Комбикорм с высокой распадаемостью	СВ	76,6±2,6	79,2±2,2	
	СП	70,2±1,1	84,9±2,6	
Комбикорм с низкой распадаемостью	СВ	75,1±1,9	76,1±1,3	
	СП	39,8±1,6	44,4±1,2	
Глютен (63%СП)	СВ	23,9±2,2	12,9±1,9	11,8±0,9
	СП	14,8±1,6	5,54±1,3	9,5±0,6
Глютен (23%СП)	СВ	54,4±1,1	52,1±1,6	
	СП	68,6±0,6	71,8±1,3	
Шрот подсолн.	СВ	-	64,0±0,9	63,1±0,8
	СП	-	73,7±0,6	76,6±0,5
Шрот соевый	СВ	65,9±2,3	57,0±1,6	61,2±1,3
	СП	58,9±1,6	46,3±1,3	49,6±0,9
Ячмень	СВ	81,0±1,3	85,2±1,6	82,8±1,2
	СП	78,2±1,2	87,3±1,3	85,6±1,0
Сено овсяное	СВ	60,6±1,1	60,9±1,3	59,3±0,9
	СП	42,0±0,6	38,9±0,9	35,7±0,6
Сено разнотравно-злаковое	СВ	62,5±1,6	63,7±1,3	64,9±2,0
	СП	38,9±1,1	31,9±1,1	26,3±1,6
Силос разнотравный	СВ	68,2±1,6	69,6±1,4	69,4±1,3
	СП	58,5±1,3	48,5±1,3	52,4±1,2

В то же время, как показали проведенные исследования, показатели распадаемости могут значительно изменяться в зависимости от структуры рациона (табл.3). При повышении доли концентратов в рационе происходило снижение показателя pH рубцовой жидкости и увеличение содержания бактерий (табл.4). В результате этого скорость распада СВ и СП снижалась от 5 до 30%. На рационе из грубых кормов (сено, силос), с уровнем 35% концкормов по питательности, распадаемость фракций клетчатки грубых кормов

низкого качества снижалась на 50%. При этом распадаемость СП в среднем повысилась для большинства исследованных кормов на 10%, а крахмала на 3-5%.

Высококонцентратный рацион (61% комбикорма по питательности) приводил к заметному снижению pH рубца, увеличению концентрации ЛЖК и аммиака, доли пропионата, при сохранении уровня целлюлозолитической активности. На этом фоне происходило снижение распадаемости СП большинства кормов на 10%, повышение распадаемости крахмала на 3-5% и снижение распадаемости фракций клетчатки для некачественных грубых кормов на 50%. Наибольшее изменение распадаемости СП отмечено для кормов с высоким содержанием клеточных стенок в составе зерна (ячмень, овес, сено, силос). Но для основных белковых кормов значительных достоверных изменений не обнаружено.

Таблица 3. ***Распадаемость в рубце СВ и СП кормов в зависимости от структуры рациона (сено- силосно- концентратные, при потреблении 16,5кг СВ)***

Корма		Рационы		
		35% концентратов	50% концентратов	65 % концентратов
Ячмень	СВ	75,6±3,1	69,0±2,5	67,3±2,3
	СП	79,7±2,6	73,1±1,6	60,9±1,9
Овес	СВ	79,8±2,0	75,0±1,6	64,2±2,5
	СП	82,9±1,9	77,9±1,8	55,4±1,6
Пшеница (мягкая)	СВ	83,5±3,3	61,4±3,6	77,6±2,2
	СП	81,2±2,5	61,4±2,9	66,9±1,6
Пшеница (твердая)	СВ	81,9±3,2	75,1±4,1	78,3±2,3
	СП	79,7±3,0	73,1±3,2	72,4±2,0
Кукуруза	СВ	37,7±1,5	28,9±2,5	41,1±1,6
	СП	31,1±1,3	25,0±2,1	23,1±1,8
Отруби пшеничные	СВ	61,7±2,2	56,6±3,1	60,7±1,4
	СП	80,9±2,8	71,1±3,1	78,4±1,1
Подсолнечный шрот	СВ	54,0±1,6	57,8±1,2	55,9±1,6
	СП	73,3±1,3	75,5±1,1	72,7±1,1
Соевый шрот	СВ	53,8±1,4	51,4±1,5	51,5±2,3
	СП	30,5±1,2	23,7±1,3	26,0±1,8
Соевые бобы	СВ	71,5±1,0	68,6±1,1	64,4±2,0
	СП	72,0±0,9	68,0±1,0	60,4±1,3
Сено козлятника	СВ	47,8±2,0	51,5±2,6	45,4±1,6
	СП	46,7±1,6	44,5±1,3	37,6±1,3
Силос разнотравный	СВ	36,9±2,6	56,9±3,2	37,5±1,9
	СП	27,1±2,0	54,9±2,9	29,9±1,6
Сено разнотравное	СВ	41,0±3,1	58,8±2,3	35,4±2,6
	СП	35,2±2,2	42,2±1,6	30,3±1,3

По-видимому, на рационах с пониженной долей концентратов обеспечивались более благоприятные условия для целлюлозолитических бактерий, что увеличивало доступность белков для действия протеолитических ферментов микроорганизмов (табл.4).

Таблица 4. ***Среднесуточные показатели микробиологических процессов в рубце коров в зависимости от структуры рациона***

n рационов	pH	Число бактерий, млрд/мл	Число инфузорий, тыс/мл	Амилолит. активность, Е/мл	Целлюлоз. активность, %
35% концентратов	6,55±0,01	7,92±0,24	145,5±3,37	29,8±0,55	12,9±0,30
50% концентратов	6,74±0,07	8,41±0,13	191,6±13,7	26,9±0,19	14,5±0,42
65% концентратов	6,06±0,15	9,52±0,61	152,2±11,47	37,0±0,81	14,6±0,35

Полученные данные свидетельствуют, что показатели распадаемости протеина зерновых и грубых кормов, полученные в стандартных условиях (уровень кормления поддерживающий, содержание концентратных кормов 50% по питательности) при использовании рационов с низкой долей концентратов (30-35% по питательности) следует повышать на 10%, а при использовании высококонцентратных рационов (60-65% по питательности) занижать на 10%.

В связи с полученными данными об увеличении распадаемости при увеличении потребления кормов и соответственно скорости эвакуации кормовых частиц из преджелудков, такое же явление можно было ожидать при снижении доступности белков к распаду за счет использования труднораспадаемых естественных кормов. Опыты заключались в инкубации в рубце кормов при использовании в кормлении комбикормов, различающихся по степени распада СП. Проведенные исследования показали, что распадаемость СВ и СП отдельных кормов не зависела от распадаемости СП комбикорма рациона (табл.5).

Источник крахмала в составе комбикорма также незначительно влиял на распадаемость СВ и СП (табл.6). На настоящий момент общепринято, что в процессах распада протеина и фракций клетчатки определяющее значение имеет pH среды, от которой во многом зависит оптимальность целлюлозолитических процессов в преджелудках.

Изменения в составе комбикорма не приводили к изменению микробиологических и ферментационных показателей в преджелудках. Рацион с комбикормом на ячменной основе, при уровне 50% концентратов по питательности, обеспечивал оптимальные процессы целлюлозиса и его замена на комбикорм на кукурузной основе не приводила к улучшению микробиологических показателей и на этом фоне показатели распадаемости протеина, фракций клетчатки и крахмала отдельных кормов значительно не различались.

Таблица 5. ***Распадаемость в рубце СВ и СП кормов в зависимости от распадаемости СП комбикорма рациона (сено-силосно-концентратный рацион, 50% конц. кормов по питательности)***

Корма		Рацион			
		сено-силосно-концентратный 16,5 кг СВ		сено-концентратный, 16,5 кг СВ.	
		комбикорм с низкой распадаемостью СП (63,6%)	комбикорм с высокой распадаемостью СП (84,5%)	комбикорм с низкой распадаемостью СП (43,2%)	комбикорм с высокой распадаемостью СП (77,7%)
Соевый шрот	СВ	76,3±1,2	76,6±1,5	53,5±2,6	61,2±2,6
	СП	73,5±1,1	72,3±1,8	28,6±2,8	49,6±2,4
Подсолнечный шрот	СВ	54,2±2,5	52,6±1,9	62,6±1,3	63,1±1,3
	СП	91,1±1,8	86,6±1,3	70,9±1,5	76,6±1,5
Зерносмесь	СВ	76,5±1,6	76,6±1,6		
	СП	91,4±1,8	89,1±1,0		
Кукуруза	СВ	39,9±1,1	50,1±2,3		
	СП	28,1±0,9	41,6±2,2		
Сено разнотравно-злаковое	СВ	54,0±1,3	53,9±1,3	63,2±1,3	64,9±1,2
	СП	44,5±1,5	36,5±1,6	29,5±1,3	26,3±1,1
Силос разнотравный	СВ	61,8±1,9	60,8±1,6	61,3±1,2	69,4±1,0
	СП	68,5±2,2	68,9±1,3	44,3±2,3	52,4±0,9
Комбикорм с низкой распадемостью	СВ	66,9±1,6	72,5±1,8		
	СП	63,6±1,3	75,4±1,6		
Комбикорм с высокой распадаемостью	СВ	71,3±1,8	72,3±1,2		
	СП	77,6±1,6	84,5±1,4		
Глютен (63%СП)	СВ			12,7±1,3	11,8±0,3
	СП			2,43±1,5	9,52±0,6
Ячмень	СВ			80,1±1,2	82,8±1,2
	СП			77,2±1,1	85,6±1,1

Обогащение комбикорма кормовым жиром до уровня 4,7% в рационе, за счет введения его в комбикорм (около 200г), также не привело к заметным изменениям ферментолиза. Отмечено снижение целлюлозолитической активности, в результате которой произошло снижение распада СВ, протеина и фракций клетчатки у кормов с низкой потенциальной скоростью распада (ячмень, овес, подсолнечный шрот, силос разнотравный, сено злаковое), но не повлияло на корма с более высокой потенциальной распадаемостью (пшеница, соевый шрот, отруби пшеничные, соевые бобы, сено козлятника восточного). Так же не отмечено изменения распадаемости крахмала этих кормов.

Таблица 6. ***Распадаемость в рубце СВ и СП кормов в зависимости от состава комбикорма, % (сено-силосно-концентратный рацион, 50% конц. кормов по питательности*****)**

Корма		Рационы сено- силосно – концентратные (50% конц. по питательности) 16,5кг СВ		
		комбикорм на основе ячменя	комбикорм на основе кукурузы	комбикорм на основе ячменя и жира
Ячмень	СВ	69,0±4,1	66,2±3,3	70,3±2,1
	СП	73,1±3,7	61,6±3,4	65,2±2,1
Овес	СВ	75,0±7,0	72,3±4,4	69,2±3,0
	СП	77,9±4,5	73,5±3,9	65,0±2,9
Пшеница (мягкая)	СВ	61,4±5,4	55,0±5,1	80,6±2,1
	СП	61,4±3,8	55,4±4,5	77,4±2,0
Пшеница (твердая)	СВ	75,1±3,0	77,6±2,3	84,3±3,4
	СП	73,1±2,2	74,3±1,9	85,9±3,0
Кукуруза	СВ	28,9±1,9	30,5±3,5	40,0±4,2
	СП	25,0±1,2	26,0±1,9	43,3±3,6
Отруби пшеничные	СВ	56,6±1,4	58,2±4,4	64,3±1,9
	СП	71,1±1,3	73,8±3,2	78,1±1,2
Подсолнечный шрот	СВ	57,8±1,8	55,2±4,8	51,2±3,3
	СП	75,5±1,4	71,0±3,6	62,4±2,6
Соевый шрот	СВ	51,4±1,4	47,3±1,9	50,9±1,7
	СП	23,7±1,0	18,8±1,5	23,0±1,2
Соевые бобы	СВ	68,6±3,5	69,8±4,9	72,4±3,6
	СП	68,0±2,6	68,2±3,9	70,3±2,9
Сено козлятника	СВ	51,6±1,9	50,2±1,8	53,2±2,9
	СП	44,5±1,3	56,2±1,1	47,0±1,8
Силос разнотравный	СВ	56,9±2,1	43,6±1,1	46,6±1,1
	СП	53,0±1,8	49,0±0,89	46,3±1,0
Сено разнотравное	СВ	53,1±3,6	47,5±1,6	45,2±1,4
	СП	34,2±2,6	31,6±1,1	27,6±0,9

Результаты этих исследований показали, что жир в рационе (в изученных диапазонах) не оказал влияния на показатели распадаемости СП различных групп кормов. При составлении рационов,

предусматривающих введение животных жиров в количестве до 4,5% от СВ, можно использовать стандартные значения показателей распадаемости СП.

Одним из важных факторов, определяющих ферментативные процессы в рубце и уровень потребления корма, является стадия лактации. В связи с этим изучали зависимость характеристик распада протеина кормов по стадиям лактации. Исследования выполнены на коровах с 10 по 160 день лактации. Как показали результаты, при инкубации корма в разные дни лактации, начиная с 60-го дня различий в распаде СП не обнаружено (табл.7).

Таблица 7. ***Распадаемость СП различных кормов в рубце в зависимости от стадии лактации (сено-силосно-концентратный рацион, 60% конц. кормов по питательности, потребление 17,5кг СВ)***

Корма	Дни лактации			
	10	65	100	160
Пивная дробина	66,5±1,2	71,3±2,0		
Соевый шрот	32,7±1,8	51,4±1,6	49,0±1,7	43,4±2,2
Подсолнечный шрот		72,3±1,6	72,2±1,6	80,8±1,5
Кукуруза		15,9±1,2	14,9±1,3	12,8±0,8
Кукурузный шрот	42,9±1,7	80,8±2,3		
Свекловичный жом	16,7±1,0	56,0±1,4		
Пшеница		88,1±2,2	83,0±1,8	83,7±1,3
Ячмень		79,9±1,8	86,2±2,2	79,1±1,4
Сено		36,0±2,3	24,0±1,6	27,2±2,5
Силос		61,0±1,2	63,0±1,8	59,8±1,8

В то же время у коров на 10-м дне лактации, на аналогичных рационах, распадаемость СП ряда кормов была значительно ниже, например для соевого шрота на 80%. Это указывает, что в самом начале лактации у коров происходит только становление нормальной ферментации и в этот период рационы должны состоять из кормов с повышенной доступностью к перевариванию в рубце, а перевод на обычные рационы должен быть плавным, без использования труднораспадаемых видов белковых кормов в этот период.

Данные корреляционного анализа также свидетельствуют о том, что величину распада растительных кормов в значительной мере обуславливает целлюлозолитическая активность рубцового содержимого. Возрастание целлюлозолитической активности с увеличением скорости оттока сенных частиц является компенсаторным и адаптационным проявлением со стороны рубцовой микрофлоры, направленным на поддержание постоянного снабжения их энергией и субстратами за счет распада СП и НДК.

Результаты проведенных опытов показали, что распадаемость СП различных кормов определяется его свойствами, активностью

рубцовой среды и средним временем задержки частиц корма в преджелудках. Корма с высокой долей растворимого СП, с быстрой потенциальной скоростью распада, или с медленной скоростью распада имеют более постоянную распадаемость СП, которая в меньшей степени зависит от факторов кормления и содержания. Распад кормов, содержащих в своих стенках относительно высокое количество НДК, будет определяться целлюлозолитической активностью рубцового содержимого. В то же время скорость оттока частиц корма из рубца оказывает наибольшее влияние на распадаемость СП кормов с высоким содержанием нерастворимой распадаемой фракции и низкой потенциальной скоростью распада СП.

Установлено, что состав рациона оказывает влияние на показатели распадаемости СВ и СП в рубце. Установлена зависимость между распадаемостью СВ всех видов кормов в рубце ($r=0,83;p<0.05$) и распадаемостью СП и крахмала ($r=0,86;p<0.05$) и между СП и крахмалом ($r=0,92;p<0.05$). Для грубых кормов отмечена зависимость уровня распада СВ и СП ($r=0,71;p<0.05$), СВ и НДК ($r=0,95;p<0.05$), СВ и КДК ($r=0,84;p<0.05$), СП и НДК ($r=0,7;p<0.05$), СП и КДК ($r=0,74;p<.05$), НДК и КДК ($r=0,93;p<0.05$). При составлении рационов следует применять значения показателей распадаемости, полученные на том же типе рациона, который предполагается использовать.

При изменениях в составе рациона, приводящих к модификации ферментативных и микробиологических процессов, скорость распада СВ и СП различных кормов может варьировать. При этом наименьшим вариациям подвержены корма с относительно низким содержанием нерастворимой распадаемой фракции (подсолнечный шрот, силос), высокой скоростью распада этой фракции (ячмень) или низкой скоростью распада СП (сено овсяное, сено разнотравное). Пределы колебаний степени распада для этих кормов составляют ± 10 абсолютных %. Корма с высоким содержанием нерастворимой распадаемой фракции и средней скоростью распада обладают большей способностью к изменению скорости распада (соевый шрот от 28 до 58%).

Учет этих факторов кормления, влияющих на распадаемость СП кормов, позволяет получать объективные показатели распадаемости СП кормов.

Заключение

Распадаемость СП кормов в рубце является важнейшим показателем качества протеина корма, лежащим в основе нормирования протеинового питания. Результаты исследований показали, что она определяется, в первую очередь, характеристиками протеина кормов – его фракционным составом и потенциальной

доступностью нерастворимой распадаемой фракции. В то же время рубцовая среда, зависящая от состава рациона, может оказывать модифицирующее влияние на скорость распада. Это происходит под действием факторов, приводящих к снижению переваривания фракций клетчатки. Наибольшему влиянию подвержены корма с высокой долей нерастворимой распадаемой фракции СП и средней скоростью распада. Рационы, не ингибирующие целлюлозолизис, обеспечивают скорость распада на уровне потенциальной, замеренной на уровне поддерживающего кормления. В наших опытах наибольшее влияние на распадаемость СП кормов оказали уровень потребления СВ, начальная фаза лактации (10-15 день) и структура рациона. Эти данные следует учитывать при оценке распадаемости протеина рационов при его нормировании в практических условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alderman G., Jarrige R. Feed evaluation and protein requirement systems for ruminants. CEC-EAAP Seminar. Brussels.,1986.
2. Ganev G., Orskow E.R., Smart R. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. J. Agr. Sci. Camb., 1979, 93: 651-656.
3. Lees J.A., Miller E.A. The effect of basal diet on rumen protein degradability measurements derived using an in situ polyster bag technique. Proc.Nutr. Soc., 1988, 47, 2: 94A.
4. Newbold C.J., Chamberlain D.G., Thomas P.C. Effect of intraruminal infusions of sodium bicarbonate on the rate of passage and degradation of dietary proteins in cows given a silage basd diets. J. Sci. Food Agr., 1988, 43: 287-293.
5. Orskov E.R., Mehrez A.Z. Estimation of extent of protein degradation from basal feeds in the rumen of sheep. Proc. Nutr. Soc., 1977, 36, 2: 78A.
6. Thomson D.J. Physical form of the diet in relation to rumen fermentation. Proc. Nutr. Soc., 1972, 31, 2: 127-134.
7. Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных. Методические указания, Боровск, 1977.
8. Изучение пищеварения у жвачных (методические указания). Курилов Н.В., Севостьянова Н.А., Коршунов В.Н. и др. (Под ред. Н.В. Курилова) Боровск, 1987:104с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. М; Высш. шк., 1990: 352 с.

ВЛИЯНИЕ СХЕМЫ ВЫРАЩИВАНИЯ ТЕЛЯТ НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ РУБЦОВОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ

А. В. Шишкин (Нижегородская ГСХА)
О.Б. Брускова (ВНИИФБиП с.-х. животных)

Проведено сравнение двух схем кормления при выращивании племенных бычков. Установлено, что раннее стимулирование потребления стартерного комбикорма телятами, при исключении из рациона сена и снижении уровня молочного питания, способствует развитию преджелудков и их морфофункциональной активности у животных, что приводит в дальнейшем к повышенному потреблению объемистых кормов.

Введение

Системы выращивания телят, применяемые в последние годы в нашей стране, предусматривают использование значительных объёмов цельного и обезжиренного молока или их заменителей (ЗЦМ). Молоко является дорогостоящим кормом, в связи с чем возникает вопрос о снижении затрат на выращивание животного. Для снижения затрат в ряде хозяйств применяют так называемую «голландскую» систему выращивания телят (Маркин и др., 2003), которую с успехом используют фермеры Канады, США, стран Европы (Клейменов и др., 1989; Кошелева и др., 2002). Данная технология выращивания предусматривает значительное сокращение молочного периода и, соответственно, дачи молочных кормов, и раннее введение в рацион растительных кормов с высоким содержанием легкопереваримых углеводов (высококачественных стартерных комбикормов).

При переходе на растительные корма происходит более быстрое становление микрофлоры преджелудков, характерной для взрослых животных и способной к перевариванию больших количеств клетчатки, повышается вес и объём преджелудков, усиливается их пищеварительная функция. Это касается и других органов (печень, почки, сердце), прямо или косвенно связанных с процессами пищеварения (Бергнер и др., 1973, Лабуда и др., 1976, Рой Дж., 1982).

Несмотря на большой объём исследований, проведённых в этой области в основном за рубежом, необходимо было изучить особенности роста и развития телят, их пищеварительной системы при применении основных элементов данной технологии выращивания в условиях подсобного хозяйства «Пушкинское», Большеболдинского района Нижегородской области.

Материал и методы

Для решения поставленных задач был проведен научно-хозяйственный опыт на бычках черно-пестрой породы. Из телят с момента рождения по принципу парных аналогов с учетом возраста и живой массы были сформированы 2 группы по 10 животных в каждой. Живая масса телят при рождении варьировала в пределах 35,2-43,4 кг. В основной период опыта, который продолжался 120 дней, рацион изменяли согласно схеме выращивания по декадам. Контрольную группу телят выращивали по схеме кормления, принятой в хозяйстве. За 180-дневный период они получили по 400 кг цельного молока, 600 кг свежего обрата, 185 кг комбикормов, 68 кг сена, 48 кг кукурузного силоса, 170 кг травы искусственных пастбищ и 270 кг травы люцерны. Телят опытной группы содержали на рационе с уменьшенной нормой выпойки молока (205 кг), но с увеличенным количеством концентратов, сена, силоса и зеленой массы (табл.1).

Скармливание растительных кормов - сена и комбикорма в контрольной группе начали с 10-дневного возраста; в опытной группе с 5-дневного возраста предлагали только концентраты, сено же начинали скармливать только тогда, когда телята смогли потреблять около 1 кг

Таблица 1. ***Затраты кормов и питательных веществ на выращивание телят до 180- дневного возраста, кг***

Корма и питательные вещества	Группы	
	контрольная	опытная
Молоко цельное	400	205
Обрат свежий	600	-
Концентрированные корма	185	249
Сено злаково-бобовое	68	80
Силос кукурузный	48	87
Трава культурных пастбищ	170	240
Трава люцерны	270	360
В потребленных кормах содержится:		
Кормовых единиц, кг	534,6	525,3
Сухого вещества, кг	464,9	508,73
Сырого протеина, кг	96,3	89,98
Сырой клетчатки, кг	72,3	96,07

комбикорма в сутки. В качестве концентрированных кормов телятам скармливали 2 вида комбикорма. Первый комбикорм КР-1-775-4664 скармливали до 60-дневного возраста и он состоял из 6,5% пшеницы, 45,6% ячменя без пленок, 4% травяной муки, 18,5% подсолнечного жмыха, 15,2% соевого шрота, 1,4% растительного масла, 5% кормовых дрожжей, 1% мела кормового, 0,4% поваренной соли, 0,6% трикальцийфосфата, 1% премикса ПКР-1. Комбикорм был изготовлен на Ильиногорском заводе комбикормов «Изкорм», а в условиях

хозяйства к нему было добавлено 13% сухого заменителя цельного молока «Кальволак». Скармливаемый с 60-го до 180-дневного возраста комбикорм КК-62-779-3473 был также изготовлен на заводе «Изкорм» и имел следующий состав, %: овес - 3, пшеница - 16, ячмень без пленок – 30,3, отруби пшеничные – 12,4, жмых подсолнечный – 7,8, шрот подсолнечный – 10, шрот соевый – 8,5, меласса - 4, дрожжи кормовые - 4,2, мел кормовой – 1, соль поваренная – 0,7, трикальцийфосфат – 1,1, премикс П61-1 – 1%.

До 25-дневного возраста телят содержали в профилактории в индивидуальных клетках, затем в групповых клетках по 5 голов. Поедаемость кормов учитывали по группам, взвешивали телят ежемесячно. При достижении телятами 60-дневного возраста (перед началом скармливания сена животным опытной группы) был проведён балансовый опыт в течение 4 дней на 3-х парах животных. Концентрацию азота в кормах, кале и моче определяли по методу Къельдаля, содержание клетчатки – по Геннебергу и Штоману, сухое вещество – весовым методом (Методы…, 1997).

У телят 3-месячного возраста брали пробы рубцовой жидкости с помощью пищеводного зонда через 3 часа после утреннего кормления, в которой анализировали аммиак, ЛЖК и их молярное соотношение (Изучение пищеварения…, 1987). В возрасте 120 дней из каждой группы было убито по 2 бычка с целью определения степени развития желудочно-кишечного тракта в зависимости от типа кормления. Так же были взяты образцы стенки рубца для гистологических исследований. Пробы фиксировали в 10%-ном растворе формалина. В лаборатории морфологических исследований ВНИИФБиП были приготовлены гистологические срезы толщиной 6 мкм с последующей окраской по Акимченкову. Под микроскопом МБИ-15 с помощью окуляр-микрометра измеряли толщину стенки рубца и его слоев. С помощью бинокулярного стереологического микроскопа МБС-9 измеряли длину и толщину сосочков рубца и проводили их подсчет (Лилли, 1969).

По достижении телятами 180-дневного возраста они были переведены на крупногрупповое содержание (по 50 голов в группе) в летний лагерь. Было продолжено ежемесячное взвешивание животных, но учет потребления зеленой массы не проводился.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что сокращение выпойки молока в опытной группе в возрасте 20 дней до 3 л в сутки привело к значительному повышению потребления комбикормов, тогда как в контрольной группе потребление растительных кормов оставалось довольно низким на протяжении всего молочного периода. Если к 60-

дневному возрасту телята опытной группы потребляли в среднем по 1,3 кг комбикорма в сутки, то в контрольной группе потребление комбикорма и сена было 0,64 и 0,38 кг соответственно. В целом же рацион кормления опытной группы уступал контрольной по содержанию кормовых единиц, сухого вещества, сырой клетчатки, протеина и сахара, но превосходил по количеству крахмала, кальция и фосфора.

В течение первых 5 месяцев телята контрольной группы превосходили опытных по интенсивности роста (рис.1). К 3-месячному возрасту уровень среднесуточного прироста живой массы в опытной группе достигал 904 г, против 962 в контроле.

При переводе телят на кормление зеленой массой культурных пастбищ произошло незначительное снижение прироста у телят как опытной, так и контрольной групп, который в течение 60 дней возрос в опытной группе до прежнего уровня, а к 7-месячному возрасту достиг максимума – 925 г. При исключении молочных кормов из рациона телят контрольной группы в возрасте 5 месяцев произошло резкое снижение среднесуточного прироста животных. Это связано, вероятно, как с неспособностью телят поедать значительные объёмы растительных кормов, так и с недостаточным развитием преджелудков и, в частности, рубца.

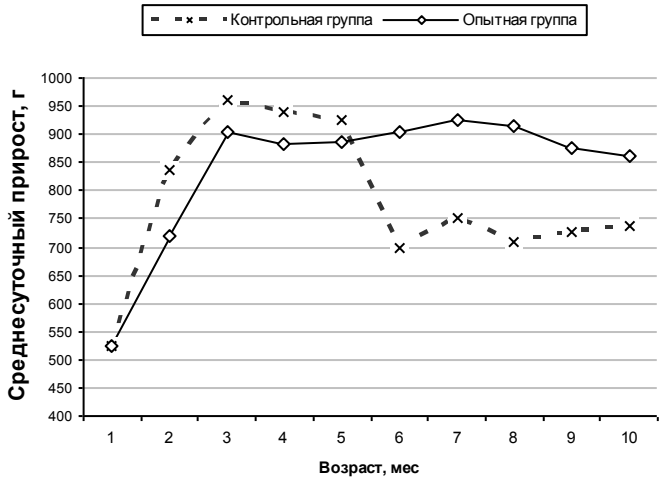


Рис 1. Динамика среднесуточных приростов у телят с 1 до 10-месячного возраста.

Если в 150-дневном возрасте среднесуточный прирост живой массы телят контрольной группы составлял 924 г, против 887 г в опытной группе, то в 10-месячном возрасте он был равен 767 г в контрольной группе и 860 г в опытной. В целом же к 10-месячному возрасту телята опытной группы превосходили по живой массе телят контрольной группы в среднем на 17,76 кг. Валовой прирост живой массы за 10 месяцев составил в контрольной группе 238кг, в опытной – 256кг.

Балансовый опыт, проведенный на бычках 60-дневного возраста показал, что переваримость сухого вещества, сырой клетчатки и сырого протеина была выше у бычков контрольной группы. Более высокая переваримость протеина обусловлена потреблением белка молока, переваримость которого достигает 94-97%, тогда как в рационе телят опытной группы основную долю занимал растительный белок комбикорма с пониженной переваримостью у телят этого возраста.

Использование азота животными контрольной группы так же было выше, чем у животных опытной группы (табл. 2). Вместе с тем, потребление протеина телятами опытной группы было на 16,8% меньше, чем в контрольной, что и явилось одной из причин более низкого прироста живой массы в этот возрастной период (- 14,3%), хотя уровень прироста был довольно высоким.

Таблица 2. ***Баланс азота у телят 60-дневного возраста, г на голову в сутки***

Показатели	Группы животных	
	контрольная	опытная
Принято с кормом	71,62±0,18	59,58±1,2
Выделено:		
с калом	0,91±0,18	1,6±0,27
с мочой	1,32±0,19	1,52±0,23
Переваримость, %	98,72±0,24	97,31±0,32
Усвоено	69,39±0,34	56,46±0,39
% от принятого	96,89±0,9	94,76±1,3
% от переваренного	98,13±1,2	97,38±1,1

Проведенный в 120-дневном возрасте убой 4 телят (по 2 из каждой группы) с целью определения развития пищеварительной системы и взятия образцов стенок рубца для гистологического исследования, выявил значительные отличия в развитии желудочно-кишечного тракта в зависимости от схемы кормления (табл. 3). Как видно из этой таблицы, в основном все отделы сложного желудка и кишечника у телят опытной группы превосходили по своему развитию подобные у телят контрольной группы.

Таблица 3. ***Развитие пищеварительной системы у 120-дневных телят в зависимости от схемы кормления, кг***

Показатели	Группы	
	контрольная	опытная
Рубец без содержимого	2,53	3,75
Содержимое рубца	13,95	17,7
Книжка с содержимым	1,48	2,98
Сычуг без содержимого	0,92	1,48
Тонкий кишечник с химусом	8,55	9,63
Толстый кишечник без содержимого	2,17	2,63

Данные таблицы указывают на повышенное потребление телятами опытной группы растительных кормов: содержимое рубца через 3 часа после кормления составляло у них 17,7 кг, против 13,95 кг в контроле, или на 21,2 % больше.

Результаты гистологических исследований, представленные в таблице 4, выявили более интенсивное развитие тканей преджелудков при раннем переходе на растительные корма.

Из данных табл.4 видно, что у опытных телят толщина стенки свода вентрального мешка была достоверно выше на 830 мкм, чем у животных контрольной группы. Большая толщина стенки рубца у телят опытной группы обусловлена большими размерами как мышечного, так и эпителиального слоев.

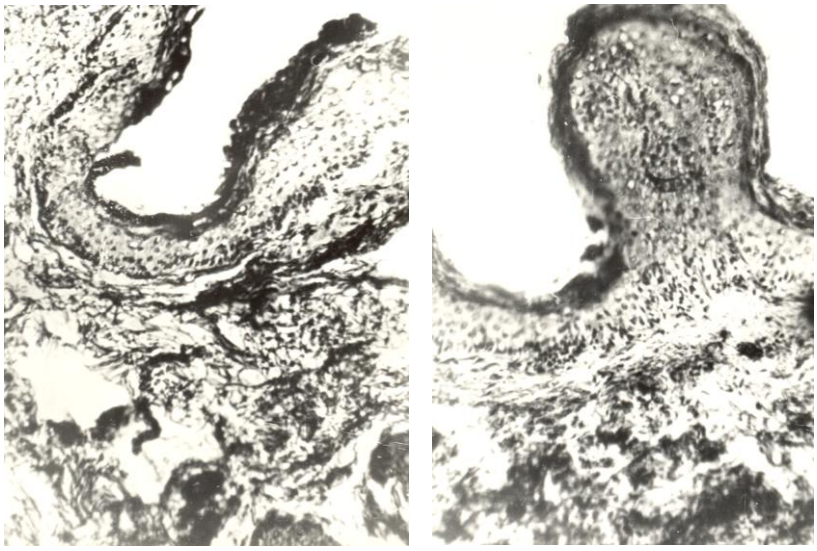
Таблица 4. ***Морфометрические показатели развития стенки рубца бычков***

Показатели	Группа	
	контрольная	опытная
Толщина общей стенки рубца, мкм	1610,5 ±31,2	2440,5±51,0*
Толщина мышечной оболочки, мкм	1281,0 ±26,0	2220,5 ± 30,5*
Общая толщина эпителиального слоя, мкм	28,0 ± 0,2	31,6 ±0,5*
Камбиальная зона эпителия, мкм	19,7 ±0,5	21,2 ±0,3
Ороговевающая зона эпителия, мкм	8,3 ± 0,4	10,3 ±0,5*

Примечание: * - P< 0,05

Эпителиальный слой хорошо развит, в нем отчетливо выражены камбиальный, шиповатый, зернистый и блестящий слои. Следует отметить, что у опытных телят в эпителии находилось большое количество крупных зернистых клеток, в которых содержались зерна кератогиалина (рис. 2). Эпителиальные клетки ростового слоя были крупными, содержали ядра с одним или двумя ядрышками, что указывает на повышенную функциональную активность эпителия.

Общая толщина эпителия в опытной группе была выше и составляла 31,5 ± 0,5, против 29,05 ± 0,4 в контроле.



1 2

Рис.2. Стенка рубца бычков контрольной (1) и опытной (2) групп. Окраска по Акимченкову. Ув. 160.

Как видно на рисунке, сосочки рубца бычка опытной группы высокие и широкие, покрыты многослойным плоским эпителием, в котором зоны росткового и ороговевающего слоев значительно выше, чем в контроле. Отчетливо выражены крупные клетки зернистого слоя с большим количеством зерен кератогиалина. Стенка рубца состоит из слизистой, мышечной и серозной оболочек. Многослойный плоский эпителий слизистой оболочки имеет сосочки, у которых значительно изменена форма, густота и величина в зависимости от состава рациона. У опытных бычков высота, ширина и число сосочков были выше по сравнению с контрольными (табл. 5).

Таблица 5. ***Параметры и число сосочков рубца у бычков***

Показатели	Группа	
	контрольная	опытная
Высота сосочков, мм	6,5 ± 0,03	7,5 ± 0,4*
Ширина сосочков, мм	2,1 ±0,04	3,1 ±0,1*
Число сосочков на 1 см^2	46,0 ± 1,8	49,0 ± 1,1*

Примечание: * - P<0.05

Таким образом, морфологические исследования стенки рубца показали, что скармливание телятам с 10-дневного возраста комбикорма способствует увеличению размера стенки рубца, его мышечного и эпителиального слоев. Увеличение эпителиального пласта происходило за счет росткового и ороговевающего слоев, при этом у опытных бычков функциональная активность эпителиоцитов была значительно выше, по сравнению с контрольными животными. Данные отличия свидетельствуют об окончательном формировании стенки рубца у опытных телят, в то время как у контрольных телят она оставалась недостаточно развитой.

Анализ проб рубцовой жидкости подопытных телят 3-месячного возраста выявил более высокий уровень ЛЖК у животных опытной группы (на 13%) при увеличении молярной доли бутирата ($P < 0,05$) и снижении процента ацетата (табл. 6).

Таблица 6. ***Показатели рубцовой жидкости телят 3-месячного возраста***

Показатели	Группа	
	контрольная	опытная
Аммиак, мг %	8,41±0,65	6,48±0,45
ЛЖК ммоль/100мл	7,90±0,23	8,94±0,17*
Молярный % ЛЖК:		
уксусная	63,2±1,3	60,3±0,6
пропионовая	24,8±1,8	22,4±1,0
масляная	12,0±0,5	17,3±0,3*

*P<0,05

Таким образом, раннее приучение телят к потреблению стартерного комбикорма при одновременном ограничении скармливания молочных продуктов и сена способствует становлению микробиальных процессов в преджелудках, повышенному образованию ЛЖК, что является важнейшим фактором стимуляции развития эпителия преджелудков, его метаболической и всасывательной активности. Особая роль в этом отношении принадлежит масляной кислоте (Курилов и др., 1978, Noble, 1981).

Расчет затрат показал, что при выращивании бычков опытной группы, за счет сокращения расхода молока и обрата на 195 и 600 кг соответственно, затраты на корма снизились на 2241 руб. (по средним ценам за февраль-май 2003 г.). Перерасход комбикормов, сена и зеленой массы по сравнению с контрольной группой за 6 месяцев составил в денежном выражении 361 руб. Таким образом, общая экономия затрат на корма при выращивании телят опытной группы составила за 6 месяцев 1880 рублей в среднем на голову (табл. 7).

Таблица 7. ***Продуктивность и затраты кормов при выращивании бычков до 180-дневного возраста***

Показатели	Группы	
	контрольная	опытная
Живая масса телят, кг:		
в начале опыта	38,40	38,20
в возрасте 180 дней	187,50	185,37
Прирост живой массы:		
валовый, кг	149,1	147,17
среднесуточный, г	828	818
На 1 кг прироста живой массы затрачено:		
кормовых единиц, кг	3,59	3,57
сырого протеина, г	634	626
молочного белка, г	230	46

Как видно из этой таблицы, при разных схемах выращивания к 6-месячному возрасту животные имели практически одинаковую живую массу и одинаковые затраты кормовых единиц и сырого протеина на 1 кг живой массы при существенном снижении потребления молочных продуктов. Но за счет разницы в потреблении кормов и их стоимости экономический эффект складывается в пользу внедрения испытуемой в хозяйстве схемы выращивания.

Заключение

Сравнение схем кормления молодняка крупного рогатого скота показало, что умеренное молочное кормление телят на начальном этапе жизни при раннем включении в рацион высокоэнергетических углеводистых кормов не ухудшает качество выращиваемого поголовья, способствует раннему развитию рубцового пищеварения и потреблению растительных кормов с высоким содержанием клетчатки. Снижение уровня молочного кормления при выращивании племенных бычков до 6-месячного возраста с 400 кг молока и 600 кг обрата до 205 кг молока позволяет экономить до 1880 руб. при выращивании каждого теленка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бергнер Х., Кетц Х.-А. Научные основы питания с.-х. животных. М.: Колос, 1973: 41-86.
2. Изучение пищеварения у жвачных. Методические указания. Боровск, 1987
3. Клейменов Н.И., Клейменов В.Н., Клейменов А.Н. Системы выращивания крупного рогатого скота. М.: Росагропромиздат, 1989: 320с.

4. Кошелева Г., Ляхобская Е. Новая система выращивания телят в Нидерландах. Животноводство России. 2002, 3: 32-33.
5. Курилов Н.В., Севастьянова Н.А. Пищеварение у жвачных. Итоги науки и техники. Сер. животноводство и ветеринария. М., 1978, 25: 5-78.
6. Лабуда Я., Демченко П.В. Кормление высокопродуктивных животных. М.: Колос, 1976: 142-167.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969: 538с.
8. Маркин Ю., Слушков В. Кормление телят в стартерный период. Животноводство России. 2003, 8: 26-27.
9. Рой Дж. Х.Б. Выращивание телят. М.: Колос. 1982: 470с.
10. Сироткин В.И. Кормление молодняка крупного рогатого скота. М., 1986: 239 с.
11. R. C. Noble. Lipid metabolism in the neonatal ruminant animals. (W.W. Christie), H. 81-4116, 1981.

АНАЛИЗ ЗАДАЧИ ОПТИМИЗАЦИИ СОСТАВА РАЦИОНА С УЧЕТОМ ТРЕБУЕМОГО МИНИМАЛЬНОГО ОБЪЕМА ВСАСЫВАНИЯ ПО ОСНОВНЫМ СУБСТРАТАМ

(ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ИМИТАЦИИ БИОЦЕНОЗА РУБЦА)

Г.Г. Черепанов, А.В. Катаев

На примере определения оптимального сочетания распадаемости в рубце протеина и крахмала описывается новый метод оптимизации рациона, использующий оценки тканевых потребностей в субстратах на уровне порога метаболического лимитирования и данные компьютерного прогноза объемов всасывания при разных сочетаниях градаций кормовых факторов.

Введение

Изучение эффектов «защиты» от распада в рубце протеина и крахмала и неаддитивности питательной ценности кормов в составе рациона стимулируют развитие и применение количественных методов биокинетики (Black et al., 1980-1981; Черепанов, 1992; Bannink et al., 1997). Исследования последних лет показали, что снижение рубцовой деградации протеина – это не панацея и не гарантия продуктивного эффекта, тем более на фоне скармливания труднодеградируемого крахмала. Микробиальный синтез пропорционален объему ферментируемого в рубце органического вещества и снижение уровня растворимых углеводов и протеина может отрицательно влиять на темпы возобновления микробных популяций. Нужный баланс можно, по-видимому, найти только с учетом целевых потребностей, т.е. продуктивности, стадии лактации, возраста и т.д. Ясно, что здесь нужно точное балансирование и достаточно

эффективные прогностические модели для анализа питательной ценности и оптимизации состава рационов (Danfaer, 1990; Dijkstra et al., 1992).

Ранее разработанный во ВНИИФБиП исследовательский вариант модели биоценоза рубца показал себя достаточно работоспособным как в предсказании общих закономерностей рубцовой ферментации и всасывания субстратов (Черепанов, 2002), так и в количественном прогнозе питательности рационов для продуктивных жвачных животных (Черепанов и др., 2002). Однако для применения этой фундаментальной разработки в практической работе для составления рационов и по другим направлениям использования остается нерешенным ряд вопросов, в том числе следующие: 1) отсутствие справочных данных по детальной оценке кормов (по фракционному составу, константам скорости деградации протеина и крахмала и т.д.), 2) недостаточная научная проработка концепции тканевых потребностей в субстратах; 4) отсутствие аналитических процедур (алгоритмов) подбора показателей состава рациона, оптимальных для достижения биологического эффекта. В используемой в настоящее время версии модели численные значения этих показателей предполагаются уже заданными и используются в составе входных данных для прогнозирования объема всасывания субстратов. Обратная же задача, т.е. нахождение оптимальных значений показателей рациона по заданному целевому спектру объемов всасывания субстратов, ранее в литературе не рассматривалась.

Целью настоящей работы было проведение серии численных экспериментов на модели биоценоза рубца с варьированием параметров деградируемости протеина и крахмала и описанием поверхности отклика по разным показателям рубцовой ферментации для поиска зон биологического оптимума. В процессе работы был сформулирован общий принцип и алгоритм поиска оптимальных значений характеристик состава рациона с учетом минимального требуемого объема всасывания по основным субстратам.

Материал и методы

Численные эксперименты проводили с использованием ранее описанной компьютерной модели биоценоза рубца – РУБЕЦ1 (Черепанов, 2002). Значения параметров модели приведены в таблице 1.

Таблица 1. ***Значения параметров и входных переменных для модели биоценоза рубца ****

Параметр	Значение	Параметр	Значение	Параметр	Значение	Параметр	Значение
R11	4.59	Y12	1	K9	1.56	f9	.04
R12	1.6	Y13	1.13	K10	.41	f10	.08
R21	0	C9	.121	K13	13	f11	.03
R22	4.97			K14	1	f2	.04
R31	7.33	Y11	1.14	K15	20	f15	0
R32	1.12	Y14	1.45	KK1	.009	f16	0
R41	.23	Y15	1	KK2	.002	f17	.2
R42	.23	Y21	.43	KK3	.0012	f18	.4
R51	2.71	Y22	.52	KK4	.095	f19	.017
R52	-.42	Y23	.49	KK5	.041	f20	.9
R61	.017	Y24	.21	KK6	.0064		
R62	.019	Y25	.57	V1	600		
R7	40	Y31	.215	V2	250		
C1	.00023	Y32	.24	f1	.06		
C2	.014	Y33	.19	f2	.05		
C3	1	Y34	.17	f3	.060		
C4	.5	Y35	.04	f4	.04		
C5	1	K1	2.16	f5	.25		
C6	1.2	K3	1.25	f6	.09		
C7	.212	K7	4.65	f7	.13		
C8	.43	K8	12.2	f8			

* Значения входных параметров и переменных даны для расчетов с варьированием констант скорости ферментации крахмала (K2) и нерастворимого протеина (K4). Для расчетов с варьированием доли растворимого протеина $f_{прот}$ = f9/(f9+f10) и крахмала ($f_{крахм}$ = f17) были взяты средние значения K2 = 3,45 и K4 = 2,33.

Входные данные – доли химических составляющих в сухом веществе рациона и общее потребление сухого вещества. Выходные даные – потоки всасывания субстратов, энергия всасывающихся субстратов, валовая энергия корма, потери энергии в пищеварительном тракте др. показатели. В целом модельный рацион примерно соответствовал соотношению концентрированных и грубых кормов 50:50 по сухому веществу и содержал 6% сахаров, 25% крахмала, 27% холоцеллюлозы (целлюлоза + гемицеллюлоза) и 12% сырого протеина. Потребление сухого вещества – 15 кг/сут.

Работа с программой РУБЕЦ1 заключалась в следующем. В диалоговом меню выбирался режим «Частичный ввод», в предлагаемом списке параметров отмечались переменные и параметры, подлежащие изменению, затем вводились их численные значения и информация, необходимая для прогона программы: интервал интегрирования (6 дней), шаг интегрирования (0,005) и шаг выдачи результатов на печать. Значения К2, К4 и f17, f9, f10 задавались при каждом новом прогоне программы в двух циклах расчетов соответственно. Всего было проведено 16 циклов расчета с варьированием в четырех градациях К2 в интервале от 1 до 7 кг протеина/кг микробной массы· сутки и К4 в интервале от 0,5 до 5 кг крахмала/кг микробной массы·сутки, а также 16 аналогичных циклов с варьированием доли растворимого крахмала $f_{крахм}$ в сыром крахмале (0,1 – 0,4) и доли растворимого протеина в сыром протеине $f_{прот}$ (0,1 – 0,7). По распечаткам выходных данных были построены двумерные таблицы и трехмерные изображения поверхности отклика по различным показателям рубцовой ферментации (рис. 1.1 -1.8; 2.1 – 2.4).

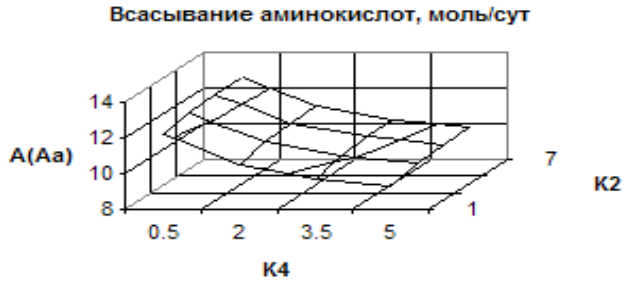
Результаты и обсуждение

Для сравнительной оценки влияния факторов деградируемости на показатели ферментации, имеющие разную размерность, использовали относительный индекс силы влияния [СВ = (относительное изменение показателя)/(относительное изменение фактора]; относительное изменение рассчитано в виде отношения размаха к среднему значению показателя или фактора. Как показал анализ (рис. 1.1 – 1.8), вариация скорости деградации крахмала больше всего сказывается на всасывании глюкозы, в меньшей степени – на всасывании аммиака и глюкозных эквивалентов (со знаком «-« по отношению к направлению изменения фактора), примерно в такой же степени эта вариация влияла на всасывание пропионата и ацетата, объем рубцовой ферментации ОВ и выход микробной массы (со знаком «+») (табл. 2).

То, что снижение относительной скорости деградации протеина в изопротеиновых рационах по модельному прогнозу, помимо положительного влияния на всасывание аминокислот, может сопровождаться заметным снижением всасывания ацетата и пропионата на фоне менее выраженных изменений общей энергии всосавшихся субстратов, представляет определенный интерес в плане возможного теоретического объяснения отмеченного в опытах положительного влияния инфузий этих субстратов на продукцию молочного белка у коров (Отчеты ВНИИФБиП, 2001-2002 гг., Черепанов, 2002).

Рис. 1.1. Всасывание аминокислот, моль/сут

		К2	1	3	5	7	СВ
К4	0.5		12.23	12.47	12.55	12.62	0.021
	2		10.52	10.84	10.95	11	0.03
	3.5		9.73	10.07	10.19	10.25	0.03
	5		9.29	9.64	9.76	9.81	0.03
СВ			0.17	0.16	0.156	0.16	



Сила влияния: К2: +0.028 К4: -0.16
Среднее значение 10.7

Рис. 1.2. Всасывание глюкозных эквивалентов, моль/сут

		К2	1	3	5	7	СВ
К4	0.5		15.30	12.56	11.66	11.25	0.21
	2		15.84	13.05	12.24	11.87	0.2
	3.5		16.08	13.29	12.50	12.14	0.2
	5		16.22	13.41	12.63	12.29	0.2
СВ			0.035	0.04	0.05	0.05	



Сила влияния: К2: -0.2; К4: 0.04
Среднее значение: 13.27

Рис. 1.3. Всасывание ацетата, моль/сут

		К2	1	3	5	7	СВ
К4	0.5		41.1	47.9	50.0	50.9	0.14
	2		46.5	53.4	55.2	56.0	0.12
	3.5		48.4	55.2	57.0	57.8	0.11
	5		49.4	56.1	57.9	58.6	0.11
СВ			0.110	0.094	0.090	0.084	



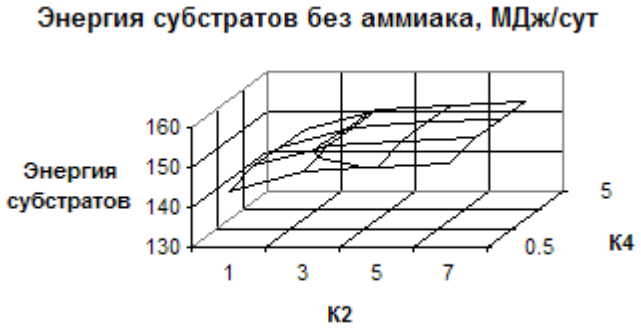
Сила влияния: К2; +0.12:; К4: +0.095
Среднее значение: 52.6

Вариация скорости деградации нерастворимого протеина больше всего влияла на всасывание аммиака (+); при этом амплитуда изменений в микробном синтезе, общей рубцовой ферментации ОВ, всасывании пропионата и ацетата (+) и всасывании аминокислот (-)

была приблизительно постоянной, а эффективность микробного синтеза в большей степени зависела от деградируемости протеина, по сравнению с крахмалом. Аналогичные тенденции влияния на показатели ферментации и всасывания были отмечены при варьировании $f_{крахм}$ и $f_{прот}$ (рис. 2.1- 2.4), хотя значения силы влияния оказались в целом существенно меньшими, по сравнению с варьированием скорости деградации К2 и К4 (табл. 2).

Рис. 1.4. Энергия субстратов без аммиака, МДж/сут

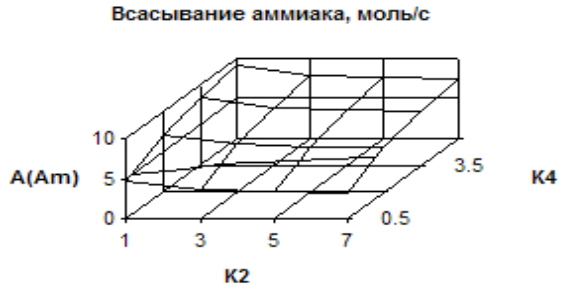
	К2	1	3	5	7	СВ
К4	0.5	144.3	149.0	150.2	151.0	0.03
	2	145.9	150.8	152.0	152.7	0.03
	3.5	145.7	150.5	151.8	152.4	0.03
	5	145.4	150.3	151.5	152.1	0.03
СВ		0.005	0.005	0.005	0.004	



Сила влияния: К2: +0.02; К4: +0.005
Среднее значение: 149.7

Рис. 1.5 Всасывание аммиака, моль/сут

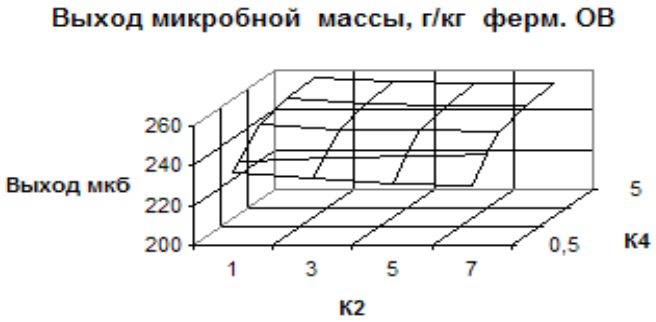
	К2	1	3	5	7	СВ
К4	0.5	4.64	3.68	3.39	3.24	0.25
	2	7.14	6.02	5.69	5.53	0.176
	3.5	8.4	7.23	6.89	6.72	0.153
	5	9.11	7.93	7.58	7.42	0.141
СВ		0.37	0.42	0.43	0.44	



Сила влияния: К2: - 0.18; К4: 0.415
Среднее значение: 6.29

Рис. 1.6. Эффективность микробного синтеза, г/кг ферм. ОВ

		К2 1	3	5	7	СВ
К4	0,5	236	234	231	230	0,017
	2	252	248	249	247	0,008
	3,5	255	253	252	252	0,008
	5	257	254	253	253	0,01
	1,64	0,051	0,049	0,054	0,057	



Сила влияния: К2: - 0.01; К4 = 0,053
Среднее значение: 247

Рис. 1.7 Объем ферментации ОВ, кг/сут

		К2 1	3	5	7	СВ
К4	0.5	5.71	6.67	6.96	7.1	0.14
	2	6.36	7.37	7.64	7.76	0.13
	3.5	6.59	7.6	7.87	7.99	0.12
	5	6.7	7.71	7.98	8.1	0.12

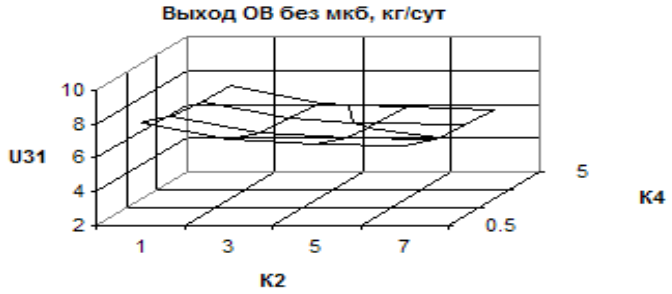
СВ	0.095	0.086	0.082	0.08



Сила влияния: К2: +0.13; К4: +0.09
Среднее значение: : 7.26

Рис. 1.8 Выход ОВ без микроорганизмов, кг/сут

		К2 1	3	5	7	СВ
К4	0.5	8.09	7.13	6.84	6.7	0.13
	2	7.44	6.43	6.16	6.04	0.14
	3.5	7.21	6.2	5.93	5.81	0.15
	5	7.1	6.09	5.82	5.7	0.15
СВ		0.081	0.098	0.1	0.1	



Сила влияния: К2: - 0.14; К4: - 0.1
Среднее значение: 6.5

Приведенные выше таблицы и диаграммы свидетельствуют о монотонном характере зависимостей и отсутствии областей локальных максимумов или минимумов на поверхности отклика по исследованным показателям в связи с вариациями деградируемости и доли растворимого протеина и крахмала в рубце. При экстраполяции этого вывода к реальным процессам необходимо иметь в виду, что в исследованной модели не учитывались эффекты возможного влияния pH содержимого на процессы ферментации, поэтому этот прогноз можно отнести лишь к области значений pH, при которой указанное

влияние незначительно. По мере роста соотношения концентрированных кормов к грубым (свыше 50:50 по сухому веществу) начинают сказываться эффекты закисления среды и для прогноза в этой области необходимо иметь «pH-чувствительную» модель биоценоза рубца.

Известно, что продуктивный эффект применения добавок защищенного протеина очень вариабелен и эффективность использования поступающих аминокислот на синтез молочного белка в среднем не превышает 20% на фоне большого разброса опытных точек (Hanigan et al., 1998). С учетом проведенного анализа и результатов физиологических опытов можно предположить, что возникающий при этом дефицит определенных энергетических субстратов может лимитировать биоконверсию и в некоторых ситуациях снижать эффективность использования защищенного протеина.

Рис.2.1 Всасывание аминокислот, моль/сут

	Крх	0.1	0.2	0.3	0.4	СВ
Прот	0.1	10.61	10.67	10.74	10.81	0.015
	0.3	10.61	10.67	10.72	10.77	0.012
	0.5	10.58	10.62	10.66	10.7	0.009
	0.7	10.52	10.54	10.55	10.58	0.005
СВ		0.006	0.011	0.015	0.018	

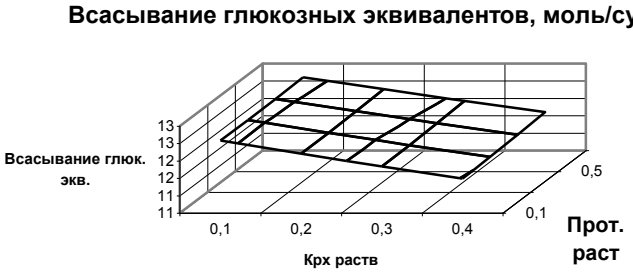


Сила влияния: крх раст.: 0.01; прот. раст.: - 0.012
Среднее значение: 10.65

Рис. 2.2 Всасывание глюкозных эквивалентов, моль/сут

	Крх	0.1	0.2	0.3	0.4	СВ
Прот.	0.1	12.58	12.21	11.84	11.49	0.075
	0.3	12.58	12.21	11.85	11.52	0.073

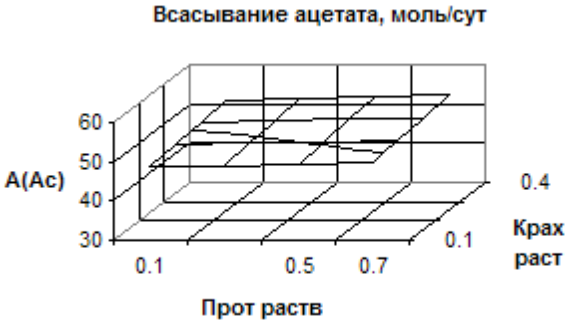
0.5	12.58	12.23	11.89	11.55	0.071
0.7	12.60	12.26	11.92	11.60	0.069
СВ	0.001	0.003	0.004	0.006	



Сила влияния: крх раст.:-0.07; прот. раст.:-0.003
Среднее значение: 12.06

Рис. 2.3 Всасывание ацетата, моль/сут

	Крх	0.1	0.2	0.3	0.4	СВ
Прот	0.1	48.60	49.47	50.30	51.09	0.04
	0.3	48.86	49.76	50.60	51.40	0.04
	0.5	49.19	50.11	50.97	51.79	0.04
	0.7	49.60	50.53	51.42	52.25	0.04
СВ		0.013	0.014	0.015	0.015	

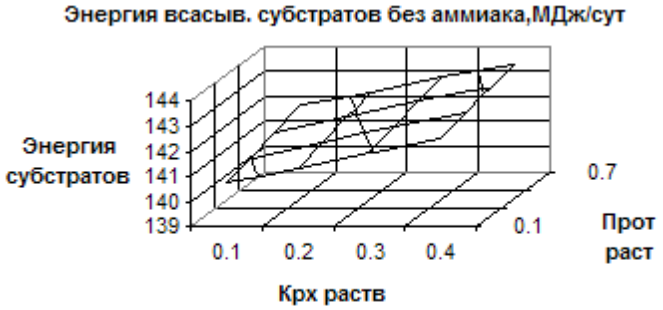


Сила влияния: крх раст.:0.04; прот. раст.: 0.014
Среднее значение: 50.37

Рис. 2.4. Энергия субстратов без аммиака, МДж/сут

	Крх	0.1	0.2	0.3	0.4	СВ
Прот	0.1	140.7	141.3	142.0	142.5	0.01
	0.3	141.0	141.6	142.3	142.8	0.01
	0.5	141.3	141.9	142.5	143.0	0.01

	0.7	141.6	142.1	142.7	143.2	0.009
СВ		0.004	0.004	0.0037	0.0034	



Сила влияния: крх. раств.:0.01; прот. раст.:0.004
Среднее значение: 142

Отсутствие экстремумов на поверхности отклика для рубцовых процессов не говорит об отсутствии оптимума в соотношении деградируемости протеина и крахмала для продуктивных функций, т.е. на уровне организма. Такой оптимум существует, но он определяется соотношением объема всасывающихся субстратов и текущей потребности в них. Приведенные таблицы и диаграммы можно использовать для нахождения этого оптимума.

Для иллюстрации предлагаемого общего метода рассмотрим численный пример, в котором данные по первым четырем таблицам сопоставлены с нижней границей (X_i) оцененных физиологических потребностей (x_i) по четырем показателям:

Аминокислоты ≥ 10 моль/сут	Глюкозные эквиваленты ≥ 12,5 моль/сут
Ацетат ≥ 55 моль/сут	Энергия всосавшихся субстратов ≥ 150 МДж/сут.
Факультативное условие: всасывание аммиака ≤ 7 моль/сут	

Ячейки на двумерных таблицах 1.1. – 1.4. для разных сочетаний К2 и К4, содержащие значения показателей, удовлетворяющие этим условиям, отмечены серым цветом, а ячейки на первой таблице, соответствующие тем сочетаниям, для которых выполняются все четыре условия, обведены рамкой. Таким образом, оптимальным сочетанием значений К2 и К4 в данном примере можно считать две пары чисел: 3 - 3,5; 5 - 3,5. С учетом же факультативного условия по аммиаку единственным приемлемым значением в данном случае является сочетание 5 - 3,5. Во втором цикле расчетов (рис. 2.1 – 2.4)

заданным условиям по указанным показателям не удовлетворяет ни одно из исследованных сочетаний факторов.

Описанную аналитическую процедуру можно расширить, включив дополнительные факторы, например, содержание растворимых неструктурных углеводов, целлюлозы и т.д., при этом необходимо провести некоторое число прогонов компьютерной модели с вариациями этих факторов. Общее число прогонов составит $N = m^2 * n$ раз, где n - число факторов, а m - число градаций фактора. В результате определяется совокупность значений $\{k_1, k_2 \ldots k_m\}$, для которой выполняются все заданные условия $x_i \geq X_i$. (или со знаком $\leq$ для аммиака, масляной кислоты и др. потенциально токсичных соединений). Найденные численные значения k_i можно затем использовать в составе общего списка исходных требований при составлении рационов, например, методом линейного программирования.

Таблица 2. ***Оценка влияния изменений доли растворимого протеина $f_{прот}$ и крахмала $f_{крахм}$ и констант скорости ферментации нерастворимого протеина и крахмала (К2 и К4) на показатели рубцовой ферментации и всасывания субстратов у коров (прогноз по модели)***

Варьируемый фактор	Константа скорости деградации нерастворимого протеина или крахмала			Доля растворимого протеина или крахмала		
Показатель	среднее значение	сила влияния		среднее значение	сила влияния	
		К2	К4		$f_{крахм}$	$f_{прот}$
Объем всасывания, моль/сут:						
Аминокислоты	10,7	0,03	- 0,16	10,65	0,01	- 0,012
Глюкоза	5,97	- 0,63	- 0,04	4,99	- 0,25	- 0,015
Пропионат	20,9	0,15	0,11	20,2	0,05	0,017
Глюкозные эквиваленты *	13,3	- 0,2	0,04	12,06	- 0,07	0,003
Ацетат	52,6	0,12	0,09	50,37	0,04	0,014
Аммиак	6,29	- 0,18	0,415	6,25	- 0,05	0,05
Выход микробной массы, кг/сут	1,8	0,12	0,13	1,91	0,036	0,034
Объем ферментации ОВ, кг/сут	7,26	0,13	0,09	7,62	0,04	0,015
Выход ОВ без микр., кг/сут	6,5	- 0,14	- 0,1	6,19	- 0,05	- 0,018
Эфф. микроб. синтеза, г/кг ОВ	247	- 0,01	0,053	251	-0,006	0,018
Ферментация холоцел. кг/сут	2,6	0,01	0,1	2,68	0,001	0,014
Энергия субстратов,	150	0,02	0,005	142	0,01	0,004

МДж/сут

Примечание: * (Объем всасывания пропионата х 0.7)/2
К2 – константа скорости ферментации нерастворимого крахмала; К4 – константа скорости ферментации нерастворимого протеина.
$f_{крахм}$ - доля растворимой части в сыром крахмале; $f_{прот}$ - доля растворимой части в сыром протеине. Сила влияния данного фактора на измеряемый показатель = (относительное изменение показателя)/(относительное изменение фактора).
ОВ – органическое вещество; СВ – сухое вещество.

В математической формулировке эта процедура может рассматриваться как дискретная реализация общей задачи анализа гиперповерхности, построенной в пространстве *n* факторов. Для рассмотренного двумерного случая поверхность отклика (объема всасывания) по разным субстратам можно описать аналитически и найти контур области в координатах К2, К4, соответствующей срезу поверхности на уровне порога лимитирования по данному субстрату. Затем набор полученных контуров необходимо наложить друг на друга и определить зону, общую для всех субстратов. При переходе к большему числу факторов наглядность процедуры утрачивается и требуется разработка специальных компьютерных программ. Такая более сложная процедура оправдана для достижения повышенной точности прогноза, однако на данном этапе можно ограничиться рассмотрением небольшого числа градаций факторов, поскольку здесь важна не столько точность, сколько обоснованность самого принципа метода.

В этой аналитической процедуре предполагается, что потребность в субстратах выражается не в виде одного числа, а в виде неравенства, ограничивающего некоторую область значений на уровне, который можно назвать порогом метаболического лимитирования. Аргументы в пользу такого представления потребностей могут состоять в следующем. Если не принимать в расчет микронутриенты, витамины и незаменимые аминокислоты, то необходимо признать, что эффекты замещений, компенсаций и адаптаций в той или иной степени характерны для метаболизма практически всех основных факторов питания, т.е. энергетических и пластических субстратов (азотсберегающее действие пропионата, липотропное действие метионина, разобщающее действие свободных жирных кислот, торможение глюконеогенеза при повышенном всасывании аммиака, снижение белковомолочности при скармливании жировых добавок и т.д.). Важность учета этого общего свойства отмечалась ранее при обсуждении адаптивно-метаболических аспектов нормирования питания (Черепанов, 1997; Черепанов, 2002).

С другой стороны, наличие субстратного лимитирования потоков (чаще всего на стадии ключевых необратимых реакций) - это такой же общий феномен, как и способность к адаптациям. Поэтому важно в первую очередь обеспечить поступление всех основных

субстратов на уровне порога лимитирования, что практически достигается за счет относительного (условного) «перерасхода» по некоторым другим субстратам и показателям. Условность этого перерасхода понятна с учетом эффекта «метаболического котла», перераспределяющего субстраты по своим внутренним каналам, множественность и сложность которых вряд ли допускает количественное исчисление для целей нормирования питания. Будет ли эффективной эта точка зрения и соответствующая ей вычислительная процедура, или какая-то модифицированная методика, могут показать лишь дальнейшие исследования. Пока же надо отметить, что в рамках «субстратной теории» класс предложенных оптимизационных процедур крайне ограничен, а без этого теория остается лишенной необходимого исполнительного механизма.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных численных экспериментов с использованием компьютерной модели, имитирующей процессы рубцового пищеварения в области физиологически нормальных значений pH, показали, что исследованным сочетаниям значений деградируемости (констант скорости ферментации в рубце и доли растворимых фракций) протеина и крахмала соответствуют монотонные нелинейные поверхности отклика по разным показателям ферментации и всасывания субстратов при отсутствии локальных максимумов или минимумов. Для нахождения оптимальной комбинации деградируемости протеина и крахмала предложен общий метод, использующий оценки тканевых потребностей в субстратах на уровне порога метаболического лимитирования и данные компьютерного прогноза объемов всасывания при разных сочетаниях градаций деградируемости протеина и крахмала. Метод включает в себя определение контура двумерной области допустимых значений на плоскости координат, соответствующей срезу поверхности отклика на уровне порога лимитирования по данному субстрату с последующим наложением полученных контуров и определением зоны, общей для всех субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черепанов Г.Г. Вычислительный эксперимент как связующее звено между исследованием процессов питания и оптимизированной технологией. Бюллетень ВНИИФБиП, 1992, 2-3(103-104): 12-19.
2. Черепанов Г.Г. Современные подходы к проблеме прогнозирования продуктивности и адаптивно-метаболическая концепция нормирования

питания животных. Мат. 2-й межд. конф. «Актуальные проблемы биологии в животноводстве».- Боровск, 1997.- С. 18-28.
3. Черепанов Г.Г., Агафонов В.И., Е.Л.Харитонов Е.Л., Катаев А.В. Оценка энергетической питательности рационов для скота. Зоотехния, 2002, 3: 11-12.
4. Черепанов Г.Г, Системно-кинетические принципы и модели в теории питания продуктивных животных. Боровск: изд. ВНИИФБиП, 2002: 163 с.
5. Baldwin R.L. Modeling ruminant digestion and metabolism. Chapman & Hall. New York, 1995.
6. Bannink A., DeVisser H. Comparison of mechanistic rumen models on mathematical formulation of extramicrobial and microbial processes. J. Dairy Sci., 1997, 80: 1296-1314.
7. Black J.L., Beever D.E., Faichney G.J. et al. Simulation of the effects of rumen function on the flow of nutrients from the stomach of sheep: Part 1 - description of a computer program. Agr. Syst., 1980-1981, 6: 195-219.
8. Danfaer A. A dynamic model of nutrient digestion and metabolism in lactating dairy cows. 671 Report from the National Institute of Animal Science, Denmark, 1990.
9. Dijkstra J., Neal H.D.St.C., Beever D.E., France J. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. J. Nutr., 1992, 122: 2239.
10. Hanigan M.D., Cant J.P., Weakley D.C. and Beckett J.L. An evaluation of postabsorptive protein and amino acid metabolism in the lactating dairy cow. J. Dairy Sci., 1998, 81: 3385-3401.

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЗАВИСИМОСТЬ ПЕРЕВАРИМОСТИ В КИШЕЧНИКЕ ОТ РАСПАДАЕМОСТИ В РУБЦЕ – ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРОГНОЗ

Черепанов Г.Г.

Разработан метод анализа данных и с его помощью обосновано положение о том, что вариации кишечной переваримости нераспавшихся в рубце фракций, измеренной методом in *sacco, могут быть обусловлены различиями по фракционному составу кормов, а не особенностями гидролитических процессов в кишечнике.*

Введение

Эффективность использования структурных компонентов корма (протеина, клетчатки, крахмала) определяется у жвачных в значительной мере степенью их распада в преджелудках и уровнем поступления в кишечник (Материкин, Харитонов, 1998; Mills et al., 1999). Определение распадаемости проводят обычно *in sacco*, т.е. инкубированием в рубце корма, помещенного в мешочек из

синтетической ткани. Метод мобильных мешочков применяют и для определения переваримости в кишечнике нераспавшихся в рубце кормовых фракций (Харитонов и др., 2000; Kalnitsky, Kharitonov, 2001; Voigt et al. 1985). Этим методом выявлена зависимость кишечной переваримости от распадаемости в рубце, характеризуемая спадом переваримости при высоких значениях распада (Voigt et al. 1985) или наличием оптимума переваримости (Харитонов и др., 2000; Kalnitsky, Kharitonov, 2001). Эти эмпирические зависимости предлагается включать в компьютерные программы для расчета доступности обменного протеина при составлении рационов (Харитонов и др., 2003а). Для обоснования таких расчетов необходимо иметь определенную теоретическую базу. Различные отделы пищеварительного тракта строго специализированы по функциям и условиям ферментации, поэтому не совсем ясно, в чем состоит физиологический смысл корреляции процессов, протекающих в рубце и в кишечнике. Положение и форма эмпирических кривых сильно варьируют в зависимости от вида корма и длительности инкубации в рубце (Харитонов, 2003б) и не ясно, чем вызвана эта вариабельность – фракционным составом, возможной гетерогенностью фракций по скорости распада, особенностями переваривания в кишечнике или другими причинами.

Кинетические модели процессов пищеварения в настоящее время широко применяются в теоретическом и прикладном плане, хотя таких работ по обсуждаемому здесь вопросу в литературе нет. Поскольку положенные в основу моделей закономерности рубцового пищеварения достаточно обоснованы экспериментально, модельное исследование может пролить свет на эту проблему и подсказать направления дальнейших исследований.

Целью работы было исследовать на теоретической модели взаимосвязь между распадаемостью структурных компонентов корма, измеренной *in sacco,* и переваримостью их в кишечнике, в частности, зависимость общей переваримости в кишечнике нераспавшихся фракций, от степени распада в рубце.

Модель

Обозначения:

$P(0)$ - общее содержание структурного компонента в мешочке до помещения его в рубец;

a - содержание в мешочке фракции, растворимой в рубцовом содержимом, г;

B_{max} - начальное (максимальное) содержание нерастворимой распадаемой фракции, г.

c_r - содержание фракции, недоступной для распада в рубце, г; t - время инкубации мешочка в рубце;

t^* - время нахождения мешочка в кишечнике.

Имеем по определению:

$$P(0) = a + B_{\max} + c_r \qquad (1)$$

Если деградация в рубце нерастворимой фракции характеризуется одним значением константы скорости k_{dr} (ед. времени$^{-1}$) и растворимая фракция быстро вымывается из мешочка, то содержание в мешочке суммы распадаемой и недоступной для распада фракций (т.е. $P(t)$) и количество распавшегося вещества $D(t)$ описываются однокомпонентной кинетикой:

$$P(t) = B_{\max} e^{-k_{dr}t} + c_r \qquad (2)$$

$$D_r(t) = a + B_{\max}(1 - e^{-k_{dr}t}) \qquad (3)$$

Анализ модели

Последнее соотношение выразим в относительных единицах (по отношению к $P(0)$; соответствующие величины ниже имеют обозначения «с крышкой»):

$$\hat{D}_r(t) = \frac{D(t)}{P(0)} = \frac{a}{P(0)} + \frac{B_{\max}}{P(0)} - \frac{B_{\max} e^{-k_{dr}t}}{P(0)} \qquad (4)$$

Из выражения (4) путем преобразования получаем:

$$e^{-k_{dr}t} = \frac{\hat{D}(t) - \dfrac{B_{\max}}{P(0)} - \dfrac{a}{P(0)}}{\dfrac{B_{\max}}{P(0)}} = \frac{\hat{B}_{\max} + \hat{a} - \hat{D}(t)}{\hat{B}_{\max}} = 1 + \beta - \gamma \qquad (5)$$

где

$$\beta = \frac{\hat{a}}{\hat{B}_{\max}} = \frac{a}{B_{\max}}$$

$$\gamma(t) = \frac{\hat{D}_r(t)}{\hat{B}_{\max}} = \frac{D_r(t)}{B_{\max}}$$

Мешочки, извлеченные из рубца после инкубации в течение заданного периода времени, помещаются в дуоденум и извлекаются затем из кала для анализа переваримого в кишечнике вещества. Общее содержание структурного компонента в мешочке можно рассматривать

как сумму переваримой в кишечнике фракции I и недоступной для переваривания в кишечнике фракции c_{in}:

$$I(0^*) = I_{\max} + c_{in} \qquad (6)$$

и, следовательно,

$$I_{\max} = I(0^*) - c_{in} \qquad (7)$$

Если рассматривать процесс переваривания содержимого мешочка на некотором единичном отрезке кишечника, то количество переваримого вещества зависит от длительности процесса переваривания t^* (т.е. величины, обратной времени транзита), исходного количества переваримого вещества $I_{\max}$ и константы скорости переваривания k_{in}:

$$D_{in}(t) = I_{\max}(1 - e^{-k_{di}t^*}) \qquad (8)$$

или в относительных единицах:

$$\hat{D}_{in}(t) = \frac{I_{\max}}{I(0^*)}(1 - e^{-k_{di}t^*}) \qquad (9)$$

В тех случаях, когда определяется общая переваримость в кишечнике (*in sacco* по калу) без измерения времени транзита, можно вместо выражения в скобках ввести некоторую суммарную величину ς_{t^*}, которую можно назвать фактором переваримости, имея в виду, что общая величина переваримости складывается из этого фактора и величины фракции, недоступной для переваривания в кишечнике:

$$\varsigma_{t^*} = (1 - e^{-k_{di}t^*}) \qquad (10)$$

В дальнейшем изложении возможны два варианта расчета, различающиеся тем, что понимается под величиной «переваримое вещество» $I_{\max}$.

Вариант I. $I_{\max} = (B_{\max}e^{-k_{dr}t} + c_r) - c_{in} = I(0^*) - c_{in}$. Этот случай соответствует тому, что переваривается все вещество, поступающее из преджелудков; при этом должно выполняться соотношение: $c_{in} > c_r$.

Вариант I1. $I_{\max} + c_{in} = B_{\max}e^{-k_{dr}t}$, следовательно, $I_{\max} = B_{\max}e^{-k_{dr}t} - c_{in}$. В этом случае предполагаем, что переваривается только нераспавшаяся часть фракции, потенциально распадаемой в рубце, а недоступная для распада в рубце часть проходит через кишечник транзитом; $I(0^*) = P(t) = B_{\max}e^{-k_{dr}t} + c_r$; $c_{in} < c_r$.

Для варианта 1 , учитывая начальное условие

$$I(0^*) = P(t) \qquad (11)$$

и используя выражения (2) и (5) для подстановки в правую часть соотношения (11), с учетом (7) получаем выражение для связи между количеством переваримой в кишечнике фракции и величиной распавшейся в рубце фракции содержимого мешочка:

$$\hat{D}_{in}(t^*) = \frac{I_{\max}\varsigma_{t^*}}{B_{\max}(1+\beta-\gamma)+c_r} = \frac{[I(0^*)-c_{in}\ ]\varsigma_{t^*}}{B_{\max}(1+\beta-\gamma)+c_r} \qquad (12)$$

Если ввести дополнительные обозначения

$$\alpha = \frac{c_{in}}{c_r}$$

$$\delta = \frac{B_{\max}}{c_r},$$

то после преобразований выражения (12) получаем общую искомую зависимость:

$$\hat{D}_{in}(t^*) = \varsigma_{t^*}(1-\frac{\alpha}{\delta[1+\beta-\gamma(t)]+1}) \qquad (13)$$

В этом выражении две неизвестных величины: 1) безразмерная величина ς_{t^*}, зависящая от коэффициента переваримости и от длительности нахождения изучаемой фракции в кишечнике и 2) безразмерная величина α, представляющая объем фракции, недоступной для переваривания в кишечнике, выраженный по отношению к объему фракции, недоступной для распада в рубце (т.е. к величине, ранее измеренной в опыте).

При анализе модифицированной модели с включением двух компонент распада (т.е. двух фракций с разными константами скорости деградации в рубце) было получено аналогичное выражение, в котором $B_{\max}$ представляет собой сумму исходного содержания в корме нерастворимых распадаемых фракций. Таким образом, следует заключить, что, исходя из модельных расчетов, наличие нескольких фракций, различающихся по скорости деградации в рубце, не влияет на положение и форму кривой зависимости кишечной переваримости от степени распада в рубце.

Для варианта II из соотношения (9) имеем расчетное соотношение:

$$\hat{D}_{in}(t) = \frac{I_{\max}}{I(0^*)}\zeta_{e^*} = (\frac{B_{\max}(1+\beta-\gamma)-c_{in}}{B_{\max}(1+\beta-\gamma)+c_r})\zeta_{t^*} \qquad (14)$$

Для дополнительной характеристики процессов деградации кормового протеина в рубце целесообразно, помимо величины распада D_r и распадаемости $\hat{D}_r$, ввести величину степени распада γ', которая определяется по нижеприведенным соотношениям

$$\gamma(t) = \frac{D_r(t)}{B_{\max}} = \frac{\alpha + B(t)}{B_{\max}} = \beta + \gamma'$$

$$\gamma' = \frac{B(t)}{B_{\max}} \text{ и } \gamma' = \gamma - \beta$$

Численный эксперимент

Целью проведения численного эксперимента было выяснить, воспроизводит ли вышеописанная теоретическая модель выявленную в опыте зависимость переваримости в кишечнике структурных фракций корма от распадаемости их в рубце, которая характеризуется спадом переваримости при больших значениях распада, т.е. наличием оптимума переваримости на шкале распадаемости (Voigt et al. 1985; Харитонов и др., 2000; Kalnitsky, Kharitonov, 2001). Для модельного расчета были взяты следующие три варианта фракционного состава корма, различающиеся по соотношению растворимой (a), нерастворимой распадаемой (B_{max}) и недоступной для распада в рубце (c_r) фракций (табл. 1).

Расчеты проводились по формуле (13) для трех вариантов с подстановкой указанных значений α, β, δ и варьируемых значений γ в интервале от 0 до 1. Следует предположить, что, приняв величины ς_{t^*} и α равными 1, можно получить прогноз, близкий к реальности, поскольку по литературным данным отклонения от 1 небольшие. Результаты расчетов приведены в табл. 2 и на рис. 1.

Таблица 1. ***Численный пример фракционного состава трех кормов, различающихся по величине растворимой (a), нерастворимой распадаемой (B_{max}) и недоступной для распада в рубце (c_r) структурных фракций (г) и производные вспомогательные безразмерные величины*, использованные для расчета***

N	a	B_{max}	c_r	α	β	δ
1	10	70	30	1	0,143	2,33
2	20	60	20	1	0,333	3.0
3	10	85	5	1	0,118	17

* см. обозначения к формулам (5) и (12)

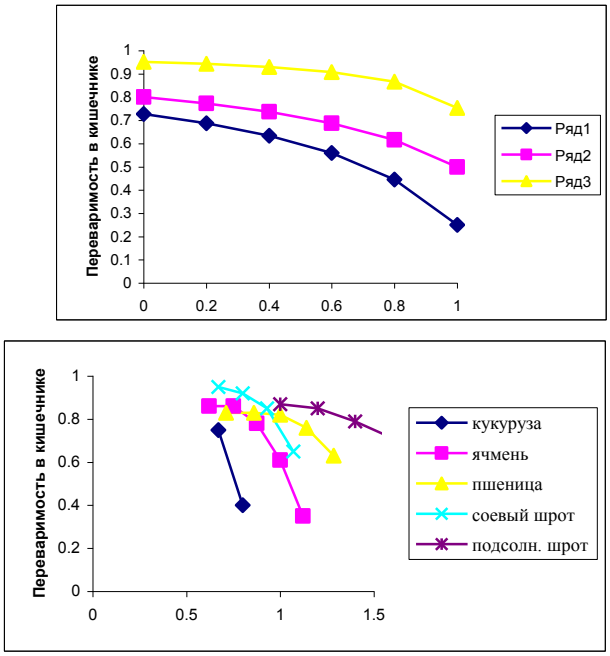


Рис. 1. Зависимость коэффициента переваримости в кишечнике $\hat{D}_{in}$ *от величины* $\gamma(t)$ *для кормов, инкубированных* in sacco *в рубце при разной длительности инкубации. По оси абсцисс – величина* $\gamma(t)$ *(см. обозначения к формуле 5). Вверху - прогноз по модели для трех кормов, различающихся по фракционному составу (табл. 1); внизу – фактические данные для сырого протеина пяти кормов (Харитонов, 2003б).*

Таблица 2. ***Заданные значения величины*** $\gamma(t)$ ***и соответствующие им коэффициенты переваримости в кишечнике*** $\hat{D}_{in}$ **** (объяснения в тексте)***

1		2		3	
$\gamma(t)$	$\hat{D}_{in}$	$\gamma(t)$	$\hat{D}_{in}$	$\gamma(t)$	$\hat{D}_{in}$
0	0,7	0	0,8	0	0,9
0,23				0,25	
0,4	0,6	0,2	0,7	0,2	0,9
0,69		0,27		0,24	
0,8	0,6	0,4	0,7	0,4	0,9
1	0,53		0,74		0,33
	0,5	0,6	0,6	0,6	0,9
	0,66		0,79		0,11
	0,4	0,8	0,6	0,8	0,8

	4				2				7	
		0,2		1		0,5		1		0,7
	5								5	

* Прогноз по модели, вариант 1 в предположении $\varsigma_{t^*} = 1$

Таким образом, наблюдаемый эффект (снижение переваримости с увеличением распадаемости) в качественном отношении воспроизводится на модели. Количественные сопоставления приведены в нижеследующем разделе.

Анализ опытных данных

Исходные данные для анализа приведены в табл. 3.

Таблица 3. ***Опытные данные по фракционному составу протеина пяти видов корма, % и относительной скорости распада в рубце, час$^{-1}$, а также вспомогательные величины для расчета****

Корм	$\hat{a}$	$\hat{B}_{\max}$	$\hat{c}_r$	β	δ	k_{dr}, час$^{-1}$
Кукуруза	15	75	10	0,2	7,5	0,025
Ячмень	15	80	5	0,187	16	0,07
Пшеница	25	70	5	0,357	14	0,13
Соевый шрот	20	75	5	0,267	15	0,02-0,04
Подсолнечниковый шрот	45	50	5	0,9	10	0,14

* Примечание: цифровые данные получены по графикам, приведенным в работе (Харитонов, 2003).

Для расчета по одному соотношению (13 или 14) имеются два неизвестных, поэтому была использована следующая квазиитерационная процедура вычислений. Учитывая, что значения ς_{t^*} и α для протеина, по-видимому, близки к 1, были взяты несколько значений объема фракции, недоступной для переваривания в кишечнике (0,8; 1,1; 1,2 х c_r для варианта I и 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 х c_r + c_r для варианта II), по соотношениям (13) и (14) соответственно определены величины фактора переваримости ς_{t^*} для разных значений распадаемости сырого протеина корма (выраженной в виде γ или γ') (табл. 4). При этом оказалось, что величина фактора переваримости, найденная по первому и второму вариантам расчета, для проанализированных кормов не зависит от распадаемости, за исключением нескольких «выскакивающих» значений (табл. 4, рис. 2).

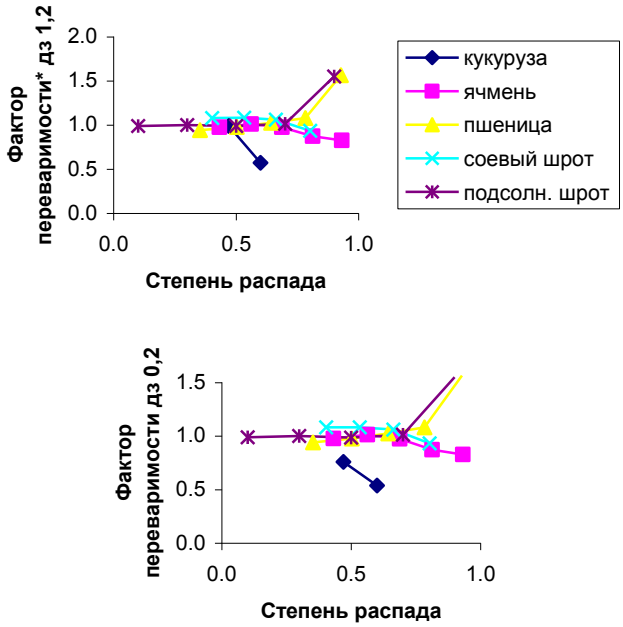


Рис. 2. Сопоставление значений фактора переваримости (ς_{t^*}), рассчитанного по опытным данным для сырого протеина пяти видов корма, с соответствующими значениями степени распада в рубце (γ'). Верхняя часть рисунка соответствует расчетному варианту I, нижняя часть – варианту II.

Значение ς_{t^*} не может быть больше 1, поэтому, анализируя данные табл. 4 (вариант II), можно видеть, что повышенная частота значений, превышающих 1, в колонках 0.05 и 0.3, в сравнении с колонкой 0.2, по-видимому, указывает на то, что наиболее вероятная величина фракции сырого протеина, недоступной для переваривания в кишечнике, может составлять приблизительно 0,2 x c_r.+ c_r.

Таблица 4. ***Значения*** ς_{t^*} ***(фактора кишечной переваримости нераспавшегося в рубце протеина), полученные при перерасчете опытных значений переваримости сырого протеина, измеренной методом мобильных мешочков (табл. 1, рис. 1), с использованием в двух вариантах расчета четырех значений объема недоступной для переваривания в кишечнике фракции ****

Корм	γ	γ'	Вариант I, c_r x			Вариант II, $c_r + c_r$ x			
			0,8	1,1	1,2	0,05	0,1	0,2	0,3
Кукуруза	0,67	0,47	0,89	0,96	0,99	0,95	0,96	0,76	1,02
	0,80	0,60	0,50	0,55	0,57	0,54	0,55	0,54	0,59
Ячмень	0,62	0,43	0,93	0,97	0,98	1,06	1,07	0,98	1,12
	0,75	0,56	0,96	1,00	1,01	1,12	1,14	1,01	1,21
	0,88	0,69	0,90	0,96	0,98	1,11	1,14	0,98	1,24
	1,00	0,81	0,76	0,84	0,87	1,05	1,09	0,87	1,27
	1,12	0,93	0,57	0,74	0,83	1,10	1,23	0,83	2,25
Пшеница	0,71	0,35	0,90	0,93	0,94	1,02	1,04	0,94	1,09
	0,86	0,50	0,92	0,96	0,98	1,08	1,10	0,98	1,17
	1,00	0,64	0,95	1,00	1,03	1,17	1,20	1,03	1,30
	1,14	0,78	0,95	1,04	1,08	1,30	1,35	1,08	1,57
	1,29	0,93	1,05	1,39	1,57	2,09	2,35	1,57	4,64
Соевый	0,67	0,40	1,03	1,07	1,08	1,18	1,19	1,08	1,25
шрот	0,80	0,53	1,02	1,07	1,08	1,20	1,22	1,08	1,29
	0,93	0,66	0,98	1,04	1,06	1,21	1,24	1,06	1,35
	1,07	0,80	0,81	0,90	0,93	1,13	1,17	0,93	1,37
Подсолнечниковый шрот	1,00	0,10	0,95	0,98	0,99	1,08	1,09	0,99	1,14
	1,20	0,30	0,94	0,99	1,00	1,11	1,13	1,00	1,20
	1,40	0,50	0,91	0.97	0,99	1,13	1,15	0,99	1,26
	1,60	0,70	0,89	0,98	1,01	1,22	1,27	1,01	1,48
	1,80	0,90	1,03	1,38	1,55	2,07	2,33	1,55	4,65

* 0,8; 1,1; 1,2 x c_r для варианта I и 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 x $c_r + c_r$ для варианта II.

Обсуждение результатов и заключение

Результаты расчетов показали, что нисходящая ветвь на выявленной методом мобильных мешочков параболической зависимости переваримости в кишечнике от распадаемости в рубце воспроизводится (прогнозируется) на модели независимо от числа компонент распада (т.е. независимо от числа фракций с разными константами скорости деградации в рубце). При этом оказалось, что наблюдаемые в опыте вариации в положении и форме кривых кишечной переваримости могут быть обусловлены специфической комбинацией величин, характеризующих фракционный состав в

аспекте растворимости и распадаемости в рубце, т.е. факторами, не связанными с гидролитическими процессами в кишечнике.

Если проанализированная модель верна и в реальности «не задействованы» иные механизмы, сказанное может означать, что регистрируемый методом мобильных мешочков спад переваримости обусловлен постепенным увеличением (в зависимости от длительности инкубации) доли недоступного для распада в рубце (и в силу этого недоступного для переваривания в кишечнике) вещества в общем объеме содержимого мешочка. Следовательно, в расчетах объема поступления обменного протеина необходимо будет иметь в виду, что выходящая из преджелудков потенциально распадаемая, но «не до конца распавшаяся» фракция имеет переваримость в кишечнике, не зависящую от распадаемости в рубце.

В качественном отношении изложенное выше интуитивно понятно. Расчеты необходимы для того, чтобы более четко определить понятия, оценить роль разных факторов (в том числе фракционного состава и его гетерогенности по скорости распада в рубце) и сделать количественные заключения для разных кормов. В какой мере эти заключения выполняются на более представительной выборке и для разных структурных компонентов корма (в т.ч. крахмала), можно выяснить лишь в дальнейших исследованиях, в ходе которых вышеизложенные теоретические подходы необходимо уточнить с учетом особенностей переваривания и условий проведения измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Материкин А.М., Харитонов Е.Л. Определение растворимости, распадаемости и переваримости протеина кормов. В кн.: Методы исследования питания сельскохозяйственных животных. Боровск, 1998: 132-140.
2. Mills J.A.N., France J., Dijkstra J. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposal for a mechanistic model: 1. Dietary starch characterization and ruminal starch digestion. J. Anim. Feed Sci., 1999, 8: 291-310.
3. Харитонов Е.Л., Материкин А.М., Мысник Н.Д. Подходы к определению поступления аминокислот из пищеварительного тракта жвачных. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, 2000, 39: 235-245.
4. Kalnitsky B.D., Kharitonov E.L. Modern approaches to estimation of feed value and to rationing in ruminant nutrition. J. Anim. Feed Sci., 2001, 10(1): 105-114.
5. Voigt J., Piatkowsky B., Engelmann M. et al. Measurement of the postruminal digestibility of crude protein by the bag technique in cows. Arch. Tierernahr.., 1985. 35(8): 555-562.
6. Харитонов Е.Л., Харитонов Л.В., Сироткина Ю.В. Нормирование аминокислотного питания молочного скота. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, 2003а, 42:46-55.

7. Харитонов Е.Л. Комплексные исследования процессов рубцового и кишечного пищеварения у жвачных животных в связи с прогнозированием образования конечных продуктов переваривания кормов. Автореф. дисс… д.б.н., Боровск, 2003.

МЕТАБОЛИЗМ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА И РАСПАДА МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ У РАСТУЩИХ БЫЧКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН КОМПЛЕКСНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

К.Т. Еримбетов, Д.И. Шариева, Е.В. Пьянкова, О.В. Обвинцева
Лаборатория белково-аминокислотного питания

Скармливание растущим бычкам на фоне сено-силосно-концентратного рациона разработанной нами кормовой добавки, состоящей из труднодеградируемого в рубце протеина и синтетических азотистых веществ, доступных для микроорганизмов, обеспечило повышение эффективности синтеза мышечных белков на 12,4% и накопление мышечной массы на 18,4%, что в конечном итоге улучшило показатели мясной продуктивности и качества мяса.

Введение

В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку способов управления количественными и качественными показателями мясной продуктивности. Несомненно, что путь к решению этой проблемы у молодняка крупного рогатого скота лежит через повышение эффективности биоконверсии питательных веществ корма в продукцию, прежде всего за счет оптимизации условий питания. Показано, что у интенсивно растущих бычков одним из факторов, лимитирующих интенсивность процессов биосинтеза компонентов мяса, является количество глюкозы и аминокислот, поступающее из желудочно-кишечного тракта в метаболический пул организма (Campbell et al., 1997; Dhiman and Satter, 1997; Bethard et al., 1997; Ludden and Kerley, 1997; Orskov et al., 1999; Abe et al., 1999; Loest et al., 2001). Можно полагать, что в случае адекватного потребностям обеспечения организма растущих бычков аминокислотами можно изменить интенсивность и направленность метаболических процессов в сторону увеличения биосинтеза белка, а следовательно, направленного влияния на качество мяса и мясную продуктивность.

Система питания, разрабатываемая в Корнельском университете (США), предполагает учет качества протеина и углеводов в кормах,

что позволяет более эффективно оптимизировать протеиновое питание жвачных животных и прогнозировать поток аминокислот из кишечника в метаболический пул организма (Beerman et al., 1997). В ранее проведенных исследованиях мы изучали параметры биосинтеза мышечных белков и липидов, показатели мясной продуктивности бычков при использовании рационов с пониженной распадаемостью в рубце протеина и крахмала корма. Установили, что в условиях одинакового содержания в рационе энергии и сырого протеина, использование кормов с пониженной распадаемостью протеина и крахмала в рубце повышает эффективность синтеза мышечных белков и увеличивает массу скелетной мускулатуры.

В результате выявленных ранее закономерностей в процессах метаболизма азотистых веществ в организме молодняка крупного рогатого скота при интенсивном выращивании и откорме, предполагалось разработать и апробировать новый способ повышения биоконверсии питательных веществ корма в компоненты мяса на основе создания комплексной кормовой добавки, включающей протеин с заранее рассчитанной распадаемостью, синтетические азотистые вещества и биологически активные вещества, применение которой позволит улучшить обеспеченность процессов метаболизма аминокислотами, повысить эффективность использования азота на продукцию, снизить количество белковых кормов (шротов) в рационах и в целом уменьшить затраты корма на единицу продукции.

Обоснование способа повышения биоконверсии протеина корма в компоненты мяса у бычков на основе использования новой кормовой добавки, включающей корма с пониженной распадаемостью протеина в рубце и синтетические азотистые вещества и явилось целью настоящей работы. В соответствии с указанной целью в задачу исследований входило изучение метаболизма азотистых веществ и количественных аспектов обмена мышечных белков, а также апробация эффективности использования кормовой добавки в условиях научно-хозяйственного опыта на растущих бычках.

Материал и методы

В соответствии с задачами исследований проведены эксперименты на молодняке крупного рогатого скота в виварии института и в условиях СХП «Родина» Малоярославецкого района, Калужской области.

В виварии института опыт был проведен на 10 бычках черно-пестрой породы в период интенсивного выращивания и откорма, с живой массой тела в начале опыта 145 кг, методом групп. Содержание бычков привязное, кормление 3-разовое индивидуальное по детализированным нормам, разработанным для интенсивных

технологий выращивания и откорма бычков (Наставление…, 1971, Нормы и рационы…, 1994). В период эксперимента ежедневно учитывали потребление корма, а интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешивания до утреннего кормления в течение 2 дней подряд и брали среднюю величину между ними.

В предварительный период опыта в течение трех месяцев животные находились на одном рационе. Бычки были приучены к максимальному потреблению сена и силоса, а интенсивность их роста достигала 900-1000 г среднесуточного прироста живой массы.

В дальнейшем по принципу парных аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста бычки были распределены в две группы по 5 голов в каждой. Животные 1-й группы (контрольной) получали типовой комбикорм на ячменной основе с использованием подсолнечного шрота в качестве основного источника протеина. У животных 2-й группы (опытной) из состава комбикорма был исключен подсолнечный шрот, но вводили комплексную кормовую добавку. В 1 кг кормовой добавки содержалось 0,8 к. ед., 9,63 МДж обменной энергии, 943 г сухого вещества, 447 г сырого протеина и 35 г сырой клетчатки. При этом уровень сырого протеина в комбикорме для бычков опытной группы существенно не отличался от такового в контроле. Ежедневно каждое животное опытной группы получало в составе комбикорма 440 г кормовой добавки. Продолжительность применения 120 дней.

Рационы для животных обеих групп состояли из сена злакового, силоса злакового и комбикорма. При этом исходили из принципа, что уровень комбикорма должен быть в пределах 50-55% обменной энергии рациона. Состав и питательность рациона для бычков в период проведения балансового опыта приведены в таблицах 1 и 2.

Перед началом опытного периода (возраст 11 месяцев) провели 2-суточный отбор мочи для определения экскреции с мочой 3-метилгистидина и креатинина, а также брали методом биопсии пробы длиннейшей мышцы спины (в области 1-3 поясничных позвонков) с целью характеристики исходных параметров обмена мышечных белков. В 11- (до дифференцированного кормления), 14- и 15-месячном возрасте были взяты пробы крови пункцией яремной вены до утреннего кормления животных и через 3 часа после него. В ходе эксперимента провели балансовый опыт (в 14-месячном возрасте) с целью определения переваримости и усвоения азотистых веществ корма. В конце опыта провели убой животных для оценки состава туши и мясной продуктивности бычков и взяли пробы органов и тканей для биохимических исследований.

Для характеристики метаболизма азотистых веществ определяли: в плазме крови концентрацию мочевины по Coulambe, Fawreon (1963); и концентрацию свободных аминокислот на аминкислотном

анализаторе AAA-T-339; активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в длиннейшей мышце спины и печени по Reitman, Frankel (1967); содержание общего азота в кормах, кале, моче по Къель-

Таблица 1. ***Рацион для 14-месячных бычков контрольной группы с живой массой 360 кг при суточном приросте массы тела 1300 г (виварий)***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковое	комбикорм	
Масса корма, кг	2,4	12	4,5	18,9
Кормовые единицы	1,32	4,44	4,73	10,49
Обменная энергия, Мдж	16,08	29,4	47,25	92,72
Сухое вещество, кг	2,08	3,02	4,19	9,29
Сырой протеин, г	211	460	661	1332
Переваримый протеин, г	116	300	512	928
Сырой жир, г	62	156	117	335
Сырая клетчатка, г	562	870	209	1641
Крахмал, г	28,8	24	1503	1556
Сахар, г	84	36	115	235
Поваренная соль, г			31,5	31,5
Кальций, г	18,24	25,2	22,8	66,24
Фосфор, г	17,47	7,2	25,7	50,44
Магний, г	2,16	4,8	12,43	19,38
Калий, г	33,6	43,2	26,6	103,4
Сера,г	2,88	3,6	12,52	19
Железо, мг	1258	668	590	2516
Медь, мг	4,8	10,8	52,6	68,2
Цинк, мг	41	50,4	404,2	495,6
Кобальт, мг	0,48	0,48	5,49	6,45
Марганец, мг	128	576	399	1103
Йод, мг	0,72	1,2	7,56	9,48
Каротин, мг	60	120	-	180
Витамин А, тыс. ИЕ	-	-	67,5	67,5
Витамин Д, тыс. ИЕ	0,96	0,78	12,27	14,01
Витамин Е, мг	216	540	186	942

далю. Химический анализ мышечной ткани (сухое вещество, азот, липиды) проводили по общепринятым методам (Лебедев, Усович, 1976). В пробах длиннейшей мышцы спины определяли также фракционный состав белков (саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные) по Helander (1957). Для оценки качества мяса были выбраны следующие показатели: pH в динамике его созревания,

влагоудерживающая способность мяса, окраска мяса, нежность мяса, белково-качественный показатель мяса (Гуменюк, Черкасская, 1977).

В качестве интегральных показателей, характеризующих интенсивность и направленность метаболических процессов, были избраны скорости отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани.

Таблица 2. ***Рацион для 14-месячных бычков опытной группы с живой массой 360 кг при суточном приросте массы тела 1300 г (виварий)***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковое	комбикорм	
Масса корма, кг	2,4	12	4,5	18,9
Кормовые единицы	1,32	4,44	4,86	10,62
Обменная энергия, Мдж	16,08	29,4	46,80	92,26
Сухое вещество, кг	2,08	3,02	4,19	9,29
Сырой протеин, г	211	460	675	1346
Переваримый протеин, г	116	300	512	929
Сырой жир, г	62,4	156	113,8	332
Сырая клетчатка, г	562	870	168	1600
Крахмал, г	28,8	24	1778	1831
Сахар, г	84	36	84	204
Поваренная соль, г			31,5	31,5
Кальций, г	18,24	25,2	24,8	68,24
Фосфор, г	17,47	7,2	27,8	52,2
Магний, г	2,16	4,8	7,07	14,03
Калий, г	33,6	43,2	24,5	101,3
Сера,г	2,88	3,6	11,34	18,17
Железо, мг	1258	668	455	2382
Медь, мг	4,8	10,8	48,6	64,2
Цинк, мг	41	50,4	415	506,4
Кобальт, мг	0,48	0,48	5,31	6,17
Марганец, мг	128	576	381	1085
Йод, мг	0,72	1,2	7,19	9,11
Каротин, мг	60	120	3,0	183
Витамин А, тыс. ИЕ	-	-	67,5	67,5
Витамин Д, тыс. ИЕ	0,96	0,78	9,23	10,97
Витамин Е, мг	216	540	202	958

Для их расчета в начале и конце каждого периода опыта у животных определяли суточную экскрецию с мочой креатинина, которая пропорциональна количеству мышечной ткани в организме бычков. На основании этих данных рассчитывали количество

мышечной ткани и среднесуточную скорость её накопления. В образцах мышечной ткани, взятой путем биопсии, определяли концентрацию белков и по ней, с учетом количества мышечной ткани, рассчитывали скорость отложения мышечных белков. Определение в эти периоды суточной экскреции 3-метилгистидина с мочой позволило определить скорость распада мышечных белков и, с учетом скорости их отложения, установить параметры синтеза и оценить в целом эффективность процессов биосинтеза мышечных белков с использованием коэффициентов, предлагаемых Goppinath et al. (1984), Nishisawa et al. (1979) и сотрудниками нашей лаборатории.

Таблица 3. ***Рацион для 14-месячных бычков контрольной группы с живой массой 300 кг при суточном приросте массы тела 900-1000 г (СХП «Родина»)***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковое	дерть смеси зерна + соль и мел	
Масса корма, кг	6,5	7,5	3,0	17,0
Кормовые единицы	3,9	1,65	3,24	8,79
Обменная энергия, Мдж	44,01	14,63	29	87,6
Сухое вещество, кг	5,62	2,05	2,69	10,36
Сырой протеин, г	533	184	292	1009
Переваримый протеин, г	293	101	190	584
Сырой жир, г	176	61	57	294
Сырая клетчатка, г	1716	608	137	2461
Крахмал, г	130	27	1404	1561
Сахар, г	189	48	28	265
Поваренная соль, г			27	27
Кальций, г	35,1	14,8	14,57	64,5
Фосфор, г	7,15	4,58	10,44	22,2
Магний, г	5,2	5,1	3,3	13,6
Калий, г	125	52,4	13,9	191,3
Сера,г	9,75	4,58	3,8	18,13
Железо, мг	2171	1425	138	3734
Медь, мг	21,5	16,5	15,0	53,0
Цинк, мг	133	56,9	51,8	242
Кобальт, мг	2,86	0,38	0,48	3,72
Марганец, мг	743	158	59	960
Йод, мг	2,15	0,6	0,45	3,2
Каротин, мг	91	82,5	-	174
Витамин А, тыс. ИЕ	-	-	-	-
Витамин Д, тыс. ИЕ	1,95	1,0	-	2,95
Витамин Е, мг	189	210	105	504

Концентрацию 3-метилгистидина в моче определяли на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339, содержание креатинина в моче и плазме крови химическим методом (Лемперт, 1968).

Апробацию разработанного способа повышения биоконверсии питательных веществ корма в продукцию при выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота проводили в условиях СХП «Родина» Малоярославецкого района, Калужской области. По принципу парных аналогов с учетом возраста и живой массы было сформировано две группы 11-12 месячных бычков по 20 голов в каждой. В среднем их живая масса в начале опыта составляла в пределах 215-220 кг. Содержание животных привязное, кормление индивидуальное, 2-разовое.

Таблица 4. ***Рацион для 14-месячных бычков опытной группы с живой массой 300 кг при суточном приросте массы тела 900-1000 г (СХП «Родина»)***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковое	дерть смеси зерна + соль, мел и комплексная корм. добавка	
Масса корма, кг	6,5	7,5	3,0	17,0
Кормовые единицы	3,9	1,65	3,27	8,82
Обменная энергия, Мдж	44,01	14,63	29,8	88,4
Сухое вещество, кг	5,62	2,05	2,79	10,46
Сырой протеин, г	533	184	394	1111
Переваримый протеин, г	293	101	256	650
Сырой жир, г	176	61	61	298
Сырая клетчатка, г	1716	608	122	2446
Крахмал, г	130	27	1224	1381
Сахар, г	189	48	28	265
Поваренная соль, г			27	27
Кальций, г	35,1	14,8	14,1	64
Фосфор, г	7,15	4,58	16,5	28,2
Магний, г	5,2	5,1	3,36	13,7
Калий, г	125	52,4	13,2	191
Сера,г	9,75	4,58	5,22	19,6
Железо, мг	2171	1425	171	3767
Медь, мг	21,5	16,5	19,7	57,7
Цинк, мг	133	56,9	80	270
Кобальт, мг	2,86	0,38	0,5	3,74
Марганец, мг	743	158	60	961
Йод, мг	2,15	0,6	0,6	3,35
Каротин, мг	91	82,5	0,21	174

Витамин А, тыс. ИЕ	-	-	45	45
Витамин Д, тыс. ИЕ	1,95	1,0	6,0	8,95
Витамин Е, мг	189	210	127	526

Рационы бычков обеих групп включали сено злаковое, силос злаковый и дерть смеси зерна (60% ячменя, 30% пшеницы и 10% овса).

Бычкам контрольной группы (хозяйственный рацион) к зерновой дерти добавляли поваренную соль и мел, а животным опытной группы поваренную соль, мел и комплексную кормовую добавку в дозе 312 г на голову в сутки. Состав и питательность рационов с учетом дачи кормовой добавки приведены в таблицах 3 и 4. Продолжительность опыта 100 дней. В начале опыта и каждый месяц в течение опыта проводили взвешивание бычков. В конце опыта брали пробы крови пункцией яремной вены, длиннейшей мышцы спины и провели контрольный убой животных по 7 голов из каждой группы. В пробах крови определяли концентрацию мочевины, свободных аминокислот, креатинина. В длиннейшей мышце спины определяли также фракционный состав белков, сухое вещество, белок, липиды, концентрацию свободных аминокислот, активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. Для оценки качества мяса были выбраны те же показатели, что и в опыте на виварии.

Результаты всех исследований были обработаны с применением математических методов (Овсянников, 1976).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что улучшение обеспеченности процессов метаболизма аминокислотами, за счет использования в кормлении бычков кормовой добавки, содержащей труднодеградируемый в рубце протеин и синтетические азотистые вещества, в условиях изопротеиновых рационов в период интенсивного доращивания и откорма позволило на 7,7% увеличить среднесуточный прирост живой массы животных (у бычков опытной группы он составил 1318±56, у контрольных 1224±59 г). В целом за 120 дней опыта прирост живой массы у бычков контрольной группы составил 147±7,0 кг, а у животных опытной группы – 158,0±6,7 кг, что на 7,5% больше. В среднем от каждого бычка опытной группы было дополнительно получено 11,0 кг прироста живой массы на фоне сбалансированного кормления. При этом у бычков опытной группы за весь период опыта повышалась не только интенсивность роста, но и снижалось потребление корма и питательных веществ по сравнению с контролем: комбикорма – на 2,06, сухого вещества – на 4,18, сырого

протеина – на 4% и обменной энергии на 0,98 %. Следовательно, опытные животные меньше затратили сухого вещества (на 4,1 %), сырого протеина (на 7,7 %) и обменной энергии (на 4,2%) на единицу получаемой продукции.

Несмотря на снижение потребления с кормом сырого протеина за весь период опыта, результаты балансовых опытов показали, что у животных, получавших кормовую добавку в составе комбикорма, потребление азота корма было несколько выше контроля (табл.5).

Таблица 5. *Параметры использования азота корма, г/сутки*

Показатели	Группы	
	контроль	**опыт**
14-месячный возраст – опытный период		
Принято азота с кормом	**183,87 ± 5,38**	**190,94 ± 3,12**
Выделено: с калом	59,72 ± 3,96	**64,48 ± 1,89**
с мочой	**77,58 ± 1,86**	**74,67 ± 4,52**
Переварено, г	**124,01 ± 4,60**	**126,46 ± 1,99**
%	**67,47 ± 1,72**	**66,24 ± 0,65**
Усвоено, г	**46,58 ± 4,30**	**51,80 ± 4,83**
% от принятого	**25,23 ± 1,72**	**27,16 ± 2,67**
% от переваренного	**37,38 ± 2,38**	**40,96 ± 3,62**

В то же время при меньшем количестве переваренного сырого протеина в опытной группе, отложение азота было больше за счет меньшего выделения его с мочой, что свидетельствует о более высокой эффективности использования у них азота в обменных процессах. В пользу последнего утверждения говорят и данные таблицы 6.

Таблица 6. *Эффективность использования азота бычками*

Возраст	Контроль			Опыт		
	потреблено N с кормом, г/сутки	**выделено N с мочой, г/сутки**	**N мочи / N потребл.**	**потреблено N с кормом, г/сут**	**выделено N с мочой, г/сут**	**N мочи / N потребл.**
11-мес – исходные данные	96,1 ±2,3	28,5±1,3	0,30	**99,7±3,8**	**32,3±1,8**	**0,32**
14-мес – опытный период	183,9±5,4	77,6±1,9	0,42	**191±3,1**	**74,7±4,5**	**0,39**
15-мес – опытный период	191,5±5,1	75,7±3,9	0,40	**203±2,3**	**69,6±1,7**	**0,34**

Как следует из таблицы 6, у бычков опытной группы отношение выделенного азота с мочой к потребленному во все периоды опыта было на 7 – 15% ниже, чем у контрольных животных. По-видимому, более низкая распадаемость сырого протеина кукурузного глютена и соевого шрота, как основных компонентов кормовой добавки, обусловила меньшее образование аммиака в рубце и улучшение обеспеченности процессов метаболизма лимитирующими аминокислотами бычков опытной группы. Соответственно, в течение всего опыта у них, по сравнению с контролем, уровень мочевины – конечного продукта азотистого обмена в плазме крови до кормления был ниже на 8,2-12,2%, тогда как через 3 часа после кормления он был ниже у животных контрольной группы, в связи с содержанием синтетических азотистых соединений в кормовой добавке (табл. 7).

Таблица 7. ***Концентрация мочевины в плазме крови бычков, ммоль/л***

Контроль		*Опыт*	
до кормления	через 3 часа после кормления	до кормления	через 3 часа после кормления
11-месячный возраст – исходные данные			
2,80 ± 0,28	3,01 ± 0,38	2,71 ± 0,33	2,95 ± 0,26
14-месячный возраст – опытный период			
3,54 ± 0,22	4,33 ± 0,31	3,25 ± 0,23	4,62 ± 0,19
15-месячный возраст – опытный период			
4,75 ± 0,22*	5,14 ± 0,30	4,17 ± 0,14*	5, 49± 0,21

Здесь и далее * - p < 0,05; ** - p<0.01; *** - p<0,005

Об усилении потока аминокислот из кишечника в кровь под влиянием кормовой добавки, содержащей протеин с пониженной распадаемостью в рубце и синтетические азотистые соединения, свидетельствуют и данные по концентрации свободных аминокислот в плазме крови бычков.

Как видно из таблицы 8, у бычков опытной группы уровень свободных аминокислот в плазме крови через 3 часа после кормления был на 6,9% выше, чем у контрольных животных. При этом наиболее заметное увеличение отмечалось по незаменимым аминокислотам (на 11,3 %). Эти изменения в потреблении и усвоении азота, в уровне свободных аминокислот указывают на лучшую обеспеченность процессов метаболизма аминокислотами, что в свою очередь способствовало некоторому изменению характера обмена белков в скелетных мышцах. Так, бычки опытной группы по уровню и интенсивности наращивания скелетной мускулатуры и по отложению белка в мышцах превосходили животных контрольной группы (табл. 9, рис. 1). Например, среднесуточный прирост мышечной ткани у них был выше контроля на 18,41%, отложение белка в скелетных мышцах при этом повысилось на 18,58% (табл. 9)

Таблица 8. ***Концентрация свободных аминокислот в плазме крови бычков, мг%***

Аминокислоты	Через 3 часа после кормления			
	11-месячный возраст		15-месячный возраст	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Аспарагиновая кислота	0,50 ± 0,02	0,41± 0,03	0,43 ± 0,007	0,42 ± 0,03
Треонин	0,68 ± 0,04	0,58 ± 0,07	0,71 ± 0,006	0,80 ± 0,05
Серин	1,00 ± 0,07	0,92 ± 0,04	0,63 ± 0,04	0,73 ± 0,05
Глутаминовая кислота	1,99 ± 0,12	2,03 ± 0,17	2,91± 0,08	3,00 ± 0,10
Глицин	2,69 ± 0,19	2,20 ± 0,13	3,33 ± 0,21	3,40 ± 0,22
Аланин	2,18 ± 0,22	2,10 ± 0,16	3,04 ± 0,12	2,90 ± 0,09
Валин	2,53 ± 0,11	2,36 ± 0,10	3,03 ± 0,11	3,49 ± 0,16*
Цистин	0,39 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,50 ± 0,18
Метионин	0,33 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,07	0,51 ± 0,10
Изолейцин	1,18 ± 0,05	1,18 ± 0,08	1,66 ± 0,08	1,76 ± 0,09
Лейцин	1,26 ± 0,06	1,28 ± 0,09	1,53 ± 0,11	1,98 ± 0,15*
Тирозин	0,84 ± 0,05	0,90 ± 0,07	1,57 ± 0,09	1,60 ± 0,05
Фенилаланин	0,85 ± 0,06	0,92 ± 0,05	1,03 ± 0,07	1,09 ± 0,07
Лизин	1,14 ± 0,09	1,31± 0,10	1,25 ± 0,07	1,35 ± 0,06
Гистидин	1,09 ± 0,08	1,12 ± 0,06	1,27 ± 0,07	1,48 ± 0,05*
Аргинин	2,19 ± 0,11	2,17 ± 0,15	2,46 ± 0,12	2,42 ± 0,09
Сумма аминокислот	20,78 ± 0,62	20,70 ± 0,90	25,67 ± 0,89	27,43 ± 0,97
в т.ч. незаменимых	11,27 ± 0,42	11,78± 0,54	13,37 ± 0,57	14,88 ± 0,68
заменимых	9,51± 0,31	8,92 ± 0,44	12,30 ± 0,42	12,55 ± 0,49

Таблица 9. ***Параметры отложения мышечных белков и прироста мышечной ткани у бычков***

Показатели	**Группы**		**% к**
	контроль	**опыт**	**контролю**
11-месячный возраст – исходные данные			
Количество мышечной ткани, кг	88,75 ± 3,98	**90,07 ± 2,85**	**101,49**
Количество белка в мышечной ткани, кг	16,97 ± 0,99	**17,01 ± 0,54**	**100,24**
15-месячный возраст – опытный период			
Количество мышечной ткани, кг	**155,3± 4,02**	**168,8 ± 5,80**	**108,71**
Количество белка в мышечной ткани, кг	**30,56 ± 1,11**	**33,08 ± 1,81**	**108,25**
Среднесуточный прирост мышечной ткани, г/сут	**554 ± 25,1**	**656 ± 35,9***	**118,41**
Среднесуточный прирост белка в мышечной ткани, г/сут	**113 ± 4,9**	**134 ± 6,8***	**118,58**

Величина отложения мышечных белков и прирост мышечной ткани зависят от соотношения интенсивности двух противоположных процессов – синтеза и распада белков. Данные опыта свидетельствуют,

что более высокое накопление мышечных белков у бычков опытной группы обусловлено как повышением скорости их синтеза, так и деградации, но интенсивность синтеза белков превалировала над распадом, и у них она была выше на 5,49%. Соответственно выше была и скорость их отложения. В результате этого у опытных бычков эффективность синтеза мышечных белков повысилась на 12,39% по сравнению с

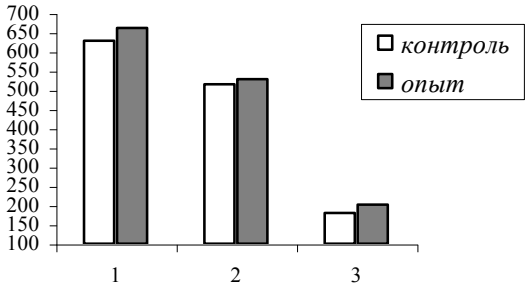


Рис.1 Параметры обмена мышечных белков 15-мес бычков.
1 - скорость синтеза белков, г/сут; 2 - скорость распада белков, г/сут; 3- эффективность синтеза белков, % (×10)

контролем (рис.1). В исследованиях других авторов (Wessels et al., 1997) было также показано увеличение скорости и эффективности синтеза белков тела у бычков при инфузии в кровь в течение 14 дней смеси лимитирующих аминокислот (лизина, метионина, треонина, триптофана, гистидина и аргинина) на фоне сено-кукурузного рациона при уровне сырого протеина 10%.

Также следует отметить, что у бычков опытной группы, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы, имело место и повышенное отложение липидов в длиннейшей мышце спины по сравнению с контролем (табл. 10). Концентрация общих липидов была более высокой у животных опытной группы и в гомогенате мышц, полученных после убоя животных (табл. 11).

Таблица 10. ***Концентрация белка и липидов в длиннейшей мышце спины, г%***

Возраст	Контроль		Опыт	
	белок	липиды	белок	липиды
11-месяцев – исходные данные	19,1 ± 0,14	1,15± 0,06	**18,88± 0,18**	**1,10± 0,05**
15-месяцев – опытный период	19,7± 0,13	1,90± 0,04	**19,60± 0,15**	**2,02± 0,06**

Приведенные данные свидетельствуют, что увеличение интенсивности синтеза белков и липидов за счет оптимизации условий протеинового питания бычков происходит на фоне одновременного повышения скорости их деградации, то есть, наблюдалось усиление обмена белков и липидов у бычков.

Таблица 11. *Химический состав мышц бычков 15 – месячного возраста, %*

Показатели	Группы	Длиннейшая мышца спины	Гомогенат средней пробы мышц
Сухое вещество	контрольная	24,32± 0,09	**26,52± 0,18**
	опытная	24,88± 0,10	**26,81± 0,10**
Белок	контрольная	19,68± 0,13	**18,98± 0,17**
	опытная	19,60± 0,15	**18,84± 0,09**
Общие липиды	контрольная	**1,90± 0,04**	**3,70 ± 0,10**
	опытная	**2,02± 0,06**	**3,82± 0,12**

Различия в эффективности использования азота и связанные с этим изменения в обмене белков скелетных мышц у бычков разных групп нашли отражение в убойных и мясных качествах (табл.12). В туше бычков опытной группы по сравнению с контролем было больше мякоти (на 9,0%), отношение количества мякоти к выходу костей также оказалось на 25,3% выше, чем у контрольных животных. Это свидетельствует о лучшей омускуленности туш у бычков опытной группы.

Таблица 12. ***Показатели мясной продуктивности 15-месячных бычков***

Показатели	Группы		% к контролю
	контроль	опыт	
Масса туши, кг	209,5± 4,78	217,7± 8,7	103,9
Убойный выход туши, %	52,9± 1,19	55,8± 1,37	105,4
Количество мякоти в туше, кг	162,0± 4,58	176,5± 7,70	109,0
Количество мякоти в туше, %	77,3± 0,70	81,0± 0,56	104,8**
Количество костей в туше, кг	47,6±1,15	41,5± 1,51	87,2*

Количество костей в туше, %	22,7± 0,62	19,1± 0,54	84,1***
Отношение мякоти /кости	3,40± 0,13	4,25± 0,15	114,57**

Необходимо отметить, что обеспеченность метаболизма подопытных животных аминокислотами, за счет скармливания кормовой добавки, отразилась как на количестве, так и на качестве мяса. Мясо животных опытной группы отличалось более высокими значениями физико-химических показателей, а также большим содержанием полноценных белков по сравнению с контролем (табл.13).

Таблица 13. ***Физико-химические и качественнные показатели мяса 15-месячных бычков***

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
pH через 1,5 часа после убоя	6,46 ± 0,05	6,43 ± 0,03
pH через 24 часа после убоя	5,54 ± 0,02	5,53 ± 0,05
Интенсивность окраски, ед. (экстинция×1000)	247,4 ± 12	279,2 ± 11
Нежность мяса, $см^2$ / г	1159,5 ± 24*	1256,1 ± 28*
Влагоудерживающая способность, %	71,54 ± 4,8*	89,6 ± 5,1*
Качественный показатель белков, ед. (отношение саркоплазм.+миофибрил. к стромальной фракции мышечных белков)	4,91 ± 0,18	5,50 ± 0,15*

Как указывалось выше, апробацию разработанного способа повышения биоконверсии питательных веществ корма в продукцию при выращивании и откорме бычков проводили в СХП “Родина” Малоярославецкого района, Калужской области. Применение в кормлении бычков разработанной нами кормовой добавки в условиях хозяйства позволило на 19,3% увеличить среднесуточный прирост живой массы животных (у бычков опытной группы он составил 1064±35, у контрольных 892±21 г ($p < 0,0001$)).

Результаты контрольного убоя показали, что применение добавки обеспечило не только повышение интенсивности роста молодняка крупного рогатого скота, но и повысило качество мясной продукции, получаемой от них. В частности, в туше бычков опытной группы по сравнению с контролем было больше мякоти на 9,7% на фоне снижения на 10,4% количества костей. В результате этого в туше животных опытной группы по сравнению с контролем достоверно выше было отношение мясо/кости, что свидетельствует о более высоком качестве говядины (табл. 14).

Таблица 14. ***Показатели мясной продуктивности 15-месячных бычков в СХП "Родина"***

Показатели	Группы		% к контролю
	контроль	опыт	
Живая масса, кг	331 ± 5,6	340 ± 5,9	102,7
Масса туши, кг	163,5 ± 3,04	171,6 ± 4,9	104,9
Убойный выход туши, %	49,4 ± 3,04	50,5 ± 0,97	102,2
Количество мякоти в туше, кг	125,1 ± 3,01	137,2 ± 4,23	109,7*
Количество мякоти в туше, %	76,5 ± 0,52	79,9 ± 0,41	104,4***
Количество костей в туше, кг	38,4 ± 0,61	34,4 ± 0,99	89,6***
Количество костей в туше, %	23,5 ± 0,52	20,1 ± 0,41	85,5***
Отношение мякоти /кости	3,27 ± 0,1	3,99 ± 0,1	122,0***

Также следует отметить, что у животных опытной группы, как и в опыте на бычках в виварии института, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы, имело место и повышенное отложение липидов в длиннейшей мышце спины по сравнению с контролем (табл. 15).

Таблица 15*. Химический состав мышц бычков 15 - месячного возраста в СХП "Родина", %*

Показатели	**Группы**	**Длиннейшая мышца спины**
Сухое вещество	контрольная	23,70± 0,08
	опытная	23,98± 0,09
Белок	контрольная	19,52± 0,11
	опытная	19,98± 0,14
Общие липиды	контрольная	**1,31± 0,05**
	опытная	**1,43± 0,07**

Таблица 16. Физико-химические и качественнные показатели мяса 15-месячных бычков в СХП "Родина"

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
pH через 24 часа после убоя	5,70 ± 0,04	5,72 ± 0,05
Интенсивность окраски, ед. (экстинция×1000)	250 ± 13	278 ± 15
Нежность мяса, $см^2$ / г	1047,2 ± 31	1103,6 ± 25
Влагоудерживающая способность, %	74,6 ± 5,9	85,6 ±4,8
Качественный показатель белков, ед. (отношениесаркоплазм.+миофибрилл. к стромальной фракции мышечных белков)	4,00 ± 0,18	4,5 ± 0,27

При этом так же отмечено, что мясо животных опытной группы отличалось более высокими значениями физико-химических показателей, а также большим содержанием полноценных белков по сравнению с контролем (табл.16). В плазме крови опытных животных обнаружена.

Таблица 17. ***Концентрация мочевины и креатинина в плазме крови бычков в СХП "Родина"***

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
Мочевина, ммоль/л в плазме крови до кормления	2,01 ± 0,15	2,17 ± 0,19
Мочевина, ммоль/л в плазме крови через 3 ч. после кормления	2,10 ± 0,17	2,46 ± 0,22
Креатинин, ммоль/л в плазме крови	88,10 ± 2,37*	96,36 ± 3,26*

достоверно высокая концентрация креатинина (метаболита, характеризующего массу скелетных мышц), которая положительно коррелировала с количеством мякоти в туше. У этих бычков выше было и содержание мочевины в крови, что согласуется с данными по уровню сырого протеина в рационах (табл. 17).

Заключение

Результаты исследований, представленные в данной работе, показывают, что скармливание бычкам в период интенсивного выращивания и откорма комплексной кормовой добавки, состоящей из труднодеградируемого в рубце протеина и синтетических азотистых веществ, как в условиях сбалансированного питания, так и при использовании на фоне хозяйственных рационов положительно сказалось на повышении эффективности использования азотистых веществ корма. Это, в свою очередь, способствовало повышению эффективности синтеза белка в скелетных мышцах на 12,4 % и увеличению массы скелетной мускулатуры на 18,4 % и, в конечном итоге, обеспечило улучшение показателей мясной продуктивности за счет лучшей обеспеченности аминокислотами процессов синтеза основного компонента мяса – мышечной ткани. При этом значительно повысилась конверсия питательных веществ корма в производство говядины. Количественные показатели формирования мышечной ткани при интенсивном выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота подтвердили необходимость оптимизации протеинового питания жвачных и прогнозирования потока аминокислот из кишечника в метаболический пул организма путем учета качества протеина в кормах.

В целом проведенные исследования свидетельствуют об актуальности исследований по изысканию путей повышения биоконверсии питательных веществ корма в компоненты продукции и улучшения ее качества за счет направленной регуляции метаболизма и биосинтеза. Необходимо продолжить эти разработки с перспективой совершенствования способов повышения биоконверсии питательных веществ корма у откармливаемых бычков в компоненты мяса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campbell C.G., Titgemeyer E.C. and St-Jean G. Sulfur Amino Acid Utilization by Growing Steers. J. Anim. Sci., 1997, 75:230-238.
2. Dhiman T.R. and Satter L.D. Effect of Ruminally Degraded Protein on Protein Available at the Intestine Assessed Using Blood Amino Acid Concentrations. J. Anim. Sci., 1997, 75:1674-1680.
3. Bethard G.L., James R.E. and McGilliard M.L. Effect of Rumen-Undegradable Protein and Energy on Growth and Feed Efficiency of Growing Holstein Heifers. J. Dairy Sci., 1997, 80: 2149-2155.
4. Ludden P.A. and Kerley M.S. Amino Acid and Energy Interrelationships in Growing Beef Steers: 1. The Effect of Level of Feed Intake on Ruminal Characteristics and Intestinal Amino Acid Flows. J. Anim. Sci., 1997, 75: 2550-2560.
5. Orskov E.R. et al. Effect of supply on fasting nitrogen excretion and effect of level and type of volatile fatty acid infusion on response to protein infusion in cattle. Brit. J. Nutr., 1999, 81: 389-393.
6. Abe M. et al. Absence of Limiting Amino Acids in Calves Fed a Corn and Soybean Meal Diet Past Three Months of Age. J. Anim. Sci., 1999, 77:769-779.
7. Loest C.A. et al. Branched-chain amino acids for growing cattle limit-fed soybean hull-based diets. J. Anim. Sci., 2001, 79:2747-2753.
8. Beermann D.H., Robinson T.F., Knaus W.F. and Fox D.G. Formulation of protein supplements to provide ideal amounts of absorbed amino acids in growing cattle. Procedings 1997 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Cornell University, Ithaca, NY, 1997. 172-180.
9. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971.- 30с.
10. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. Часть I. Крупный рогатый скот. Под ред. акад. РАСХН А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова проф. В.В.Щеглова. М.: Знание, 1994. 400 с.
11. Coulambe S.S., Favreon S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem. 1963, 1, 9: 23.
12. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the transaminases. Am. J. Clin. Path., 1957, 1: 28.
13. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976, 389.

14. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasma and myofibrile protein content of normal and atrophy skeletal muscle. Acta physiological Scand., 1957, 41: 141.
15. Гуменюк Г.А., Черкасская Н.В. Методические рекомендации по исследованию кормов и продуктов животноводства. Киев, 1977, 256.
16. Goppinath R., Kitts W.D. Growth, N-methylhistidine excretion and muscle protein degradation in growing beef steers. J. Anim. Sci., 1984, 59: 1262-1269.
17. Nishizawa N., Joyoda Y., Noguchi T. et al. N-methylnistidine content of organs and tissues of cattle and an attempt to estimate fractional catabolic and synthesis rates of myofibrillar proteins of skeletal muscle during growth by measuring urinary output of N-methylhistidine. Brit. J. Nutr., 1979, 42: 247.
18. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев,1968.18-20.
19. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве М.: Колос, 1976, 210.
20. Wessels R.H., Titgemeyer E.C. and Jean G. St. Effect of Amino Acid Supplementation on Whole-Body Protein Turnover in Holstein Steers. J. Anim. Sci. 1997, 75: 3066-3073.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ГЛЮКОЗЫ, ГОРМОНОВ В КРОВИ И ПРОДУКТИВНОСТЬ БЫЧКОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА МЯСО НА ФОНЕ РАЗНОГО УРОВНЯ ПРОТЕИНА В ИХ РАЦИОНЕ

В.П. Галочкина, В.А. Матвеев, А.М. Коровяцкий, Т.Н. Дворецкая
Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности

На бычках черно-пестрой породы на фоне принятого в хозяйстве рациона с уровнем протеина 9,73 %, довели этот показатель до уровня 10,62 % с помощью комплексной кормовой добавки, содержащей высокопротеиновые корма с пониженной распадаемостью в рубце протеина и компоненты, активизирующие микробиальные процессы в рубце. Повышение уровня протеина в рационе привело к увеличению концентрации глюкозы в крови, гормонов, связанных с ее использованием и синтезом, в сыворотке крови, что указывает на лучшую обеспеченность синтетических процессов в организме животных, проявившуюся в повышении интенсивности роста на 19,3 %.

Введение

В зависимости от поступления метаболитов из желудочно-кишечного тракта меняется и секреторная функция желез внутренней секреции, что, в свою очередь, влияет на активность ферментов в тканях и в целом на обмен веществ в организме животных и их продуктивность. Наибольшее влияние кишечные метаболиты (глюкоза, аминокислоты, длинноцепочечные жирные кислоты) и поступающие из рубца летучие жирные кислоты оказывают на

активность поджелудочной железы, надпочечников, а так же передней доли гипофиза. Именно минимальные изменения в содержании этих метаболитов в крови воспринимают рецепторы бета-клеток поджелудочной железы. Функцией данных клеток и секретируемого ими инсулина является регуляция обмена белков, липидов и углеводов, в том числе, обеспечение тканевых клеток организма глюкозой (Балаболкин, 1998). Инсулину отводится ведущее место в гомеостазе глюкозы. Он является единственным гормоном, стимулирующим синтез и повышение активности «ключевых» ферментов, катализирующих фосфорилирование глюкозы в печени, мышечной и жировой тканях, что ведет к активации гликолитического и пентозного пути окисления глюкозы. При низкой концентрации глюкозы в крови усиливается процесс глюконеогенеза, а активируются эти процессы глюкокортикоидами и соматотропином. Глюкокортикоиды осуществляют регуляцию интенсивности глюконеогенеза из аминокислот и проявляют катаболические свойства (Балаболкин, 1998). Инсулин усиливает транспорт глюкозы через клеточные мембраны и использует ее в качестве энергии в процессах синтеза, а также осуществляет транспорт аминокислот через клеточные мембраны, стимулируя биосинтез тканевых белков и, в первую очередь, мышечных (Buttery, 1983, Галяс, 1999). Он не только стимулирует, но и регулирует биосинтез мышечных белков, так как инсулин через регуляцию синтеза простогландинов $F_{2\alpha}$ и E_2 усиливает или снижает процессы синтеза или деградации мышечных белков (Reeds et al., 1985). Влияние инсулина на метаболизм веществ противоположно действию гормонов, стимулирующих глюконеогенез, которые уменьшают периферийное использование глюкозы, в том числе и в мышечной ткани (Rannels et al., 1980). Тиреоидные гормоны при физиологических уровнях играют важную роль в регуляции роста мышц, влияя как на анаболические, так и на катаболические процессы и это влияние дозозависимо (Brown et al., 1981). Тиреоидные гормоны усиливают основной обмен, что проявляется в увеличении количества и размера митохондрий, митохондриальной мембраны и количества рибосом. Эти изменения приводят к усилению выработки энергии за счет повышения активности ферментов глицерофосфатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, цитохрома С, НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (Митев и др., 1973, Ньюсхолм и др., 1977). Совокупность гормонального воздействия на организм и регулирует проявление его продуктивного потенциала. Продуктивными качествами бычков, выращиваемых на мясо, являются величина их прироста, а повышение роста и наращивания мышечной массы тела при снижении затрат на их производство зависит от рационального обеспечения кормами. В задачу исследования входило изучение влияния разного уровня протеина на концентрацию глюкозы в крови,

гормонов в сыворотке крови, на интенсивность роста и наращивание мышечной массы у бычков, выращиваемых на мясо. Поставленная цель достигалась путем введения в зерновую дерть комплексной кормовой добавки, обеспечивающей большее поступление аминокислот в кишечник как за счет кормов с низкой распадаемостью протеина в рубце, так и за счет компонентов для обеспечения активной жизнедеятельности микроорганизмов в рубце и большего поступления в кишечник микробиального белка.

Материал и методы

Эксперимент проведен на бычках черно-пестрой породы в СХП «Родина» Калужской области, продолжительностью 3 месяца. Были сформированы две группы бычков по 20 голов в каждой. Живая масса при постановке на опыт в среднем составила 216 ± 8,3 кг в контрольной и опытной группах. Бычки контрольной группы находились на рационе, принятом в хозяйстве. В качестве концентрированных кормов они получали зерновую дерть (ячмень - 60 %, пшеница – 30 % и овес – 10 %). Соль (27 г) и мел (24 г) получали отдельно в кормушки. Животные опытной группы получали аналогичную с бычками контрольной группы по составу зерновую дерть, к которой добавляли комплексную кормовую добавку в количестве 397 г на голову в сутки, заменяя ею равную по массе часть зерновой дерти. Кормовая добавка обеспечивала увеличение содержания протеина в их рационе. В итоге его уровень в сухом веществе рациона бычков контрольной группы составлял 9,73 %, у бычков опытной группы – 10, 62 % (табл.1).

В таблице 1 представлен рацион кормления бычков в среднем за 3-месячный период опыта. В состав комплексной кормовой добавки входило 312 г высокопротеиновых кормов с биологически активными добавками и 85 г минеральной части. Рацион бычков опытной группы, за счет введения комплексной кормовой добавки, содержал корма с низкой расщепляемостью протеина в рубце и вещества, поддерживающие и стимулирующие развитие микрофлоры рубца (диаммоний фосфат, органические кислоты, серу и премикс), соль, источник кальция. Премикс, аналогичный премиксу, используемому в промышленных комплексах при интенсивном выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота на мясо (Наставление…., 1971), вводили в составе кормовой добавки для нормального функционирования рубцовой микрофлоры и наращивания микробиальной массы.

Таблица 1. ***Рацион кормления бычков с живой массой 300 кг при суточном приросте массы тела 900 – 1000 г***

Показатели	Группы	
	контрольная	опытная
Сено злаковое, кг	6,5	6,5
Силос злаковый, кг	7,5	7,5
Дерть смеси зерна, кг	3	-
Дерть смеси зерна + комплексная кормовая добавка, кг	-	3
Кормовые единицы	8,79	8,82
Обменная энергия, МДж	87,6	88,4
Сухое вещество, кг	10,36	10,46
Сырой протеин, г	1009	1111
Переваримый протеин, г	584	650
Сырая клетчатка, г	2461	2446
Крахмал, г	1561	1381
Сахар, г	265	265
Сырой жир, г	294	298
Поваренная соль, г	27	27
Кальций, г	64,5	64
Фосфор, г	22,2	28,2

За счет введения комплексной кормовой добавки и содержащихся в ней высокопротеиновых кормов и синтетических азотистых веществ, в рационе бычков опытной группы повысилось содержание сырого протеина на 10 %. Концентрированные корма задавались каждому животному индивидуально два раза в сутки. Для контроля интенсивности роста в конце каждого месяца проводили индивидуальное взвешивание животных. Для выяснения влияния разного уровня протеина в рационе, создаваемого за счет скармливания комплексной кормовой добавки, на биохимические процессы, приводящие к повышению интенсивности роста животных, в конце эксперимента была взята кровь пункцией яремной вены. В сыворотке крови определяли иммуноферментным методом концентрацию инсулина, кортизола и тироксина (тест-системы фирмы DRG International Inc. USA), а в цельной крови концентрацию глюкозы

глюкозооксидазным методом (Радченков и др. 1986). Кровь брали у шести наиболее типичных для каждой группы животных. Для выяснения влияния кормовой добавки на мясные качества бычков в конце эксперимента провели контрольный убой животных (8 – из контрольной и 7 – из опытной группы). У трех бычков из каждой группы был взят трехреберный отруб (на уровне 9 – 11 ребер) для определения содержания костей и бескостного мяса в туше. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу, описанному Асатиани (1965).

Результаты и обсуждение

После введения в рацион бычков опытной группы комплексной кормовой добавки, все исследуемые нами показатели у бычков опытной группы через 3 месяца после начала ее скармливания были выше по сравнению с бычками контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2. ***Концентрация глюкозы в крови и гормонов в сыворотке крови после 3-месячного применения комплексной кормовой добавки***

Группа	Время после приема корма, часы		% к базальному уровню
	0	3	
	Глюкоза, мг%		
Контрольная	53,12±1,29	55,90±1,54	105,2
Опытная	59,52±1,03	62,15±1,12	104,4
% к контролю	112,0**	111,2*	
	Инсулин, мкед/мл		
Контрольная	16,60±2,53	20,96±2,54	126,3
Опытная	17,47±2,73	21,28±3,05	121,8
% к контролю	105,2	101,5	
	Тироксин, нг/мл		
Контрольная	78,34±5,47	73,76±4,93	94,2
Опытная	81,46±3,64	89,66±3,14	110,1
% к контролю	104,0	121,6*	
	Кортизол, нмоль/л		
Контрольная	61,64±7,56	69,84±14,44	113,3
Опытная	79,02±19,92	75,99±12,36	96,2
% к контролю	128,2	108,8	

Примечание: здесь и далее - * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,005$

Эти позитивные изменения были достигнуты в связи с лучшей сбалансированностью их рациона за счет компонентов вводимой кормовой добавки.

Крахмал зерновых, поступающий с дертью, ферментируясь в рубце, в виде летучих жирных кислот всасывается из рубца в кровяное русло и частично используется рубцовой микрофлорой. Вводимые с кормовой добавкой синтетические азотистые вещества и сера являются источником аммиака и серы для синтеза аминокислот микроорганизмов, а за счет введения органических кислот

предполагалось повысить обеспеченность процессов микробиосинтеза энергией и четырехуглеродными компонентами.

Пропионат, как продукт микробиальных процессов в рубце, и органические кислоты кормовой добавки (цитрат, сукцинат, фумарат), неиспользованные микроорганизмами, могут служить источником глюкозы через процесс глюконеогенеза, без стимуляции этого процесса глюкокортикоидами. Подтверждением этому является приблизительно равное с контролем повышение концентрации глюкозы в крови бычков опытной группы через три часа после приема корма (на 11,2 %) и до его приема (на 12,0 %) при снижении у них на 13,8% концентрации кортизола в сыворотке крови через 3 часа после приема корма (относительно этого показателя до приема корма). Использование с добавкой кормов с более низкой расщепляемостью в рубце протеина и синтетических азотистых веществ способствовало большему поступлению в кишечник, соответственно и в кровь, аминокислот и отложению их в тканях. Поэтому повышенная концентрация глюкозы в крови поддерживалась не только за счет пропионата и других органических кислот, поступающих из рубца, но и за счет глюконеогенеза из аминокислот, и особенно до приема корма. Об этом свидетельствует более высокая концентрация кортизола у бычков опытной группы и в большей степени до утреннего кормления (табл. 2). При сравнении с базальным уровнем, показатели в опытной группе не всегда были выше, чем в контрольной, или процент повышения был ниже, чем повышение аналогичного показателя в контрольной. Эти изменения биохимических показателей в крови связаны с различиями в условиях питания животных, приводящих к большему поступлению в кровь бычков опытной группы аминокислот и органических кислот. У бычков контрольной группы отмечено относительно большее повышение концентрации глюкозы в крови (на 5,2 и 4,4 % соответственно в контрольной и опытной группах) и инсулина в сыворотке крови (на 26,3 и 21,8 %) через три часа после приема корма по сравнению с периодом до кормления. Соответственные изменения концентрации глюкозы и инсулина в этот период закономерны, и в контрольной группе они обеспечивались за счет повышения синтеза глюкозы в реакциях глюконеогенеза из аминокислот, что подтверждается изменением концентрации глюкокортикоидов. Концентрация кортизола в контрольной группе после приема корма увеличилась по сравнению с базальным уровнем на 13,3 %. У бычков опытной группы эта величина снизилась на 3,8 % при более высокой концентрации глюкозы. Ее концентрация у бычков опытной группы была выше и до приема корма. В этот временной отрезок глюконеогенез происходил в основном за счет аминокислот, о чем свидетельствует относительно более высокая концентрация базального уровня кортизола (на 3,8 %) по сравнению с его концентрацией после

кормления у бычков этой группы. В контрольной же группе увеличение концентрации кортизола на 13,3 % у бычков через 3 часа после приема корма, по сравнению с базальным уровнем, говорит о более раннем включении процесса глюконеогенеза из аминокислот у бычков этой группы. Ниже был и базальный уровень глюкозы. Из сказанного можно предположить, что к утру у бычков контрольной группы гормональный фонд коры надпочечников снижался и секретируемый уровень глюкокортикоидов не способен был поддерживать в крови более высокую концентрацию глюкозы.

Повышенный уровень глюкозы, поддерживаемый за счет глюконеогенеза из аминокислот, стимулировал более высокую секрецию инсулина по сравнению с бычками контрольной группы (5,2 %). Спустя три часа после приема корма разница в концентрации инсулина снижалась, с некоторым преимуществом в опытной группе (1,5 %). Бычки контрольной группы на величину добавки получали больше зерновых кормов, что, по-видимому, способствовало большему поступлению крахмала (табл. 1) в двенадцатиперстную кишку, следовательно, и относительно большему увеличению поступления глюкозы в кровяное русло после приема корма. Вероятно поэтому повышение концентрации инсулина в крови, по отношению к базальному уровню, у бычков контрольной группы было более значимым (26,3 % по сравнению 21,8 %).

Инсулин, обеспечивая доставку глюкозы в периферические ткани, в том числе и в мышечную, одновременно с этим обеспечивает и транспорт аминокислот в клетки мышечной ткани. Судя по повышению концентрации инсулина в сыворотке крови, повышение потребления протеина в рационе бычков опытной группы и большее его поступление в кишечник, за счет кормов с низким расщеплением протеина в рубце и микробиального белка, привело к усилению функциональной активности поджелудочной железы и повышению секреции инсулина. Аминокислоты так же вызывают повышение его секреции, хотя и в меньшей степени, чем глюкоза. В конечном итоге эти изменения в направленности биохимических процессов способствовали повышению интенсивности роста бычков (табл. 3).

Таблица 3. ***Интенсивность роста бычков***

Группы	Периоды опыта (месяцы), среднесуточный прирост живой массы (г)			
	0 -1	1 - 2	2 - 3	0 – 3
Контрольная	850±60	960±58	853±50	892±21
Опытная	1025±72	1060±38	1105±67	1064±35
% к контролю	120,6	110,6	129,6	119,3
P ≤	0,06	0,07	0,003	0,0001

Как видно из таблицы 3, интенсивность роста бычков опытной группы была выше по всем периодам опыта и за опытный период с высокой степенью достоверности она превышала таковую в контрольной группе на 19,3 %. Повысилась не только интенсивность роста бычков, но и увеличилось у них наращивание мышечной массы. В таблице 4 представлен результат контрольного убоя.

Таблица 4. ***Показатели контрольного убоя бычков***

Показатели	Группа		%
	контрольная	опытная	к контролю
Масса туши, кг	163,5±3,04	171,6±4,90	104,9
Убойный выход, %	49,4±3,04	50,5±0,97	102,2
Количество бескостного мяса в туше, кг	125,1±3,01	137,2±4,23	109,7*
Количество бескостного мяса в туше, %	76,5±0,52	79,9±0,41	104,4***
Количество костей в туше, %	23,5±0,52	20,1±0,41	85,5***
Отношение мякоть/кости	3,27±0,1	3,99±0,1	122,0***

Такому результату способствовало и повышение концентрации тироксина, так как тироксин обеспечивает повышение выработки энергии и способствует использованию для этих целей липидов, сберегая аминокислоты. За счет повышения интенсивности роста бычков в опытной группе снизились затраты наиболее полноценных и дорогостоящих концентрированных кормов с 3,36 кг на килограмм среднесуточного прироста живой массы тела до 2, 82 кг, что составило 83,93 % к затратам в контрольной группе.

Заключение

Лучшая сбалансированность рациона была достигнута благодаря введению в зерновую дерть комплексной кормовой добавки, обеспечивающей большее поступление в кишечник сырого протеина за счет компонентов с низкорасщепляемым в рубце протеином и повышение синтеза микробиального белка (в результате усиления функционирования микрофлоры рубца при использовании азота

диаммонийфосфата, органических кислот и минеральных веществ добавки). Созданные условия питания способствовали более полной обеспеченности процессов синтеза необходимыми субстратами, о чем можно судить по повышению концентрации глюкозы и секреции в кровь гормонов, связанных с ее синтезом и метаболизмом, что, в свою очередь, сказалось на достоверном повышении интенсивности роста бычков опытной группы (на 19,3 %), массы туши, количестве бескостного мяса в ней (на 9,7 %) и снижении затрат концентрированных кормов на единицу продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. М.: Универсум паблишинг, 1998: 598с.
2. Buttery P.J. Hormonal control of protein deposition in animals. Proc. Nutr. Soc., 1983, 42: 137-148.
3. Галяс В.Л. Вплив ісуліну на метаболізм стеариновоЇ кислоти в скелетних м´язах великоЇ рогатоЇ худоби у різному віці. Біологія тварин, 1999, 1, 1: 79 – 83.
4. Reeds P.J. Palmer R.M. Intracellular control of muscly protein turnover: a potential site for the manipulation of muscle growth. The Rowet Institute Report Annual. 1985, 40: 9-24.
5. Rannels S.R., and Jefferson. L.S. Effects of glucocorticoids an muscle protein turnover in perfused rat hemicorpus. Am. J. Physiolog., 1980, 238: E564-E572.
6. Brown J.S., Bates P.S., Hollidey M.A. and Millward D.J. Thyroid hormones and muscle protein turnover. The effect of thyroid hormone deficiency and replacementn thyroidectomized and hypophysectomized rats. Biochem. J., 1981, 194: 771-782.
7. Митев И. П., Ангелов А.М., Крышков А.М., Пашев И.Д. Экстратиреоидный эффект метилмеркаптоимидазола. Влияние метилмеркаптоимидазола на активность некоторых ферментов печени и почек морских свинок, получавших тироксин. /Проблемы эндокринологии, 1973, 19, 5: 94-97.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир. 1977: 407с.
9. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971: 30.
10. DRG International Inc. USA, EIA – 2935.
11. DRG International Inc. USA, EIA – 1887.
12. DRG International Inc. USA, EIA – 1781.
13. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. (Методические указания). Боровск, 1986. 9с.
14. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М: Наука, 1965: 522с.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ, ИНСУЛИНА, ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И МЯСНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ БЫЧКОВ

А.М. Коровяцкий, В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, Т.Н. Дворецкая
Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности

Определены параметры концентрации глюкозы, инсулина, тироксина и трийодтиронина в крови бычков в связи с возрастом и при применении комплексной кормовой добавки. За 4 месяца опыта от бычков опытной группы, получавших кормовую добавку, получено, по сравнению с контролем, на 11,0 кг больше прироста живой массы и на 14,5 кг мякоти.

Введение

В опытах по изучению механизмов, регулирующих обмен веществ и биосинтез компонентов мяса у продуктивных животных, установлено, что, изменяя состав кормов в рационе или интенсивность ферментативных процессов в желудочно-кишечном тракте, можно влиять на обеспеченность субстратами организма животного и, в том числе, процессов биосинтеза компонентов мяса. Показано, что у интенсивно растущих бычков одним из факторов, определяющих интенсивность процессов биосинтеза мяса, является обеспеченность метаболизма аминокислотами и глюкозой (Matras et al., 1989, Погосян , 1992).

Основным источником аминокислот, поступающих в метаболический пул в результате их всасывания в кишечнике, являются аминокислоты, образующиеся в результате переваривания белков микробиального и кормового происхождения. Оптимальным вариантом может быть ситуация, когда на фоне максимального синтеза в рубце микробиального белка в дуоденум поступает достаточное для обеспечения потребностей количество переваримого кормового протеина. Аналогична ситуация и с обеспечением организма жвачных животных глюкозой. Поэтому современные системы питания жвачных животных предполагают учет качества протеина и углеводов корма, что позволяет более эффективно оптимизировать питание жвачных животных за счет прогнозирования потоков аминокислот и углеводов из кишечника в метаболический пул организма (Beermann et al., 1997).

Наши исследования также показали высокую эффективность данного подхода при интенсивном выращивании и откорме бычков

(Матвеев и др.,2001, 2003; Коровяцкий и др.,2003). В частности, скармливание бычкам комбикормов с пониженной распадаемостью в рубце протеина (кукурузный глютен) и крахмала (кукуруза) обеспечивает повышение у них интенсивности роста и накопления мышечной массы, по сравнению с животными, потреблявшими комбикорм на основе ячменя и подсолнечного шрота.

Интенсивное выращивание и откорм бычков на мясо предусматривает максимальное использование в рационах дешевых кормов. Однако полная замена в их рационе традиционных кормов (ячмень, пшеница, отруби, подсолнечный шрот), обладающих высокой распадаемостью в рубце протеина и крахмала, на дефицитные для нашей зоны корма с пониженной распадаемостью (кукуруза, кукурузный глютен, соевый шрот и т. д.) может быть экономически неоправдана.

Поэтому целью дальнейших исследований являлось создание комплексной кормовой добавки на основе использования минимального количества кормов с пониженной распадаемостью протеина в рубце, синтетических азотистых соединений и природных биологически активных веществ, применение которой при интенсивном выращивании и откорме бычков обеспечило бы повышение продуктивности и эффективности производства говядины. В задачу исследований текущего этапа работы входило изучение влияния комплексной кормовой добавки на функциональную активность инсулярного аппарата поджелудочной железы, коры надпочечников и щитовидной железы, как показателей, характеризующих интенсивность и направленность процессов обмена веществ.

Материал и методы

Комплексный опыт проведен в виварии института на 10 бычках черно-пестрой породы в период интенсивного выращивания и откорма с живой массой тела в начале опыта 145 кг. Содержание животных привязное, кормление 3-разовое, индивидуальное по детализированным нормам (Нормы и рационы…., 1985, Наставление…., 1971). В предварительный период опыта в течение трех месяцев животные обеих групп находились на одном рационе. В этот период они были приучены к максимальному потреблению сена и силоса, а интенсивность их роста достигала 900-1000 г среднесуточного прироста живой массы.

В дальнейшем по принципу парных аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста бычки были распределены в две группы по 5 голов в каждой. Животные 1-й группы (контрольной) получали типовой комбикорм на ячменной основе с использованием

подсолнечного шрота в качестве основного источника протеина (табл. 1). У животных 2-й группы (опытной) из состава комбикорма исключали подсолнечный шрот, но вводили комплексную кормовую добавку (табл. 2) При этом уровень сырого протеина в комбикорме для бычков опытной группы существенно не отличался от такового в контроле. Ежедневно каждый бычок опытной группы получал в составе комбикорма 440 г комплексной кормовой добавки. Продолжительность опытного периода 4 месяца.

Комплексная кормовая добавка включала корма с пониженной распадаемостью протеина в рубце, корма с повышенным содержанием ряда незаменимых аминокислот, синтетические азотистые соединения, органические кислоты и другие биологически активные вещества. В 1 кг комплексной кормовой добавки содержалось 0,8 к. ед., 9,63 МДж обменной энергии, 943 г сухого вещества, 447 г сырого протеина и 35 г сырой клетчатки.

Таблица 1. ***Процентное соотношение компонентов, химический состав и питательность комбикорма для бычков контрольной группы***

Показатели	Компоненты							Итого
	ячмень	пшеница	отруби пшеничные	шрот подсолнечный	соль поваренная	изв. мука + три кальцфос	премикс	
Масса, %	52,57	15,0	15,0	14,53	0,7	1,2	1,0	100
Кормовые ед.	0,6	0,19	0,11	0,15	-	-	-	1,05
Обмен. энергия, МДж	5,47	1,62	1,33	1,54	-	-	-	9,96
Сухое вещество, г	490	138	138	137	7	12	10	932
Сырой протеин, г	50,03	16,5	22,35	54,05	-	-	-	142,93
Перевар. протеин, г	37,53	13,2	14,30	48,65	-	-	-	113,68
Сырая клетчатка, г	17,04	2,91	11,16	15,40	-	-	-	46,51
Крахмал, г	253	77	0	4	-	-	-	334
Сахара, г	1,04	3	7,05	7,64	-	-	-	18,73
Сырой жир, г	11,47	3	6,15	5,38	-	-	-	26,0
Кальций, г	1,04	0,12	0,3	0,52		3,9		5,88
Фосфор, г	1,72	0,58	1,27	1,47		0,68		5,72
Магний, г	1,19	0,15	0,65	0,74			0,04	2,77
Калий, г	2,61	0,51	1,63	1,16			-	5,91
Сера, г	0,68	0,18	0,29	0,48			1,16	2,79
Железо, мг	26,1	6	25,5	48,2			25	131
Медь, мг	2,19	0,99	1,7	3,5			3,3	11,68
Цинк, мг	18,29	3,45	12,15	5,93			50	89,82
Кобальт, мг	0,14	0,01	0,01	0,06			1	1,22
Марганец, мг	7,04	6,96	17,55	7,05			50	88,6
Йод, мг	0,11	0,01	0,26	0,1			1,2	1,68
Каротин, мг	0,16	0,15	0,39	0,44			-	1,14
Витамин Д, тыс. МЕ				0,73			2,0	2,73
Витамин Е, мг	26,06	1,79	3,13	0,44			10	41,41

Витамин А, тыс. МЕ	15,0	15

Рацион для животных обеих групп состоял из сена злакового, силоса злакового и комбикорма. По мере увеличения живой массы животных рацион ежедекадно корректировали. При этом исходили из принципа, что уровень комбикорма должен быть в пределах 50-55% от

Таблица 2. ***Процентное соотношение компонентов и химический состав комбикорма для бычков опытной группы***

Показатели	Компоненты							Итого
	ячмень	пшеница	отруби пшеничные	комп. корм. добавка	соль поваренная	извест. мука + три кальцф.	премикс	
Масса, %	56,59	15	15	10,51	0,7	1,2	1,0	100,0
Кормовые ед.	0,65	0,19	0,11	0,103				1,05
Обмен. энергия, МДж	5,95	1,62	1,33	0,127				9,03
Сухое вещество, г	533	138	138	97	7	12	10	935
Сырой протеин, г	54,43	16,5	22,35	56,72				150,0
Перевар. протеин, г	40,82	13,2	14,30	39,38				107,7
Сырая клетчатка, г	18,54	2,91	11,16	3,57				36,18
Крахмал, г	275	77,3	-	0,5				352,8
Сахара, г	1,13	3	7,0	1,14				12,27
Сырой жир, г	12,47	3	6,15	5,31				26,90
Кальций, г	1,13	0,12	0,3	0,2		3,96		5,71
Фосфор, г	1,88	0,58	1,27	2,45				6,18
Магний, г	0,57	0,15	0,64	0,16			0,04	1,57
Калий, г	2,83	0,51	1,63					4,97
Сера, г	0,74	0,18	0,28	0,157			1,16	2,52
Железо, мг	28,3	6	25,5	16,42			25	101
Медь, мг	2,38	0,99	1,7	2,42			3,3	10,79
Цинк, мг	19,9	3,4	12,2	6,78			50	92,3
Кобальт, мг	0,15	0,01	0,02	0,01			1	1,19
Марганец, мг	7,65	6,96	17,55	2,42			50	84,6
Йод, мг	0,12	0,01	0,26	0,01			1,2	1,59
Каротин, мг	0,17	0,15	0,39	-			-	0,71
Витамин Д, тыс. МЕ				0,05			2	2,05
Витамин Е, мг	28,35	1,78	3,13	1,66			10	44,93
Витамин А, тыс. МЕ							15	15

обменной энергии рациона. Состав и питательность рациона для бычков в период проведения балансового опыта приведены в таблицах 3 и 4. Для характеристики интенсивности роста животных взвешивали ежемесячно, до утреннего кормления, в течение двух смежных дней.

Таблица 3. ***Рацион 14-месячных бычков контрольной группы с живой массой 360 кг при суточном приросте массы тела 1300 г.***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковый	комбикорм	
Масса корма, кг	2,4	12	4,5	18,9
Кормовые единицы	1,32	4,44	4,73	10,49
Обменная энергия, МДж	16,08	29,4	47,25	92,72
Сухое вещество, кг	2,08	3,02	4,19	9,29
Сырой протеин, г	211	460	661	1332
Переваримый протеин, г	116	300	512	928
Сырая клетчатка, г	562	870	209	1641
Крахмал, г	28,8	24	1503	1556
Сахара, г	84	36	115	235
Сырой жир, г	62,4	156	117	335
Поваренная соль, г			31,5	31,5
Кальций, г	18,24	25,2	22,8	66,24
Фосфор, г	17,47	7,2	25,7	50,44
Магний, г	2,16	4,8	12,43	19,38
Калий, г	33,6	43,2	26,6	103,4
Сера, г	2,88	3,6	12,52	19
Железо, мг	12,58	668	590	2516
Медь, мг	4,8	10,8	52,6	68,2
Цинк, мг	41,0	50,4	404,2	495,6
Кобальт, мг	0,48	0,48	5,49	6,45
Марганец, мг	128	576	399	1103
Йод, мг	0,72	1,2	7,56	9,48
Каротин, мг	60	120	-	180
Витамин Д, тыс. МЕ	0,96	0,78	12,27	14,01
Витамин Е, мг	216	540	186	942
Витамин А, тыс. МЕ	-	-	67,5	67,5

Таблица 4. ***Рацион 14-месячных бычков опытной группы с живой массой 360 кг при суточном приросте массы тела 1300 г***

Показатели	Корма			Итого
	сено злаковое	силос злаковый	комбикорм	
Масса корма, кг	2,4	12	4,5	18,9
Кормовые единицы	1,32	4,44	4,86	10,62
Обменная энергия, МДж	16,08	29,4	46,80	92,26
Сухое вещество, кг	2,08	3,02	4,19	9,29
Сырой протеин, г	211	460	675	1346

Переваримый протеин, г	116	300	513	929
Сырая клетчатка, г	562	870	168	1600
Крахмал, г	28,8	24	1778	1831
Сахара, г	84	36	84	204
Сырой жир, г	62,4	156	113,8	332

продолжение таблицы 4

Поваренная соль, г			31,5	31,5
Кальций, г	18,24	25,2	24,8	68,24
Фосфор, г	17,47	7,2	27,8	52,2
Магний, г	2,16	4,8	7,07	14,03
Калий, г	33,6	43,2	24,5	101
Сера, г	2,88	3,6	11,34	18,17
Железо, мг	1258	668	455	2382
Медь, мг	4,8	10,8	48,6	64,2
Цинк, мг	41,0	50,4	415	506
Кобальт, мг	0,48	0,48	5,31	6,17
Марганец, мг	128	576	381	1085
Йод, мг	0,72	1,2	7,19	9,11
Каротин, мг	60	120	3,0	183
Витамин Д, тыс. МЕ	0,96	0,78	9,23	10,97
Витамин Е, мг	216	540	202	958
Витамин А, тыс. МЕ	-	-	67,5	67,5

Для оценки функционального состояния эндокринной системы определяли в пробах крови базальную (до утреннего кормления) концентрацию ряда гормонов и их содержание через 1 и 3 часа после приема корма. Кровь брали пункцией яремной вены до начала опыта и через 1, 3 и 4 месяца после начала скармливания комплексной кормовой добавки. В пробах сыворотки крови определяли концентрацию инсулина, кортизола, тироксина и трийодтиронина иммуноферментным способом, а в пробах цельной крови содержание глюкозы глюкозооксидазным методом (Радченков и др., 1985, Методы биохимического анализа, 1997). Математическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (Губский и др.,1990; Лакин, 1980).

Результаты и обсуждение

Условия кормления обеспечили высокую интенсивность роста животных обеих групп. Однако среднесуточный прирост бычков за 4-месячный период опыта в контроле составил 1224±59 г, а в опытной группе 1318±56 г. Следовательно, даже в условиях сбалансированного по детализированным нормам кормления молодняка крупного рогатого скота в период интенсивного доращивания и откорма, применение комплексной кормовой добавки обеспечило увеличение интенсивности роста на 7,7%. В целом за 4 месяца опыта прирост живой массы у бычков контрольной группы составил 147±7,0 кг, а у животных

опытной группы – 158,0±6,7 кг, что на 7,5% больше. В среднем от каждого бычка опытной группы было получено дополнительно 11,0 кг прироста живой массы на фоне сбалансированного кормления.

Увеличение живой массы животных сопровождалось изменением массы ряда органов и тканей и, в том числе, увеличением массы мышечной, жировой и костной ткани. От их соотношения в составе туши зависит качество получаемой говядины. В целях характеристики показателей мясной продуктивности в конце опыта был проведен убой животных с последующим анализом состава туши. Результаты исследований показали, что в туше бычков опытной группы статистически достоверно было больше на 4,8% относительное содержание мякоти, меньше на 15,9% относительное содержание костей, выше на 25,3% отношение количества мяса к костям (табл. 5). Эти данные свидетельствуют о лучшем качестве говядины, полученной от животных опытной группы.

Таблица 5. ***Результаты контрольного убоя бычков при применении комплексной кормовой добавки***

Показатели	Группы		%
	контрольная	опытная	к контролю
Масса туши, кг	209,5±4,78	217,7±8,7	103,9
Убойный выход, %	52,9±1,19	55,8±1,37	105,4
Количество мякоти в туше, кг	162,0±4,58	176,5±7,70	109,0
Относительное содержание в туше: мякоти, %	77,3±0,70	81,0±0,56	104,8 **
костей, %	22,7±0,62	19,1±0,54	84,1 ***
Отношение мясо/кости	3,40±0,13	4,26±0,15	125,3 ***

Здесь и далее: * - P ≤ 0,05; ** - P≤ 0.01; *** - P ≤ 0,005.

Одним из интегральных показателей метаболизма углеводов в организме животных является концентрация глюкозы в крови. На протяжении всего опыта базальный уровень глюкозы (до утреннего приема корма) в крови бычков был выше 60 мг % (табл. 6).

Таблица 6. ***Концентрация глюкозы в крови бычков, мг %***

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Исходные данные			
Контрольная	69,84±2,05	65,20±1,39	64,79±1,59
Опытная	72,69±1,77	69,16±1,36	70,44±1,27
% к контролю	104,1	106,1	108,7
Через месяц после начала применения добавки			
Контрольная	79,34±1,26	72,64±0,85	74,49±1,88
Опытная	77,48±1,53	74,10±1,68	70,20±2,25
% к контролю	97,6	102,0	94,2
Через 3 месяца посла начала применения добавки			
Контрольная	62,46±1,83	61,67±2,15	62,73±1,24

Опытная	66,05±1,74	59,91±1,58	64,37±1,96
% к контролю	105,8	97,1	102,6
Через 4 месяца после начала применения добавки			
Контрольная	72,31±2,06	64,12±1,15	72,49±3,11
Опытная	70,34±1,33	59,84±1,41	71,50±3,00
% к контролю	97,3	93,3	98,6

Это свидетельствует о достаточно хорошей обеспеченности процессов метаболизма углеводами и согласуется с высокой интенсивностью роста животных. Применение комплексной кормовой добавки бычкам на таком фоне кормления не оказало существенного влияния на гомеостаз глюкозы.

После приема корма существенно возрастает потребность организма жвачных животных в глюкозе. Соответственно, в этот период регуляторные системы, обеспечивающие постоянство концентрации глюкозы в крови, испытывают повышенные нагрузки. Поэтому даже в условиях сбалансированного питания часто наблюдается снижение концентрации глюкозы в крови после приема корма.

В начале опыта и через 1 и 3 месяца после начала скармливания комплексной кормовой добавки концентрация глюкозы в крови бычков контрольной и опытной групп через час после приема корма снижалась несущественно (на 1,3 – 9,3%) (табл. 6). В конце опыта концентрация глюкозы в крови 15-месячных бычков контрольной и опытной групп через час после приема корма достоверно снижалась на 11,3% ($P \leq 0,01$) и на 14,9% ($P < 0,001$). По-видимому, это связано с тем, что в этом возрасте значительно возрастает интенсивность биосинтеза липидов, что сопровождается увеличением потребности организма откармливаемых бычков в глюкозе. В этих условиях регуляторные механизмы системы гомеостаза не способны в полной мере обеспечить ее стабильный уровень в крови животных.

Анализ данных по концентрации в сыворотке крови бычков инсулина и тироксина показал, что уровень гормонов находился в пределах физиологической нормы и соответствовал возрасту животных и условиям их питания. В частности, во все периоды опыта наблюдалась типичная реакция инсулярного аппарата на прием корма, которая характеризовалась увеличением в крови концентрации инсулина после кормления бычков (табл. 7). Эти изменения в активности поджелудочной железы согласуются с приведенными ранее данными о том, что питание животных обеих групп в достаточной мере отвечало физиологическим потребностям организма и обеспечило высокую интенсивность их роста.

Как показали наши ранее проведенные исследования, увеличение в крови бычков концентрации инсулина после приема корма способствует усилению использования метаболитов, поступающих из желудочно-кишечного тракта в кровь, для

обеспечения основных физиологических функций и, в том числе, для активизации процессов биосинтеза белков и липидов.

Таблица 7. ***Концентрация инсулина в сыворотке крови бычков, мкед/мл***

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Исходные данные			
Контрольная	13,85±1,92	14,13±1,44	9,72±1,35
Опытная	12,26±2,69	14,97±1,92	12,17±2,55
% к контролю	88,5	106,0	125,1
Через месяц после начала применения добавки			
Контрольная	12,39±1,50	21,07±1,94	19,56±2,30
Опытная	13,85±1,78	23,08±1,37	14,95±2,16
% к контролю	111,8	109,5	76,4
Через 3 месяца посла начала применения добавки			
Контрольная	15,79±0,97	27,22±3,21	18,39±2,03
Опытная	12,24±0,72	16,44±1,94	13,71±2,39
% к контролю	77,5 *	60,4 *	74,6
Через 4 месяца после начала применения добавки			
Контрольная	15,48±1,43	19,32±2,08	15,07±1,12
Опытная	14,05±1,18	17,42±1,66	13,37±1,56
% к контролю	90,8	90,1	88,7

После месячного скармливания комплексной кормовой добавки в сыворотке крови бычков опытной группы отмечена тенденция к более высокому уровню инсулина. В дальнейшем через три месяца после начала применения добавки в сыворотке крови бычков опытной группы концентрация инсулина была статистически достоверно ниже (табл. 7). Тенденция к более низкому уровню инсулина у них сохранилась до конца опыта. Концентрация инсулина в крови животных отражает соотношение двух составляющих функциональной активности эндокринной железы - интенсивности биосинтеза и инкреции гормона в кровяное русло, и скорости связывания гормона с рецепторами в клетках органов и тканей-«мишеней». Данные анализа, приведенные в таблице, свидетельствуют, что в сыворотке крови 14-месячных бычков опытной группы был ниже не только базальный уровень инсулина, но и меньше величина подъема содержания гормона через час после приема корма, когда концентрация гормона в опытной группе увеличивалась на 34,3%, а в контроле на 72,4%. На основании этих данных можно полагать, что снижение функциональной активности инсулярного аппарата у бычков при применении комплексной кормовой добавки связано с торможением активности секреторных клеток поджелудочной железы.

По-видимому, можно следующим образом интерпретировать адаптивные изменения в активности инсулярного аппарата поджелудочной железы. В процессе наращивания живой массы у

бычков в период доращивания и откорма изменяется соотношение между интенсивностью синтеза мышечных белков и липидов. По мере увеличения массы тела в среднесуточном приросте увеличивается доля накопления липидов в организме животного. Известно, что инсулин стимулирует не только синтез белков, но и является основным активатором процессов липогенеза. Поэтому более высокий уровень инсулина в сыворотке крови у бычков контрольной группы в 14- и 15-месячном возрасте свидетельствует о повышенном использовании питательных веществ корма на образование липидов. Соответственно, у животных опытной группы, которые потребляли аналогичное количество обменной энергии корма, была выше доля питательных веществ, отложенных в мышечной ткани. Эти положения согласуются с приведенными выше результатами убоя бычков о более высоком содержании мышечной ткани у животных опытной группы.

Таблица 8. ***Концентрация тироксина в сыворотке крови бычков, нг/мл***

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Исходные данные			
Контрольная	93,82±4,39	100,4±5,20	113,8±3,65
Опытная	82,80±5,70	94,62±5,49	115,9±7,34
% к контролю	88,3	94,2	101,9
Через месяц после начала применения добавки			
Контрольная	107,8±5,76±	101,5±8,01	103,7±4,93
Опытная	92,97±4,91	96,32±7,43	95,47±15,50
% к контролю	86,3	94,9	92,0
Через 3 месяца посла начала применения добавки			
Контрольная	98,06±5,08	103,7±4,16	111,8±2,56
Опытная	103,0±4,06	105,5±5,65	102,9±5,47
% к контролю	105,0	101,8	92,0
Через 4 месяца после начала применения добавки			
Контрольная	96,46±4,31	98,40±2,70	106,9±2,80
Опытная	95,22±5,64	96,50±5,73	102,7±8,35
% к контролю	98,7	98,1	96,0

Результаты анализа концентраций тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови бычков свидетельствуют, что применение комплексной кормовой добавки не оказало существенного влияния на функциональную активность щитовидной железы, так как не было достоверных различий между группами животных по уровню гормона (табл. 8 и 9). Концентрация гормонов в сыворотке крови бычков обеих групп была в пределах верхнего уровня физиологических норм. Исходя из биологической роли тиреоидных гормонов, можно полагать, что у них интенсивно протекали процессы обмена веществ, что подтверждают приведенные данные о высоком среднесуточном приросте массы тела.

Влияние тиреоидных гормонов в значительной степени определяется соотношением их концентраций, так как трийодтиронин по активности значительно превосходит тироксин. Из приведенных в таблице 9 данных следует, что к концу откорма бычков в 14-15-месячном возрасте наблюдалась тенденция к снижению соотношения этих гормонов на фоне высокой концентрации трийодтиронина.

Таблица 9. ***Базальная концентрация трийодтиронина и соотношение концентраций тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови бычков***

Группа	Концентрация Т3, нмоль/л	Отношение Т4/Т3
Исходные данные		
Контрольная	4,82±0,31	19,63±1,01
Опытная	4,94±0,23	16,95±1,47
% к контролю	102,5	86,3
Через месяц после начала применения добавки		
Контрольная	5,28±0,36	20,81±1,80
Опытная	5,33±0,38	18,04±2,33
% к контролю	101,0	86,7
Через 3 месяца посла начала применения добавки		
Контрольная	5,96±0,34	16,62±1,13
Опытная	6,70±0,18	15,38±0,46
% к контролю	112,4	92,5
Через 4 месяца после начала применения добавки		
Контрольная	7,31±0,68	13,42±0,67
Опытная	6,00±0,79	17,27±2,77
% к контролю	82,1	128,7

В 15-месячном возрасте у бычков контрольной группы была самая высокая концентрация трийодтиронина и наименьшее значение соотношения концентрации тиреоидных гормонов. Можно полагать, что в результате этого у них увеличивалось использование субстратов на образование энергии и снижалась эффективность использования питательных веществ корма на привес. Это подтверждают результаты исследований сотрудников лаборатории энергетического питания, которые установили, что у бычков контрольной группы по сравнению с опытной на 3,5% были выше затраты энергии на теплопродукцию и на 9,3% ниже энергия продукции.

Заключение

Изыскание путей повышения биоконверсии питательных веществ корма в компоненты продукции и улучшения ее качества за счет направленной регуляции метаболизма и биосинтеза продолжают оставаться приоритетным направлением мировой науки. В этом направлении перспективно развитие новых подходов и, в том числе, применение препаратов, регулирующих интенсивность и

направленность процессов пищеварения в желудочно-кишечном тракте жвачных животных в целях преимущественного поступления в метаболический пул отдельных субстратов. В соответствии с поставленной задачей, наши исследования были направлены на разработку способа повышения биоконверсии питательных веществ корма в компоненты мяса за счет оптимизации питания бычков, выращиваемых на мясо, путем применения комплексной кормовой добавки. В качестве рабочей концепции при ее разработке были приняты следующие положения:

- организм жвачных животных обладает уникальной способностью синтезировать в рубце микробиальный белок, используя некормовые источники азота;
- увеличение в рационе жвачных животных доли кормов с пониженной распадаемостью в рубце протеина или крахмала корма должно быть компенсировано включением в рацион определенных веществ, обеспечивающих сохранение на высоком уровне интенсивности микробиологических процессов в рубце, чтобы в достаточной мере обеспечивать переваримость клетчатки корма.

Исходя из данной концепции, была разработана комплексная кормовая добавка. Результаты исследований, приведенные в работе, убедительно свидетельствуют о высокой эффективности добавки даже в условиях сбалансированного питания молодняка крупного рогатого скота. В среднем за 4-месячный период ее применения от каждого бычка получено дополнительно 14,5 кг мяса. По состоянию на 1 сентября 2003 года в среднем по Калужской области 1 кг такого мяса стоил 160-180 рублей. Следовательно, от каждого бычка опытной группы дополнительно получено продукции на 2465 рублей. При этом за 120 дней опыта израсходовано на одну голову 52,8 кг добавки, что составило 514 рублей при цене ее 9,73 рубля за кг. Кроме того, из состава комбикорма для животных опытной группы был исключен подсолнечный шрот, что позволило снизить стоимость комбикорма. В целом за 120 дней опыта было сэкономлено 73,4 кг подсолнечного шрота, что при цене 4 рубля за 1 кг шрота составило 294 рубля. Следовательно, на получение дополнительной продукции на сумму 2465 рублей было израсходовано 220 рублей. То есть, на каждый затраченный рубль было получено дополнительно продукции на сумму 11,2 рубля.

На основании полученных результатов можно заключить, что использование комплексной кормовой добавки позволяет изменить функциональное состояние ряда регуляторных систем организма, и в первую очередь эндокринной системы, что и обеспечивает перераспределение субстратов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, наилучшим образом для обеспечения процессов биосинтеза мяса и лучшей реализации продуктивного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matras J., Preston R.L. The role of glucose infusion on the metabolism of nitrogen in ruminants. J. Anim. Sci., 1989, 6, 67: 1642-1647.
2. Погосян Д.Г. Переваримость нерасщепляемого в рубце протеина различных кормов в кишечнике растущих бычков. Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.б.н., Боровск, 1992: 24 с.
3. Beermann D.H., Robinson T.F., Knaus W.F. and Fox D.G. Formulation of protein supplements to provide ideal amounts of absorbed amino acids in growing cattle. Procedings 1997 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Cornell University, Ithaca, NY, 1997: 172-180.
4. Матвеев В.А., Галочкина В. П., Баранова И.А. и др. Параметры обмена веществ и показатели мясной продуктивности у бычков при использовании кормов с пониженной распадаемостью в рубце протеина и крахмала. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сб. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2001, 40: 3-13
5. Коровяцкий А.М., Галочкина В.П., Матвеев В.А., Дворецкая Т.Н. Влияние кормов с пониженной расщепляемостью крахмала в рубце на уровень гормонов, связанных с метаболизмом глюкозы, и мясную продуктивность выращиваемых на мясо бычков. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборник научных трудов ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2003, 32: 126-134.
6. Матвеев В.А., Галочкина В.П., Коровяцкий А.М., Дворецкая Т.Н. Влияние кормов с пониженной расщепляемостью крахмала в рубце на секреторную активность некоторых желез внутренней секреции и интенсивность роста бычков, выращиваемых на мясо. Мясное скотоводство и перспективы его развития. Сборник научных трудов ВНИИ мясного скотоводства, Оренбург, 2003 (в печати).
7. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. (Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др.) М.: Агропромиздат, 1985: 352 с.
8. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971: 30с.
9. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. Методические указания. Боровск, 1986: 9с.
10. Методы биохимического анализа. (Под общей редакцией акад. Кальницкого Б.Д.), Боровск, 1997: 165-194
11. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. Методические указания. Боровск, 1985: 74 с
12. Губский Ю.И., Курский М.Д., Задорина О.В. и др. Биохимия, 1990, 55, 1: 12-22.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. М.: Высш. Школа, 1980: 293 с.

ОБМЕН ЭНЕРГИИ У РАСТУЩИХ БЫЧКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКСНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

М.В. Сорокин, В.И. Агафонов, В.П. Лазаренко, В.В. Михайлов
Лаборатория энергетического питания

Использование в рационе бычков, выращиваемых на мясо, кормовой добавки, состоящей из труднораспадаемого в рубце протеина и легкодоступных для микроорганизмов САВ, способствовало снижению уровня теплопродукции на 3,35 %, увеличению отложения энергии в приросте на 10,22 % и повышению эффективности использования обменной энергии на прирост на 5,87 % по сравнению с контролем.

Введение

Высокий уровень обменной энергии в рационах достигается за счет включения зерновых концентратов. Однако при этом существенное значение имеют показатели доступности питательных веществ и энергии, которые зависят от качества содержащихся в рационе протеина, крахмала, структурных углеводов и жира. При изучении процессов питания необходимо учитывать как состояние преджелудочного пищеварения, так и показатели кишечного переваривания протеина и крахмала у жвачных животных. От регулирования соотношения преджелудочного и кишечного пищеварения, в конечном счете, зависит эффективность использования питательных веществ и энергии корма на продукцию (Агафонов, 1998; Агафонов и др., 2001; Сорокин, Лазаренко, 2003; Chudy, 2001; Kovacova et al, 2001; Ludden and Kerley, 1997; Matthi et al, 2000).

Эти выводы подтверждены в комплексных опытах лаборатории 2000-2002 г.г. При использовании кормов, содержащих протеин и крахмал с низкой распадаемостью в преджелудках, было установлено повышение среднесуточного прироста на 6-7 % и повышение качества говядины. На основании этих исследований была приготовлена кормовая добавка, включающая протеин с заранее рассчитанной распадаемостью, при использовании САВ, кукурузного глютена и биологически активных веществ, позволяющая регулировать процессы рубцового и кишечного пищеварения, что, в конечном счете,

должно повысить эффективность биконверсии питательных веществ корма в компоненты прироста.

Непосредственно для регулирования тканевого обмена, процессов обеспечения субстратами физиологических функций и биосинтеза компонентов прироста необходимо знать оптимальные варианты источников энергии и уметь прогнозировать обеспечение продуктивных процессов из фонда метаболитов, не использованных в энергетическом обмене. Вопросы регулирования кормовыми факторами тканевого энергетического обмена в последние годы являются актуальными (Агафонов, 1998; Агафонов и др., 2001; Сорокин, Лазаренко, 2003).

Целью исследований в отчетном году являлось обоснование возможности повышения биоконверсии обменной энергии корма в компоненты мяса у бычков, при включении в рацион специально разработанной кормовой добавки. В задачу исследований входило проведение апробации эффективности использования кормовой добавки в научном опыте на основе респирационных исследований и оценки баланса энергии у бычков, а также изучение возможности регулирования соотношения затрат обменной энергии на теплопродукцию и отложение в теле.

Материал и методы

Научный опыт проведен в виварии института на двух группах бычков, по 5 голов парных аналогов в группе. В предварительный период бычкам скармливали общий рацион в течение двух месяцев. В опытный период (11-15-месячный возраст) бычкам контрольной и опытной групп скармливали одинаковое количество сена, силоса и комбикорма. Однако состав комбикорма различался: вместо подсолнечного шрота (комбикорм 1) для бычков опытной группы была введена кормовая протеиновая добавка (комбикорм 2). Комбикорма были приготовлены на ячменной основе, количество которого в комбикормах 1 и 2 (в % по массе) составляло: 52,50 и 56,70; пшеница 15 и 15; отруби пшеничные 15 и 15; шрот подсолнечный 14,5 (комб.1); кормовая протеиновая добавка 10,3 (комб.2); минеральные добавки и премикс 3,0 и 3,0. В сочетании с основными кормами комбикорма обеспечивали одинаковое содержание в рационах обменной энергии, крахмала, сырого жира (табл. 3). Интенсивность роста бычков определяли ежемесячно. Респирационные исследования проведены до начала опытного периода, во время балансовых опытов и перед завершением опыта; балансовый опыт - в середине эксперимента. В конце опыта проведен контрольный убой животных (Агафонов, 1998; Лакин, 1980; Надальяк и др., 1986).

Научно-производственный опыт (продолжительностью 3 месяца) был проведен на двух группах бычков черно-пестрой породы, по 20 голов в группе, в условиях СПХ «Родина» Малоярославецкого района. Животные обеих групп получали одинаковые рационы, состоящие из сена и силоса злаковых многолетних трав с добавлением дерти зерносмеси. Бычки опытной группы получали дополнительно к дерти кормовую добавку (табл. 7).

Материалы исследований обработаны методами статистического анализа (Лакин, 1980).

Результаты и обсуждение

Анализ материалов респирационных исследований, проведенных в конце предварительного периода (табл. 1), выявил, что по

Таблица 1. ***Газоэнергетический обмен у бычков 11-месячного возраста***

Группы	Легочная вентиляция, л/час	Потребление кислорода, %	Выделение углекислоты, %	Дыхательный коэффициент	Теплопродукция, МДж/сут
Контроль	3630±132	3,124±0,585	2,779±0,125	0,89±0,02	48,52±6,20
Опыт	3620±127	2,982±0,060	2,567±0,125	0,88±0,03	47,28±3,77

показателям газоэнергетического обмена достоверных различий между группами не было, т. е. перед опытным периодом бычки были аналогами не только по живой массе и среднесуточному приросту (табл. 2), но и по ряду физиологических показателей.

Таблица 2. ***Живая масса и среднесуточный прирост бычков***

Группы	Возраст, месяцев					
	предварительный период	опытный период				
	11	12	13	14	15	11-15
	Живая масса, кг					
Контроль	237,4±6,1	276±6,9	319,2±5,1	359±7,6	388,3±8,1	-
Опыт	234,8±6,7	272±14,3	318,6±13,6	358±13,3	387,4±13,5	-
	Среднесуточный прирост, г					
Контроль	929±30	1245±42	1394±90	1372±148	862±32,2	1224±59
Опыт	956±35	1219±131	1484±221	1359±48	1086±492	1318±56
% к контролю	102,9	97,9	106,5	98,99	126,0	107,66

Анализ среднесуточного прироста массы тела бычков показал, что в течение первых трех месяцев опытного периода животные обеих групп не различались по данному показателю, так как содержание основных питательных веществ (обменная энергия, протеин, жир) в рационах было на одинаковом уровне. Однако использование в рационе бычков опытной группы протеина с заранее рассчитанной распадаемостью, за счет включения доступного для микроорганизмов СА В и труднораспадаемого в рубце протеина (кукурузного глютена), способствовало регулированию процессов рубцового и кишечного пищеварения с последующим повышением эффективности биоконверсии питательных веществ корма в компоненты прироста. В преджелудках у бычков опытной группы больше образовывалось пропионата, а в тонком кишечнике аминокислот (табл. 3). Респирационные исследования, проведенные во время балансового опыта с последующим определением баланса энергии (табл. 4), показали, что при одинаковом потреблении валовой энергии и близких по величине потерях энергии с калом и мочой у бычков обеих групп, потери энергии с теплопродукцией были выше у животных контрольной группы. Затраты обменной энергии на поддержание у бычков при данной интенсивности роста составили 0,45 МДж/кг метаболической массы, а эффективность синтеза прироста у бычков контрольной группы – 45,67%, в опытной группе – 51,54%.

Таблица 3. ***Оценка питательности рационов по данным балансового опыта***

Корма, показатели питательности	Ед.изм.	Контроль	Опыт
Сено злаково-боб.мн.трав	кг	2.134	2.110
Силос злаково-боб.мн.трав	-«-	10.946	11.190
Комбикорм 1	-«-	4.200	-
Комбикорм 2	-«-	-	4220
В рационах содержалось:			
Обменная энергия	МДж	67.4	67.0
Сухое вещество	кг	8.374	8.512
Сырой протеин	г	1201	1234
Распадаемость протеина	%	78	70
Сырая клетчатка	г	1900	2048
Лигнин	-«-	523	499
Гемицеллюлоза	-«-	1623	1620
Целлюлоза	-«-	1563	1594
Крахмал	-«-	1510	1540
Сахар	-«-	330	320
Сырой жир	-«-	465	467
Субстратная оценка рациона			
Ацетат	г	1832	1734
Пропионат	-«-	788	833
Бутират	-«-	447	437
Сумма аминокислот	-«-	710	743

Сумма высших жирных кислот	-«-	368	365
Глюкоза, молочная кислота	-«-	109	118

Таким образом, выявилось преимущество в отложении энергии в приросте у бычков опытной группы.

Это подтвердилось в последующем, когда в заключительном месяце опытного периода среднесуточный прирост у животных опытной группы превысил контроль на 26 % ($P < 0,01$).

Таблица 4. ***Баланс энергии у бычков, МДж/сутки***

Показатели	Группы бычков	
	контрольная	опытная
Валовая энергия корма	139,4±3,6	139,5±1,9
Энергия кала	52,5±1,0	53,2±3,8
Энергия переварим.питат.в-в	86,9±3,7	86,4±3,0
Потери энергии с метаном и теплотой ферментации	15,0±0,7	14,5±0,5
Энергия мочи	4,5±0,3	4,9±0,4
Обменная энергия	67,4±3,2	67,0±2,8
Теплопродукция	53,7±2,5	51,9±2,0
Энергия в приросте	13,7±0,9	15,1±1,7

Респирационные исследования, проведенные на животных этого возраста, показали, что у бычков опытной группы были на 15 % ($P<0,01$) ниже вентиляция легких и на 13 % ниже суточная теплопродукция (табл.5).

Таблица 5. ***Газоэнергетический обмен у бычков 15-месячного возраста***

Группы	Легочная вентиляция, л/мин	Потребление кислорода, %	Выделение углекислоты, %	Дыхат. коэффициент	Теплопродукция, МДж/сут
Контроль	54±1,44	3,10±0,18	2,50±0,14	0,80±0,02	48,78±3,48
Опыт	46±1,35	3,23±0,06	2,54±0,13	0,79±0,02	42,42±0,65

Важным моментом являлось то, что при практически одинаковом уровне энергетического и протеинового питания, спектр субстратов, образующихся из питательных веществ корма, был различным, что позволило более эффективно использовать субстраты в энергетическом обмене (табл. 6). В результате изменений субстратного спектра

Таблица 6. ***Использование субстратов в энергетическом обмене у бычков***

Показатели	Ед. изм.	Группы	
		контроль	опыт
Теплопродукция	МДж	53,7	51,9
Дыхательный коэффициент	CO_2/O_2	0,840	0,858
Аминокислоты и др.азотистые в-ва	г	400	390

Ацетат и глюкоза	-«-	1447	1580
Высшие жирные к-ты, кетоновые тела	-«-	653	560
АТФ крови	Мг%	33,9	22,1
Креатинкиназа	Е/л	19,3	43,2

обеспеченность макроэргами изменилась. Скорость обмена АТФ (генерация и использование) была выше у бычков опытной группы, что совпадает с активностью креатинкиназы (табл. 6).Эти данные подтверждаются и результатами контрольного убоя. У животных опытной группы был выше убойный выход и мясность туш. Калориметрия образцов длиннейшей мышцы спины показала, что у бычков контрольной группы содержалось 21,96±0,15 кДж энергии, у опытной – 23,04±0,32 кДж (разница 4,9 %, P<0.01); в средних пробах туши – 24,64±0,53 кДж и 24,73±0,27 кДж/г сухого вещества.

Исследования были продолжены в условиях научно-производственного опыта на двух группах бычков, по 20 голов в группе. Проведенная оценка энергетической и субстратной питательности рационов показала, что изучаемая кормовая добавка позволила на 11 % увеличить в опытной группе содержание сырого протеина и суммы аминокислот (табл. 7).

Таблица 7. ***Рационы кормления бычков с живой массой 300 кг (расчет фактической поедаемости корма)***

Корма, показатели питательности	Ед. изм.	Контроль	Опыт
Сено злаковых мн.трав	кг	6,5	6,5
Силос злаковых мн.трав	-«-	7,5	7,5
Дерть зерносмеси	-«-	3,0	-
Дерть+кормовая добавка	-«-	-	3,0
В рационах содержится:			
Обменная энергия	МДж	65,0	65,5
Сухое вещество	кг	7,8	7,8
Сырой протеин	г	1009	1121
Распадаемый протеин	-«-	780	780
Сырая клетчатка	-«-	1900	1850
Крахмал	-«-	1450	1370
Сахар	-«-	265	265
Сырой жир	-«-	265	299
Субстратная оценка рационов			
Ацетат	г	1543	1474
Пропионат	-«-	615	661
Бутират	-«-	333	328
Сумма аминокислот	-«-	597	662
Сумма высших жирных кислот	-«-	200	226
Глюкоза, молочная кислота	-«-	192	174

Трехмесячные испытания кормовой добавки, задаваемой в количестве 312 г на 1 голову в сутки в рационах откармливаемых

бычков в составе зерновой дерти, показали стабильное увеличение среднесуточного прироста животных. У бычков опытной группы за 3 месяца среднесуточный прирост был на 19 % выше, чем у контрольных (табл. 8).

Таблица 8. ***Среднесуточный прирост бычков в научно-производственном опыте***

Группы	Периоды опыта, месяцы			
	0-1	1-2	2-3	0-3
Контроль	850±60	960±58	853±50	892±21
Опыт	1025±72	1060±38	1105±67	1064±35
% к контролю	120,6	110,4	129,6	119,3
P <	0,06	0,07	0,003	0,0001

Более высокую интенсивность роста бычков опытной группы можно объяснить влиянием кормовой добавки на процессы преджелудочного и кишечного пищеварения, а именно за счет изменений спектра субстратов в преджелудках в сторону повышения количества пропионата, выхода аминокислот и высших жирных кислот в тонком кишечнике (табл. 7).

Результаты контрольного убоя показали, что как и в опыте, проведенном в условиях вивария института, у бычков опытной группы был выше убойный выход и недостоверно (на 9,7%) выше мясность туши.

Заключение

Обеспеченность животных энергией зависит от доступности из основных ее источников. У жвачных микрофлора в преджелудках в качестве энергетических источников использует все питательные вещества, однако доступность их неодинакова. Регуляция использования источников энергии существует как для тканевого обмена, так и в целом для животного. Поэтому в ряде работ по данной проблеме имеются рекомендации по тщательному нормированию источников энергии, ввиду их различной доступности (Агафонов, 1998; Агафонов и др., 2001; Riis et al, 1990). Разрабатывается АТФ-концепция в конечной эффективности использования энергии на физиологические функции и биосинтез компонентов продукции.

Регулирование преджелудочного пищеварения приводит к изменению спектра субстратов, образующихся в преджелудках и кишечнике (Агафонов, 1998; Агафонов и др., 2001; Сорокин, Лазаренко, 2003; Kovacova et al, 2001; Ludden and Kerley, 1997; Matthi et al, 2000; Piatkowski, 1990). У бычков опытной группы за счет кормовой

добавки рацион был оптимизирован по соотношению энергии и протеина для микроорганизмов рубца, по количеству основных субстратов, необходимых для тканевого энергетического обмена, по фонду субстратов для биосинтеза, по образованию макроэргов в тканях. Подтверждением этого в данном исследовании является снижение энергозатрат на синтетические процессы. Суточная теплопродукция у бычков опытной группы была ниже, чем в контрольной, а среднесуточный прирост и качество выхода продукции выше.

При одинаковом содержании ОЭ в рационах бычков контрольной и опытной групп как в научном, так и в научно-производственном опытах, можно говорить лишь об экономии затрат энергии в преджелудках, что мы попытались вычислить при проведении балансового опыта. Однако на данном этапе экономия энергии корма оказалась незначительной – всего 0,5 МДж/гол/сутки. Более значительным было снижение уровня теплопродукции у бычков опытной группы (1,8 МДж/гол/сутки). Поэтому эффективность использования обменной энергии на прирост бычков опытной группы была выше по сравнению с контролем (45,67 % – в контроле и 51,54 % – в опытной группе). Эти данные подтверждаются результатами контрольного убоя бычков: в средних пробах мякоти туши содержалось 24,64 кДж в контроле и 24,73 кДж в опыте на 1 г сухого вещества, а общее накопление энергии за сутки, соответственно, 13,97 МДж и 14,47 МДж (3,58 %, различия недостоверны).

По косвенным данным (концентрация АТФ и активность креатинкиназы в крови) можно предположить о существенном увеличении потребности в макроэргах у бычков опытной группы для процессов, протекающих в мышечной ткани. Однако этот интересный результат требует дополнительной проверки, так как на этой основе возможна разработка теста оценки биоконверсии энергии корма в компоненты мяса.

Как в научном, так и в научно-производственном опытах спектр ЛЖК у бычков опытной группы связан с более высоким образованием пропионата и с большим выходом доступных для тканевого обмена аминокислот. По нашим данным обеспеченность энергией и аминокислотами на биосинтез компонентов прироста у бычков опытной группы была выше за счет использования кормовой добавки, содержащей протеин с заранее определенными свойствами на фоне сено-силосно-концентратного рациона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В.И. Изучение обеспеченности животных энергией. Методы исследований питания с.-х. животных, 1998: 337-341.

2. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Сорокин М.В. и др. Совершенствование системы энергетического питания молочного скота. Тр. ВНИИФБиП, 2001, 40: 36-49.
3. Лакин Г.В. Биометрия. М., 1980: 293.
4. Надальяк Е.А., Агафонов В.И., Решетов В.Б. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у с.-х. животных. Метод.ук., Боровск, 1986: 58.
5. Сорокин М.В., Лазаренко В.П. Обмен энергии у растущих бычков при разной распадаемости протеина в рационах. Тр. ВНИИФБиП, 2003, 42: 134-140.
6. ARC. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Reference Book 433. London, 1988: 128 p.
7. Chudy Y.A. Energieumsatz: Einflussfactoren, Modellierung und energetisch Futterbewertung. Lohmann information, 2001, 1: 13-22.
8. Kovacova J., Ceresnakova Z. A., Sommer A. Crude protein and organic matter, degradability and intestind digestibility of varions feeds. J. of Farm Animal Sci., 2001, 34: 115-121.
9. Ludden and Kerley M.C. Amino Acid and Energy Interrelationships in Growing Beef Steers. J. Anim. Sci., 1997,75: 2550-2560.
10. Matthi A., Libzien P., Flachowsky E Zur Bedeutung von Bypass-Staree fur die glycoseversorgnung von hochleistenden Milchkuhen . Ubersichten zur Tierernáhrung, 2000, 28.1: 1-64.
11. Piatkowski B. Grundzuge der Wiederkáuer Ernáhrung. Jena, 1990: 236 s.
12. Riis P.M., Danfaer A., Hvelpland T et al. A model for the efficient use of new information within physiology, Tryk. Frideriksberg Bogtrykneri a.s. 1990: 68.

ЭЛЕМЕНТЫ ИММУНИТЕТА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У БЫЧКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН КОРМА, СОДЕРЖАЩЕГО ТРУДНОРАСЩЕПЛЯЮЩИЙСЯ КРАХМАЛ

В.Ф. Сухих
Лаборатория иммунобиотехнологии

Введение в рацион молодняка крупного рогатого скота кормовых средств, содержащих повышенное количество труднораспадающегося в рубце крахмала, оказывает положительное влияние на показатели, характеризующие функциональное состояние иммунной системы: происходит увеличение в крови лизоцима, общей бактерицидной активности и активности бета-лизинов; концентрация иммуноглобулинов класса G остается в пределах естественных биологических колебаний.

Введение

Современные представления о механизме транспорта питательных веществ в организме животного предусматривают наличие определенных метаболических потоков, по которым продукты расщепления корма в рубце переносятся к тканям организма животного. В литературе представлена биохимическая характеристика основных метаболических потоков, но не исследованы детально составляющие их компоненты. Определенные трудности возникают также в связи с разной расщепляемостью компонентов корма в рубце.

По распадаемости белка кормов экспериментальный материал имеется. Значительно менее изучена распадаемость углеводных компонентов корма и связь степени распадаемости сложных углеводов с показателями иммунологической защиты организма животного. Известно, что максимальная эффективность процессов биосинтеза мышечной массы в организме молодняка зависит от способности организма молодого животного сопротивляться неблагоприятным факторам внешней среды, в т.ч. от наличия питательных компонентов рациона. Регуляторные механизмы обеспечения общего метаболического потока питательными веществами имеют сложную многоступенчатую структуру. Эндокринная регуляция и иммунологическая защита являются ответственными звеньями этой системы регулирования (Моргунов и др., 1975; Берестов и др., 1991).

Иммунологические механизмы регуляции не только изменяют систему адаптации животного к изменяющемуся рациону, но и влияют на распределение питательных веществ между различными звеньями всего метаболического потока. Отдельные иммунологические стадии регуляторного процесса различаются по механизму действия иммунологических факторов, но тем не менее в результате влияния различных элементов системы получается эффект оптимального распределения питательных веществ корма между различными звеньями процесса биосинтеза белка на клеточном уровне.

Данная работа является частью комплексных исследований, выполненных сотрудниками ряда лабораторий института. Для решения поставленных задач проведена экспериментальная работа на молодняке крупного рогатого скота в периоды доращивания и интенсивного откорма.

Материал и методы

Работа выполнена в виварии института на 10 бычках черно-пестрой породы в период доращивания животных и откорма, с 9- до 15-месячного возраста. Опыт состоял из предварительного периода,

продолжительностью 45 дней, и опытного - 158 дней. Каждый из этих периодов имел свои особенности вследствие различий в возрасте бычков, их массе и среднесуточном приросте. Кормление варьировали в соответствии с возрастом животных и рассчитывали на среднесуточный прирост 1000 г. Комбикорм для всех животных готовили из ячменно-пшеничной смеси с добавлением кукурузы. В комбикорме для бычков опытной группы 30 % ячменя заменяли кукурузой. В заключительной стадии эксперимента комбикорм скармливали 2 раза в сутки, вместо трехразового скармливания. Подробно условия кормления и содержания животных, характеристика зоотехнических, морфологических, физиологических и биохимических показателей описаны в статье Коровяцкого и др. (2002).

В качестве критериев иммунологического состояния организма использовали концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови, активность лизоцима, бета-лизинов и общую бактерицидную активность. Лизоцим определяли, используя в качестве тест-культуры Micrococcus lysodeicticus (Дорофейчук 1968), бета-лизины с помощью Bacillus subtilis (Бухарин и др., 1972) и общую бактерицидную активность по степени задержки роста культуры E. coli в среде, содержащей сыворотку крови подопытных животных. Иммуноглобулины класса G определяли иммунодиффузионным методом Манчини (Бем, 1987). Экспериментальный материал обрабатывали статистически с применением критериев Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Общая бактерицидная активность крови (табл. 1) в сыворотке крови бычков после скармливания им рациона, содержащего труднораспадаемый крахмал в виде кукурузы, была значительно выше в сравнении с контролем: на 7,6 % в начальную фазу эксперимента и на 15,8 % в заключительный период.

Таблица 1. ***Общая бактерицидная активность сыворотки крови подопытных бычков, (%)***

№ животных	1 взятие крови (10 мес)	2 взятие крови (11 мес)	3 взятие крови (13 мес)	4 взятие крови (15 мес)
		Контрольная группа		
1	37.4	37.3	38.2	38.8
2	37.8	38.8	38.7	38.3
3	38.2	38.4	38.6	38.7
4	38.6	38.2	37.9	38.5
5	38.3	38.7	38.1	38.5
В сред.	38.1±0.2	38.3±0.2	38.3±0.2	38.6±0.1
	Опытная группа			
6	38.2	38.7	43.2	45.4

7	37.7	38.0	42.2	43.3
8	37.1	37.7	39.7	43.7
9	37.8	38.1	40.3	45.9
10	37.7	38.2	40.5	45.3
M±м	37.9±0.2	38.1±0.2	41.2±0.7	44.7±0.7
% к контролю	99.5	99.5	107.6*	115.8*

Примечание – здесь и далее значения со значком * - P < 0.005

Постепенное нарастание общей бактерицидной активности крови возможно лишь в случае повышения активности отдельных компонентов этой системы. Наряду с этим обобщенным показателем в крови животных есть и другие индивидуальные субстанции (лизоцим, β-лизин) с отчетливо выраженным бактерицидным действием.

В условиях данного опыта активность лизоцима (табл. 2) в опытной группе во время всего эксперимента постоянно превышала контроль: на 1,4% в начале исследования и на 20,9% в конце опыта. Это свидетельствует об усилении действия бактерицидных элементов в организме животного при перераспределении углеводных компонентов в общем метаболическом потоке. Есть основание полагать, что более высокая функциональная активность иммунной системы и надёжность функционирования комплекса систем организма, ответственных за состояние его защитных систем и его общей, неспецифической резистентности, способны обеспечить дополнительный прирост продукции у молодняка крупного рогатого скота.

Таблица 2. ***Активность лизоцима в сыворотке крови подопытных бычков, мкг/мл***

№ животных	1 взятие крови (10 мес)	2 взятие крови (11 мес)	3 взятие крови (13 мес)	4 взятие крови (15 мес)
		Контрольная группа		
1	10	13	11	11
2	12	13	16	14
3	13	16	17	16
4	11	16	13	14
5	11	13	12	12
M± м	11.4±05	14.2±0.4	13.8±0.4	13.4±0.66
		Опытная группа		
6	12	14	14	13
7	10	16	16	16
8	12	16	18	19
9	13	13	17	18

10	10	13	14	15
M±м	10.6±0.68	14.4±0.046	15.8±0.45	16.2±0.48
% к контролю	93.0	101.4	114.5 *	120.9*

Животные, имевшие повышенные показатели неспецифической резистентности, лучше росли и развивались, о чем свидетельствует более высокий среднесуточный прирост (1577, 1462, 1423 г). По-видимому, бактерицидные факторы крови являются существенными элементами в организме животного, обеспечивающими метаболизм на высоком уровне. Высокий уровень метаболических реакций, в свою очередь, поддерживает активность биосинтетических процессов, достаточную для обеспечения запланированной продуктивности животных. Бактерицидные элементы крови наряду с другими факторами обеспечивают также высокое качество получаемой продукции.

Активность бета-лизинов (табл.3) сыворотки крови бычков, наряду с литическими свойствами лизоцима, отражает состояние общего бактерицидного фона в организме подопытных животных. Уровень активности бета-лизинов в крови на протяжении опыта оставался достаточно высоким (18,0 –20,1 %), хотя при исследовании динамики этого процесса существенных изменений активности в отдельные периоды опыта не было обнаружено. Более высокую активность бета-лизинов у животных опытной группы относительно контрольной наблюдали только в 13 - месячном возрасте (106,9 %). В целом за весь период эксперимента литическая активность крови несущественно и недостоверно менялась в пределах естественных физиологических колебаний.

Таблица 3. ***Уровень активности бета-лизинов сыворотки крови подопытных бычков, (%)***

№ животных	1 взятие крови (10 мес)	2 взятие крови (11 мес)	3 взятие крови (13 мес)	4 взятие крови (15 мес)
		Контрольная группа		
1	18.8	18.9	19.0	19.3
2	18.3	18.5	18.4	18.4
3	19.1	19.6	19.3	19.4
4	17.8	17.8	18.0	18.0
5	19.3	19.6	19.5	19.7
M±м	18.7±0.3	18.9±0.3	18.8±0.3	19.0±0.3
		Опытная группа		
6	19.1	15.7	18.9	16.4
7	18.4	18.6	19.7	21.0

8	18.7	18.7	19.5	18.6
9	19.2	19.1	21.2	17.7
10	18.6	17.9	21.3	19.1
M±м	18.8-0.2	18.0±0.5	20.1±0.5	18.6±0.9
% к контр.	100.5	95.0	106.9	98.0

Концентрация иммуноглобулинов класса G (табл.4) в крови бычков на протяжении опыта весьма существенно колебалась, оставаясь, однако, во все периоды взятия крови и у всех животных в пределах физиологической нормы. Это свидетельствует о специфической изменчивости элементов молекулярного иммунитета и факторов, ответственных за неспецифическую резистентность в связи с изменением уровня деградируемости крахмала в рубце. Однако расщепляемость крахмала и протеина в рубце имеет многоступенчатый характер, поэтому на разных стадиях ферментации могут образоваться такие биологические структуры, которые оказывают специфическое влияние на иммунологические функции организма.

Таблица 4. ***Концентрация иммуноглобулина класса G в сыворотке крови подопытных бычков, мг/мл***

№ животных	1 взятие крови (10 мес)	2 взятие крови (11 мес)	3 взятие крови (13 мес)	4 взятие крови (15 мес)
		Контрольная группа		
1	11.65	12.15	7.2	9.6
2	8.9	10.9	10.8	8.15
3	13.0	11.65	12.90	10.55
4	12.2	8.9	12.8	13.65
5	10.15	15.95	10.0	10.45
M± м	11.18±1.1	11.91±0.5	10.74±1.25	10.48±0.85
		Опытная группа		
6	17.85±0.15	10.75±0.05	9.0±0.1	6.15±0.05
7	16.15±0.25	14.6±0.1	16.7±0.2	16.9±0.1
8	12.9±0.2	16.5±0.1	8.65±0.05	14.9±0.2
9	14.7±0.2	9.3±0.2	12.5±0.1	15.95±0.05
10	13.0±0.2	12.8±0.1	12.85±0.05	14.55±0.15
M±м	14.92±1.26	12.79±0.48	11.95±1.52	13.69±0.9
% к контролю	133*	107	111	131*

P < 0,05

Анализ материала табл. 4 показывает, что введение в рацион кормов с труднорасщепляемым крахмалом выравнивает концентрацию иммуноглобулинов в крови контрольных и подопытных животных, снижая различие между группами животных до 7,0-11,0 %. Детали в механизме влияния модифицированного рациона на молекулярный иммунитет пока изучены недостаточно.

Заключение

Введение в рацион молодняка крупного рогатого скота кормовых средств, содержащих труднораспадающийся в рубце крахмал, приводит к существенному повышению уровня лизоцима в крови (на 1.4 – 20,9 %) и общей бактерицидной активности крови (на 7,6 – 15,8 %). Уровень активности бета-лизинов в крови подопытных бычков превышал контроль на 6,9% при длительном скармливании рациона на кукурузной основе и на 15,8% при двукратном введении комбикорма в рацион. Концентрация иммуноглобулина G в крови бычков была значительно выше контроля (на 30,5%), но окончательные выводы сделать нельзя, потому что и у интактных животных разница была существенной.

Из анализа зоотехнических и иммунологических показателей следует заключить, что длительное скармливание бычкам на откорме повышенного количества труднодеградируемого в рубце крахмала, положительно повлияло на величину показателей, характеризующих функциональное состояние иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моргунов И.Н., Супоницкая В. М. Гуморальные факторы иммунологической реактивности организма. Киев, 1975.
2. Берестов В.А., Калинина Г. М. Особенности неспецифического иммунитета у норок и песцов. Ленинград, 1991.
3. Смирнов А.М., Васильев М.В., Никишина И.В. Показатели естественной резистентности организма у клинически здоровых телят при гипотрофии. Сб. научных работ Ленинградского вет. института, 1979, 55; 110-113.
4. Дорофейчук В. Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом, Лаб. дело , 1968, 1; 28.
5. Бухарин 0.В., Фролов Б.А., Луда А. П. Ускоренный метод определения бета-лизинов в сыворотке крови, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1972, 119, 42.
6. Бем Э. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини, Иммунологические методы . М. Мир. 1987; 49-57.
7. Коровяцкий А.М., Галочкина В.П., Матвеев В.А., Дворецкая Т.Н Влияние кормов с пониженной расщепляемостью в рубце крахмала на уровень

гормонов, связанных с метаболизмом глюкозы и мясную продуктивность бычков. Труды ВНИИФБиП с-х животных, 2002..

ПРОДУКТИВНОСТЬ ПОМЕСНЫХ СВИНЕЙ КРУПНАЯ БЕЛАЯ Х ЛАНДРАС И КРУПНАЯ БЕЛАЯ Х PIC-402 ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТИПОВЫХ КОМБИКОРМОВ В РАЦИОНАХ

Н.С.-А. Ниязов, Д.Е. Панюшкин, О.В. Обвинцева
Лаборатории аминокислотного питания и межуточного обмена веществ

Изучали эффективность использования полнорационных комбикормов типа СК-5; СК-6 и СК-7 помесными свиньями. Установлено, что в период доращивания помесные поросята пород крупная белая х ландрас и крупная белая х Pic-402 по среднесуточному приросту, расходу корма, сырого протеина и обменной энергии на единицу прироста существенно не различались. Следовательно, в этот период генетические возможности роста обеих групп животных реализовались одинаково. Однако уже в 1-й период откорма у помесных свиней крупная белая х Pic-402 наметилась тенденция к лучшему росту и конверсии корма по сравнению с помесями крупная белая х ландрас. Среднесуточный прирост у них был на 5,05% выше, а расход корма ниже на 7,58%. Это превосходство сохранилось и во второй период откорма, что свидетельствует о лучшей реализации генетического потенциала помесями крупная белая х Pic-402.

Введение

Одним из путей увеличения производства и улучшения качества свинины является широкое применение межпородного скрещивания. Этот метод разведения позволяет эффективно и быстро использовать желательные человеку качества животных, накопленные в результате длительной селекции. Кроме того, комбинация различных генов обеспечивает гетерозис, т.е. усиление жизненности и повышение продуктивности свиней по сравнению с исходными родительскими формами. Однако эффект скрещивания проявляется по-разному и зависит от породы, степени генетической обусловленности признаков, их сочетаемости, условий кормления и содержания животных (Мысик, 1975; Петухова, 1989; Кабанов, 2001).

Задачей настоящей работы являлось сравнительное изучение эффективности использования полнорационных комбикормов по показателям интенсивности роста, использования питательных веществ, расходу корма, протеина и энергии на единицу прироста

разными помесями поросят (крупная белая х ландрас и крупная белая х Pic-402).

Материалы и методы

Для решения поставленных задач в условиях вивария института проведен опыт на помесных поросятах крупная белая х ландрас (1-я группа) и крупная белая х Pic-402 (2-я группа), подобранных с учетом пола, возраста (55-58 суток) и живой массы. Животные обеих подопытных групп (по 15 голов в группе) в разные возрастные периоды: доращивание до 104 дней, первый период откорма до 154 дней и второй период откорма до 222 дней получали полнорационные комбикорма типа СК-5; СК-6 и СК-7 с премиксами КС-3, КС-4 и КС-5 (табл. 1 и 2).

Для контроля за ростом молодняка свиней проводили индивидуальное взвешивание в начале и конце каждого возрастного периода. Кормление подопытных животных осуществлялось сухим кормом, с учетом его поедаемости. С целью определения эффективности использования азота и переваримости питательных веществ корма были проведены балансовые опыты в 104 дневном возрасте (по 4 головы из каждой группы) и во втором периоде откорма (возраст 204 дня, по 3 головы из каждой группы), с последующим их убоем, обвалкой туш, взятием

Таблица 1. ***Состав и питательность комбикормов, (%)***

Компоненты	Комбикорм		
	СК-5	СК-6	СК-7
Пшеница	30,00	40,00	40,00
Овес	-	-	4,67
Ячмень без пленок	43,28	-	-
Ячмень	-	37,82	33,94
Отруби пшеничные	1,65	3,74	5,25
Шрот подсолнечный в/п	10,00	9,44	8,80
Шрот соевый	7,69	2,63	2,27
Мука рыбная 64%	2,00	-	-
Смесь кор. белков	-	3,00	2,00
СОМ "Нуклоспрей"	1,00	-	-
Масло растительное	-	0,40	-
Лизин кормовой	0,05	0,10	-
Метионин кормовой	-	0,04	-
Мел кормовой	1,33	1,42	0,95
Соль поваренная	0,25	0,30	0,33
Фосфат	1,52	-	0,79

Натуфос 5000 С	0,01	0,01	-
Ваниль	0,02	-	-
Асидлак	0,20	0,10	-
Премикс КС-3	1,00	-	-
Премикс КС-4	-	1,00	-
Премикс КС-5	-	-	1,00
В 1 кг комбикорма содержится:			
Влажность, %	13	11,9	11,9
Обменная энергия, МДж/кг	13,23	12,89	12,61
Кормовые единицы	1,24	1,12	1,10
Сырой протеин, %	17,44	15,43	14,92
Лизин, %	0,87	0,69	0,60
Метионин+цистин, %	0,57	0,54	0,46
Сырая клетчатка, %	4,48	4,81	5,07
Сырой жир, %	2,79	2,52	2,61
Ca, %	1,15	0,72	0,73
Na, %	0,16	0,15	0,16
P,%	0,91	0,62	0,59

Таблица 2. ***Витаминный и минеральный состав премиксов для растущих свиней (на 1 кг)***

Показатели	Ед. изм.	Премиксы		
		КС-3	КС-4	КС-5
Витамин А	тыс. МЕ	20,00	6,00	4,50
Витамин D	тыс. МЕ	2,00	1,20	0,90
Витамин Е	мг	20,00	18	18,3
Витамин К	мг	2,00		
Витамин В1	мг	3,00		
Витамин В2	мг	6,00	2,00	1,50
Витамин В3	мг	16,00	5,00	3,75
Витамин В4	мг	150,00	300,00	200,00
Витамин В5	мг	30,00	15,00	10,00
Витамин В6	мг	4,00		
Витамин В12	мг	0,04	0,02	0,01
Витамин С	мг	100,00		
Cu	мг	12,00	10,00	11,00
Fe	мг	72,00	45,00	67,00
J	мг	0,60	0,40	0,30
Mn	мг	37,00	38,00	48,00
Se	мг	0,20	0,15	0,15
Zn	мг	58,00	57,00	55,00
Co	мг	0,28	0,28	0,31

образцов органов и тканей, корма, кала и мочи для физиолого-биохимических исследований (Лебедев и др., 1969).

Результаты и обсуждение

Анализ данных опыта показал (табл. 3), что помесные поросята в период доращивания по среднесуточному приросту, расходу корма, сырого протеина и обменной энергии на единицу продукции существенно не различались. Следовательно, в этот период генетические возможности роста поросят обеих экспериментальных групп реализовались одинаково. Однако в 1-й период откорма у помесных свиней крупная белая х Pic-402 отмечена тенденция к лучшему росту и конверсии корма, чем у помесей крупная белая х ландрас. Среднесуточный прирост у них был на 5,05% выше, а расход корма снизился на 7,58%, также произошло снижение расхода сырого протеина на 0,8% и обменной энергии на 4,7% на 1 кг прироста, по сравнению с животными 1-й группы. За весь период откорма у помесных свиней 2-й группы среднесуточный прирост был на 7,27% выше, а расход корма на 6,72% ниже, по сравнению с животными 1-й группы. Помеси крупная белая х Pic-402 более эффективно использовали сырой протеин (на 6,75%) и обменную энергию корма (на 6,74%) на 1 кг прироста. Из вышеизложенного следует, что свиньи 2-й группы лучше реализовали свой генетический потенциал в период откорма.

Таблица 3. ***Живая масса, среднесуточный прирост и затраты корма у помесных свиней***

Показатели	Группы	
	кр. белая + ландрас	кр. белая + Pic-402
Период доращивания 105 дн.		
Живая масса в начале периода, кг	15,60±0,55	14,99±0,65
Живая масса в конце периода, кг	36,45±1,08	36,02±1,35
Прирост живой массы, кг	20,85±0,82	21,03±0,87
Среднесуточный прирост, г	426,0±17,0	429,0±18,0
Потреблено корма на 1 гол., кг	68,0	68,0
Расход корма на 1 кг прироста, кг	3,26	3,23
В т.ч. сырого протеина, г	568,2	563,9
обменной энергии, МДж	44,12	43,74
Первый период откорма 154 дн.		
Живая масса в начале периода, кг	36,25±1,27	36,20±1,76
Живая масса в конце периода, кг	61,95±1,56	63,18±1,62
Прирост живой массы, кг	25,71±0,43	26,98±0,36
Среднесуточный прирост, г	514,0±9,0	540,0±7,0
Потреблено корма на 1 гол., кг	98,5	98,5
Расход корма на 1 кг прироста, кг	3,83	3,54

В т.ч. сырого протеина, г	591,1	563,3
обменной энергии, МДж	49,38	47,06
Второй период откорма 224 дн.		
Живая масса в начале периода, кг	61,95±1,56	63,18±1,62
Живая масса в конце периода, кг	106,07±4,77	111,07±5,78
Прирост живой массы, кг	44,12±3,98	47,89±4,11
Среднесуточный прирост, г	621±56	674±58
Потреблено корма на 1 гол., кг	203,3	203,3
Расход корма на 1 кг прироста, кг	4,61	4,25
В т.ч. сырого протеина, г	687,9	633,8
обменной энергии, МДж	58,1	53,5
За весь период откорма		
Живая масса в начале периода, кг	36,25±1,27	36,20±1,76
Живая масса в конце периода, кг	106,07±4,77	111,07±5,78
Прирост живой массы, кг	69,82	74,87
Среднесуточный прирост, г	577	619
Потреблено корма на 1 гол., кг	301,8	301,8
Расход корма на 1 кг прироста, кг	4,32	4,03
В т.ч. сырого протеина, г	652,4	608,4
обменной энергии, МДж	54,9	51,2

На основании данных о потреблении кормов и выделении кала, а также их химического анализа, были вычислены коэффициенты переваримости питательных веществ для каждой подопытной группы (табл. 4).

Таблица 4. ***Коэффициенты переваримости питательных веществ кормов, %***

Показатели	Период доращивания		Период откорма	
	кр. белая х ландрас	кр. белая х Pic-402	кр. белая х ландрас	кр. белая х Pic-402
Сухое вещество	82,23±0,34	81,13±1,05	80,03±1,36	81,13±0,45
Органическое вещество	84,52±0,51	82,83±0,94	81,96±1,21	83,32±0,85
Сырой протеин	81,75±0,77	78,91±1,62	80,91±1,29	80,64±1,86
Сырой жир	68,34±2,84	69,55±2,06	54,72±5,80	59,21±4,05
Сырая клетчатка	40,23±1,94	38,83±1,87	35,88±2,91	39,95±1,99
Сырая зола	39,16±1,84	38,60±3,27	38,30±4,51	42,37±2,42
БЭВ	88,87±0,48	87,48±0,30	86,45±0,97	87,43±0,09

При анализе коэффициентов переваримости видно, что в конце периода доращивания существенных различий в переваримости отдельных питательных веществ между группами не выявлено. Во втором балансовом опыте установили, что коэффициенты переваримости питательных веществ корма у животных 2-й группы были несколько выше. Так 2-я группа животных имела более высокую

переваримость сырого жира (на 4,49%) и сырой клетчатки (на 4,07%), по сравнению с животными 1-й группы. В результате балансового опыта установлено, что животными 2-й группы усвоено 26,17±2,66 г азота, что на 2,58 г больше, по сравнению с животными 1-й группы. В процентном отношении от переваренного усвоенный азот составил 42,49±3,81% и 38,17±2,09%, во 2-й и 1-й группах, соответственно. Из этого следует, что животные 2-й группы лучше трансформировали кормовой протеин в белок собственного тела, имели больший прирост массы тела и оплату корма. Полученные нами экспериментальные данные согласуются с данными Баньковского (1971), который установил, что помеси свиней с породой пьетрен лучше переваривают питательные вещества корма.

Данные по убоям подопытных животных, проведенным в возрасте 109 и 207 дней, показали (таблица 5), что в 109-дневном возрасте у подопытных поросят не выявлено существенных различий по убойному выходу и показателям обвалки туш. Однако в конце откорма отмечено, что у свиней 2-й группы убойный выход был на 2,74%, а выход мяса на 3,15% выше. Соответственно с выходом мяса изменились показатели выхода сала и костей. Так вес сала у помесей крупная белая х Pic-402 был ниже на 1,85% относительно массы туши.

Таблица 5. ***Показатели обвалки туш (помеси крупная белая х ландрас и крупная белая х Pic-402, соответственно)***

Живая масса, кг	Масса туши, кг	Убойный выход, %	Мясо	Сало	Кость
			кг	кг	кг
В конце периода доращивания					
37,25±2,36	21,09±1,78	56,41±1,09	7,51±0,76	1,46±0,11	2,01±0,17
36,60±1,78	20,85±1,24	56,89±0,87	7,19±0,39	1,36±0,07	1,90±0,07
В конце периода откорма					
95,50±1,32	59,35±1,55	62,12±0,83	18,93±0,61	6,67±0,35	4,33±0,17
97,00±3,11	62,93±2,16	64,86±0,14	20,74±0,88	6,43±0,58	4,25±0,16

Заключение

Исследования, выполненные на помесных свиньях, выявили преимущества в интенсивности роста, определяемой по показателям затрат корма и эффективности его конверсии в продукцию, у помесей, полученных от скрещивания свиней крупной белой породы с животными линии Pic-402, что дает возможность сделать заключение о более перспективном использовании данных животных при откорме на животноводческих комплексах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мысик А.Т. Мясной и беконный откорм. М.: Россельхозиздат, 1975: 189 с.
2. Генетические основы селекции животных. (Под ред. Петуховой В.Л.) М.: Агропромиздат, 1989: 448 с.
3. Кабанов В.Д. Свиноводство. М.: Колос, 2001: 431 с.
4. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. М.: Колос, 1969: 475 с.
5. Баньковский Б.В. Переваримость питательных веществ, обмен азота и мясосальные качества свиней пород пьетрен, миргородской их помесей и ландрас. В кн.: Пищеварение и обмен веществ у свиней. М.: Колос, 1971: с. 145-152.

ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ РАЗНОГО ГЕНОТИПА

К.Т. Еримбетов, Н.С.-А. Ниязов, Д.И. Шариева, Е.В. Пьянкова, О.В. Обвинцева
Лаборатория белково-аминокислотного питания

В комплексных исследованиях по изучению физиолого-биохимических закономерностей биосинтеза компонентов мяса у молодняка свиней разного генотипа установили, что при одинаковых условиях кормления помесные поросята крупной белой × Pic-402 по интенсивности роста превосходят помесей крупной белой × ландрас, при меньших затратах корма на единицу прироста. Выявили, что лучший рост помесей кр. белая × Pic 402 обусловлен более эффективным использованием азотистых веществ корма в биосинтетических процессах в их организме, что, в свою очередь, способствовало увеличению массы скелетной мускулатуры и отложения мышечных белков.

Введение

Как известно, высоких показателей в свиноводстве можно достичь путем обеспечения животных высококачественными кормами, применения современных технологий их приготовления, эффективного использования поголовья, улучшения существующих и выведения новых пород, применения скрещивания и гибридизации (Терентьева,1988; Шарнин,1997; Мироненко, 2001).

Современные технологии производства свинины предусматривают использование в производственном процессе межпородных помесей. Этот прием позволяет создавать типы свиней с желаемыми мясными качествами, а также повышать продуктивность

животных за счет эффекта гетерозиса. Однако эффект скрещивания проявляется по-разному и зависит от породы, степени генетической обусловленности признаков, их сочетаемости, условий кормления и содержания животных (Никульников, 2000; Мамонтов, 1998; Васильева, 1997; Иващук, 1997; Susenbeth et al., 1999). Обеспечение адекватного питания для полной реализации гетерозиса нуждается в серьезной физиолого-биохимической проработке.

В практической работе важно уметь отбирать генотипы животных с высокой продуктивной наследственностью. Одним из таких приемов может быть использование биохимических тестов для раннего прогнозирования мясных качеств животных – скорости роста, способности к формированию мышечной и жировой ткани, эффективности использования корма. Различия в генотипе проявляются на уровне регуляторных систем организма, от состояния которых зависит интенсивность и направленность метаболических процессов, влияющих на скорость наращивания мясной и жировой ткани, и на степень использования питательных веществ корма на прирост. Актуальность научных поисков в этом плане определяется недостаточной изученностью механизмов, регулирующих процессы биосинтеза белка и липогенеза в тканях, и определяющих формирование мясных качеств помесных свиней. Накопление сведений о параметрах метаболизма и биосинтеза компонентов мяса требуется так же для разработки системы питания помесей.

В связи с изложенным в задачу настоящих исследований входило изучение особенностей азотистого метаболизма и формирования мышечной ткани у молодняка помесных свиней.

Материал и методы

В комплексе с другими лабораториями в соответствии с задачами исследований проведен опыт в виварии института на помесных поросятах: 1-я группа (крупная белая × ландрас), 2-я группа - (крупная белая × Pic-402). По принципу парных аналогов с учетом породы, происхождения, живой массы, пола и возраста были сформированы две группы по 15 голов в каждой. Возраст поросят составлял 55-58 дней. Содержание групповое в клетке, поение из автопоилок. Опыт был поделен на три периода: доращивание поросят до достижения живой массы – 35-36 кг (104-106 дней) и два периода откорма до достижения живой массы 61-63 (154-156 дней) и 100-110 кг (222-225 дней). Рецепты комбикормов и премиксов разрабатывали в соответствии с потребностями животных в питательных и биологически активных веществах на различных этапах роста и

развития животных. Рационы для обеих групп свиней были одинаковыми и включали комбикорма типа СК-5; СК-6 и СК-7 и премиксы КС-3; КС-4 и КС-5 на соответствующих периодах выращивания и откорма. Содержание незаменимых аминокислот в комбикормах для свиней приведено в таблице 1. Комбикорма были приготовлены по нашим рецептам на Кузнецовском заводе

Таблица 1. ***Содержание незаменимых аминокислот в комбикормах для свиней, г / кг корма***

Аминокислоты	Период доращивания	Период откорма
Треонин	6,6	4,2
Валин	6,3	5,3
Метионин+цистин	6,0	4,6
Изолейцин	7,3	4,7
Лейцин	11,8	9,3
Фенилаланин	8,9	6,3
Лизин	8,69	5,7
Гистидин	4,1	2,8
Аргинин	9,2	7,1
Сырой протеин, г в кг корма	174,4	149,3

“Комбикорма и Премиксы” Московской области. В течение опыта учитывали потребление комбикормов, расход корма на единицу прироста и периодически исследовали их химический состав. С целью контроля за ростом и развитием подопытных животных проводили индивидуальное взвешивание поросят в начале опыта и в конце каждого возрастного периода.

Для определения эффективности использования азота корма были проведены балансовые опыты в конце периода доращивания в возрасте 104 дней при живой массе 36 кг (по 4 головы из каждой группы) и во втором периоде откорма в возрасте 204-209 дней, при живой массе 95-100 кг (по 3 головы из каждой группы) с последующим убоем животных, обвалкой туш и взятием образцов органов и тканей для проведения биохимических анализов.

Для характеристики метаболизма азотистых веществ были определены: концентрация мочевины в плазме крови по Coulambe, Fawreon (1963); концентрация свободных и общих аминокислот в плазме крови, печени, кале и длиннейшей мышце спины на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339; активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в длиннейшей мышце спины и печени по Reitman, Frankel (1967); активность щелочной фосфатазы в плазме крови (Кальницкий, 1997); активность креатинкиназы в плазме крови (Холод, Ермолаев, 1988); содержание креатинина в плазме крови и моче по Лемперт (1968). Химический анализ мышечной ткани (сухое вещество, азот) проводили по

общепринятым методам (Лебедев, Усович, 1976). В пробах длиннейшей мышцы спины определяли также белковые фракции (саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные белки) по Helander (1957).В ходе опыта проводили анализ кормов, кала и мочи на содержание азота по Къельдалю. Для оценки качества туш и мяса нами определены следующие показатели: площадь «мышечного глазка», толщина шпига, pH созревания мяса в динамике, его влагоудерживающая способность, окраска, нежность и белково-качественный показатель (Гуменюк, Черкасская, 1977).

Результаты всех исследований обработаны с применением математических методов (Овсянников, 1976).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что при одинаковых условиях кормления помесные поросята кр. белой × Pic-402 в период доращивания по интенсивности роста и затратам корма на единицу прироста существенно не отличались от помесей кр. белой × ландрас (табл. 2). К концу откорма (возраст 209 дней) картина несколько изменилась. По интенсивности роста помеси кр. белая × Pic 402 опережали свиней кр. белая × ландрас на 42 г, при меньших затратах корма на единицу прироста (на 6,72 %) (табл. 2).

Таблица 2. ***Интенсивность роста и расход корма на единицу прироста свиней***

Показатели	Группы	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
Период доращивания		
Среднесуточный прирост живой массы, г	426 ± 17	429 ± 18
Расход корма на 1 кг прироста, кг	3,26	3,23
За весь период откорма		
Среднесуточный прирост живой массы, г	577	619
Расход корма на 1 кг прироста, кг	4,32	4,03

Результаты балансовых опытов свидетельствуют о том, что у свиней кр. белая × Pic 402 во все периоды опыта при меньшем количестве переваренного сырого протеина в желудочно-кишечном тракте выделение азота с мочой было ниже, чем у помесей кр. белая × ландрас, что указывает на более эффективное использование у них азота в обменных процессах. Отношение выделенного азота с мочой к потребленному с кормом у них снизилось на 5,3-8,0% (табл.3).

Таблица 3. ***Показатели усвоения азота корма свиньями, г/сутки***

Показатели	Период доращивания		Период откорма	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
Потреблено азота с кормом, г	47,44±0,00	47,44±0,00	76,38±0,00	76,38±0,00
Потреблено азота с кормом, г на кг живой массы ^{0,75} в сутки	3,15±0,06	3,19±0,08	2,50±0,03	2,47±0,06
Выделено:				
с калом	8,66±0,36	10,01±0,76	14,58±1,06	14,79±1,82
с мочой	18,00±0,75	17,19±0,85	38,21±1,50	35,42±1,92
Переварено, г	38,78±0,36	37,44±0,76	61,80±1,06	61,59±1,98
%	81,75±0,77	78,91±1,62	80,91±1,29	80,64±1,86
Отложено, г	20,79±0,66	20,25±1,20	23,59±1,32	26,17±2,66
% от потребленного	43,82±1,39	42,68±2,92	30,89±3,06	34,26±1,75
% от переваренного	53,60±1,69	54,08±2,01	38,17±2,09	42,49±3,81
Отложено, г на кг живой массы ^{0,75} в сутки	1,38±0,04	1,36±0,06	0,77±0,04	0,85±0,06
Отложение белка в теле, г	130 ± 4	127 ± 7	147 ± 8	164 ± 13
Отложение белка в теле, г на кг живой массы ^{0,75} в сутки	8,62±0,25	8,50±0,37	4,81±0,25	5,31±0,37
Отношение N мочи/N потребленному с кормом	0,38	0,36	0,50	0,46

Различия в эффективности использования азота корма помесными свиньями особенно отчетливо проявились к концу откорма. В результате этого помеси кр. белая × Pic 402 в период откорма по отложению азота корма на 2,58 г/сут превосходили сверстников кр. белая × ландрас. При расчете количественных параметров отложения азота и белка на кг метаболической массы тела свиней были получены аналогичные результаты (табл.3).

О лучшем использовании помесными свиньями кр. белая × Pic 402 азотистых веществ в тканевом метаболизме по сравнению со сверстниками кр. белая × ландрас свидетельствуют и данные по концентрации мочевины – конечного продукта азотистого обмена и уровню незаменимых аминокислот в плазме крови. Содержание мочевины в плазме крови было ниже (на 6,3 - 9,4%) у помесей кр. белая × Pic 402, тогда как концентрация креатинина (метаболита, характеризующего массу скелетных мышц) – ниже у свиней кр. белая × ландрас (табл. 4).

Таблица 4. ***Показатели азотистого обмена у свиней***

Показатели	Группы	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
104 -дневный возраст		
Мочевина, ммоль/л в плазме крови	4,64 ± 0,18	4,35 ± 0,29

Креатинин, мкмоль/л в плазме крови	47,90 ± 2,71	46,83 ± 2,35
Щелочная фосфотаза, мккат/л в плазме крови	1,14 ± 0,06	1,25 ± 0,08
Креатинкиназа, мккат/л в плазме крови	0,18 ± 0,008	0,19 ± 0,01
Активность в печени:		
аспартатаминотрансферазы, мг пирувата натрия/г ткани	30,2 ± 1,99	28,9 ± 2,2
аланинаминотрансферазы, мкг пирувата натрия/г ткани	4694,0 ±286,4	4202,5± 256,1
Активность в длиннейшей мышце спины:		
аспартатаминотрансферазы, мг пирувата натрия/г ткани	11,02 ± 1,65	12,74 ± 1,79
аланинаминотрансферазы, мкг пирувата натрия/г ткани	1547,7 ±100,0	1682,1 ± 91,2
209 -дневный возраст		
Мочевина, ммоль/л в плазме крови	6,05 ± 0,30	5,48 ± 0,49
Креатинин, мкмоль/л в плазме крови	81,97 ± 3,03	89,22 ± 3,67
Щелочная фосфатаза, мк кат/л в плазме крови	0,84 ± 0,05	1,01 ± 0,10
Креатинкиназа, мккат/л в плазме крови	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,02
Активность в печени:		
аспартатаминотрансферазы, мг пирувата натрия/г ткани	27,8 ± 2,0	25,3 ± 1,86
аланинаминотрансферазы, мкг пирувата натрия/г ткани	4164,9 ±204,9	3821,3± 189,9
Активность в длиннейшей мышце спины: аспартатаминотрансферазы, мг пирувата натрия/г ткани	8,76 ± 1,52	11,87 ± 1,80
аланинаминотрансферазы, мкг пирувата натрия/г ткани	1256,0 ±90,0	1432,5 ± 99,2

Как видно из таблицы 5, у помесей кр. белая × Pic 402 уровень незаменимых аминокислот в плазме крови был на 7,8 % ниже, чем у животных кр. белая × ландрас. При этом наиболее заметное уменьшение отмечалось по лимитирующим аминокислотам.

Приведенные данные свидетельствуют о более эффективном использовании аминокислот в мышечной ткани и повышенной активности биосинтетических процессов в скелетных мышцах у помесей кр. белая × Pic 402 по сравнению со сверстниками кр. белая × ландрас. На это указывают и данные, характеризующие активность ферментов, ответственных за катаболизм аминокислот в тканях (табл. 4). Так, у свиней кр. белая × Pic 402 активность аспартатаминотрансферазы, являющейся интегрирующим ферментом в белковом синтезе, в длиннейшей мышце спины была выше, чем у помесей кр. белая × ландрас. Также следует отметить, что у помесей кр. белая × Pic 402 активность щелочной фосфатазы и креатинкиназы в плазме крови была так же более высокой, чем у свиней кр. белая × ландрас.

Таблица 5. ***Концентрация свободных аминокислот в плазме крови свиней, мг%***

Аминокислоты	***Период доращивания***		Период откорма	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
Аспарагиновая кислота	0,49±0,03	0,50±0,03	0,40±0,02	0,46±0,03
Треонин	1,16±0,08	1,07±0,06	1,28±0,08	1,22±0,09
Серин	1,25±0,10	1,49±0,08	1,11±0,06	1,08±0,07
Глутаминовая кислота	3,60±0,29	3,54±0,18	3,30±0,19	3,92±0,26
Глицин	4,04±0,28	4,40±0,33	5,12±0,50	5,47±0,28
Аланин	2,81±0,11	2,93±0,16	3,12±0,20	3,58±0,15
Валин	3,21±0,15	3,00±0,19	4,00±0,23	3,86±0,11
Цистин	0,62±0,09	0,61±0,06	1,01±0,08	0,91±0,07
Метионин	0,14±0,005	0,13±0,02	0,43±0,03	0,37±0,02
Изолейцин	1,20±0,05	1,03±0,08	1,44±0,10	1,28±0,04
Лейцин	1,90±0,12	1,79±0,09	2,39±0,10*	2,09±0,07*
Тирозин	0,87±0,09	0,88±0,07	0,95±0,04	0,95±0,08
Фенилаланин	0,86±0,04	0,90±0,05	1,07±0,08	1,03±0,09
Лизин	1,33±0,15	1,15±0,09	1,64±0,13	1,33±0,15
Гистидин	0,68±0,10	0,91±0,05	0,98±0,04	1,03±0,09
Аргинин	1,32±0,11	1,20±0,09	1,84±0,09	1,70±0,10
Сумма	25,48±0,72	25,53±0,91	30,08±0,65	30,28±1,54
в т.ч. незаменимых	11,80±0,37	11,18±0,28	15,07±0,51	13,91±0,49
заменимых	13,68±0,35	14,35±0,75	15,01±0,59	16,37±1,12

Здесь и далее ***** - $p < 0,05$

Эффективное использование азотистых веществ корма в биосинтетических процессах в организме свиней кр. белая × Pic 402 способствовало увеличению массы скелетной мускулатуры, отложения мышечных белков (табл. 6, 7). Например, среднесуточный прирост мышечной ткани к концу откорма у них был выше помесей кр. белая × ландрас на 10,6%, отложение белка в скелетных мышцах при этом повысилось на 8,2% (табл.7).

Таблица 6. ***Химический состав мышц свиней, %***

Показатели	Группы	Длиннейшая мышца спины	
		период доращивания – 104-дн. возраст	период откорма-209-дн. возраст
Сухое вещество	Кр. белая × ландрас	23,58 ± 0,41	25,31 ± 0,31
	Кр. белая × Pic 402	23,52 ± 0,16	25,10 ± 0,71
Белок	Кр. белая × ландрас	19,92 ± 0,38	20,98 ± 0,15
	Кр. белая × Pic 402	19,74 ± 0,14	20,69 ± 0,27

Таблица 7. ***Параметры отложения мышечных белков и мышечной ткани у свиней, кг***

Показатели	Группы	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
104-дневный возраст		
Количество мышечной ткани	14,52 ± 0,72	13,92 ± 0,41
Количество мышечного белка	2,89 ± 0,56	2,75 ± 0,30
209-дневный возраст		
Количество мышечной ткани	38,28 ± 1,37	40,20 ± 1,20
Количество мышечного белка	7,44 ± 0,38	8,80 ± 0,57
Среднесуточный прирост мышечной ткани, г/сутки	226 ±13,0	250 ± 15,9
Среднесуточный прирост белка в мышечной ткани, г/сутки	49 ±1,9	53 ± 2,6

Результаты прижизненной оценки интенсивности метаболизма азотистых веществ и накопления мышечной ткани подтвердились и данными, полученными после убоя свиней. В туше свиней кр. белая × Pic 402 было больше мякоти (на 9,6 %). Отношение количества мякоти к выходу костей на 11,7 % и к выходу жира на 13,7 % также оказалось выше, чем у помесей кр. белая × ландрас. Это свидетельствует о лучшей омускуленности туш у помесей кр. белая × Pic 402 (табл.8).

Таблица 8. ***Показатели мясной продуктивности свиней, кг***

Показатели	Период доращивания (105 дней)		Период откорма (209 дней)	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
Живая масса	37,25±2,36	36,60±1,78	95,50±1,32	97,00±3,11
Масса туши	21,09±1,78	20,85±1,24	59,35±1,55	62,93±2,16
Убойный выход, %	56,41±1,09	56,89±0,87	62,12±0,83	64,86±0,14
Масса полутуши	10,99±1,03	10,46±0,49	29,93±0,92	31,26±1,54
Выход мяса	7,51±0,76	7,19±0,39	18,93±0,61	20,74±0,88
Выход жира	1,46±0,11	1,36±0,07	6,67±0,35	6,43±0,58
Выход костей	2,01±0,17	1,90±0,07	4,33±0,17	4,25±0,16
Внутренний жир	53,60±1,69	54,08±2,01	38,17±2,09	42,49±3,81
Отношение мясо / жир	5,14 ± 0,36	5,29±0,31	2,84 ±0,18	3,23±0,17
Отношение мясо / кости	3,74±0,09	3,78±0,10	4,37±0,12	4,88±0,20

Однако следует отметить, что у животных кр. белая × Pic 402, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы, имело место некоторое ухудшение физико-химических показателей мяса (табл. 9).

Таблица 9. ***Физико-химические показатели мяса свиней 209-дневного возраста***

Показатели	Группы	
	кр. белая × ландрас	кр. белая × Pic 402
pH через 1,5 часа после убоя	6,05 ± 0,17	6,35 ± 0,12
pH через 24 часа после убоя	5,72 ± 0,02	5,75 ± 0,02
Интенсивность окраски, ед. (экстинция×1000)	152,5 ± 6,6	142,5 ± 5,9
Нежность мяса, $см^2$ / г	1083,2 ± 15,2	1061,0 ± 18,3
Влагоудерживающая способность, %	85,42 ± 3,7	80,94 ± 4,1

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о более эффективном использовании аминокислот в мышечной ткани и повышенной активности биосинтетических процессов в скелетных мышцах у помесей кр. белая × Pic 402 по сравнению со сверстниками кр. белая × ландрас. На это указывают данные, характеризующие активность ферментов, ответственных за катаболизм аминокислот в тканях (ферментов переаминирования), концентрация мочевины, свободных аминокислот, креатинина, выделение азота с мочой. Более эффективное использование азотистых веществ корма в биосинтетических процессах в организме свиней кр. белая × Pic 402 способствовало увеличению у них массы скелетной мускулатуры и белка в скелетных мышцах. Однако следует отметить, что у помесей кр. белая × Pic 402, по сравнению со сверстниками кр. белая × ландрас, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы, имело место некоторое ухудшение значений физико-химических показателей мяса. В дальнейшем, при проведении исследований по разработке системы питания свиней, целесообразно учитывать выявленные особенности в метаболизме азотистых веществ и параметры отложения белков скелетных мышц и всего тела у разных генотипов животных. Это предполагает, с одной стороны, необходимость уточнения норм протеинового и аминокислотного питания помесей кр. белая × Pic 402 для максимального наращивания мышечной массы (поскольку свиньи обоих генотипов находились в одинаковых условиях кормления), с другой стороны − дальнейший

поиск путей повышения эффективности биосинтеза мышечных белков у молодняка свиней разных генотипов

ЛИТЕРАТУРА

1. Терентьева А.С. Использование генофонда свиней в современных условиях производства. Обзорная информация. М., 1988; 44 с.
2. Шарнин В.Н. Производство свинины на промышленных комплексах. Зоотехния, 1997, 10: 24-27.
3. Мироненко А.И. Продуктивность свиней на откорме в зависимости от полноценности рациона. Зоотехния, 2001, 12: 11-13.
4. Никульников В.С. Влияние генотипа и среды на качество мяса свиней. 2 съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Санкт-Петербург. Тезисы докладов, 2000, 2: 55.
5. Мамонтов Н.Т. и др. Центр гибридизации свиней в Тюменской области. Зоотехния, 1998, 10: 22-25.
6. Васильева Э.Г. Ситникова Н.Ф. Селекция свиней при создании гибридов. Зоотехния, 1997, 10: 8-11.
7. Иващук И.С. Эффективность скрещивания в свиноводстве. Зоотехния, 1997, 10: 12-13.
8. Susenbeth A., Dickel T., Diekenhorst A.and Hohler D. Effect of Energy Intake, Genotype and Body Weight on Protein Retention in Pigs When Dietary Lysine Is the First-Limiting Factor. J. Anim. Sci., 1999, 77:2985-2989.
9. Coulambe S.S., Favreon S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem., 1963, 9, 1: 23.
10. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the transaminases. Am. J. Clin. Path., 1957, 1: 28.
11. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968:18-20.
12. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976: 389.
13. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasma and myofibrile protein content of normal and atrophy skeletal muscle. Acta physiological Scand., 1957, 41: 141.
14. Кальницкий Б.Д. Методы биохимического анализа (справочное пособие), Боровск, 1997.
15. Холод В.М., Ермолаев Г.Ф. Справочник по ветеринарной биохимии. Минск, 1988: 163-165.
16. Гуменюк Г.А., Черкасская Н.В. Методические рекомендации по исследованию кормов и продуктов животноводства. Киев, 1977:256.
17. Овсянников А.И.Основы опытного дела в животноводстве М.:Колос, 1976: 210.

ОБМЕН МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ У СВИНЕЙ РАЗНЫХ ПОМЕСЕЙ

Т.Н. Дворецкая, В.А. Матвеев, А.М. Коровяцкий

Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности с.-х. животных

У помесных свиней крупная белая х Pic-402, по сравнению с помесями крупная белая х ландрас, при одинаковом потреблении всех исследованных минеральных элементов, наблюдалось увеличение отложения в организме меди на 20%, цинка на 6,1%, кобальта на 14,1%, магния на 7,2% и железа на 7,6%.

Введение

В условиях оптимального питания помесные животные способны более полно реализовать потенциал мясной продуктивности. Однако, для этих целей необходимо удовлетворение потребностей организма не только в основных питательных веществах и энергии, но и в таких компонентах как незаменимые аминокислоты, витамины, макро и микроэлементы.

Минеральные вещества играют большую роль в обмене веществ и процессах биосинтеза основных компонентов мяса. Они входят в состав многих витаминов, гормонов, ферментов, активируют или ингибируют их действие и, тем самым, влияют на интенсивность процессов обмена веществ (Самохин, 1981). Минеральное питание тесно связано с количеством и качеством продукции, с воспроизводительной функцией (марганец, цинк, йод и другие), кроветворением (железо, медь, марганец, кобальт, йод и другие), возбудимостью нервов и мышц (кальций, натрий, калий, хлор, магний), с обменом энергии и другими физиологическими функциями организма (Кокорев, 1990; Кузнецов, 1989, 2003; Слесарев и др., 1995; Mahan, 1990; Мусина, Юсупов, 1999, Гурьянов и др., 1998; Хаданович, 1979; Раецкая, 1979).

В комплексном опыте по оптимизации питания помесных свиней перед нами стояла задача:

- определить параметры обмена минеральных веществ у свиней разных помесей при одинаковых условиях питания;
- изучить связь между параметрами обмена минеральных веществ и показателями мясной продуктивности свиней разных помесей.

Материал и методы

Опыт проведен в условиях вивария института на 30 помесных поросятах (крупная белая х ландрас; крупная белая х Pic-402) с живой массой при постановке на опыт 15-16 кг в возрасте 55-58 суток. По принципу парных аналогов с учетом живой массы, пола и возраста были сформированы две группы животных, по 15 голов в каждой. Опыт включал три технологических периода: период доращивания – 104 дня (до достижения живой массы 35-36 кг); первый период откорма – 154 дня (до достижения живой массы 61-63 кг); второй период откорма – 222-225 суток (до достижения живой массы 100-110 кг).

Каждому периоду соответствовали разные по составу и питательности типовые рецепты комбикормов (СК-5, СК-6, СК-7) и премиксов (КС-3, КС-4, КС-5). Рецепты комбикормов и премиксов разрабатывались в соответствии с потребностями животных в питательных и биологически активных веществах на различных этапах роста и развития. Условия содержания и уход были одинаковыми для животных подопытных групп и отвечали зоотехническим требованиям.

На протяжении всего опыта учитывали поедаемость кормов и в конце каждого возрастного периода для изучения динамики роста молодняка свиней проводили индивидуальное взвешивание животных. Переваримость и использование питательных веществ корма изучали в балансовых опытах на животных в возрасте 104 (живая масса 36 кг) и 204 -209 дней (живая масса 85-90 кг). Исследования проводились на 8 и 6 свиньях, соответственно. После каждого балансового опыта животных убивали, проводили обвалку туш и брали для анализа пробы крови, печени и длиннейшей мышцы спины. До анализа пробы хранили при температуре -20^{o}C.

В пробах плазмы крови, печени, в длиннейшей мышце, комбикормах, в моче и кале определяли концентрацию железа, меди, цинка, магния, марганца, кобальта на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант Z.ЭТА», а содержание общего фосфора - химическим методом с применением аммония метаванадата.

При анализе минеральных веществ в комбикорме, кале, печени и мышцах использовали сухое озоление биологического материала в муфельной печи, а минеральные элементы в моче и сыворотке крови определяли непосредственно на приборе, без предварительной подготовки. Методы определения минеральных веществ подробно изложены в методических указаниях (Методы биохимического анализа, 1997, Кальницкий, Кузнецов, 1988).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что у свиней разных помесей величина среднесуточного прироста массы тела, расход корма на 1 кг прироста живой массы и другие зоотехнические показатели в период доращивания существенно не различались между группами. Следовательно, в этот период при использовании типовых комбикормов генетический потенциал продуктивности реализовался в одинаковой мере у поросят разных помесей.

В дальнейшем в 1-й период откорма у помесных свиней крупная белая х Pic-402 отмечена тенденция к лучшему росту и конверсии корма, чем у помесей крупная белая х ландрас. Среднесуточный прирост у них был на 5,1% выше, а расход корма снизился на 7,6%. За весь период откорма у помесных свиней 2-й группы среднесуточный прирост был на 7,27% выше, а расход корма на 6,72% ниже, по сравнению с животными 1-й группы, то есть свиньи 2-й группы при одинаковых условиях питания лучше реализовали свой генетический потенциал в период откорма. Эти данные подтверждают результаты убоя свиней. В конце периода доращивания не установлено существенных различий в составе туш между группами животных. В конце откорма у свиней 2-й группы был несколько выше убойный выход, выход мяса и меньшее количество жира, по сравнению с животными 1-й группы.

Одним из интегральных показателей, характеризующих обмен минеральных веществ в организме животных, является уровень минеральных элементов в крови. Характеризуя эти данные, необходимо отметить, что содержание большинства исследованных минеральных веществ в плазме крови свиней в период доращивания и откорма находилось в пределах физиологической нормы и не имело существенных различий между группами (табл. 1).

Интенсивность и направленность метаболических потоков минеральных веществ в организме животных определяется количеством потребленных минеральных элементов, их доступностью к перевариванию и всасыванию в пищеварительном тракте, генетически обусловленной интенсивностью обмена веществ и скоростью роста отдельных органов и тканей.

Таблица 1. ***Параметры концентрации минеральных веществ в плазме крови помесных свиней в период доращивания и откорма, мг/л***

Показатели	Группы		% к 1 гр
	Ландрас	Pic-402	
	104-дневный возраст		
Медь	2,08±0,16	2,15±0,13	103,4
Магний	11,53±1,78	11,66±1,37	101,1
Цинк	1,22±0,13	1,23±0,18	100,8
Кобальт	0,09±0,008	0,09±0,01	100
Марганец	0,12±0,015	0,12±0,01	100
Железо	1,68±0,27	1,81±0,38	107,7
	209-дневный возраст		
Медь	1,99±0,04	2,05±0,08	102,9
Магний	13,37±3,16	13,43±2,6	100,5
Цинк	1,45±0,04	1,50±0,06	103,4
Кобальт	0,077±0,005	0,080±0,010	103,0
Марганец	0,277±0,009	0,283±0,018	102,4
Железо	1,79±0,06	1,77±0,11	98,7

Результаты исследований, представленные в таблице 2, свидетельствуют о разной эффективности использования железа, магния, цинка, меди, марганца и кобальта в организме помесных поросят в период доращивания, что согласуется с данными других авторов (Гурьянов и др., 1998, Гурьянов, 1998, Тихомиров и др., 2000, Давыдова, 1989, Кокорев и др., 1992). В частности, существенно различается способность к перевариванию отдельных минеральных элементов, поступающих с кормом в составе стандартных комбикормов и премиксов. Если переваримость магния, цинка и кобальта была выше 70%, то переваримость железа и марганца меньше 60%. Это связано с разной доступностью к всасыванию минеральных элементов из химических соединений, входящих в состав кормов и премиксов. Различия в генотипе между двумя группами помесных свиней не проявились на уровне функционирования пищеварительной системы, так как переваримость минеральных веществ у них практически не различалась.

Интенсивность метаболизма минеральных веществ и обеспеченность ими организма животных характеризуют параметры выделения элемента с мочой с учетом уровня его поступления в метаболический пул. С этой целью рассчитали отношение количества выделенного элемента с мочой к количеству поступившего из пищеварительного тракта (в %).

Таблица 2. ***Параметры среднесуточного обмена минеральных веществ в организме 104-дневных поросят в период доращивания***

Группы животных	Поступило с кормом, мг/сутки	Выделено из организма, мг/сутки		Переварено, мг/сутки	Отложено в организме, мг/сутки
		с калом	с мочой		
			Медь		
Pic-402	21,08	7,39±0,38	3,51±0,51	13,69±0,38	10,18±0,68
Ландрас	21,08	7,39±0,53	3,54±0,44	13,69±0,53	10,15±0,46
			Цинк		
Pic-402	98,6	26,27±2,2	6,2±1,18	72,33±2,24	66,13±3,22
Ландрас	98,6	26,43±2,1	7,03±0,89	72,17±2,10	65,14±2,91
			Кобальт		
Pic-402	0,476	0,126±0,010	0,27±0,04	0,350±0,010	0,08±0,03
Ландрас	0,476	0,115±0,011	0,29±0,03	0,361±0,011	0,08±0,02
			Марганец		
Pic-402	62,9	25,83±2,7	0,20±0,04	37,07±2,74	36,87±2,75
Ландрас	62,9	25,87±1,8	0,21±0,02	37,03±1,75	36,82±1,77
			Магний		
Pic-402	2006	440,8±24,52	287,6±40,99	1565±24,5	1278±61,3
Ландрас	2006	415,6±16,66	312,3±24,25	1590+16,7	1278±26,9
			Железо		
Pic-402	73,1	31,53±2,1	14,87±2,6	41,57±2,07	26,69±3,03
Ландрас	73,1	31,39±0,8	15,01±1,8	41,71±0,84	26,71±2,41

Согласно данным, представленным на рис. 1, не проявились различия в генотипе между двумя группами помесных свиней в период доращивания по интенсивности метаболизма минеральных элементов.

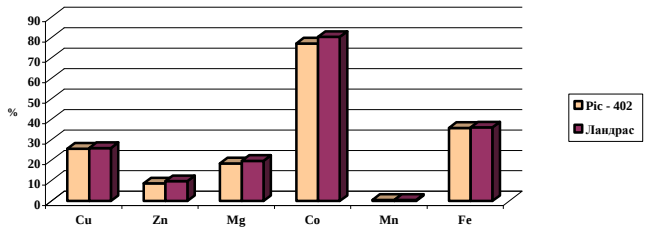


Рис.1 Отношение количества выделенных с мочой минеральных элементов к их количеству, переваренному в пищеварительном тракте, %

Типовые комбикорма и премиксы не полностью обеспечивали физиологические потребности животных в отдельных элементах. В частности, более 70 % кобальта, поступившего в метаболический пул из пищеварительного тракта, выделялось с мочой и, следовательно, не

использовалось для отложения в органах и тканях. Возможно, это связано с тем, что уровень кобальта в комбикорме превышал физиологические потребности животных. В то же время более 90% цинка и марганца, поступившего из пищеварительного тракта, оставалось в метаболическом пуле организма свиней. Учитывая важную биологическую роль этих элементов в обмене веществ, считаем целесообразным увеличивать количество этих элементов в рационе свиней в период их доращивания.

Среднесуточное поступление минеральных веществ с кормом для животных обеих групп на протяжении всего опыта было одинаковым, но у помесей Pic-402 в период откорма эффективность использования их организмом была несколько выше (табл. 3). В частности, отмечено более низкое выделение их с мочой и калом, что свидетельствует о более интенсивном их включении в процессы метаболизма. Самая низкая доступность к всасыванию для животных обеих групп установлена для меди в период откорма. Только 39,7 и 38,3 % данного элемента, поступившего с кормом, всасывалось из желудочно-кишечного тракта и включалось в обменные процессы. По-видимому, это связано с химической природой веществ, которые были использованы в виде источника меди в составе премиксов.

Таблица 3. ***Параметры среднесуточного обмена минеральных веществ в организме свиней в 209-дневном возрасте (период заключительного откорма)***

Группы животных	Поступило с кормом, мг/сутки	Выделено из организма, мг/сутки		Переварено, мг/сутки	Отложено в организме, мг/сутки
		с калом	с мочой		
			Медь		
Pic-402	35,84	21,61±1,87	2,40±0,24	14,23±1,87	11,84±2,05
Ландрас	35,84	22,11±1,47	3,95±0,84	13,73±1,47	9,87±3,38
			Цинк		
Pic-402	176,6	65,65±4,53	3,63±0,17	111,00±4,53	107,36±4,68
Ландрас	176,6	70,91±1,4	5,55±0,54	105,72±1,40	101,14±1,23
			Кобальт		
Pic-402	0,992	0,254±0,028	0,27±0,027	0,738±0,028	0,468±0,029
Ландрас	0,992	0,259±0,006	0,328±0,045	0,733±0,006	0,410±0,040
			Марганец		
Pic-402	153,6	48,43±2,0	0,36±0,025	105,18±2,00	104,81±2,02
Ландрас	153,6	50,48±0,8	0,54±0,06	103,12±0,8	102,64±1,45
			Магний		
Pic-402	4032	890,7±73,3	331,6±18,8	3141±73	2810±67
Ландрас	4032	927,6±24,5	506,6±69,5	3105±25	2620±50
			Железо		
Pic-402	214,4	88,27±7,18	18,09±0,36	126,13±7,18	108,04±6,84
Ландрас	214,4	90,24±2,19	25,89±1,3	124,16±2,19	100,43±0,70

С возрастом у подсвинков обеих групп отложение кобальта, марганца, магния и железа в организме увеличивалось. Так, если в 104-дневном возрасте в организме поросят Pic-402 откладывалось 16,8 % кобальта, 58,6% марганца, 63,7% магния и 36,5% железа от фактически принятого с кормом, то в 209-дневном возрасте эти показатели составляли 47,2%, 68,2%, 69,7% и 50,4%, соответственно. Аналогичная ситуация складывалась и в группе помесей ландрас. По-видимому, это обусловлено способностью растущего организма накапливать микроэлементы пропорционально увеличению массы органов и тканей и количеству элемента, полученного с кормом. Так, например, с возрастом у животных обеих групп суточное потребление марганца увеличилось в 2,4 раза, а отложение его в теле за период опыта возросло в 2,8 раза, что свидетельствует об увеличении потребности свиней в нем.

Как показано выше, к концу откорма при одинаковых условиях питания помесных свиней проявились различия между группами животных по интенсивности роста, эффективности использования корма на прирост и составу туши. Соответственно это нашло отражение в интенсивности метаболизма минеральных элементов. У помесных свиней крупная белая х Pic-402 по сравнению с помесями крупная белая х ландрас отмечена тенденция к повышению эффективности использования железа, меди, кобальта, цинка и магния за счет уменьшения выведения их с мочой (рис. 2).

При этом у свиней обеих групп в период откорма, аналогично как и в период доращивания, доля выделения с мочой марганца и цинка от их количества, поступившего в метаболический пул, составляла менее 10%, то есть поступившие в организм свиней минеральные элементы практически полностью использовались в метаболическом пуле.

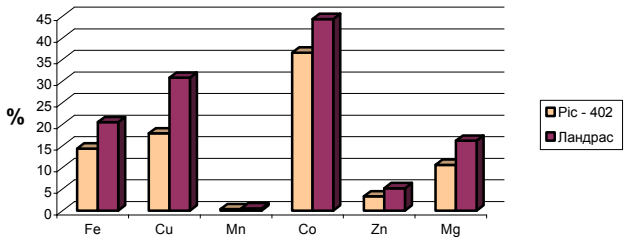


Рис.2 Отношение количества выделенных с мочой минеральных элементов к их количеству, переваренному в пищеварительном тракте в возрасте 200 дней, %

Накопление минеральных элементов в организме животных связано с их включением в определенные биологические структуры, которые играют существенную роль в регуляции обмена веществ и реализации физиологических функций. При этом даже при дефиците отдельных минеральных элементов наблюдается выделение их мочой. Незначительное выделение марганца и цинка с мочой может свидетельствовать о том, что организм помесных свиней был обеспечен на минимальном уровне. Исходя из этого, можно полагать, что при использовании типовых комбикормов и премиксов для интенсивного выращивания и откорма помесных свиней целесообразно увеличение количества марганца и цинка в рационе за счет дополнительного введения их в премиксы.

В связи с многообразием воздействия микро- и макроэлементов на биохимические процессы, представляет интерес определение их в органах и тканях животных, так как содержание минеральных элементов может, в известной степени, отражать интенсивность обмена веществ у свиней разных помесей.

Из данных таблицы 4 видно, что генотип животных в период доращивания при одинаковых условиях питания не оказал существенного влияния на содержание отдельных минеральных элементов в печени и длиннейшей мышце спины помесных свиней.

Таблица 4. ***Параметры концентрации минеральных веществ в печени и длиннейшей мышце спины помесных свиней в период доращивания в 104-дневном возрасте, мг/кг***

Показатели	Группы		% к 1 гр
	Ландрас	Pic-402	
	печень		
Медь	2,89±0,05	2,90±0,09	100,4
Магний	110,6±8,89	110,0±6,09	99,5
Цинк	84,9±5,7	84,5±4,1	99,5
Кобальт	0,062±0,006	0,062±0,004	100
Марганец	2,94±0,17	2,94±0,22	100
Железо	97,8±5,78	98,0±3,46	100,2
	длиннейшая мышца спины		
Медь	1,17±0,07	1,19±0,08	101,7
Магний	75,2±5,15	74,8±4,2	99,5
Цинк	53,5±7,2	57,9±4,7	108,2
Кобальт	0,053±0,004	0,053±0,013	100
Марганец	0,75±0,019	0,76±0,027	101,3
Железо	30,6±2,44	30,9±2,72	101

Заключение

Один из путей увеличения производства и улучшения качества свинины – широкое применение межпородного скрещивания. Этот

метод разведения позволяет эффективно и быстро использовать желательные человеку качества животных, повышая интенсивность роста и качество продукции на фоне снижения затрат корма на ее производство. Однако эффект скрещивания проявляется по-разному и зависит от породы, возрастного периода, степени генетической обусловленности признаков, их сочетаемости, условий кормления и содержания животных и т.д. (Севрюгин, 2003). Установлено, что скорость роста свиней в большей степени зависит от условий кормления, а мясная продуктивность – от генетических особенностей животных (Кабанов, 1983, Козловский, 1987, Степанов и др., 2001).

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что метаболизм белков, жиров и углеводов в значительной мере связан с уровнем и соотношением минеральных веществ, поступающих с кормом в организм животных. Результаты исследований показали, что в период откорма у помесных свиней крупная белая х Pic-402, по сравнению с помесями крупная белая х ландрас, была выше интенсивность роста, эффективность использования корма на продукцию, интенсивность биосинтеза мышечных белков и меньшее образование липидов в туше. Эти изменения в интенсивности и направленности метаболических потоков в организме свиней нашли отражение в метаболизме минеральных элементов. У помесных свиней крупная белая х Pic-402, по сравнению с помесями крупная белая х ландрас, при одинаковом потреблении всех исследованных минеральных элементов наблюдалось увеличение отложения в организме меди на 20%, цинка на 6,1%, кобальта на 14,1%, магния на 7,2% и железа на 7,6%. Повышение ретенции минеральных элементов происходило в первую очередь за счет пониженного выделения их с мочой, на фоне отсутствия существенных различий в концентрации этих элементов в крови животных. Эти результаты свидетельствуют о наличии регуляторных механизмов, контролирующих интенсивность и направленность процессов метаболизма минеральных элементов.

В результате проведенных исследований определены параметры минерального обмена у помесных свиней в период доращивания и откорма. Установлено, что при использовании типовых комбикормов и премиксов у животных обеих групп на протяжении всего опыта с мочой выделялись в относительно небольшом количестве марганец и цинк, то есть поступив из пищеварительного тракта, эти элементы преимущественно оставались в метаболическом фонде организма. Известно, что у животных происходит выделение минеральных элементов с мочой даже на рационах, дефицитных по этим элементам. Поэтому выделение с мочой у свиней обеих групп марганца и цинка, в количестве менее 10% от поступившего в метаболический пул из желудочно-кишечного тракта, может быть связано с недостаточным обеспечением животных этими элементами.

Эти экспериментальные данные свидетельствуют о необходимости корректировки количества минеральных веществ в составе комбикорма для интенсивного выращивания помесных свиней. Результаты исследований могут быть использованы при совершенствовании системы питания свиней с целью контроля за обеспеченностью животных минеральными элементами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самохин В.Т. Профилактика нарушений обмена микроэлементов у животных. М., 1981: 3, 56.
2. Кокорев В.А. Биологическое обоснование потребности супоросных свиноматок в макроэлементах. Саранск, 1990:172с.
3. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность и метаболизм минеральных веществ у молодняка свиней. Автореф. дис…д.б.н., Боровск, 1989:37 с.
4. Потребность свиней в питательных веществах. Национальный исследовательский совет. Перевод с англ. Киев, 1991:95 с.
5. Слесарев И.К., Пилюк Н.В. Минеральные источники Беларуси для животноводства. Жодино-Минск, 1995:176 с.
6. Mahan D.S. Mineral nutrition of the sow: a review. J. Anim. Sci., 1990, 68: 537-582.
7. Мусина Н.Ю., Юсупов Ф.Р. Отрицательные последствия недостаточного питания животных. Современные научные и практические проблемы животноводства, ветеринарной медицины и перспективы их решения. Материалы докладов республиканской научно-практической конференции, Уфа, 29 сентября 1998. Уфа, 1999: 90-93.
8. Кузнецов С.Г. Микроэлементы в кормлении животных. Животноводство России. 2003, 3: 16-18.
9. Гурьянов А.М., Кокорев В.А., Петуненков В.А. и др. Микроэлементы в питании молодняка свиней. Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности с.-х. животных. Материалы межд. научной конференции, Мордовский гос. Университет. Саранск, 1998: 95-96 .
10. Хаданович И.В. Роль минеральных веществ в питании сельскохозяйственных животных. Химия в сельском хозяйстве, 1979, 11: 14-16.
11. Раецкая Ю.И. Биологическая функция микроэлементов и применение их в животноводстве. Химия в сельском хозяйстве, 1979, 11: 20-24.
12. Методы биохимического анализа. Под общей редакцией проф. Кальницкого Б.Д., Боровск, 1997:111-143.
13. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1988: 103 с.
14. Гурьянов А.М. Взаимодействие микроэлементов в организме и рационах молодняка свиней. Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности с.-х. животных. Материалы международной научной конференции, Мордовский гос. Университет, Саранск, 1998: 20-22 .

15. Тихомиров Г.С., Кокорев В.ВА., Гурьянов А.М., Тихомиров И.А. Обмен марганца и потребность в нем молодняка свиней. Третья Межд. конференция «Актуальные проблемы биологии в животноводстве». Боровск 6-8 сентября. 2000: Тезисы докладов. Боровск, 2000: 227-229.
16. Давыдова Р.Р. Влияние уровня и соотношения минеральных элементов (кальция и меди) в рационах на продуктивность и обмен веществ откармливаемых свиней. Автореф. дис…д.с.-х. н., Дубровицы, 1989:15 с.
17. Кокорев В.А., Гурьянов А.М., Тихомиров Г.С. Обмен марганца в организме свиней и потребность в нем молодняка. Сельскохозяйственная биология, 1992, 4: 56-65.
18. Севрюгин В. Сравнительная оценка свиней по воспроизводительным качествам при двухпородном скрещивании. Свиноводство, 2003, 3: 6-7.
19. Кабанов В.Д. Повышение продуктивности свиней. М., 1983: 256 с.
20. Козловский В.Г., Лебедев Ю.В., Тонышев И.И. Гибридизация в промышленном свиноводстве. М., 1987: 271 с.
21. Степанов В.И., Михайлов Н.В. Актуальные проблемы отечественного свиноводства. Актуальные проблемы производства свинины. Материалы 10-го заседания Межвузовского координационного совета по свиноводству и Республиканской научно-производственной конференции. 28-29 мая 2001 г. п. Персиановский, 2001: 4-7.

СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е В ОРГАНИЗМЕ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА, ВОЗРАСТА И УСЛОВИЙ БЕЛКОВОГО ПИТАНИЯ

Т.Е.Рябых
Лаборатория биологически активных веществ

В научно-хозяйственных опытах в условиях Кузнецовского комплекса (Московская область) и в виварии института изучали обеспеченность витаминами А и Е свиней-помесей первого поколения: крупная белая х ландрас и крупная белая х Pic-402, в связи с возрастом, а также в зависимости от уровня обеспеченности рационов протеином и незаменимыми аминокислотами. При определении витаминов А и Е в крови, печени, жире, мышечной ткани, в качестве теста обеспеченности ими организма свиней, каких-либо отличий от существующих нормативов, а также достоверных различий, связанных с генотипом или условиями белкового питания не обнаружено. В опытах обнаружен факт обратной связи между концентрациями витаминов в тканях и в корме.

Введение

Актуальным в свиноводстве является подбор исходных родительских пород и получение помесей первого поколения,

проявляющих гетерозис. Центральная проблема при этом состоит в обеспечении приемами питания проявления гетерозиса. В процессе разработки системы питания свиней является оценка их по ряду признаков, в том числе по обеспеченности жирорастворимыми витаминами А и Е. Белковый статус организма животных во многом ответственен за нормальный метаболизм этих веществ. Для ретинола неадекватное белковое питание в первую очередь отражается на синтезе ретинолсвязывающего белка (Натансон, 1979; Шарманов, 1979; Двинская, 1985; Goodman, 1984; Olson, 1984). Для токоферола дефицит белка в рационе также крайне негативно отражается на функциональной активности α-токоферолсвязывающего липопротеина (Rajaram et al., 1977). В целом определение концентраций витаминов А и Е в органах и тканях свиней может быть достаточным тестом наличия отклонений в белковом обмене и в проявлении хозяйственно-полезных признаков животных.

Материал и методы

В опытах использовались помеси: крупная белая х ландрас (группа 1) и крупная белая х Pic-402 (группа 2). Опыт 1 проводили в условиях вивария института. Каждая группа была укомплектована 15-ю головами поросят, отнятых в 45-суточном возрасте. Кормление свиней было одинаковым. В процессе эксперимента использовали типовые комбикорма (СК-5, СК-6, СК-7). В комбикормах определяли содержание ретинола (СК5-10290; СК6-6000; СК7-4000 МЕ/кг) и α-токоферола (соответственно - 39; 18; 18,3 мг/кг). Материал для анализов отбирали при убое в 105- и 209-суточном возрасте.

В опыте 2, проведенном в условиях Кузнецовского комплекса (Московская область), сформировали 2 группы поросят-отъемышей по 530 голов в каждой группе. Опыт 3 проводили на части этих же животных, в 120-суточном возрасте перевезенных в виварий института, где опыт продолжался до 236-суточного возраста (на комплексе до 239-суточного возраста). Животных кормили различными кормосмесями. Рационы для группы 2 отличались повышенным уровнем протеина и незаменимых аминокислот, и исключением премикса фирмы «Хайфид». В опытах 2 и 3 убой проводили в их конце по 4 головы из каждой группы. В момент убоя отбирали образцы крови и тканей для анализа. В кормах определяли содержание ретинола (выращивание – 4850 и 5250; 1 фаза откорма – 2628 и 2940; 2 фаза откорма – 2245 и 2310 МЕ/кг) соответственно для 1 и 2 групп и токоферола (39,2 и 41,14; 1 фаза откорма – 30,0 и 30,12; 2 фаза откорма – 25,7 и 29,47 мг/кг соответственно для 1 и 2 групп).

Определение ретинола и α-токоферола проводили с помощью ВЭЖХ (Скурихин,Двинская,1989; Скурихин, Шабаев,1996).

Экспериментальный материал обработан с помощью вариационной статистики.

Достоверность разницы оценивали по критерию Стьюдента (Лакин,1972).

Результаты и обсуждение

Как установлено (табл. 1), помеси крупная белая х Pic-402 за весь период откорма имели лучшие характеристики скорости роста и оплаты корма продукцией по сравнению с помесями крупная белая х ландрас (опыт 1). По результатам за весь период опыта у помесей Pic-402 среднесуточный прирост живой массы был на 7,27% выше, а оплата корма приростом на 6,72% ниже, чем у помесей с ландрасами.

Изучение интенсивности роста свиней при содержании их на рационах с разным уровнем протеина и незаменимых аминокислот (табл. 1, опыт 2), также выявило существенную разницу в пользу помесей крупная белая х Pic-402. При этом, за весь период откорма среднесуточный прирост живой массы у этих животных был выше на 7%, с более низкими затратами корма на прирост на 6,8%, по сравнению с помесями крупная белая х ландрас.

Таблица 1. ***Характеристики откорма свиней разных помесей (опыт 1) и при разном уровне протеина и аминокислот (опыт 2)***

Показатели	**Группы**	
	1	**2**
	Опыт 1	
Среднесуточный прирост, г	**577**	**619**
Оплата корма приростом, кг/кг	**4,32**	**4,03**
	Опыт 2	
Среднесуточный прирост, г	**582 ± 43**	**623 ± 48**
Оплата корма приростом, кг/кг	**4,19**	**3,92**

Концентрация витаминов А и Е в плазме крови в опыте 1 не претерпевала существенных изменений в связи с генотипом животных (табл. 2). В то же время ее возрастные изменения оказались примечательными в связи с тем, что обнаружилась обратная зависимость с обеспеченностью корма этими витаминами. Для ретинола эта зависимость не является странной, так как витамин А обладает ярко выраженной способностью депонироваться в печени. Эта способность сохраняется с понижением обеспеченности им рациона с возрастом. Здесь могло иметь место лишь снижение скорости депонирования. Что касается витамина Е, то он в животных

организмах не депонируется. Подобный факт был обнаружен Строжа и Вевере (1972) в опытах на цыплятах в отношении мышечной ткани. В нашем опыте (табл. 3) такие же данные получены в отношении не только мышечной, но и жировой ткани. Вполне возможно, что это связано со снижением потребности животных в витамине Е в связи с возрастом.

Таблица 2. ***Изменения концентрации ретинола и α-токоферола в плазме крови в зависимости от генотипа и в связи с возрастом свиней***

Группы	Возраст, сутки			
	105	209	105	209
	Ретинол, мкг/мл		α-токоферол, мкг/мл	
1	0,382±0,019	0,438±0,046	4,52±0,340	5,21±0,660
2	0,386±0,046	0,448±0,040	4,59±0,134	5,28±0,570

При невысоких различиях в концентрации ретинола и α-токоферола в органах и тканях между группами свиней, более высокая скорость роста у помесей крупной белой с Pic-402 определяет более заметные их преимущества по тотальному содержанию витаминов А и Е в мышечной ткани, что обусловлено их большей скоростью роста, по сравнению с помесями крупная белая x ландрас.

Таблица 3. ***Изменения содержания ретинола и α-токоферола в печени, жировой и мышечной тканях в зависимости от генотипа и в связи с возрастом свиней***

Группы	Возраст, сутки			
	105		209	
	мкг/г	Тотальное содержан., мг	мкг/г	Тотальное содержан., мг
	Печень, ретинол			
1	144,04±7,09	125,40±12,94	345,01±54,24	587,14±12,14
2	167,46±14,13	138,33±13,04	337,82±55,26	576,39±71,97
	Жировая ткань, ретинол			
1	0,266±0,020	0,780±0,082	0,276±0,027	3,70±0,56
2	0,278±0,021	0,748±0,320	0,281±0,022	3,62±0,60
	Мышечная ткань, ретинол			
1	0,076±0,001	1,142±0,132	0,097±0,005	3,64±0,116
2	0,076±0,002	1,102±0,062	0,095±0,003	3,96±0,238
	Печень, α-токоферол			
1	11,95±0,539	10,28±0,826	12,64±1,10	22,35±2,99
2	13,06±1,35	10,75±1,07	12,91±0,73	22,34±2,16
	Жировая ткань, α-токоферол			
1	1,80±0,107	5,26±0,418	3,94±0,338	52,22±2,12
2	1,84±0,187	4,98±0,374	3,91±0,204	50,60±8,66
	Мышечная ткань, α-токоферол			
1	1,28±0,027	19,26±2,46	1,86±0,078	70,28±4,30
2	1,30±0,039	18,72±0,642	1,92±0,16	80,08±9,08

В возрастном аспекте наблюдается обратная зависимость между обеспеченностью рационов витаминами А и Е и концентрацией этих витаминов в плазме крови, жировой и мышечной тканях. Для витамина А этот феномен объясняется его способностью депонироваться в печени, для витамина Е – понижением потребности в нем у свиней с возрастом.

У новорожденных поросят проанализировали печень на содержание витамина А. Несмотря на то, что плацента тормозит переход в плод многих липидных веществ, концентрация ретинола в печени новорожденных была достаточно высокой (44,7 мкг/г), по сравнению с минимальным пределом (20 мкг/г), ниже которого состояние А-витаминного питания считается дефицитным. К 35-суточному возрасту концентрация ретинола возросла до 78,9 мкг/г.

Измерение концентрации ретинола в печени используют как один из самых достоверных тестов оценки А-витаминной обеспеченности животных (Крюков,1976). Полученные нами результаты свидетельствуют о хорошем состоянии А-витаминного питания в организме свиней обеих групп без существенных различий (P>0,05) между ними (таблица 4).

Таблица 4. ***Концентрации ретинола и α-токоферола в печени, жировой и мышечной тканях в связи с изменениями в протеиновом питании и в зависимости от генотипа свиней***

Группы	Возраст, сутки			
	239		236	
	мкг/г	тотальное содержан., мг	мкг/г	тотальное содержан., мг
			Печень, ретинол	
1	143,42±18,28	210,16±28,86	134,09±12,18	232,74±18,01
2	157,71±20,74	286,08±26,95	149,41±11,49	228,20±18,09
	Жировая ткань, ретинол			
1	0,163±0,005	6,42±0,518	0,154±0,002	3,22±0,132
2	0,167±0,003	6,52±0,478	0,156±0,003	2,90±0,364
	Мышечная ткань, ретинол			
1	0,084±0,004	3,18±0,170	0,093±0,006	3,46±0,586
2	0,088±0,003	3,92±0,150	0,096±0,004	3,86±0,526
	Печень, α-токоферол			
1	14,68±0,92	22,38±5,32	14,27±0,392	25,09±2,94
2	14,86±1,09	26,96±1,09	14,76±0,561	22,55±1,20
	Жировая ткань, α-токофрол			
1	1,61±0,167	63,34±8,86	1,50±0,24	31,48±1,84
2	1,64±0,003	63,82±13,34	1,52±0,036	27,94±2,34
	Мышечная ткань, α-токоферол			
1	1,01±0,055	37,88±0,436	0,992±0,026	37,14±6,96

2	**0,979±0,027**	**43,1±0,430***	**1,02±0,017**	**41,48±6,80**

То же следует отнести и к α-токоферолу, хотя по тотальному содержанию витамина Е в мышечной ткани картина несколько иная. Здесь обнаружено статистически достоверное увеличение общего содержания α-токоферола в мышцах ($P<0,05$) у помесей крупная белая х Pic-402, обусловленное более высокой скоростью роста мышечной ткани у них. В опыте 3, завершение которого проходило в виварии института, подтвердились основные выводы, которые вытекали из результатов опыта 2.

Заключение

Главный смысл проведенных исследований состоит в том, что уровень и вариации в белковом питании, осуществленные в представленных экспериментах в сочетании с примененными уровнями витаминной обеспеченности рационов, не задевают статус жирорастворимых витаминов А и Е в организме свиней изученных нами помесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Двинская Л.М. Физиолого-биохимические основы повышения продуктивности с.-х. птицы. Тр. ВНИИФБИП, 1985, 31: 176.
2. Крюков В.С. О взаимодействии витаминов А и Е. Обмен и функции витамина А и каротина в организме человека и животных, их практическое использование. Черновцы, 1976, 1976: 81-82.
3. Лакин Б. Биометрия. М: 1972.
4. Натансон О.А. Транспорт витамина А в крови: ретинолсвязывающий белок сыворотки крови и его биологическая роль. Вопросы питания, 1979, 3: 3-12.
5. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение альфа-токоферола и ретинола в плазме крови с.-х. животных методом микроколоночной ВЭЖХ. Ж. Сельскохозяй-ственная биология, 1989, 4: 127-129.
6. Скурихин В.Н., Шабаев С.В. Методы анализа витаминов А, Е, Д и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М:Химия, 1996.
7. Строжа И.К., Вевере Л.К. Изменение количества витамина Е в крови и тканях цыплят в зависимости от его содержания в рационе. Биохимия и физиология питания животных. Рига: Зинатне, 1972: 83-90.
8. Шарманов Т.Ш. Витамин А и белковое питание. М: Медицина, 1980.
9. Goodman D.S. Plasma Retinol-Binding Protein. The Retinoids. Eds M.B.Sporn et al. Acad. Press, 1984, 2: 42-89
10. Olson J.A. Vitamin A. Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. Ed. Machlin L.S., 1984: 1-43.

11. Rajaram O.V., Fatterpaker P., Sreenivasan A. Effect of protein deficiency on absorption and distribution of α-tocopherol in the rat. Br.J. of Nutrition, 1977, 37, 2: 157-165.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕНОПИРАНА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ В СРЕДЕ РАДИОЦЕЗИЯ

Е.В. Крапивина, В.А. Галочкин, Ю.Н. Федоров

Применение различных схем использования селенопирана с целью повышения естественной резистентности и иммунного статуса свиней и крупного рогатого скота, в условиях повышенного содержания в среде радиоцезия, выявило преимущества пренатальной и постнатальной обработки животных селенопираном в комбинации с витаминами A, D, E.

Введение

Необходимым условием для формирования и реализации продуктивного потенциала животных является высокий уровень естественной резистентности и иммунного статуса организма животных. Однако в условиях повышенного уровня радиоактивного облучения функциональная активность этих защитных механизмов снижается, что приводит к уменьшению минимальных инфицирующих доз микроорганизмов для развития инфекционного процесса, увеличению числа случаев с тяжелым клиническим течением болезни, обострению латентных форм инфекций с переходом их в манифестные (Будаков идр., 1993). В результате снижается продуктивность животных и сохранность молодняка.

С целью установления оптимальной схемы использования селенопирана для повышения уровня естественной резистентности и иммунного статуса организма у молодняка свиней и крупного рогатого скота в загрязненных радиоцезием районах Брянской области был проведен ряд экспериментов.

Материал и методы

Исследования проводили на свинофермах хозяйств, расположенных на территориях с различной плотностью загрязнения почвы радиоцезием (0,1-1 Ku/км^2, 5-10 Ku/км^2, 10-15 Ku/км^2) и на телятах в хозяйствах с уровнем загрязнения почвы 5-10 Ku/км^2. Содержание селена в основном рационе подопытных животных не превышало 0,1 мг/кг сухого вещества. Хозяйства благополучны по инфекционным болезням. Условия содержания, подкормка и основной рацион животных контрольных и опытных групп были одинаковы и соответствовали по основным показателям общепринятым нормам (Нормы и рационы…, 1985).

Пробы крови отбирали для исследований утром до кормления у 2-месячных поросят (перед отъемом) из сосудов хвоста, у 3-месячных телят - из яремной вены. Общее количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, лейкоцитарную формулу - в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза. Содержание популяции Т-лимфоцитов (Е-РОЛ %) определяли с помощью реакции розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами барана (Понякина и др.,1984). Субпопуляции иммунорегуляторных Т-лимфоцитов, обладающих преимущественно хелперной (Е-РОЛ$_{тр,}$ %) и супрессорной (Е--РОЛ$_{тч}$ %) активностью - в тесте с теофиллином (Петров и др., 1989), содержание иммуноглобулинов – РИД по Манчини (Бэм, 1987). Фагоцитарный показатель (ФП) рассчитывали как процент нейтрофилов, способных к поглощению частиц латекса, фагоцитарный индекс (ФИ) - как среднее число частиц латекса, поглощенных одним активным нейтрофилом, абсолютный фагоцитоз крови (АФ, 10^9/л) – как общее количество частиц латекса, поглощаемое нейтрофилами в литре крови (Чумаченко и др., 1990). Функционально-метаболическую активность нейтрофилов оценивали по результатам реакции восстановления нитросинего тетразолия. Индекс активации нейтрофилов (ИАН) вычисляли согласно инструкции "Риакомплекс" по использованию НСТ-тест набора. Поглотительную способность нейтрофилов (ФП, %, ФИ, у.е, АФ, 10^9/л, ФЧ, у.е.) и активность их оксидазных систем (+НСТ, %, ИАН) оценивали в двух состояниях: базальном (баз.) - в свежевзятой крови, стабилизированной гепарином, и стимулированном (стим.) - после внесения в пробы крови зимозана, что является моделью

бактериального заражения и характеризует адаптационные резервы поглотительной и микробицидной способности (Хаитов и др., 1995). Показатель резерва оксидазной способности нейтрофилов периферической крови (ПР) и коэффициент метаболической активации нейтрофилов (К) рассчитывали по Пахмутову и Ульяновой (1984). Кислородонезависимую микробицидность нейтрофилов периферической крови оценивали по содержанию в них катионных белков по методу В.И.Жибинова (1983), рассчитывая средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле, предложенной Н.А.Макаревичем (1988). Общий белок определяли рефрактометрически, белковые фракции нефелометрическим методом (Методические указания …, 1981). Фактический материал подвергнут статистическому анализу с использованием компьютерной техники (Иванов и др., 1994). В качестве значений физиологической нормы принимали интервалы соответствующих показателей, приведенные в литературе (Карпуть, 1986; Чумаченко и др., 1986).

Результаты исследований

Для изучения влияния селенопирана на уровень естественной резистентности и иммунный статус организма у 2-месячных поросят к моменту отъема в условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 0,1-1 Ku/км^2 (условно чистая зона) в УОХ "Кокино" была сформирована с учетом возраста, живой массы и продуктивности за предыдущий опорос, группа свиноматок 2-3 опороса крупной белой породы (6 голов). На десятый день после опороса поросят от этих свиноматок разделили (в каждом помете) на две группы, что составило 2 группы поросят-сосунов (1 - контрольная, 2 - опытная). Животным 2-й группы (15 голов) в 10-суточном возрасте подкожно ввели по 2 мл 1% масляного раствора селенопирана на голову, поросятам 1-й группы (19 голов) инъекцию не проводили.

Установлено, что у 2-месячных поросят контрольной группы количество нейтрофилов крови, проявляющих в базальных условиях способность к поглощению частиц латекса и оксидазную активность (табл. 1), превышало нормативные значения, интервалы которых составляют 4-10%. После

стимуляции клеток крови зимозаном эти показатели практически не изменялись по сравнению с базальным состоянием (P>0,05). Это свидетельствует о наличии в крови у животных 1-й группы факторов, активирующих нейтрофилы и об отсутствии адаптационных резервов микрофагальной системы защиты организма (дезак-

Таблица 1. ***Влияние селенопирана на функциональную активность нейтрофилов периферической крови у поросят (0,1-1 Ки/км^2)***

Показатели	*1 группа*	*2 группа*
Лейкоциты, 10^9/л	*29,76±1,83*	*22,69±2,34**
Нейтрофилы, %	*31,80±2,23*	*25,63±2,16*
ФП баз., %	*33,94±4,52*	*18,24±4,78*
ФП стим., %	*32,29±4,28*	*48,25±2,54**
ФИ баз., у. е..	*3,98±0,12*	*4,87±0,22**
ФИ стим., у. е..	*3,75±0,17*	*5,50±0,11**
АФ баз., 10^9/л	*13,16±2,28*	*4,99±1,62**
АФ стим., 10^9/л	*11,92±2,10*	*15,88±3,14*
ФЧ баз., у. е.	*1,36±0,19*	*0,86±0,35*
ФЧ стим., у. е.	*1,15±0,19*	*2,67±0,11**
Е-РОН, %	*45,54±3,56*	*55,75±5,69*
+НСТ баз., %	*56,89±2,59*	*32,19±3,32**
+НСТ стим., %	*41,00±4,83*	*68,09±4,17**
ИАН баз.	*1,06±0,06*	*0,50±0,05**
ИАН стим.	*0,70±0,07*	*1,36±0,03**
ПР	*0,72±0,08*	*2,21±0,31**
СЦК	*1,66±0,16*	*2,14±0,10**

*Примечание: * - P<0,05 по отношению к поросятам 1-й группы.*

тивации нейтрофилов крови), что по некоторым данным (Маянский и др., 1989,1990; Мазурик и др., 1999) вызывается "переraздражением", которое происходит при интенсивной выработке активных форм кислорода в условиях недостаточности в клетках антиоксидантов.

У 2-месячных поросят 2-й группы количество нейтрофилов крови, проявляющих в базальных условиях способность к поглощению частиц латекса и оксидазную активность, также превышало нормативные значения, но в меньшей степени, чем у животных контрольной группы.

После стимуляции клеток крови зимозаном у этих животных обнаружено достоверное увеличение, по сравнению с базальными условиями, как числа нейтрофилов, обладающих поглотительной (на 164,53%) и оксидазной (на 111,52%) способностью, так и интенсивности поглощения ими частиц

латекса (на 12,94%), а также индекса активации оксидазной способности нейтрофилов (на 172,0%), что свидетельствует о высоких адаптационных резервах микрофагальной системы защиты организма у поросят, которым в 10-суточном возрасте инъецировали селенопиран. У 2-месячных поросят опытной группы, по сравнению с контрольными животными, увеличивалось количество нейтрофилов, проявляющих после стимуляции зимозаном поглотительную способность на 49,43%, оксидазную активность на 66,07%, а также повышались фагоцитарный на 46,67% и индекс активации оксидазной способности нейтрофилов на 94,28%, содержание катионных белков в нейтрофилах на 28,92%. Введение 10-суточным поросятам селенопирана не оказало существенного влияния на иммунный статус их организма к 2-месячному возрасту, но способствовало повышению уровня общего белка в сыворотке крови на 7,11%, что в определенной степени коррелирует с более высокой живой массой этих животных по сравнению с контролем (на 6,08%).

Изучение влияния селенопирана на уровень естественной резистентности и иммунный статус организма у поросят и установление оптимальных режимов его применения в условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 10-15 Ku/км^2 проводили в СХП "Боевик" Новозыбковского района. Были сформированы, с учетом возраста, живой массы и продуктивности за предыдущий опорос, две группы свиноматок 2-3 опороса (А – контрольная и Б - опытная) по пять голов в каждой. Свиноматкам Б группы за 3-4 недели до опороса подкожно (в шею у основания уха) ввели по 5мл 4% масляного раствора селенопирана на голову. На 10 день после опороса поросята от подопытных свиноматок по принципу аналогов были разделены (в каждом помете) на две подгруппы, что составило 4 группы поросят-сосунов: 1-я и 2-я группы от свиноматок А группы, 3-я и 4-я группы от свиноматок Б группы. 1-я группа (13 голов) служила контролем, 2-я (13 голов), 3-я (17 голов) и

4-я (10 голов) группы были опытными. Животным 2-й и 4-й групп в 10-суточном возрасте подкожно ввели по 2мл 1% масляного раствора селенопирана на голову.

Результаты изучения влияния селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови у 2-месячных поросят (табл. 2) свидетельствуют о том, что у животных 2-й

группы в отличие от поросят, содержавшихся в хозяйстве условно чистой зоны (УОХ "Кокино") при аналогичной схеме использования селенопирана, не происходило достоверных изменений поглотительной способности нейтрофилов крови по сравнению с животными 1-й группы. В крови у поросят 3-й группы отмечена тенденция к увеличению, по сравнению с животными 1-й группы, фагоцитарного показателя (после стимуляции клеток крови зимозаном) на 28,02% и фагоцитарного индекса на 7,64%, что обусловило достоверное повышение адаптационного резерва абсолютного фагоцитоза крови на 137,69%.

Таблица 2. ***Влияние селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови и иммунный статус организма у поросят (10-15 Ки/км^2)***

Показатели	*Группы*			
	1-я	*2-я*	*3-я*	*4-я*
Лейкоциты, 10^9/л	*17,68±1,71*	*16,22±0,03*	*23,26±2,47 •*	*21,07±1,00 •*
Нейтрофилы, %	*40,38±1,99*	*37,85±1,68*	*47,96±0,52 •*	*34,62±3,39 ▲*
ФП баз., %	*46,05±1,16*	*40,83±7,33*	*39,98±3,90*	*29,37±1,90**
ФП стим., %	*39,33±6,41*	*42,77±4,03*	*50,35±5,40*	*66,74±6,55* •*
ФИ баз., у.е.	*4,96±0,15*	*5,50±0,34*	*5,05±0,22*	*4,48±0,21 •*
ФИ стим., у.е.	*4,45±0,31*	*4,57±0,15*	*4,79±0,31*	*5,45±0,38*
АФ баз., 10^9/л	*16,34±1,92*	*14,46±3,47*	*23,57±5,44*	*9,76±0,72* •*
АФ стим., 10^9/л	*12,55±2,98*	*11,95±1,36*	*29,83±9,34**	*25,82±2,88* •*
ФЧ баз., у.е.	*2,29±0,11*	*2,36±0,55*	*2,03±0,23*	*1,38±0,13* ▲*
ФЧ стим., у.е.	*1,82±0,38*	*1,98±0,32*	*2,36±0,48*	*3,73±0,61**
+НСТ, баз., %	*63,62±1,16*	*44,14±1,02**	*25,65±1,73* •*	*29,61±1,47* •*
+НСТ стим., %	*66,73±0,96*	*72,06±0,85**	*74,73±1,89**	*84,09±1,12* •▲*
ИАН баз.	*0,97±0,02*	*0,66±0,02**	*0,42±0,01* •*	*0,38±0,01* •▲*
ИАН стим.	*1,01±0,03*	*1,20±0,03**	*1,10±0,06*	*1,33±0,05* •▲*
К	*0,05±0,01*	*0,39±0,02**	*0,65±0,03* •*	*0,65±0,02* •*
ПР	*1,05±0,01*	*1,64±0,05**	*2,98±0,27* •*	*2,87±0,16* •*
СЦК	*1,40±0,11*	*1,55±0,09*	*1,58±0,03*	*1,74±0,03* ▲*
Лимфоциты, %	*50,89±1,86*	*54,40±1,24*	*42,11±2,60 •*	*58,78±2,76* ▲*
Е-РОЛ, %	*31,25±4,53*	*29,20±3,72*	*47,50±4,89 •*	*43,20±6,44*
Е-РОЛтр, %	*45,17±2,30*	*37,75±4,17*	*53,40±9,90*	*44,00±7,05*
М-РОЛ, %	*15,37±4,83*	*20,00±3,93*	*29,20±2,60**	*29,00±1,05**
Ig A, мг/мл	*0,50±0,05*	*0,46±0,05*	*0,36±0,03**	*0,39±0,04*

*Примечание: * - P<0,05 по отношению к 1-й группе, • - P<0,05 по отношению ко 2-й группе, ▲ - P<0,05 по отношению к 3-й группе.*

Адаптационные резервы поглотительной способности микрофагальной защитной системы у животных 4-й группы были выше, чем у контрольных, на что указывает не только

достоверное увеличение после стимуляции клеток крови зимозаном абсолютного фагоцитоза крови (на 105,74%), как и у животных 3-й группы (на 137,69%), но и увеличение фагоцитарного числа на 104,94%. Использование селенопирана при выращивании поросят-сосунов, согласно всех примененных в эксперименте схем, обусловило у 2-месячных животных повышение адаптационных резервов кислородозависимой микробицидности крови, выявляемых пробой с зимозаном, наиболее выраженное при использовании селенопирана по схеме, предусматривающей его пренатальное поступление с последующим подкожным введением в 10-суточном возрасте (4 группа).

Применение селенопирана при выращивании поросят-сосунов в условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 10-15 Ku/км^2 не оказало существенного влияния на Т-клеточное звено иммунной системы их организма к 2-месячному возрасту. При этом у животных 3-й и 4-й групп установлено достоверное повышение содержания в крови В-лимфоцитов на 89,98% и 88,68% соответственно по сравнению поросятами 1-й группы. Не обнаружено достоверного влияния применения селенопирана на содержание в сыворотке крови у животных опытных групп общего белка, его фракций и иммуноглобулинов отдельных изотипов, за исключением снижения на 28,00% уровня IgA у животных 3-й группы, что можно отнести к проявлению "вторичной недостаточности" селена. Использование селенопирана согласно всех схем его применения обусловило к 60-суточному возрасту повышение живой массы на 14,10%, 27,15% и 34,99% у поросят 2, 3 и 4-й групп соответственно.

Следовательно, при повышении содержания в среде радиоцезия у поросят увеличивается потребность в селенопиране. Повышение адаптационных резервов фагоцитарной активности нейтрофилов крови у 2-месячных поросят на территории условно чистой зоны отмечено в результате подкожного введения селенопирана только в 10-суточном возрасте, а у поросят в условиях загрязнения почвы радиоцезием 10-15 Ku/км^2 для проявления аналогичного эффекта (повышение фагоцитарного показателя на 49,43% и 69,69%, фагоцитарного числа на 132,17% и 104,94% и содержания катионных белков на 28,92% и 24,29% соответственно) необходимо еще и пренатальное его поступление.

Имеются сведения, что в крови у поросят, получавших с кормом селенопиран в дозе 0,1-0,3 мг селена на 1 кг сухого вещества рациона, достоверно повышались живая масса, содержание в крови В-лимфоцитов и уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови (Боряев, 1992). Изучение влияния скармливания селенопирана на уровень естественной резистентности и иммунный статус организма у поросят в условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 5-10 Ku/км^2 проводили в колхозе "Прогресс" Клинцовского района. Были сформированы 2 группы поросят-сосунов по 15 голов в каждой. Поросята 1 группы являлись контролем, животные 2 группы (опытная) в течение недели до отъема и недели после него с кормом получали селенопиран из расчета 1,2 мг/кг сухого вещества рациона. Через 18 дней после окончания скармливания препарата у 6 голов из каждой группы взяли кровь для анализов.

В результате изучения влияния скармливания селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови у поросят (табл. 3) установлено, что после стимуляции клеток крови зимозаном увеличивались: фагоцитарный показатель на 46,97, фагоцитарный индекс на 31,12%, коэффициент метаболической активации на 123,33%, показатель резерва оксидазной способности нейтрофилов крови на 107,27%, индекс активации оксидазной способности нейтрофилов на 41,94%, что свидетельствует об увеличении адаптационных резервов поглотительной функции и кислородозависимой микробицидности нейтрофилов крови опытных животных. У поросят, получавших с кормом селенопиран, по сравнению с контрольными, уровень Т-лимфоцитов в крови снижался на 80,15%. При этом обнаружены малодифференцированные Т-лимфоциты, о чем свидетельствует инверсный эффект теофиллина.

Таблица 3. ***Влияние скармливания селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови и иммунный статус организма у поросят (5-10 Ku/км^2)***

Показатели	*1 группа*	*2 группа*		
	M ± m	*M ± m*	*% к 1 группе*	*P*
Лейкоциты, 10^9/л	*28,24±3,29*	*26,29±1,77*	*93,10*	*>0,05*
Нейтрофилы, %	*36,25±4,04*	*27,99±3,65*	*77,19*	*>0,05*
ФП баз., %	*45,80±2,84*	*52,70±3,43*	*115,06*	*>0,05*
ФП стим., %	*49,67±1,63*	*73,00±3,20*	*146,97*	*<0,001*

ФИ баз., у.е.	*4,69±0,24*	*5,89±0,17*	*125,59*	*<0,01*
ФИ стим., у.е.	*4,66±0,20*	*6,11±0,36*	*131,12*	*<0,01*
АФ баз., 10^9/л	*22,69±4,53*	*22,56±3,91*	*99,43*	*>0,05*
АФ стим., 10^9/л	*24,72±5,82*	*32,26±6,19*	*130,50*	*>0,05*
+НСТ баз., %	*26,61±3,08*	*17,15±1,92*	*64,45*	*<0,05*
+НСТ стим., %	*38,99±4,45*	*52,12±4,39*	*133,68*	*>0,05*
ИАН баз.	*0,46±0,08*	*0,27±0,04*	*58,70*	*<0,05*
ИАН стим.	*0,62±0,08*	*0,88±0,07*	*141,94*	*<0,05*
К	*0,30±0,08*	*0,67±0,03*	*223,33*	*<0,01*
ПР	*1,52±0,17*	*3,15±0,35*	*207,24*	*<0,01*
Лимфоциты, %	*50,71±3,38*	*56,19±2,41*	*110,81*	*>0,05*
Е-РОЛ, %	*35,32±4,38*	*7,01±3,39*	*19,85*	*<0,001*
Е-РОЛ тр, %	*32,86±4,96*	*27,02±3,21*	*82,23*	*>0,05*
IgG, мг/мл	*21,22±2,34*	*28,38±0,36*	*133,74*	*<0,05*
IgM, мг/мл	*2,27±0,27*	*2,56±0,13*	*112,78*	*>0,05*
IgA, мг/мл	*0,89±0,11*	*1,49±0,11*	*167,42*	*<0,01*

На содержание В-лимфоцитов в крови, уровень в сыворотке крови общего белка, его фракций и IgM у поросят 2-й группы скармливание селенопирана существенного влияния не оказало. При этом установлено достоверное увеличение в сыворотке крови уровня IgG на 33,74% и IgA на 67,42%. Следовательно, в условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 5-10 Ku/км^2 введение в рацион поросят в течение 2 недель селенопирана в дозе 1,2 мг/кг сухого вещества обусловило достоверное увеличение адаптационных резервов микрофагальной системы защиты организма. При этом у животных отмечена стимуляция механизмов гуморального иммунитета (повышение уровня в сыворотке крови IgG и IgA), которая дезавуирует функциональную недостаточность тимуса, о чем свидетельствует низкий уровень в крови Т-лимфоцитов. В случае подкожного введения селенопирана такой эффект не отмечен.

Полученные данные свидетельствуют о недостаточности функциональной активности тимуса у поросят в регионах с высокой плотностью загрязнения почвы радиоцезием. В этих условиях подкожное введение селенопирана поросятам предпочтительнее, чем ежедневное в течение 2 недель оральное его поступление в организм.

Для изучения влияния различных схем использования селенопирана как в комплексе с жирорастворимыми витаминами (А, Е, Д), так и отдельно, на уровень естественной резистентности и иммунный статус организма у телят в условиях

плотности загрязнения почвы ^{137}Cs 5-10 Ku/км^2 проведен эксперимент в колхозе "Первомайский" Климовского района. Были сформированы 3 группы (А, Б и В) сухостойных полновозрастных коров черно-пестрой породы 2-4 лактации по 10 голов в каждой. Коровы А группы были контрольными. Коровам Б группы за 3-4 недели до отела ввели подкожно по 6 мл 5% масляного раствора селенопирана на голову. Коровы В группы, кроме подкожной инъекции селенопирана в той же дозировке, орально получили комплекс жирорастворимых витаминов (А - 2 млн. ИЕ, Е - 0,5 г, Д - 400 тыс. ИЕ на голову). Телят, полученных от коров каждой группы, разделили на 2 подгруппы и, таким образом, было создано 6 групп телят. Телята 1-й группы являлись контрольными, 2-6-й - опытными. В возрасте 1-3 суток телятам 2 и 6 групп ввели подкожно селенопиран и орально витамины А, Е, Д, животным 3-й группы – только селенопиран орально, а 4-й группы – только селенопиран подкожно. Независимо от схемы применения селенопирана дозы препаратов были одинаковыми для телят всех опытных групп (селенопиран - 100 мг, витамин А – 250 тыс. ИЕ, витамин Д - 100 тыс. ИЕ, витамин Е - 0,034 г на голову).

В результате изучения влияния различных схем применения селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови у 3-месячных телят (табл. 4) установлено, что поступление в организм телят селенопирана в пренатальный период, а затем в 1-3-суточном возрасте как орально (3 группа), так подкожно (4 группа) обусловило ряд аналогичных изменений ($P<0,05$) в микрофагальной системе защиты организма: увеличение абсолютного фагоцитоза крови после стимуляции клеток зимозаном (на 94,42% и 276,76%), снижение индекса активации оксидазной способности нейтрофилов крови в базальных условиях (на 47,22% и 63,89%), повышение коэффициента метаболической активации (в 25,71 раза и в 37,14 раза) и показателя резерва оксидазной активности нейтрофилов крови (на 57,61% и 137,29% соответственно). Анализ функциональной активности нейтрофилов крови у телят этих групп выявил преимущество подкожного введения селенопирана (4 группа), по сравнению с оральным (3 группа), которое заключалось в достоверном увеличении абсолютного фагоцитоза крови на 141,82% в базальных условиях и на 93,78% после стимуляции клеток крови зимозаном.

Совместное пренатальное применение селенопирана с витаминами А, Е, Д (6 группа) с последующим постнатальным их введением оказало влияние на более широкий спектр защитных механизмов организма у телят, по сравнению с использованием только одного селенопирана (4 группа). Установлено увеличение резерва поглотительной способности нейтрофилов крови у телят 6-й группы как за счет повышения фагоцитарного показателя (на 83,75%), так и фагоцитарного индекса (на 31,87%), а также повышение в крови Т-хелперов (на 41,98%), в то время как у животных 4-й группы, получавших только селенопиран, подобных изменений не отмечено.

В зависимости от способа введения селенопирана телятам в 1-3-суточном возрасте (орально или подкожно) отмечены особенности действия этого препарата на клеточное звено иммунной системы (табл. 5). По сравнению с животными контрольной группы оральное введение телятам 3-й группы селенопирана обусловило оптимизацию уровня В-лимфоцитов в крови, о чем свидетельствует снижение их количества на 23,96% (до верхней границы физиологической нормы), а подкожное введение (4 группа) вызвало повышение функциональной активности тимуса, на что указывает увеличение в крови уровня Т-лимфоцитов на 64,45%. Достоверное увеличение живой массы телят (на 20,87%) отмечено только при подкожном введении селенопирана. Пренатальное и последующее введение 1-3-суточным телятам селенопирана в сочетании с жирорастворимыми витаминами (6 группа), способствовало повышению функциональной активности тимуса, о чем свидетельствует повышение, относительно животных контрольной группы, в крови у телят 6-й группы содержания Т-лимфоцитов на 68,88% ($P<0,05$) и оптимизация Т-хелперно/супрессорного отношения (2,31).

Таблица 4. ***Влияние различных схем использования селенопирана на функциональную активность нейтрофилов крови у 3-месячных телят***

Показатели	*Группы*					
	1-я	*2-я*	*3-я*	*4-я*	*5-я*	*6-я*
	M ± m	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*
Лейкоциты, 10^9/л	*9,89±0,10*	*15,11±1,87**	*11,78±0,63**	*13,65±0,40**	*9,90±0,31 • ▲◊*	*14,05±0,38* ▲◘*
Нейтрофилы, %	*20,30±2,39*	*26,44±2,09*	*21,59±3,10*	*30,56±4,38*	*25,47±7,05*	*24,52±1,63*
ФП баз., %	*60,83±3,96*	*76,88±1,39**	*65,00±10,11*	*90,17±0,93* •*	*76,58±3,39*◊*	*86,75±3,32* •◘*
ФП баз., %	*60,83±3,96*	*76,88±1,39**	*65,00±10,11*	*90,17±0,93* •*	*76,58±3,39*◊*	*86,75±3,32* •◘*
ФП баз., %	*60,83±3,96*	*76,88±1,39**	*65,00±10,11*	*90,17±0,93* •*	*76,58±3,39*◊*	*86,75±3,32* •◘*
ФП стим., %	*40,50±2,78*	*51,75±3,71**	*47,33±1,20*	*59,33±8,57*	*45,13±6,77*	*74,42±4,47* • ▲◘*
ФИ баз., у.е.	*11,47±0,38*	*11,41±0,38*	*11,06±1,09*	*12,33±0,48*	*12,14±0,27*	*12,94±0,32* •*
ФИ стим., у.е.	*7,53±0,53*	*8,70±0,45*	*8,80±1,26*	*8,48±0,66*	*8,57±0,52*	*9,93±0,57**
АФ баз., 10^9/л	*14,47±2,40*	*34,77±4,13**	*19,20±5,33*	*46,43±7,66* ▲*	*24,44±8,22*	*39,31±4,62* ▲*
АФ стим., 10^9/л	*5,38±1,38*	*18,47±3,44**	*10,46±1,61**	*20,27±2,82* ▲*	*10,45±3,92*	*26,03±3,64* ▲◘*
ФЧ баз., у.е.	*6,98±0,53*	*8,76±0,23**	*7,40±1,79*	*11,14±0,50* •*	*9,30±0,55**	*11,23±0,50* •◘*
ФЧ стим., у.е.	*2,69±0,51*	*4,61±0,41**	*4,18±0,62*	*4,92±0,44**	*3,80±0,72*	*7,51±0,86* • ▲◊◘*
+НСТ баз., %	*49,89±6,43*	*33,50±3,20*	*31,17±5,24*	*28,00±5,75**	*54,00±8,50*	*21,46±3,69* •◘*
+НСТ стим., %	*28,08±6,64*	*32,58±3,95*	*37,67±4,48*	*36,83±3,71*	*41,50±4,79*	*38,50±3,34*
ИАН баз.	*0,72±0,11*	*0,47±0,04*	*0,38±0,07**	*0,26±0,08**	*0,77±0,12 ▲◊*	*0,26±0,04* •◘*
ИАН стим.	*0,37±0,08*	*0,40±0,02*	*0,52±0,05*	*0,45±0,06*	*0,52±0,05*	*0,58±0,08*
К	*0*	*0*	*0,18±0,07**	*0,26±0,09**	*0*	*0,52±0,06* • ▲◘*
ПР	*0,59±0,13*	*0,97±0,08**	*1,23±0,12**	*1,40±0,20**	*0,79±0,05 ▲◊*	*1,99±0,26* • ▲◘*
СЦК	*0,92±0,08*	*0,99±0,10*	*0,95±0,17*	*1,45±0,15* •*	*1,15±0,05**	*1,38±0,12* •*

*Примечание: * - P<0,05 по отношению к 1 группе, • - P<0,05 по отношению ко 2 группе, ▲ - P<0,05 по отношению к 3 группе, ◊ - P<0,05 по отношению к 4 группе, ◘ - P<0,05 по отношению к 5 группе.*

Таблица 5. ***Влияние различных схем использования селенопирана на иммунный статус организма у 3 месячных телят***

Показатели	*Группы*					
	1-я	*2-я*	*3-я*	*4-я*	*5-я*	*6-я*
	M ± m	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*	*M ± m*
Е-РОЛ, %	*37,50±4,16*	*51,50±4,73*	*58,00±8,02*	*61,67±1,33**	*44,75±4,78* ◊	*63,33±1,84** ◘
Е-РОЛтр, %	*37,33±4,86*	*59,00±1,29**	*36,00±4,04* •	*41,67±2,33* •	*36,50±0,96* •	*53,00±3,59** ▲◊◘
М-РОЛ, %	*43,83±3,60*	*32,00±6,70*	*33,33±2,33**	*40,00±2,08*	*43,00±5,43*	*35,00±3,55*
IgG,мг/мл	*12,08±0,30*	*11,27±0,52*	*11,83±0,52*	*12,00±0,51*	*11,70±0,48*	*12,12±0,45*
IgM, мг/мл	*3,37±0,13*	*3,00±0,17*	*2,87±0,20*	*3,47±0,27*	*3,10±0,20*	*3,44±0,20*
Общий белок, г/л	*62,50±2,20*	*62,90±3,50*	*59,20±0,90*	*55,80±3,10*	*61,90±2,90*	*60,30±2,90*
Альбумины, г/л	*28,38±2,00*	*29,22±4,02*	*29,32±0,24*	*26,59±1,05*	*30,62±1,36*	*32,14±3,23*
α-глобулины, г/л	*5,14±0,34*	*4,34±0,92*	*4,39±0,70*	*5,30±1,03*	*6,29±2,27*	*4,52±0,55*
β-глобулины, г/л	*14,42±1,33*	*14,34±1,25*	*13,30±0,30*	*12,29±0,96*	*11,80±1,45*	*12,91±1,60*
γ-глобулины, г/л	*13,55±1,82*	*12,06±3,19*	*12,19±2,13*	*11,66±2,78*	*10,85±3,34*	*9,91±1,27*
Лимфоциты, %	*75,67±2,75*	*68,95±2,84*	*74,70±3,48*	*63,28±4,90*	*67,67±6,80*	*70,21±1,48*
Атипичные, % от лимфоцитов	*22,68±3,26*	*15,21±5,22*	*19,48±5,81*	*8,78±1,47**	*9,66±1,08**	*9,80±2,00**

*Примечание: * - P<0,05 по отношению к 1 группе, • - P<0,05 по отношению ко 2 группе, ▲ - P<0,05 по отношению к 3 группе, ◊ - P<0,05 по отношению к 4 группе, ◘ - P<0,05 по отношению к 5 группе*

При этом в 3-месячном возрасте отмечено увеличение живой массы телят 6-й группы на 17,19% и среднесуточного прироста живой массы на 31,03% ($P<0,05$).

В условиях плотности загрязнения почвы радиоцезием 5-10 Ku/км^2 витамины А, Е и Д, проступающие в организм телят вместе с селенопираном, усиливали его оптимизирующее влияние на лимфоцитарную систему: если для снижения уровня атипичных лимфоцитов в крови у 3-месячных телят на 57,41% достаточно было только пренатального поступления селенопирана и витаминов А, Е, Д, то для аналогичного снижения их числа (на 61,29%) под влиянием одного селенопирана требовалось дополнительное его подкожное введение в 1-3-суточном возрасте. При этом основной эффект в снижении уровня атипичных лимфоцитов в крови у телят связан именно с пренатальным поступлением селенопирана и витаминов А, Е, Д, так как введение этих препаратов только в 1-3-суточном возрасте не оказало существенного влияния на число этих клеток.

Заключение

По широте спектра защитных механизмов организма у 3-месячных телят, функциональная активность которых повышалась под влиянием селенопирана, испытанные схемы его применения можно расположить в следующем порядке: пренатальное, а затем в 1-3-суточном возрасте введение подкожно селенопирана и орально витаминов А, Е, Д > пренатальное, а затем в 1-3-суточном возрасте подкожное введение одного селенопирана > подкожное введение селенопирана и оральное витаминов А, Е, Д в 1-3-суточном возрасте > пренатальное, а затем в 1-3-суточном возрасте оральное введение селенопирана > только пренатальное поступление селенопирана и витаминов А, Е, Д.

Таким образом, в условиях повышенной плотности загрязнения почвы радиоцезием для увеличения адаптационных резервов фагоцитарной способности нейтрофилов крови, количества В-лимфоцитов в крови и повышения живой массы у 2-месячных поросят-сосунов необходимо проводить однократное подкожное введение пролонгированной формы селенопирана свиноматкам за 3-4 недели до опороса по 2 мл 4% масляного раствора на голову, с последующей подкожной инъекцией его 10-

суточным поросятам по 2 мл 1% раствора на голову. Для увеличения адаптационных резервов фагоцитарной способности нейтрофилов крови, количества Т-лимфоцитов и, в частности, Т-хелперов в крови, повышения радиорезистентности лимфоцитов крови и живой массы у 3-месячных телят следует вводить коровам за 3-4 недели до отела подкожно по 6 мл 5% масляного раствора пролонгированной формы селенопирана и орально витамины А - 2 млн. ИЕ, Е - 0,5 г, Д - 400 тыс. ИЕ на голову, а затем 1-3-суточным телятам подкожно по 5 мл 2% селенопирана и орально витамин А – 250 тыс. ИЕ, витамин Д - 100 тыс. ИЕ, витамин Е - 0,034 г на голову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бударков В.А., Зенкин А.С., Карпов А.Н. и др. Иммунный статус жвачных животных при поражении щитовидной железы радиоактивным йодом. Сельскохоз.биология, 1993, 4: 81-86.
2. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Спр. пособие. А.П.Калашников, Н.И,Клейменов, В.Н.Баканов и др. М.: Агропромиздат, 1985: 352 с.
3. Понякина И.Д., Лебедев К.А., Васенович М.И. и др. Способ определения иммунологического состояния организма. А. с. 1090409 (РФ) МКИ^3 А 61 К 39/00, №3429. 198/28-13; заявл. 23.04.82; опубл. 07.05.84, Бюл. №17.
4. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях (Методология и методические рекомендации). М.: Медицина, 1989: 153 с.
5. Бэм Э. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини // Иммунологические методы. М.: Мир, 1987: 49-57.
6. Чумаченко В.Е., Высоцкий А.М., Сердюк Н.А., Чумаченко В.В. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай, 1990: 136 с.
7. Хаитов Р.Б., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995: 219 с.
8. Пахмутов И.А., Ульянова М.С. Оценка функциональной активности нейтрофилов крови животных. Ветеринария, 1984, 3: 68-69.
9. Жибинов В.И. Применение лизосомально-катионного теста. Ветеринария, 1983, 8: 30-31.
10. Макаревич Н.А. Лизосомально-катионный тест для оценки уровня резистентности организма крупного рогатого скота. Ветеринария, 1988, 5: 26-28.
11. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях. М.: ВАСХНИЛ, 1981: 85 с.
12. Иванов В.П., Крапивин И.А. Программа для статистической обработки результатов зоотехнических, физиологических и биохимических

исследований. Новые формы и методы обучения студентов. Кострома, 1994, 2: 90-91.
13. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохояйственных животных.- Мн.: Ураджай, 1986: 183 с.
14. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующего излучения на организм млекопитающих. Радиационная биология. Радиоэкология, 1999, 39, 1: 89-96.
15. Маянский А.Н. Кондиционирование нейтрофила. Успехи современной биологии, 1990, 109, 1: 90-105.
16. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989: 344 с.
17. Боряев Г.И. Влияние кленбутерола в комплексе с органическими соединениями цинка и селена с целью повышения продуктивности и резистентности цыплят-бройлеров: Автореф.... канд. биол. наук. Боровск, 1992: 23с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ МИКРОЦИНОГЕННОГО ШТАММА ESCHERICHIA COLI B 214/99 ДЛЯ КРОЛИКОВ

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова, А.И. Манухина
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта
Кабинет морфологических исследований

В опытах на кроликах изучена хроническая токсичность микроциногенного штамма E. coli B 214/99. Показано, что его ежедневное применение в дозах 1,5-3,0 х 10^8-10^{10} колониобразующих единиц (к.о.е.)/гол/сут в течение 6 мес не сопровождалось какими-либо неблагоприятными отклонениями в функционировании у кроликов органов и систем. Применение препарата увеличивало прирост живой массы (9,4-16,1%), но при 10- и 100-кратно повышенных дозах уменьшалась масса мышечной ткани и костей, а доля жира возрастала до 23,4-23,8%. В испытанных дозировках микроциногенный штамм E. coli B 214/99 в крови из сердца, почках и мышечной ткани не обнаруживался и не вызывал видимых патологических изменений в органах и тканях. Показано, что пробиотик стимулирует неспецифическую резистентность животных и активизирует почти все клетки иммунной системы. Он усиливает интенсивность пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов в лимфоидных органах, увеличивает число межклеточных кооперации макрофагов с лимфоцитами и плазматическими клетками. Однако при

увеличении дозы препарата до 1,5-3,0 х -10^{10} к.о.е./гол/сут наблюдается уменьшение количества и величины центров размножения в лимфоидных узелках кишечника, брыжеечных лимфоузлах и селезенке, а в паренхиматозных органах отмечено нарушение микроциркуляции. Сделано заключение, что ежедневное 6-месячное скармливание микроциногенного штамма E. coli B 214/99 в дозах 1,5-3,0 х 10^8-10^9 к.о.е./гол/сут – безвредно для кроликов.

Введение

В последние годы в лаборатории биотехнологии микроорганизмов были выделены микроциногенные штаммы эшерихий, испытание которых на антагонизм показало, что они подавляют 69-100% эшерихий и 42,6-80% сальмонелл дикого типа, обитающих в кишечнике крупного рогатого скота, свиней, цыплят и кошек. Из этих данных следует, что полученные штаммы являются перспективными для создания новых высокоэффективных пробиотиков и поэтому должны пройти тщательную проверку на безвредность (Инструкция …, 1988; Доклад ВОЗ, 1994). Ранее нами для штамма E. coli B 214/99 была определена LD_{50} (1,0х10^{10} к.о.е./гол) и показано, что он имеет слабую токсичность, не обладает токсигенностью, аллергенностью и местным токсическим действием, но способен к транслокации через тканевые барьеры и диссеминации во внутренние органы. Однако для окончательного заключения о безвредности изучаемого штамма необходимо определение его хронической токсичности.

Исходя из вышеизложенного, задачей исследований было изучить хроническую токсичность микроциногенного штамма E. coli B 214/99 для кроликов.

Материалы и методы

Для проведения исследований из послеотъемных кроликов было сформировано 4 группы по 12 животных в каждой. Они содержались в виварии института в сетчатых клетках по одной голове и получали сбалансированный по основным питательным веществам рацион, который в зимне-весенний период состоял из 200 г злакового сена и 200 г зерносмеси или комбикорма. Он содержал: сухого вещества – 280 г, кормовых единиц – 0,22, обменной энергии – 2,3 МДж, сырого протеина – 33 г, переваримого протеина – 21 г, сырой клетчатки – 78 г, кальция – 1,3г и фосфора – 0,7 г. Первая группа кроликов служила контролем. Животные 2-й группы дополнительно к основному рациону в смеси с комбикормом ежедневно получали

культуру E. coli B 214/99 в дозе 1 мл/гол с титром 1,5-3,0 х10^8к.о.е./мл, а кроликам 3-й и 4-й групп препарат задавали в 10-ти и 100-кратно увеличенной дозе соответственно.

В период опыта учитывали прирост живой массы тела, ежедневно вели контроль за общим состоянием животных. Убой кроликов (по 3 головы из каждой группы) и отбор образцов крови, мочи, органов и тканей для морфологических, биохимических и гистологических исследований проведен после 3-х и 6-месячного скармливания препарата.

В крови определяли количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу (Карпуть, 1986), фагоцитоз по Кост и Стенко (Блинов, 1983), СОЭ по методу Панченкова (Кондрахин и др.,1985), гемоглобин в гемометре Сали, бактерицидную активность сыворотки крови по Смирновой и Кузьминой (1966), лизоцимную активность по Емельяненко (1980). Функцию почек оценивали по физико-химическим показателям мочи, в которой определяли pH на иономере ЭВ-74; цвет, прозрачность и консистенцию визуально; белок с помощью сульфосалициловой кислоты; сахар по Гайнесу; кетоновые тела по реакции с нитропруссидом натрия; желчные пигменты по Розину (Кондрахин и др., 1985).

На убойном материале устанавливали массу сердца, легких, печени, почек, селезенки, надпочечников и тимуса, определяли в тушках соотношение мышечной ткани, костей и жира и провели патологоанатомические исследования.

Способность штамма E. coli B 214/99 диссеминировать во внутренние органы кроликов определяли микробиологическими методами. С этой целью на агар Эндо делали высевы из печени, почек, легких, крови из сердца, лимфатических узлов и длиннейшей мышцы спины. Бактериологические исследования выполнены в соответствии с требованиями общей схемы исследования мяса и мясных продуктов (Ветеринарная лабораторная практика, 1963).

Для морфологического и гистохимического изучения отбирали образцы пищеварительного тракта (дно желудка, 12-перстная и слепая кишки), желез внутренней секреции (тимуса и поджелудочной железы), паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка) и мезентериальных лимфатических узлов. Отобранный материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, жидкости Карнуа и заливали в парафин. Изготовленные с помощью микротома срезы окрашивали по Акимченкову и гематоксин-эозином. Гистохимические показатели на гликозамингликаны, гликоген и белок определяли по Лилли и оценивали визуально по интенсивности окраски.

Результаты и обсуждение

Общее состояние животных, параметры крови и мочи. Наблюдения показали, что применение препарата в течение 6 мес не сопровождалось какими-либо отклонениями в поведении и клиническом состоянии животных. В период опыта по причине кокцидиоза пал один кролик в контрольной группе, один крольчонок с диагнозом гастроэнтерит выбыл из второй группы и одна самка пала в 4-й группе от жирового перерождения печени и нефроза.

Гематологические исследования показали, что основные морфологические параметры крови животных контрольной и опытных групп после 3-месячного применения препарата находились в пределах физиологической нормы и между группами существенно не различались. После 6-месячного скармливания культуры E. coli B 214/99 эти показатели не выходили за границы нормы, но у кроликов 3-й и 4-й групп, получавших микробный препарат в 10- и 100-кратно увеличенной дозах, в крови статистически значимо (P< 0,05-0,01) снизилось количество эритроцитов, лейкоцитов и уровень гемоглобина (табл. 1).

Таблица 1. ***Динамика морфологических показателей крови кроликов***

Показатель	Группа животных			
	1	2	3	4
3-месячное скармливание препарата				
Гемоглобин, г/л	98±0,09	92±2,4	90±4,8	92±4,3
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	1,5±0,1	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	9,3±1,20	10,6±0,24	8,7±0,24	9,28±0,58
Количество эритроцитов, млн/мкл	5,8±0,04	6,6±0,26	6,2±0,12	6,4±0,12[в]
6-месячное скармливание препарата				
Гемоглобин, г/л	107±1,4	99±2,1[б]	100±0,7[в]	95±1,9[в]
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	1,0±0,0
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	8,6±0,42	8,3±0,42	6,2±0,04[в]	7,1±0,4[а]
Количество эритроцитов, млн/мкл	6,1±0,19	6,1±0,63	5,2±0,12[в]	5,2±0,14[в]

Примечание. Здесь и далее достоверность разницы показана в сравнении с 1-й (контрольной) группой. а – P<0,05; б – P<0,02; в – P<0,01; г – P<0,001.

Что касается лейкоцитарной формулы (табл. 2), то во всех группах она соответствовала лейкограмме здоровых животных, но при этом значительно выросли показатели неспецифической

резистентности: фагоцитарная, бактерицидная и лизоцимная активности сыворотки крови.

Моча у животных всех групп имела цвет от соломенно-желтого до коричневого, была мутной и с характерным для грызунов запахом. Показатель pH колебался в пределах от 7,0 до 9,0. В моче кроликов как контрольной, так и опытных групп содержалось небольшое количество белка (0,01 г/л) и желчные пигменты – уробилин и билирубин. Если уробилин является нормальным компонентом мочи, то появление билирубина свидетельствует о признаках нарушения функций печени. У животных 3-й и 4-й группы он был обнаружен по одному случаю в каждой группе.

Таблица 2. ***Лейкоцитарная формула и показатели неспецифической резистентности крови кроликов, получавших E. coli B 214/99***

Показатель	Группа животных			
	1	2	3	4
3-месячное скармливание препарата				
Лейкоцитарная формула, %				
Псевдоэозинофилы:				
палочкоядерные	3,2	4,3	3,0	3,0
сегментоядерные	22,6	20,0	24,6	23,0
Базофилы	2,0	1,3	1,5	2,0
Эозинофилы	1,6	2,0	2,3	1,0
Лимфоциты	66,5	70,4	65,6	67,3
Моноциты	4,1	2,0	3,0	3,7
Неспецифическая резистентность				
	20±0,0	24,95±0,8[в]	33,5±1,7[в]	31,3±0,8[г]
Фагоцитарная активность, %				
Фагоцитарный индекс	2,0±0,24	3,3±0,02[в]	3,3±0,07[в]	3,25±0,07[в]
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	37,2±2,4	37,2±1,9	38,0±0,6	38,8±1,9
Лизоцимная активность сыворотки крови, мкг/мл	110±2,4	98±3,7	126±2,4[в]	130±4,8[а]
6-месячное скармливание препарата				
Лейкоцитарная формула, %				
Псевдоэозинофилы:				
палочкоядерные	2	2	2	2
сегментоядерные	19	14	17	18
Базофилы	3,0	2,0	1,0	3,0
Эозинофилы	3,0	2,0	4,0	3,0
Лимфоциты	70	77	73	72

Моноциты	3	3	3	2
Неспецифическая резистентность				
Фагоцитарная активность, %	26,0±2,4	30,0±0,0	33,0±1,7	33,5±2,4
Фагоцитарный индекс	2,4±0,09	2,7±0,12	3,6±0,09[г]	3,8±0,29[в]
Бактерицидная активность сыворотки, %	25,8±1,45	36,2±0,48[в]	30,5±2,4	25,8±0,48
Лизоцимная активность сыворотки крови, мкг/мл	66,6±4,8	68,0±4,8	73,3±7,2	107,5±10,2[а]

Продуктивность и качество мяса. Кролики всех четырех использованных в опыте групп полностью поедали задаваемые им корма. При этом проявилось положительное ростстимулирующее действие изучаемого штамма. У животных, получавших препарат в дозах 1,5-3,0x10^8, x10^9 и x10^{10}к.о.е./гол/сут в течение 3 и 6 месяцев, прирост живой массы превосходил контроль на 4,5%; 7,2%; 7,5% и 9,4%, 9,4% и 16,1% соответственно (табл. 3). После 3-месячного скармливания препарата убойный выход тушки варьировал в пределах 46,9 -48,6%, а масса мышц, костей и жира составляла 78-81%, 15-16,7% и 4,65% соответственно и существенно между группами не различалась (табл. 4). Никаких посторонних запахов мясо не имело. В мясе задних окорочков у животных опытных групп возрастало содержание сухого вещества, в котором увеличивались уровни протеина. После 6-месячного примене-

Таблица 3. ***Прирост живой массы тела кроликов при скармливании штамма E. coli B 214/99***

Группа животных	Живая масса , г			%
	в начале опыта	в конце опыта	прирост за опыт	к контролю
После 3-месячного скармливания препарата				
1	835±65	2290±203	1455±73	100,0
2	790±63	2310±145	1520±63	104,5
3	760±48	2320±119	1560±40	107,2
4	840±82	2405±139	1565±68	107,5
После 6-месячного скармливания препарата				
1	835±65	3065± 81	2230±75	100,0
2	790±63	3230±101	2440±46[а]	109,4
3	760±48	3200± 78	2440±80	109,4

4	840±82	3430± 66	2590±45[г]	116,1

ния препарата убойный выход тушки повысился и колебался в пределах 54,6-55,8%. Оценка соотношений мышц, костей и жира в тушках кроликов 1-й и 2-й групп существенных изменений не выявила, тогда как у животных 3-й и 4-й групп эти соотношения существенно изменялись (табл. 4). Так, доля мышц и костей с 74,8% и 13% в контроле снижалась до 65,1% и 11,5%; 64,6% и 11,6% у кроликов 3-й и 4-й групп (P<0,05-0,02), а содержание жира увеличивалось с 12,2% до 23,4% и 23,8% соответственно. Что касается химического состава мяса задних окорочков, то по содержанию влаги, сухого вещества и золы он между группами существенно не различался, но в мясе животных 2-й и 3-й групп содержалось больше белка (P<0,001), тогда как в 4-й группе увеличился до 8,3 процент межмышечного жира (табл. 4). Никаких посторонних запахов мясо не имело и в соответствии с МРТУ-18/104-65 все тушки отнесены к I категории.

Оценка способности штамма E.coli B 214/99 к диссеминации во внутренние органы и ткани показала, что после 3-месячного применения препарата в крови из сердца, почках и мышцах у кроликов всех групп кишечная палочка не обнаружена. В лимфоузлах кишечника она выявлена у одного кролика контрольной и у одного из 4-й групп. Из печени эшерихии изолированы от 3 и 2 крольчат контрольной и 3-й групп соответственно.

Таблица 4. ***Соотношение в тушках кроликов мышц, костей, жира и химический состав мяса задних окорочков при скармливании E. coli B 214/99***

Показатель	*Группа животных*			
	1	2	3	4
После 3-месячного скармливания препарата				
Масса, г:				
тушки	1175±85	1015±27	1000±24	1000±37
	100	100	100	100
мышц	945±75	800±12	810±11	780±29
	80,4	78,9	81	78
костей	180±9,7	170±14,5	150±5,0	155±2,4
	15,35	16,7	15,0	15,5
жира	50	45±1,1	40±1,1	65±1,2
	4,25	4,4	4,0	6,5
Химический состав мяса, %				
влага	77,7±0,24	75,3±0,02	73,1±0,02	74,5±0,02
сухое вещество	22,3±0,24	24,7±0,02[г]	26,9±0,02[г]	25,5±0,02[г]
азот	14,12±0,0	14,54±0,07[б]	14,80±0,12[в]	14,37±0,0
жир	4,36±0,82	4,30±0,24	4.05±0,31	5,15±0,24

зола	6,09±0,80	6,50±0,46	6,70±0,53	7,10±0,65
После 6-месячного скармливания препарата				
Масса, г:				
тушки	1650±64,4	1850±16,1[а]	1575±8,05	1550±48,3
	100	100	100	100
мышц	1235±53,1	1390±16,1[а]	1025±8,0[б]	1000±8,05[б]
	74,8	75,1	65,1	64,6
костей	215±11,28	260±1,60[а]	180±1,6[а]	180±00[а]
	13,0	14,0	11,5	11,6
жира	200±3,2	200±00	370±19,3[г]	370±19,1[г]
	12,2	10,9	23,4	23,8
Выход тушки % к живой массе	54,6±0,64	54,4±0,64	55,2±1,2	55,8±0,4
Химический состав мяса, %				
влага	72,8±0,3	72,8±0,21	72,7±0,14	72,6±0,2
сухое вещество	27,2±0,3	27,2±0,21	27,3±0,14	27,4±0,2
белок	86,0±0,04	87,4±0,07[г]	87,4±0,02[г]	85,5±0,74
жир	6,6±0,24	6,1±0,14	6,9±0,37	8,3±0,62[а]
зола	6,6±0,6	6,5±0,14	6,0±0,6	6,0±0,48

Примечание. Числитель - масса, г; знаменатель - процент от массы тушки

После 6-месячного скармливания препарата в крови из сердца, почках и мышцах у кроликов всех групп кишечная палочка не найдена. В лимфоузлах кишечника она выявлена у 2 кроликов 4-й группы, а в печени у 2 кроликов 3-й. Во 2-й группе E. coli не была выделена ни из одного органа.

Таким образом, диссеминация штамма E. coli B 214/99 ограничивалась компетентными органами (лимфоузлами и печенью) и обсеменения мяса бактериями не происходило, т.е. оно отвечало требованиям, предъявляемым к свежему доброкачественному мясу.

Патологоанатомические исследования. При послеубойном осмотре тушек и внутренних органов животных контрольной группы в сердце, легких, лимфоузлах, почках и селезенке патологические изменения не обнаружены. В печени у всех крольчат наблюдались поверхностные, единичные, мелкие (1-3 мм в диаметре) узелки с белой сметанообразной массой, что было расценено нами как переболевание печеночной формой кокцидиоза. У крольчат 2-й группы, получавших препарат в течение 3 месяцев, паренхиматозные органы без видимых патологических изменений. Печень была значительно ($P<0,02$) увеличена, но кокцидиозные узелки в ней выявлены только у одного животного. Наблюдалась также тенденция к повышению массы лимфоидных органов (селезенка и тимус), тогда как таковая надпочечников снижалась (табл. 5). Аналогичные изменения в массе

органов и эндокринных желез выявлены в 3-й и 4-й группах, но в последней группе различия были недостоверными и в печени отсутствовали кокцидиозные узелки. После 6-месячного скармливания препарата в сердце, легких, печени, почках и селезенке видимых патологических изменений не обнаружено. Достоверных различий в массе этих органов, по сравнению с контролем, также не выявлено, но некоторые отклонения отмечались в тимусе. Его масса у кроликов 3-й и 4-й групп достоверно($P<0,02$) уменьшилась (табл. 5).

Таблица 5. ***Масса внутренних органов у кроликов, получавших культуру E. coli B 214/99, г***

Орган	Группа животных			
	1	2	3	4
После 3-месячного скармливания препарата				
Сердце	6,12±0,8	5,56±0,44	6,97±1,2	6,39±1,2
Легкие	10,8±0,72	12,9±0,24	12,1±0,92	11,0±1,4
Печень	54,8±0,72	79,6±6,07[б]	71,6±2,9[в]	59,2±4,8
Почки	10,8±0,85	13,9±1,0	13,7±1,2	12,0±0,5
Надпочечники	0,81±0,09	0,53±0,04[а]	0,58±0,02[а]	0,62±0,04
Селезенка	0,94±0,09	1,13±0,14	2,71±0,51[а]	1,30±0,34
Тимус	5,53±0,53	6,85±0,26	7,49±1,20	7,25±0,99
После 6-месячного скармливания препарата				
Сердце	7,45±1,19	6,38±0,68	6,36±0,43	6,59±0,89
Легкие	12,23±1,57	14,90±2,45	11,89±0,92	11,70±1,62
Печень	74,4±10,5	90,9±10,5	70,9±11,6	76,4±6,7
Почки	15,1±1,79	14,9±1,28	12,3±0,65	13,7±1,19
Надпочечники	0,85±0,14	0,83±0,07	0,76±0,21	0,8±0,14
Селезенка	1,09±0,26	1,5±0,24	0,88±0,04	1,23±0,41
Тимус	8,30±0,60	9,03±0,17	5,79±0,33[б]	5,76±0,36[б]

Таким образом, установлено, что в испытанных дозировках штамм EcB 214/99 видимых патологических изменений в органах и тканях кроликов не вызывает.

Морфологические исследования органов и тканей.

Тимус. Клеточный состав тимуса подопытных кроликов отличался от контроля. Наибольшие изменения касались клеток лимфоидного ряда. Содержание малых лимфоцитов было достоверно увеличено на протяжении всего срока наблюдений в коре и мозговом веществе. Доля средних лимфоцитов менялась незначительно, число лимфобластов увеличивалось у кроликов 2-й и 3-й групп.

Мозговое вещество является местом выхода Т-лимфоцитов из органа через венулы в кровоток. Здесь обильно представлены эпителиоретикулярные клетки (5-20%). Количество лимфоидных клеток ниже, чем в корковом веществе, в основном это малые лимфоциты. Эпителиальные клетки этого слоя формируют тимические тельца (рис. 1). Использованный в опытах микробный препарат оказал существенное влияние на функционирование у кроликов иммунной системы. Так, в тимусе отмечены изменения клеточного состава как

коркового, так и мозгового вещества. При использовании микроциногенного штамма E.coli B214/99 в течение 3 и 6 месяцев наблюдалось увеличение числа лимфоцитов, лимфобластов, эпителиоретикулоцитов и митотически делящихся клеток.

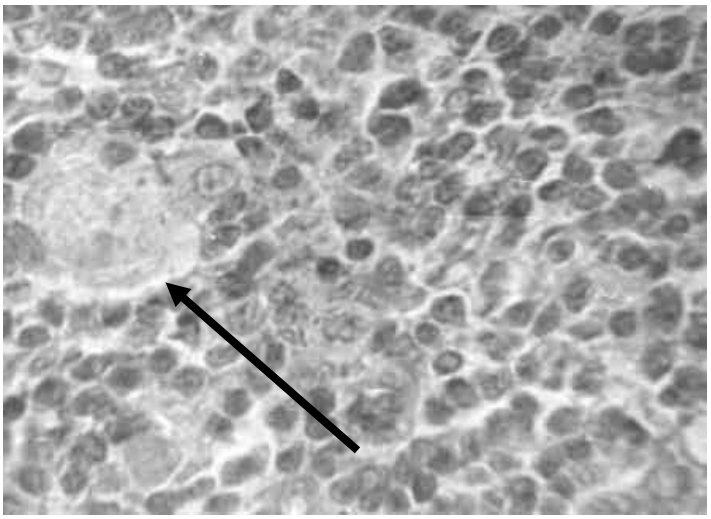


Рис. 1. Тельца Гассаля в тимусе кролика 2-й группы. Окраска по Акимченкову. х *400.*

Доля коркового и мозгового вещества в тимусе кроликов 2-й и 3-й групп была увеличена (табл. 6), тогда как у животных 4-й группы эти показатели были ниже, чем в контроле.

Таблица 6. ***Морфометрические показатели развития тимуса кроликов***

Группа	***Размер зон тимуса, мкм***	
	корковая	мозговая
После 3-месячного скармливания препарата		
1	147,6 ± 4,4	55,0 ± 4,2
2	150,0 ± 6,1	80,0 ± 3,8[a]
3	160,0 ± 7,8[a]	100,4 ± 5,3[a]
4	112,0 ± 4,8	45,2 ± 2,4
После 6-месячного скармливания препарата		
1	130,1 ± 3,2	79,2 ± 2,8
2	150,0 ± 7,1[a]	80,4 ± 3,2[a]
3	160,0 ± 4,5[a]	100,0 ± 8,1[a]
4	112,0 ± 2,8	75,0 ± 2,9

Селезенка. Доля лимфоидной ткани селезенки менялась в связи с возрастом и от воздействия разных доз препарата (табл. 7). Так,

она достоверно увеличилась у животных 2-й и 3-й групп: с 24,5±2,1 в контроле до 48,0±3,4 во 2-й и 45,0±2,8 у 3-й группы.

Таблица 7. ***Относительное содержание (%) структурных компонентов селезенки (по гистологическим срезам) у кроликов***

Группа	Структура селезенки		
	белая пульпа	красная пульпа	строма
После 3-месячного скармливания препарата			
1	24,5 ± 2,1	65,0 ± 4,8	10,5 ± 1,1
2	48,0 ± 3,4[a]	40,0 ± 2,7[a]	12,0 ± 1,1
3	45,0 ± 2,8[a]	45,0 ± 3,1[a]	10,0 ± 0,9
4	20,0 ± 2,4	70,0 ± 4,8	10,0 ± 1,2
После 6-месячного скармливания препарата			
1	21,7 ± 2,4	70,0 ± 6,4	9,0 ± 0,5
2	40,0 ± 3,4[a]	50,0 ± 3,5	10,0 ± 0,4
3	45,0 ± 4,1[a]	43,0 ± 4,3[a]	12,0 ± 0,9
4	20,0 ± 2,5	70,0 ± 5,4	10,0 ± 0,7

Клеточный состав белой пульпы весьма разнообразен. Это большие лимфоциты, В и Т-клетки, плазмоциты и макрофаги. Непосредственно вокруг артерий располагаются малые лимфоциты, плотно прилегающие друг к другу, ретикулярные клетки, плазмоциты. В отдельных местах малые лимфоциты, прилегая друг к другу, образуют цепочки из 3-7 клеток, располагающиеся в радиальном направлении по отношению к артериям (рис. 2). Следует отметить, что у подопытных животных число и длина этих цепочек значительно выше, чем у контрольных. По данным Сапина и Самойлова (1988) такая кооперация клеток лимфоидного ряда усиливает иммунный ответ органа на воздействие антигена.

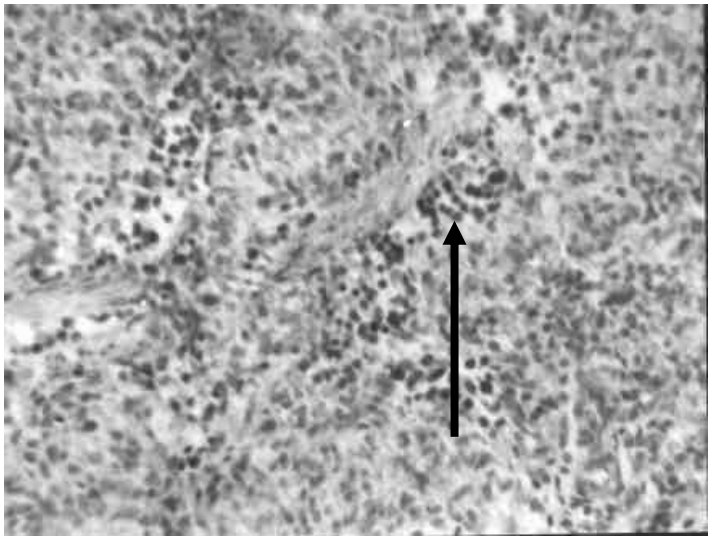


Рис. 2. Цепочки лимфоцитов, располагающиеся радиально по отношению к артерии в селезенке кролика 3-й группы. Окраска азур-эозином. х *160.*

При использовании микроциногенного штамма E. coli B 214/99 в течение 3- и 6-месяцев в *брыжеечных лимфоузлах* выявлен комплекс морфологических изменений, свидетельствующих об усилении их иммунопоэтической функции. Так, у животных 2-й, 3-й и 4-й групп наблюдалось увеличение площади мозгового вещества и расширение мякотных тяжей, которые раздвигают корковое вещество и узкими участками проникают в периферические отделы узла вплоть до капсулы. Клеточный состав мякотных тяжей у подопытных животных изменяется и в них достоверно возрастает число больших лимфоцитов, макрофагов и плазмоцитов (табл. 8). Существует мнение, что возрастание содержания бластных форм и делящихся лимфоцитов свидетельствует о стимуляции иммунитета (Кассина,1976).

Состав *лимфоидных узелков в слепой кишке* кроликов представлен клетками лимфоидного ряда различной степени зрелости. Различают ретикулярные клетки, большие и малые лимфоциты, макрофаги, плазмоциты. В цитоплазме ретикулярных клеток часто выявляются гетерогенные включения в виде фрагментов микробных тел, а также полисахаридные комплексы (рис. 3).

Таблица 8. ***Клеточный состав и его процентные соотношения в брыжеечных лимфатических узлах кроликов***

Клетки	Группа животных и вещество лимфоузла							
	1		2		3		4	
	корковое	мозговое	корковое	мозговое	корковое	мозговое	корковое	мозговое
После 3-месячного скармливания препарата								
Ретикулярные	4±0,2	2±0,1	4±1,2	2±0,2	5±1,2	4±0,8	3±0,4	3±0,1
Большие лимфоциты	2±0,1	4±0,3	2±0,1	11±0,9[a]	3±0,4	10±0,9[a]	2±0,9	6±0,9
Малые лимфоциты	89±2,5	84±3,8	86±2,9	68±3,5	84±4,2	67±3,5[a]	87±5,4	75±8,1
Макрофаги	4±0,2	5±1,2	7±2,1	10±1,2[a]	5±0,8	10±0,8[a]	5±0,2	9±0,8[a]
Плазмоциты	1±0,1	5±1,4	1±0,2	9±0,9[a]	3±1,2	9±0,5[a]	3±0,9	7±0,6[a]
После 6-месячного скармливания препарата								
Ретикулярные	3±0,1	2±0,1	4±0,9	4±1,2	4±0,8	4±0,7	4±0,6	4±1,2
Большие лимфоциты	1±0,09	4±0,9	2±0,08	6±0,9	2±0,1	8±0,9[a]	2±0,5	6±1,2
Малые лимфоциты	93±7,1	86±7,9	84±7,1	70±6,5	86±7,1	72±4,6	85±5,4	76±5,3
Макрофаги	2±0,9	3±0,5	8±0,7[a]	12±4,8[a]	6±0,7[a]	6±0,9[a]	7±0,9[a]	8±1,4[a]
Плазмоциты	1±0,05	5±0,7	2±0,1	8±1,2	2±0,09	10±1,2[a]	2±0,7	6±1,2

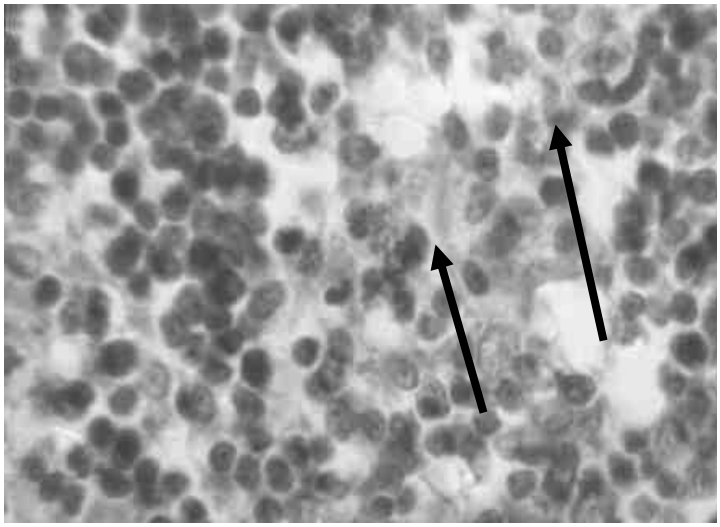


Рис. 3. Ретикулярные клетки лимфоидных узелков аппендикса кролика 2-й группы содержат в цитоплазме фрагменты микробных тел и полисахаридные комплексы. Окраска по Лилли. х *400.*

Анализ клеточного состава *лимфоидных узелков аппендикса* у кроликов показал, что основную массу клеток составляют малые лимфоциты, однако число их снижается при введении в рацион культуры кишечной палочки. При этом достоверно увеличивается количество ретикулярных клеток, больших лимфоцитов, макрофагов и плазмобластов (табл. 9), что свидетельствует об активизации иммунопоэза в аппендиксе подопытных кроликов. Клеточные элементы в лимфоидных узелках расположены группами по 3-5 клеток, либо в виде скоплений, в которых к макрофагу плотно прилегают 2-3малых лимфоцита. Кроме того, у животных 2-й и 3-й групп увеличено количество своеобразных цепочек, состоящих из 5-8 малых лимфоцитов, которые расположены по всему лимфоидному узелку (рис. 4). Было показано, что большинство лимфоцитов аппендикса имеют иммуноглобулины и принадлежат к В-клеткам. Таких лимфоцитов в лимфоидной ткани аппендикса кролика до 70%, они участвуют в формировании В-зон органов иммунной системы и осуществляют иммунные реакции (Уланова, 1988).

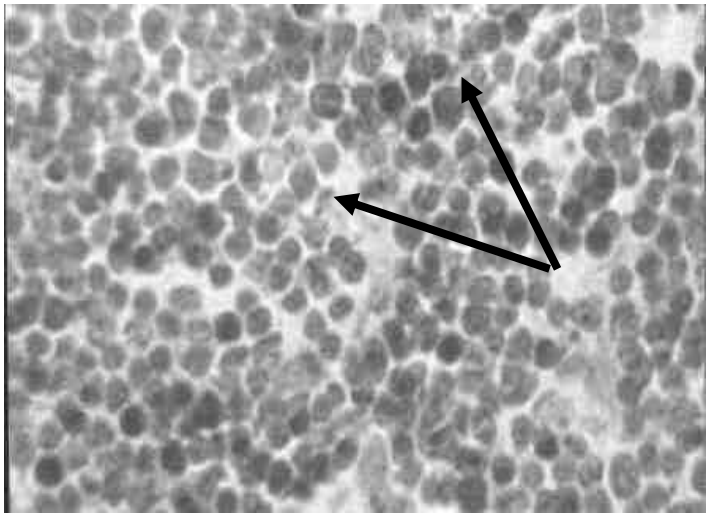


Рис. 4. Образование большого числа цепочек лимфоцитов в лимфоидном узелке аппендикса. Окраска по Акимченкову. х *400.*

Таблица 9. ***Клеточный состав лимфоидных узелков слепой кишки кроликов***

Клетки	***Группа животных и соотношение клеток, %***			
	1	2	3	4
После 3-месячного скармливания препарата				
Ретикулярные	16,7 ± 0,1	23,3 ± 1,4[a]	20,9 ± 1,3	15,6 ±1,6
Большие лимфоциты	2,8 ±0,3	4,7 ± 1,2	6,3 ± 1,4[a]	1,9 ± 0,2
Малые лимфоциты	73,2 ± 4,2	60,3 ± 3,5	58,9 ± 1,8	71,9 ± 4,4
Макрофаги	4,6 ± 1,2	6,9 ± 1,0[a]	8,6 ± 0,9[a]	3,5 ± 0,9
Плазмоциты	2,7 ± 0,2	4,8 ±0,9[a]	6,2 ± 1,3[a]	3,5 ± 0,9
После 6-месячного скармливания препарата				
Ретикулярные	25,8 ± 1,3	30,4 ± 2,4	32,4 ± 2,7[a]	34,4 ± 1,8[a]
Большие лимфоциты	3,0 ± 0,9	10,5 ± 1,2[a]	12,0 ± 1,8[a]	10,8 ± 1,3
Малые лимфоциты	56,3 ± 3,7	43,7 ± 2,9	37,2 ± 1,7	38,3 ± 2,4
Макрофаги	5,4 ± 0,7	9,4 ± 1,2	10,0 ± 0,9[a]	10,3 ± 1,2[a]
Плазмоциты	4,5 ± 1,2	6,0 ± 0,9	8,4 ± 0,9[a]	6,2 ±1,3

В качестве доказательства иммунной активности лимфоидной ткани аппендикса Mac Donald, Spenser (1990) приводят факт повышения розеткообразующих свойств лимфоцитов органа в ответ на введение кроликам антигенов в просвет кишечника. Введенный антиген разрушался в центрах размножения и в куполе лимфоидных узелков находящимися там макрофагами. В тоже время иммунизация кроликов ведет к увеличению в лимфоидной ткани аппендикса числа молодых и дифференцированных В-лимфоцитов. Аналогичные

изменения в аппендиксе кроликов были отмечены в наших исследованиях при использовании микроциногенного штамма E. coli B214/99 в течение 3 и 6 месяцев.

Характерной особенностью *печени* кроликов 2-й и 3-й групп является наличие большого числа гипертрофированных гепатоцитов с полиплоидными ядрами. Цитоплазма клеток богата органеллами, хорошо выражена гранулярная и агранулярная эндоплазматическая сеть, что указывает на интенсивный синтез белка. Большинство гепатоцитов содержали по 2 или 3 ядра с хорошо развитыми ядрышками, которые имели нуклеолонемный характер, свойственный для незрелых (бластных) форм клеток. У кроликов 4-ой группы наблюдалась вакуольная дистрофия гепатоцитов, что, видимо, обусловлено высокой дозой препарата.

Анализ роста мышечной ткани показал, что использованный препарат не оказывает влияния на рост длиннейшей мышцы спины.

Подкожная жировая ткань у кроликов состоит из адипоцитов разного размера и соединительной ткани, в которой проходят многочисленные кровеносные сосуды и нервы. Рост жировых депо идет неравномерно, вначале увеличивается число мелких клеток, которые затем заполняются триглицеридами и увеличиваются в диаметре. У подопытных животных диаметр адипоцитов был существенно выше, чем в контрольной группе, что согласуется с данными о повышенном депонировании жира у кроликов, получавших микробный препарат в высоких дозах.

Заключение

Изучение хронической токсичности микроциногенного штамма E.coli B 214/99 для кроликов показало, что его ежедневное применение в течение 6 месяцев в дозах от 1,5-3,0х108 до 1,5-3,0х1010к.о.е./гол/сут не сопровождалось какими-либо неблагоприятными отклонениями в функционировании у кроликов органов и систем. Основные параметры крови животных не выходили за пределы физиологической нормы, но при полугодовом применении10- и 100-кратно повышенных доз препарата наблюдалось уменьшение концентрации гемоглобина, количества лейкоцитов и эритроцитов, тогда как фагоцитарная, бактерицидная и лизоцимная активности сыворотки крови возрастали. При этом прирост живой массы у кроликов, получавших препарат в дозах 1,5-3,0х108, 1,5-3,0х109 и 1,5-3,0х1010 к.о.е./гол/сут, превосходил контроль на 9,4; 9,4 и 16,1% соответственно, но в тушках животных, которым давали 10- и 100-кратно

повышенные дозы препарата, уменьшалась масса мышечной ткани и костей, тогда как отложение жира увеличивалось, и он составлял 23,4-23,8% от массы тушки ($P<0,001$). В испытанных дозировках микроциногенный штамм E.coli B 214/99 в крови из сердца,

почках и мышечной ткани не обнаруживался и не вызывал видимых патологоанатомических изменений в органах и тканях.

Морфолого-гистологические исследования показали, что применение препарата в дозах 1,5-3,0x10^8 и 1,5-3,0x10^9к.о.е./гол/сут не оказывает отрицательного влияния на паранхиматозные органы и иммунную систему, усиливает интенсивность пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов в лимфоидных органах, увеличивает число межклеточных кооперации макрофагов с лимфоцитами и плазматическими клетками. Под влиянием пробиотика активизируются почти все клетки иммунной системы. При использовании препарата в дозе 1,5-3,0 x 10^{10}к.о.е./гол/сут (100-кратно увеличенная) наблюдалось уменьшение количества и величины центров размножения в лимфоидных узелках кишечника, брыжеечных лимфоузлах и в селезенке. В паренхиматозных органах отмечено нарушение микроциркуляции.

Таким образом, установлено, что ежедневное 6-месячное скармливание микроциногенного штамма E.coli B 214/99 в дозах 1,5-3,0x10^8-10^9 к.о.е./гол/сут – безвредно для кроликов. Увеличение дозы до 1,5-3,0x10^{10} к.о.е./гол/сут приводит к нарушению иммунных процессов в организме кроликов, что может снижать их устойчивость к заболеваниям.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Калужской области (проект №01-04-96027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения. Кн.: Ветеринарные препараты. Справочник, М.: Агропромиздат.1988: 230-239.
2. Стратегия оценки безопасности пищевых продуктов, получаемых с помощью биотехнологии. Доклад организации здравоохранения (ВОЗ) Женева, 1994 г.
3. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Мн.: Ураджай. 1986: 108-111.
4. Блинов Н.И. Микрометод определения фагоцитарной активности клеток крови. В кн.: Фагоцитоз и иммунитет. М.1983.
5. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. и др. Клиническая и лабораторная диагностика в ветеринарии. М.: Агропромиздат.1985: 57-68; 159-177.
6. Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонефелометрии. ЖМЭИ. 1966.4: 8-11.

7. Емельяненко П.А. Методические указания по тестированию естественной резистентности телят. М.:1980: 29.
8. Ветеринарная лабораторная практика. М.: Изд-во «Сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов» 1963. 1: 529.
9. Сапин М.Р., Самойлов М.В. Лимфоидные образования селезенки у людей разного возраста. Арх. анат., 1988. 94. 2: 35-40.
10. Кассина Т.Ф. Начальный этап клеточных реакций в стенке тонкого кишечника и брыжеечных лимфоузлах у мышей на энтеральное введение коклюшной вакцины. Труды Перм. мед. ин-та. 1976. 139: 63-70.
11. Уланова М.А. Система местного иммунитета пищеварительного тракта и ее особенности в детском возрасте. Успехи совр. биол., 1988. 2: 202-216.
12. Mac Donald T.S., Spenser J. Ontogeny of the mucosal immune response. Springer-Semin. Immunopathol. 1990. 12. 2-3: 129-137.

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ МИКРОЦИНОГЕННОГО ШТАММА ESCHERICHIA COLI B 214/99 ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

В серии опытов изучена безвредность микроциногенного штамма Escherichia coli B 214/99(EcB 214/99) для мышей и кроликов. Установлено, что его средняя вирулентная доза (LD_{50}) при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении для мышей составляет $1x10^{10}$к.о.е./голову, тогда как при пероральном вливании в желудок кроликам культуры в дозе $1x10^{11}$к.о.е./голову их отхода не наблюдается. Показано, что штамм E. coli B 214/99 проявляет слабое общетоксическое влияние, не обладает токсигенностью, аллергенностью, местным токсическим действием и не раздражает конъюнктиву глаза, но способен к транслокации через тканевые барьеры организма мышей и диссеминации во внутренние органы (печень, почки, легкие), в которых может персистировать в течение 30 сут. По совокупности выявленных свойств штамм E. coli B 214/99 отнесен к третьему классу опасности, т.е. является умеренноопасным для животных.

Введение

С целью обеспечения нормального здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных в последние годы все большее внимание уделяется контролю за микрофлорой, населяющей

пищеварительный тракт, а также подавлению в нем жизнедеятельности патогенных и условно-патогенных бактерий. Для этого, как правило, используют пробиотики, оказывающие ингибирующее действие на потенциальных кишечных патогенов путем продукции антибиотических веществ и в частности микроцинов – низкомолекулярных антибиотиков широкого спектра действия.

В последние годы в лаборатории биотехнологии микроорганизмов были выделены микроциногенные штаммы эшерихий, испытание которых на антагонизм показало, что они подавляют 69-100% эшерихий и 42,6-80% сальмонелл дикого типа, обитающих в кишечнике крупного рогатого скота, свиней, цыплят и кошек. Из этих данных следует, что выделенные штаммы являются перспективными для создания новых высокоэффективных пробиотиков и поэтому они в соответствии с ветеринарно-санитарными требованиями (Инструкция…, 1988; Доклад ВОЗ, 1994) должны пройти тщательную проверку на безвредность.

Задачей исследований было изучить безвредность микроциногенного штамма Escherichia coli B 214/99 для лабораторных животных.

Материал и методы

Исследования проведены на белых мышах и кроликах. При изучении патогенности, определении средней смертельной дозы, токсичности и токсигенности штамма E.coli B 214/99 (EcB 214/99), а также его способности к диссеминации во внутренние органы, эксперименты проводили на белых мышах обоего пола. Группы формировали из животных со стандартной живой массой тела 18-20г.

Мышей содержали в виварии в стандартных клетках, получали они полноценный рацион, состоящий из специального комбикорма ПК-121-1 (для лабораторных мышей и крыс) и пшеничной каши, приготовляемой в лаборатории, по 10 и 6 г на голову в сутки, соответственно. Гранулированный комбикорм был сбалансирован по аминокислотам, минералам и витаминам. В 100 г его содержалось (%): сырого протеина-19,3, обменной энергии-291 ккал, сырой клетчатки-4,1, сырого жира-4,2, кальция-1,2 и фосфора-0,79.

Испытания безвредности проводили с использованием методических подходов и методик, рекомендуемых для этих целей в соответствующих руководствах (Предтеченский и др., 1950; Орлов, 1963) и методических указаниях (Методические указания… , 1983,1988).

Определение среднесмертельной дозы (LD_{50}). Из белых мышей было сформировано 14 групп по 6 особей в каждой группе. Изучаемый

микроорганизм вводили 6 группам мышей внутрибрюшинно в дозах 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 и 10^{10} колониеобразующих единиц (к.о.е.), а следующим 6 группам – внутрижелудочно в тех же дозах. Двум контрольным группам мышей вместо препаратов вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия в дозе 1 мл – одним внутрибрюшинно, а другим внутрижелудочно. За выживаемостью и общим состоянием опытных мышей наблюдали в течение 30 сут. Среднесмертельной считали дозу, которая вызывала гибель 50% подопытных животных.

Взвесь микроорганизмов для введения готовили путем смыва физраствором колоний 18-24-часовых культур, выращенных на агаровой среде, и определяли количество к.о.е. в суспензии.

Изучение токсичности. Токсичность изучаемых микроорганизмов оценивали на мышах обоего пола, которым внутрибрюшинно вводили бактериальную культуру в дозах 10^9 и 10^{10} к.о.е./животное, предварительно убитую путем прогревания при 70^0С в течение 30 мин. Мышам контрольной группы вводили внутрибрюшинно стерильный раствор 0,9%-ного хлорида натрия. Наблюдения за животными вели в течение 15 сут, отмечая общее состояние, внешний вид, поведение и выживаемость.

Изучение токсигенных свойств. Подопытным мышам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл центрифугата 4- и 8-суточных культур, поскольку известно, что максимальной токсичностью обладают фильтраты 4-7-суточных культур микроорганизмов. Контрольным животным вводили такой же объем стерильной питательной среды, на которой выращивали данный вид бактерий. Наблюдения за опытными и контрольными мышами вели в течение 5 сут.

Изучение способности к диссеминации во внутренние органы. Было сформировано три группы мышей по 6 голов в каждой. Животным 1-й и 2-й групп в желудок и внутрибрюшинно вводили бактериальные культуры в дозе 10^{10} к.о.е./животное, а 3-й группе аналогично стерильный физраствор в таком же объеме – 0,5 мл. Способность изучаемых микроорганизмов диссеминировать во внутренние органы животных оценивали по результатам микробиологических исследований крови и гомогенатов печени, почек и легких через 3 и 30 сут после введения мышам бактериальных культур.

В соответствии с инструкцией по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве (Методические указания… , 1988), острую токсичность изучают не менее чем на двух видах животных (мыши и кролики). Второй этап исследований токсичности штамма E. coli B 214/99 выполнен на кроликах в виварии института. Животные были размещены в сетчатых

клетках по одной голове и получали рацион, состоящий из 200 г злакового сена и 200 г зерносмеси или комбикорма.

Острая токсичность определялась после однократного скармливания препарата E.coli B 214/99 вместе с кормом и путем введения его в желудок при помощи зонда. При скармливании испытаны дозы 5, 25 и 50 мл при содержании в 1 мл 1,5-3,0х109 к.о.е. на 1 кролика. Для каждой дозы было использовано по 4 кролика. В желудок культуру задавали в дозах 40 и 60 мл. Она вводилась через зонд по 20 мл два и три раза в день. Контрольные животные получали питательную среду без микроорганизмов в тех же дозах. После скармливания и внутрижелудочного введения препарата наблюдения за кроликами велись в течение 3 недель. При этом учитывались следующие показатели: внешний вид и поведение животных, состояние шерстного покрова и видимых слизистых оболочек, подвижность животного, частота дыхания и отношение к корму.

Местное токсическое действие штамма E.coli B 214/99 определяли путем нанесения культуры на кожу. При постановке кожной пробы шерсть на боку выстригали на площади 6х9 см и двукратно с интервалом в 24 ч втирали в кожу живую культуру микроорганизмов, а контрольным животным – питательную среду. Учет реакции проводили ежедневно в течение 4 сут. До и после нанесения препарата измеряли толщину кожной складки.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза и оценка аллергенности. Для внесения культуры микроорганизмов в конъюнктивальный мешок кролику оттягивали верхнее веко и закапывали из пипетки 1-2 капли культуральной жидкости (без твердых частиц), а контрольным кроликам идентично вводили стерильную питательную среду. В каждой группе было по 6 кроликов. Учет реакции проводили ежедневно в течение 6 сут.

Для изучения аллергенных свойств E. coli B 214/99 в опыт были взяты те же животные, на которых испытывалось местное токсическое действие на кожу (по 6 кроликов из контрольной и опытной групп). Кроликам на один и тот же выстриженный участок кожи наносили путем втирания на протяжении 8 сут живую микробную культуру, а кроликам контрольной группы – стерильную питательную среду. Через 14 сут после последней аппликации препарата на кожу свежевыстриженного участка спины этим же животным вновь втирали препарат и питательную среду в той же концентрации. Учет реакции проводили через 24 ч.

Результаты и обсуждение

Поскольку известно, что бактерии рода кишечной палочки образуют термолабильные и термостабильные эндо- и экзотоксины (Емельяненко, 2000), опыты по острой токсичности проводили в два этапа. На предварительном этапе между дозами вводимого микроорганизма брали широкие интервалы, а на втором этапе дозу повышали или понижали в зависимости от того, погибали мыши или оставались живыми. Для окончательной оценки дозы брали так, чтобы низшая проба не вызывала гибели животных, а высшая вызывала 100%-ную гибель.

В результате исследований установили, что 100%-ную гибель мышей вызывает внутрибрюшинное введение 1 мл живой культуры штамма EcB 214/99 с титром $2{,}2x10^{10}$ к.о.е. Гибель животных наступала уже через 20 ч. Внутрибрюшинное введение $1{,}1x10^{9}$ к.о.е. приводило к смерти 16% мышей, а $1{,}1x10^{10}$ к.о.е. – 50%. Дозы 10^{5} и 10^{6} не изменяли общего состояния мышей, а введение бактерий с титром 10^{7} и 10^{8} к.о.е./мл уже через 2 ч вызывало угнетенное состояние, расстройство функций пищеварительного тракта и понос (табл. 1). При внутрижелудочном введении штамма E.coli B 214/99 в дозе 10^{10} к.о.е./гол 50%-ная гибель мышей наступала через 24 ч, а дозы 10^{8} и 10^{9} к.о.е./гол вызывали состояние угнетения, вялость, малоподвижность и диарею.

При вскрытии мышей, павших после введения культуры EcB 214/99, не было обнаружено повреждений органов брюшной полости. Инфильтратов, крови, гематом в брюшной полости не наблюдалось. Кишечник слегка вздут, слизистая рыхлая, отечная, но геморагии отсутствовали. Почки кровенаполнены, граница между корковым и мозговым слоем стерта. Печень глинистого цвета без кровоизлияний. Селезенка – вишневая, края закруглены, увеличена.

При высевах на среду Эндо из органов павших мышей уже через 20 ч наблюдался обильный рост бактерий группы кишечной палочки.

Таким образом, в условиях данного эксперимента, среднесмертельная доза штамма E. coli B 214/99 при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении составляет $1{,}0x10^{10}$ к.о.е./животное.

В опытах на кроликах при введении в желудок высоких доз E. coli B 214/99 – 10^{11} к.о.е./голову гибели животных не наступало, хотя общее состояние их было угнетенным, аппетит отсутствовал и в течение 3-х сут у животных наблюдался сильный понос.

Для определения токсичности штамма EcB 214/99 мышам вводили внутрибрюшинно высокие дозы убитой прогреванием

культуры с титром 10^9 и 10^{10} к.о.е./мл. При этом падежа животных не наступало, но в течение 24 ч после введения у них наблюдалось угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова и вялость. При изучении токсигенных свойств за 15 дней наблюдений не отмечалось изменений в поведении и общем состоянии как подопытных, так и контрольных животных, а также их гибели (табл. 1).

При воздействии живой культуры E. coli B 214/99 на слизистые оболочки глаза кроликов каких-либо изменений со стороны конъюнктивы, роговицы и зрачка не обнаружено. Не было гиперемии слизистой, отечности или гнойных истечений из глаза. Отсутствовало и

Таблица 1. ***Влияние штамма E. coli B 214/99 на лабораторных животных***

Вид животных	Путь введения микроорганизма	Контрольная группа	Испытуемые дозы к.о.е./голову					
			10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
Определение среднесмертельной дозы								
Мыши	внутрибрюшинно	0/6	0/6	0/6	x6/6	x6/6	xx1/6	xx6/6(100%)
Мыши	внутрижелудочно	0/6	0/6	0/6	0/6	x6/6	x6/6	xx3/6(50%)
Кролики	внутрижелудочно	0/3	-	-	-	-	0/3	0/3
Определение токсичности и токсигенности								
Мыши	внутрибрюшинно	0/6	-	-	-	-	x6/6	x6/6
Мыши	внутрибрюшинно 4-х суточная	0/4	-	-	-	-	0/4	0/4
Мыши	внутрибрюшинно	0/4	-	-	-	-	0/4	0/4

	8-ми суточная					
		Местное токсическое и аллергенное действие				
Кролики	в конъюнктивальный мешок	0/6	-	-	-	0/6
Кролики	втирание в кожу	0/6	-	-	-	0/6
Кролики	аллергенность	0/6	-	-	-	0/6

Примечание. Числитель: х – число животных, давших реакцию; хх – число погибших животных; знаменатель – количество животных в группе.

местное токсическое действие изучаемого штамма при нанесении его на кожу кроликам. Не было утолщения кожной складки после втирания культуры; болезненности или повышения температуры на месте нанесения бактерий также не наблюдалось. Исследования показали, что штамм EcB 214/99 не обладает аллергенными свойствами: на месте нанесения культуры аллергической реакции в виде инфильтрации, изъявления или некроза тканей не обнаружено.

Способность штамма диссеминировать во внутренние органы лабораторных животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении культуры оценивали по результатам микробиологических исследований посевов из крови сердца, печени, почек и легких на среду Эндо через 3 и 30 сут после введения микробного препарата. Оказалось, что через 3 сут после внутрибрюшинной инъекции штамма или его внутрижелудочного введения в высевах из органов, а также крови из сердца мышей наблюдался рост колоний кишечной палочки (табл. 2). У контрольных животных, которым вводили физиологический раствор, кровь и внутренние органы оставались стерильными.

Таблица 2. ***Диссеминация клеток штамма EcB 214/99 во внутренние органы мышей***

Орган	Сутки после введения культуры	Путь введения культуры и группа животных			
		внутрибрюшинно		внутрижелудочно	
		контрольная	опытная	контрольная	опытная
Кровь из сердца	3	0/3	^{x}3/3	0/3	^{x}2/3
	30	0/3	0/3	0/3	0/3
Печень	3	0/3	^{x}3/3	0/3	^{x}3/3
	30	0/3	^{x}1/3	0/3	0/3
Почки	3	0/3	^{x}3/3	0/3	^{x}2/3
	30	0/3	^{x}1/3	0/3	0/3
Легкое	3	0/3	^{x}3/3	0/3	^{x}3/3
	30	0/3	^{x}3/3	0/3	^{x}2/3

Примечание. Числитель: x – число животных с положительным результатом высева эшерихий; знаменатель – количество животных в группе.

Спустя 30 сут после введения культуры жизнеспособные бактерии из крови сердца не выделялись, но единичные колонии были получены в двух пробах при желудочном введении и у 3-х мышей (из печени, почек, легких) при внутрибрюшинном. Таким образом, эксперименты показали, что исследуемый штамм кишечной палочки способен к транслокации через тканевые барьеры организма мышей и может сохраняться в органах в течение 30 сут.

При убое мышей с целью определения диссеминации культуры E. coli B 214/99 во внутренние органы анализировали кровь от контрольных и опытных животных. Исследования показали (табл. 3), что основные параметры крови контрольных и опытных мышей

Таблица 3. ***Показатели крови мышей при введении штамма E.coli B 214/99***

Показатель	Группа животных и метод введения препарата					
	контрольная, физраствор внутрибрюшинно		опытная, внутрибрюшинно		опытная, внутрижелудочно	
	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут
Количество эритроцитов, млн/мкл	6,65±0,22	6,7±0,04	6,9±0,17	7,7±0,03[а]	5,9±0,02	6,6±0,03
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	5,0±0,04	5,7±0,10	5,0±0,05	6,4±0,08[а]	4,8±0,02	6,5±0,07[а]
Скорость оседания эритроцитов, мм/час	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,3
Гемоглобин, г/л	96±0,82	98±0,20	94±0,20	99±0,20	88±0,82[г]	90±0,20[г]
Лейкоцитарная формула, %						
Базофилы		1		1		-
Эозинофилы		2		2		2
Псевдоэозинофилы:						
палочкоядерные		3		4		4
сегментоядерные		34		36		28
Лимфоциты		58		56		64
Моноциты		2		1		2
Фагоцитарная активность, %	15,2±0,77	22±0,30	24,5±0,30[г]	25±0,20[в]	26±0,20[г]	25±0,41[в]
Фагоцитарный индекс	1,2±0,01	1,5±0,03	3,2±0,03[г]	3,0±0,01[г]	2,4±0,01[г]	3,0±0,06[г]

Примечание. Достоверность разницы показана в сравнении с контрольной группой. а – P<0,05; в – P<0,01; г – P<0,001.

находились в пределах физиологической нормы (Никитин, 1949). Количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови животных существенно не различались, но через 30 сут у мышей, которым культуру кишечной палочки вводили внутрибрюшинно и внутрижелудочно, достоверно возросло число лейкоцитов, и значительно повысилась фагоцитарная активность. Лейкоцитарная формула соответствовала лейкограмме здоровых животных. Эти данные свидетельствуют о том, что введение в организм лабораторных животных бактерий штамма E. coli B 214/99 вызывает повышение защитной реакции организма.

Заключение

Изучение острой токсичности микроциногенного штамма E. coli B 214/99 проведено на мышах и кроликах. Показано, что при внутрибрюшинном и пероральном введении мышам штамма EcB 214/99 LD_{50} равнялось $1{,}0x10^{10}$ к.о.е./голову. Стопроцентная гибель мышей наступала через 20 ч после внутрибрюшинной инъекции $2{,}2x10^{10}$ к.о.е./ голову испытуемого штамма. При введении в желудок кроликам штамма EcB 214/99 в дозе $1x10^{11}$ к.о.е./гол гибели животных не происходило, но они были угнетены, аппетит отсутствовал, и в течение 3 сут сильно поносили. Установлено, что высокие дозы (10^9-10^{10} к.о.е./гол) убитой нагреванием культуры EcB 214/99 при внутрибрюшинных инъекциях гибели мышей не вызывали, но в течение 24 ч после введения у них наблюдалось угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова и вялость. Токсигенность, аллергенность и местное токсическое действие у штамма EcB 214/99 не выявлены.

Эксперименты по определению транслокации и диссеминации штамма EcB 214/99 во внутренние органы мышей показали, что через 3 и 30 сут после внутрибрюшинной инъекции или внутрижелудочного введения испытуемого штамма кишечная палочка выделялась из печени, почек и легких, т.е. он способен к транслокации через тканевые барьеры организма мышей и может персистировать в органах в течение 30 сут.

Исходя из полученных данных и руководствуясь классификацией штаммов микроорганизмов по степени опасности (Методические указания…, 1988) изученный штамм E. coli B 214/99, обладающий средней вирулентной дозой $1x10^{10}$к.о.е./гол., а также имеющий высокий порог диссеминации во внутренние органы, по степени опасности относится к третьему классу, т.е. является умеренноопасным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и администрации Калужской области (проект № 01-04-96027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения В кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988, 6: 230-239.
2. *Стратегия оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии. Доклад Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Женева, 1994.*
3. Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. Руководство по лабораторным методам исследований. М., Медгиз, 1950.
4. Орлов Ф.М. Ветеринарная лабораторная практика. М., 1963, 1
5. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. В кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988, 6: 239-289.
6. Постановка исследований для обоснования предельно допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Методические указания. М., 1983: 16с.
7. Емельяненко П.А. Энтеротоксины кишечных бактерий. Ветеринария. 2000, 2: 25.
8. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных животных. М., 1949.

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS SP.* 8 РАЗ (pLF-SL2), НЕСУЩЕГО ГЕН РИЛИЗИНГ-ФАКТОРА СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА, НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ

З.Н. Макар, М.И. Сапунов, П.В. Матющенко, Р.И. Корнеева, И.А. Бояршинов, Б.В. Тараканов
Лаборатории физиологии и биохимии лактации,
биотехнологии микроорганизмов

В научно-хозяйственном опыте, проведенном на трех группах коров, установлено, что добавление в их рацион рекомбинантного штамма Lactobacillus sp. 8 РАЗ (pLF-SL2) с геном рилизинг-фактора соматотропного гормона стимулирует молокообразование и повышает конверсию корма в компоненты молока.

Введение

К настоящему времени имеется ряд исследований, в которых установлено, что инъекции соматотропного гормона (соматотропина) продуктивным жвачным животным оказывают выраженное стимули-

рующее влияние на их молочную продуктивность (Макар и др., 1992; Etherton and Bauman, 1998; Tucker, 2000). Однако стимуляция молокообразования с помощью инъекций соматотропина имеет и ряд недостатков – трудоемкость, дороговизна, риск загрязнения молока вторичными гормональными соединениями из-за высокой начальной концентрации экзогенного гормона в крови. В связи с этим представляется перспективным применение живых рекомбинантных штаммов бактерий, продуцирующих рилизинг-фактор гормона роста (соматолиберин), путем их перорального введения.

Ранее нами установлено, что скармливание козам рекомбинантного штамма Lactobacillus sp. 8РАЗ (pLF-SL2) с геном соматолиберина существенно тормозит снижение молочной продуктивности в ходе лактации и повышает конверсию корма в компоненты молока (Сапунов и др., 2002).

В данной работе ставилась цель выяснить возможность применения рекомбинантного штамма лактобацилл, экспрессирующих ген соматолиберина, для повышения молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Материал и методы

Опыт проведен в ОПХ «Ермолино» методом групп-периодов на трех группах коров по 8 голов в каждой, находящихся на 3-5-м месяце лактации. Животные были подобраны по принципу пар-аналогов по молочной продуктивности и сроку лактации. В ходе опыта все коровы получали рацион, содержащий сено, солому, патоку, подсолнечниковый шрот, глютен и комбикорм. Доля концентратов в рационе подопытных коров составляла в среднем 50% по питательности. В основном периоде эксперимента в течение 2-х месяцев первой группе животных ежедневно в составе комбикорма скармливали препарат рекомбинантного штамма *Lactobacillus sp.* 8РАЗ (pLF-SL2) в дозе 26 млрд. к.о.е. на голову (опытная группа), а второй группе – препарат исходного штамма *Lactobacillus sp.* 8РАЗ в той же дозе (контрольная группа №1). Третья группа коров получала только основной рацион (контрольная группа №2). Указанные препараты лактобацилл были наработаны лабораторией биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта ВНИИФБиП с.-х. животных. В ходе опыта еженедельно определяли суточный удой, поедаемость кормов и раз в две недели в молоке определяли содержание жира на анализаторе молока Milko-tester F3140 (Foss Electric, Дания) и белка - колориметрическим методом (Постхумус, 1965). В основном периоде опыта у животных была взята кровь для определения в ней концентрации НЭЖК (Duncombe, 1962).

Статистическую обработку экспериментального материала проводили по парному t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1, в исходном периоде опыта среднесуточный удой животных опытной, контрольной №1 и контрольной №2 групп составил соответственно 20,0; 20,4 и 20,4 кг. В течение первых трех недель после начала скармливания препаратов лактобацилл существенных различий между группами животных по среднесуточному удою также не наблюдалось (табл. 1). Однако с 4-й недели основного периода у коров опытной группы среднесуточный удой начал увеличиваться (рис. 1). В течение последних пяти недель основного периода опыта удой коров опытной группы вырос в среднем на 10,1% по сравнению с удоем животных, которым скармливали препарат исходного штамма лактобацилл, и на 8,1% по сравнению с контролем (табл. 2.).

Отсутствие лактотропного влияния рекомбинантного штамма лактобацилл в течение первых трех недель после начала их скармливания, по-видимому, можно объяснить тем, что в течение этого срока происходит заселение содержимого рубца вносимыми бактериями и создаются устойчивые ассоциативные связи в его экосистеме, способствующие росту численности их популяции.

Таблица 1. ***Влияние скармливания препаратов лактобацилл на среднесуточный удой***

Группы животных	Исходный период;	Основной период		
	среднесуточный удой, кг	среднесуточный удой, кг		среднее значение и стандартная ошибка разности за последние пять недель[†]
		за первые три недели	за последующие пять недель	
Опытная[а]	20,0±0,70	21,6±0,90	22,8±0,91	
1-я контрольная	20,4±0,79	21,7±1,02	20,7±0,96	2,01± 0,84*
2-я контрольная	20,4±0,78	21,5±1,08	21,1±0,75	1,65±0,68*

Примечание: [а] животным скармливался препарат рекомбинантного штамма лактобацилл, продуцирующих соматолиберин; [б] животным скармливался препарат исходного штамма лактобацилл; [†] для аналогов по продуктивности в опытной и в сравниваемой группах; [*] $P < 0.05$ по парному t-критерию.

Подопытные животные всех трех групп существенно не отличались по содержанию белка в молоке. Его концентрация была

наиболее низкой в исходном периоде опыта, а наиболее высокой – в конце основного периода (табл. 2).

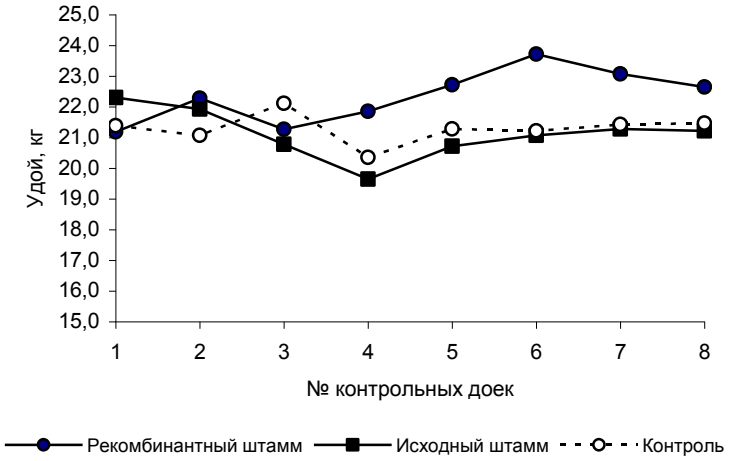


Рис. 1. Динамика молочной продуктивности подопытных коров во время скармливания препаратов лактобацилл

Скармливание коровам рекомбинантного штамма *Lactobacillus sp.* 8РАЗ (pLF-SL2) способствовало повышению содержания жира в молоке. Так, если в основном периоде опыта в первой и второй контрольных группах животных наблюдалось снижение концентрации молочного жира, то в опытной группе она напротив, росла (табл. 2).

Таблица 2. ***Влияние скармливания препаратов лактобацилл на состав молока, %***

Период опыта	1-я контрольная группа [б]		2-я контрольная группа		Опытная группа [а]	
	белок	жир	белок	жир	белок	жир,
Исходный	3,31± 0,126	4,16± 0,175	3,33± 0,085	4,27± 0,386	3,49± 0,118	4,54± 0,285
Опытный: первые три недели	3,48± 0,103	4,07± 0,232	3,47± 0,072	3,91± 0,225	3,70± 0,087	4,67± 0,288
последующие пять недель	3,74± 0,094	4,19± 0,318	3,73± 0,060	4,11± 0,202	3,91± 0,099	5,04± 0,077

Примечание: [а] животным скармливали препарат рекомбинантного штамма лактобацилл, продуцирующих соматолиберин; [б] животным скармливали препарат исходного штамма лактобацилл.

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 3, применение препарата рекомбинантного штамма лактобацилл, несущих генную конструкцию рилизинг-фактора соматотропного гормона, снижает затраты сухого вещества корма на продукцию молока. Так, если в

Таблица 3. ***Затраты сухого вещества корма на продукцию молока при скармливании препаратов лактобацилл***

Группы животных	Основной период		
	затраты корма на продукцию 1 кг молока, кг		среднее значение и стандартная ошибка разности за последние пять недель†
	за первые три недели	за последующие пять недель	
Опытная [а]	0,830±0,0341	0,801±0,0362	
%	100,0	100,0	
1-я контрольная [б]	0,823±0,0437	0,917±0,0478	0,115±0,0352*
%	99,2	114,5	
2-я контрольная	0,846±0,0452	0,884±0,0417	0,082±0,0325*
%	101,9	110,4	

Примечание: [а] животным скармливали препарат рекомбинантного штамма лактобацилл, продуцирующих соматолиберин; [б] животным скармливали препарат исходного штамма лактобацилл; † для аналогов по продуктивности в опытной и в сравниваемой группах; * $P < 0.05$ по парному t-критерию.

начале основного периода опыта не наблюдалось существенных различий между группами животных по затратам корма на продукцию молока, то в течение последующих пяти недель в 1-й и 2-й контрольных группах они выросли соответственно на 14,5 и 10,4% по сравнению с опытной (табл. 3).

Как известно, введение животным экзогенного соматотропина в больших дозах существенно повышает содержание неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в крови в результате усиления липолиза (Etherton and Bauman, 1998; Tucker, 2000). Однако при введении небольших количеств соматотропного гормона рост молокообразования может не сопровождаться ростом концентрации НЭЖК (Baldi et al., 2002; Chiado et al., 2000).

В нашем опыте у животных, получавших рекомбинантный штамм лактобацилл, наблюдалась тенденция к увеличению содержания НЭЖК в плазме крови (рис. 2).

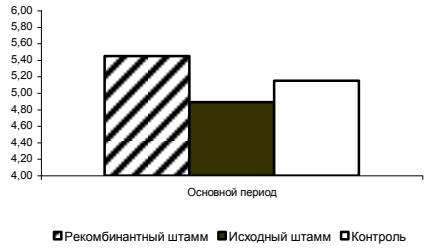


Рис.2. Содержание НЭЖК в плазме крови в основном периоде опыта, мг%.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных нами опытов свидетельствуют, что скармливание коровам препарата рекомбинантного штамма *Lactobacillus sp.* 8РАЗ (pLF-SL2) повышает молочную продуктивность и эффективность использования корма на синтез компонентов молока. Поскольку этот эффект проявлялся как по сравнению с животными не получавшими бактериальный препарат, так и по сравнению с коровами, получавшими исходный штамм *Lactobacillus sp.* 8РАЗ, можно заключить, что стимуляция молокообразования и эффективности конверсии корма в компоненты молока была обусловлена усилением инкреции соматотропина в результате воздействия синтезируемого в рекомбинантном штамме лактобацилл рилизинг-фактора этого гормона.

Полученные данные дают основание полагать, что пероральное применение рекомбинантного штамма лактобацилл, экспрессирующего образование соматолиберина, может быть реальной альтернативой применению инъекций соматотропного гормона с целью повышения молочной продуктивности крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макар З.Н., Жестоканов О.П., Плишкина К.И., Тверской Г.Б. Влияние рекомбинантного соматотропина на кровоснабжение вымени и молочную продуктивность коров. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных. 1992, 2-3 (103-104): 83-90.
2. Постхумус Г. Массовые исследования содержания белка в молоке колориметрическим методом. В кн.: Методы определения белка в молоке. М., Колос, 1965: 72-86.
3. Сапунов М.И., Тараканов Б.В., Макар З.Н. Влияние скармливания рекомбинантного штамма Lactobacillus plantarum 8 РАЗ (pLF-SL2), несущего ген рилизинг-фактора соматотропного гормона, на молочную продуктивность коз. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2002, 41: 14-19.

4. Baldi A., Cheli F., Gandolfi F. et al. Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: effects on mammary gland function, composition and morphology. Journal of Dairy Science. 2002, 85, 5: 1093-1102.
5. Chiado S., Gzervas K., Kiriakou K. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin administration to lactating goats. Small Rum. Res. 2000, 35, 2: 263-269.
6. Etherton T.D. and Bauman D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. Physiological Reviews. 1998, 78, 3: 745-761.
7. Duncombe W.G. The colorimetric determination of long chain fatty acids in the 0.05-0.5 μmole range. The Biochemical Journal. 1962, 83, 1: 6 P (230).
8. Tucker H. A. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-Year Perspective. Journal of Dairy Science. 2000, 83, 4: 874-884.

СОПРЯЖЕННОСТЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ПЕЧЕНИ БЫЧКОВ ПРИ ОТКОРМЕ НА КОМБИКОРМАХ, СОДЕРЖАЩИХ АЗОТИСТЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ

В.В.Михайлов

Лаборатория энергетического питания

Синтетические процессы, протекающие в мышцах и печени откормочных животных при скармливании мочевины, сопровождаются затратами энергии в виде макроэргических связей, источниками которых являются процессы гликолиза и цитратный цикл. В связи с этим в мышечной ткани и печени опытных бычков активность ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути – фруктозобисфосфат-альдолазы (ФБА), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также активность малатдегидрогеназы (МДГ) и креатинкиназы (КК) была выше по сравнению с контрольными животными. Сопряжения, выявленные нами между отдельными показателями энергетического обмена в мышечной ткани и печени откормочных бычков, можно выразить в форме коэффициентов корреляции. Эти корреляции отражают как отдельные звенья процессов гликолиза и глюконеогенеза, так и частные ферментативные реакции, скорость которых регулируется метаболитами-эффекторами, отличающимися по структуре от родственных субстратов изучаемых нами ферментов. Судя по уровню АТФ, АДФ, АМФ, величине энергетического заряда, содержанию пирувата, глюкозы и активности ферментов-ФБА, ЛДГ, Г-6-ФДГ, КК в мышечной ткани и печени бычков, а также по наибольшему спектру энергетических сопряжений между вышеуказанными показателями можно заключить, что наиболее перспективными для использования при откорме крупного рогатого скота являются добавки мочевины в виде карбамидного концентрата и карбамида гранулированного.

Введение

Наряду с существованием универсальных путей и циклов обмена веществ, таких как гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование, в организме животных существуют так называемые метаболические шунты (гексозомонофосфатный и др.), образующие «короткое замыкание» этих циклов, за счёт наличия общих коэнзимов и метаболитов. Благодаря наличию последних в организме устанавливаются «мосты» и «переходы» между разными процессами, что целесообразно с точки зрения сокращения энергетических затрат в организме (Брауншгейн, 1959; Кребс, Корнберг, 1959; Ингрем, 1964; Racker, 1965; Riss, Madsen, 1983; Waiblinger et. al., 2001; Иванов, 2001). Сходство типов обменных процессов и наличие «узлов связи» и прямого взаимодействия между ними создают предпосылки для интеграции обмена веществ. Именно благодаря интеграции, сведению разнообразных химических процессов в единую соподчинённую систему, организм способен к саморегулированию и к поддержанию структуры и функций в изменяющихся условиях окружающей среды (Нейфах и др., 1967). Он обладает целым набором механизмов контроля, обеспечивающих приспособление скорости реакций образования энергии к физиологическим потребностям организма. К таким механизмам относятся, прежде всего, регуляция скоростей ферментативных реакций концентрацией доступных субстратов и кофакторов, конкуренция различных энзиматических систем за общие компоненты и другие. Известен обширный класс явлений, объединяемых термином «аллостерическое регулирование», под которым подразумевают процессы, ведущие к модификации активности ферментов при их взаимодействии со специфическим метаболитом (эффектором) (Ньюсхолм, Старт, 1977). В качестве эффекторов выступают чаще всего конечные продукты различных полиферментных систем.

Имеющиеся в литературе данные указывают также на сложную функциональную связь реакций первичного дегидрирования субстратов с дыхательной цепью митохондрий, в основе которой лежат, по крайней мере, два механизма взаимодействия: 1) прямая зависимость скорости дегидрогеназных реакций от скорости переноса электронов в дыхательные цепи и 2) аллостерическое влияние адениннуклеотидов на ключевые ферменты систем первичного дегидрирования субстратов.

Что касается изучения взаимосвязей между отдельными метаболическими путями, составляющими единый энергетический

процесс обмена в организме жвачных животных, то, как правило, внимание акцентируется на исследовании отдельных показателей энергетического обмена, не выявляя их взаимосвязи в сложной биоэнергетической системе.

При скармливании жвачным мочевины, в рубце происходит некоторая коррекция биоэнергетических процессов, связанная с дополнительным образованием аммиака и его использованием микроорганизмами в преджелудках и в целом в организме животного. В отечественной и зарубежной литературе имеются очень скудные сведения о влиянии добавок азотистых синтетических веществ, в т. ч. разной формы и разного способа введения, на состояние биоэнергетической системы у жвачных животных. В связи с этим целью наших исследований было установление степени сопряжённости биоэнергетических процессов в мышечной ткани и печени, между концентрациями метаболитов и активностью ферментов у откармливаемых бычков, при скармливании им в составе комбикормов разных форм мочевины.

В задачу исследований входило: 1) изучение биоэнергетического статуса мышечной ткани и печени у 15-месячных бычков; 2) определение спектра энергетических сопряжённостей и 3) установление зависимости спектра и степени энергетических сопряжений в мышечной ткани и печени у бычков на откорме, при введении в их рацион разных форм мочевины.

Материал и методы

Эксперимент проведён совместно с отделом кормления ВИЖа в опытном хозяйстве «Дубровицы» на 25 бычках черно-пестрой породы, отобранных для откорма в возрасте 11 месяцев. Бычки были разделены на 5 групп по 5 голов в каждой.

Животным 1-й (контрольной) группы на фоне основного рациона, который состоял из 16 кг кукурузного силоса и 2 кг соломенно-травяных гранул (80-85% ячмённой соломы и 15-20% травяной муки) скармливали комбикорм, приготовленный по рецепту К 64 - I (табл. 1). Бычки опытных групп в составе рациона получали комбикорма: 2 гр. – с 10 % карбамидного концентрата, 3 гр. – с 3% изобутилидендимочевины (ИБДМ), 4гр. – комбикорм с 2% карбамида в рассыпном виде и 5 гр. – тот же комбикорм с карбамидом в гранулированном виде.

Таблица 1. ***Состав комбикормов для контрольных и опытных бычков***

Компоненты и показатели	Г р у п п ы				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
Ячмень	15	32	40	45	45
Кукуруза	25	20	20	20	20
Отруби пшеничные	37	35	34	30	30
Шрот подсолнечный	20	-	-	-	-
Карбамидный концентрат	-	10	-	-	-
Изобутилидендимочевина	-	-	3	-	-
Карбамид рассыпной	-	-	-	2	-
Карбамид гранулированный	-	-	-	-	2
Трикальцийфосфат	1	1	1	1	1
Соль	1	1	1	1	1
Премикс	1	1	1	1	1
В комбикормах содержится (%)					
Кормовые единицы	0,92	0,93	0,93	0,92	0,92
Сухое вещество	88,1	87,1	86,4	86,4	86,4
Органическое вещество	81,6	82,0	81,6	81,6	81,6
Протеин	17,2	17,1	17,3	17,3	17,3
Переваримый протеин	11,6	11,9	12,1	12,1	12,1
Клетчатка	5,2	4,2	4,2	4,2	4,2
БЭВ	56,2	58,8	58,6	58,6	58,6
Кальций	0,52	0,58	0,47	0,47	0,47
Фосфор	0,68	0,62	0,62	0,62	0,62

Опыт продолжался 140 дней, в том числе первые 20 дней – уравнительный период. В конце опыта был проведен контрольный убой бычков в возрасте 15 месяцев – по 3 головы из каждой группы. У каждого животного отбирали пробы длиннейшей мышцы спины и печени для биохимического анализа. В указанных образцах модифицированными методами определяли концентрацию АТФ, АДФ, АМФ, пирувата, глюкозы и активность ферментов – фруктозобисфосфат-альдолазы – ФБА (КФ 4.1.2.13), лактатдегидрогеназы – ЛДГ (КФ 1.1.1.27) , малатдегидрогеназы – МДГ

(КФ 1.1.1.37), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы – Г-6-ФДГ (КФ 1.1.1.49) и креатинкиназы – КК (КФ 2.7.3.2) (Таранов, Михайлов, 1978), как ключевых метаболитов и ферментов энергетического обмена, по которым можно судить о сопряжённости между ферментативными реакциями гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути.

Кроме вышеперечисленных показателей расчетным путем определяли величину энергетического заряда по формуле: ([АДФ]+ 1/2[АТФ]) / ([АМФ]+[АДФ]+[АТФ]) (Ленинджер, 1974), с целью характеристики энергетического состояния клеток мышечной ткани и печени у бычков и вычисления интегрирующего биохимического теста (Михайлов, 1979), который представляет собой произведение активности креатинкиназы (КК) и частного от деления концентрации АДФ на АТФ (активность КК х [АДФ] / [АТФ]), и который коррелирует с показателями интенсивности роста откормочных животных. По нашим данным, полученным ранее, этот биохимический тест имеет устойчивую прямую зависимость со среднесуточным приростом живой массы у молодняка крупного рогатого скота.

Статистическую обработку экспериментального материала и расчёт корреляционной матрицы проводили по программе «Статграфик» с использованием персонального компьютера Pentium II.

Результаты и обсуждение

В течение всего эксперимента проводили индивидуальное взвешивание животных. Динамика живой массы бычков представлена в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что бычки 2-й и 5-й опытных групп, получавшие в составе комбикормов карбамидный концентрат и гранулированный карбамид, имели наибольший среднесуточный прирост (1213 и 1268 г), а у животных 4-й опытной группы, в рацион которых включали комбикорм с рассыпным карбамидом, он составил 1110г.

Таблица 2. ***Живая масса и прирост у бычков, получавших азотистые синтетические добавки в составе рациона***

Группы	Живая масса (кг)		Прирост	
	в начале опыта	в конце опыта	валовый (кг)	средне суточный (г)

1.	Контроль – ОР	253,0	391,6	138,6	1155 ±43
2.	ОР + 10% карб. конц.	257,6	403,2	145,6	1213 ±90
3.	ОР + 3% ИБДМ	263,4	402,0	138,6	1155 ±59
4.	ОР + 2% карб. в рассып. виде	255,0	388,2	133,2	1110 ±70
5.	ОР + 2% карб в гран. виде	258,0	410,2	152,2	1268 ±76

Уровень биоэнергетических показателей в мышечной ткани и печени у 15-месячных бычков, получавших в составе рациона азотистые синтетические добавки с разной скоростью распадаемости, иллюстрирует таблица 3. В мышечной ткани бычков 4-й опытной группы, которым скармливали комбикорм с карбамидом в рассыпном виде, был выше уровень АТФ, АДФ, АМФ и более высокая активность фруктозобисфосфат-альдолазы (ФБА) и креатинкиназы (КК), хотя разница по сравнению с животными из контрольной группы была недостоверной. Рассыпной карбамид быстрее гидролизуется, а избыточное количество аммиака при этом не успевает утилизироваться микрофлорой рубца и он всасывается в кровь. Это отрицательно отражается на синтезе бактериального белка, являющегося важным источником аминокислот, из которых синтезируются белки организма животных. При этом возрастают потери азота с мочой и снижается эффективность его использования. Возможно, по этой причине у бычков 4-й опытной группы оказались самыми низкими показатели живой массы и среднесуточного прироста по сравнению с контрольными и опытными животными 2-й, 3-й и 5-й групп (таблица 2). В связи с быстрой эвакуацией аммиака из рубца в кровь, понижается степень его использования на синтез аминокислот микробного происхождения, поэтому у них отмечено так же и снижение концентрации аминокислот, которые обязательно должны активироваться за счет энергии макроэргических связей, прежде чем из них будут синтезированы мышечные белки. Низкий расход аденозинфосфатов на активацию аминокислот, в связи с меньшим содержанием последних, определил более высокий уровень АТФ, АДФ и АМФ в мышечной ткани у бычков 4-й группы по сравнению с контрольными и опытными бычками 2-й, 3-й и 5-й групп (229,8; 26,8 и 9,1 мг%, соответственно). Исходя из этого, можно констатировать, что хотя уровень компонентов аденилатной системы в мышечной ткани бычков 4-й группы был более высоким по сравнению с бычками из других опытных групп и контрольными животными, но из всех трех аденозинфосфатов концентрация АДФ и АМФ имела превосходство над содержанием АТФ. Этот факт вызвал снижение энергетического заряда до величины 0,91 в мышцах бычков, которым скармливали комбикорм с рассыпным карбамидом, имеющим наибольшую скорость распадаемости в рубце.

Данные таблицы 3 свидетельствуют, что в печени, как и в мышечной ткани, концентрации АТФ, АДФ и АМФ и величины энергетического заряда у опытных животных были одинаковыми с контрольными показателями у бычков, за исключением отдельных из них. Так, уровень АДФ в печени бычков 5-й опытной группы (комбикорм с гранулированным карбамидом) был достоверно ниже (28,1%, P <0,05) по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных, а величина энергетического заряда была, наоборот, выше – 0,92 против 0,91 (P < 0,001). Уровень пирувата в мышечной ткани опытных бычков был стабильным и незначительно превосходил таковой у контрольных животных, а уровни пирувата и глюкозы в печени опытных бычков были практически одинаковым с животными контрольной группы.

Повышенная активность фруктозобисфосфат-альдолазы, лактатдегидрогеназы и креатинкиназы в мышечной ткани бычков 4-й группы повлекла за собой и повышенное образование АТФ, АДФ и АМФ в мышцах животных этой группы (табл. 3), поскольку ФБА и ЛДГ участвуют в гликолизе, где образуется 2 молекулы АТФ, а КК катализирует расщепление креатинфосфата с освобождением 1 молекулы АТФ. В мышечной ткани бычков достоверные различия были только по уровню активности МДГ у животных 3-й группы, получавших комбикорм с изобутилидендимочевиной, обладающей низкой скоростью распадаемости в рубце (P < 0,05).

Динамика активности креатинкиназы в мышечной ткани опытных бычков совпадает с таковой гликолитических ферментов: фруктозобисфосфат-альдолазы и лактатдегидрогеназы. Так, активность КК в мышечной ткани опытных бычков 2-й, 4-й и 5-й групп имела более высокий уровень (13083,3; 11900,0 и 15416,7 Е/л соответственно) по сравнению с контрольными животными (7883,0 Е/л). Этот факт можно объяснить тем, что креатинфосфат распадается в мышечной ткани при участии креатинкиназы и актомиозиновой АТФазы, что может привести к увеличению содержания неорганического фосфата в клетке. В итоге распад креатинфосфата приводит к увеличению концентраций креатина и неорганического фосфата; при этом содержание АТФ и АДФ остаётся практически без изменений (таблица 3). Отсюда следует, что креатинфосфат в мышечной ткани играет роль не только донора энергии, используемой для синтеза АТФ, но также и роль источника неорганического фосфата для стимуляции гликолиза (Ньюсхолм, Старт, 1977). В связи с этим, динамика активностей КК и гликолитических ферментов ФБА и ЛДГ в мышечной ткани опытных бычков

Таблица 3. ***Биоэнергетический статус мышечной ткани и печени у 15- месячных бычков***

Показатели	Группы									
	1-я (контроль) О Р + комбикорм с подсолнечным шротом		2-я О Р + комбикорм с карбамидным концентратом		3-я О Р + комбикорм с изобутилиденди - мочевиной		4-я О Р + комбикорм с рассыпным карбамидом		5-я О Р + комбикорм с гранулированным карбамидом	
	мышца	печень	мышца	печень	мышца	печень	мышца	печень	мышца	печень
АТФ, мг%	206,0 ± 8,0	209,0 ± 9,0	206,0 ± 9,1	203,8 ± 3,9	209,2 ± 15,2	204,5 ± 9,4	229,8 ± 21,8	202,1 ± 11,1	207,5 ± 8,0	182,0 ± 11,3
АДФ, мг%	23,3 ± 1,2	29,2 ± 1,2	23,3 ± 1,2	29,2 ± 1,2	23,3 ± 1,2	29,2 ± 3,1	26,8 ± 7,1	24,5 ± 2,0	22,2 ± 1,2	21,0 ± 2,0[1]
АМФ, мг%	7,6 ± 1,0	6,2 ± 0,5	7,6 ± 1,3	5,7 ± 0,0	8,6 ± 1,4	5,7 ± 0,0	9,1 ± 1,3	7,1 ± 1,4	8,1 ± 0,9	6,2 ± 0,5
Энергетический заряд	0,92 ± 0,00	0,91 ± 0,00	0,92 ± 0,00	0,91 ± 0,00	0,92 ± 0,004	0,91 ± 0,004	0,91 ± 0,004	0,92 ± 0,004	0,92 ± 0,00	0,92 ± 0,00[3]
Пируват, мг %	9,6 ± 1,0	11,4 ± 0,5	10,8 ± 0,7	12,5 ± 0,5	10,0 ± 0,5	11,7 ± 0,3	9,3 ± 1,5	11,6 ± 0,2	11,2 ± 0,7	11,5 ± 0,4
Глюкоза, мг %	-	150,0 ± 9,8	-	132,5 ± 26,2	-	142,5 ± 38,3	-	91,0 ± 30,7	-	145,7 ± 80,6
Активность фруктозобис-фосфат - альдолазы (ФБА), Е/л	50,1 ± 17,1	16,0 ± 4,0	98,0 ± 25,5	53,3 ± 31,4	98,0 ± 23,1	49,3 ± 10,4[1]	108,0 ± 18,3	38,7 ± 1,3[2]	92,0 ± 24,6	53,3 ± 15,0
Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), Е/л	2193,3 ± 652,0	2386,6 ± 56,3	2930,0 ± 964,7	2516,6 ± 86,6	2643,3 ± 1085,7	2420,0 ± 194,1	3723,3 ± 1187,5	2546,6 ± 82,7	3373,3 ± 1174,8	2486,6 ±109,5
Активность малатдегидрогеназы (МДГ), Е/л	14775,0 ± 867,0	10175,0 ± 992,5	16250,0 ± 1711,3	12800,0 ± 288,7	18466,7 ± 931,0[1]	12958,3 ± 994,2	15625,0 ± 435,9	10991,7 ± 586,0	16983,3 ± 2582,1	12466,7 ± 147,2

продолжение таблицы 3

Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ), Е/л	91,3 ± 21,8	115,7 ± 24,2	98,3 + 44,2	120,7 ± 20,7	66,7 ± 3,3	76,7 ± 14,5	76,7 ± 12,0	111,0 ± 16,3	89,7 ± 25,4	103,7 ± 43,6
Активность креатинкиназы (КК), Е/л	7883,0 ±4245,9	1450,0 ± 171,6	13083,3 ± 4043,4	1320,0 ± 132,8	7766,7 ±4713,7	1296,7 ± 67,2	11900,0 ± 4400,2	1426,7 ± 156,3	15416,7 ± 3709,3	1396,7 ± 76,3
КК х [АДФ] / [АТФ]	828.3 ± 407.9	199.0 ± 26.9	1336.7 ± 369.0	185.0 ± 18.4	797.0 ± 462.3	178.0 ± 19.0	1430.7 ± 650.9	174.3 ± 35.5	1498.7 ± 283.4	153.3 ± 11.2

Примечание: мышца и печень: 1) $P < 0,05$; 2) $P < 0,01$; 3) $P < 0.001$.

совпадала во 2-й, 4-й и 5-й опытных группах.

Факт повышенной активности фруктозобисфосфат-альдолазы в мышечной ткани животных 4-й опытной группы, получавших комбикорм с рассыпным карбамидом, можно объяснить тем, что повышенные количества АТФ, АДФ и АМФ у бычков этой группы, по-видимому, аллостерически активировали энзимы, участвующие в общем пути катаболизма и гликолиза. Что касается печени, то здесь наблюдалась в основном аналогичная картина. Активность ряда ферментов в печени бычков, получавших азотистые синтетические добавки, также возрастала в сравнении с животными контрольной группы. Особенно чётко эта тенденция проявлялась в отношении ферментов ФБА, ЛДГ и МДГ (табл. 3).

Активность ФБА в печени оказалась значительно выше в 3-й и 4-й опытных группах (49,3 и 38,7 Е/л, соответственно) по сравнению с животными контрольной группы (16,0 Е/л); эта разница статистически достоверна ($P<0,05$-$0,01$). Высокая активность в печени опытных бычков была отмечена и у лактатдегидрогеназы, что можно объяснить образованием в рубце избыточного количества аммиака, который токсичен и должен быть выведен из организма. По нашим данным, скармливание комбикормов с карбамидом, независимо от формы и способа его использования, приводило к достоверному увеличению содержания аммиака в рубце на 31,9-69,3 % по сравнению с контролем. Среди опытных групп более высокий уровень аммиака в рубце был отмечен у животных 4-й группы (комбикорм с 2 % рассыпного карбамида), а самый низкий – у животных 3-й группы (комбикорм с 3 % изобутилидендимочевины).

Одним из путей обезвреживания аммиака является образование мочевины, которая синтезируется в печени. Этот процесс требует 3 моля АТФ для синтеза одной ее молекулы. Затраты энергии в этом процессе могут быть компенсированы как реакциями окислительного дезаминирования глутамата, течение которых сопряжено с дыхательной цепью и синтезом 3 молей АТФ, так и за счет гликолиза, который подключается для выработки дополнительного количества АТФ при введении в рацион карбамида, что в конечном итоге приводит к интенсификации синтеза мочевины. Как известно, гликолитические ферменты ФБА и ЛДГ катализируют 4-ю и 11-ю реакции пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса, соответственно. В связи с этим их активность возрастала в печени опытных бычков, получавших в составе рациона азотистые синтетические добавки.

Повышение активности МДГ в печени опытных бычков объясняется тем, что МДГ катализирует дегидрирование малата с образованием оксалоацетата, который путем реакций трансаминирования превращается в аспартат, а последний, в свою очередь, конденсируется с цитрулином и при этом синтезируется

аргининосукцинат. Это сложное соединение завершает 3-ю реакцию орнитинового цикла, которая протекает уже в цитозоле клеток печени. В результате этой реакции в молекулу мочевины поступает второй атом азота, который доставляется в орнитиновый цикл с аспартатом из любой аминокислоты, путем ее трансаминирования с оксалоацетатом (первый атом азота представлен в форме аммиака). Следовательно, атомы азота в молекуле мочевины имеют разное происхождение. Таким образом, включение аспартата в орнитиновый цикл происходит с участием фермента МДГ, активность которого возрастает при интенсификации этого процесса.

Уровни активности КК в печени контрольных и опытных животных были практически одинаковыми (1450,0; 1320,0; 1296,7; 1426,7 и 1396,7 Е/л соответственно). Таким образом, активность КК в печени бычков не проявляла существенного влияния на стимуляцию гликолиза и, соответственно, на активность ферментов пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (табл. 3).

Активность в печени глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была близка к таковой в мышечной ткани. Несколько более высокая активность Г-6-ФДГ наблюдалась в печени бычков 2-й опытной группы (комбикорм с карбамидным концентратом) и у контрольных животных (120,7 и 115,7 Е/л, соответственно). Низкая активность Г-6-ФДГ (76,7 Е/л) была отмечена в печени опытных бычков 3-й группы, при включении в их рацион комбикорма с изобутилидендимочевиной. В печени жвачных 4-й и 5-й опытных групп величины активности этого фермента занимали промежуточные положения (111,0 и 103,7 Е/л соответственно).

Уровни активности Г-6-ФДГ и концентрации АТФ и АМФ совпадали в печени бычков 3-й, 4-й и 5-й опытных групп, из чего можно заключить, что АТФ и АМФ являются аллостерическими активаторами пентозофосфатного фермента – Г-6-ФДГ в печени молодняка крупного рогатого скота, как и в случае с гликолитическим энзимом фруктозобисфосфат-альдолазой, функционирующим в мышечной ткани.

Энергетические сопряжения, выявленные при расчёте корреляционной матрицы между основными показателями биоэнергетической системы в мышечной ткани и печени у бычков при откорме на комбикормах, включающих азотистые синтетические добавки с разной скоростью распадаемости, а именно, их спектр, векторность (прямую или обратную) и степень силы сопряжений иллюстрирует таблица 4. Из данных таблицы следует, что активность гликолитического фермента – фруктозобисфосфат-альдолазы в мышечной ткани опытных бычков имела прямую связь с уровнями двух аденинуклеотидов: АТФ и АМФ, причём эта сопряжённость оказалась статистически достоверной в целом по 5-ти группам (r=0.614

и r=0.728; P<0.001 соответственно) и с аденозинмонофосфатом у животных 4-й опытной группы (r=0,991; P<0,02). Таким образом, АТФ и АМФ являются положительными.

Таблица 4. ***Энергетические сопряжения в мышечной ткани и печени у бычков на откорме, установленные при расчёте корреляционной матрицы***

Показатели	Группы					
	1-я (контроль)	2-я (карб. конц.)	3-я (ИБДМ)	4-я (рассып. карб.)	5-я (гран. карб.)	В целом по 5 гр.
Мышца						
Активность фруктозобисфосфат-альдолазы (ФБА)						
АТФ	-0,604	0,921	0,781	0,437	0,773	0,614*****
АМФ	-0,310	0,882	0,564	0,991**	0,938	0,728*****
Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ)						
АМФ	0,948	0,485	1,000*****	0,997**	0,675	0,406*
Активность малатдегидрогеназы (МДГ)						
Пируват	0,449	0,998**	0,387	0,157	0,639	0,427*
Активность креатинкиназы (КК)						
АТФ	0,057	0,882	0,821	0,993**	0,646	0,602*****
АМФ	0,381	0,835	0,617	0,197	0,860	0,473**
Активн. ФБА	0,761	0,996**	0,998**	0,327	0,984**	0,527****
Активн. Г-6-ФДГ	0,655	-0,076	0,617	0,277	0,957*	0,503***
Среднесуточный прирост живой массы						
Активность КК	0,651	0,680	0,926	0,840	0,923	0,737*****
Активн. КК х [АДФ]/ [АТФ]	0,690	0,471	0,933	0,587	0,889	0,585****
Активн. ФБА	0,988**	0,744	0,900	0,787	0,977*	0,491***
АМФ	-0,454	0,971*	0,868	0,697	0,990**	0,443*
Печень						
Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ)						
АТФ	- 0,432	- 0,500	0,937	0,969*	0,827	0,563****
АМФ	- 0,432	- 0,500	0,937	0,984**	0.884	0,526****
Активность фруктозобисфосфат-альдолазы (ФБА)						
Активн. МДГ	0,088	0,037	0,619	0,972*	0,887	0,462**

Активность креатинкиназы (КК)						
Глюкоза	- 0,171	- 0,720	- 0,948	- 0,951 *	- 0,500	- 0,432 *

продолжение таблицы 4

Среднесуточный прирост живой массы						
Активн. КК	0,652	0,916	0,985 **	0,999 ***	0,990 **	0,574 ****
Активн. КК х [АДФ]/[АТФ]	0,742	0,916	0,852	0,936	0,643	0,462 **
Активн. ЛДГ	0,855	- 0,809	- 0,997 **	- 0,988 **	- 0,769	- 0,538 ****

Примечание: мышца и печень: * – P<0.05; ** – P<0.02; *** – P<0.01; **** – P<0.005; ***** – P<0.001.

эффекторами для ФБА. Из литературы известно, что отдельные метаболиты, образующиеся в цитозоле и митохондриях клеток, являются аллостерическими эффекторами для ключевых гликолитических энзимов. К этим метаболитам относятся, в первую очередь, аденинуклеотиды, модифицирующие активность таких ферментов как фосфофруктокиназы, фосфорилазы, пируваткиназы и других энзимов (Нейфах и др., 1967). В наших исследованиях было установлено, что ФБА также может проявлять свойства аллостерического энзима, что подтверждается результатами исследований других авторов (Koida et. al., 1969; Ньюсхолм, Старт, 1977; Парина, Калиман, 1978).

Анализ таблицы 4 также показал, что активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в мышечной ткани бычков имела прямую связь с АМФ. Особенно чётко эта сопряжённость проявилась у животных 3-й и 4-й опытных групп ($r = 1{,}000$; $P < 0{,}001$ и $r = 0{,}997$; $P < 0{,}02$ соответственно). Следовательно, как и в случае с активностью гликолитического фермента ФБА, аденозинмонофосфат является положительным аллостерическим эффектором по отношению к активности Г-6-ФДГ.

В мышечной ткани активность малатдегидрогеназы имела прямую взаимосвязь с концентрацией пирувата, хотя эта сопряжённость статистически достоверной была установлена только для опытных животных 2-й группы и по всему поголовью ($r=0{,}998$; $P<0{,}02$ и $r=0{,}497$; $P<0{,}05$ соответственно). В связи с этим, можно утверждать, что пируват в мышечной ткани играет роль положительного аллостерического регулятора по отношению к активности МДГ. Выявленное нами положительное сопряжение между активностью МДГ и пируватом очень хорошо обосновывается их биохимическими функциями. Как известно, пируват карбоксилируется

с участием фермента пируваткарбоксилазы в оксалоацетат, который восстанавливается в малат с помощью малатдегидрогеназы, которая катализирует и обратную реакцию – окисление малата с выходом оксалоацетата при участии NAD^+ и $NAD + H^+$, что подтверждает наличие сопряжённости биохимических путей МДГ и пирувата. Это свидетельствует о том, что разные формы мочевины, включенные в состав рационов опытных бычков, не способны оказать существенного влияния на функциональные связи между отдельными показателями в биоэнергетической системе их мышечной ткани.

Активность креатинкиназы (КК) в мышечной ткани контрольных и опытных бычков имела положительную сопряжённость как с АТФ, так и с АМФ, причём взаимосвязь между активностью КК и АТФ оказалась статистически достоверной по всему поголовью ($r = 0,602$; $P < 0,001$). Эта энергетическая сопряжённость между активностью КК и концентрациями АТФ и АМФ легко объясняется каталитическими свойствами креатинкиназы, которая в мышцах животных выполняет функцию энергетического буфера (Липская, 2001). Установлено, что непосредственным источником энергии для мышечного сокращения служат молекулы АТФ. Функция энергетического буфера означает, что креатинкиназа поддерживает [АТФ] / [АДФ] потенциал фосфорилирования на высоком уровне. Как известно, КК катализирует распад креатинфосфата с выходом АТФ, а последний при участии актомиозиновой АТФазы, превращается в АДФ и неорганический фосфат. Таким образом, скармливание откормочным бычкам азотистых синтетических добавок инициирует высокую активность КК в мышечной ткани, особенно такой формы, как карбамидный концентрат, карбамид гранулированный и рассыпной, что приводит в конечном итоге к повышению содержания АТФ, необходимой для активации аминокислот микробного происхождения, образующихся при гидролизе мочевины в рубце. Этот факт мы наблюдали и в других экспериментах (Отчёт о НИР лаб. энергетического питания ВНИИФБиП сельскохозяйственных животных, 2003).

Анализ динамики уровня АМФ в мышечной ткани показал, что этот аденинну клеотид имеет прямую связь с активностью креатинкиназы. Отмеченная энергетическая сопряжённость между аденинмонофосфатом и активностью КК объясняется тем, что АМФ действует как своего рода метаболический усилитель при незначительном изменении концентрации АТФ в мышцах жвачных. Данный механизм делает креатинкиназу высокочувствительной к небольшим изменениям энергетического потенциала клетки и позволяет регулировать энергопродукцию в тканях и органах в зависимости от физиологического состояния, условий кормления и продуктивности животных. Вследствие этого, АМФ играет роль

положительного эффектора по отношению к активности КК в мышечной ткани бычков.

Динамика активности креатинкиназы в мышцах совпадала с таковой фруктозобисфосфофосфат-альдолазы, причём взаимосвязь этих ферментов оказалась статистически достоверной у животных 3-й опытной группы и в целом по 5-ти группам ($r = 0.998$; $P<0,02$ и $r = 0.527$; $P < 0.005$ соответственно). Этот факт, как мы отмечали выше, объясняется стимуляцией гликолиза неорганическим фосфатом, который образуется при функционировании креатинкиназной системы в мышечной ткани бычков. Кроме этого, активность креатинкиназы имела прямую зависимость с активностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в мышечной ткани. Энергетическую сопряженность между этими ферментами можно объяснить участием Г-6-ФДГ в образовании структур, участвующих в синтезе белка, а КК – в энергообеспечении синтеза белка.

Анализ литературы показал, что в мышечной ткани молодняка крупного рогатого скота некоторые метаболиты и ферменты энергетического обмена имеют прямые и обратные зависимости с привесами (Madsen, 1983). Что касается нашего эксперимента, то было установлено, что в мышечной ткани контрольных и опытных бычков четыре показателя биоэнергетической системы коррелируют со среднесуточным приростом живой массы, а именно: активности креатинкиназы и фруктозобисфосфат-альдолазы, уровни интегрирующего биохимического теста – активность КК х [АДФ]/[АТФ], и концентрация АМФ (табл. 4). При этом величины привесов у бычков имели статистически достоверные положительные зависимости только с двумя показателями: активностью креатинкиназы и интегрирующим показателем – активность КК х [АДФ] / [АТФ] по всему поголовью ($r = 0,737$; $P < 0,001$ и $r = 0.585$; $P < 0,005$ соответственно). Активность ФБА и концентрации АМФ в мышечной ткани бычков показали высокие величины коэффициентов корреляций с приростами их живой массы: $r = 0,443 - 0,990$ и эти значения были статистически достоверны у животных контрольной, 2-й и 5-й опытных групп ($P<0,005-0,01$).

Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в печени бычков имела энергетические сопряжения с АТФ и АМФ (табл. 4). Причём величины коэффициентов корреляций, отражающих характер этих двух взаимосвязей, совпадали полностью. Так, активность Г-6-ФДГ в печени животных имела отрицательную связь с АТФ и АМФ только у бычков контрольной и 2-й опытной групп. У бычков 3-й, 4-й и 5-й опытных групп активность этого фермента пентозофосфатного пути имела устойчивую положительную корреляцию с аденинтрифосфатом и аденинмонофосфатом ($r = 0,827 – 0,984$), что и определило статистически достоверные взаимосвязи между активностью Г-6-ФДГ

и концентрациями АТФ и АМФ в печени бычков 4-й опытной группы (r=0,969; P<0,05 и r=0,984; P<0,02 соответственно) и в целом по 5-ти группам (r = 0,563 и r = 0,526; P< 0,005 соответственно). Таким образом, как мы отмечали выше, в мышечной ткани бычков АМФ является положительным регулятором по отношению к активности Г-6-ФДГ, а в печени данная функция свойственна и АТФ, т.е., эти два аденинуклеотида играют роль аллостерических метаболитов – эффекторов для регулирования активности Г-6-ФДГ. Этот факт свидетельствует о том, что биохимическая функция Г-6-ФДГ в печени бычков намного шире, чем в мышечной ткани, так как активность этого полифункционального фермента регулируется одновременно двумя модуляторами: АТФ и АМФ (Madsen, 1983, 1983a).

Энергетическая сопряжённость в печени бычков между активностью фруктозобисфосфат-альдолазы и малатдегидрогеназы, как видно из таблицы 4, отмечалась устойчивой положительной корреляцией у животных 3-й, 4-й, 5-й опытных групп и в целом по 5-ти группам (r = 0,619; r = 0,972; P<0,05; r = 0,887 и r = 0,462; P<0,02 соответственно). Положительная связь между ФБА и МДГ, установленная в печени бычков, объясняется тем, что эти ферменты непосредственно участвуют в сопряженных реакциях глюконеогенеза. С помощью этого процесса печень обеспечивает глюкозой кровь и снабжает ею внепеченочные ткани, всецело зависящие в этом отношении от интенсивности реакции глюконеогенеза, в том числе с участием ферментов ФБА и МДГ (Madsen, 1983a).

Материалы таблицы 4 показывают, что активность креатинкиназы и концентрация глюкозы в печени взаимосвязаны отрицательной устойчивой корреляцией у бычков всех опытных групп: 2-й, 3-й, 4-й, 5-й и по всему поголовью (r= -0,720; r= -0,948; r= -0,951; P<0, 05; r = - 0,500 и r = -0,432; P<0, 05 соответственно). Литературные сведения, касающиеся взаимосвязи в печени активности креатинкиназы и содержания глюкозы, очень скудны. Одним из возможных вариантов объяснения механизма обратной зависимости между активностью КК и концентрацией глюкозы в печени, может служить тот факт, что глюкоза является мощным ингибитором этого фермента в силу гармоничного взаимодействия гликолиза и цитратного цикла. За счет функционирования этих двух магистральных путей, организм жвачных способен удовлетворять свои физиологические потребности в высокоэнергетических фосфатах. В этом случае печень бычков не нуждается в притоке дополнительной энергии, которая сосредоточена в креатинфосфате. Вследствие этого активность КК резко снижается при высоком уровне глюкозы в этом органе.

Показатели биоэнергетической системы печени откормочных бычков имели как положительные, так и отрицательные взаимосвязи с их привесами (табл. 4). В печени опытных бычков 3-й, 4-й, 5-й

опытных групп и в целом по 5-ти группам была установлена статистически достоверная сопряжённость между активностью креатинкиназы и величиной прироста живой массы ($r = 0,985$; $P<0,02$; $r=0,999$; $P<0,01$; $r=0,990$; $P<0,02$ и $r=0,574$; $P<0,005$ соответственно). Что касается биохимического теста - активность ККх [АДФ]/[АТФ], то он имел высокие величины коэффициентов корреляций со среднесуточным приростом живой массы у контрольных и опытных бычков (0,643- 0,936). Однако, статистически достоверная сопряжённость между интегрирующим показателем и привесами бычков была отмечена только по всему поголовью ($r=0,462$; $P<0,02$). Активность лактатдегидрогеназы в печени бычков имела отрицательную зависимость с величинами привеса живой массы. Эта взаимосвязь между активностью ЛДГ и приростами оказалась статистически достоверной у бычков 3-й, 4-й опытных групп и в целом по 5-ти группам ($r = - 0,997$; $P<0,05$; $r= -0,988$; $P<0,02$ и $r = - 0,538$, $P< 0,01$ соответственно).

Объяснение отрицательной зависимости между активностью ЛДГ в печени и величиной прироста массы опытных бычков состоит в том, что при интенсивном росте животных происходит коррекция метаболических процессов на тканевом и органном уровне, с целью обеспечения организма необходимым количеством химической энергии в виде АТФ для синтетических процессов (Михайлов, Таранов, 2003). В связи с этим в печени бычков превалирует аэробный гликолиз, который заканчивается образованием пирувата, а последний сразу поступает в митохондрии для дальнейшего окисления его в цитратном цикле, где в конечном итоге образуется наибольшее количество молекул АТФ с участием дыхательной цепи. Восстановление пирувата в лактат под действием фермента ЛДГ не происходит, так как этот процесс для организма животных является энергетически неэффективным. Пируват завершает одновременно аэробный гликолиз и запускает цитратный цикл, что ведёт к максимальному выходу АТФ, а лактат этой функцией не обладает.

Таким образом, при интенсивном росте откормочных бычков в их печени преобладают аэробные метаболические процессы (гликолиз и цитратный цикл), а скорость анаэробного гликолиза снижается, что инициирует низкую активность ЛДГ и её отрицательную связь с приростом живой массы у молодняка крупного рогатого скота.

Заключение

Скармливание откормочным бычкам различных форм азотистых синтетических добавок оказало дифференцированное влияние на биоэнергетический статус их мышечной ткани и печени. Наиболее высокий уровень метаболитов: АТФ, АДФ, АМФ, пирувата,

глюкозы и энергетического заряда, а также повышенная активность ферментов: фруктозобисфосфат-альдолазы (ФБА), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и креатинкиназы (КК) была отмечена в мышечной ткани и печени животных, получавших в составе комбикорма 10% карбамидного концентрата. И, наоборот, низкий уровень этих показателей был установлен в мышцах и печени у бычков, которым скармливали с комбикормом 3% изобутилидендимочевины. Животные, получавшие комбикорма с 2% карбамида в рассыпном и гранулированном виде занимали по уровню вышеуказанных биоэнергетических показателей в мышечной ткани и печени среднее положение. Показатели энергетических сопряжений в мышечной ткани и печени у бычков представлены в виде статистически достоверных коэффициентов корреляции, которые отражают скорости ферментативных реакций гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути, регулируемых метаболитами-эффекторами, отличающимися по структуре от родственных субстратов изученных нами ферментов. Так, повышенная активность ФБА, Г-6-ФДГ и КК в мышечной ткани и печени бычков отмечена на фоне повышения уровня АТФ и АМФ, а пируват является положительным аллостерическим модулятором в отношении МДГ. В печени животных активность КК ингибируется высоким уровнем глюкозы. Среднесуточный прирост живой массы у откормочных бычков имел положительную зависимость с показателями активности КК и ФБА, величинами интегрирующего биохимического теста – активностью КК х [АДФ]/[АТФ] и концентрациями АМФ. В печени бычков активность КК и вычисленные нами уровни интегрирующего показателя имели прямую зависимость с их привесами и обратную зависимость с активностью ЛДГ. Разные формы карбамида не оказали влияния на спектр энергетических сопряжений в мышечной ткани и печени у откормочных бычков, однако способны оказывать действие на уровень показателей энергетических сопряжений на тканях и органах, не изменяя при этом их векторность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koida M., Lai C.Y., Herecker B.L. Subunit structure of rabbit muscle aldolase: extent of homology changes in their ratio. Arch. Biochem and Biophys., 1969, 134, 2: 623-631.
2. Михайлов В.В. Биоэнергетические показатели прироста, М.: Колос, Животноводство, 1979, 4: 72-73.
3. Браунштейн А.Е. Некоторые черты химической интеграции процессов азотистого обмена. Изд-во Ин-та биол. и мед. хим. АМН СССР, М., 1959.

4. Кребс Г., Корнберг Г. Превращение энергии в живых системах. ИЛ, М., 1959.
5. Ингрем М. Механизмы биохимических реакций. М.: Мир, 1964.
6. Racker E. Mechanisms in bioenergetics. Acad. Press, 1965.
7. Riss P.M., Madsen A. Introduction to the Volume: The Dynamics of Metabolic Pools. “Dynamic Biochemistry of Animal Production”. Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo. 1983: 1-8.
8. Waiblinger S., Knierim U., Winckler C. The development of an epidemiologically based on-farm fare assessment system use with dairy cows. Acta Agric. Scand. Setion A. Anim. Sci., Suppl. 2001, 30: 73-77.
9. Иванов К.П. Основы энергетики организма: теоретические и практические аспекты. Том 3: Современные проблемы, загадки и парадоксы регуляции энергетического баланса. Санкт-Петербург (СПб.) «Наука», 2001: 278.
10. Нейфах С.А., Осипова О.П., Гайцхоки В.С., Казакова Т.Б., Репин В.С., Монахов Н.К. Механизмы интеграции клеточного обмена. Изд-во «Наука», Ленинградское отд. 1967: 315 с.
11. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977: 52 – 138.
12. Таранов М.Т., Михайлов В.В. Методические рекомендации по определению биоэнергетических показателей в тканях животных с использованием специфических реагентов высокой чистоты. ВИЖ. Дубровицы, 1978: 39 с.
13. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. Перевод с англ. М. Мир, 1974: 480 – 481.
14. Парина Е.В., Калиман П.А. Механизмы регуляции ферментов в онтогенезе. Харьков, издательское объединение «Вища школа»; 1978: 204 с.
15. Липская Т.Ю. Физиологическая роль креатинкиназной системы: эволюция представлений. (обзор). Биохимия, 2001, 2: 149-166.
16. Отчёт о научно-исследовательской работе лаборатории энергетического питания ГНУ ВНИИФБиП сельскохозяйственных животных: 03.02.02. Определить параметры биосинтеза мышечных белков, обмена веществ и функционирования эндокринной и иммунной систем у растущих бычков при применении биологически активных веществ; разработать способ повышения биоконверсии питательных веществ корма у бычков в компоненты мяса. Боровск, 2003: 1-13.
17. Madsen A. The Molecular Basis of Animal Production: Metabolism in Skeletal Muscle Cells”. .”Dynamic Biochemistry of Animal Production”. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. 1983: 9-28.
18. Madsen A. The Molecular Basis of Animal Production: Metabolism in Liver Cells. .”Dynamic Biochemistry of Animal Production”. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. 1983a: 53-74.
19. Михайлов В.В., Таранов М.Т. Энергетический обмен в мышцах и печени у откармливаемых бычков при включении в рационы различных форм синтетических азотистых веществ. Вестник мясного скотоводства: Материалы международной научно-практической конференции Россельхозакадемия: ВНИИ мясного скотоводства. М.: Издательство «Вестник РАСХН». 2003, 56: 113-124.

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НА АКТИВНОСТЬ ЭКЗОГЕННЫХ МУЛЬТИЭНЗИМНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВВОДИМЫХ В РАЦИОНЫ ЦЫПЛЯТ И БЫЧКОВ

Гулюшин С.Ю. (Лаборатория энергетического питания ВНИИФБиП)
Ленкова Т.Н. (Отдел кормления ВНИТИП)

В опытах in vitro установлено, что собственные пищеварительные ферменты животных интенсивно воздействуют на введённые в комбикорм экзогенные МЭК, что может являться весомой причиной снижения эффективности их использования в кормлении птицы и КРС. У цыплят-бройлеров (7-недельного возраста) максимальное действие эндогенных гидролаз проявилось в желудке (62,4-89,8 %), а уже в тонком кишечнике от номинальной активности ферментных препаратов осталось не более 25-40 %. Рубцовая микрофлора бычков (18-месячного возраста) не менее интенсивно воздействовала на экзогенные МЭК, тем самым, нивелируя каталитический гидролиз волокнистых веществ рациона высоким фоном бродильных процессов.

Введение

Изменения, произошедшие в России за последнее десятилетие, характеризуются кардинальной переориентацией рынка фуражного сырья. С уходом в лету кукурузных и кукурузно-соевых кормосмесей, реалией настоящего времени стало повсеместное использование в комбикормах для с.-х. животных и птицы сравнительно дешёвого зерна собственного производства – местных и нетрадиционных злаковых культур. Однако последнее обстоятельство со всей актуальностью подняло новые вопросы: что делать с высокими уровнями сырой клетчатки и некрахмалистых полисахаридов, содержащимися в пшенице, ячмене, овсе, просе и т.д. и как снизить их негативное влияние – мембранное блокирование – на процессы пищеварения при чрезмерно высоком содержании в рационах животных? Особенно остро проблема лимитирования стоит в промышленном птицеводстве (Broz *et al.*, 1993, Cosson *et al.*, 1999, Розанов, 2001).

Одним из способов, позволяющих снизить влияние волокнистых веществ на организм животных и птицы, является включение в кормосмесь мультиэнзимных комплексов (МЭК). Поскольку известно, что применение в комбикормах ферментных препаратов позволяет повысить их переваримость и питательность, улучшить реологические свойства, а при правильном применении –

нормализовать процессы пищеварения и уменьшить себестоимость конечной продукции (Околелова, 1996, Biswas *et al*., 1999), то решать данную проблему берутся многие как отечественные, так и зарубежные производители МЭК.

Однако, несмотря на обилие фирм-производителей и их, подчас, спекулятивных апелляций к новым научным данным в области питания животных и птицы, практический результат не всегда соответствует красноречивым обещаниям рекламных проспектов. Казусы развернувшейся торговой компании, сопровождающейся жёсткой конкуренцией, откровенным лоббированием и невысоким качеством отдельных МЭК, нередко ставят в тупик рядового производителя сельскохозяйственной продукции: что же выбрать и где критерий успеха?

Со страниц тематических журналов практически не сходят дискуссии о причинах провала в случае использования некоторых ферментных препаратов. Учёные и практики обмениваются мнениями о качестве кормов в стране и за её пределами, оценивают спектры действия тех или иных энзимов, с завидным постоянством изобличают фирмы, предлагающие «панацею» невысокой каталитической активности, высказывают пожелания относительно дозировок, соблюдения технологических приёмов и многое другое. Мы не сомневаемся, что эффективность при использовании мультиэнзимных комплексов – вопрос многих переменных, где лишь компетентный и интегрированный подход, учитывающий все специфические нюансы, может и должен гарантировать успех. В этом аспекте не менее интересна дискуссия о влиянии собственных пищеварительных энзимов животных на заявленную производителями активность ферментных препаратов.

Известно, что при обогащении комбикормов экзогенными мультиэнзимами используются небольшие их добавки, можно сказать микродобавки (50-500 мкг/г), которые вместе с кормом проходят по пищеварительному каналу. Подавляющее большинство предлагаемых энзимов имеет белковую природу, а, значит, в желудочно-кишечном тракте может просто «нейтрализоваться» пепсином и химотрипсином как обычный протеин. В таком случае, ни о каком положительном эффекте МЭК на процессы пищеварения не может идти и речи, по крайней мере, их положительный потенциал не будет слишком велик. В научной литературе этот вопрос слабо освещён, а его обратная сторона полностью остается на совести производителей биологически активных веществ.

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось изучение влияния желудочных и дуоденальных ферментов двух видов животных (с отличным анатомическим строением пищеварительной системы) на общую активность нескольких наиболее

распространённых на российском рынке ферментных препаратов, применяемых в кормлении птицы и КРС.

Материал и методы

В исследовании, проведённом в лаборатории энергетического питания ВНИИФБиП с.-х. животных, объектом изучения явились ряд мультиэнзимных композиций: МЭК-СХ-3, экспериментальный МЭК, Ронозим VP, Ксиланаза Г3Х, Хостазим С, Хостазим Х, Роксазим и Кемзайм. Определение активности ферментных препаратов проводили по модифицированной методике. В качестве субстрата использовали природные субстанции, содержащие натуральные волокнистые вещества. Измельчённая труха злаково-разнотравного сена и пшеничные отруби перед исследованием были подвергнуты специальной очистке (по Генненбергу-Штоману) и содержали в воздушно-сухом веществе не менее 95,1-96,7 % сырой клетчатки.

Прежде чем перейти к дальнейшему описанию методической части эксперимента, считаем нужным дать пояснения относительно выбранного нами метода анализа и природы используемых субстратов. Известно, что большинство методик по определению активности ферментов целлюлозо-лигнинового спектра действия основано на изменении концентрации восстанавливающих сахаров, образующихся при ферментативной обработке зерна. В свою очередь, значительная концентрация собственных сахаров в зерне и содержимом пищеварительного тракта животных априорно не позволяет определить активность низких концентраций фермента ни iv vitro, ни in vivo из-за высокого фона холостого опыта и, как следствие, высокой ошибки (Зоров и др., 2000).

В этой связи, для изучения активности МЭК мы использовали более простой метод, суть которого заключается в том, что по измерению интенсивности окраски супернатанта, возникающей при гидролизе окрашенного полисахаридного субстрата, представляется возможным определить активность фермента, направленного на то или иное вещество. Аналогичный приём широко практикуется многими учёными для установления специфических ферментных активностей МЭК (целлюлазной, ксиланазной, β-глюканазной и др.), где в зависимости от поставленной цели, в инкубационную систему вводится вполне конкретный окрашенный синтетический субстрат: карбоксиметилцеллюлоза, ксилан, β-глюкан и др. (Методы…, 1982, Зоров и др., 2000).

Однако, не ставя перед собой цели дифференцированно определить активность каждого фермента в МЭК, мы использовали более дешёвые и доступные субстраты природного происхождения.

Измельчённая, очищенная и окрашенная (метиленовым голубым) труха сена и отруби уже содержат весь комплекс структурных углеводов клеточных стенок растений, на гидролиз которых в конечном итоге и направлено влияние всех ферментных препаратов. Таким образом, использование в качестве субстратов данных полимерных веществ, в значительной мере лишенных видовой специфичности, позволило получить общее представление о суммарной активности МЭК. Несмотря на некоторую условность абсолютного характера, в сравнительном аспекте подобная оценка является вполне объективной, поскольку по изменению общей активности МЭК представляется возможным точно установить интрамедиарную степень разрушения экзогенных гидролаз протеазами пищеварительного тракта, если последнее будет иметь место либо в пищеварительном тракте животного, либо в экспериментально контролируемой среде.

Работы с микродозами МЭК крайне неудобны и сопряжены с ошибками метрического характера. Для устранения этого фактора мы готовили зерновую основу, состоящую из дроблёной пшеницы и ячменя 1:1 (m:m), в которую ступенчато вводили изучаемые ферментные препараты из расчёта 100 мкг/г. К одной части зерносмеси с МЭК добавляли четыре части 0,5 М фосфатного буфера (pH 7,1) или жидкой фазы содержимого верхних отделов пищеварительного тракта цыплят-бройлеров кросса «Конкурент-2» (ЭПХ ВНИТИП) и бычков чёрно-пёстрой породы (виварий ВНИИФБиП), получавших хозяйственные рационы без ферментных препаратов (!). Во избежание седиментации пробы инкубировали на водяной бане с шекером (γ = 2 Гц). После воздействия на МЭК содержимого желудочно-кишечного тракта, в последующих опытах in vitro определяли их остаточную активность с использованием окрашенных субстратов.

Экспозиция воздействия на МЭК соков желудочно-кишечного тракта в опыте имитировала физиологически нормальные значения активности эндогенных пищеварительных ферментов, соотношение фракций, а также температуры и pH среды. Ввод экзогенных ферментов в зерносмесь и инкубационные системы осуществляли из расчета 100 мкг/г. Важно уточнить, что указанные уровни не соответствовали паспортным рекомендациям для промышленного их использования в рационах животных и были приняты для уравнивания условий оценки («приведения к общему знаменателю») каждого препарата (!).

Поскольку в контролируемых средах невозможно достичь постоянного: а) «притока» новых порций ферментов и б) отвода продуктов ферментолиза, снижающих со временем активность изучаемых энзимов, то продолжительность исследования ограничивали одним часом. Результаты поисковых опытов показали, что продолжительное течение ферментной реакции, отражающее фактическое время нахождения кормовых масс в зобе или рубце, желудке и

12-перстной кишке, было лишено смысла, в то время как часовой интервал, позволяющий избежать нежелательных кинетических нюансов, оказался наиболее оптимальным вариантом. Что касается прикладного аспекта, то при прогнозировании ситуации у животных, степень разрушения экзогенных МЭК в желудочно-кишечном тракте с успехом можно интерполировать с учётом реального времени.

Для углублённого изучения ферментативных процессов у птицы, было проведено аналогичное исследование in vivo, где цыплятам-бройлерам в течение 4 дней скармливали рационы (ПК-5) с этими же ферментными препаратами, после убоя определяли остаточную их активность в 12-перстной и тощей кишках.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что наибольшее влияние на используемые субстраты оказали Ронозим VP и Роксазим (табл. 1). Однако, несмотря на внешнюю справедливость, трактовка результатов определения активности МЭК грешит явным лукавством. Отметим, что данное заключение является весьма пространным и, по большóму счёту, ничего не может значить. В виду того, что ни сено, ни отруби не используются в рационах высокопродуктивных животных в больших количествах, мы не выдвигаем установленную нами общую активность каждого протестированного МЭК, как конечный результат исследования.

Работы других авторов показали, что при использовании разнородных компонентов в комбикорме (что необходимо для оптимального подбора рациона) один и тот же МЭК, воздействуя на несколько субстратов одновременно, может обуславливать неоднозначный характер разрушения связей «биополимер-краситель». Справедливость данной сентенции подтверждается тем, что при другом фракционном составе клетчатки (целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ, лигнина и других полисахаридов) использование того же МЭК, но на другом рационе (субстрате) может иметь совершенно иной эффект (Ленинджер, 1985, Справочник…,1987).

Последнее заключение прямо подтвердилось сопоставлением результатов ферментолиза под влиянием изучаемых МЭК, которое показало, что, несмотря на схожесть ($r = + 0.90$), линейной зависимости не было отмечено. Другими словами, сырая клетчатка сена качественно отличалась от таковой у отрубей – таким образом, достаточно широко известный факт нашёл косвенное подтверждение в полученных значениях активности. Однако, если кто-либо захочет использовать данные компоненты, то применение Ронозима VP и Роксазима на кормосмесях с отрубями и сеном (как для птицы, так и КРС) будет вполне оптималь-

ным и обоснованным выбором, вопреки использованию МЭК-СХ-3, экспериментального МЭК и Ксиланазы Г3Х, которые в данном случае, мы подчеркиваем: лишь на этих двух субстратах и при указанном уровне ввода (100 г/т), оказались менее эффективными.

Степень разрушения введённых в кормосмесь экзогенных ферментов, под действием содержимого верхних участков пищеварительного тракта цыплят и бычков, представлена во второй части таблицы 1. Результаты исследования показали, что после прохождения кормовыми массами зоба, активность всех препаратов незначительно снизилась (на 1,6-12,4 %). Причём, данное уменьшение, хотя оно и не имело достоверных различий по сравнению с исходной активностью препаратов, по-видимому, можно объяснить влиянием симбиотической микрофлоры у птицы, способной даже в зобе частично разрушать экзогенные энзимы МЭК. Косвенно это заключение подтвердилось частичным гидролизом клетчатки в средах без экзогенных ферментных препаратов и незначительным уровнем протеазной активности содержимого зоба.

При изучении влияния содержимого рубца на процессы каталитического гидролиза клетчатки, интенсивность образования окраски в опытных средах оказалась 2-4 раза выше, чем в контрольной. В этой связи можно предположить, что, с одной стороны, рубцовая микрофлора хотя и способна дезаминировать и декарбоксилировать аминокислоты и, таким образом, разрушать белковые энзимы, с другой – именно она, представленная большой физиологической группой

Таблица 1. ***Исходная активность ферментных препаратов и потеря их активности (%) под влиянием пищеварительных ферментов разных отделов желудочно-кишечного тракта цыплят и КРС в течение 1 часа (исследования in vitro)***

Ферментные препараты (МЭК)	Общая активность препарата, [Ед.$_{ОП}$/(г×мин)]		Потеря активности ферментного препарата (в % от исходной)* [n = 3]						
			птица (цыплята-бройлеры, 7-нед.)			крупный рогатый скот (бычки, 18-мес.)			
						в рубце			
	на сене	на отрубях	в зобе	в желудке (муск.+желез.)	в дуоденум	нативное содержимое	добавлен формалин	в сычуге	в дуоденум
1. Без ФП (К)	- - - от 0,05 до 0,08 - - -					87,2 ±6,4	23,5 ±5,2		
2. МЭК-СХ-3	3,07 ±0,28	2,97 ±0,26	8,6 ±7,5	72,5 ±6,0	54,0 ±5,7	100,0 ±0,0	75,7 ±9,8[3]	34,9 ±4,1	42,4 ±2,4
3. МЭК [Exp.]	3,21 ±0,28	2,83 ±0,28	7,2 ±5,8	73,8 ±6,9	51,7 ±10,1	100,0 ±0,0	81,6 ±7,1[3]	30,0 ±1,3	44,8 ±4,9
4. Ронозим VP	6,87 ±0,31	7,48 ±0,37	4,2 ±3,6	62,4 ±7,0	40,7 ±6,9	100,0 ±0,0	83,7 ±8,0[3]	27,6 ±5,7	16,2 ±6,2
5. Ксиланаза Г3Х	4,92 ±0,23	5,13 ±0,23	11,9 ±5,2	89,8 ±7,2	66,4 ±5,6	100,0 ±0,0	83,5 ±5,9[3]	39,8 ±6,5	45,6 ±2,1

6. Хостазим С	5,24 ±0,35	4,83 ±0,41	3,4 ±8,1	76,4 ±5,2	36,6 ±7,2	100,0 ±0,0	77,9 ±8,7[3]	28,9 ±7,0	17,4 ±2,9
7. Хостазим Х	6,65 ±0,40	7,18 ±0,31	12,4 ±9,3	72,5 ±7,1	45,5 ±6,4	100,0 ±0,0	83,9 ±5,9[3]	46,4 ±6,0	43,8 ±11,3
8. Роксазим	7,32 ±0,21	6,48 ±0,35	6,2 ±9,5	67,4 ±6,8	20,3 ±8,2	100,0 ±0,0	82,2 ±6,6[3]	22,6 ±5,6	23,4 ±5,6
9. Кемзайм	6,29 ±0,33	6,61 ±0,32	1,6 ±7,0	87,5 ±6,3	34,6 ±6,7	100,0 ±0,0	77,3 ±5,3[3]	34,7 ±13,4	30,1 ±10,0

	Протеазная активность содержимого некоторых отделов пищеварительного тракта						
Общая активность протеаз, Е/л (метод Ансона) -определена у животных из контрольных групп	Казеин по Гаммерсену	Бычий гемоглобин	Казеин по Гаммерсену	Казеин по Гаммерсену	данных нет	Бычий гемоглобин	Казеин по Гаммерсену
	1,2 ±0,1	142,0 ±5,0	81,0 ±2,7	17,2 ±0,9		63,6 ±2,5	25,8 ±0,4

Примечание: [1] … [3] – достоверно по сравнению с исходной активностью для $P \leq 0,10 \ldots 0,01$

* За исходную активность принимали результаты, где в качестве субстрата использовали сырую клетчатку отрубей.

Таблица 2. ***Активность МЭК в химусе двенадцатиперстной и тощей кишок, Ед.$_{ОП}$/(г СВ×ч) (исследования in vivo)***

Отдел ЖКТ	Без ФП (**К**)	МЭК-СХ-3	МЭК (экс-перимент.)	Ронозим VP	Ксиланаза ГЗХ	Хостазим С	Хостазим Х	Роксазим	Кемзайм
1. *Duodenum*	–	0,92 ±0,19	0,83 ±0,11	0,81 ±0,23	0,64 ±0,16	1,02 ±0,22	0,82 ±0,20	1,23 ±0,32	0,77 ±0,12
2. *Jejunum*	–	0,68 ±0,08	0,54 ±0,04	0,71 ±0,04	0,44 ±0,07[1]	0,53 ±0,11	0,40 ±0,07[1]	0,64 ±0,11	0,55 ±0,07
Свободные сахара в нат. химусе тонкого к-ка, % *	0,76 ±0,18	1,33 ±0,35	1,32 ±0,45	1,91 ±0,48[1]	1,33 ±0,26	1,85 ±0,21[2]	1,14 ±0,39	2,00 ±0,60[1]	1,18 ±0,33
Сухое вещество химуса тонкого кишечника, % *	15,94 ±0,75	19,76 ±0,83[2]	17,47 ±0,90	17,72 ±1,54	17,19 ±0,73	18,45 ±0,85[1]	18,12 ±0,87	19,11 ±0,99[1]	15,58 ±1,31

Примечание: [1] … [3] – достоверно для $P \leq 0,10 \ldots 0,01$ * За содержание сахаров и сухого вещества в химусе тонкого кишечника понимали среднегеометрическую их концентрацию в *duodenum* и *jejunum*. Однако при соразмерном содержании глюкозы, в содержимом тощей кишки содержалось на 10,8-11,4 относ.% меньше сухих веществ ($P \leq 0,001$), чем в химусе 12-перстной (динамика стабильно дублировалась).

целлюлозолитиков, сама достаточно интенсивно воздействовала на волокнистый материал и увеличивала «кажущуюся» активность ферментов МЭК. В виду того, что в инкубационных средах первый факт был полностью нивелирован вторым, объективно установить влияние содержимого рубца на степень разрушения экзогенных энзимов в эксперименте не удалось.

Проведённое дополнительное исследование, где к рубцовому содержимому был добавлен формалин (0,1 %) для инактивации живых микроорганизмов, показало, что воздействие жидкости из преджелудка (без микрофлоры, но не лишённой некоторых энзимов-продуцентов микробного происхождения) на ферменты МЭК также обуславливало снижение их активности. Однако искусственная среда, на наш взгляд, не могла в достаточной степени правомерно отражать процессы в преджелудках, что видно и по тому, что убитая микрофлора недостаточно активно воздействовала на протеины МЭК, в средах присутствовал посторонний химический агент, не были соблюдены условия анаэробиоза и т.д. Тем не менее, даже такая постановка эксперимента показала, что участие всех МЭК в процессах ферментолиза клетчатки у бычков оказалось несоразмерно мало (до 5-18 %) по сравнению с влиянием микрофлоры из преджелудка. Последний факт навевает ряд вопросов относительно целесообразности применения мультиэнзимных комплексов в рационах КРС вообще. Однако, выражая скепсис по этому поводу, мы не беремся быть арбитрами и категорично отстаивать данный вывод, поэтому оставляем последнее слово за коллегами, изучающими вопрос в опытах *in vivo*.

Доступность для переваривания остовых углеводов в истинном желудке и тонком кишечнике животных невелика из-за неспособности пищеварительных желёз ни птицы, ни КРС экскретировать собственные энзимы, ферментирующие клетчатку (Черниговский и др., 1974). В этой связи, все процессы, связанные с биодеградацией клетчатки в низлежащих отделах, можно с уверенностью связать с влиянием экзогенных ферментов рациона, активность которых в данном случае уже не будет затушёвана влиянием многих видов облигатной, индигенной и резидентной микрофлоры.

Динамика изменения их активности показала, что наибольшее влияние оказали сок железистого желудка цыплят и сычуга бычков. Как и следовало ожидать, после прохождения истинного желудка КРС, МЭК теряли от 22,6 до 46,4 % ($P \leq 0,01$) своей активности. Причём, наибольшее снижение каталитических свойств экзогенных МЭК отмечалось после воздействия на них сока железистого желудка птицы (62,4-89,8 %), отличающегося более высокой (в 2-2,5 раза) активностью пепсина по сравнению с таковым у крупного рогатого скота.

Прохождение кормовых масс по 12-перстной кишке характеризовалось стабильно высоким (20,3-66,4 % и 16,2-45,2 %) у обоих видов животных разрушением экзогенных энзимов МЭК и тесно коррелировало ($r = + 0.61$) с протеазной активностью дуоденального содержимого, определённой в параллельном эксперименте.

Обобщая в целом результаты исследования, отметим, что в конце зоны активного переваривания питательных веществ в желудочно-кишечном тракте птицы, от исходной активности ферментных препаратов объективно осталось не более 25-40 % (табл. 1). Тем не менее, в случае абсорбции в кишечнике части питательных веществ, относительная их активность в расчёте на единицу сухого вещества химуса оказалась значительно (в 1,6-3,8 раза) выше, даже чем в скармливаемом комбикорме, что указывает на основное место «работы» МЭК в организме животных. Как показывает практика кормления, этого более чем достаточно для положительного влияния на переваримость питательных веществ и снижения негативного влияния высоких уровней клетчатки рациона. Так, даже в нашем эксперименте, содержание свободных моносахаров в тонком кишечнике у всей подопытной птицы было в 1,5-2,6 раз выше по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

В порядке обсуждения результатов исследования также уместно предостеречь практиков от чрезмерного использования МЭК в рационах. Ряд исследователей утверждает, что ввиду многообразия регуляторных свойств гидролаз в организме, дополнительный ввод ферментов угнетает работу эндокринных клеток, изменяет «фермент-субстратные» отношения в химусе, что в конечном итоге приводит к торможению секреторной и инкреторной деятельности пищеварительных желёз с последующим снижением продуктивного действия ферментных препаратов (Мирошников, 2002). В этом аспекте их влияние на организм могут подтвердить и наши данные о достоверном и закономерном увеличении содержания воздушно-сухого вещества в химусе тонкого кишечника птицы (с 15,9 до 17,5-19,7 %), получавшей изучаемые ферментные препараты (табл. 2). Кроме того, являясь биологически активными веществами, как экзогенные, так и эндогенные ферменты в процессе пищеварения интенсивно воздействуют не только на субстрат (корм), но и на стенку пищеварительного тракта. Однако, если от влияния собственных энзимов (автолиза) организм надежно защищен, то действие высоких доз чужеродных ферментных препаратов нередко заканчивается аллергенными и дегенеративно-эрозивными аномалиями с прободением слизистой оболочки и низлежащих слоёв кишечника (Vahjen *et al*., 1999).

В целом же, безкомплиментарно освещая результаты исследования, все тестируемые МЭК по степени устойчивости в ЖКТ как у птицы, так и КРС можно выстроить в следующей последовательности (max → min): Роксазим, Ронозим VP, Хостазим С, МЭК-СХ-3, экспериментальный МЭК, Кемзайм, Хостазим Х и Ксиланаза Г3Х.

Заключение

При обоснованном выборе, основанном на учёте фракционного состава клетчатки рациона, использование в комбикормах гранулированных Роксазима, Ронозима VP и Хостазима С может быть более предпочтительным и эффективным, по сравнению с другими аналогами, благодаря высокой устойчивости данных препаратов и их пролонгированному влиянию на низлежащих участках желудочно-кишечного тракта животных – в нашем исследовании они явились бесспорными лидерами. В свою очередь, Ксиланаза ГЗХ, Хостазим Х и, отчасти, Кемзайм значительно снизили свою активность во всех отделах, поэтому практическую нецелесообразность их использования в рационах, по-видимому, можно объяснить интенсивным разрушением данных МЭК в пищеварительном тракте, несмотря на исходно высокую активность препаратов.

При умеренной толерантности к пищеварительным ферментам, относительная активность МЭК-СХ-3 и экспериментального МЭК (содержащих наполнитель) оказалась минимальной. Однако абсолютная их способность воздействовать на клетчатку (и особенно на пектиновые вещества) при рекомендуемом вводе 1 кг/т будет максимальной, что обусловливает высокий продуктивный эффект от их использования, подтвержденный многими исследователями в опытах *in vivo* (Гулюшин, 2002)

Отметим также, что содержимое пищеварительного тракта цыплят-бройлеров более интенсивно воздействовало на МЭК собственными ферментами (142,0 Е/л, против 63,6 Е/л – у бычков), при этом наибольшая степень разрушения энзимов была отмечена в желудке и 12-перстной кишке птицы. У бычков кормовые массы дольше находятся в пищеварительном тракте (до 200 ч, портив 2-2,5 ч – у цыплят), в результате чего разрушались не менее эффективно, чем у птицы, а если объективно учитывать процессы микробной ферментации в преджелудках, то, возможно, даже и более. Наиболее заметное влияние на снижение активности экзогенных энзимов оказало содержимое рубца и сычуга КРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулюшин С.Ю. Питательные свойства зерна чумизы и его использование в комбикормах для цыплят-бройлеров. Дисс… канд. биол. наук, Боровск, 2002: 16.
2. Зоров И., Синицын А., Околелова Т., Румянцев С., Морозов А. Метод определения ферментов. Комбикормовая промышленность, 2000, 4: 4-13.
3. Кормление птицы. Справочник. В.Н. Агеев, Т.М. Околелова, И.А. Егоров и др. М.: Агропромиздат, 1987: 31-132.
4. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985, 2: 56-65.

5. Мирошников С.А. Действие мультиэнзимных композиций на обмен веществ и использование энергии корма в организме птицы. Дисс… докт. наук, Оренбург, 2002: 315.
6. Околелова Т.М. Кормление с.-х. птицы. Сергиев Посад, 1996: 3-96.
7. Рекомендации по нормированию кормления сельскохозяйственной птицы. ВНИТИП: Под ред. В.И.Фисинина, В.И.Ермаковой, И.А.Егорова, Т.М. Околеловой. Сергиев Посад, 1992: 67.
8. Розанов Б.Л. Мультиэнзимные композиции в комбикормах для бройлеров и кур-несушек, содержащих рожь. Дисс… канд. наук, Сергиев Посад, 2001: 110.
9. Черниговский В.Н., Соловьев А.В. Физиология пищеварения. Л.: Наука, 1974: 737.
10. Bergh M.O., Razdan A., Aman P. Nutritional influence of broiler chicken diets based on covered normal, waxy and high amylose barleys with or without enzyme supplementation. Animal Feed Sci. and Technology, 1999, 78, 3-4: 215-226.
11. Biswas T., Mandal L., Sarkar S. Studies of enzyme supplementation and herbal preparation at different levels of energy on the performance of broilers. Journal of Interacademicia, 1999, 3, 1: 53-58.
12. Broz J. Enzymes as feed additives in poultry nutrition. - current applications and future trends. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 1993, 48, 4: 213-217.
13. Cosson T., Vendrell A.M., Teresa B.G., Rene D. et al. Enzymatic assays for xylanase and beta-glucanase feed enzymes. Animal Feed Sci. and Technology, 1999, 77, 3-4: 345-353.
14. Jackson M.E., Fodge D.W., Hsiao H.Y. Effects of beta-mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance. Poultry Sci., 1999, 78, 12: 1737-1741.
15. Oloffs K., Jeroch H., Schoner F.J. The efficiency of non-starch-polysaccharide hydrolysing enzymes on nutrient digestibility and gross energy convertibility of barley, rye and wheat diets for laying hens. Archives of Animal Nutrition, 1999, 52, 2: 155-165.
16. Silversides F.G., Bedford M.R. Soluble non-starch polysaccharides, enzymes, and gut viscosity is there a connection. World Poultry, 1999, 15, 5: 17-18.
17. Vahjen W., Simon O. Biochemical characteristics of non-starch polysaccharide hydrolyzing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. Archives of Animal Nutrition, 1999, 52, 1: 1-14.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ α-ТОКОФЕРОЛА И α-ТОКОФЕРИЛХИНОНА ПОРОСЯТАМИ ИЗ РАЦИОНА

Т.В.Жарова, В.И.Дудин

Лаборатория биологически активных веществ

В опыте на поросятах в период доращивания с 87 до 105-суточного возраста исследовали характеристики использования и усвоения α-токоферола и α-токоферилхинона. Всасывание α-

токоферилхинона в кишечнике поросят протекает с заметно меньшей скоростью, чем всасывание α-токоферола (74,7 против 40,9%). Все же при достаточно эффективном усвоении в желудочно-кишечном тракте поросят экзогенного α-токоферилхинона, не обнаруживается сколько-нибудь существенных различий с контролем по его концентрации в органах и тканях, по накоплению в печени и выделению с калом в форме конъюгатов с глюкуроновой кислотой..

Введение

Установлено, (Дудин, 2001), что у цыплят α-токоферилхинон всасывается гораздо хуже, чем α-токоферол. В исследованиях по продвижению препарата α-токоферилхинона в качестве лечебного агента, препятствующего аггрегации тромбоцитов, знание интенсивности его всасывания необходимо. В этой связи, своей целью мы поставили изучение использования в желудочно-кишечном тракте поросят α-токоферилхинона в сравнении с α-токоферолом.

Материал и методы

В соответствии с задачами исследований провели опыт в условиях вивария института на помесных поросятах (крупная белая х крупная черная х дюрок) в период доращивания с 87 до 105 дней. В опыте находилось 3 группы животных, по 4 головы в каждой, сформированых по принципу аналогов. Поросята контрольной группы (1) в соответствии с возрастным периодом получали полнорационный комбикорм СК-5 (табл.1) при фоне природного α-токоферола – 17,27 мг/кг корма, α-токоферилхинона – 6 мг/кг корма. В комбикорм поросят 2-й группы добавляли 277 мг d,l-α-токоферилацетата на 1 кг корма, в комбикорм 3-й группы – 50 мг α-токоферилхинона на 1 кг корма (по данным непосредственного анализа). Витаминно-минеральный комплекс в опыте был стандартным. Лекарственные средства в премикс не вводили. При выращивании поросят учитывали рекомендуемые параметры (плотность посадки, кормление, поение, температурный и световой режимы, постоянный доступ к корму и воде). К моменту убоя в 105-дневном возрасте провели суточный балансовый опыт со взятием образцов корма и кала. На анализ отбирали образцы печени, почек, стенки тонкого кишечника.

Тонкий кишечник извлекали, делили его на 10 фрагментов: 12-перстная, подвздошная кишка и 8 равных отрезков тощей. Образцы отбирали из середины каждого фрагмента, отрезая 10% длины, промывали физиологическим раствором, удаляли жир и остатки брюшины.

Таблица 1. ***Рецептура комбикорма СК-5***

Ингредиенты	%
Кукуруза	27,0
Ячмень	29,2
Пшеница	15,0
Соевый шрот	10,0
Подсолнечниковый шрот	3,0
Рыбная мука	3,0
Сухой обрат	2,0
Дрожжи	3,0
Травяная мука	3,0
Жир кормовой	2,0
Монокальций фосфат	1,0
Соль	0,3
Мел	1,0
Премикс КС-3	0,5
В 1кг комбикорма содержится:	
Обменной энергии, МДж	12,39
Сырого протеина, г	167,0
Сырого жира, г	47,13
Клетчатки, г	47,18
Кальция, г	8,85
Фосфора, г	7,87
Лизина, г	9,15
Метионина + цистина, г	5,77

В образцах определяли концентрацию α-токоферола и α-токоферилхинона. Дополнительно в печени определяли содержание связанного α-токоферилхинона, а в кале – уровень α-токоферилацетата и связанного α-токоферилхинона.

Результаты и обсуждение

Использование α-токоферола в пищеварительном тракте поросят находилось на уровне, который обычно описывается в литературе (табл. 2). Причем самый низкий уровень усвоения был в контроле. Лишь несколько хуже, чем α-токоферол, поросята усваивали α-токоферилхинон корма. Лучшим усвоение последнего было у поросят, получавших этот препарат. Добавки α-токоферилацетата уменьшали использование α-токоферилхинона.

Из исследований ряда лет лаборатории витаминного питания вытекает, что α-токоферол используется из препаратов гораздо эффективнее, чем из натуральных кормов. Это, по-видимому, относится и к α-токоферилхинону. Здесь обращает на себя внимание только факт пониженного усвоения α-токоферилхинона у поросят группы с супердозой витамина Е.

Таблица 2. ***Использование α-токоферола и α-токоферилхинона (мг/гол/сут) в связи с введением в рацион α-токоферилацетата или α-токоферилхинона.***

Группа	Потреблено	Выделилось	Использовано	%
		α-токоферол		
1	34,5 ± 5,4	8,08 ± 0,96	26,46 ± 1,02	56,6 ± 2,8
2	846,9 ± 56,7	14,72 ± 5,69	802,19 ± 5,69	74,7 ± 0,7
3	135,8 ± 21,6	15,44 ± 1,63	120,35 ± 1,63	68,6 ± 1,2
		α-токоферилхинон		
1	14,6 ± 3,8	5,33 ± 1,84	9,26 ± 1,84	36,9 ± 12,7
2	13,6 ± 2,4	7,89 ± 1,64	5,71 ± 1,64	24,4 ± 12,0
3	112,0 ± 9,1	32,92 ± 2,59	79,07 ± 2,72	40,9 ± 4,5

Это может быть следствием некоторого ограничения всасывания со стороны α-токоферола, что характеризует его, как поставщика α-токоферилхинона в организм животных. По среднесуточной экскреции с калом поросят связанного α-токоферилхинона (рис. 1) можно заключить, что α-токоферол, в примененной нами дозе (294 мг/кг корма), является лучшим поставщиком α-токоферилхинона в организм, чем экзогенный α-токоферилхинон в том количестве, в котором мы его задавали поросятам (50 мг/кг корма).

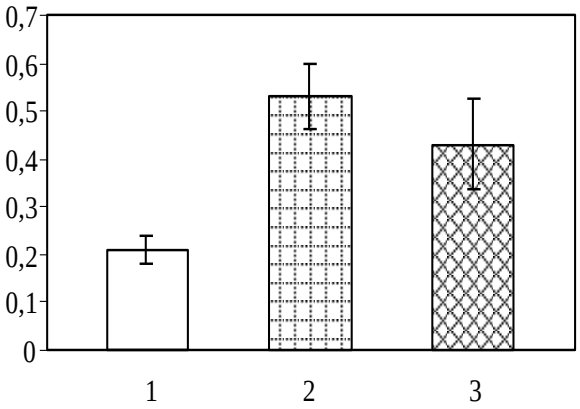


Рис. 1 Выделение связанного α-токоферил-хинона с калом поросят, получавших добавки α-токоферилхинона или α-токоферилацетата (х – группы; у – концентрация, мг/гол/сут)

Таблица 2. ***Влияние добавок α-токоферилхинона и α-токоферилацетата на выделение с желчью α-токоферола и продуктов его обмена (мкг/г)***

Группа	α-ТН	α-ТХ своб.	α-ТХ связ.
1	2,06 ± 0,19	0,27 ± 0,09	94,64 ± 9,51
2	5,57 ± 0,41	1,04 ± 0,06	96,68 ± 10,56
3	4,25 ± 1,13	1,77 ± 0,36	110,59 ± 9,51

Как показал корреляционный анализ, появление α-токоферола в печени контрольных поросят напрямую связано с его концентрацией в стенке тонкого кишечника (рис. 2). Добавки α-токоферилацетата и α-токоферилхинона сделали эту зависимость обратной, что, скорее всего, свидетельствует о повышенном оттоке α-токоферола от печени в кишечник, возможно, через систему гепатоэнтеральной циркуляции токоферола, важность которой для этого вещества была установлена Н.А. Спрышковой с соавторами (1980). В случае добавок α-токоферилацетата, являющегося поставщиком α-токоферола, феномен гепатоэнтеральной циркуляции токоферола является основным фактором, определяющим степень утилизации всосавшегося витамина Е (Надиров, 1991) и поддерживающим таким способом его гомеостаз в организме. В случае добавок α-токоферилхинона отток α-токоферола от печени, вероятно, можно объяснить регуляцией по принципу обратной связи через продукт обмена, выделяющегося системой гепатоэнтеральной циркуляции (Грищук, 1995; Дудин, 2001).

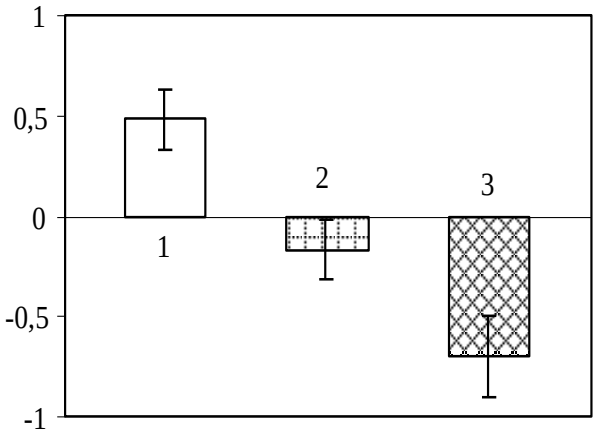


Рис.2. Взаимосвязь между концентрацией α-токоферола стенки тонкого кишечника и печени поросят (х – группы, у – коэффициент корреляции)

Печени принадлежит ведущая роль в поддержании фона витамина Е в крови. При избыточном поступлении токоферола в организм, его концентрация в печени может возрастать в несколько раз (Чаговец и др., 1970; Cardner et al., 1980). Данные по усредненной концентрации α-токоферола в печени (рис. 3) показывают, что добавки

α-токоферилацетата резко повышают уровень α-токоферола (P = 0,0001), а включение в рацион α-токоферилхинона, напротив, его снижает.

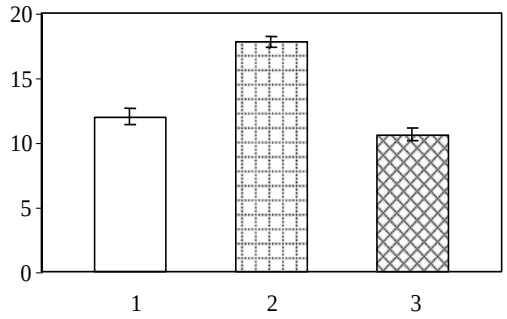


Рис. 3. Средние значения концентрации α-токоферола в печени (x – группы; y – концентрация, мкг/г ткани)

Из результатов корреляционного анализа видно (рис. 4), что появление α-токоферилхинона в печени связано с его концентрацией в стенке тонкого кишечника, особенно в связи с добавками α-токоферилацетата. В случае добавок α-токоферилхинона наблюдается его отток из печени, что, по-видимому, указывает на отсутствие равновесия этого вещества между стенкой тонкого кишечника и печенью.

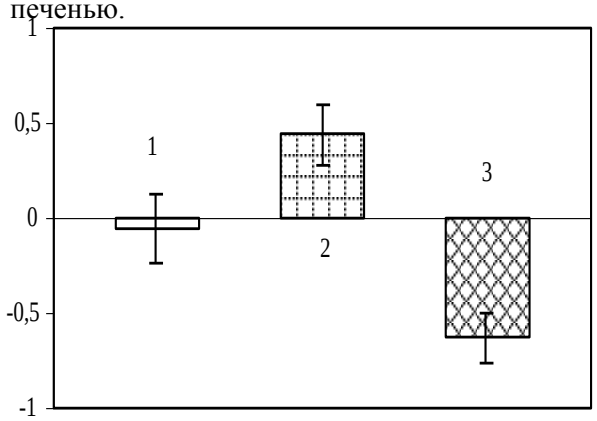


Рис. 4. Взаимосвязь между концентрацией α-токоферилхинона стенки тонкого кишечника и печени (x – группы, y – коэффициент корреляции)

Экзогенный α-токоферилхинон обладает способностью снижать скорость роста поросят. Усредненная концентрация α-токоферилхинона в печени (рис. 5) повышается в ответ на введение в рацион добавок α-токоферилхинона. Статистически достоверно она увеличивается в связи с добавками α-токоферилацетата (P = 0,005).

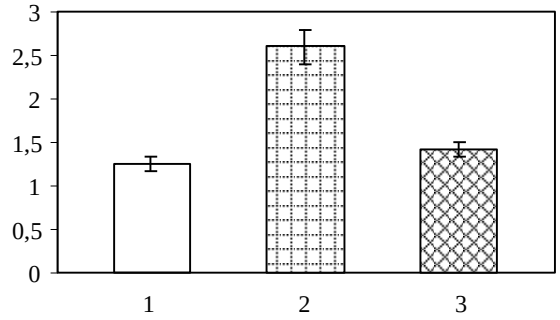


Рис. 5. Средние значения концентрации α-токоферилхинона в печени (х – группы; у – концентрация, мгк/г)

Добавки α-токоферилацетата привели к прямой связи между концентрациями α-токоферилхинона в различных фрагментах стенки тонкого кишечника и в печени. Это обстоятельство можно интерпретировать как смещение равновесия фонда α-токоферилхинона между стенкой и печенью в сторону выделения α-токоферилхинона через желчь в просвет кишечника, или же стенкой кишечника по всей его длине. В своих исследованиях мы не обнаружили заметных различий в содержании α-токоферола и α-токоферилхинона между корковой и мозговой зоной (табл. 3). В целом же почки, наряду с печенью, являются основным органом, утилизирующим α-токоферилхинон в форме водорастворимых метаболитов с мочой. Сами по себе – это минорные конечные продукты обмена α-токоферилхинона в животных организмах.

Таблица 3. ***Содержание α-токоферола и α-токоферилхинона в почках поросят (мкг/г сырой ткани) в зависимости от включения в рацион α-токоферилацетата или α-токоферилхинона (мкг/г)***

Группа	Корковая зона		Мозговая зона		Всреднем	
	α-ТН	α-ТХ	α-ТН	α-ТХ	α-ТН	α-ТХ
1	2,99± 0,02	0,36± 0,07	2,72± 0,06	0,25± 0,04	2,86± 0,04	0,31± 0,06
2	5,67± 0,41	0,45± 0,01	5,77± 0,64	0,49± 0,05	5,72± 0,53	0,47± 0,25
3	2,17± 0,33	0,28± 0,01	2,09± 0,26	0,25± 0,01	2,13± 0,30	0,27± 0,01

Окисление α-токоферола в почках протекает с небольшой интенсивно стью (рис. 6). Невысока, по-видимому, и дальнейшая утилизация α-токоферилхинона.

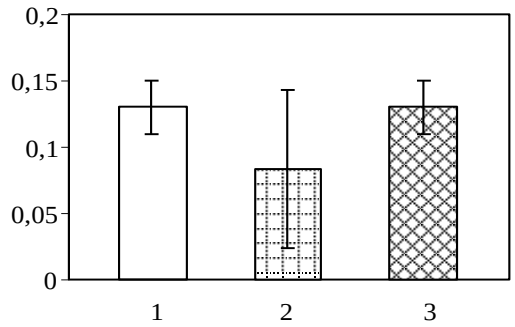


Рис. 6.Состояние окисленности α-токоферола в почках в среднем в связи со способом введения α-токоферилхинона в организм поросят(х – группы; у – отношение α-токоферилхинон/α-токоферол)

Таким образом, α-токоферилацетат является лучшим поставщиком α-токоферилхинона в организме поросят в примененных дозах (α-токоферилхинон – 50 мг, α-токоферилацетат – 277 мг на 1 кг корма), вследствие более отлаженной доставки в органы мишени этого метаболита в форме α-токоферола. При достаточно эффективном усвоении в желудочно-кишечном тракте поросят (41%) экзогенного α-токоферилхинона не обнаруживается сколько-нибудь существенное различие с контролем по его концентрации в органах и тканях, по синтезу в печени и утилизации с калом в форме конъюгатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грищук С.В. Метаболизм альфа-токоферола у поросят раннего возраста. Дис... к.б.н., Боровск, 1995.
2. Дудин В.И. Метаболизм альфа-токоферола в организме сельскохозяйственных животных. Докт. дисс., Боровск, 2001
3. Надиров Н.К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. М., Наука, 1991: 336 с.
4. Спрышкова Н.А., Серебряков Н.Г., Спрышкова Р.А. и др. Депонирующая роль пищеварительного тракта в обмене D-l-[5-метил-^{3}H]-токоферола при бластомогенезе в мозжечке крыс. Актуальные проблемы витаминологии: Тез. докл. научн. конф. Тарту, 1980: 39-41
5. Чаговец Р.В., Кузнецова Л.Н., Лахно Е.В., Рыбина А.А. Некоторые проблемы обмена витаминов при избыточном их поступлении в организм. Витамины в эксперименте и клинике. М: Медицина, 1970, вып. 2
6. Cardner H.K., Vang V.J., Niavis R.D. Removal of α-tocopherol from blood and its comparison with other lipids. Fed. Proc., 1986, 45(4): 841

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВА ФОЛИНА

В.И.Дудин
Лаборатория биологически активных веществ

Впервые публикуется изобретенный автором колориметрический способ определения перекиси водорода с реактивом Фолина. При этом механизм реакции до сих пор остается неизвестным.

Обычно активность каталазы определяют путем измерения количества перекиси водорода до и после инкубации источника фермента с образцом крови. Количественный анализ, как правило, ведут титрованием перекиси водорода перманганатом. Мы предложили колориметрический метод определения перекиси водорода с использованием реактива Фолина (а.с.

СССР, №1399682 от 1 февраля 1988 года. Способ определения каталазы в крови).

Разведенную в 2500 раз гемолизированную кровь поросят в количестве 1 мл переносят в пробирку и нагревают на водяной бане при 37°С в течение 3 мин, а затем добавляют 1 мл 3мМ раствора перекиси водорода, подогретого до 37°С. Через 1 мин реакцию останавливают приливанием 1 мл 10%-го раствора мета-фосфорной кислоты. Фильтруют, к 1,5 мл фильтрата приливают 0,5 мл 0,4%-ного раствора восстановленного глутатиона, а затем – 3 мл реактива Фолина. Спустя 1-12 ч пробу колориметриют при 650-700 нм. Параллельно ставят слепую пробу (вместо 1 мл перекиси водорода – 1 мл воды). Количество перекиси водорода определяют по предварительно построенному калибровочному графику, который при концентрациях перекиси водорода от 0 до 3 мкМ представляет собой прямую линию.

В целях приготовления реактива Фолина (Коренман, 1970) к 50 мл 4%-ного водного раствора молибденовокислого аммония ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x $4H_2O$) приливают 25 мл ледяной уксусной кислоты, а затем, после тщательного перемешивания, добавляют 3 мл 20%-ного водного раствора силиката натрия (Na_2SiO_3 x $9H_2O$) и водой доводят до 100 мл.

Активность каталазы рассчитывают по формуле $A = R(C_и – C_н)$, где:

А – активность, мкМ H_2O_2/мин х мл крови;

$C_и$ – исходное количество H_2O_2, мкМ ($C_и = 3$);

$C_н$ – количество неиспользованной H_2O_2, мкМ;

R– разведение крови (R = 2500)

Реактив Фолина представляет собой раствор кремниймолибденовой гетерополикислоты. Центральным атомом является кремний, а координированными группами – полианионы молибдена. Интенсивная синяя окраска (молибденовая синь), появляющаяся в результате реакции, обусловлена присутствием в этих соединениях двух валентных форм молибдена Mo-V и Mo-VI. Соотношение форм зависит от выбора восстановителя и многих других условий (Бабко, Пилипенко, 1974). Лучшими восстановителями кремниймолибденовой гетерополикислоты являются эйконоген и аскорбиновая кислота. Мы также испытывали другие восстановители (двухлористое олово, тиомочевина, аскорбиновая кислота), но во всех случаях результаты воздействия от перекиси водорода не зависели. В наших исследованиях в качестве восстановителя применен восстановленный глутатион, который восстанавливает желтую кремниймолибденовую гетерополикислоту только совместно с перекисью водорода. Однако механизм этой реакции пока неизвестен, известно лишь, что перекись водорода способна как к окислительным, так и к восстановительным реакциям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., Пилипенко А.Т. Фотометрический анализ. М: Химия,1974
2. Коренман И.М.. Фотометрический анализ. М: Химия,1970

К МЕТОДУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ

М.В.Брусков
Лаборатория биологически активных веществ

Разработан метод определения водорастворимых витаминов (С, B_2, B_5 и B_6), с применением отечественного хроматографа семейства «Милихромов», имеющего известные для этой серии недостатки (шприцевой ввод и невысокое давление, 5 мПа). Как и в зарубежных аналогах, в разработанном способе используется обращенно-фазовая хроматография.

Введение

Контроль витаминного питания при производстве мяса является едва ли не самым уязвимым звеном, ввиду чрезвычайной сложности методов анализа и широкого спектра нарушений метаболизма, ведущих к существенному снижению эффективности производства. В этой связи перед нами была поставлена задача разработать метод одновременного определения нескольких водорастворимых витаминов с помощью ВЭЖХ с использованием отечественного оборудования. За рубежом в последнее время разработаны методы определения водорастворимых витаминов с применением ионообменной ВЭЖХ. В нашей стране воспроизведен подобный метод на базе зарубежного оборудования. Этим методом определяют содержание в премиксах витаминов B_1,B_2,B_5 и B_6. Данные методы имеют ограничение, поскольку они непригодны для анализа витаминов в объектах с низким уровнем витаминов, например в животных тканях. В таких случаях лаборатория фирмы БАСФ рекомендует применять микробиологические методы. В то же время методы с использованием ВЭЖХ хороши тем, что позволяют провести быстрый анализ и не разрушают витамины в процессе анализа.

Материал и методы

В работе использовали ВЭЖ-хроматограф «Милихром-4» (ПО «Научприбор», г. Орел) с УФ-спектрофотометрическим детектором с диапазоном 190-360 нм. Хроматографические колонки из стали, размером 120 х 2 мм, заполняли обращенной фазой SPH C_{18} с диаметром частиц 6,0 мкм.

Мобильную фазу готовили с использованием смесей на основе метанола, ацетонитрила или диметилформамида. Испытано большое количество вариантов витаминов, из числа которых отобрали те витамины, которые обнаруживались на хроматограммах при использовании такого сочетания стационарной и мобильной фаз, когда давление в колонке не превышало предельно допустимое, имея ввиду, что хроматографы семейства «Милихром» имеют шприцевой ввод, обеспечивающий давление в колонке не более 5 мПа. При разработке режима экстракции сравнивали гостированный метод кислотной экстрации (2% уксусной кислоты) и принятый при химических анализах метод экстракции 1/10 н. раствором H2SO4 на примере рибофлавина. При поиске путей концентрирования экстракта попробовали применить гель-хроматографию на молселекте G10. В качестве среды для набухания геля применяли 0,15 М NaCl. Такой же раствор использовали для проведения гель-хроматогрфии.

Результаты и обсуждение

Вначале был проведен подбор концентраций отдельных витаминов с тем, чтобы пики разделяемых веществ на хроматограммах имели оптимальные размеры. В результате выяснилось, что наряду с очевидными достоинствами: быстрота анализа (около 2-х часов) и щадящий режим анализа ─ высокоэффективная хроматография водорастворимых витаминов пригодна только для работы с премиксами. Так, для аскорбиновой кислоты оптимальной концентрацией в стандартном растворе является 50 мкг/мл. Такая же концентрация необходима для никотиновой кислоты и пиридоксина гидрохлорида, несколько меньшая (30 мкг/мл) для рибофлавина. Согласно данным справочника «Видаль ветеринар» (2001) в РФ принято в качестве нормативов для поросят введение в корм 100-150 мг аскорбиновой кислоты на 1 кг корма, 5 мг/кг пиридоксина и рибофлавина, 30 мг/кг никотиновой кислоты. В связи с этим, в обычных комбикормах нельзя определить ни один из перечисленных витаминов.

При использовании в качестве мобильной фазы смеси равных объемов метанола и воды и детектировании при 260 нм на хроматограмме выявляются 3 максимума, ввиду того, что аскорбиновая и никотиновая кислоты имеют близкую подвижность (рис.1).

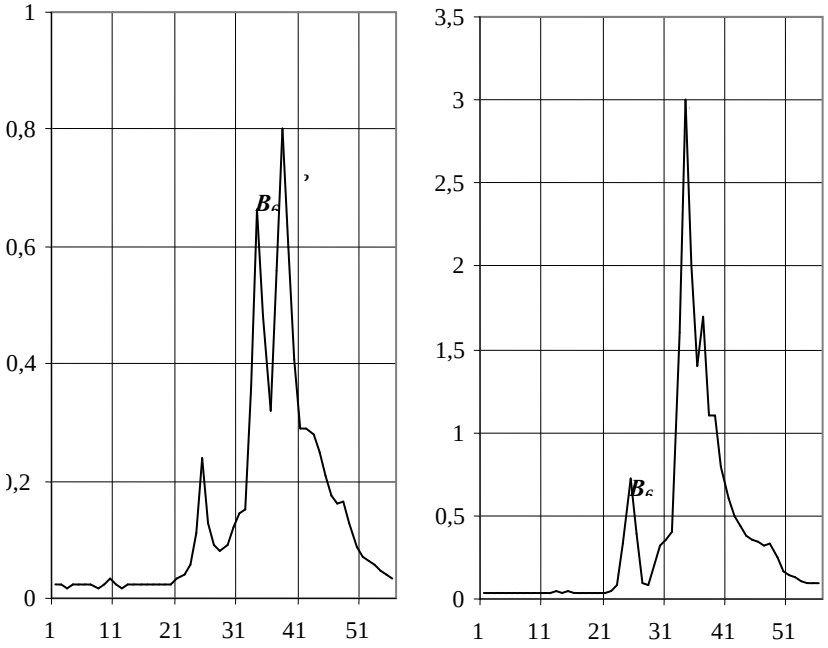


Рис.1. УФ-хроматограмма кислого экстракта премикса КС-3 при 260 нм (слева) и 210 нм (справа)(х-объем элюции,мкл; у-абсорбция)

Дифференциацию аскорбиновой и никотиновой кислот можно вести по разнице поглощения при 260 и 210 нм. Эти вещества имеют близкое поглощение при 260 нм и контрастное при 210 нм в пользу никотиновой кислоты (рис.2).

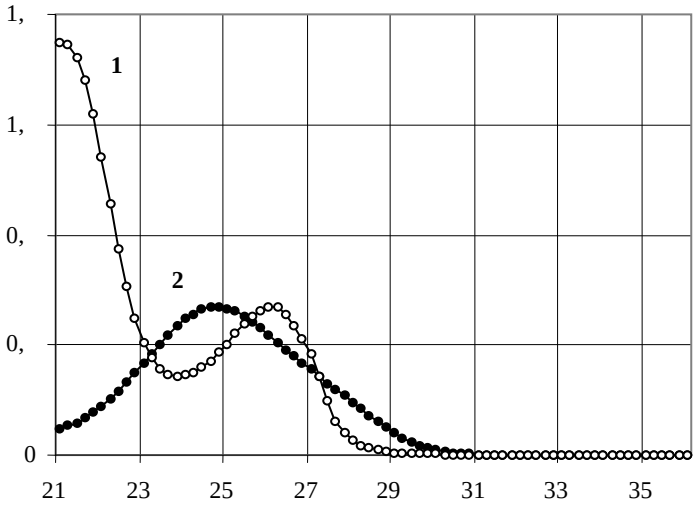


Рис.2. УФ-спектры никотиновой (1) и аскорбиновой (2) кислот в остановленном потоке элюента (х-длины волн,нм; у-абсорбция)

При 210 нм аскорбиновая кислота поглощает в 5 раз менее, тогда как никотиновая кислота в 3 раза более интенсивно. Что касается витаминов B_2 и B_6, то их отделение друг от друга и от витаминов B_5 и С вполне удовлетворительно. При этом они имеют контрастные различия по спектрам поглощения в УФ-свете (рис.3)

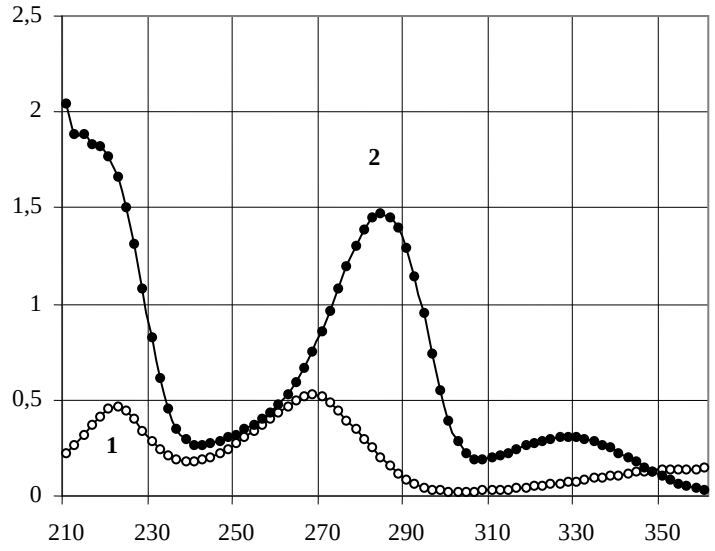


Рис. 3. УФ-спектры рибофлавина (1) и пиридоксина гидрохлорида (2) в остановленном потоке элюента (х-длины волн,нм; у –абсорбция)

В результате подбора оптимальных режимов экстракции очень больших различий между вариантами не обнаружено (97% против 93%) в пользу гостированного способа экстракции ─ 2% уксусной кислоты в воде. В целях повышения разрешающей способности метода, удалось опробовать способ концентрирования экстракта гель-фильтрацией через молселект G10. Против ожидаемого компактного выхода водорастворимых витаминов пик оказался размытым, а объем элюирования - более высоким, по сравнению с объемом ввода (6-7 мл против 5 мл). Продолжением работ по концентрированию может быть поиск иных сочетаний геля и буфера. В результате исследований был разработан следующий вполне пригодный для использования *способ*

определения водорастворимых витаминов с помощью обращенно-фазовой хроматографии с применением отечественной аппаратуры.

Предварительные замечания. Создание метода продиктовано возможностями отечественной исследовательской техники. Способ пригоден для определения в премиксах следующих витаминов: аскорбиновой кислоты, никотиновой кислоты, пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина. В методе применена обращенно-фазовая ВЭЖ хроматография.

Подготовка образцов. Навеску премикса (около 1 г) помещают в колбу объемом 100 мл , куда приливают 60 мл 2% раствора уксусной кислоты в воде, нагревают в кипящей бане в течение 20 минут, затем встряхивают в течение 10 минут, охлаждают до комнатной температуры, доводят до 100 мл 2% раствором уксусной кислоты. Сразу же проводят разведение до финальных концентраций с помощью 0,01 М/л орто-фосфорной кислоты и фильтруют. При анализе витаминно-минеральных премиксов добавляют 1 г диэтилентриаминоуксусной кислоты в образец перед экстракцией.

Приготовление растворов. Для приготовления 2% раствора уксусной кислоты берут 40 мл ледяной уксусной кислоты и смешивают с водой в мерной колбе на 2 л. Основной раствор о-фосфорной кислоты готовят путем растворения 23,1 г вещества 85% концентрации в мерной колбе на 2 л. Рабочий раствор получают смешиванием 100 мл основного раствора с водой в мерной колбе на 1 л.

Стандартные растворы. Основные растворы готовят путем растворения 100 мг витамина в 100 мл 2% раствора уксусной кислоты в воде. В течение 2-месячного хранения в холодильнике эти растворы пригодны для использования. Раствор аскорбиновой кислоты готовят на воде каждый раз перед использованием. Рабочие растворы готовят путем разведения 0,01 М/л орто-фосфорной кислоты до финальных концентраций: никотиновая кислота – 50 мкг/мл, пиридоксин-гидрохлорид – 50 мкг/мл, рибофлавин – 30 мкг/мл, аскорбиновая кислота – 50 мкг/мл. Разведение анализируемого образца проводят так, чтобы предполагаемая концентрация витаминов подходила под концентрацию витаминов в стандарте.

Условия хроматографии.

Хроматограф «Милихром-4»	ВЭЖХ «Милихром» или
Детектор	УФ-детектор, 190-360 нм
Колонка	Стальная, 120х2 мм
Стационарная фаза	Силасорб SPH C_{18}
Мобильная фаза	Смесь метанола и воды 1:1
Скорость	100 мкл/мин
Объем инъекции	15 мкл

Длины волн, нм *витаминов:*	*Максимумы поглощения*
	Аскорбиновая кислота - 248 нм
	Никотиновая кислота - 210 и 262 нм
	Пиридоксин-гидрохлорид–214 и 284 нм
	Рибофлавин –222 и 268 нм
	Аналитическая программа:
	Аскорбиновая кислота -248 нм
	Никотиновая кислота – 210 нм
	Пиридоксин-гидрохлорид- 284 нм
	Рибофлавин – 260 нм
Объем элюции	Аскорбиновая кислота –245 мкл
	Никотиновая кислота – 250 мкл
	Пиридоксин-гидрохлорид-340 мкл
	Рибофлавин – 416 мкл
Расчеты	$C_n=S_n \times C_c \times R/ S_c \times m$, где
пробе,мкг/г	C_n-концентрация витамина в
	S_n- площадь пика в пробе,
	S_c-площадь пика в стандарте,
	C_c-количество витамина в стандарте,
	R-разведение, m-навеска премикса.

Заключение

Таким образом, разработан способ определения водорастворимых витаминов, в котором применен отечественный хроматограф семейства «Милихромов», с известными для этой серии недостатками (шприцевой ввод и невысокое давление, 5 мПа). Как и в зарубежных аналогах, в нашем способе используется обращенно-фазовая хроматография. По сравнению с аналогами, нами получен

такой же аналитический эффект, но более простым способом. Метод апробирован в лабораторных условиях при анализе премикса КС-3, составленного с учетом последних рекомендаций. Способ может быть применен, как и в аналогах, при анализе премиксов с достаточно большим уровнем витаминов, вполне возможно в условиях производств, которые очень часто оснащены подобной аналитической аппаратурой.

ПРОБЛЕМЫ АДАПТАЦИИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ К УСЛОВИЯМ ПРОМЫШЛЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Л.К. Бусловская
Белгородская ГСХА

У сельскохозяйственных животных от состояния внутренней среды организма зависит нормальная жизнедеятельность и стабильная продуктивность. Константы, характеризующие кислотно-щелочной баланс, являются жесткими параметрами гомеостаза, и поэтому могут служить показателями приспособленности организма к условиям среды. Длительные и сильные воздействия, вызываемые стресс-факторами, ведут к нарушениям кислотно-щелочного баланса и вызывают ацидозы и алкалозы разной природы и стадии компенсации. Хорошо известно, что даже небольшие изменения активной реакции крови сопровождаются серьезными последствиями, такими как изменение активности ферментов и проницаемости мембран, физико-химических характеристик клетки и коллоидных структур.

Необходимость приспособления к воздействию стресс-факторов вызывает напряжение физиологических функций и приводит к дополнительным затратам энергии. Уровень энергозатрат служит универсальной количественной оценкой функционирования живого организма. Энергетический подход применяется также для оценки эффективности адаптационных процессов (Лекявичус, 1986; Михеев, 1988). При действии стрессоров величина энергозатрат на приспособление к неблагоприятным факторам может возрасти. Для сельскохозяйственных животных это означает снижение продуктивности и непроизводительный расход кормов.

В условиях интенсификации сельскохозяйственного производства животные подвержены температурным, технологическим, социальным, транспортным и другим стрессам. Высокопродуктивные животные, обладая повышенным уровнем обмена веществ и энергии, склонны к нарушениям кислотно-щелочного баланса в организме. Какие сдвиги баланса вызывают у них стрессоры, какова величина затрат энергии на восстановление нарушенного гомеостаза – эти вопросы требуют своего разрешения.

Мы изучали нарушения кислотно-щелочного баланса и энергетический обмен у сельскохозяйственной птицы кросса «Иза

Браун» при адаптации к действию стрессоров в условиях промышленного производства: технологических операций, транспортировки, высокой температуры воздуха и других.

Параметры кислотно-щелочного баланса крови определяли методом Аструпа в модификации О. Зиггаард-Андерсена. Активную реакцию крови ($pH_{ист.}$) – иономером И-130.2М, буферные основания (БО) ─ диффузионным методом в сдвоенных колбах. Парциальное давление углекислого газа ($pC0_2$), стандартные (СБ), истинные бикарбонаты (ИБ), сдвиг буферных оснований (СБО) рассчитывали по номограммам О. Зиггаард-Андерсена.

Обмен энергии у кур исследовали в условиях физиологических балансовых опытов. Анализ комбикормов, выделенного помета и снесенных яиц проводили общепринятыми методами. По данным балансового опыта рассчитывали обменную энергию (ОЭ) и энергию, заключенную в продукции ($Э_{цпрод.}$). Для расчета теплопродукции (ТП) пользовались общеизвестной формулой: ТП = ОЭ - $Э_{прод.}$ Расчет эффективности производства продукции (ЭПП) проводили по формуле:

$$ЭПП = (Э_{прод.} / ТП)\times 100,$$

коэффициента продукции ($К_{прод.}$):

$$К_{прод.} = (Э_{прод.}/ОЭ)\times 100$$

(Денисов, 1969; Калашников,1977, 1998).

Пересадка, взвешивание и взятие крови вызывали беспокойство птицы и повышение ее двигательной активности. Происходило значительное учащение дыхательных движений (табл. 1). Напряжение физиологических функций еще больше стимулировало обменные процессы. Как известно, активизация симпатоадреналовой системы непосредственно после стрессирования стимулирует окислительные процессы в организме и способствует накоплению нелетучих кислот (Кравченко, 1975).

В крови кур проявлялись нарушения кислотно-щелочных взаимоотношений, которые по совокупности параметров можно охарактеризовать как метаболический ацидоз субкомпенсированной фазы. Его основными признаками были, прежде всего, недостаток всех буферных оснований, в том числе стандартных и истинных бикарбонатов плазмы крови и отрицательный сдвиг буферных оснований. Произошло снижение $pH_{ист.}$ ниже границы компенсации и уменьшение $pC0_2$. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1. ***Параметры кислотно-щелочного состояния крови кур-несушек при адаптации к технологическим операциям***

Время опыта	ЧД	$pH_{ист.}$, ед.	$pC0_2$, кПа	БО	СБ	СБО
				ммоль/л		
Первая пересадка						
До	29±2	7,44±0,03	4,7±1,8	47,0±2,5	24,0±0,5	-0,6±0,2

После	45±6**	7,33±0,09	4,1±1,3	38,2±1,6*	17,7±0,7***	-9,4±1,7**
Третья пересадка						
До	25±4	7,44±0,03	4,5±1,2	46,9±2,1	24,7±1,3	-2,5±0,6
После	40±6	7,39±0,04	3,8±0,4	41,7±2,3	21,9±1,2	-6,2±1,1*
Пятая пересадка						
До	31±4	7,43±0,04	4,1±0,6	44,5±1,9	23,4±1,4	-2,5±0,5
После	44±5	7,37±0,05	4,3±0,3	42,2±1,5	22,2±0,8	-5,9±0,7**
Седьмая пересадка						
До	26±4	7,44±0,03	4,4±0,3	46,5±1,5	24,5±1,1	-1,5±0,5
После	45±4*	7,41±0,04	3,4±0,5	41,2±3,0	21,7±1,6	-6,6±1,9*

Примечание: достоверные изменения по сравнению со значениями параметров до пересадок, *- P<0,05; ** - P<0,01; ***- P< 0,001

Технологические операции повторяли ежесуточно. После повторных пересадок, взвешиваний и взятий крови частота дыхания снова увеличивалась. Компенсаторные механизмы кислотно-щелочного баланса не были достаточно эффективными, поэтому сдвиг буферных оснований был достоверно больше, а pH – ниже должных величин.

Только после пятой пересадки механизмы компенсации совершенствовались настолько, что были в состоянии восстанавливать равновесие кислотных и щелочных веществ в крови. Поэтому перед шестой пересадкой и последующими воздействиями все параметры, включая СБО, были в пределах нормальных значений. Исключение составляло $pC0_2$ в крови, которое было неизменно ниже нормальных значений. По-видимому, свой отпечаток накладывал высокий уровень обмена веществ и энергии, сопровождающий интенсивную яйцекладку у кур.

При повторении операций ацидоз переходил в компенсированную фазу. Адаптивные особенности, несомненно, связаны с совершенствованием компенсаторных механизмов, а приспособление требует длительного периода времени. Как установили Гаркави и др. (Гаркави, 1990), адаптивные реакции имеют ритм, близкий к суточному. Именно суточный ритм воздействий способствует оптимизации реакций со стороны живого организма. При однократном применении воздействий развивается стадия ориентировки или стадия первичной активности, и затем стадия возвращения к состоянию, свойственному данному организму. Закономерное развитие всех трех стадий стресса, включая стадию истощения, наблюдается и при систематическом повторении стрессовых воздействий.

Метаболический ацидоз часто сопровождает экстремальные состояния организма животных, связанные с усилением процессов потребления энергии. По данным ряда авторов (Siesjo, 1966; Aalkjaer, 1997) метаболический ацидоз вызывает нарушение функций митохондрий, недостаточное снабжение тканей кислородом, избыточ-

ное окисление липидов и т.д. Метаболический ацидоз – основной фактор, ответственный за утомление организма и ограничение работоспособности при нагрузках (Green, 1997).

Как было установлено, метаболический ацидоз декомпенсированной фазы имеет место у птицы и при транспортировке. Эксперимент был проведен в плановые сроки пересадки подопытных молодок. Воздействие транспортного стресса изучали в условиях летней жары и зимой. Оказалось, что летом нарушения были большими. После погрузки, перевозки и пересадки кур в крови возникал метаболический ацидоз декомпенсированной фазы. Параметры кислотно-щелочного состояния крови кур представлены в табл. 2.

Таблица 2. ***Параметры кислотно-щелочного состояния крови кур при транспортировке***

ЧД	$pH_{ист.}$, ед.	$pC0_2$, кПа	БО	СБ	ИБ	СБО
			Ммоль/л			
До транспортировки						
38±3	7,48±0,06	3,9±0,4	47,5±3,3	24,0±0,7	25,0±1,5	-0,5±0,1
После транспортировки						
48±2*	7,27±0,07*	2,6±0,7	30,7±3,0**	12,1±3,1**	16,2±2,5*	-16,7±5,9*

Состояние крови характеризовалось значительным уменьшением $pC0_2$ и pH, отрицательным и весьма существенным СБО. Объяснение этому факту, по-видимому, состоит в том, что до пересадки в крови кур уже были нарушения, вызванные высокой температурой воздуха. В помещениях, где содержались куры и куда их перевозили, температура воздуха составляла 27,0-27,4^{0}C, относительная влажность 75-77%. В таких условиях учащение дыхания и усиление легочной вентиляции приводило к избыточному выведению из организма углекислого газа, снижению pCO_2 и повышению pH выше физиологической нормы, в крови кур развивался респираторный алкалоз субкомпенсированной фазы. Это согласуется с результатами, полученными нами при изучении влияния высокой температуры воздуха на организм кур. При длительной гипервентиляции и сохраняющемся респираторном алкалозе создавались предпосылки для компенсаторного накопления молочной кислоты, что усугубляло нарушения во внутренней среде организма.

Известно, что куры-несушки кроссов, отличающихся большой живой массой и массой яиц, при высоком уровне яйцекладки нуждаются в большем "метаболическом потоке" по сравнению с “легкими” яичными кроссами. Птица таких кроссов расходует значительно больше энергии корма на физиологические процессы (Прайзингер, 1996, Миронова, 1995).

В физиологическом балансовом опыте были установлены особенности обмена энергии у кур при адаптации к технологическим операциям. Обменная энергия (ОЭ) составила 1358 - 1408 кДж на голову в сутки. Теплопродукция (ТП) на начало эксперимента у кур опытной и контрольной групп составляла в среднем 52,7-53,5 кДж/100 г ж.м. (живой массы). Энергия, заключенная в продукции ($Э_{прод.}$) – 15,4-17,9 кДж/100 г ж.м.

При ежесуточном повторении пересадок, взвешиваний и взятий крови обнаружили следующие изменения. В процессе адаптации к концу опыта ТП у опытных несушек увеличилась и составила уже 83% ОЭ (в контроле - 69%). Энергетическая ценность 100 г яичной массы различалась в группах незначительно. Количество снесенных яиц и их масса в контрольной группе были больше, поэтому $Э_{прод.}$ у контрольных несушек в среднем за весь опыт оказалась больше на 116 кДж (на 28%). У кур, подвергавшихся технологическим операциям, к концу эксперимента $Э_{прод.}$ сократилась по сравнению с контрольными несушками на 46% за счет увеличения доли ОЭ, выделяющейся непроизводительно, т.е. в виде тепла. Поэтому эффективность производства продукции (ЭПП) к концу эксперимента оказалась почти в 2 раза ниже, чем в контроле. Коэффициент продукции ($К_{црод.}$) у птицы после пересадок и взвешиваний сократился на 24%, т.е. количество ОЭ, потраченной продуктивно, было на четверть меньше в сравнении с началом опыта.

Восстановление физиологических функций организма после стрессов происходит достаточно долго и нередко сопровождается резким падением общей резистентности организма, ухудшением здоровья и отставанием в развитии. Разработанные способы профилактики применяются в настоящее время редко, прежде всего, из-за материальных затрат. ЭПП и $К_{прод.}$, рассчитанные для кур-несушек, позволяют утверждать, что для сохранения высокой продуктивности при технологических операциях затраты кормов должны быть значительно увеличены. Поэтому при совершении технологических операций необходимо строго соблюдать рекомендации и применять препараты, уменьшающие проявление стрессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лекявичус Э.К. Элементы общей теории адаптации. Вильнюс. Моксалас, 1986: 273 с.
2. Михеев В.Н. Пищевое поведение животных и принцип оптимальности. Экологическая энергетика животных. Пущино, 1988: 112 с.
3. Денисов Н.И. Методика по нормированию кормления и оценке кормов для крупного рогатого скота по комплексу питательных веществ и в показателях обменной энергии. Дубровицы, 1969: 108 с.
4. Новая концепция о балансе энергии в организме животного. (А. П. Калашников, В.В. Щеглов, Н.В. Груздев, В.Г. Двалишвили). Зоотехния, 1997. 12: 10-14.

5. Калашников А.П. Современные проблемы теории и практики кормления животных. Зоотехния, 1998. 7:13-17.
6. Кравченко М.А. Реакция симпатоадреналовой системы цыплят на воздействие пересадки как стресс-фактора. Актуальные проблемы развития птицеводства. Загорск, 1975:121-125.
7. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д: изд. Ростов. Универ., 1990: 224 с.
8. Molecular mechanisms of acidosis mediated damage. (B.K. Siesjo, K.J. Katsura, T. Kristian et al.). Acta Neurochir. Suppi (Wien), 1996, 66: 8-14
9. Aalkjaer C. PH and smooth muscle. (C. Aalkjaer, H.L. Peng.). Acta Physiol Scand., 1997, 161 (4): 447-566.
10. Green H.J. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. J. Sports Sci. 1997, 15, 3: 247-256.
11. Прайзингер Р., Бониц В. Совершенствование кроссов "Ломанн". Птицеводство, 1996, 5:35 с.
12. Миронова Г.Н., Клюкина Т.А. Сравнительная характеристика продуктивных качеств кур “П-46” и "Ломанн Браун" в условиях Удмуртии. Вопросы селекции и технологии производства продуктов животноводства, охотоведения и природопользования. Тезисы докл. регион. межв. науч. конф. в г. Кирове (3-4 июля 1995), Киров, 1995, 1: 45-46.

СПОСОБЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ И РЕАЛИЗАЦИИ ВЫСОКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ МОЛОЧНЫХ КОРОВ В УСЛОВИЯХ МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Фирсов В.И.

Мурманская госсельхозстанция

Молочное скотоводство – одна из наиболее сложных отраслей животноводства, производящее исключительно ценные продукты питания – молоко и говядину, роль которых очень высока в пищевом балансе населения.

В экстремальных субарктических условиях Кольского Севера животные находятся на круглогодовом стойловом содержании. Основные корма, потребляемые крупным рогатым скотом – привозные. Поэтому экономное эффективное расходование их ─ неоспоримое требование жизни.

В наших условиях нет возможности значительно увеличивать поголовье скота. Только интенсификация ведения отрасли может дать возможность получать конкурентоспособную продукцию. Было установлено, что в условиях Мурманской области становится невыгодным иметь первотелок с удоем ниже 4000-5000 кг молока в год, для Карелии этот показатель равен 3000-3500 кг.

В связи с этим перед научными сотрудниками Мурманской ГСХОС была поставлена задача - разработать рекомендации по интенсификации молочного животноводства. И это удалось сделать еще до перехода к рыночным отношениям, хотя работа по

совершенствованию технологических процессов ведения отрасли продолжается и сейчас,

Динамика молочной продуктивности коров в условиях Мурманской области показана в таблице 1.

Таблица 1. ***Продуктивность коров***

Показатели	1980 г.	1990 г.	1996 г.	2001 г.	2002 г.
Удой коров за год (кг) в среднем по области	3680	4906	2969	5226	5544

Основными проблемами в молочном животноводстве Мурманской области до создания лаборатории кормления крупного рогатого скота в 1983 г. были: отсутствие роста молочной продуктивности коров за последние 15 лет (3600-3700 кг), низкая жирность молока (ниже 3,3 %) и небольшой выход телят на 100 коров (74-77%). При этом в хозяйствах области основными кормами (60-70% по питательности) были комбикорма, скармливаемые только в запаренном виде.

Всесторонне изучив указанные проблемы, были даны рекомендации уже в 1983 г. перевести животных на многократное (6-7 раз в сутки) скармливание концентрированных кормов в сухом виде. Результат начал сказываться уже в течение первых суток. Жирность молока поднималась на 0,2-0,3 % за счет нормализации обменных процессов в рубце. Были проведены сравнительные исследования по количеству инфузорий в 1 мл содержимого рубца. Коровы, которым скармливали концентраты в запаренном виде, в содержимом рубца имели через 0,5-3 часа после кормления только сотни инфузорий, а при сухом многократном скармливании – 1-1,5 млн. инфузорий в 1 мл.

После внедрения такого приема жирность молока поднялась в целом по всем хозяйствам области с 3,2 в 1982 г. до 3,6 в 1990 г. Оптимизация обменных процессов в организме способствовала увеличению выхода телят на 100 коров с 77 до 86%,и в целом подъему продуктивности коров (табл. 2).

Таблица 2. ***Показатели роста продуктивности коров***

Годы	Удой	Жирность	Выход телят на 100 коров
1982	3602	3,20	77,0
1983	3704	3,31	77,0
1984	3930	3,37	78,0
1985	3993	3,44	78,0
1986	4270	3,46	81,0
1987	4576	3,50	83,0
1988	4797	3,50	84,0

1989	4847	3,6	86,0
1990	4906	3,6	87,0

Начиная с 1980 г. на опытной станции были начаты исследования по скрещиванию животных холмогорской породы с голштинами. Повышение удоев полукровных животных по первой лактации в условиях опытов составило около 650 кг, по второй – 800 кг. В 1985 году была дана рекомендация по массовой голштинизации скота по разработанной научными сотрудниками станции схеме. В результате широкомасштабных работ по скрещиванию пород были созданы высокопродуктивные маточные семейства. По типу телосложения такие животные приближаются к голштинам, характеризуются обильной молочностью, ванно-чашеобразной формой вымени, крепкой и плотной конституцией, гармоничностью телосложения, выносливостью. Таким образом, произошло удачное сочетание признаков крупного рогатого скота местной холмогорской породы и выдающихся молочных признаков голштинского скота.

Примером для Мурманской области может служить опыт работы специалистов и животноводов одного из наших базовых хозяйств – совхоза «Полярная звезда», которые создали выдающееся стадо крупного рогатого скота с удоем коров в 2002 году 7694 кг и с предпосылкой получить в 2003 году 8500 кг молока от каждой из 650 коров. Кроме того, еще 5 хозяйства перешагнули в прошлом году 7000-й рубеж, в том числе и наше ГУЛ ОПХ «Рассвет». Прибавка к уровню 2001 г. составила 2249 кг молока от каждой коровы.

Следует заметить, что все эти выдающиеся, для условий Севера, показатели получены на основе разработок и рекомендаций, предложенных научными сотрудниками Мурманской ГСХОС. Все эти разработки содержат в себе основы знаний полученных в ведущих институтах страны, таких как ВНИИФБиП, ВНИИГРЖ, ВИЖ и др. Опираясь на научные разработки ведущих институтов страны и зарубежья, на опытной станции были проведены исследования по определению оптимального содержания сырого протеина по стадиям лактации. В условиях базовых хозяйств была определена растворимость в рубце коров белков различных кормов путем инкубации in vivo в рубце животных (табл. 3) и установлено оптимальное соотношение растворимых и труднорастворимых фракций белков по стадиям лактации. Установлено, что оптимальным уровнем растворимых фракции является 45% в первой и второй стадиях лактации.

В опытах были подвергнуты термической и химической (формальдегидом) обработке различные виды ценных кормов (комбикорм, подсолнечниковый шрот), при этом расщепляемость их снизилась до 20%. Скармливание обрабатываемых кормов повышало продуктивность лактирующих коров.

*Таблица 3.**Расщепляемость протеина кормов в рубце коров***

Корма	% расщепляемости протеина	Корма	% расщепляемости протеина
Сено злаковое	52	Рыбная мука	26
Сено клеверное	56	Ячмень	80
Сено люцерновое	64	Пшеница	80
Силос однолетних трав	83	Кукуруза	30
Свекла кормовая	80	Отруби пшеничные	50
Мука травяная	33	Мука хвойная	25
Комбикорм для КРС	56	Картофель	80
Шрот соевый	32	Жом свекловичный	21
Шрот подсолнечный	60	Пивная дробина	29
Шрот рапсовый	63		

При исследовании оптимального содержания клетчатки в сухом веществе рациона коров было установлено, что в I-ю фазу лактации уровень клетчатки не должен превышать 20%, во вторую – 23%. При этом было установлено, что уровень нейтральнодетергентной клетчатки в I и II фазы лактации должен быть в пределах 40-41,5 % соответственно, а кислотнодетергентной – 25-24%. При этом продуктивность коров опытной группы была выше, чем в контрольной на 2,25 кг, а во второй – на 1,4 кг 4%-ного молока.

Одним из самых важных элементов создания высокопродуктивного молочного стада является выращивание молодняка. Целью таких исследований является выращивание здоровых ремонтных телок, способных реализовать генетический потенциал данного типа скота. Ответственным звеном в целенаправленном выращивании ремонтного молодняка являются первые 10 дней после рождения. Помимо кормления, очень важно, чтобы телята не заболели в этот период. Для этого была разработана схема содержания – «все свободно – все занято». Родильное отделение разбивается на секции, каждая секция заполняется в течение максимум 3 суток, лучше за 1 сутки. Секция тщательно дезинфицируется. Телята содержатся на цементном полу без клеток, но со слоем 15-20 мм высушенных и продезинфицированных опилок, не более 10-12 дней. Затем переводятся в следующее отделение, а бокс дезинфицируется в течение 3 суток.

Второе немаловажное значение в выращивании отводится кормлению с получением прироста живой массы не ниже 700 г в сутки. При этом в первые три месяца, в период формирования органов, ответственных за будущую лактацию, привесы должны быть не менее 900-1000 г в сутки. Особенностью системы выращивания является то, что в период полового созревания в возрасте 10-14 месяцев, привесы должны быть не более 400 г в сутки.

Выращенные таким образом ремонтные телки достигают в 16-18 месяцев живой массы 400-420 кг и после этого осеменяются. Вес первотелок при отеле достигает 530-560 кг и более. В настоящее время первотелки с удоем 20-23 кг в сутки выранжировываются в совхозе «Полярная звезда» и других хозяйствах.

Важным элементом в получении высокой продуктивности является приучение к машинному доению. Начиная с 7 месяцев стельности, нетелям делают пневмомассаж с помощью вакуумного колокола. За 20 дней до отела массаж прекращают, чтобы избежать отека вымени.

В сухостойный период, за три недели до отела, как коровам, так и нетелям в рацион в обязательном порядке вводятся корма, богатые жирами (жмых, кукуруза, овес). Как известно поступление жиров с кормами тормозит липазную активность в подкожной жировой клетчатке, в противном случае высокопродуктивные коровы погибают от жирового перерождения печени. Это связано с тем, что все свободные жирные кислоты крови проходят через печень, тогда как кормовые жиры, минуя печень, идут прямо в молочную железу и используются для синтеза жира молока.

В настоящее время научные сотрудники станции распространяют опыт повышения продуктивности коров, по просьбе руководителей хозяйств, в соседней с Мурманской областью республике Карелия.

В ООО «Мийнала» Питкарянтского района республики Карелия в 2002 году продуктивность коров составляла около 2000 кг молока в год. В текущем году при внедрении разработанных нами рекомендаций продуктивность достигнет минимум 4500 кг. Результатом такого повышения прежде всего является сбалансированное по всем показателям кормление животных, рассчитанное на данную продуктивность.

Мы пытались создать базу для получения более высокой продуктивности, но взрослые животные, имея высокий генетический потенциал (матери отцов имели продуктивность 10-12 тыс. кг молока) из-за плохих условий выращивания в первые месяцы жизни, оказались неспособными адекватно реагировать на улучшенное кормления.

Приведенные нами данные подтверждают значимость правильного выращивания животных и оптимизации условий их питания с целью получения высокой продуктивности.

ВЛИЯНИЕ РАЗНОГО КАЧЕСТВА ПРОТЕИНА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ РАЦИОНОВ НА СТЕПЕНЬ ПРЕВРАЩЕНИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССОВ ИХ ФЕРМЕНТАЦИИ И СИНТЕЗА МИКРОБИАЛЬНОГО БЕЛКА В РУБЦЕ

Г.И. Левахин, А.Г. Мещеряков
Всероссийский НИИ мясного скотоводства

Попытки увеличить степень использования азотистых веществ кормов приводят к необходимости выявления факторов, влияющих на процессы превращения, всасывания и использования их жвачными животными. По мнению большинства исследователей, к факторам, влияющим на степень использования азотистых веществ у жвачных, относятся: физиологическое состояние животных, структура рациона, доступность, соотношение и качество составных веществ кормов, режим кормления, способы приготовления и скармливания кормов.

Одним из малоизученных вопросов является влияние концентрации ОЭ рациона на эффективность использования протеина разного качества, позволяющих повысить степень использования азотистых веществ без существенных изменений условий производства.

Повышенный интерес к этой теме вызван необходимостью совершенствования существующих норм протеинового питания жвачных животных, до настоящего времени мало учитывающих особенности их физиологии.

Составление рационов только по количеству сырого и переваримого протеина, без учета распадаемости последнего и ферментативно-биохимических процессов в преджелудках, часто приводит к перерасходу кормового белка, недополучению и удорожанию продукции и нарушениям обмена веществ. Особую значимость эти вопросы приобретают при кормлении молодняка крупного рогатого скота. В молодом возрасте за счет синтеза белка и аминокислот в рубце может быть в среднем обеспечено 40-50% потребности, остальное их количество должно поступать с кормом, избегая разрушения в рубце.

Целью проведения наших исследований явилось получение экспериментальных данных об использовании протеина разного качества бычками симментальской породы мясного направления продуктивности и влияние концентрации ОЭ рациона на эффективность его использования. Во все периоды опыта рационы кормления составлялись на основе детализированных норм, разработанных во Всероссийском НИИ мясного скотоводства и позволяющих получать среднесуточный прирост на уровне 1000-1100 г. Бычкам, разделенным на четыре группы, в период с 10- до 15-месячного возраста скармливали рационы, содержащие примерно одинаковое количество основных питательных веществ, но различных по концентрации ОЭ и качеству протеина.

После подготовительного периода животные в течение 20 суток были постепенно переведены на режим опыта, предусматривавшего кормление бычков 1-йгруппы рационами с расщепляемостью протеина 75% и КОЭ – 9,5 МДж/кг, во 2-й группе данные показатели составляли 75% и 10,5 МДж/кг, в 3-й – 70% и 9,5 МДж/кг, в 4-й группе – 70% и 10,5 МДж/кг (табл. 1).

Таблица 1. ***Фактические рационы кормления подопытных бычков, кг/сут***

Показатели	Группы			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Сено житняковое	4,35	1,98	4,23	2,00
Сенаж ячменный	6,20	5,90	6,80	6,20
Ячмень дробленый	3,30	4,20	3,20	4,50
Жмых подсолнечниковый	0,80	1,00	-	-
Мясокостная мука	-	-	0,63	0,75
Патока	0,70	1,50	1,00	1,50
В рационах содержится:				
сухого вещества	10,02	9,06	10,03	9,08
обменной энергии, МДж	95,20	96,80	96,90	96,40
сырого протеина	1,31	1,31	1,31	1,31
переваримого протеина	0,71	1,57	0,70	0,87
клетчатки	2,04	1,34	1,95	1,26
Концентрация ОЭ, МДж/кг СВ	9,50	10,60	9,60	10,60

В процессе проведения исследований нами была установлена неоднозначная реакция организма животных на изучаемые факторы. Это выражалось в изменениях рубцового пищеварения и формировании мясной продуктивности.

Отмеченные в рубцовом пищеварении изменения обусловлены фактором кормления подопытного молодняка. Скармливание рационов с более высокой концентрацией ОЭ интенсифицировало работу рубца, что выражалось в усилении синтеза микробиального белка и утилизации основных метаболитов рубцового пищеварения. Концентрация летучих жирных кислот (ЛЖК) в рубце этих животных повышалось и обуславливала сдвиг pH в кислую сторону. В нашем опыте содержание суммы ЛЖК во 2-й и 4-й группах составило 10,6-11,8 ммоль в 100 мл рубцового содержимого, что по сравнению с бычками из 1-й и 3-й групп, соответственно на 3,5 и 2,7 ммоль было выше. Это объясняется усилением бактериальной ферментации корма,

обусловленной повышением общей питательности рационов и достаточным количеством легкопереваримых углеводов и белков.

Качество протеина способствовало лишь незначительному увеличению концентрации ЛЖК. Тенденцию к некоторому увеличению их в этом случае, вероятно, можно объяснить тем, что протеин мясокостной муки малодоступен воздействию микроорганизмов и они замедляют свое развитие, освобождая место для целлюлозолитических штаммов, которые, в свою очередь, усиливают сбраживание углеводов, повышая количество летучих жирных кислот (табл.2).

Таблица 2. ***Влияние КОЭ и разного качества протеина на основные показатели метаболизма в рубце***

Показатели	Группы			
	1-я	2-я	3-я	4-я
pH	7,01±0,17	6,22±0,14	7,15±0,15	6,16±0,16
Общий азот, ммоль/л	326,3±9,12	294,3±3,08	206,4±2,20	473,0±1,87
Белковый азот, ммоль/л	276,0±3,67	255,9±3,60	138,0±4,05	126,0±2,16
ЛЖК, ммоль/100 мл	7,10±0,11	10,60±0,18	9,10±0,53	11,80±0,17
NH_3, ммоль/л	25,20±0,82	19,90±0,46	18,97±0,42	14,60±0,25
Биомасса бактерий, г/100 мл	4,6	3,8	4,2	3,6
Биомасса простейших, г/100 мл	13,8	11,9	12,9	11,0
Количество инфузорий, тыс/мл	1115±20,13	720±10,64	879±21,53	645±17,96

Такая гипотеза позволяет более полно обосновать факт повышения переваримости сырой клетчатки, который мы описали выше.

Величина pH, затронутая при описании ЛЖК, оказывает значительное влияние на метаболические процессы в рубце. От нее в значительной степени зависит их направленности. В нашем опыте реакция среды на протяжении всего периода исследований была близка к нейтральной. Однако в группах с более высокой КОЭ наблюдалось снижение pH рубцовой жидкости на 0,8-1,0 ед. Микроорганизмы рубца бычков подопытных групп проявили неодинаковую протеолитическую активность. В связи с этим в рубцовой жидкости была отмечена разница в концентрации аммиака. По результатам проведенных исследований четко видно, что оба изучаемых нами фактора оказали влияние на концентрацию аммиака в рубцовой жидкости. Так, дача труднорасщепляемого белка способствовала уменьшению количества аммиака на 5,38-6,33 ммоль. Такая же закономерность наблюдалась и при использовании рационов с более высокой концентрацией ОЭ. Снижение количества аммиака в упомянутых группах происходило, в основном, за счет повышения уровня углеводов и их лучшей ферментации целлюлозолитическими и амилолитическими бактериями в рубце.

Высокое содержание аммиака свидетельствует о его низком усвоении микроорганизмами, что сопровождается высокими потерями азота. Таким образом, продуктивность будет увеличиваться лишь в том случае, если количество распадающегося в рубце протеина рациона невелико, а потребление энергии достаточно для его усвоения.

Определение общего азота в содержимом рубца бычков позволило судить о количественном содержании азотистых соединений в рубце, которые являются конечными или промежуточными продуктами распада питательных веществ и их синтеза. Их концентрация в содержимом рубца также находилась в тесной зависимости от уровня и типа кормления.

Использование высокорасщепляемого протеина привело к достоверному увеличению количества общего азота на 58,0-70,0% в рубцовой жидкости, при одновременном снижении остаточного азота на 22,4-36,0% ($P<0,05$). Повышение концентрации ОЭ в рационе, напротив, вызвало снижение этого показателя на 11,0-19,0%, которое происходило как за счет белкового, так и остаточного азота. Увеличение белкового азота в 1-й и 2-й группах обусловлено более высокой расщепляемостью протеина рациона и переходом азота корма в жидкость рубца.

Активное расщепление в рубце протеина способствовало повышению использования его для синтеза бактериального белка. Определение численности инфузорий позволило подтвердить это. Увеличение концентрации ОЭ привело к уменьшению их количества на 36,3-54,9%. По нашему мнению, снижение количества микроорганизмов происходит, в основном, за счет целлюлозолитических штаммов, что объясняется снижением уровня доступной для расщепления клетчатки в рационе на 5,5%. Уровень бактериального азота изменялся лишь в зависимости от концентрации ОЭ. Уменьшение распадаемости протеина рационов за счет использования кормов с разным качеством протеина не оказало заметного влияния на этот показатель.

Обращает на себя внимание тот факт, что содержание азота в биомассе бактерий было на 5,6-10,3% выше, чем в биомассе инфузорий. Концентрация бактериальной и протозойной массы рубцовой жидкости бычков зависела в большей степени от концентрации ОЭ, чем от качества протеина.

С увеличением концентрации ОЭ биомасса бактерий и простейших уменьшилась на 14-17%. Использование же мясокостной муки способствовало снижению в биомассе микроорганизмов лишь на 5,8-8,7%. Данные о концентрации биомассы инфузорий и бактерий в рубце бычков в литературе очень разноречивы. По количеству биомассы в рубцовой жидкости можно судить о синтезе бактериального белка. В нашем опыте в рубце бычков, получавших труднорасщепляемый протеин, этот процесс незначительно замедлялся, а повышение концентрации ОЭ приводило к значительному снижению этого показателя.

Результаты контрольного убоя, проведенного в конце опыта, позволили установить, что использование рационов с различной степенью деградации протеина в рубце и концентрацией ОЭ, оказали неодинаковое влияние не только на интенсивность роста, но и на выход продуктов убоя. Абсолютные и относительные показатели парных туш у животных всех изучаемых групп были сравнительно высокими и имели высокую корреляцию с величиной убойной массы. По этому показателю животные 1-й группы уступали своим сверстникам из 2-й, 3-й, 4-й групп соответственно на 19,3; 11,6% и 24,2 % ($P<0,05$).

Увеличение убойного выхода было характерно для бычков 4-й группы – 60,0%, которые превосходили по этому показателю животных из 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно на 1,5%, 0,4 и 1,0% ($P<0,05$). С возрастом происходило увеличение выхода мякоти и постепенное снижение выхода костей. Наибольшее количество мякоти получено от бычков, которым скармливали в составе высокоэнергетических рационов высокобелковые корма. Разница по отношению к 1-й группе составила 11,0-20,5 кг ($P<0,001$), к 3-й - 6.6-11,0 кг ($P<0,05$) соответственно.

Повышение концентрации ОЭ рационов и использование труднорасщепляемого протеина в кормлении жвачных животных способствовало увеличению отложения всех питательных веществ в тканях и органах животных. К концу опытного периода максимальное количество питательных веществ было отложено в тканях и органах съедобной части тела животных 4-й группы. Так, содержание жира составило в 4-й группе 29,18 кг, что на 4,97 и 2,92 кг выше, чем в 1-й и 3-й и на 1,16 кг, чем во 2-й группе. Разница по общему содержанию протеина в 1-й, 3-й, 2-й группах по отношению к 4-й группе составила соответственно 5,84; 3,35 и 1,8 кг.

Использование труднорасщепляемого протеина в нашем случае способствовало повышению степени трансформации протеина в ткани организма, повышая, тем самым, коэффициент конверсии протеина (ККП) на 0,6-1,3%. Повышение концентрации ОЭ рационов увеличивало его величину на 1,7-2,4%. Вместе с тем, КОЭ рационов оказала заметное влияние на эффективность использования животными энергии. Максимальное значение коэффициента ее конверсии (ККОЭ) было зафиксировано в 4-й группе - 9,0%, что на 2,2; 0,7 и 1,4% выше, чем в 1-й, 2-й и 3-й группах соответственно (табл.3).

Таблица 3. ***Фактические рационы кормления подопытных животных, кг/гол/сут***

Показатели	Группы			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Сено люцерновое	7,38	7,20	7,13	6,37
Ячмень дробленный	0,66	0,66	0,66	0,66
Сахар	-	1,1	-	-
Крахмал	-	-	1,3	-
Целлюлоза	-	-	-	2,0
В рационах содержится:				

сухого вещества	8,23	7,77	7,65	7,51
обменной энергии, МДж	73,21	76,75	75,04	72,43
сырого протеина	0,98	1,11	1,10	0,99
переваримого протеина	0,59	0,69	0,65	0,61
сырой клетчатки	2,49	1,86	1.84	3,63
сахара	0,41	1,25	0,28	0,23
крахмала	0,32	0,33	1,6	0,31
БЭВ	3,83	4,00	3,87	2,61
Концентрация обменной энергии, МДж/кг	8,96	9,88	9,81	9,64
Энерго-протеиновое отношение	0,14	0,16	0,1	0,15
Сахаро-протеиновое отношение	0,7	1,8	0,43	0,38
Крахмало-сахарное отношение	0,78	0,27	5,7	1,35

В последние годы в странах с развитым животноводством нормирование питания крупного рогатого скота осуществляется на основе современных научных достижений в оценке питательности кормов и рационов и физиологического контроля полноценности кормления. В ряде стран поставлены на разработку и частично уже используются принципиально новые интегрированные системы нормированного питания жвачных, основанные на учете образования конечных продуктов переваривания питательных веществ кормов и ориентированные на использование в зоотехнической практике современной компьютерной техники.

Вместе с тем, данные о процессах динамики ферментации углеводистых компонентов корма в рубце молодняка крупного рогатого скота противоречивы и недостаточны. В связи с этим нами была поставлена задача – проследить влияние различных источников обменной энергии на процессы рубцового пищеварения и динамику гидролиза легко- и трудноперевариимых углеводов. В период с 2001-2002 гг. в условиях скотдвора ОПХ «Экспериментальное» ВНИИМСа проводились физиологические опыты. Для проведения их было отобрано 12 бычков герефордской породы, которые по принципу аналогов были разделены на 4 группы по 3 головы в каждой (контрольная и 3 опытных).

Животные контрольной группы получали основной рацион, составленный на основе детализированных норм кормления для получения 800-900 г. среднесуточного прироста (Калугин и др., 1991). В его состав в среднем входили ячмень дробленный 0,7 кг, сено люцерновое 5 кг и сено суданской травы 5 кг. Бычкам из опытных групп 20% ОЭ основного рациона было заменено на используемые углеводы, которые вводили в рубец путем инфузии через фистулу рубца. Сахар и крахмал разбавляли в теплой воде и вводили в рубец через фистулу. В качестве источника целлюлозы использовали фильтрованную бумагу, которую предварительно измельчали на мельнице, смачивали в буферном растворе и вводили в рубец. Для изучения процессов пищеварения из рубца через фистулу отбирали пробы (300 мл) рубцового содержимого в динамике: до кормления, после кормления через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16 и 20 ч, которые фильтровали через 4 слоя марли и в жидкой её части определяли основные показатели метаболизма рубца (ионометром ЭВ-74).

Следует отметить, что динамика концентрации летучих жирных кислот в рубцовой жидкости у животных всех опытных групп была подчинена общим закономерностям. Так, наименьшая ее величина отмечалась перед началом кормления, а наивысший пик варьировал от 5 до 6 часов, а при инфузии целлюлозы даже в 8 часов (табл.4).

Таблица 4. ***Динамика концентрации ЛЖК в рубце подопытных животных после кормления ммоль/100 мл***

Время взятия проб	Группы			
	1	2	3	4
0 часов до кормления	8,64±0,25	6,50±0,04	8,55±0,55	10,35±0,06
0 часов до инфузии	-	12,40±0,12	14,9±0,08	10,65±0,02
1	9,92±0,18	12,90±0,04	14,0±0,20	12,55±0,02
2	10,4±0,25	13,97±0,10	12,7±0,10	12,8±0,10
3	10,97±0,45	15,30±0,06	14,35±0,30	13,95±0,06
4	11,5±0,08	15,90±0,08	15,1±0,04	14,85±0,02
5	10,85±0,04	16,60±0,10	15,35±0,02	14,94±0,09
6	10,3±0,83	14,30±0,04	15,53±0,07	16,7±0,19
8	10,2	13,60±0.08	14,95±0,06	16,8±0,10
10	10,15	12,60±0,10	14,7±0,04	15,86±0,02
12	10,1±0,23	11,90±0,06	13,9±0,08	13,7±0,09
16	9,98	10,90±0,10	12,65±0,02	11,1±0,08
20	9,87±0,45	7,50±0,19	9,95±0,06	9,55±0,22

До кормления концентрация ЛЖК в рубце бычков 3-й группы составляла 10,35 ммоль в расчете на 100 мл, что на 59,2% выше, чем у молодняка 2-й группы и на 19,8 и 21,1% бычков 1-й и 3-й групп. После кормления количество ЛЖК в рубце всех подопытных животных повышалось. Так, если до кормления этот показатель у бычков 2-й группы составлял 6,5±0,04 ммоль/л, то через 1 час после кормления наблюдалось повышение на 98,5%, а через 3 и 5 часов на 135,4 и 155,4%.

Максимальная концентрация летучих жирных кислот в рубцовой жидкости животных, получавших сахар, наблюдалась через 5 часов после кормления и составляла 16,6 ммоль/л. В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение и уже через 6, 8, 12 и 20 часов после кормления этот показатель снизился соответственно – на 16,1, 22,1, 39,5 и 121,3%. Если сравнивать течение этого процесса в рубце молодняка 1-й и 2-й групп, то можно отметить, что количество ЛЖК у бычков 2-й группы было несколько выше. Так, максимальное ее количество у бычков 1-й группы было зафиксировано через 4 часа после кормления и составило лишь 11,5 ммоль/100 мл, что на 38,3% ниже, чем у животных 2-й группы в это же время.

На рационе с использованием крахмала уже через 1 час после кормления отмечалось резкое повышение количества ЛЖК до 14,0 ммоль/100 мл, что на 41,1% превосходило этот показатель у бычков из 1-й группы. Это обстоятельство повлияло на сдвиг показателя концентрации водородных ионов в рубце у бычков 3-й группы в

кислую сторону, что, вероятно, связано с быстрым сбраживанием декстрина. В дальнейшем исследование жидкости рубца показало, что через 2 часа после кормления у этих животных отмечалось некоторое понижение количества летучих жирных кислот, после чего концентрация их снова возрастала и достигала своего пика через 6 часов после кормления. При этом ее величина на 8,6 и 50,8% была выше, чем соответственно у бычков из 2-й и 1-й групп в этот промежуток времени. Самая высокая концентрация ЛЖК - 16,8 ммоль/100 мл была у бычков 4-й группы, получавших целлюлозу. В динамике наблюдалось ее постепенное увеличение в течение 8 часов, а затем с аналогичной последовательностью происходил спад первоначального показателя. Сравнивая данные, полученные при исследовании рубцовой жидкости бычков 1-й и 4-й групп, можно отметить, что концентрация ЛЖК последних была практически всегда выше. Так, через 2, 4, 8 и 16 часов разница по этому показателю составила 23,1, 29,1, 64,7 и 11,2% в пользу животных 4-й группы.

Таким образом, знания о динамике гидролиза основных питательных веществ в рубце и влиянии разных факторов кормления на этот процесс, позволяют влиять на направленность метаболических реакций, состав и синтез микрофлоры в рубце, а также в дальнейшем прогнозировать количество и качество продукции.

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ ЛАКТИРУЮЩИМ КОРОВАМ КОМБИКОРМОВ С МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИЕЙ МЭК-СХ-3 НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ИХ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

В.Л. Владимиров, П.А. Науменко, А.И. Юрьев, А.В. Головин

В целях создания прочной кормовой базы для молочного животноводства, в частности для коров, в последнее время намечается тенденция использования в рационах дойных коров различных кормовых добавок, в том числе ферментных препаратов.

В этом плане сотрудники отдела кормления ВИЖа совместно с коллегами Института биотехнологии разработали и испытали различные кормов добавки серии МЭК на различных видах сельскохозяйственных животных целью изучения влияния их на продуктивность и обмен веществ в организме.

В задачу исследований входило изучение влияния биологически активной кормовой мультиэнзимной композиции МЭК-СХ-3, при скармливай её в составе комбикорма-концентрата с преимущественным содержанием пшеничных отрубей, на физиолого-биохимическое состояние организма высокопродуктивных коров; интенсивность и направленность обменных процессов в их организме; на потребление кормов рациона, переваримость использование питательных веществ и на молочную продуктивность. Конечной задачей являлось определение экономической эффективности целесообразности использования МЭК-СХ-3 в кормлении лактирующих коров.

Для реализации поставленных задач в опытном хозяйстве ВИЖа «Дубровицы» в зимне-стойловый период был проведен опыт на 16 новотельных коровах черно-пестрой породы с удоем по предыдущей лактации около 7 тыс. кг и жирностью молока 4,3%, распределенных в две группы по 8 животных каждой, по нижеследующей схеме (табл. 1).

Таблица 1. ***Схема опыта***

Группы	Количество животных	Продолжительность опыта, дн.	Характеристика кормления
1-контрольная	8	100	ОР[x] + комбикорм №1
2-опытная	8	100	ОР + комбикорм №2

x) ОР ─ основной рацион

Согласно схеме опыта первая группа коров получала комбикорм-концентрат №1, позволяющий балансировать рацион кормления коров в соответствии с требованиями детализированных норм кормления для данной продуктивности. Для коров второй группы в состав аналогичного комбикорма-концентрата под №2 была включена мультиэнзимная композиция МЭК-СХ-3, из расчета 0,1% от массы скармливаемого комбикорма.

Основной рацион состоял из сенажа злако-бобовых трав, силоса кукурузного, свеклы кормовой. Сенаж и силос скармливали вволю, а кормовую свеклу из расчета 0,7-0,8 кг на литр молока, а затем патоку (после того как закончилась свекла) из расчета 2-2,5 кг на голову в сутки. Количество концентратов нормировали в зависимости от продуктивности животных из расчета 350 г на 1 литр молока. Корректировку скармливания комбикорма проводили после контрольных доек. Содержание коров в период проведения опыта было стойловое с выгулом, кормление трехразовое, поение из автопоилок при свободном доступе. Молочную продуктивность учитывали путем проведения ежедекадных контрольных доек с ежемесячным определением содержания жира и белка в молоке. В конце опыта был проведен балансовый опыт на трех животных из каждой группы с целью изучения переваримости и использования питательных веществ рациона, для чего анализу подверглись все корма, входящие в состав рациона, а также кал, моча, кровь и молоко. О состоянии обмена веществ у коров судили по биохимическим показателям, характеризующим белковый, углеводно-жировой, минеральный обмены, а также витаминную обеспеченность и ферментативную активность в организме.

Вся зоотехническая часть опыта выполнялась сотрудниками лаборатории комбикормов и кормовых добавок ВИЖа. При анализе показателе полноценности кормления подопытных животных установлено, что рацион животных обеих групп были хорошо сбалансированы и отвечали существующим требованиям детализированных норм кормления.

Для биохимических анализов кровь у коров брали из яремной вены через 4 часа после начала утреннего кормления.

Известно, что жизнедеятельность живого организма представляет собой единый процесс, в котором обмен белков и их производных азотистых веществ, обмен жиров, углеводов и минеральных соединений тесно связаны между собой посредством сложной цепи превращения биологически активных веществ, т.е. процесс обмена веществ. Что касается белков, то следует отметить, что белки или протеины ─ важнейший класс биологически активны веществ. Они играют ключевую роль в клетке, присутствуют в виде главных компонентов в любых формах живой материи, будь то микроорганизмы, животные или растения.

Для выяснения влияния мультиэнзимной композиции МЭК-СХ-3 на процессы жизнедеятельности у подопытных коров за основу взяли изучения прежде всего азотистого обмена, так как белковые вещества крови и продукты азотистого обмена в значительной степени дают возможность судить состоянии и направленности обменных процессов.

В наших исследованиях в таблице 2 представлены результаты биохимических исследований по содержанию общего азота и его фракций крови коров.

Таблица 2. ***Содержание общего азота и его фракций в крови, мг%***

Показатели	Контроль (п = 3)	Опыт (п = 3)
Общий азот	2949 ±210,9	2856±116,6
Белковый азот	2916,5±211,5	2819,4±115,8
Небелковый азот	32,8±0,62	36,6±1,13$^{x)}$
Аминный азот	7,1±0,42	6,6±0,09

X) P<0,05

Из таблицы видно, что содержание общего, белкового и аминного азота в крови коров опытной группы было ниже, чем в контрольной группе на 93 мг%, 97,7мг% и 0,5мг%, что составляет 3,2%, 3,3% и 7% соответственно. Более низкая их концентрация связана с более интенсивным использованием аминокислот, в основном свободных, на синтез белков тела и молока. Эти данные согласуются со многими литературными сообщениями и подтверждаются большей продуктивностью коров опытной группы в наших исследованиях.

Определение содержания небелкового азота в крови всегда используется для характеристики различных физиологических состояний. В состав фракции небелкового азота входят промежуточные и конечные продукты метаболизма (мочевина, аммиак, мочевая кислота, креатинин и др.), которые могут вовлекаться в обмен веществ, а также метаболиты, являющиеся пластическим материалом для синтеза белка (полипептиды и аминокислоты). В наших исследованиях установлено, что концентрация небелкового азота в крови коров опытной группы была достоверно (P < 0,05) выше, чем в контрольной на 11,6%. Это связано, видимо, с тем, что кормовая ферментная добавка содержит амилазу и протеазу, которые способствуют более активному образованию и всасыванию в кровь продуктов ферментации,

входящих в фракцию небелкового азота веществ, в том числе креатинина.

Важными показателями белкового обмена являются соотношение фракций белка, а также содержание в крови мочевины и креатинина (таб.3). Установлено, что по содержанию общего белка, альбуминов, глобулинов, а также по значению А/Г коэффициента за период опыта в сыворотке крови не произошло значительного перераспределения фракций белка как в контрольной, так и в опытной группах коров, что свидетельствует о физиологическом здоровье животных.

Таблица 3. ***Содержание белковых фракций, мочевины и креатинина в сыворотке крови коров.***

Показатели	Контроль п=3	Опыт п=3
Общий белок, г/л	90,5±4,1	90,6±3,6
Альбумин, г/л	35,3±2,1	35,4±0,84
Глобулины, г/л	55,1 ±2,97	55,1±4,47
А/Г коэффициент	0,64±0,04	0,65±0,06
Мочевина, мг%	14,4±2	12,5±0,5
Креатинин, мг%	1,72±0,17	1,78±0,14

Одним из основных продуктов обмена белков является мочевина, концентрация которой в крови коров опытной группы была ниже на 1,9мг%, что указывает на способность МЭК-СХ-3 препятствовать образованию большого количества токсичного аммиака и направлять его на образование мочевины, мочевой кислоты и др. В пользу усиления белкового обмена свидетельствует и повышение на 3,5% концентрации креатинина в их крови. Процесс обмена белка катализируется определенным набором и количеством ферментов, входящих в единую систему физиолого-биохимических процессов, происходящих в организме животных. К числу таких ферментов относятся активностью. Проведенные нами исследования показали, что активность ферментов переаминирования АСТ и АЛТ в сыворотке крови коров была неодинаковой (табл.4).

Таблица 4. ***Фермента тивная активность АСТ и АЛТ в сыворотке крови, ИЛ/л***

Показатели	Контроль (п=3)	Опыт (п=3)
АСТ	49,6±0,88	59,6±4,7
АЛТ	20,3±1,85	24,3±1,45

Данные табл.4 показывают, что хотя по активности ферментов переаминирования, содержащихся в сыворотке крови коров, достоверных различий между группами не установлено, тем не менее активность АСТ в крови коров опытной группы была выше на 20,1%, а АЛТ на 19,7%, чем в контрольной. Повышение активности АЛТ свидетельствует также об интенсификации использования аланина для

синтеза глюкозы, что подтверждается повышением концентрации глюкозы в крови коров опытной группы на 7,7%.

Данные табл.5 показывают, что в крови коров опытной группы содержание общих липидов, фосфолипидов и холестерина было выше, чем в контроле, на 10,8%, 33,8% и 9,6 % соответственно. Особенно значимо повышенное содержание холестерина, поскольку он является одним из важнейших структурных компонентов клеточных мембран, цитоплазмы и наружного слоя липопротеидов плазмы крови. От его количества зависят физико-химические свойства мембран, он участвует в создании осмотического давления клетки, регулирует её проницаемость, а также активность мембранных ферментов. Кроме структурной функции он выполняет также метаболическую роль, являясь предшественником ряда биологически активных веществ - желчных кислот, витаминов группы Д, стероидных гормонов. Есть сведения, что метаболизм этого соединения тесно связан с липидным обменом в целом, следовательно, чем выше его уровень, тем интенсивнее метаболизм липидов.

Таблица 5. ***Содержание липидных фракций и глюкозы в крови коров, мг%***

Показатели	Контроль (п=3)	Опыт (п=3)
Общие липиды	261,2±9,5	289,6±23,7
Фосфолипиды	113,3±8,21	151,6±26,8
Холестерин	94,2±2,20	103,3±11,6
Липидный индекс	0,43±0,0	20,52±0,06
Глюкоза	85,7±3,9	92,3±2,5

О более интенсивном обмене у животных опытной группы свидетельствует липидный индекс, определяемый путем деления количества фосфолипидов на количество общих липидов. Так как фосфолипиды являются самой мобильной фракцией, их относят к транспортной форме жиров, энергия сгорания которых идет на обеспечение биоэнергетических превращений - это и позволяет судить об интенсивности обмена липидов.

Наряду с использованием для энергетических целей липидов, основным источником энергии в организме является глюкоза, образующаяся при распаде и окислении поступающих с кормом углеводов, за счет которой удовлетворяется около 60% энергетических потребностей. Если поступление углеводов с кормом ограничено, то организм животного использует энергию, получаемую из промежуточных продуктов окисления липидов, а также из белков после их дезаминирования.

Использованная нами мультиэнзимная композиция МЭК-СХ-3 в составе комбикорма для лактирующих коров, судя по полученным данным, способствовала высокой степени гидролиза некрахмалистых полисахаридов корма, в результате чего значительное количество образовавшейся глюкозы поступало в кровь, где её концентрация у опытных коров была выше на 7,7%.

Существенное значение для живого организма имеют минеральные и биологически активные вещества, к которым следует отнести макроэлементы кальций и фосфор, а также витамины, концентрация которых представлена ниже (табл.6).

Таблица 6. ***Содержание минеральных веществ и витаминов в крови коров, мг%***

Показатели	Контроль (п=3)	Опыт (п=3)
Кальций	10,1±1,7	11,7±0,27
Фосфор	5,7±1,3	6,0±0,71
Витамин А	0,14±0,02	0,15±0,01
Каротин	0,26±0,07	0,27±0,01

Из табл. 6 видно, что содержание кальция в крови опытных коров было выше, чем в контроле на 15,8%,что свидетельствует о положительном влиянии ферментной кормовой добавки на интенсивность пищеварительных процессов, способствующих лучшему усвоению кальция. Это подтверждается количеством отложенного элемента в теле, которое было выше, чем в контрольной группе на 8,9%. Выше на 5,7% была и концентрация фосфора в крови коров опытной группы.

Что касается витамина А и каротина, то концентрация их в крови была выше у животных опытной группы на 7,1% и 3,8% соответственно, чем в контроле. Это свидетельствует о том, что скармливание коровам экзогенной ферментной кормовой добавки оказало положительное влияние на процессы пищеварения, способствующие лучшему всасыванию каротиноидов и доставки их кровотоком в печень для синтеза витамина А и включения его, в комплексе с другими витаминами, в процессы регуляции белкового, жирового, углеводного, водного и минерального обменов, окислительно-восстановительного процессов, которые по своему действию на обмен веществ в отдельных случаях приближаются к гормонам.

Известно, что в процессе обмена веществ в организме образуются кислые и щелочные вещества, в результате чего в тканях устанавливается их определенное соотношение: при преобладании первых развивается ацидоз, при преобладании вторых - алкалоз. Оба эти состояния нарушают обмен веществ и представляют определенную опасность для организма. При этом более опасны ацидозы, так как особенно часто они сопровождаются накоплением кетоновых тел и, в частности, бета-масляной кислоты. Поэтому определенный запас бикарбонатов в крови имеет важное значение для предупреждения избыточной кислотности крови, которую определяют путем выявления так называемой резервной щелочности, находящейся в норме в крови коров в пределах 52-85 об.%CO_2.

Наши исследования показали, что в этих пределах находилась резервная щелочность только у коров опытной группы (табл.7) и была

выше контроля на 26,6%, тогда как в контрольной группе коров, она была даже меньше допустимого нижнего предела на 13,3%.

Таблица 7. ***Уровень резервной щелочности в крови коров, об. %CO_2***

Показатель	Контроль (п=3)	Опыт (п=3)
Резервная щелочность	45,1±8,63	57,1±2,67

Это свидетельствует о том, что ферментная кормовая добавка способствовала лучшему всасыванию из кишечника в кровь минеральных веществ, создавая условия для формирования буферных систем, среди которых особое значение имеет бикарбонатная система, обладающая способностью связывать кислоты, образующиеся в организме в процессе обмена веществ.

Таким образом, можно констатировать, что скармливание высокопродуктивным лактирующим коровам комбикорма - концентрата с содержанием мультиэнзимной композиции МЭК-СХ-3 оказало положительное влияние на обмен веществ в их организме, что способствовало хорошей поедаемости кормов, переваримости и усвояемости питательных веществ рациона и положительно отразилось на уровне молочной продуктивности.

На основании учета задаваемых кормов и их остатков было рассчитано среднесуточное потребление кормов подопытными коровами за 100 дней научно-хозяйственного опыта и усредненная питательность рационов. За время проведения опыта животные опытной группы потребляли их почти на 0,5 кг больше. Однако эти отличия зависели не от разной поедаемости, а были связаны с различной продуктивностью животных, поскольку комбикорма нормировались строго в соответствии с уровнем молочной продуктивности, из расчета 350 г на 1кг молока натуральной жирности.

Результаты физиологических исследований показали, что коэффициенты переваримости практически всех питательных веществ были выше у животных опытной группы. Так, коэффициенты переваримости сухого вещества были выше на 2,1% по сравнению с контролем, органического вещества на 2,5%, протеина на 1,7%, жира на 1,9% и клетчатки на 3,9%, а в среднем переваримость питательных веществ рациона коровами опытной группы была выше на 1,8 абс. процента.

Показатели молочной продуктивности опытных животных и затрат кормов приведены в табл. 8.

Содержание белка в молоке коров второй группы было выше на 0,03 абс. процента, что в свою очередь сказалось на увеличении выхода молочного белка на 4,6% по сравнению с контролем, хотя различия по этому показателю были недостоверными. Затраты кормов на 1 кг молока 4% жирности различались между группами несущественно. Это было обусловлено повышенной энергетической питательностью рациона коров опытной группы и лучшей переваримостью

питательных веществ рациона у них. Затраты сухого вещества у коров опытной группы были ниже на 4,2%.

Таблица 8. ***Молочная продуктивность коров***

Показатели	контроль	опыт
Валовый удой натурального молока, кг	2581 ±59	2712±62
Среднесуточный удой натурального молока, кг	25,8±0,59	27,1±0,62
Содержание жира в молоке, %	4,23±0,05	4,28±0,03
Содержание белка в молоке, %	2,92±0,02	2,95±0,02
Удой молока 4%-й жирности, кг	2727±59	2899±47$^{X)}$
Среднесуточный удой молока 4%-й жирности, кг	27,3±0,59	29,0±0,47$^{X)}$
Выход молочного жира, кг	109,1 ±2,35	116,0±1,88$^{X)}$
Выход молочного белка, кг	75,4±1,77	80,0±1,82
Затраты кормов на 1 кг 4%-го молока:		
-кормовых единиц	0,68	0,68
-ЭКЕ	0,76	0,77
Комбикормов-концентратов, г	331	328
Сухого вещества, г	766	734

X) P< 0,05

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что включение МЭК-СХ-3 в состав скармливаемых лактирующим коровам комбикормов-концентратов с 40% пшеничных отрубей, повышает молочную продуктивность животных при одновременном снижении затрат кормов, выраженных в граммах сухого вещества на единицу продукции.

Выводы

Скармливание лактирующим коровам комбикорма-концентрата с мультиэнзимной композицией МЭК-СХ-3:

- снижает содержание общего, белкового и аминного азота в крови коров опытной группы (на 3,2 %, 3,3 % и 7% соответственно) в результате интенсивного использования аминокислот, в основном свободных, на синтез белков тела и молока;

- препятствует образованию большого количества аммиака, превращающегося в мочевину, что подтверждается снижением концентрации мочевины в крови опытных коров на 13,2%, повышением концентрации креатинина на 3,5% и активности ферментов переаминирования АСТ и АЛТ на 21,1 % и 19,7% соответственно;

- повышает содержание в крови опытных коров общих липидов на 10,8%, фосфолипидов на 33,8%, холестерина на 9,6% и глюкозы на 7,7%, что свидетельствует об активизации липидно-углеводного обмена.

- увеличивает молочную продуктивность, в пересчете на среднесуточный удой молока 4%-й жирности, на 6,2% ($P < 0,05$), при снижении затрат кормов, выраженных в граммах сухого вещества на единицу продукции на 4,2%.

Предложения производству

Для повышения продуктивного действия комбикормов-концентратов, с преимущественным содержанием пшеничных отрубей, используемых в кормлении лактирующих коров, целесообразно обогащать их мультиэнзимной композицией МЭК-СХ-3, из расчета 1 г на 1 кг комбикорма.

ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОКОМПОНЕНТНЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК В РАЦИОНАХ ВАЛУХОВ И ДОЙНЫХ КОРОВ

А.П. Гаганов, Н.Г. Григорьев
ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса

На современном этапе развития скотоводства повышение молочной продуктивности животных, имеющих достаточный генетический потенциал, может быть достигнуто за счет полноценного сбалансированного кормления. Добиться такого положения можно повышением качества как объемистых кормов, так и концентратов.

Однако заготавливаемые объемистые корма собственного производства имеют низкую питательность и содержат в основном от 8,5 до 9,0 % сырого протеина, и от 8,0 до 8,5 МДж/кг СВ обменной энергии (Тащилин и др., 1997). За последнее десятилетие производство комбикормов в России сократилось почти в четыре раза и составило в 2000 г. всего 12 млн. тонн. В общем объеме концентратов удельный вес комбикормов для крупного рогатого скота составляет 21 % (Нестеров, 2001). Сокращение производства комбикормов произошло прежде всего из-за отсутствия денежных средств у потребителя и поставок дешёвых низкокачественных комбикормов производителями. Производство качественных комбикормов для крупного рогатого скота остается нерешенной задачей до настоящего времени.

Основным источником белка в комбикормах для скота являются производимые отечественной промышленностью подсолнечниковые жмыхи и шроты, в которых содержится около 30 % сырого протеина, и отруби. Включение в состав комбикормов импортных жмыхов и шротов из сои резко увеличивает их стоимость и снижает покупательную способность. Включение в комбикорма большого количества отрубей и подсолнечниковых жмыхов и шротов (с высоким содержанием клетчатки) снижает их энергетическую ценность. Злаковые концентраты собственного производства не могут сбалансировать рационы крупного рогатого скота по протеину и энергии и, тем самым, обеспечить высокий уровень продуктивности, что приводит к перерасходу кормов и снижению экономических показателей отрасли.

Поэтому возникла необходимость в разработке малокомпонентных кормовых добавок (МКД), которыми можно было бы заменить в рационе лактирующих коров практически весь комбикорм. Одним из путей повышения энергетического и протеинового потенциала злаковых концентратов является дополнение их семенами зернобобовых и масличных капустных культур. Но поскольку они содержат антипитательные факторы (глюкозинолаты, ингибитор трипсина, синильная кислота и т.д.), то требуется соответствующая технология их производства, позволяющая частично или полностью устранить отрицательное влияние антипитательных веществ на жвачных животных. Наиболее приемлемой технологией является совместная экструзия составляющих такие концентраты ингредиентов, повышающая доступность их питательных веществ для животных, а также улучшающая их санитарные качества.

Целью настоящих исследований было разработать рецептуру малокомпонентных кормовых добавок с использованием злакового зерна, семян вики и рапса. Задачей исследований предусматривалось установить влияние состава МКД и вида их обработки на переваримость питательных веществ рационов валухов; определить оптимальный уровень семян вики в составе МКД и норму их включения в рацион животных; провести проверку перспективных рационов с МКД на лактирующих коровах.

Для выполнения поставленных задач на валухах романовской породы были проведены научные эксперименты по изучению переваримости питательных веществ рационов, содержащих различный уровень МКД и различный уровень вики в их составе, при разных способах их обработки. Опыты проведены методом групп в условиях вивария, в трех повторностях. При проведении анализов использовали общепринятые методы исследований (Журавлев,1963; Петухова и др., 1989;Томме, 1969; Меркурьева, 1970; Григорьев и др., 1988, 1989, 1990; Овсянников, 1976; Калашников и др.,1986).

Для испытания были приготовлены следующие рецепты МКД с викой (в % по сухому веществу) :

1. Зерно ячменя - 80 %, семена вики - 20 %;
2. Зерно ячменя - 65 %, семена вики - 20 %, семена рапса - 15 %.

Зерно и семена в первом рецепте было размолото и обработано на маслопрессе ПШМ – 250; во втором рецепте обрабатывали только на ПШМ - 250. Приведенные рецепты испытывали в рационах, содержащих 75% силоса кукурузного и 25% МКД (по СВ). Кроме того были приготовлены, обработанные на маслопрессе ПШМ - 250, следующие рецепты МКД (по СВ):

1. Зерно ячменя - 70 %, семена вики - 15 %, семена рапса - 15 %;
2. Зерно ячменя - 55 %, семена вики - 30 %, семена рапса - 15 %:
3. Зерно ячменя - 40 %, семена вики - 45 %, семена рапса - 15 %.

Указанные варианты рецептов испытывали на валухах в рационах следующего состава (по СВ): а) силос кукурузный – 63-64 %, сено злаковое – 11-12 %, МКД – 25%, премикс для валухов – 1 %; б)

силос кукурузный – 42,5-43,5 %, сено злаковое – 11-12%, МКД – 45,5 %, премикс – 1 %.

Рецепт МКД, содержащий 30 % вики, апробировали в опыте на лактирующих коровах на Московской селекционной станции. Рационы животных отличались по составу используемых концентратов: в опытной группе это были МКД с викой, в контрольной – жмых подсолнечниковый и ячменная дерть.

При разработке рецептуры и способов приготовления исходили из того, что МКД должны обладать высоким энергетическим и протеиновым потенциалом. Уровень бобового компонента и количество кормовых добавок в рационах животных должны оказывать положительное влияние на переваримость питательных веществ рационов и продуктивность животных. Стандартные комбикорма содержат, как правило, от 14 до 22 % сырого протеина и от 11 до 13 МДж/кг СВ обменной энергии. В стартерных комбикормах для телят уровень сырого протеина доходит до 24-25 % (Крохина и др.,1990).

При выращивании вико-ячменной кормосмеси можно получить зернофураж, содержащий примерно 80 % злакового зерна и 20 % семян вики. Такая зерносмесь представляет собой практически готовый концентрат, который можно использовать в кормлении скота. Аналогичные по составу МКД, размолотые и обработанные на маслопрессе ПШМ-250, а также с добавлением 15 % семян рапса были апробированы в рационах валухов. Кормовые добавки, состоящие из зерна ячменя и вики, содержали (в сухом веществе) 12 МДж в 1 кг СВ обменной энергии и 22,2 % сырого протеина; с добавлением 15 % семян рапса - 13,2 МДж/кг СВ обменной энергии и 23,4 % сырого протеина. Влияние методов обработки и рецептуры МКД на переваримость питательных веществ рационов валухами демонстрируются данными таблицы 1.

Согласно полученным данным, обработка МКД на маслопрессе ПШМ-250 значительно увеличивала переваримость питательных веществ рационов валухами по сравнению с размолом. Так, переваримость сухого вещества возросла на 6,5, сырого протеина - на 11,7, сырого жира - на 18,3, сырой клетчатки - на 11,9 и БЭВ на 2,5 относительных процента.

Таблица 1. ***Влияние вида обработки и состава МКД на переваримость питательных веществ рационов валухов***

Номер рецепта	Вид обработки	Коэффициенты переваримости, %				
		СВ	СП	СЖ	СК	БЭВ
1	Размол	64,8	54,0	59,7	62,8	75,6
1	ПШМ-250	69,0	60,3	70,6	70,3	77,5
2	ПШМ-250	70,9	65,2	73,5	68,6	80,5

Добавление 15 % (по СВ) семян рапса в МКД, обработанные на ПШМ - 250, способствовало дальнейшему повышению переваримости

сухого вещества на 2,7 %, сырого протеина - на 8,1, сырого жира - на 4,1 и БЭВ - на 3,9 относительных процента. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о правильности подбора ингредиентов для МКД и технологии их приготовления.

Проведены также исследования по определению влияния уровня вики в МКД и самих МКД в составе рационов на переваримость питательных веществ рационов валухами. Кормовые добавки, содержащие 15, 30 и 45 % вики, имели 18,6, 20,3 и 23,8 % сырого протеина и 13,4, 13,5 и 13,7 МДж/кг СВ обменной энергии.

Содержание сырого протеина в МКД определяется уровнем введенного в их состав бобового компонента и количеством сырого протеина в компонентах, входящих в МКД. Результаты опытов по переваримости питательных веществ рационов валухами в зависимости от уровня вики в составе МКД и самих добавок в рационе представлены в таблице 2.

Таблица 2. ***Влияние МКД на переваримость питательных веществ рационов валухами***

Уровень вики в МКД, %	МКД в рационе, %	Коэффициенты переваримости, %				
		СВ	СП	СЖ	СК	БЭВ
15	25	62,2	65,3	72,4	48,8	72,6
30	25	62,5	65,8	79,8	52,1	69,3
45	25	58,5	69,3	85,7	42,7	65,5
15	45,5	66,2	65,1	79,5	46,2	78,0
30	45,5	64,7	66,7	82,7	45,9	74,9
45	45,5	63,0	65,5	82,8	40,6	77,9

Испытание трех рецептов МКД, включаемых в состав рационов валухов, показало, что увеличение количества вики в составе кормовой добавки с 15 до 30 % почти не повлияло на переваримость сухого вещества и сырого протеина, но способствовало повышению переваримости сырого жира и сырой клетчатки на 10,2 и 7,6 отн.%, и снижению переваримости БЭВ на 4,8 отн.%. Дальнейшее увеличение доли вики с 30 до 45 % в составе МКД увеличивало переваримость сырых протеина и жира на 5,3 и 7,4 отн.% и снижало переваримость сухого вещества, сырой клетчатки и БЭВ на 6,4, 18,0 и 5,5 относительных процента. При включении МКД в состав рационов валухов в количестве 45,5 % увеличение уровня вики с 15 до 30 % снижало переваримость сухого вещества на 2,3, сырой клетчатки на 0,6 и БЭВ на 4,0 отн.%, но при этом возрастала переваримость сырого жира на 4,0 отн.% и незначительно – сырого протеина. Дальнейшее увеличение уровня вики в составе МКД с 30 до 45 % привело к

снижению переваримости сухого вещества на 2,6 и сырой клетчатки на 11,5 отн.%. Переваримость сырых протеина и жира при этом практически не уменьшалась, а БЭВ даже увеличилась. Увеличение доли МКД в составе рационов валухов с 25 до 45,5 %, при содержании в них 15 и 30 % вики, способствовало повышению переваримости сухого вещества, сырого жира и БЭВ. При этом снижалась переваримость сырой клетчатки, а сырого протеина незначительно уменьшалась и была практически одинаковой. При 45 % включении вики в состав МКД переваримость сырого протеина, сырого жира и сырой клетчатки уменьшалась, а сухого вещества и БЭВ незначительно возрастала.

Согласно полученным данным включение 30 % вики в составе МКД, обработанных на экструдере, вероятно, следует считать максимальной величиной, которую можно использовать в кормлении жвачных животных. Для подтверждения этого вывода на Московской селекционной станции был проведен научно-хозяйственный опыт на первотелках голштинской породы. Кормовую добавку, состоящую на 55 % из зерна ячменя, 30 % семян вики и 15 % семян рапса готовили на экструдере. В сухом веществе МКД содержалось 13,4 МДж/кг СВ обменной энергии и 18,85 % сырого протеина. Продолжительность опыта 63 дня. Рацион животных обеих групп состоял из кукурузного силоса - 16,0 кг, сенажа - 9,0 кг, злакового сена - 2,5 кг и сухого жома - 1,0 кг. Дополнительно контрольная группа животных получала 4,5 кг подсолнечникового жмыха, 4,5 кг ячменной дерти и 0,3 кг мясо-костной муки. В опытной группе концентраты (9,0 кг) были представлены МКД. Кроме того, животные обеих групп получали по 110 г поваренной соли, 100 г трикальцидфосфата и премикс. Первотелки контрольной группы с рационом получали 17,2 кг сухого вещества, 175,4 МДж обменной энергии, 2,54 кг сырого протеина, 3,63 кг сырой клетчатки, 0,75 кг сырого жира, 8,97 кг БЭВ, 1 18 г кальция, 87 г фосфора. Рацион животных опытной группы содержал: 16,9 кг сухого вещества, 178,6 МДж обменной энергии, 2,48 кг сырого протеина, 3,11 кг сырой клетчатки, 0,92 кг сырого жира, 9,44 кг БЭВ, 109 г кальция, 74 г фосфора. Различия в питательности рационов обусловлены различиями в химическом составе концентратов и уровнем потребления кормов. В целом содержание питательных веществ в рационах соответствовало существующим нормативным данным.

За период опыта надой на корову в опытной группе составил 1277,3 кг или 20,3 кг на голову в сутки при жирности молока 3,51 %. В контрольной группе эти показатели соответствовали: 1302 кг, 20,7 кг и 3,56 %. В пересчете на 4 % молоко среднесуточный удой составил в опытной группе 17,8 кг, а в контрольной - 18,4 кг, что на 3,4 % больше, чем в опытной группе.

Содержание белка в молоке контрольных животных было на 7,4 % выше, чем в опытной группе. Количество энергии, выделенное с молоком, в контрольной группе составило 60,7 МДж, а в опытной группе - 59,1 МДж. Хотя животные находились на 2-4 месяцах

лактации, за период опыта не произошло снижения их живой массы: обе группы коров имели достаточно высокий среднесуточный прирост. В контрольной группе он составил 555 граммов, а в опытной - 710 граммов. В результате энергия продукции (энергия молока + энергия прироста живой массы) в опытной группе составила 76,9 МДж, а в контрольной - 74,6 МДж, то есть, несмотря на более высокую молочную продуктивность, энергия всей продукции в контрольной группе оказалась на 3,1% меньше, чем в опытной.

Важнейшим показателем использования сверхподдерживающей обменной энергии на продуктивные цели являются её затраты на синтез 1 МДж энергии продукции. В проведенных исследованиях эти затраты в контрольной и опытной группах оказались одинаковыми и составили 1,70 МДж. В результате эффективность использования сверхподдерживающей обменной энергии на производство продукции в обеих группах была практически одинаковой – 58,7 %.

Расход переваримого протеина на 1 МДж сверхподдерживающей обменной энергии составил в опытной группе 10,8, а в контрольной – 11,8 г. Затраты питательных веществ на 1 кг молока по сухому веществу, обменной энергии, сырому и переваримому протеину в опытной и контрольной группах не имели существенных различий, а на 1 МДж энергии продукции соответственно составили по сухому веществу – 0,22 и 0,23 кг, обменной энергии – 2,3 и 2,3 МДж, сырому протеину – 32 и 34 г, переваримому протеину – 22 и 23 г, концентратам – 103 и 110 г. Эти данные свидетельствуют хотя и о незначительном, но повышении эффективности использования питательных веществ рационов животными, получавшими МКД с викой. Таким образом, включение 30 % вики в состав МКД, обработанных на экструдере, можно заменить на аналогичное, по содержанию сырого протеина, количество подсолнечникового жмыха в рационах лактирующих коров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тащилин В.А., Якушев В.Д. Новая концепция решения проблемы кормового белка. Кормопроизводство, 1997, 2: 7-11.
2. Нестеров Н.Е. Современное состояние и перспективы производства комбикормов и балансирующих добавок в России. Новое в приготовлении и использовании комбикормов и балансирующих добавок. Материалы научно-практической конференции МСХ, Дубровицы, 2001: 3-4.
3. Журавлев Е.М. Руководство по зоотехническому анализу кормов, -М. Сельхозиздат, 1963: 295 с.
4. Зоотехнический анализ кормов. (Е.А. Петухова, Р.Ф. Бессарабова, А.Д. Коленова, О.А. Антонова), 2-е изд., дополненное и переработанное. М., Агропромиздат, 1989: 287 с.
5. Методика определения переваримости кормов и рационов. Под ред. М.Ф. Томмэ. М., 1969: 39 с.

6. Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетике с.-х. животных. М, Колос, 1970: 423 с.
7. Методические указания по оценке энергетической и протеиновой питательности кормов для жвачных животных. (Н.Г. Григорьев, Н.П. Волков, А.И. Фицев и др.), М., 1988: 50 с.
8. Методические рекомендации по оценке кормов на основе их переваримости. (Н.Г. Григорьев, В.С. Воробьев, А.И. Фицев и др.), М., 1989: 42 с.
9. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М. Колос, 1976: 304 с.
10. Оценка энергетической и протеиновой питательности кормов и рационов для крупного рогатого скота. Методические рекомендации (Н.Г. Григорьев, Н.Л. Волков и др.), М., Агропромиздат, 1990.
11. Рекомендации по оценке качества основных видов кормов для жвачных животных. (Н.Г. Григорьев, Н.П. Волков и др.), Агропромиздат, 1990.
12. Калашников А.Л., Клейменов А.И. Баканов В.Н. и др. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. М. Агропромиздат, 1986: 352 с.
13. Комбикорма, кормовые добавки и ЗЦМ для животных (состав и применение). Под редакцией Крохиной В.А. М. Агропромиздат, 1990: 304 с.

ПОТРЕБЛЕНИЕ ОБЪЕМИСТЫХ КОРМОВ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН БЫЧКОВ МЭК СХ-3 И ЦЕОЛИТА

С.В. Воробьва
ВНИИ животноводства

Цеолитовые туфы успешно зарекомендовали себя как природные сорбенты, нормализующие обмен веществ животных и повышающие продуктивное действие кормов рационов. Действие цеолитов проявляется, в первую очередь, в желудочно-кишечном тракте, где они стабилизируют реакцию среды, активизируют ферментацию углеводов и биосинтез микробного белка, регулируют состав и концентрацию электролитов содержимого пищеварительного тракта. Отмечено специфическое влияние цеолитов на микроорганизмы рубца, ослабление под их воздействием процессов брожения и гниения в кишечнике.

Зерно злаковых культур и продукты их переработки (отруби), используемые в качестве компонентов комбикормов для с.-х. животных, кроме легкодоступных питательных веществ, содержат ряд трудноперевариимых, а иногда и угнетающих переваримость веществ. В этой связи комбикормовая промышленность все шире использует в составе комбикормов комплексные ферментные препараты в виде мультиэнзимных композиций (МЭК) целлюлозолитического, амиллолитического и пектолитического действия.

Известно, что примерно треть органического вещества, поступающего с кормом, обычно не усваивается организмом

животного, поэтому снижение этих потерь с помощью МЭК, имеющих направленное действие на антипитательные вещества, содержащиеся в зерновых компонентах комбикормов, позволило бы получить дополнительную продукцию.

В последние годы сотрудниками института биотехнологии разработаны несколько видов мультиэнзимных композиций, которые находят в комбикормовой промышленности все более широкое применение. Мультиэнзимная композиция МЭК СХ - 3 предназначена для комбикормов с основным содержанием в них пшеничных отрубей.

С целью изучения влияния МЭК и цеолита на потребление питательных веществ, процессы пищеварения и использования питательных веществ, были проведены исследования по изучению потребления объемистых кормов бычками при включении в их рацион указанных биологических веществ. Основной рацион состоял из силоса злаково-разнотравного, зерносмеси, патоки кормовой, подсолнечного жмыха.

Для характеристики процессов пищеварения у животных учитывали объем химуса, проходящего через дуоденальный анастамоз за сутки. Разница в кормлении по группам заключалась в том, что животные первого варианта получали основной рацион (контроль), во втором варианте к основному рациону добавляли 20 г МЭК из расчета 0,1% от количества концентрированных кормов, и в третьем – 200 г цеолита (5% от сухого вещества рациона). В конце каждого периода, через 21 день после их начала, были проведены балансовые опыты по изучению переваримости питательных веществ и балансу азота.

Результаты исследований показали, что скармливание МЭК и цеолита в составе рационов кормления бычков оптимизировало процессы рубцового пищеварения и положительно влияло на жизнедеятельность рубцовой микрофлоры.

Реакция среды в рубце у животных контрольной группы была ниже, чем у животных опытных групп. Так, через 2 ч после кормления, когда значение pH было минимальным (6,4: 6,56 и 6,63), разница со второй группой составила 0,16 и с третьей – 0,23. Через 3 ч после кормления pH среды рубца возрастала во всех вариантах. Ко второму часу после начала кормления концентрация летучих жирных кислот у животных контрольного варианта возросла по сравнению с исходной на 72,9%, второго – на 58,7% и третьего - на 36,1% . Через 3 часа после кормления концентрация ЛЖК в рубце бычков контрольной и третьей групп была на одном уровне (13,41Ммоль/100мл). Можно отметить значительное увеличение концентрации аммиака во всех вариантах через 2 часа после начала кормления. За это время она увеличилась в первом варианте на 172,4%, во втором – на 170,9% и в третьем – на 174,0%.

Следует отметить факт повышения переваримости клетчатки в третьем варианте на 6,31%, во втором - на 6,78% по сравнению с контролем. Вероятно, это является следствием увеличения концентрации биомассы бактерий в рубце животных опытных

вариантов и создания более благоприятных условий для их жизнедеятельности.

Исследованиями по изучению переваримости протеина установлено, что основная часть протеина во всех группах переваривается в кишечнике. Причем, у животных 2-й группы в желудке всасывалось 17,6% протеина, у бычков 3-й группы – 21,3, а у 1-й группы – 27,5%, т.е. у животных контрольного варианта шло более интенсивное переваривание протеина в желудке, тогда как у бычков 3-ей, а особенно 2-й групп переваривание смещалось в кишечник. Более высокая переваримость была отмечена у животных 2-й группы – 61,4% (на 3,2% выше по сравнению с 1-й группой и на 5,22% – с 3-й).

Наибольшее количество органического вещества переваривалось в сложном желудке бычков контрольного варианта – 54,93%. На таком же уровне – 53,21% у животных 3-го варианта. У бычков, получавших МЭК, этот показатель был ниже на 9,44% по сравнению с 3-м вариантом и на 11,16% с контрольным. В кишечнике, соответственно вариантам, переваривалось 372,48: 1343,51 и 735,34 гг органического вещества или относительно принятого 6,18; 22,42 и 12,34%. При этом количество видимопереваренного органического вещества в контрольном варианте составило 3683,48 г при коэффициенте переваримости 61,11%: во втором – 3966,76 г и19%; в третьем – 3910,27 г и 65,64% соответственно.

Увеличение видимой переваримости органического вещества у бычков, получавших МЭК и цеолит, объясняется тем, что основная масса его переваривалась микрофлорой, населяющей рубец. Таким образом, с вводом в рацион бычков МЭК и цеолита шло увеличение доли переваривания органического вещества в кишечнике и соответственно возрастала доля энергии в общем ее объеме за счет питательных веществ, переваренных в кишечнике.

Потребление азота по группам было близким. Однако, отложение азота в теле бычков второго опытного варианта было выше на 3,24 г или 8,6% по сравнению с контролем. У животных, получавших цеолит, отложение азота было на уровне контрольной группы – 36,68 г .

Безазотистые экстрактивные вещества в большей степени (59,36%) переваривались в сложном желудке бычков контрольного варианта, в то время как в третьем опытном варианте этот показатель находился на уровне 57,29, а второго – 47,22%. Наибольшее количество БЭВ переваривалось в кишечнике бычков второго варианта (837,15 г или 23,38% от принятого с кормом).

Максимальное увеличение количества жира в дуоденальном химусе бычков отмечено во втором опытном варианте – 279,6 г. У этих животных соответственно увеличивалось количество жира, всосавшегося в кишечнике. Этот показатель по вариантам составил 70,7; 185,9 и 99,2 г, т.е. с увеличением поступления жира с дуоденальным химусом происходило увеличение использования его на энергетические нужды из кишечника. Общее количество переваренного

жира составило по вариантам соответственно: 107,5 г и 50,8%; 113,0 г и 54,6% и 85,3 г и 42,4%.

Среднесуточные приросты у всех бычков были примерно на одном уровне и составили 640 г в 3-м варианте, 650 г в контроле. У бычков, в состав рациона которых был включен МЭК, получено 670 г суточного прироста.

Добавки МЭК и цеолита оказали влияние на всасывание кальция. Так, у бычков второго опытного варианта в кишечнике всосалось на 5,3 г (151,1%), третьего – на 4,5 г (127,4%) больше, чем у животных, служивших контролем. Количества выделенного с мочой и калом кальция по вариантам были довольно близкими. Отложение кальция по вариантам оказалось примерно одинаковым –11,9 г в первом варианте, 13,7 г во втором и 12,4 г – в третьем. Однако эффективность использования из-за лучшего всасывания в кишечнике оказалась максимальной при введении в рацион МЭК – 20,1% и цеолита –19,6%, что на 3,2% и 2,7% соответственно выше по сравнению с контролем.

Эффективность всасывания фосфора в кишечнике также была выше в пользу опытных вариантов и составила 24,4 г или 67,0 % от принятого в контрольном варианте, 25,6 г или 71,8 % во втором и 25,4 г или 78,0 % - в третьем опытном варианте.

Таким образом, введение в рационы бычков на откорме МЭК и цеолита положительно влияет на процессы рубцового пищеварения, обеспечивает повышение переваримости и использования всех питательных элементов рациона, стимулирует эффективность всасывания в кишечнике азота, кальция и фосфора, и, как следствие, повышает использование этих элементов в организме подопытных животных.

ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫЙ СИЛОС ИЗ ПРОВЯЛЕННЫХ ТРАВ И ПРИЕМЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Ю.А. Победнов
ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса

Издавно считалось, да и сейчас это представление не изжито, что существуют специальные силосные культуры, среди которых главенствующее место по праву занимает кукуруза. Именно с кукурузой, а также однолетними бобово-злаковыми смесями и связано развитие силосования как важнейшей отрасли кормопроизводства. Но какой смысл в это понятие можно вложить сейчас?

Может быть, силосными культурами надо называть такие, которые иным способом не могут быть сохранены впрок? Но ведь даже кукурузу, не говоря уже об однолетних бобово-злаковых смесях, при желании можно успешно провяливать в валках с последующим ее использованием на сенаж (Монтаков, Дупенко, 1977, Боярский, 1983).

Может быть силосные культуры это такие, которые хорошо силосуются? Но ведь даже силос из кукурузы, не достигшей молочно-восковой спелости, то есть богатой сахаром, из-за большой утечки сока зачастую получается недостаточно кислым (pH = 5 – 6) с высоким содержанием масляной кислоты (Зубрилин, 1962).

А может быть отличительной чертой силосных культур служит высокий выход корма с единицы площади, не досягаемый при возделывании других кормовых культур? Но и по этому показателю многие кормовые растения, и в первую очередь многолетние травы, которые обычно к числу силосных культур не относятся, с полным правом должны быть к ним причислены. Ведь многолетние травы при многоукосном использовании их на поливе дают до 12 – 13 тыс. кормовых единиц с гектара, что по энергетической оценке равноценно 60 т кукурузы, а по содержанию белка значительно превосходят эту культуру (Зафрен, 1970).

Следовательно, при решении вопроса о наборе кормовых культур (в том числе и тех, которые будут силосоваться), руководители и специалисты сельскохозяйственных предприятий должны исходить лишь из того, чтобы получить питательные вещества в надлежащем сочетании для конкретного вида животных с учетом их продуктивности.

Однако, если при заготовке силоса из кукурузы в фазе молочно-восковой и восковой спелости зерна, а также вико- и горохо-овсяной смеси, убранной в рекомендуемую фазу вегетации, особых затруднений не возникает, то силосование многолетних трав и по сегодняшний день все еще остается сложной проблемой. До недавнего времени считалось, что силос из провяленных до содержания сухого вещества свыше 30% многолетних трав, как правило, бывает лучше, чем из свежескошенной массы (18-20% сухого вещества и менее). Поскольку в таком силосе меньше накапливалось аммиака, отсутствовала масляная кислота, многие исследователи объясняли более слабое его заквашивание не накоплением щелочных продуктов, а меньшей активностью микрофлоры, которая, по их мнению, подавляется уже при повышении сухого вещества до 30-35%, то есть задолго то того, как сырье достигнет состояния так называемой “сенажной влажности” (50-55%). Это привело к ошибочному заключению, что при указанном содержании сухого вещества в силосуемой массе она сохраняется независимо от степени и, тем более, от скорости ее подкисления (Зафрен, 1970, 1977).

Однако это не совсем так. Еще в середине 70-х годов Н.В. Колесников (1975) установил, что провяливание до указанного предела содержания сухого вещества ежи сборной не обеспечивает получение корма с высокой сохранностью питательных веществ и с хорошим качеством по продуктам брожения. Вследствие чего автор рекомендовал использовать данную культуру только для приготовления сенажа. В рекомендациях по силосованию кормов (1982) отмечалось, что масса из молодых трав с высоким содержанием белка – люцерны, эспарцета, сои, чины и др. успешно сохраняется

только при условии их провяливания до содержания сухого вещества 45% и более. Это обусловлено тем, что и при силосовании провяленных трав решающее значение имеет концентрация водородных ионов (pH), необходимый уровень которой определяется содержанием сухого вещества в силосуемой массе. И.А. Муравьев (1927) впервые установил, а Г. Верингом (Weiringa, 1960) было окончательно доказано, что критическое значение pH для роста маслянокислых бактерий зависит от осмотического давления в среде брожения. По мере повышения осмотического давления чувствительность к кислотности у этих бактерий увеличивается, что позволяет сдерживать их развитие при более высоком значении pH.

Но для надежного управления процессом силосования следовало связать эти два взаимно дополняющих друг друга консервирующих фактора. Первую попытку в этом направлении сделали немецкие исследователи (Weissbach u.a., 1975), предложив определять так называемый "коэффициент брожения массы" (КБ), исчисляемый по формуле: КБ=СВ,% + 8х(содержание сахара в СВ,% / буферная емкость СВ,%), где СВ – содержание сухого вещества в силосуемой массе. При этом маслянокислое брожение исключается лишь при условии, если коэффициент брожения силосуемой массы равен или превышает 45. Следовательно, зная содержание сухого вещества в силосуемой массе и ее сахаро-буферное отношение, можно сразу же заключить : будет ли содержать полученный корм масляную кислоту или нет. Одновременно, зная сахаро-буферное отношение в зеленой массе, можно сразу же рассчитать и необходимый предел ее провяливания, исключающий развитие маслянокислых бактерий. Для этого достаточно лишь видоизменить предложенную авторами формулу: СВ,%=45-8х(содержание сахара в СВ,% / буферная емкость СВ,%).

Нетрудно заметить, что указанный выше способ прогнозирования успешности силосования базируется лишь на использовании двух основных параметров силосуемой массы : отношения сахара к буферной емкости, как меры способности трав к подкислению, и содержания сухого вещества, как меры требуемой степени их подкисления. И совершенно не принимает во внимание скорость подкисления массы в первую решающую фазу ее силосования, что обусловило серьезный его недостаток, особенно при прогнозировании успешности силосования трав с относительно высоким (более 30%) содержанием сухого вещества.

Это связано с тем, что при силосовании провяленных до содержания сухого вещества свыше 30% трав, процесс молочнокислого брожения уже сильно сдерживается высоким осмотическим давлением в растительных клетках (Крукланде и др., 1975). В результате подкисление массы до pH, исключающего развитие маслянокислых бактерий, происходит в течение довольно продолжительного времени и при этом, в отличие от свежескошенных трав, почти не зависит от ее сахаро-буферного отношения.

В этом случае успешность силосования зеленой массы в значительной степени зависит уже от неконтролируемых факторов, таких как содержание нитратов и степени обсемененности растений эпифитными молочнокислыми бактериями (табл.1).

Таблица 1. *Накопление масляной кислоты в силосе из провяленных злаковых трав в зависимости от содержания в них нитратов и численности эпифитных молочнокислых бактерий*

Содержание сухого вещества в массе, %	Содержание нитратов в сухом веществе массы, г/кг	Численность эпифитных молочнокислых бактерий, log/г массы	pH		Содержание масляной кислоты в сухом веществе корма, %
			через 3 суток силосования	готового корма	
30,7	**0,18**	**3,05**	**4,85**	**3,84**	**0,61**
32,5	**0,75**	**3,48**	**6,02**	**4,20**	**0,04**
31,2	**0,09**	**5,56**	**4,23**	**3,68**	**0,02**

Из данных таблицы 1 следует, что несмотря на то, что во всех случаях для силосования использовалась хорошо обеспеченная сахаром масса, о чем свидетельствует достаточно низкий pH полученного корма, задержка с ее подкислением при недостаточно высоком содержании нитратов (0,18 г/кг СВ) неизбежно приводила к накоплению в силосе некоторого количества масляной кислоты. И только при содержании нитратов в сухом веществе массы в количестве 0,75 г/кг маслянокислого брожения не наблюдалось. По имеющимся данным (Weissbach, 1996), минимальное количество нитратов, необходимое для устранения маслянокислого брожения в силосе из провяленных трав, составляет 0,5 г в расчете на 1 кг сухого вещества силосуемой массы.

Значение нитратов заключается в том, что продукты их восстановления (нитриты, окислы азота) сдерживают развитие маслянокислых бактерий в первый период силосования, то есть до момента создания в массе критического pH. При недостаточно высоком содержании нитратов в силосуемом сырье успешность его силосования целиком зависит от другого неконтролируемого фактора : численности эпифитных молочнокислых бактерий, которая, как следует из данных таблицы 1, должна составлять не менее 10^5 в расчете на 1 г силосуемой массы. В этом случае происходит быстрое (в течение 3 суток) подкисление провяленных трав до pH ниже критического, что исключает дальнейшую активность маслянокислых бактерий. Последнее обусловлено тем, что от численности эпифитных молочнокислых бактерий во многом зависит и их качественный состав. Наши исследования показали, что при численности эпифитных молочнокислых бактерий 10^3 и менее в 1 г растений лишь около половины их способны функционировать на провяленной массе, в то время как при численности 10^5 и более – более 80% (Победнов,2003).

Поскольку, как уже отмечалось, при заготовке силоса из провяленных трав в практических условиях ни содержание нитратов в

растениях, ни их обсемененность эпифитными молочнокислыми бактериями не учитываются, всегда нужно исходить из того, что оба указанных фактора неблагоприятны. А это означает, что при силосовании растительного сырья с содержанием сухого вещества 30% и более, независимо от наличия в нем сахара, необходимы меры, направленные на улучшение силосуемости. Поскольку альтернативой высокому содержанию нитратов в силосуемой массе служит высокая численность эпифитных молочнокислых бактерий, эффективным приемом улучшения силосуемости провяленных трав является использование препаратов молочнокислых бактерий. Но не любых, а только созданных на основе осмотолерантных штаммов молочнокислых бактерий, то есть из микроорганизмов, способных сразу же после внесения активно размножаться и функционировать на травах с относительно высоким содержанием сухого вещества. К настоящему времени в нашей стране создан только один подобный препарат под названием Биотроф, который и получает все большее распространение в сельскохозяйственной практике.

Между тем, устранение маслянокислого брожения – отнюдь не единственная задача, которую следует решать при заготовке силоса из провяленных трав. Не менее важно устранить жизнедеятельность и других нежелательных микроорганизмов, среди которых наибольшее отрицательное значение имеют гнилостные бактерии, энтеробактерии и дрожжи. Именно эти группы микроорганизмов служат основным источником потерь при силосовании провяленных трав и снижают качество полученного корма.

С гнилостными бактериями вопрос решается просто. Эти бактерии, подобно маслянокислым, очень чувствительны к кислотности и высокому содержанию сухого вещества в силосуемой массе (Чуканов, Попенко, 1986). Поэтому меры, направленные на устранение маслянокислого брожения, как правило, предотвращают в корме и гнилостные процессы.

Сложнее подавить жизнедеятельность энтеробактерий. Эти микроорганизмы обладают значительно большей устойчивостью к высокому осмотическому давлению в среде брожения, нежели молочнокислые, гнилостные и маслянокислые бактерии (Зубрилин, 1947). По этой причине одно только провяливание трав до содержания сухого вещества 30-35% без мер, направленных на ускорение их подкисления, не оказывает на энтеробактерий отрицательного влияния (табл.2). Об этом, в частности, свидетельствует высокое содержание аммиака и 2,3-бутандиола в корме, наиболее характерных продуктах жизнедеятельности энтеробактерий. Более того, наши исследования показали, что критический pH для энтеробактерий практически не изменяется по мере повышения содержания сухого вещества в силосуемой массе. И лишь при сенажировании трав, содержащих около 45% сухого вещества и более, жизнедеятельность указанных микроорганизмов полностью подавляется так называемой “физиологической сухостью” массы.

Таблица 2. *Накопление аммиака и 2,3-бутандиола в силосе из провяленных трав в зависимости от скорости их подкисления и степени провяливания*

Масса	Содержание сухого вещества, %	pH		Содержание в сухом веществе, %	
		через 3 суток силосования	готового корма	$N\text{-}NH_3$	2,3-бутандиола
Слабопровяленная (n=5)	*31,06±2,66*	**5,51±0,28**	**4,32±0,06**	**0,30±0,05**	**0,35±0,05**
То же (n=5)	**31,56±1,60**	**4,40±0,23**	**3,81±0,08**	**0,13±0,01**	**0,06±0,02**
Сильнопровяленная (n=5)	**44,55±2,73**	**5,06±0,30**	**4,02±0,11**	**0,11±0,02**	**0,02±0,01**

Подавить жизнедеятельность энтеробактерий при силосовании слабопровяленных трав можно лишь при условии быстрого (в течение 3 суток) их подкисления до pH 4,4 и ниже, то есть до предела, исключающего развитие этой группы микроорганизмов. По имеющимся данным, критический pH для энтеробактерий находится в пределах 4,5-4,3 (Nosberger, Opitz von Boberfeld, 1986).

Понятно, что не всякая провяленная до содержания сухого вещества 30-35% масса сможет подкислиться в течение трех суток до pH 4,4 и ниже даже при использовании препарата Биотроф. Это будет зависеть от ее обеспеченности сахаром. Нами установлено, что при использовании указанного препарата подкисление провяленных трав до необходимого предела обеспечивается только при их сахаро-буферном отношении не менее 1,5 (Победнов, 2003). При меньшем сахаро-буферном отношении препарат Биотроф, вследствие дефицита сахара, уже не в состоянии быстро подкислить массу до необходимого предела, а следовательно и обеспечить стабильность корма при хранении. Подавить жизнедеятельность энтеробактерий в массе с сахаро-буферным отношением менее 1,5 можно путем ее сенажирования, а при невозможности глубокого провяливания – только за счет использования химических консервантов.

Следующим не менее значимым источником потерь при заготовке силоса из провяленных трав являются дрожжи. Считается, что их рост ограничивается созданием в корме анаэробных условий, то есть образованием в среде брожения низкого окислительно-восстановительного потенциала (Мишустин, Емцев, 1987). Но это не совсем так. Дрожжи, как и многие другие виды микроорганизмов, также содержатся в составе эпифитной микрофлоры культурных растений и нередко в значительном количестве. Но среди них встречаются в основном неферментирующие формы с преобладанием аэробного типа дыхания и тенденцией к обитанию на поверхности субстрата (Квасников, Нестеренко, 1975). Эти формы дрожжей ответственны за разогревание зеленой массы в период ее загрузки в силосохранилище и действительно довольно быстро исчезают из нее после создания анаэробных условий. Но взамен их на вторые-третьи

сутки силосования, то есть после создания в массе анаэробных условий, начинают размножаться ферментирующие формы дрожжей, также входящих в состав эпифитной микрофлоры, но в очень незначительном количестве. Эти формы дрожжей активно сбраживают сахар в этиловый спирт без доступа кислорода (Middelhoven, Baalen, 1988). Именно с этим связано то, что дрожжи в силосуемой массе начинают развиваться позднее молочнокислых бактерий, что позволяет регулировать их численность за счет усиления молочнокислого брожения в самом начале силосования. При силосовании провяленных трав это достигается за счет использования новых бактериальных препаратов и происходит исключительно за счет ускорения перевода содержащегося в массе сахара в молочную кислоту, что лишает дрожжей источника питания (табл.3).

Таблица 3. *Накопление спирта в силосе из провяленных злаковых трав (39,1% СВ) с сахаро-буферным отношением 3,2 в зависимости от интенсивности молочнокислого брожения*

Варианты силосования	**pH**		**Содержание в сухом веществе, %**	
	через 3 суток силосования	**готового корма**	**молочной кислоты**	**этанола**
Без добавок	**6,2**	**4,3**	**6,93**	**2,05**
С Кофасил-Лак	**4,2**	**3,8**	**11,11**	**0,54**

Поскольку от интенсивности дрожжевого брожения в значительной степени зависят потери питательных веществ и интенсивность поражения силоса плесневыми грибами в процессе его выемки из силосохранилищ, то подавление этого вида брожения одновременно способствует и значительному повышению так называемой “аэробной стабильности” полученного корма.

Однако при очень высоком сахаро-буферном отношении в провяленных травах (выше 4,0) использование новых бактериальных препаратов (Биотроф или его импортного аналога препарата Кофасил-Лак) может приводить к негативному результату. В этом случае, наоборот, отмечается стимуляция дрожжевого брожения, что способствует ухудшению аэробной стабильности полученного силоса, обусловливая быструю его порчу и увеличение потерь питательных веществ в процессе выемки его из силосохранилищ (табл.4).

Следовательно, при использовании новых бактериальных препаратов, наряду с минимальным сахаро-буферным отношением, определяющим сохранность и качество силоса по продуктам брожения, не менее важное значение имеет и максимальное значение этого параметра, как фактора, обусловливающего аэробную стабильность полученного корма.

Таблица 4. ***Аэробная стабильность силоса из провяленных (41,3% СВ) трав с сахаро-буферным отношением 4,6 в зависимости от способа силосования***

Варианты силосования	Время стабильности силоса, сутки	Потери сухого вещества за 7 суток аэрации силоса, %
Без добавок	**4,00**	**3,85**
С Кофасил-Лак	**1,50**	**7,30**

Трав с сахаро-буферным отношением выше 4,0 в нашей стране немного. По существу к ним относится только райграс многолетний 1-го укоса. Поэтому, если бы не отмеченное выше влияние неконтролируемых факторов, это обстоятельство имело бы больше теоретическое, нежели практическое значение. Наши исследования показали, что при использовании новых бактериальных препаратов на аэробную стабильность полученного корма большое влияние оказывает исходная численность эпифитных молочнокислых бактерий на растительных покровах. При силосовании провяленных трав с численностью эпифитных молочнокислых бактерий в 1 г массы 10^5 и более, использование препарата Биотроф приводит к усилению спиртового брожения уже при их сахаро-буферном отношении лишь немногим более 3,0. А это значит, что в зону риска, наряду с райграсом многолетним 1-го укоса, попадают уже и почти все виды однолетних силосных культур, перспективу применения новых препаратов молочнокислых бактерий при силосовании которых еще предстоит изучить. В настоящее время силосовать с добавкой новых бактериальных препаратов необходимо в основном лишь многолетние бобовые (кроме люцерны), злаковые (кроме райграса многолетнего 1-го укоса) травы и их смеси, провяленные до содержания сухого вещества 30-40%.

В качестве примера высокой эффективности новых препаратов молочнокислых бактерий при силосовании такого сырья приведем результаты научно-хозяйственного опыта по скармливанию молодняку крупного рогатого скота обычного и приготовленного с добавкой препарата Биотроф силоса из злаково-клеверной смеси (35-40% сухого вещества), выполненного в ЭСХ “Дятьково” Брянской области (табл.5).

Они показали, что скармливание приготовленного с добавкой препарата Биотроф силоса в рационе откормочных бычков не только привело к увеличению на 23,5% их среднесуточных приростов живой массы, но и обусловило снижение почти на 20% затрат зерновых и белковых концентратов на единицу продукции.

Таблица 5. ***Эффективность скармливания обычного и приготовленного с добавкой препарата Биотроф силоса из провяленной злаково-клеверной смеси молодняку крупного рогатого скота***

Показатели	Рацион	
	с обычным силосом	с силосом, приготовленным с добавкой препарата Биотроф

Среднесуточный прирост живой массы, г	**793,0**	**979,0**
Затраты на 1 кг прироста живой массы (кг):		
сухого вещества	**7,53**	**6,77**
зерновых концентратов	**1,51**	**1,23**
подсолнечникового жмыха	**1,26**	**1,02**

Таким образом, в отличие от свежескошенных трав, успешность силосования которых целиком зависит от их сахаро-буферного отношения, при силосовании провяленных до содержания 30-40% сухого вещества трав, вследствие особенности протекающих в них микробиологических процессов, большое значение приобретают неконтролируемые факторы: содержание нитратов и обсемененность растений эпифитными молочнокислыми бактериями. Низкая численность эпифитных молочнокислых бактерий и, следовательно, медленное подкисление провяленных трав на фоне недостаточно высокого содержания в них нитратов, служат причиной возникновения в корме маслянокислого брожения, способствующего увеличению потерь питательных веществ и снижению качества корма по продуктам брожения. Одновременно в корме активизируется жизнедеятельность энтеробактерий и дрожжей, обусловливающих дальнейшее увеличение потерь питательных веществ и ухудшение стабильности корма в процессе его анаэробного хранения и выемки из силосохранилищ.

Для получения высококачественного силоса из провяленных трав следует принимать меры, направленные на быстрое подкисление массы до pH 4,4 и ниже, что предусматривает обязательное использование новых препаратов молочнокислых бактерий, например, препарата Биотроф. Для обработки указанным препаратом пригодна масса с сахаро-буферным отношением 1,5-3,0, то есть практически все виды многолетних трав, за исключением люцерны и райграса многолетнего 1-го укоса. Люцерну, то есть сырье с сахаро-буферным отношением ниже 1,5, нужно консервировать путем сенажирования, что полностью устраняет опасность возникновения в ней маслянокислого брожения и развития энтеробактерий. Следует, однако, иметь в виду, что аэробная стабильность люцернового сенажа невысокая и значительно уступает полученному из нее силосу. Поэтому наиболее прогрессивным приемом консервирования люцерны все же является ее силосование в слабопровяленном (30-35% сухого вещества) виде с использованием химических консервантов, обладающих преимущественно бактерицидным действием. Райграс многолетний 1-го укоса, то есть сырье с сахаро-буферным отношением выше 4,0, также целесообразно консервировать в слабопровяленном виде с добавкой химических консервантов. Однако в этом случае последние должны обладать выраженным фунгицидным действием.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Боярский Л. Сенаж из кукурузы. Сельское хозяйство Молдавии.1983, 2: 33 с.
2. Зафрен С.Я. Технология приготовления кормов. М.,1977: 239 с.
3. Зафрен С.Я. Как приготовить хороший силос. М.,1970: 79 с.
4. Зубрилин А.А. О силосе и способах силосования кукурузы и других культур. М.,1962: 31 с.
5. Зубрилин А.А. Научные основы консервирования зеленых кормов. М.,1947: 391 с.
6. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.,1975: 389 с.
7. Крукланде М., Иевиня Е., Янсоне Б. Микробиологические и биохимические процессы в сенаже и силосе из злаковых трав. Проблемы кормления и разведения сельскохозяйственных животных. Елгава,1975: 31-34.
8. Колесников Н.В. Силосование и химическое консервирование избыточно влажных зеленых кормов. М.,1975: 115 с.
9. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. М.,1987: 368 с.
10. Монтаков В., Дупенко Н. Сенаж из кукурузы. Сельские зори. 1977, 7: 33-35.
11. Муравьев И.А. Влияние поваренной соли на микроорганизмы, встречающиеся в маслоделии. Тр. Сиб. ин-та с.-х. и лесоводства. Омск,1927, 8, 4: 103-143.
12. Победнов Ю.А. Теоретическое обоснование и разработка способов приготовления энергонасыщенных высокопротеиновых силосованных кормов на основе регулирования микробиологических процессов. Дисс…д. с.- х. наук. М.,2003: 296 с.
13. Рекомендации по силосованию кормов. М.,1982: 29 с.
14. Чуканов Н.К., Попенко А.К. Микробиология консервирования трудносилосующихся растений. Алма-Ата,1986: 198 с.
15. Middelhoven W.J., Baalen A.A.M. Development of the ueast flora of whole crop maize during ensiling and during subsequent aerobiosis. J. of Food Agr. 1988, 42, 3: 199-207.
16. Nosberger J.,Opitz von Boberfeld W. Grundfutterproduktion. Berlin, Hamburg, 1986: 114-115.
17. Weiringa G.W. Some factors affecting silage fermentation. 8 th Grassland Cong. 1960: 609 .
18. Weissbach F., Smidt L., Peters G. u.a. Methode und Tabellen zur Schatzung der Vergarbarkeit. Leipzig, 1975: 53.
19. Weissbach F. New Developments in Crop Conservation. Proceedings of the 11th International silage Conference 8 th – 11 th September 1996. Aberyswyth, 1996: 11-25.

СОДЕРЖАНИЕ

В.П. Рябых
Фолликулогенез и суперовуляция: I. Регулирование фолликулогенеза у крупного рогатого скота при вызывании суперовуляции в середине лютеальной фазы полового цикла 6
……

В.П. Рябых, А.Г. Логинов
Фолликулогенез и суперовуляция: II. Регулирование фолликулогенеза и вызывание суперовуляции у коров-доноров в начальный период лютеальной фазы полового цикла ……..... 32

В.П. Рябых, К.И. Бахитов, А.Г. Логинов
Фолликулогенез и суперовуляция: III. Регулирование фолликулогенеза и вызывание суперовуляции у коров-доноров препаратами с различным содержанием ФСГ и ЛГ 40
……

В.А. Езерский, Л.Б. Иванова, В.Г. Шевченко
Создание генно-инженерной конструкции на основе регуляторных элементов αS1-казеина быка и структурного гена лактоферина человека 52

В.А. Езерский, Т.Ю. Шмидт, В.Г. Шевченко
Изучение полиморфизма молекулярно-генетических маркеров 6-й хромосомы крупного рогатого скота ……. 68

Е.Л. Харитонов
Физиологическое обоснование оптимальных соотношений субстратов в составе обменной энергии для молочных коров …… 83

В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, В.П. Лазаренко, В.П. Волобуев, Р.А. Волобуева, В.В. Михайлов, С.Ю. Гулюшин
Обоснование норм потребности коров в энергетических субстратах …. 92

Л.В. Харитонов, О.Б. Брускова Ю.В. Сироткина, В.Н. Чичаева
Потребность молочных коров в метионине и лизине в первую фазу лактации ……..……..... 104

Е.Л. Харитонов, Н.Д. Мысник, Н.Н. Семина, И.А Долгов
Влияние состава рационов на скорость распада сырого протеина кормов 114
……..

А. В. Шишкин, О.Б. Брускова
Влияние схемы выращивания телят на рост, развитие и формирование рубцового пищеварения ……... 125

Г.Г. Черепанов, А.В. Катаев
Анализ задачи оптимизации рациона с учетом требуемого минимального объема всасывания по основным субстратам (по данным компьютерной имитации биоциноза рубца) 134
…….
Г.Г. Черепанов
Существует ли зависимость переваримости в кишечнике от распадаемости в рубце – постановка задачи и количественный прогноз 149
……..
К.Т. Еримбетов, Д.И. Шариева, Е.В. Пьянкова, О.В. Обвинцева
Метаболизм азотистых веществ и количественные аспекты синтеза и распада мышечных белков у растущих бычков при введении в рацион комплексной кормовой добавки **…….** 159
В.П. Галочкина, В.А. Матвеев, А.М. Коровяцкий, Т.Н. Дворецкая
Концентрация глюкозы, гормонов в крови и продуктивность бычков при выращивании на мясо на фоне разного уровня протеина в их рационе 176
А.М. Коровяцкий, В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, Т.Н. Дворецкая
Влияние комплексной кормовой добавки на концентрацию глюкозы, инсулина, тиреоидных гормонов и мясную продуктивность бычков …. 184
М.В. Сорокин, В.И. Агафонов, В.П. Лазаренко, В.В. Михайлов
Обмен энергии у растущих бычков при использовании комплексной кормовой добавки ……. 197
В.Ф. Сухих
Элементы иммунитета и неспецифической резистентности у бычков при введении в рацион корма, содержащего труднорасщепляющийся крахмал ……... 205
Н.С.-А. Ниязов, Д.Е. Панюшкин, О.В. Обвинцева
Продуктивность помесных свиней (крупная белая х ландрас и крупная белая х Pic-402) при использовании типовых комбикормов в рационах 211
К.Т. Еримбетов, Н.С.-А. Ниязов, Д.И. Шариева, Е.В. Пьянкова, О.В. Обвинцева
Особенности азотистого метаболизма и накопления мышечной ткани у молодняка свиней разного генотипа ……... 217
Т.Н. Дворецкая, В.А. Матвеев, А.М. Коровяцкий
Обмен минеральных веществ у свиней разных помесей ……..... 227
Т.Е. Рябых
Содержание витаминов А и Е в организме свиней в зависимости от генотипа, возраста и условий белкового питания …… 237
Крапивина Е.В., В. А. Галочкин, Ю.Н. Федоров
Использование селенопирана при выращивании молодняка свиней и крупного рогатого скота в условиях повышенного содержания в среде радиоцезия ……..... 243
Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова, А.И. Манухина
Исследование хронической токсичности микроциногенного штамма Escherichia coli B 214/99 для кроликов …….. 256
Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова
Исследование безвредности микроциногенного штамма Escherichia coli B 214/99 для лабораторных животных …… 272
З.Н. Макар, М.И. Сапунов, П.В. Матющенко, Р.И. Корнеева, И.А. Бояршинов, Б.В. Тараканов

Влияние скармливания рекомбинантного штамма *Lactobacillus sp.* 8РАЗ (PLF-SL2), несущего ген релизинг-фактора соматотропного гормона, на молочную продуктивность коров 281
…….....
В.В. Михайлов
Сопряженность энергетических процессов в мышечной ткани и печени бычков при откорме на комбикормах, содержащих азотистые синтетические добавки 287
……..
С.Ю. Гулюшин, Т.Н. Ленкова
Влияние пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта на активность экзогенных мультиэнзимных препаратов, вводимых в рационы цыплят и бычков ……..... 304
Т.В. Жарова, В.И. Дудин
Использование α-токоферола и α-токоферилхинона поросятами из ***р***ациона **……...** 315
В.И. Дудин
Определение активности каталазы с реактивом Фолина 323
……....
М.В. Брусков
К методу определения водорастворимых витаминов с помощью ВЭЖХ ……. 324
Л.К. Бусловская
Проблемы адаптации высокопродуктивных животных к условиям промышленных технологий ……..... 330
В.И. Фирсов
Способы регулирования процессов формирования и реализации высокой продуктивности молочных коров в условиях Мурманской области 336
Г.И. Левахин, А.Г. Мещеряков
Влияние разного качества протеина и энергетической обеспеченности рационов на степень превращения азотсодержащих веществ с учетом процессов их ферментации и синтеза микробиального белка в рубце 341
…
В.Л. Владимиров, П.А. Науменко, А.И. Юрьев, А.В. Головин
Влияние скармливания лактирующим коровам комбикормов с мультиэнзимной композицией МЭК-СХ-3 на обмен веществ и их продуктивность 349
..……
А.П. Гаганов, Н.Г. Григорьев
Применение малокомпонентных кормовых добавок в рационах валухов и дойных коров 357
С.В. Воробьва
Потребление объемистых кормов при включении в рацион бычков МЭК СХ-3 и цеолита 363
Ю.А. Победнов
Высококачественный силос из провяленных трав и приемы его получения 367
…….....

Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.
Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2004, т.43, 376 с

Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.

Редактор издания В.Д. Кальницкая
Компьютерная верстка Л.Л. Полякова
Полиграфическое исполнение А.В. Бочаров

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных. Лицензия ИД № 03641
Формат 70x100/16 Объем 26,2 п. л. Тираж 100 экз.

249013 Калужская обл., г. Боровск, ВНИИФБиП с.-х. животных
тел. 546-34-15