

1.Zavy M., Geisert R. Embryonic Mortality in Domestic Species.- CRC Press, Boca Raton.-1994.-P. 99–140.

2.Humblot P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants// Theriogenology.- 2001.-V.56.-P. 1417–1433.

3.Kastelic J. Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers// Theriogenology.-1991.-V.35.-P. 351–363.

4.Сергеев Н.И., Лепнова Н.А., Ефремова М.Н. и др. Гибель замороженно-оттаянных и культивированных вне организма эмбрионов после пересадки // Зоотехния.- 1996. – № 12. – С.23-25.

5.Болгов А.Е., Карманова Е.П., Хакана И.А. Ранняя эмбриональная гибель у коров под влиянием паратипических факторов // Сельскохозяйственная биология. – 1997. - № 6. – С. 67-70.

6.Wubishet A., Creves C., Spahr S. et al. Effect of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows // Theriogenology.- 1986.- V. 25.- P. 425.

ЧИННИКИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ПОКАЗНИКИ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ СМЕРТНОСТІ В МОЛОЧНИХ КОРІВ

В.А. Титова, Х.Н. Насібов, С.Ф. Абілова, ДНУ ВІТ РСХА

У статті визначена динаміка ембріональних втрат на початкових етапах тільності молочних корів. Установлено, що основними чинниками, що впливають на ембріональну смертність є вік корів, рівень молочної продуктивності, сезон року, але не залежить вона від породної належності. Основні ембріональні втрати припадають на 17 і 22 дні після запліднення, надалі вони знижуються. Чим вища молочна продуктивність, тим частіше ембріональні втрати. Випадки ембріональних втрат у літній період зростають до 42,9 % і знижуються в стійловий - до 19,0-28,5 %

Ключові слова: корова, рівень продуктивності, сезон року, вік, ембріональна смертність.

THE DETERMINANT FACTOR IMPACT ON EMBRYO DEATH RATE OF THE DAIRY COWS

V. Titova , Kh. Nasibov , S. Abilova , Russian agricultural academy

This article highlights the experimental research results on the embryo death rate progress at the initial dairy cow pregnancy stages. The determinant factor impact on the embryo death rate proved to be chronological age of the cows, milk output & season. Breed is considered to be the indirect factor. The highest embryo death rate was observed on the 17-th & the 22 days after insemination. Then the losses are lowered. Correlation ratio was observed by milk productivity & the embryo death rate. The embryo death rate increases during the summer period. The percentage amounts 42,9%. The embryo death rate is abated by the stall barn system. The percentage equals 19,0-28,8%.

Key words: cow, milk productivity, season, chronological age, embryo death rate

УДК 636.2.082-089.843

СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КОРОТКОЧАСНОГО ЗБЕРЕЖЕННЯ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Розроблено мало компонентне середовище для короткочасного збереження ембріонів великої рогатої худоби поза організмом. Середовище пройшло лабораторну перевірку на ембріонах лабораторних та сільськогосподарських тварин і за результатами досліджень його можна використовувати для біотехнологічних робіт із дотриманням необхідних вимог. Створення мало компонентного вітчизняного середовища з доступного і більш дешевого матеріалу має велике прикладне значення в рішенні проблем відтворення та прискореного розмноження сільськогосподарських тварин методом трансплантації ембріонів.

Ключові слова: середовище, екстракт ембріона, антимікробний препарат.

Для культивування та короткострокового збереження ембріонів ссавців не існує загальноприйнятого середовища, тому для цього використовується багато різних складних середовищ переважно закордонного виробництва, які в основному призначені для вирощування вірусів та тканинних культур. До них відносяться середовище Ігла, Хема, ТСМ 199, а також фізіологічні сольові розчини - фосфатний буфер Дюльбекко і розчин Кребса [1]. Найпростішим із середовищ є фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко (ФСБД), але багатокомпонентність, поетапність і складність його приготування, зміна якості при стерилізації автоклавуванням і іонізуючим випромінюванням ускладнює його застосування і, відповідно, підвищує вартість біоматеріалу.

Безпосередньо перед культивуванням у всі середовища для розвитку ембріонів додають 10 - 20 % (100 - 200 мл/л) фетальної сироватки крові теляти, або інші сироватки [2–3]. Висока вартість фетальної сироватки спонукає фахівців до пошуку інших джерел білків. Добрі результати одержані від додавання у ФСБД 20 % сироватки бугайця-кастрата, або 10 % сироватки новонароджених телят та інших сироваток [4].

Для інкубування росту мікроорганізмів, які можуть потрапити з довкілля в культуральні середовища, додають антимікробні препарати. Відповідно до інструкції з трансплантації ембріонів для попередження мікробної контамінації у середовище необхідно вводити пеніцилін [5]. Однак цей препарат не має пагубної дії на віруси, мікоплазми, а також на деякі види умовно-патогенної мікрофлори, наприклад *Pseudomonas aeruginosa* [6 - 7].

Метою дослідження було розробити вітчизняне мало компонентне середовище для збереження ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* протягом декількох годин перед їх пересадкою.

Матеріали і методи досліджень. За основу дослідного середовища взяли стабілізований фосфатно-сольовий буфер (СФСБ) для вилучення ембріонів, який складається з таких компонентів: NaCl – 8,5 г/л; Na₂ HPO₄ – 2,8 г/л; KН₂PO₄ – 0,4 г/л [5]. Замість фетальної сироватки теляти як імплемента до складу середовища додавали екстракт ембріона жуйних тварин 10 % або 20 %.

Екстракт виготовляли з 30-35-ти денного ембріона великої рогатої худоби або 14-20-денного ембріона вівці чи кози за нашою методикою. Ембріон подрібнювали і гомогенізували при 4-х тис. об./хв протягом 15 хвилин. Отриману масу змішували порівну зі стерильним СФСБ і екстрагували у холодильнику при температурі 4 °С протягом 48 годин, а потім центрифугували при 4-х тис. об./хв протягом 20 хвилин. Надосадову рідину відбирали у стерильний поліетиленовий

пакет і заморожували при температурі мінус 12 °С. Потім екстракт розморожували та центрифугували. Знов відбирали надосадову рідину і розфасовували її в поліетиленові ампули та зберігали у холодильнику при температурі мінус 12 °С. Усі описані вище процедури виконували з дотриманням асептичних вимог. Перед застосуванням необхідну кількість екстракту повільно розморожували і стерилізували через міліпорові фільтри діаметром 0,45 μm .

Як бактерицидну речовину використовували сульфацил-натрій, оптимальну концентрацію якого добирали дослідним шляхом при посіві проб на поживні середовища для мікроорганізмів за загальноприйнятою методикою.

У контролі використовували фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко (ФСБД) з додаванням 10 % або 20 % фетальної сироватки теляти та пеніциліну (100 од/мл).

Після приготування контрольного та дослідного середовищ визначали їх фізико-хімічні показники. Осмотичний тиск середовищ перевіряли за допомогою осмометру ОМК 1С-01, кислотн - водневий показник (рН) вимірювали іономером марки УЄВ-74. Токсичність середовищ визначали шляхом біопроб на сперміях бугаїв та баранів при додаванні сперми у співвідношенні 1:10.

Культивування ембріонів у середовищах проводили відповідно інструкції з трансплантації ембріонів великої рогатої худоби [5].

Результати досліджень. Розробку середовища для короточасного зберігання ембріонів ссавців почали з аналізу патентно-пошукової інформації, на підставі якої були підібрані компоненти та складена рецептура.

Складання рецептури середовища здійснювали в напрямі спрощення його складу зі збереженням властивостей, необхідних для розвитку ембріонів. У середовище для вилучення ембріонів (СФСБ) для росту і розвитку ембріонів додавали екстракт ембріона одного із видів жуйних тварин, тим самим вносили необхідні компоненти: “ріст стимулюючі” фактори, гормони, енергетичні субстрати.

Після приготування середовищ визначали осмотичний тиск, який відповідав 310-328 мОсм у дослідному середовищі і 318 мОсм - у контрольному, тобто він перевершував верхню допустиму межу (310). Однак є літературні дані, що він може коливатися у межах $\pm 10\%$ без шкоди для клітин [1], що підтвердили і наші дослідження. Показники рН були 7,7 у дослідному та 7,6 - у контрольному середовищі. У подальших дослідженнях рН було скореговане відповідно до вимог об'єкту культивування.

Після встановлення фізичних параметрів середовищ були проведені дослідження з визначення токсичності дослідного середовища при інкубуванні в ньому спермійів бугая при температурі 38 °С з подальшим визначенням їх виживаності через кожну годину до повної загибелі (табл.1).

1.Виживаність спермійів бугаїв при інкубуванні у дослідному та контрольному середовищах

n=10

Склад середовища	Якісні показники сперми при її розбавленні ($M \pm m$)		
	рухливість спермійів після розбавлення сперми, балів	виживаність спермійів (t), год	показник абсолютної виживаності спермійів (S_a), ум.од
СФСБ+20 % ЕЕТ	8,0 $\pm$ 0,1	14,0 $\pm$ 0,21	70,0 $\pm$ 2,97

(дослід)			
ФСБД+20 % ФС (контроль)	8,0±0,1	12,6±0,34	67,6±0,67

Примітка: СФСБ – стабілізований фосфатно-сольовий буфер; ЕЕТ - екстракт ембріона теляти; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко; ФС - фетальна сироватка.

Встановлено (див. табл.1), що якісні показники сперми після розбавлення дослідним та контрольним середовищем становили: рухливість спермійів 8,0 балів; показник виживаності відповідно - 14,0±0,21 і 12,6±0,34 та показник абсолютної виживаності 70,0±2,97 і 67,6±0,67. Таким чином, можна зробити висновок, що дослідне середовище не має токсичної дії на спермії бугаїв.

Для запобігання мікробної контамінації в результаті патентного пошуку підібрано малотоксичний сульфаніламідний препарат широкого спектра дії на мікроорганізми – сульфацил-натрій (альбуцид).

Оптимальну концентрацію бактерицидної речовини підбирали дослідним шляхом, починаючи з концентрації 50 мг/мл середовища для розрідження сперми бугаїв. При цьому визначали вплив сульфацил-натрію на рухливість спермійів бугаїв щогодинно. Результати досліджень показали, що спермії у досліді зберігали активний рух до 8 годин та більше 12 годин у контролі, тобто дослідна концентрація сульфацил-натрію негативно впливає на спермії бугая.

Наступним етапом нашої роботи було визначення оптимальної концентрації сульфацил-натрію за виживаністю спермійів у дослідному середовищі (СФСБ+20 % ЕЕТ). Для цього були використані концентрації сульфацил-натрію від 1 до 25 мг/мл середовища (табл. 2).

Досліди показали, що спермії бугаїв зберігали рухливість більше 12 годин як при додаванні бактерицидної речовини у вищезазначених концентраціях, так і в контролі без препарату, що свідчить про нетоксичність препарату.

У подальших дослідженнях було вивчено вплив сульфацил-натрію в цих концентраціях на умовно-патогенну мікрофлору статевих шляхів тварин (табл.3).

Бактеріологічні дослідження показали, що усі досліджені мікроорганізми (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) чутливі до сульфацил-натрію в концентрації від 5 до 10 мг/мл, при зменшенні концентрації препарату до 2-4 мг/мл ріст мікроорганізмів знижувався, але повної бактерицидної активності препарату не спостерігалось.

2. Виживаність спермійів бугаїв при інкубуванні у дослідному середовищі з різними концентраціями сульфацил-натрію

n=10

Концентрація сульфацил-натрію, мг/мл	Якісні показники сперми при її розбавленні (M±m)		
	рухливість спермійів після розбавлення сперми, балів	виживаність спермійів (t), год	показник абсолютної виживаності спермійів (Sa), ум.од
1	8,0±0	13,2±0,21	70,0±2,97
5	8,0±0	12,6±0,34	67,6±0,67
10	8,0±0	12,9±0,21	69,0±0,97
25	8,0±0	13,1±0,21	70,0±2,97
Без препарату	8,0±0	13,0±0,21	70,0±2,97

3. Вплив сульфацил-натрію на ріст мікроорганізмів

n=10

Концентрація сульфацил-натрію, мг/мл	Культури мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів на живильних середовищах		
		МПА, кількість колоній (M±m)	МПБ	Середовище Буліра
1	Escherichia coli Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Bacillus subtilis	10±0,91 - 20,25±6,98 28,50±6,03	++ - + +	+ - - -
5	Escherichia coli Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Bacillus subtilis	- - - -	- - - -	- - - -
10	Escherichia coli Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Bacillus subtilis	- - - -	- - - -	- - - -
25	Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis	- - - -	- - - -	- - - -

Таким чином, оптимальною концентрацією сульфацил-натрію у середовищі для розрідження сперми бугаїв була 5-25 мг/мл, яка не мала токсичного впливу на спермії, але до неї була чутлива умовно-патогенна мікрофлора статевих шляхів тварин та оточуючого повітря.

Далі проводили випробування зі впливу екстракту ембріонів різних видів жуйних тварин при зниженні його концентрації від 20 % до 10 % на якісні показники сперми баранів-плідників (табл. 4).

Результати досліджень показали, що спермії ссавців не чутливі до зміни концентрації ЕЕ від 20 до 10 % та виду тварин, від яких отримано екстракт ембріона.

4. Вплив екстракту ембріонів різних видів тварин у залежності від його концентрації на показники сперми баранів-плідників

n=10

Склад середовища	Якісні показники сперми при її розбавленні (M±m)		
	рухливість спермій після розбавлення сперми, балів	виживаність спермій (t), год	показник абсолютної виживаності спермій (Sa), ум.од
1.СФСБ+20%ЕЕТ+С	7,3±0,11	13,3±0,31	65,8±2,24
2. СФСБ +10%ЕЕТ+С	8,0±0	13,6±0,34	69,6±0,67
3. СФСБ +20%ЕЕЯ+С	8,0±0	14,0±0	70,0±2,97
4. СФСБ +10%ЕЕЯ+С	8,0±0	13,6±0,34	67,0±4,58
5. СФСБ +20%ЕЕЦ+С	8,0±0	13,6±0,34	68,3±2,19
6. СФСБ +20%ЕЕЦ+С	8,0±0	14,0±0	74,6±3,41
7.ФСБД+20%ФС+П	8,0±0	13,6±0,34	69,6±0,67

Примітка: СФСБ – стабілізований фосфатно-сольовий буфер; ЕЕТ- екстракт ембріону теляти; ЕЕЯ- екстракт ембріону ягняти; ЕЕЦ екстракт ембріону

цапеняти; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбеко; ФС - фетальна сироватка; С - сульфацил-натрію; П- пеніцилін.

При цьому виживаність (t) та абсолютна виживаність (Sa) спермій у середовищах із додаванням 20; 10 % будь-якого ЕЕ не відрізнялася від значень цих показників у контролі ($p > 0,05$).

Таким чином, підтверджена робоча гіпотеза щодо запропонованого екстракту ембріонів різних видів тварин, який не поступається за біологічно важливими показниками фетальній сироватці теляти.

Лабораторну перевірку з визначення придатності розробленого середовища для короткострокового зберігання ембріонів ссавців проводили шляхом культивування ембріонів ссавців до наступної стадії розвитку.

Для культивування використовували ембріони великої рогатої худоби та лабораторних тварин (пацюків і мишей) на різних стадіях розвитку, задовільної, доброї і відмінної якості. При цьому отримані позитивні результати: більша кількість ембріонів досягла наступної стадії розвитку (табл. 5).

5. Вплив середовищ на розвиток ембріонів ссавців при культивуванні їх *in vitro*

Ембріони	Розвилось ембріонів до наступної стадії (M±m)			
	СФСР+10 % ЕЕТ+С		ФСБД+10 % ФС+П	
	шт	%	шт	%
Корів	9/10	90,0±5,21	9/10	90,0±5,21
Пацюків	16/17	98,3±3,12	9/10	90,0±5,21
Мишей	19/20	99,05±1,45	18/20	99,1±1,68

Визначено, що усі ембріони доімплантаційних стадій розвитку (морули, бластоцисти) відмінної та доброї якості досягли наступної стадії розвитку. Ранні морули задовільної якості дегенерували як у досліді, так і у контролі.

Таким чином нами розроблене, апробоване та запатентоване середовище для короткочасного збереження ембріонів ссавців (Патент на винахід № 77745 від 15.01.07).

Далі наведено склад розробленого середовища:

NaCl	8,5 г
Na ₂ HPO ₄ · 6 H ₂ O	2,17 г
KH ₂ PO ₄	0,2 г
Екстракт ембріона теляти, вівці або кози	100,0 г
сульфацил-натрію	5,0 г
бідистильована вода	1,0 л

Висновки:

1. Розроблене середовище з доданням як імплемента 10 % екстракту ембріона жуйних тварин та 5 г/л сульфацил-натрію можна використовувати для короткострокового збереження ембріонів ссавців.

2. Створення мало компонентного вітчизняного середовища з доступного і більш дешевого матеріалу має велике прикладне значення в рішенні проблем відтворення та прискореного розмноження сільськогосподарських тварин методом трансплантації ембріонів.

Бібліографічний список

- 1.Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1970. – 151 с.
- 2.Методические указания по использованию французской технологии трансплантации эмбрионов // Жильцов Н.З. и др. Госагропром СССР. – Москва, 1986. – 32 с.
- 3.Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных - Москва: Агропромиздат, 1989. – 302 с.
- 4.Мадисон В.В., Мадисон В.Л. Трансплантация эмбрионов в практике разведения молочного скота. – Москва: Агропромиздат, 1988. – С.71-74.
- 5.Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 57с.
6. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии: Справочник /В.Ф.Ковалев, И.Б.Волков, Б.В.Виолин и др. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 223 с.
- 7.Тихона Г.С. Способи підвищення приживлення ембріонів великої рогатої худоби при трансплантації: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. - Харків, 1996. – 25 с.
- 8.Авторское свидетельство №1713529, 1989, Ф.И.Осташко, М.К.Дибиров, Н.Д.Безуглый.

СРЕДА ДЛЯ КРАТКОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА Г.С.Тихона, В.Н Хмельков, Институт животноводства УААН

Разработана мало компонентная среда для кратковременного хранения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма. Среда прошла лабораторную проверку на эмбрионах лабораторных и сельскохозяйственных животных и по результатам исследований ее можно использовать для биотехнологических работ с соблюдением необходимых требований. Создание мало компонентной отечественной среды из доступного и более дешевого материала имеет большое прикладное значение в решении проблем воспроизведения и ускоренного размножения сельскохозяйственных животных методом трансплантации эмбрионов.

Ключевые слова: среда, экстракт эмбриона, антимикробный препарат

MEDIUM FOR SHORT-TERM CATTLE EMBRYO STORAGE Tykhona G., Khmelkov V., the institute of animal science, UAAS.

This article highlights the experimental research results on medium formation for short-term cattle embryo storage. Medium was tested by the laboratory examination. The laboratory & agricultural animal embryos were tested by the medium & it can be applied for biological & check analysis according to the requirements. Medium formation problem out of the cheap stuff is acute in our country. Medium affects reproductive capacity & accelerated breeding of the agricultural animals due to embryo transplantation.

Key words: medium, embryo extraction, bacterial preparation.

УДК 636.082.451

НОВА СХЕМА СТИМУЛЯЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМ ПРЕПАРАТОМ ЗАПЛІДНЕНОСТІ КОРІВ