

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОЛОГИИ
ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том XXXVIII

ВНИИФБиП с.-х. животных



Боровск, 1999

ББК 28:45
УДК 636:612:577.1

Т.38. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборник научных трудов. Том XXXVIII. Боровск, 1999. – 546 с.

В сборник включены экспериментальные и обзорные статьи по следующим направлениям исследований: биотехнологические аспекты животноводства; физиология, биохимия и морфология животных, выращиваемых на мясо; пищеварение, обмен веществ и продуктивность молочных коров.

Редакционная коллегия: Матвеев В.А., Медведев И.К., Заболотнов Л.А., Рябых В.И., Тараканов Б.В., Черепанов Г.Г.

© Коллектив авторов, 1999
© ВНИИФБиП с.-х. животных

СОДЕРЖАНИЕ

Биотехнологические аспекты животноводства	3
Эффективность получения потомства кроликов из зигот, микроинъекцированных генноинженерными конструкциями (В.П. Рябых, Е.Г. Сапунова, Т.П. Трубицина, Л.И. Маркина).....	3
Получение и использование сперматогоний в качестве кариопластов при реконструировании яйцеклеток (В.Н. Столярова, В.П. Рябых, С.А.Лисицина, Г.П. Маленко, И.Г. Сметанина, М.П. Овчаренко).....	13
Дозревание ооцитов крупного рогатого скота вне организма (Г.П. Маленко).....	22
Конструирование векторов на основе регуляторных элементов гена $\alpha s1$ -казеина быка (Г.А. Дворянчиков, Л.Б. Иванова, В.А. Езерский, В.Г.Шевченко).....	40
Выделение космидных клонов с генами белков казеина быка (Г.А.Дворянчиков, Л.Б. Иванова, В.Г. Шевченко).....	47
Структурно-функциональные особенности микросателлитных последовательностей и их использование в изучении генома сельскохозяйственных животных (В.Н. Симоненко, Н.П. Корохов, В.Г.Шевченко).....	54
Выделение и анализ микросателлитных последовательностей (TG)-типа из космидной геномной библиотеки быка (В.Н. Симоненко, Н.П.Корохов, Ю.А. Логинова, В.Г. Шевченко).....	64
Биологические эффекты пробиотиков (Б.В. Тараканов).....	78
Новые пробиотики и микробные препараты направленного действия для использования в животноводстве и кормопроизводстве (Б.В.Тараканов, Т.А. Николичева, И.А. Долгов, Г.К. Соколовская, А.М.Соловьев).....	87
Микрофлора и процессы пищеварения у телят при скормливании нового пробиотика лактоамиловорина (Б.В. Тараканов, Л.В.Харитонов, Л.Н. Клабукова, Л.В. Пузач.....	97
Новые мобилизуемые векторы семейства PLF1311 для молочнокислых бактерий, несущие NIS сайт gr4 с различными флангами (В. В. Алёшин, Б. В. Тараканов).....	106
Клонирование гена соматолиберина в молочнокислых бактериях и его экспрессия с промотора репликативных генов вектора (В.В. Алёшин, Е.В. Семёнова, Б.В. Тараканов, С.Г. Карпушина, В.А. Ливищ).....	116
Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы кроликов при длительном использовании стрептофагина (А.И.Манухина, Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева).....	130
Оценка иммуногенных свойств конъюгатов с-концевых окта- и тетрапептидных фрагментов холецистокинина с природными и синтетическими полимерными носителями, в свободной и пролонгированной формах, как основы вакцины аппетита (Н.А. Назаров, Е.М. Колоскова, В.А. Галочкин).....	136
Регулирование скорости выделения низкомолекулярных биологически активных веществ из препаратов пролонгированного действия образованием интерполимерных комплексов (Е.М. Колоскова, В.А.Галочкин).....	146
Свойства рекомбинантного соматотропного гормона свиньи и его препараты пролонгированного действия (Е.М. Колоскова, В.А.Матвеев, В.А. Галочкин).....	152
Физиология, морфология и биохимия животных, выращиваемых на мясо	159
Уровень гормонов и обмен веществ у растущих бычков (В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, Г.М. Ельченинов, Б.Д. Кальницкий,	

<i>М.Д.Аитова, К.Ш. Еримбетов, А.М. Материкин, Н.Н. Семина, В.И.Агафонов, М.В. Сорокин)</i>	159
Активность АТФаз в тканях откармливаемых бычков (<i>В.А. Матвеев, В.П.Галочкина, Г.М. Ельченинов, Т.И. Назарова</i>).....	173
Метаболизм мышечных белков и липидов подкожной жировой ткани у бычков молочного направления в период дорастивания и откорма (<i>М.Д. Аитова, Б.Д Кальницкий, К. Т. Еримбетов, П.В. Матющенко, Е.И.Кузнецова</i>).....	183
Применение базовой системной модели роста для разных фенотипов: прогнозирование эффектов действия кленбутерола у бычков на откорме (<i>Г.Г. Черепанов, В.А. Матвеев, К.Ш. Еримбетов</i>).....	192
Обмен мышечных белков у бычков в онтогенезе (<i>И.М. Тюпаев, Б.Д.Кальницкий, А. В. Бочаров, Н.Р. Пьянков, А.И. Григорьев</i>).....	198
Обмен белков скелетных мышц и всего тела у бычков при разной интенсивности выращивания (<i>И.М. Тюпаев, Н.Р. Пьянков, А.В.Бочаров, А. И. Григорьев</i>).....	208
Идентификация и оценка взаимодействий метаболических потоков на уровне продуктивной эффективности растущего скота (<i>Г.Г.Черепанов, В.Б. Решетов, А.Ю. Морозова</i>).....	218
Эмбриогенез мышечной и жировой ткани у крупного рогатого скота (<i>А.И. Манухина</i>).....	233
Морфология иммунной системы (<i>А.И. Манухина</i>).....	246
Регуляция потребления корма у свиней (<i>С.Г. Кузнецов</i>).....	254
Обеспеченность организма поросят минеральными веществами в ранний период онтогенеза (<i>А.Г. Овчаренко, С.Г. Кузнецов, Т.С. Кузнецова</i>).....	269
К обоснованию питания поросят в период подсоса (<i>В.И. Дудин, С.Н.Аитов, С.Д. Ковальский</i>).....	278
Динамика роста и развития тонкого кишечника, мышц и содержания аминокислот у поросят в онтогенезе и в связи с различными условиями питания (<i>Е.В. Пьянкова</i>).....	285
Потребность в йоде и особенности его метаболизма у свиней в онтогенезе (<i>Е.В. Громова, С.Г. Кузнецов</i>).....	296
Биологическая доступность минеральных элементов для молодняка свиней из природных цеолитов (<i>С.Г. Кузнецов, О.Д. Скурихина</i>).....	313
Регуляция натрия, калия, кальция и магния в эндометрии свиноматок (<i>И.А. Бурков, Т.П. Трубицина</i>).....	322

Пищеварение, обмен веществ и воспроизводство у жвачных животных.....

Переваривание протеина в кишечнике жвачных животных (<i>Е.Л.Харитонов, А.М. Материкин, Н.Д. Мысник</i>).....	330
Метаболизм в молочной железе у лактирующих и сухостойных коров (<i>Л.А. Заболотнов, Н.А. Гаранина, Л.Н. Вострова, А.В. Лысов</i>).....	343
Обеспеченность субстратами энергетических процессов у коров при различных уровнях кормления и продуктивности (<i>В.И. Агафонов, В.Б.Решетов, В.П. Волобуев, Р.А. Волобуева, В.П. Лазаренко, А.Ю.Морозова, Е.А. Надальяк</i>).....	375
Теоретическое и экспериментальное моделирование динамики поглощения субстратов из крови и синтеза компонентов молока в молочной железе коров (<i>Г.Г. Черепанов, И.К. Медведев, А.С.Мартынова</i>).....	384
Переваривание структурных углеводов у молочных коров при различных условиях кормления (<i>Н.Н. Семина, Н.Д.Мысник, Е.Л.Харитонов, И.А. Долгов, А.М. Материкин</i>).....	394
Влияние факторов питания на микрофлору преджелудков у коров (<i>И.А.Долгов, А.М. Материкин, Е.Л. Харитонов</i>).....	400
Гормональный статус у коров на разных стадиях лактации и при инфузии субстратов (<i>В.А. Матвеев, Е.В. Бутров, В.П. Радченков, А.В.Антонов</i>).....	409
Физиолого-биохимическое обоснование системы минерального	

питания молочных коров (<i>С.Г. Кузнецов</i>).....	418
Минеральный обмен у коров при замещении части кормов субстратами и метаболитами (<i>В.И. Калашиник, С.Г. Кузнецов, В.Д.Омельченко, А.Г. Овчаренко, В.Т. Винокурова</i>).....	451
Динамика макроэлементного статуса у коров в процессе голодания (<i>В.Д. Омельченко, В.И. Калашиник, С.Г.Кузнецов</i>).....	467
Метаболизм липидов в жировой ткани молочных коров в конце сухостойного периода и в начале лактации (<i>П.В. Матющенко</i>).....	471
Обмен тканевых белков в период лактогенеза у коров (<i>Н.А. Комков, И.К. Медведев</i>).....	486
Динамика секреторных продуктов в молочной железе коров и коз в процессе запуска (<i>Е.М. Свищева</i>).....	494
Участие аминокислот в регуляции сычужного пищеварения у телят (<i>Л.В. Харитонов, О.В. Харитонова</i>).....	502
Минеральный состав природных цеолитов различных месторождений (<i>С.Г. Кузнецов, О.Д. Скурихина, А.Г. Овчаренко</i>).....	514
Физико-химические свойства премиксов на основе сапропелей (<i>В.Д.Евтишенков, С.Г. Кузнецов, В.Д. Омельченко, А.Г. Овчаренко, Т.Е. Рябых, М.С. Долгова</i>).....	518
Некоторые аспекты физиологических взаимосвязей функции лактации и воспроизводства у высокопродуктивных коров (<i>К.И. Бахитов, Л.А.Калашиник</i>).....	524
Формы проявления анэструса у высокопродуктивных коров в начале лактации и способы их преодоления (<i>К.И.Бахитов, Л.А.Калашиник</i>).....	531
Биологическое консервирование кормов (<i>А.М. Соловьев</i>).....	538

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ЖИВОТНОВОДСТВА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПОТОМСТВА КРОЛИКОВ
ИЗ ЗИГОТ, МИКРОИНЪЕЦИРОВАННЫХ
ГЕННОИНЖЕНЕРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ**

В.П. Рябых, Е.Г. Сапунова, Т.П. Трубицина, Л.И. Маркина
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

С целью разработки технологии получения трансгенных кроликов, продуцирующих с молоком биологически активные вещества лекарственного назначения, были проведены исследования по изучению факторов, влияющих на эффективность получения потомства кроликов из зигот, микроинъецированных генноинженерными конструкциями. Проведенные исследования показали, что суперовуляцией на гормональную обработку лучше реагировали крольчихи пород шиншилла ($36,0 \pm 2,2$ овуляций), калифорнийский ($40,0 \pm 5,4$), серебристый ($39,0 \pm 3,4$). Несколько хуже - белый великан ($31,0 \pm 2,6$) и черный аборигенный ($20,0 \pm 7,3$). При этом отмечено, что лучшие суперовуляцией реагируют крольчихи всех пород в возрасте до полутора лет. Приживляемость зигот, микроинъецированных генноинженерной конструкцией, как в расчете на всех использованных реципиентов, так и на одного сукрольного реципиента, была наиболее высокой у крольчих-реципиентов калифорнийской породы (14,3 и 29%) и шиншиллы (8,2 и 19,0%). С увеличением числа трансплантированных зигот с 14-20 до 31-40 процент сукрольных реципиентов увеличивался с 26,6 до 66,6%. С увеличением возраста реципиентов с 1 до 3-х лет снижалась как сукрольность (с 58,0 до 17%), так и приживляемость эмбрионов (с 10,2 до 5,9%). Отмечено, что лучшей приживляемостью обладали микроинъецированные зиготы, полученные от крольчих-доноров породы шиншилла (54,3 против 33,3% для остальных исследуемых пород). Установлено, что обработка зигот цитохалазином Б перед инъекцией в них ДНК снижала на 12-17% количество blastocysts, вышедших из прозрачной оболочки при культивировании in vitro в течение 144 час. Наибольший процент blastocysts, вышедших из прозрачной оболочки, получен при культивировании зигот, микроинъецированных ДНК в буферном растворе трис-ЭДТА.

Введение

Получение трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества лекарственного назначения, считается в настоящее время одним из наиболее быстро окупаемых направлений трансгенной технологии, разработке которого уделяется наибольшее внимание.

Принципиальная возможность получения трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества белковой природы, обусловлена механизмом тканеспецифической экспрессии, определяемой регуляторными последовательностями генов основных

белков молока, используемых в качестве промоторов при создании генноинженерных конструкций.

Среди белков, имеющих терапевтическое значение, наибольшее внимание исследователей привлекают: эритропоэтин, фактор некроза опухолей, колонии стимулирующие факторы, интерлейкины, урокиназа и др. Получение белков этого класса с помощью рекомбинантных бактерий в ряде случаев принципиально невозможно из-за неспособности прокариот осуществлять сложные посттрансляционные модификации синтезируемых белков (гликозилирование, карбоксилирование и др.), которые в совокупности обеспечивают функциональную активность этих белков.

Разработанные в настоящее время технологии получения некоторых лекарственных биологически активных веществ на основе использования культур клеток млекопитающих животных, которые способны в определенной степени осуществлять посттрансляционные модификации белков, являются слишком трудоемкими и дорогостоящими. Расчеты, основанные на результатах первых экспериментов, свидетельствуют, что только разработка технологии получения трансгенных животных, продуцирующих лекарственные биологически активные вещества с молоком, позволит решить проблему более быстрыми темпами и с наименьшими затратами. Эти животные-суперпродуценты могут стать высокоэффективными экологически чистыми биофабриками по производству биологически активных веществ, необходимых для медицины и сельского хозяйства по несравнимо низкой себестоимости. Кроме того, получение этих веществ из молока позволит устранить опасность заражения их вирусами гепатита, СПИДа и др., которая существует при традиционной технологии получения этих веществ из тканей человека.

В связи с тем, что некоторые лекарственные вещества имеют высокую биологическую активность и терапевтические дозы их очень низки, потребности их на мировом рынке исчисляются в граммах. Поэтому многие исследователи (1, 2) приходят к выводу, что очень удобным объектом для получения этих веществ с молоком является кролик. Основными достоинствами кроликов для технологии получения суперпродуцентов биологически активных веществ с молоком, являются их высокая скороплодность и одноразовое в течение суток кормление крольчихами своего потомства, в результате которого от крольчихи можно получать до 150-200 мл молока в сут. Исходя из этих соображений, возникает необходимость в разработке эффективной технологии получения трансгенных кроликов, продуцирующих с молоком биологически активные вещества лекарственного назначения.

В настоящее время при получении трансгенных кроликов исследователи используют отдельные этапы технологии трансплантации эмбрионов поздних стадий развития, разработанной для изучения некоторых узких вопросов биологии развития. Однако применительно к технологии получения трансгенных животных к этим этапам предъявляются значительно более жесткие требования в связи с тем, что в этой технологии используются эмбрионы на стадии зиготы, которая имеет продолжительность всего 6-8 часов.

В значительной степени эффективность технологии получения трансгенных животных зависит от жизнеспособности и приживляемости зигот, подвергнутых различным процедурам, связанным с введением в их пронуклеусы генноинженерных конструкций. В связи с этим, для разработки эффективной технологии получения трансгенных кроликов микроинъекционным методом, необходимы исследования по изучению влияния различных факторов

на жизнеспособность и приживляемость зигот, микроинъецированных генноинженерными конструкциями.

Материал и методы

Исследования проведены на кроликах пяти пород, наиболее распространенных в Калужской и Московской областях (советская шиншилла, калифорнийский, серебристый, белый великан и черный аборигенный). Для получения максимального числа эмбрионов на стадии зиготы у крольчих-доноров вызывали суперовуляцию по следующей схеме: 1-й день – ФСГ(вечер); 2-й день – ФСГ(утро и вечер); 3-й день – ФСГ(утро и вечер); 4-й день – ФСГ(утро), ХГ(вечер) и покрытие самцом; 5-й день – извлечение зигот (утро). Доза ФСГ на каждую инъекцию составляла 0,5 армор. ед., а ХГ – 100 И.Е.

Подготовку синхронизированных крольчих-реципиентов проводили по следующей схеме: в первый день обработки крольчих-доноров препаратом ФСГ, кроликам-реципиентам вводили ГСЖК в дозе 50 И.Е., а на 4-й день – ХГ (100 И.Е.) и спаривали с вазэктомизованным самцом. Извлечение эмбрионов, а также их трансплантацию проводили хирургическим методом через бахромку яйцевода.

Микроинъекцию генноинженерной конструкции в зиготы проводили под инвертированным микроскопом ICM-405 фирмы "Orton", снабженным оптикой Номарского, позволяющей визуализировать пронуклеусы в зиготах без каких-либо дополнительных манипуляций. Линейные фрагменты плазмидной ДНК различных генноинженерных конструкций размером от 5 до 7 тыс. пар оснований инъецировали в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5 – 2 мкм в объеме 2 – 3 пкл, в концентрации 2 – 4 мкг/мл.

Для манипуляций с кроличьими зиготами на воздухе использовали среду, приготовленную по прописи Капе (1981) с добавлением HEPES-буфера для поддержания необходимого pH раствора.

Зиготы, неразрушавшиеся в течение 1 часа после микроинъекции генноинженерной конструкции, были трансплантированы синхронизированным крольчихам-реципиентам по 15 – 40 штук поровну в оба яйцевода с помощью пластикового катетера. Часть микроинъецированных зигот была поставлена на культивирование. Культивирование эмбрионов проводили в среде Hams F-10, обогащенной 20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота под газовой фазой, содержащей 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что в Калужской и Московской областях разводят несколько пород кроликов, необходимо было выяснить, какие из широко распространенных в нашей зоне пород наиболее подходят для использования их в качестве доноров и реципиентов в работах по трансгенезу.

Анализ результатов по вызыванию суперовуляции у крольчих-доноров показал (табл. 1.), что лучше на гормональную обработку реагировали крольчихи пород: шиншилла, калифорнийский и серебристый. Несколько хуже – белый великан и черный аборигенный.

Таблица 1. Зависимость реакции суперовуляции от породы донора эмбрионов

Порода кроликов	Число животных	Число овуляций M ± m	Число извлеченных эмбрионов M ± m

Шиншилла	23	36,0±2,2	32,0±2,3
Калифорнийский	10	40,0±5,4	30,0±6,3
Серебристый	10	39,0±3,4	36,0±4,9
Белый великан	8	31,0±2,6	22,0±2,7
Черный аборигенный	3	20,0±7,3	19,0±6,2

Эта закономерность сохранилась и при извлечении зигот у крольчих-доноров (32, 30, 36; 22 и 19, соответственно). Выход зигот в пределах 30-36 на одну крольчиху-донора является достаточно высоким и свидетельствует о хорошем качестве разработанной в лаборатории, схемы вызывания суперовуляции.

Наряду с этим была отмечена закономерность, отражающая лучшую ответную реакцию суперовуляцией на гормональную обработку крольчих всех пород в возрасте от одного года до полутора лет, после чего ответная реакция на гормональную обработку достоверно снижалась, с $40,0 \pm 2,0$ до $25,0 \pm 1,5$ (табл. 2).

Таблица 2. Реакция суперовуляции у крольчих-доноров разного возраста

Возраст животных (год)	Число животных	Число овуляций
1	34	40,0±2,0
2	9	25,0±1,5
3	7	27,0±2,2

Аналогичная закономерность отмечена кролиководами-практиками в племенном кролиководстве, где не рекомендуется использовать для племенных целей самок в возрасте старше трех лет. Особенно важным моментом при получении потомства из зигот, микроинъецированных генноинженерными конструкциями, является приживляемость этих зигот у крольчих-реципиентов.

Таблица 3. Сукрольность и приживляемость эмбрионов в зависимости от породы крольчих-реципиентов

Порода реципиента	Число животных-реципиентов			Пересажено зигот		Получено крольчат			Приживляемость эмбрионов, %	
	Число животных-реципиентов	п	%	Всего	На одного реципиента	Всего	На всех реципиентов	На одного сукрольного реципиента	На всех реципиентов	На сукрольных реципиентов
Шиншилла	18	18	44	414	23,0±1,1	36	2,0±0,6	4,3	8,2	19
Калифорнийский	13	6	46	309	24,0±1,7	46	3,5±1,1	7	14,3	29
Серебристый	4	2	50	115	29,0±4,9	9	2,2±1,4	4,5	7,8	15
Белый великан	4	3	75	105	26,0±3,8	9	2,1±1,0	3	8,5	11
Черный аборигенный	7	1	14	156	22,0±0,9	2	0,3±0,28	2	1,2	9

Анализ приживляемости зигот, микроинъецированных генноинженерной конструкцией, в зависимости от породы реципиента показал (табл. 3), что при трансплантации крольчихам-реципиентам по 22-29 зигот наибольший процент сукрольности наблюдался у реципиентов породы белый великан (75%), а наименьший – у породы черный аборигенный (14%).

У породы шиншилла, калифорнийский и серебристый сукрольность была практически одинаковой (44, 46 и 50%, соответственно). Однако приживляемость эмбрионов в расчете на всех использованных реципиентов была наиболее высокой у крольчих-реципиентов калифорнийской породы (14,3%), шиншиллы (8,2%) и белый великан (8,5%), но учитывая приживляемость эмбрионов на одного сукрольного реципиента, наилучшие результаты отмечены у крольчих калифорнийской породы (29%) и шиншиллы (19%). Эти результаты дают основание заключить, что при получении потомства из зигот, микроинъектированных генноинженерными конструкциями, в качестве реципиентов целесообразно использовать крольчих следующих пород: калифорнийский, шиншилла, серебристый и белый великан. Нецелесообразно использовать крольчих черной аборигенной породы.

Принимая во внимание невысокий процент приживляемости микроинъектированных зигот, существенное значение приобретает вопрос о числе зигот, которое необходимо пересаживать животному-реципиенту для получения положительного результата. Анализ результатов исследований по выяснению зависимости приживляемости эмбрионов от числа зигот, трансплантированных крольчихам-реципиентам показал (табл. 4), что с увеличением числа трансплантированных эмбрионов процент сукрольных реципиентов увеличивался с 26,6 до 66,6%, при пересадке, соответственно, с 18 до 35 зигот.

Таблица.4. Зависимость приживляемости эмбрионов и сукрольности от числа зигот, трансплантированных крольчихам-реципиентам

Число трансплантированных эмбрионов	Число животных-реципиентов	Сукрольных реципиентов		Пересажено зигот		Получено крольчат		Приживляемость эмбрионов, %
		n	%	Всего	На одного реципиента	Всего	На одного сукрольного реципиента	
14-20	15	4	26,6	267	18±0,8	18	4,5	6,7
21-30	27	12	44,4	665	25±0,6	61	5,1	9,2
31-40	6	4	66,6	208	35±1,6	20	5,0	9,6

Увеличивалась также и приживляемость эмбрионов в расчете на всех использованных доноров с 6,7% до 9,6%, соответственно. Однако среднее число крольчат, полученное на одного сукрольного реципиента, оставалось практически одинаковым – 4,5 при трансплантации 14-20 зигот; 5,1 при трансплантации 21-30 зигот и 5,0 при трансплантации 31-40 зигот. Эти результаты показывают, что крольчихам-реципиентам наиболее целесообразно трансплантировать от 30 до 40 зигот, микроинъектированных генноинженерной конструкцией. Немаловажное значение в работах по трансгенезу имеет решение вопроса об интервале времени, в течение которого можно манипулировать с зиготами разных видов животных в процессе проведения микроинъекций без существенного снижения их жизнеспособности. Анализ результатов проведенных исследований показал (табл. 5), что нахождение кроличьих зигот вне организма матери в течение 1,5-4,5 час при проведении манипуляций, связанных с микроинъекцией в них генноинженерной конструкции, не оказало

существенного отрицательного влияния на сукрольность крольчих-реципиентов и приживляемость эмбрионов при трансплантации самкам-реципиентам по 22-24 зиготы.

При трансплантации крольчихам-реципиентам микроинъецированных зигот, находившихся вне организма матери в течение 5-5,5 часов, наблюдалась такая же сукрольность реципиентов и приживляемость эмбрионов как и в период от 1,5 до 4,5 час, но реципиентам этой группы было трансплантировано свыше 30 зигот, т.е. такое число зигот, при котором повышается и сукрольность, и приживляемость (табл. 2), поэтому период нахождения микроинъецированных зигот целесообразно ограничить 4,5 часами.

Таблица 5. Зависимость приживляемости микроинъецированных зигот от времени нахождения их вне организма крольчихи

Интервал времени (час)	Число животных	Сукрольных реципиентов		Пересажено зигот		Получено крольчат		Приживляемость эмбрионов (%)	
		п	%	Всего	На одного реципиента	Всего	На сукрольного реципиента	На всех реципиентов	На сукрольных реципиентов
0,5-1,5	4	2	50	99	24,7	8	4	8	17
2,0-2,5	11	4	36,3	258	23,4	22	5,5	8,5	24
3,0-3,5	18	7	38,8	411	23,3	30	4,3	7,3	14
4,0-4,5	9	4	44,4	200	22,2	25	6	12,5	27
5,0-5,5	6	3	50	184	31	14	4,6	7,6	15

Анализ результатов проведенных исследований также показал, что как сукрольность реципиентов, так и приживляемость эмбрионов зависят от возраста крольчих-реципиентов (табл. 6). Наименьшая сукрольность (17%) и приживляемость эмбрионов (5,9%) была отмечена у крольчих-реципиентов трехлетнего возраста. Выше было показано, что крольчихи в возрасте свыше 3-х лет также плохо реагируют и на вызывание суперовуляции.

Таблица 6. Зависимость приживляемости микроинъецированных зигот от возраста крольчих-реципиентов

Возраст реципиентов (год)	Число животных	Сукрольных реципиентов		Пересажено эмбрионов		Получено крольчат		Приживляемость эмбрионов, %
		п	%	Всего	На одного реципиента	Всего	На одного реципиента	
1	28	12	42	655	23	67	2,4	10,2
2	12	7	58	295	24	26	2,2	8,8
3	6	1	17	141	24	6	1,0	5,9

Эти факты дают основание заключить, что крольчих в возрасте 3-х лет нецелесообразно использовать в работах по трансгенезу ни в качестве доноров, ни в качестве реципиентов. Наибольший процент сукрольности (58%) был отмечен у крольчих 2-летнего возраста и несколько меньший (42%) у крольчих в возрасте 1 года, хотя у однолетних крольчих несколько выше был процент приживляемости эмбрионов (10,2%). Если учесть, что крольчихи в возрасте 1-го года лучше реагируют суперовуляцией на гормональную обработку, то их

целесообразно использовать в качестве доноров эмбрионов, а крольчих до двухлетнего возраста – лучше использовать в качестве реципиентов.

Анализ результатов исследований также показал (табл. 7), что лучшей приживляемостью у реципиентов разных пород обладали микроинъекцированные зиготы, полученные от крольчих-доноров шиншилла (53,4% против 33,3% для остальных исследуемых пород).

Таблица 7. Приживляемость микроинъекцированных зигот, полученных от крольчих-доноров разных пород

Порода доноров	Число использованных реципиентов	Сукрольность реципиентов	
		п	%
Шиншилла	22	12	54,5
Калифорнийский	7	2	28,6
Серебристый	6	2	33,3
Белый великан	6	2	33,3
Черный аборигенный	3	1	33,3

Кроме того, было отмечено, что в цитоплазме зигот, полученных от крольчих породы шиншилла, содержится меньше зернистых включений, которые препятствуют четкой визуализации пронуклеусов. Эти факты дают основание заключить, что в работах по получению трансгенных кроликов в качестве доноров целесообразно использовать крольчих породы шиншилла, а в качестве реципиентов – пород калифорнийский, шиншилла и серебристый.

В связи с тем, что при микроинъекцированном способе введения генноинженерной конструкции в пронуклеусы зигот наряду с ДНК вводятся различные буферные растворы, в которых эта ДНК растворена, возникает необходимость в выяснении влияния факторов, связанных с введением чужеродной ДНК в пронуклеусы, на жизнеспособность зигот. Было изучено влияние буферных растворов, вводимых в пронуклеусы зигот (трис-ЭДТА и фосфатно-солевого), и влияние предварительной инкубации зигот с цитохалазином Б на жизнеспособность зигот *in vitro* в течение 114 часов. Для микроинъекций использовали линейные фрагменты ДНК (6-10 тыс. пар оснований) в концентрации 10 нг/мл. Объем раствора, вводимого в пронуклеусы, составлял 1-2 пиколитра. Для растворения ДНК использовали буферный раствор, содержащий 10 мМ трис-НС1-буфер и 0,1 мМ ЭДТА, рН 7,4 и фосфатно-солевой буфер. Предварительную инкубацию зигот отдельных групп в растворе цитохалазина Б (7,5 мкг/мл) проводили с целью расслабления цитоскелета.

Анализ результатов исследования (табл. 8) показал, что обработка интактных кроличьих зигот цитохалазином Б вызывала определенное снижение процента бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки. Это снижение было еще более значительным (12-17%) при инъекции в зиготы, обработанные цитохалазином, раствора ДНК в буфере (гр. 7 и 8). Инъекция в пронуклеусы зигот фосфатно-солевого буферного раствора или раствора трис-ЭДТА (гр. 3 и 4) на 24-29% снижала число бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки, тогда как при инъекции в зиготы раствора ДНК в этих буферных системах количество вылупившихся бластоцист было на 7-9 % выше, чем в 3-4 группах, в которых зиготы инъекцировали только чистыми буферными растворами. Наибольший процент бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки, получен при культивировании *in vitro* зигот, микроинъекцированных чужеродной ДНК в буферном растворе трис-ЭДТА (гр. 5). Этот вариант был использован для инъекцирования зигот,

которые трансплантировали в яйцеводы синхронизированных крольчих реципиентов с целью получения потомства.

Таблица 8. Развитие in vitro кроличьих зигот, микроинъекцированных чужеродной ДНК при различных условиях

Группы	Число использованных зигот	Число зигот, вступивших в дробление	Развилось в течение 144 часов до стадии:		
			поздняя морула (n%)	бластоциста (n%)	вылупляющаяся бластоциста (n%)
1. Контроль (без инъекции)	50	49	16 (32,7)	5 (10,2)	28 (57,1)
2. Без инъекции + ЦХ*	32	32	11 (34,4)	4 (12,5)	16 (50,0)
3. Инъекция Т – Э**	16	15	6 (40,0)	3 (20,0)	5 (33,3)
4. Инъекция ФСБ***	16	14	4 (28,6)	4 (28,6)	4 (28,6)
5. Инъекция ДНК в Т-Э	81	71	16 (22,5)	18 (25,3)	30 (42,2)
6. Инъекция ДНК в ФСБ	44	33	13 (33,3)	10 (25,6)	14 (35,9)
7. Инъекция ДНК в Т-Э+ЦХ	28	24	7 (29,2)	6 (25,0)	6 (25,0)
8. Инъекция ДНК в ФСБ+ЦХ	33	30	9 (30,0)	8 (26,7)	7 (23,3)

* – цитохалазин Б, ** – буфер трис – ЭДТА, *** – фосфатно-солевой буфер

Выводы

1. Крольчихи пород шиншилла, калифорнийский и серебристый лучше реагируют на гормональную обработку, по сравнению с крольчихами пород белый великан и черный абorigineнный.

2. В работах по трансгенезу в качестве доноров эмбрионов целесообразно использовать в первую очередь крольчих породы шиншилла и нецелесообразно использовать крольчих породы белый великан и черный абorigineнный.

3. Лучше суперовуляцией на гормональную обработку реагируют крольчихи всех исследованных пород в возрасте до полутора лет; после этого ответная реакция достоверно снижается.

4. Лучшими реципиентами для трансплантации микроинъекцированных зигот являются крольчихи калифорнийской породы. Несколько худшие результаты приживляемости наблюдались у крольчих пород шиншилла, серебристый и белый великан в возрасте до двух лет. Нецелесообразно использовать в качестве реципиентов крольчих породы черный абorigineнный.

5. С увеличением числа зигот, трансплантированных крольчихам-реципиентам увеличивается процент сукрольности. Наиболее целесообразно трансплантировать свыше 30 зигот.

6. Время нахождения кроличьих зигот вне организма животного при проведении манипуляций, связанных с микроинъекцией в них генноинженерной конструкции, целесообразно ограничить 4,5 часами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brem G. Transgenic animals. In Biotechnology v.2 Puhler A. n.-y. YCH Press, 1993: 745-832.
2. Buhler TA. et al. Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interlenkin-2 into the milk of transgenic rabbits. Biotechnology 1990, 8: 140-143.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМАТОГОНИЙ В КАЧЕСТВЕ КАРИОПЛАСТОВ ПРИ РЕКОНСТРУИРОВАНИИ ЯЙЦЕКЛЕТОК

В.Н. Столярова, В.П. Рябых, С.А. Лисицина, Г.П. Маленко,
И.Г. Сметанина, М.П. Овчаренко

Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

Получена популяция сперматогоний из семенников неполовозрелых мышей 4 – 6-дневного возраста и бычков 3-месячного возраста, а также культура клеток сперматогенного ряда из семенников взрослых бычков с идентификацией сперматогоний. Достигнуто сохранение жизнеспособности сперматогоний в течение 7 – 10 дней при культивировании in vitro. Полученные сперматогонии использованы в качестве кариопластов при реконструировании зигот мышей и ооцитов крупного рогатого скота, дозревших in vitro.

Результаты культивирования реконструированных клеток, полученных путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные зиготы мышей, показали признаки дробления у трех клеток, из которых две выглядели как 2-клеточные эмбрионы, а одна – как 8-клеточный. Однако, хромосомный анализ показал наличие ядра только в одном из бластомеров у 2-клеточных эмбрионов и в двух бластомерах у 8-клеточного эмбриона. Результаты культивирования реконструированных клеток, полученных путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные ооциты крупного рогатого скота, дозревшие in vitro показали, в одном случае, развитие до 3 – 4 бластомеров, что подтверждено методом хромосомного анализа, в другом, визуально оценено дробление до стадии 16 – 32 бластомеров. Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования сперматогоний быка в качестве кариопластов при реконструировании яйцеклеток с целью клонирования животных.

Введение

Исследования по клонированию животных развиваются очень интенсивно. В настоящее время к этому направлению проявляется особый интерес в связи с возможностью получения клонов животных при использовании в качестве кариопластов не только эмбриональных, но и соматических клеток. В 1996 году сотрудниками Рослинского института (1) в результате использования в качестве кариопластов эпителиальных клеток молочной железы и фетальных фибробластов получено потомство овец.

На наш взгляд, первоначальные сперматогенные клетки – сперматогонии-А вполне могут служить источником ядер для реконструирования зигот. Исследования в данном направлении имеют перспективы, поскольку в случае проявления сперматогониями тотипотентных свойств, можно будет получать путем реконструирования зигот копии самцов с заведомо полезными признаками.

Первой попыткой использования сперматогоний как источника ядер для трансплантации в энуклеированную яйцеклетку, с целью определения их тотипотентности, являются исследования, проведенные на лягушках (2). После трансплантации ядер сперматогоний из тестисов взрослых особей в энуклеированные яйцеклетки, эмбрионы достигали продвинутых стадий органогенеза, и один из них развился в аномального головастика. На человеческих яйцеклетках (3) показано развитие до стадии морулы после 72 часов культивирования реконструированных клеток, полученных путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные созревшие ооциты на стадии метафазы II. Однако в связи с тем, что основная техника реконструирования клеток берет свое начало только с 1983 года (4), ряд авторов (5) подвергают сомнению результаты этих опытов, считая, что ядерное вещество, не имеющее ядерной мембраны на стадии метафазы II, не может быть удалено путем прокалывания оболочки без обработки клетки цито-скелетным ингибитором, а также отвергают возможность объединения цитопласта с кариопластом в результате прямой инъекции сперматогония в цитоплазму ооцита.

По мнению Сейдела (6, 7), инъекция ядра сперматогоний в энуклеированный одноклеточный эмбрион является перспективным направлением. Генетическая тотипотентность этих клеток является очевидной. В результате возникает возможность клонирования самцов млекопитающих с помощью трансплантации ядер сперматогоний, полученных из тестиса. На начальном этапе возникает необходимость проведения исследований по использованию сперматогоний в качестве ядер при реконструировании зигот на лабораторных животных – мышах. Затем приобретенные методические навыки позволили использовать на новом этапе исследований по клонированию крупный рогатый скот.

Целью настоящего исследования являлось получение и использование сперматогоний в качестве кариопластов при реконструировании мышинных зигот, а также получение и использование сперматогоний из семенника быка в качестве кариопластов при реконструировании ооцитов крупного рогатого скота, дозревших *in vitro* и поддержание жизнеспособности реконструированных клеток при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Материалы и методы

Эксперимент на неполовозрелых мышах 1 – 6-дневного возраста проводили в виварии института. Самок подсаживали к самцам сроком на 5 дней. Через 18-21 день наступали роды, день рождения обозначали как 0. Изоляцию семенных канальцев и получение суспензии сперматогенных клеток проводили по методу Ромрелл (8) в модификации Мушкамбарова Н. (9). Для разрушения межклеточных связей в сперматогенном эпителии и освобождения сперматогоний проводили ферментативную обработку. С этой целью ткань семенных канальцев инкубировали вначале в растворе коллагеназы (0,16 мг/мл) в течение 20 мин при 31 – 33°C, а затем трижды промывали и инкубировали в растворе трипсина и ДНК-азы (соответственно 2,5 и 0,002 мг/мл) при 31-33°C в течение 8 минут.

Клеточная суспензия сперматогенных клеток из семенников быков 3-месячного и взрослого животного была получена по методу (10, 11) с идентификацией сперматогоний под оптикой Номарского по Ортавант (12). Для разрушения межклеточных связей в сперматогенном эпителии использовали обработку трипсином (1:250) 0,25%-ной концентрации в течение 10 – 15 мин при 31 – 33°C. Для инактивации трипсина использовали 8%-ную фетальную сыворотку крупного рогатого скота.

Полученную суспензию сперматогенных клеток культивировали в среде 199 с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота при 31°C.

Реконструирование зигот проводили микрохирургическим методом (4) на установке, включающей в себя комплект микроманипуляторов и инвертированный микроскоп, оснащенный оптикой Номарского. В качестве цитопластов использовали энуклеированные зиготы или двухклеточные эмбрионы мышей. Зиготы извлекали из ампулярной части яйцевода мыши в 1-й день беременности. Перед микрохирургией группу эмбрионов инкубировали 15-20 минут в модифицированной среде Виттена (13), содержащей цитоскелетный ингибитор цитохалазин "В" в концентрации 5 мкг/мл. Для удаления пронуклеусов зиготу фиксировали с помощью удерживающей пипетки-присоски. Заточенной инъекционной пипеткой прокалывали зону пеллюциды, извлекали пронуклеусы и вводили сперматогоний под зону пеллюциды энуклеированной яйцеклетки.

Выделение ооцитов крупного рогатого скота и дозревание их *in vitro* проводили по общепринятым методикам с некоторыми модификациями Г.П. Маленко (14). Освобождали ооциты от клеток кумулюса с помощью гиалуронидазы в концентрации 1 мг/мл в растворе Дюльбекко путем встряхивания на Fuse-vortex в течение 5 – 8 минут. Ооцит, имеющий полярное тельце считали созревшим. При реконструировании ооцитов удаляли полярное тельце и прилегающую к нему область цитоплазмы, а затем трансплантировали сперматогоний в перивителлиновое пространство. Для расслабления цитоскелета ооцитов в раствор Дюльбекко добавляли цитохалазин «В» в концентрации 7,5 мкг/мл. Основные инструменты для микрохирургических манипуляций: микропипетка (внешний диаметр 25 – 30 мкм) и микроприсоска (внешний диаметр 120 мкм и внутренний – 30 мкм) были приготовлены по методу Фонбрюна (15). Все микрохирургические операции проводили в камере типа Фонбрюна при комнатной температуре.

Для слияния кариопласта-сперматогония с цитопластом-энуклеированным ооцитом использовали метод локального направленного электростимулируемого слияния клеток. Подачу импульсов тока при слиянии производили с помощью генератора прямоугольных импульсов ЭСЛ-2. Для электрослияния были применены электроды, приготовленные из вольфрама с разным диаметром торцов – 100 мкм и 20 мкм. Электроды были тщательно изолированы, за исключением торцов. В процессе работы учитывали режим и условия электростимулирующего слияния цитопласта с кариопластом, подобранные сотрудниками нашей лаборатории Рябых В.П., Лисициной С.А. (16). Слияние цитопласта с кариопластом проводили при следующих условиях: амплитуда импульса 10 – 20 V, длительность импульса 0,1 мсек с последовательным двухкратным и трехкратным воздействием. После электрослияния реконструированные зиготы мышей помещали в модифицированную среду Виттена (13) для дальнейшего развития. В качестве питательной среды для культивирования реконструированных ооцитов крупного рогатого скота использовали среду 199 или Хем F-10 с добавлением 20% фетальной сыворотки. В течение 3 – 5 суток наблюдали за развитием реконструированных клеток. Для оценки развития реконструированных клеток использовали метод хромосомных препаратов (17).

Результаты и обсуждение

В десяти сериях экспериментов по получению сперматогоний было использовано 488 семенников мышей 1 – 6-дневного возраста. Отмечено, что оптимальное количество семенников для получения клеточной суспензии составляет в каждом опыте 30 – 90. Все попытки выделения сперматогоний и получения культуры клеток из 15 – 20 семенников были неудачными, в виду больших потерь при фильтровании и центрифугировании. Отмечено, что процесс трипсинизации требует точного соблюдения температуры и времени инкубации. При нарушении какого-либо параметра не происходит полного разъединения клеток. При выделении сперматогоний необходимо строго соблюдать не только режим трипсинизации, но и режим ее прекращения. Хорошим свойством инактивации трипсина обладает фетальная сыворотка крупного рогатого скота. Культура клеток семенников неполовозрелых мышей 1 – 6-дневного возраста содержала недифференцированные клетки-сперматогонии типа-А и клетки Сертоли. Наличие одной популяции сперматогоний-А в семеннике 1 – 6-дневных мышей подтверждается другими исследователями (18).

Установлено, что через 72 – 80 часов культивирования клеточной суспензии, полученной после ферментативной обработки семенников мышей, клетки Сертоли прикреплялись ко дну культурального флакона и образовывали монослой, тогда как шаровидные клетки сперматогоний находились во взвеси и могли свободно извлекаться из культурального флакона. При этом, популяция сперматогоний была представлена двумя типами клеток с диаметром 14 – 15 микрон и 8 – 10 микрон. Все исследуемые в эксперименте культуральные среды (199, Хем F-10, Хем F-12) хорошо поддерживали жизнеспособность сперматогоний как минимум в течение 10 дней. Отмечено, что к концу этого периода популяция сперматогоний в основном была представлена клетками диаметром 8 – 10 микрон. Таким образом, сперматогоний могут быть выделены в свободном виде из сперматогенного эпителия неполовозрелых самцов и определенное время переживать в культуре на монослое клеток Сертоли.

Суспензии сперматогенных клеток, полученные из семенников быков разного возраста, отличались по составу. Уже на второй день культивирования в клеточной суспензии семенника быка 3-месячного возраста наблюдали образование монослоя в виде наличия клеток Лейдига и Сертоли. Наоборот, в клеточной суспензии семенника взрослого быка монослой не образовывался совсем на протяжении длительного времени культивирования. Трипсиновой обработки оказалось достаточно для разрушения межклеточных связей в семеннике быков в отличие от мышей, где помимо трипсина применяли обработку коллагеназой и ДНК-азой.

Ввиду того, что первая пролиферация сперматогоний в семеннике быков наступает только спустя 4 месяца после рождения, популяция сперматогенных клеток в клеточной суспензии семенника быка 3-месячного возраста была представлена только сперматогониями. Сперматогонии-А представляли собой шаровидные клетки с мелкодисперсным ядерным хроматином и наличием крупного ядрышка. Суспензия из сперматогенных клеток взрослого быка содержала все типы клеток сперматогенного ряда: сперматогонии, сперматоциты, спермазоиды.

Поскольку сперматогенные клетки потеряли свое гистотопографическое расположение в процессе извлечения из ткани семенника, создавались определенные трудности при их идентификации, поэтому

приходилось ограничиваться просмотром клеточной суспензии под оптикой Номарского. При идентификации сперматогоний взрослого быка использовали признаки, характерные для сперматогоний семенника 3-месячного возраста. Культура сперматогенных клеток семенника взрослого быка сохранялась в течение нескольких недель, однако для целей клонирования в качестве клеток-доноров использовали сперматогонии через сутки после совместного культивирования с другими сперматогенными клетками.

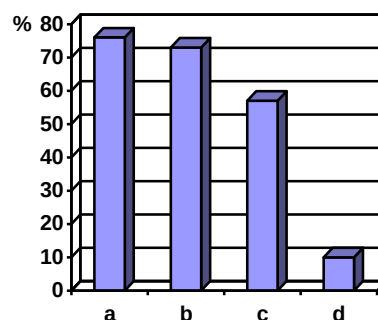
В результате реконструирования мышинных зигот с использованием сперматогоний в качестве кариопластов получено 48 реконструированных клеток. Эмбрионы, реконструированные путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные 2-клеточные эмбрионы не проявили признаков развития при культивировании их *in vitro* в течение 3 суток. Хроматин ядер трансплантированных сперматогоний в этих клетках претерпел процесс сильной конденсации, что, по-видимому, свидетельствует о низкой репрограммирующей способности цитоплазмы бластомеров 2-клеточных мышинных эмбрионов.

Однако определенная часть сперматогоний (13,8% или 5 из 36), трансплантированных в энуклеированные зиготы, претерпела процесс разбухания ядер, что является одним из основных показателей репрограммирующей способности цитоплазмы зигот, выражающейся в способности деконденсировать хроматин ядра сперматогоний и в подготовке реконструированных клеток к делению. Однако ни одна из реконструированных клеток с набухшим чужеродным ядром не проявила признаков дробления, за исключением 3-х клеток, из которых две внешне были похожи на 2-клеточные эмбрионы, а одна реконструированная зигота выглядела как нормальный 8-клеточный эмбрион. Однако исследования этих 2-клеточных и 8-клеточного эмбрионов под оптикой Номарского, а затем хромосомный анализ препаратов, приготовленных по Тарковскому (17), показали, что нормальное по размерам ядро находилось только в одном из бластомеров у 2-клеточных эмбрионов и в 2-х бластомерах у 8-клеточного эмбриона. Эти факты свидетельствуют о том, что цитоплазма мышинных зигот в определенной степени обладает способностью репрограммировать ядра сперматогоний, однако этого действия достаточно только для деконденсации ядра сперматогоний, но недостаточно для дальнейшего развития зиготы.

В качестве реципиентных клеток в процессе микроманипулирования, помимо мышинных зигот, использовали ооциты крупного рогатого скота после созревания *in vitro*. Проведенные исследования по микроманипулированию показали, что ооциты крупного рогатого скота, созревшие *in vitro*, можно успешно энуклеировать и реконструировать с включением в качестве кариопласта сперматогоний (рис. 1, 2). В результате получено 154 реконструированных клеток в двух сериях опытов. В первой серии опытов 76% ооцитов (140 из 182) оказались зрелыми, имели одно полярное тельце и были пригодны для микроманипулирования (рис. 1).

Рис. 1. Результаты микроманипулирования ооцитов крупного рогатого скота, прошедших стадию созревания *in vitro* (I серия).

а – % ооцитов, имеющих полярное тельце, пригодных для микроманипулирования; в – % ооцитов, успешно энуклеированных; с – % ооцитов успешно реконструированных; d – %

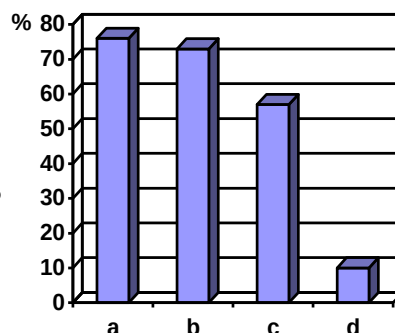


ооцитов, разрушенных при микроманипулировании.

Прошли успешно энуклеацию 73% созревших ооцитов (103 из 140). Были реконструированы путем введения в качестве кариопласта сперматогонии 57% успешно энуклеированных созревших ооцитов (81 из 103). Во второй серии опытов только 50% ооцитов (108 из 217) имели полярное тельце и были использованы для микроманипулирования (рис. 2). Прошли успешно энуклеацию 67% созревших ооцитов (73 из 108). На таком же уровне прошло и реконструирование энуклеированных ооцитов с помощью трансплантации сперматогоний. Во второй серии опытов добились большей эффективности в реконструировании клеток. В этой серии опытов, в отличие от первой, были осуществлены все этапы микроманипулирования, включая энуклеацию, пересадку сперматогоний в качестве кариопластов и электрослияние.

Рис. 2. Результаты микроманипулирования ооцитов крупного рогатого скота, прошедших стадию созревания *in vitro* (II серия).

а – % ооцитов, имеющих полярное тельце, пригодных для микроманипулирования; в – % ооцитов успешно энуклеированных; с – % ооцитов успешно реконструированных; d – % ооцитов разрушенных при микроманипулировании.



Самым слабым звеном в общей цепи микроманипулирования оказалось электрослияние, из-за несоответствия размеров сливаемых клеток кариопласта-сперматогония с цитопластом-энуклеированным ооцитом (12 – 14 мкм против 120 – 140 мкм). В связи с этим была затруднена ориентация кариопласта в электрическом поле. Несмотря на это во всех реконструированных клетках во второй серии опытов подвергали слиянию кариопласт с цитопластом спустя 18 – 20 часов после предварительного культивирования *in vitro*, которое проводилось с целью восстановления цитоскелета оперированной клетки.

Результаты культивирования реконструированных клеток, полученных путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные, со-зревшие *in vitro* ооциты крупного рогатого скота, показали, в одном случае, развитие до стадии 3 – 4 бластомеров, что подтверждено методом хромосомного анализа, в другом, визуально оценено дробление до стадии 16 – 32 бластомеров. Более продвинутых стадий развития реконструированных клеток не наблюдали в виду того, что культивирование было прервано на 3 – 5 день, а реконструированные клетки были взяты для хромосомного анализа с целью подтверждения развития.

Приведенный факт первоначального развития реконструированных созревших *in vitro* ооцитов может быть полезен при выяснении тотипотентности сперматогоний и способности цитоплазмы ре-программировать ядра сперматогоний. Полученные результаты следует признать предварительными, необходимо проведение дополнительных экспериментов с целью достижения более продвинутых стадий развития реконструированных клеток, чтобы дать окончательный ответ о пригодности сперматогоний для реконструирования.

Данные по реконструированию ооцитов с использованием сперматогоний семенника быка получены нами впервые. В литературе имеются лишь данные исследователей (19), которые в опыте на мышах,

используя в качестве кариопластов диплоидные гоноциты (мужские зародышевые клетки утробного плода) на 15,5 день после спаривания, т.е. на более ранней стадии развития, чем сперматогонии, а в качестве цитопластов используя зрелые ооциты, получили развитие реконструированных клеток до бластоцисты.

Известно, что после рождения гоноциты возобновляют свою митотическую активность и дают начало примитивному типу спермато-гоний-А (18). Существует сходство по морфологии и клеточной кинетике между гоноцитами утробного плода и недифференцированными сперматогониями-А у зрелых типов животных. Высказывается гипотеза, что эти клетки являются идентичными (20). Если верна данная гипотеза, открывается возможность получения реконструированных клеток с использованием в качестве кариопласта сперматогоний семенника и достижения более продвинутых стадий развития.

В случае проявления сперматогониями семенника титопотентных свойств и способности цитоплазмы репрограммировать ядра сперматогоний, в недалеком будущем можно будет получать путем реконструирования ооцитов крупного рогатого скота копии самцов-быков с заведомо полезными признаками.

Выводы

1. Получена популяция сперматогоний из семенников неполовозрелых мышей 4 – 6-дневного возраста и бычков 3-месячного возраста, а также культура клеток сперматогенного ряда из семенников взрослых быков с идентификацией сперматогоний.
2. Результаты культивирования реконструированных клеток, полученных путем трансплантации сперматогоний в энуклеированные зиготы мышей и ооциты крупного рогатого скота показали принципиальную возможность использования сперматогоний в качестве кариопластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilmut A.E., Schnieke A.E. et al. Viable Offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385:810-813.
2. Berardino M., Hoffner M. Development and chromosomal constitution of nuclear transplants derived from male germ cells. *J. of Exper. Zoology*, 1971, 176, 1:61-72.
3. Zandrum B., Shettles M.D. Diploid nuclear replacement in mature human ova with cleavage. *Am. J. Obstet. gynecol*, 1979, 133:222-224.
4. Mc. Grath, Solter. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. of Experimental Zoology*, 1983, 228, 2:355-362.
5. Soon Chye Ng M et al. Micromanipulation its relevance to human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 1990, 53, 2:203-219.
6. Seidel G. Production of genetically identical sets of Mammals: Cloning. *J. Exp. Zool*, 1983, 2:228.
7. Seidel G. Embryo transfer: the next 100 years. *Theriogenology*, 1991, 35, 1:171-180.
8. Romrell I. et al. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A. Morphological characterization. *Developmental Biology*. 1976, 49, 1:119-131.
9. Мушкамбаров Н.Н., Волкова Н.П., Николаев А.Д. Стабильность и жизнеспособность сперматогенных клеток после их выделения и фракционирования. *Цитология*, 1982, 24, 6: 719-722.
10. Steiberger A., Steiberger E. In vitro culture rat testicular cells. *Experimental Cell Research*, 1966, 44:217-233.
11. Steiberger A., Steiberger E. Tissue culture of postnatal male mammalian

- gonads. In method in Mammalian Embriology. Ed., J. Daniel. 1971:496-510.
12. Ortavant R. Spermatogenesis and Morphology of the spermatozoon. In Reproduction in Domestic animals. Edited by H.H. Cole and p. Cippis, University of California, Davis California. Academic Press, New York and London, 1959:1-50.
 13. Whitten W.K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. In: Advances in the Biosciences. Ed. Y. Raspe, 1971, 6, 129.
 14. Маленко Г.П., Сметанина И.Г., Рябых В.П. Получение бластоцист крупного рогатого скота вне организма с использованием среды SOF. Межд. конф. "Актуальные проблемы биологии в животноводстве". 5 – 8 сентября 1995, Россия, Боровск, 1995.
 15. . Фонбрюн П. Методы микроманипуляций» М., 1951.
 16. Рябых В.П., Лисицина С.А. Основные этапы технологии клонирования млекопитающих животных путем трансплантации ядер в яйцеклетки. Биол. основы высокой продукт. с.-х. животных. Тез. докл. Межд. конф. ч. II, Боровск, 1990.
 17. Tarkovski A.K. An air-drying Method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics, 1966:394-400.
 18. Bellve A. et al. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and Morphological characterization. J. Cell Biology, 1971, 74,1:68-85.
 19. Tsunoda et al. Cytogenic analysis of reconstituted one cell mouse embryos derived from nuclear transfer of fetal malr germ cells. J. Reprod. Fertil., 1992, 1:275-281.
 20. Kluin R., Rooy D. A comparison between the morphology and cell kinetic of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. J. of Andrology, 1981, 4, 4:475-493.

ДОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА

Г.П. Маленко

Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

В обзоре обобщены данные по дозреванию ооцитов крупного рогатого скота in vitro. Рассмотрены вопросы температурного режима во время доставки яичников, выделения и обработки ооцитов. Представлены данные по эффективности использования различных питательных сред, состава газовой фазы и разных систем культивирования для дозревания ооцитов in vitro. Обсуждаются вопросы применения гонадотропных и стероидных гормонов в зависимости от среды дозревания. Материал проанализирован с целью совершенствования метода дозревания ооцитов in vitro, являющегося ключевым этапом в технологии получения зародышей крупного рогатого скота вне организма.

Благодаря разработке эффективных методов оплодотворения ооцитов и созданию простых систем культивирования зародышей крупного рогатого скота в настоящее время существенно повысилась эффективность технологии получения зародышей крупного рогатого скота in vitro. При этом четко выявилось, что условия дозревания ооцитов крупного рогатого скота in vitro оказывают решающее влияние на дробление зигот и развитие зародышей до бластоцисты (1-5).

Постимплантационное развитие зародышей также зависит от среды дозревания как для ооцитов мыши (6), так и крупного рогатого скота (7). В понятие "дозревание" ооцитов входит: 1) возобновление мейоза и достижение стадии метафаза II (MII), обозначаемое как ядерное дозревание; 2) ряд биохимических, функциональных, морфологических процессов в цитоплазме, обеспечивающих возможность оплодотворения и эмбрионального развития, то есть цитоплазматическое созревание (8, 9). Хотя в работах по клонированию

ядерный материал ооцитов, используемых в качестве реципиентов-оопластов выбрасывается, их цитоплазма должна быть зрелой, способной к взаимодействию с чужеродным ядром для обеспечения эмбрионального развития. Методы дозревания ооцитов крупного рогатого скота вне организма разрабатывались на основе данных о созревании яйцеклеток в естественных условиях. В обзоре предпринята попытка представить и проанализировать материал, касающийся вопросов дозревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*, с привлечением данных о ходе этого процесса *in vivo*.

Дозревание ооцитов крупного рогатого скота in vivo. Дозревание ооцитов *in vivo* происходит в предовуляторных фолликулах. Инициатором мейоза *in vivo* является предовуляторная волна лютеинизирующего гормона (ЛГ) (10-12). Считают, что у коров одновременно происходит начало эструса и начало подъема ЛГ. Длительность периода от проявления рефлекса неподвижности до пика ЛГ, по данным разных исследователей, составляет около 2 – 2,5 часов (11, 13), хотя есть данные, что предовуляторный выброс ЛГ происходит в день, предшествующий охоте (14). Овуляция происходит примерно через 24 часа после пика ЛГ и спустя 27 часов от начала охоты (15). С пиком ЛГ связаны изменения в концентрации гормонов в фолликулярной жидкости предовуляторных фолликулов. Перед пиком ЛГ содержание эстрадиола достигает 1000 нг/мл и остается на высоком уровне в течение последующих 6 часов. Затем концентрация эстрадиола резко снижается, составляя к 8 часам после пика ЛГ 100-170 нг/мл и остается до овуляции на уровне около 100 нг/мл (16). Незадолго перед овуляцией в фолликулярной жидкости начинает возрастать концентрация прогестерона, достигая наивысшего уровня 160 – 300 нг/мл к моменту овуляции (12, 17).

Возобновление мейоза ооцитов крупного рогатого скота *in vivo*, характеризующееся исчезновением мембраны зародышевого пузырька, происходит в период резкого падения концентрации эстрадиола в фолликулярной жидкости (11). Через 9 – 12 часов после пика ЛГ прерываются связи между отростками клеток кумюлюса и ооцитом. В ходе дозревания идет пространственная перестройка митохондриальных крист, изменение комплекса Гольджи, сглаживание эндоплазматического ретикулума, что является характерным для цитоплазматического созревания. Примерно через 19 часов после пика ЛГ наблюдалось отторжение первого полярного тельца. Через 21 – 22 часа отмечалась миграция кортикальных гранул и их одиночное расположение вдоль ооцитомы. Перивителлиновое пространство начинает расширяться через 0 – 2 часа после пика ЛГ, и этот процесс идет в ходе предовуляторного созревания (18). Достижение стадии метафаза I (M_I) ооцитов предовуляторных фолликулов совпадает с низким уровнем эстрадиола и возрастанием концентрации прогестерона в фолликулярной жидкости. Максимальное количество ооцитов на стадии M_I наблюдается через 12 – 17 часов после пика ЛГ (17, 19). Завершение мейоза ооцитов происходит через 19 – 27 часов после пика ЛГ (12, 17, 20).

In vitro ядерное созревание вызывается спонтанно, когда ооциты млекопитающих высвобождают из ингибирующего окружения фолликула и помещают в соответствующую культуральную среду (21).

Культуральная среда для дозревания ооцитов крупного рогатого скота. Комплексная среда 199 с добавлением эмбриональной или эстральной сыворотки крови крупного рогатого скота и гонадотропных и стероидных гормонов в различных сочетаниях наиболее широко применяется для дозревания ооцитов (22, 23). В экспериментах с использованием среды 199 и

RPMI-1640 с 20% эстральной сыворотки для дозревания ооцитов крупного рогатого скота, развитие до морулы было выше у ооцитов, дозревавших в среде 199 (21, 1%), чем в RPMI-1640 (9,6%) (24). При сравнении пяти сред для дозревания ооцитов крупного рогатого скота лучшими были MEM и SFRE, среда 199 занимала среднее положение. Среды Ham F12 и Waymouth MB 752/I оказались неподходящими для дозревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* (3). Ранее также сообщалось, что среда Waymouth MB 751/I оказалась совсем не пригодной для дозревания ооцитов крупного рогатого скота, хотя она была лучшей для дозревания ооцитов мыши (6).

В другом эксперименте параллельно использовали три среды для дозревания ооцитов крупного рогатого скота: среду 199, Menezo B2 и Ham F10 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и 50 мкг/мл ЛГ. По дроблению несколько отстал вариант дозревания ооцитов в среде Menezo B2. Но отдаленные последствия были существенными: выход расширенных бластоцист в случае дозревания ооцитов в среде Menezo B2 составил всего 7%, тогда как при дозревании в среде 199 или в Ham F10 было получено 22 и 32% бластоцист соответственно. Таким образом, среда Menezo B2 оказалась неподходящей для дозревания ооцитов, а среда Ham F10 явно опережала среду 199 (25). Среда Ham F10 успешно использовалась другими исследователями в качестве среды дозревания ооцитов крупного рогатого скота (26-28).

Газовая фаза для культивирования ооцитов крупного рогатого скота. Для поддержания pH среды в интервале 7,2 – 7,4 при дозревании ооцитов используется газовая смесь 5% CO₂ в воздухе, иногда 2% CO₂ в воздухе (22). Если судить по достижению стадии МП, концентрация CO₂ в воздухе

2,5, 5 или 10% не влияла на дозревание ооцитов, хотя нормально оплодотворилось несколько меньше ооцитов, дозревавших при использовании газовой фазы 10% CO₂ в воздухе (29). При постоянном уровне 5% CO₂, концентрация кислорода в газовой фазе при дозревании ооцитов оказалась критической. Стадии метафаза II достигли 9,3, 26,9 и 71,4% ооцитов, дозревавших в каплях среды под маслом, при концентрации кислорода 5, 10 и 20% соответственно (29).

Использование гонадотропных и стероидных гормонов в среде для дозревания ооцитов крупного рогатого скота. Начальный высокий уровень эстрогенов в среде необходим для цитоплазматического созревания ооцитов свиньи *in vitro* (30). Предполагалось, что добавление гормонов необходимо для обеспечения цитоплазматического созревания ооцитов овец *in vitro* (31). Более того, в среде без гормонов стадии МП достигало только 25% ооцитов овец, а в присутствии гормонов 86% (32). Однако до стадии бластоцисты развивалось намного больше ооцитов овцы из числа достигших стадии МП, если они дозревали в среде без гормонов, по сравнению с дозревшими в присутствии гормонов (32).

О необходимости присутствия и оптимальных концентрациях гормонов и сыворотки в среде в период дозревания ооцитов крупного рогатого скота приводятся противоречивые данные (33-36). В случае добавления гормонов в среду дозревания ооцитов наиболее часто применяются следующие концентрации: ЛГ 5-10 мкг/мл, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) 0,5 – 1,0 мкг/мл, эстрадиол 1 мкг/мл (37, 38). Увеличение концентрации эстрадиола до 10 мкг/мл в первые 10 часов культивирования не вызывало дегенерации ооцитов (39), но содержание эстрадиола на уровне 2 мкг/мл в течение всего периода дозревания снижало развитие ооцитов до бластоцисты (24). Имеются сообщения, что ЛГ в высокой концентрации 10 – 30 мкг/мл (24) или 50 – 100 мкг/мл (7) существенно увеличивает процент

дробления и, особенно, выход бластоцист как в присутствии альбумина или сыворотки, так и в безбелковой среде дозревания. Высокий уровень ЛГ (50 мкг/мл) использовался при дозревании ооцитов в среде Ham F10 с 10% эмбриональной сыворотки, однако в последующем авторы показали, что при данных условиях добавление 0,1 мкг/мл ЛГ в среду достаточно для дозревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* (25).

Считается, что в отсутствие сыворотки в среде дозревания ооцитов, добавление гонадотропных и стероидных гормонов является критическим. ЛГ, ФСГ и эстрадиол увеличивают процент мейотического дозревания, оплодотворяемость, начальное дробление и развитие до бластоцисты ооцитов, дозревших в среде без добавок макромолекул (7, 40-42). Среда 199 с 2 мкг/мл ФСГ и 1 мкг/мл эстрадиола обеспечила дробление и развитие до бластоцисты на уровне среды, дополнительно включающей еще 10% эмбриональной сыворотки (43). Отмечалось, что лучшие результаты по оплодотворению и развитию до морулы ооцитов крупного рогатого скота были получены, если эстрадиол добавляли сразу в среду дозревания ооцитов, а ЛГ и ФСГ спустя 6 часов от начала культивирования (44, 45).

В то же время есть данные, что при включении в среду дозревания эстральной или эмбриональной сыворотки, гормоны не влияли на оплодотворение, дробление и развитие ооцитов до бластоцисты (46, 47), или даже снижали эти показатели (34, 48). В одной из работ, при индивидуальном использовании гормонов, было показано, что ни ЛГ, ни ФСГ ни в какой из исследованных концентраций в среде дозревания не улучшали дальнейшее развитие зародышей даже по сравнению со средой 199 без сыворотки (49). В этих экспериментах при использовании среды 199 без всяких добавок для дозревания ооцитов сбор эмбрионов после оплодотворения *in vitro* был выше, чем сообщалось ранее большинством других исследователей, то есть повысился базовый уровень. И именно поэтому, считают авторы, не было выявлено дополнительного положительного влияния гормонов, а не вследствие снижения эффекта добавления гормонов. Повышение базового уровня, в свою очередь, могло зависеть от среды (авторы наблюдали заметные различия при использовании разных серий среды 199), от качества воды, используемой для приготовления среды, различий между отдельными партиями ооцитов (возможно это связано со временем и условиями сбора яичников для получения ооцитов), результатами оплодотворения и условиями культивирования зародышей после оплодотворения. Однако в этих экспериментах, как правило, проявлялось положительное влияние добавления сыворотки в среду дозревания ооцитов.

В последнее время многие лаборатории имеют высокие результаты в получении зародышей крупного рогатого скота вне организма без использования гормональных добавок при дозревании ооцитов *in vitro* (22, 50-52).

Использование сыворотки крови в среде дозревания ооцитов. Еще в 1978 году в среде для дозревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* была использована сыворотка крови, полученная от коров в день выявления охоты – эстральная сыворотка (53). В результате оплодотворения и культивирования таких ооцитов *in vivo* и последующей трансплантации бластоцист постоянному реципиенту, были получены первые телята из ооцитов, дозревших вне организма. Применение 20% эстральной сыворотки в среде дозревания ооцитов крупного рогатого скота без добавления гормонов способствовало

значительному увеличению выхода морул и бластоцист, пригодных для нехирургической трансплантации (48).

В одном из экспериментов у коров, пришедших в охоту после обработки ФСГ и простагландином, кровь брали с интервалом 2 часа. Для опытов использовали сыворотку с наибольшим содержанием ЛГ – 20 нг/мл. Было испытано три варианта среды с эмбриональной или эстральной сывороткой для дозревания ооцитов. Дробилось 6,6, 24,7 и 72,5% ооцитов, дозревавших соответственно в среде 199 с 20% эмбриональной сыворотки, 199 с 20% эмбриональной сыворотки, дополненной 10 мкг/мл ЛГ и 1 мкг/мл эстрадиола или в среде 199 с 20% эстральной сыворотки (54). На практике применяют эстральную сыворотку в среде дозревания ооцитов без добавления гормонов (55).

До бластоцисты развивалось больше ооцитов при дозревании в среде с эстральной сывороткой, полученной от коров с естественным половым циклом, чем после гормональной обработки для суперовуляции (24). По дроблению до 4-клеточной стадии лучшей для дозревания ооцитов была сыворотка, полученная в проэструсе (Д 20), затем в день охоты (Д0)(33).

Влияние эпидермального фактора роста на дозревание ооцитов. Присутствие эпидермального фактора роста (ЭФР) во время дозревания ооцитов *in vitro* в комплексной среде 199, независимо от концентрации (1, 10 и 100 нг/мл), достоверно увеличивало пропорцию ооцитов, достигших стадии МII и их дробление. Образование бластоцист также достоверно увеличивалось для ооцитов, дозревавших в присутствии ЭФР (31 – 32%), но только по сравнению со средой 199 (21%). Если в среде одновременно присутствовали ЭФР и эмбриональная сыворотка, кумулятивного эффекта не наблюдалось (56). Иммунофлуоресцентным методом было выявлено присутствие рецепторов к ЭФР на незрелых комплексах ооцит-кумулюс (9).

Система культивирования ооцитов. Для дозревания ооцитов *in vitro* используют различные системы культивирования. При дозревании в каплях под маслом на 100 мкл среды помещают от 10 (55, 57) до 18 – 20 (22, 52) комплексов ооцит – кумулюс (КОК) или по 10 – 14 КОК на каплю 50 мкл (58, 59). Во многих лабораториях дозревание ведут в открытой системе (без масла) в платах. На одну ячейку помещают 0,5мл среды и 30 – 50 КОК (25, 49, 50, 60). В ходе дозревания ооцитов концентрация эстрадиола увеличивалась в открытой системе при культивировании 10 КОК на 1мл в среде Ham F10, но увеличение не наблюдалось в системе под маслом при плотности 5 КОК на 50 мкл среды. Концентрация прогестерона увеличивалась в обеих системах, но выше была в открытой системе. Полагают, что происходит диффузия стероидов из капель среды в парафиновое масло (61).

По эффективности дозревания эти системы вполне сопоставимы, хотя результаты сравнительного эксперимента встретились только в одной работе (43). Ооциты дозревали в каплях 100 мкл под маслом или в 500 мкл в открытой системе. По дроблению (65 – 67%) и по достижению стадии бластоцисты (23%) они оказались одинаково эффективными. Авторы делают вывод, что открытая система с бессывороточной средой может быть использована при массовом получении эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

Культивирование в чашке Петри диаметром 30мм в объеме 2,5 – 4,0 мл применялось при добавлении клеток гранулезы в среду дозревания ооцитов.

Применение клеток гранулезы для дозревания ооцитов. Сообщалось, что фолликулярные соматические клетки влияют на последующее развитие эмбрионов овец и крупного рогатого скота, если ооциты культивируются с этими клетками во время дозревания (48, 62-

65). По результатам проведения экспериментов на ооцитах крысы было высказано предположение, что ФСГ-вызванный стероидогенез клеток гранулезы способствует улучшению дозревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* (66).

Синтез прогестерона и эстрадиола клетками гранулезы *in vitro* зависит от "здоровья" фолликула и его диаметра. Синтез прогестерона катастрофически возрастает, если гранулеза выделена из атретических фолликулов, независимо от их диаметра. Синтез эстрадиола максимален в здоровых фолликулах диаметром 10 мм и выше, и этот уровень с другими не сопоставим (67). Был предложен комплекс признаков для отбора неатретических фолликулов (67, 68).

При включении клеток гранулезы в среду дозревания ооцитов открытая система культивирования иногда сочетается с мягким покачиванием или встряхиванием чашек (48, 63). В одной из первых работ при добавлении клеток гранулезы из предовуляторных фолликулов в среду дозревания ооцитов до стадии морула и бластоциста развивалось 36% ооцитов, а без добавления гранулезы 0%, хотя по дозреванию, оплодотворению и образованию мужского пронуклеуса различий между группами не было (63). Авторы высказали предположение, что взаимодействие клеток гранулезы с КОК во время дозревания влияет на приобретение ооцитами способности к развитию. Высокий выход морул и бластоцист, пригодных для нехирургической трансплантации, был получен при сочетании трех факторов во время дозревания ооцитов: 1) использование среды с эстральной сывороткой без добавления гормонов; 2) добавление гранулезы в количестве $5-7 \times 10^6$ клеток/мл; 3) покачивание чашек во время дозревания ооцитов (48).

Высказывалось предположение, что в статической культуральной системе происходит лютеинизация прикрепившихся к дну чашки клеток гранулезы, и это отрицательно влияет на ооциты (64). Однако при добавлении в среду дозревания в виде суспензии клеток гранулезы из мелких фолликулов, до бластоцисты развивалось только 16% дробящихся зародышей, а при дозревании на монослое клеток гранулезы, полученных из предовуляторных фолликулов – 32%. Оплодотворение и дробление в этом эксперименте было на одном уровне в обеих группах: 85 – 87% и 73 – 75% соответственно (1). Важно, чтобы для сбора клеток гранулезы были отобраны крупные, неатретические эстроген-активные фолликулы (34). Гранулезные клетки из мелких фолликулов даже способны удерживать ооциты крупного рогатого скота *in vitro* на стадии зародышевого пузырька (69).

Исследовали влияние различной концентрации клеток гранулезы в среде дозревания на оплодотворение ооцитов и развитие зародышей до бластоцисты (70). Развитие ооцитов до бластоцисты составляло 20 – 24, 16, 19 и 11% при концентрации $1,0-7,5 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ клеток гранулезы/мл и без добавления гранулезы, соответственно. Часто используют содержание гранулезы в среде дозревания ооцитов в интервале $1-5 \times 10^6$ клеток/мл (23, 34, 37, 71) и статическую систему дозревания ооцитов (72).

Изучалось влияние добавления клеток гранулезы на дозревание ооцитов разных категорий. В первом эксперименте ооциты из яичников убитых животных классифицировали на 4 группы по окружающем кумулюсу: 1) 4 слоя; 2) 2-3 слоя; 3) 1-2 слоя; 4) денудированные. Во втором эксперименте ооциты были аспирированы из фолликулов прижизненно. Культивировали ооциты в течение 21-22 часов с добавлением гранулезы 1×10^6 клеток/мл или без них. По мнению авторов добавление клеток гранулезы в среду дозревания улучшает качество ооцитов с относительно небольшим кумулюсом (73).

Клетки кумулюса, входящие в состав КОК, играют активную метаболическую роль в созревании ооцитов. Но, возможно, непосредственная связь клеток кумулюса с ооцитом не является необходимой (74). Так, были отобраны КОК с плотным многослойным кумулюсом. Если они созревали как интактные КОК, то 26% ооцитов, отделивших полярное тельце к концу созреваия, после оплодотворения достигали стадии бластоцисты. Если ооциты денудировали и помещали для созреваия на 2-дневный монослой клеток кумулюса или просто в среду созреваия, стадии бластоцисты достигали соответственно 48 и 9% ооцитов с полярным тельцем (75). Авторы даже предлагают использовать систему созреваия денудированных ооцитов на 2-дневном монослое клеток кумулюса, чтобы по наличию полярного тельца выделять популяцию ооцитов с высоким потенциалом развития.

Подобно этому, лучшие результаты по созреванию ооцитов были получены, когда КОК, помещенные на созреваниe в ячейку платы (40 КОК/500 мкл среды), были взяты один раз в пипетку диаметром 140 мкм и тут же выпущены. При этом клетки гранулезы и большинство клеток кумулюса снимались с КОК и оставались лежать на дне ячейки в период созреваия ооцитов. Клетки лучистого венца оставались в составе КОК, также как и часть клеток кумулюса, главным образом на одном или двух полюсах комплекса (25). Более того, даже блестящая оболочка не является строго необходимой для созреваия и оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*. Если у ооцитов с компактным кумулюсом сняли кумулюс и блестящую оболочку и при созревании добавили клетки кумулюса, то из 20 ооцитов 3 стали компактными морулами, потом 2 из них бластоцистами (76).

На созреваниe ооцитов *in vitro* оказывает влияние и фолликулярная жидкость. До бластоцисты развивалось 29 или 7-14% ооцитов, если в среду созреваия была добавлена фолликулярная жидкость, собранная из фолликулов через 20 или 0 часов после пика ЛГ, соответственно (77).

Температурный режим обработки и культивирования ооцитов. Важное значение имеет температурный режим в период доставки яичников в лабораторию, а также во время выделения и созреваия ооцитов. При транспортировке яичников при 4-10°C значительная часть ооцитов оказывается дегенеративной. Дробление после созреваия и оплодотворения полученных в таких условиях ооцитов составляло 12-16%, а до бластоцисты развивалось 0,9-2% ооцитов (78). При 24-25°C яичники крупного рогатого скота могут храниться около 11 часов без снижения способности ооцитов к оплодотворению и способности ранних зародышей развиваться до бластоцисты (79). При 38°C способность ооцитов к созреванию и дальнейшему развитию была несколько выше, чем при 20°C, если длительность хранения яичников составляла 2 или 4 часа, но при удлинении срока хранения резко падала (80). На практике яичники транспортируют при 30-37°C, если длительность этого периода не превышает 3 часов (22, 23, 37, 48, 81-83).

При необходимости хранения яичников в течение 4-6 часов хорошие результаты получены при температуре 25-28°C (58). В случае доставки яичников на расстояние 200 км температура хранения яичников в течение 8-9 часов выдерживалась на уровне 26°C (84). Имеется практика выделения и отбора ооцитов в лаборатории, расположенной вблизи места убоя животных. Затем ооциты транспортировали во флаконе с 2 мл среды созреваия в термосе при

39°C в течение ночи. Таким образом, время транспортировки являлось составной частью периода дозревания ооцитов (85).

Существенное значение имеет температура, при которой ооциты выделяются из фолликулов и обрабатываются перед дозреванием. Охлаждение ооцитов на стадии зародышевого пузырька до 0, 10 или 20°C не влияло на ядерное дозревание и оплодотворение. Однако в дальнейшем до бластоцисты развивалось только 8 и 3% ооцитов, выдержанных перед дозреванием в течение 30 минут при 10 или 0°C соответственно. Если ооциты обрабатывали при температуре 30 и 20°C, выход бластоцист составлял 25 и 26% соответственно (86). В другой работе, проведенной в этой же лаборатории, яичники доставляли при 35-37°C. КОК выделяли при температуре 25, 30 или 35°C. Как и в предыдущей работе, оплодотворение и дробление не отличались достоверно между этими режимами температуры. Выход бластоцист в случае выделения ооцитов при 25 и 30°C также оказался примерно на одном уровне: 22,4 и 19,5% соответственно. А вот в случае поддержания температуры во время выделения ооцитов на уровне 35°C выход бластоцист составил 33,7%. Среднее число бластомеров на эмбрион было также выше при температуре выделения ооцитов 35°C, чем при двух других температурных режимах (87). Таким образом не случайно встречаются сообщения типа: от сбора яичников до получения бластоцист температура никогда не была ниже 33°C (81).

Дозревание ооцитов проводят при температуре 38,5-39°C. Исходят из того, что ректальная температура у крупного рогатого скота в среднем 38-39,3°C. И действительно, частота оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота при 39°C была достоверно выше у ооцитов, дозревавших при 39°C, чем при 35, 37 или 41°C (88). Вместе с тем сообщалось, что температура предовуляторного фолликула у коров редко превышала 37°C, а у мелких фолликулов 38°C (89). Авторы подчеркнули, что их данные не подтверждают результаты предшествующих работ, показавших, что оптимальная температура дозревания ооцитов крупного рогатого скота 38-39°C.

Ооциты крупного рогатого скота успешно переносят повышение температуры до 41°C в течение первых 12 часов дозревания, сохраняя высокий потенциал развития до бластоцисты. Устойчивость к тепловому шоку снижается от ооцитов до 2-клеточной стадии (0% бластоцист), а затем возрастает (90).

Временные параметры дозревания ооцитов крупного рогатого скота. Предполагается, что ооциты крупного рогатого скота могут дозреть *in vitro* примерно за одинаковый период времени, несмотря на некоторые различия в условиях культивирования. Стадия метафаза II при дозревании ооцитов *in vitro* выявляется через 17-19 часов от начала дозревания (91, 92), а максимальное количество ооцитов, завершивших мейоз, отмечается через 19-24 часа (91-95). В Японии было проведено сравнение дозревания ооцитов трех пород крупного рогатого скота (96). Независимо от породы через 21 час культивирования от 91,5 до 97,5% ооцитов было на стадии МII.

Роль фолликула в потенциале развития ооцитов. Сроки дозревания ооцитов сопоставимы *in vivo* от пика ЛГ и *in vitro* от начала культивирования. Однако яйцеклетки, выделенные из фолликулов после пика ЛГ, обладают более высокой способностью к развитию, чем *in vitro* дозревшие ооциты. Это свидетельствует о том, что цитоплазматический потенциал отличается у *in vivo* и *in vitro* дозревших ооцитов (97). Два фактора ответственны за эти различия: используемые культуральные условия для дозревания ооцитов *in vitro* и исходное состояние ооцитов.

В условиях *in vivo* ооциты возобновляют мейоз в предовуляторных фолликулах после пика ЛГ. Перед этим проходит несколько дней (от 4 до 10), в течение которых фолликул диаметром 2-4 мм превращается в предовуляторный, диаметром около 15 мм и выше (98-100). Во время роста доминантного фолликула у ооцитов происходит накопление протеина и мРНК, вследствие чего они приобретают способность к развитию. Прекращение синтеза РНК сопутствует возобновлению мейотического дозревания (101). Таким образом, на созревании ооцитов *in vivo* сказывается не только период от пика ЛГ до овуляции, но и период, предшествующий подъему ЛГ (102).

При получении эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* эта стадия роста фолликула в развитии ооцитов отсутствует. Для дозревания *in vitro* ооциты выделяют обычно из фолликулов диаметром 2-6 мм, то есть с прерванным на разных стадиях фолликулогенезом. В среде дозревания у них возобновляется мейоз и к 21-22 часам культивирования ооциты достигают стадии МII. При этом зрелые по хромосомам ооциты оказываются гетерогенными по способности к дальнейшему развитию. Полагают, что это обусловлено гетерогенностью самих фолликулов, из которых были выделены ооциты (49).

Несмотря на многочисленные системы получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* только около 30% ооцитов, дозревавших *in vitro*, достигают стадии бластоцисты. Причем ооциты из крупных фолликулов оказываются более компетентными, чем из мелких (100, 103). Возможно, необходима еще предварительная стадия перед возобновлением мейоза для того, чтобы позволить ооцитам из более мелких фолликулов "догнать" ооциты из более крупных или предовуляторных фолликулов (104-106).

Отмечалось, что способность к развитию до стадии бластоцисты приобретается ооцитом в фолликуле, и она может быть увеличена при выдержке яичников в условиях термостата в течение нескольких часов перед выделением ооцитов из фолликулов (97).

Известно, что ооциты из яичников телят менее способны к развитию после дозревания *in vitro*, чем из яичников коров (68, 107). Рецепторы к ЭФР в одинаковой степени были обнаружены иммунофлуоресцентным методом на КОК у телят и коров. И добавление ЭФР при созревании *in vitro* ооцитов телят достоверно увеличило дробление и выход бластоцист. Однако у коров эти показатели и без добавления ЭФР оставались выше (9).

Для идентификации потенциальных маркеров качества дозревания и, соответственно, различия в способности к развитию между ооцитами коров и телят сравнили параллельно профили их структурных и вновь синтезируемых белков перед и после дозревания *in vitro*. Также сравнили белковый профиль фолликулярной жидкости яичников коров и телят (9). В структурных белках ооцитов коров и телят не обнаружили различий, и только минорные модификации наблюдались перед созреванием у части вновь синтезируемых белков. Однако при сравнении профиля структурных белков фолликулярной жидкости телят и коров были выявлены количественные различия. Авторы заключают, что фолликулярная жидкость играет большую роль в последующей судьбе ооцита. В целом, приобретение способности к развитию ооцитами крупного рогатого скота при дозревании *in vitro* может зависеть от фолликула, из которого этот ооцит происходит (9).

Таким образом, исходное состояние ооцитов и условия их дозревания *in vitro* имеют принципиальное значение в технологии получения зародышей крупного рогатого скота вне организма.

Достижение ооцитами стадии метафаза II, уровень их оплодотворения и дробления зигот не являются достаточными показателями полноценного дозревания ооцитов *in vitro*. Неадекватные условия дозревания ооцитов нередко имеют отдаленные последствия, впервые проявляясь на стадии образования бластоцисты.

При транспортировке яичников на небольшие расстояния, а также в период выделения ооцитов из фолликулов и их обработки оптимальной является температура 35°C. Для дозревания ооцитов можно успешно использовать среды 199 и Ham F10 в сочетании с газовой фазой 5% CO₂ в воздухе. Применение эстрадиола, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов оказывается благотворным при дозревании ооцитов в беспротеиновой среде. Среда с включением 10-20% эстральной сыворотки крови позволяет получать ооциты с высоким потенциалом развития без применения гормонов. Открытая система культивирования позволяет упростить этап дозревания ооцитов, особенно при одновременной обработке большого количества ооцитов. При дозревании ооцитов *in vitro* получается довольно гетерогенная популяция по их способности к эмбриональному развитию. Предполагается, что во многом эта гетерогенность обусловлена исходным состоянием фолликулов, из которых были выделены ооциты. Тем не менее, при соблюдении оптимальных условий дозревания 25-30%, а в исключительных случаях до 50% ооцитов крупного рогатого скота после оплодотворения достигают стадии бластоцисты при культивировании *in vitro*.

Дальнейшее совершенствование методов дозревания ооцитов будет способствовать повышению эффективности технологии получения зародышей крупного рогатого скота вне организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fassi-Fihri N., Chupin D., Marguant-Le Guienne B., Thibier M. Critical effect of granulosa cells from preovulatory follicles on IVM, IVF and embryonic development in cattle. *Theriogenology*, 1991, 35:128 abstr.
2. Keefer C.L., Strice S.L., Maki-Laurila M. Bovine embryo development in vitro: effect of in vitro maturation conditions on fertilization and blastocyst development. *Theriogenology*. 1991;35:223 abstr.
3. Rose T.A., Bavister B.D. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Repr. Dev.* 1992;31:72-77.
4. Bavister B.D., Rose-Hellekant T.A., Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morule and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 1992;37:127-146.
5. Harper K.M., Brackett B.G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentration of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 1993; 48:409-416.
6. van de Sandt J.J.M., Schroeder A.E., Eppig J.J. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 1990;25:164-171.
7. Zuelke K.A., Brackett B.G. Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 1990;43:784-787.
8. Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., Northey D.L., First N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 1987; 36: 376-383.
9. Khatir H., Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Prepubertal bovine oocytes: A negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 45: 231-239.
10. Ireland J.J., Roche J.F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: Changes in serum hormones steroides in

follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*, 1982;111:2077-2086.

11. Dieleman S.J., Kruip Th.A.M., Fontijne P., de Jong W.H.R., van der Weyden G.C. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocrinology*. 1983; 97:31-42.
12. Callesen H., Greve T., Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*. 1986;25:71-86.
13. Yadav M.C., Walton J.C., Leslie K.E. Timing of the onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. *Theriogenology*. 1986;26:501-521.
14. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных. Ленинград. "Наука". 1983:66-76.
15. Hamilton W.J., Laing J.A. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *J. Anat.* 1946;80:194-204.
16. Fortune J.E., Hansel W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol. Reprod.* 1985; 32:1069-1079.
17. Hyttel P., Callesen H., Greve T., Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*. 1991;35:91-108.
18. Hyttel P., Callesen H., Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fert.* 1986; 76:645-656.
19. de Loos F.A.M., Bevers M.M., Dieleman S.J., Kruip T.A.M. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology*. 1991;35:527-535.
20. de Loos F.A.M., Bevers M.M., Dieleman S.J., Kruip T.A.M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology*. 1991b;35:537-546.
21. Pincus G., Enzmann E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 1935;62:665-675.
22. Hamano S., Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors. A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 1993;39:703-712.
23. Carolan C., Monaghan P., Gallagher M., Gordon I. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology*. 1994;41:1061-1068.
24. Gliedt D.W., Rosenkrans C.F., Rorie R.W., Munyon A.L., Pierson J.N., Miller G.F., Rakes J.M. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J. Dairy Sci.* 1996;79:536-542.
25. Hawk H.W., Wall R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology*. 1994;41:1585-1594.
26. Xu K.P., Greve T., Callesen H., Hyttel P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1987;81:501-504.
27. Xu K.P., Yadav B.R., King W.A., Betteridge K.J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Repr. Dev.* 1992;31:249-252.
28. Эрнст Л.К., Прокофьев М.И., Прокофьева Е.С., Черных В.Я., Лимонов В.И., Миршин Ю.Н., Майер П.К., Хорошилова Т.В., Захаров А.В., Поплевин В.Н., Удавляникова Н.И., Лагутина И.С. Получение телят из дозревших и оплодотворенных вне организма коровы фолликулярных ооцитов. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1987;6:82-87.
29. Pinyopummintr T., Bavister B. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1995;44:471-477.
30. Cran D.G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.* 1985;74:237-245.
31. Moor R.M., Trounson A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* 1977; 49:101-109.
32. Galli C., Moor R.M. Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of

sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*. 1991;35:1083-1093.

33. Younis A.I., Brackett B.G., Fayrer-Hosken R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 1989;23:189-201.
34. Fukui Y., Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1989; 86:501-506.
35. Gordon I., Lu K.H. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 1990;33:77-87.
36. Fukushima M., Fukui Y. Effect of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1985;9:323-332.
37. Fukui Y., McGowan L.T., James R.W., Pugh P.A., Tervit H.R. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1991;92:125-131.
38. Yang B.K., Yang X., Foote R.H. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO and O. *J. Reprod. Dev.* 1994;40:197-205.
39. Kruip A.M., van Beneden H., Dieleman S.J., Bevers M.M. The effect of oestradiol-17 on nuclear maturation of bovine oocytes. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. 1988, Dublin, v.3 abstr.336.
40. Saeki K., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. Are fetal calf serum and hormones necessary during in vitro maturation of cattle oocytes for subsequent development? *Theriogenology*. 1990;33:316.
41. Saeki K., Hoshi M., Leibfried-Rutledge M.L. Effects of gonadotropins and estradiol-17 (E) during in vitro maturation of bovine oocytes in serum-free medium on subsequent fertilization and development. *Biol. Reprod.* 1990;42, Suppl.1, p.92.
42. Saeki K., Hoshi M., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 1991;44:256-260.
43. Takahashi H., Tabara Y., Yoshida Y. In vitro developmental ability of bovine oocytes matured in a serum free medium using the open culture system. *J. Reprod. Dev.* 1995;41:66-69.
44. Stubbings R.B., Betteridge K.J., Basrur P.K. Investigations of culture requirements for bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*. 1988;29:313 abstr.
45. Stubbings R.B., Liptrap R.M., Betteridge K.J., Walton J.S., Armstrong D.T., Basrur P.k. Requirements for bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod. Dom. Anim.* 1990;25:158-166.
46. Jiang S., Yang X., Chang S., Heuwieser W., Foote R.H. Effect sperm capacitation and oocyte maturation procedures on fertilization and development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*. 1991; 35:218 abstr.
47. Olson S.E., Thomas W.K., Seidel G.E. Effects of gonadotropins during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development. *Theriogenology*. 1991;35:250 abstr.
48. Lu K.H., Gordon I., Gallagher M., McGovern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *The Veterinary Record*. 1987;121:259-260.
49. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod. Nutr. Dev.* 1994;34:329-339.
50. Kim J.-H., Niwa K., Lim J.M., Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 1993;48:1320-1325.
51. Rorie R.W., Lester T.D., Miller G.F., Gliedt D.W., McNew R.W. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology*. 1994;42:385-395.
52. Lim J.M., Okitsu O., Okuda K., Niwa K. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.

Theriogenology, 1994; 41:1091-1098.

53. Newcomb R., Christie W.B., Rowson L.E.A. Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Veterinary Record*. 1978;102:461-462.
54. Schellander K., Fuhrer F., Brackett B.G., Korb H., Schleger W. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*, 1990;33:477-485.
55. Greve T., Madison V. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 1991;31:147-157.
56. Lonergan P., Carolan C., van Langendonck A., Donnay I., Khatir H., Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 1996;54:1420-1429.
57. Tajik P., Wang W.-H., Okuda K., Niwa K. In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration. *Biol. Reprod.* 1994;50:1231-1237.
58. Pinyopummintr T., Bavister B.D. In vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes can develop into morulae / blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.* 1991;45:736-742.
59. Rosencrans C.F., Leng G.Q., McNamara G.T., Schoff P.K., First N.L. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 1993; 49:459-462.
60. Aoyagi Y., Fukui Y., Iwasumi I., Urakawa M., Minegishi Y., Ono H. Effects of culture system on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocyst. *Theriogenology*. 1989; 31:168 abstr.
61. Xu K.P., Hoier R., Greve T. Dynamic changes of estradiol and progesterone concentrations during in vitro oocyte maturation in cattle. *Theriogenology*. 1988; 30:245-253.
62. Staigmiller R.B., Moor R.M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.* 1984; 9:221- 229.
63. Critser E.S., Leibfried-Rutledge M.L., Eyestone W.H., Northey D.L., First N.L. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*. 1986;25:150 abstr.
64. Lutterbach A., Koll R.A., Brem G. In vitro maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. *Zuchthygiene*. 1987; 22:145-150.
65. Chicamatsu N., Urakawa M., Fukui Y., Aoyagi Y., Oho H. In vitro fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different culture systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1989;35:154-158.
66. Zhang X., Armstrong D.T. Fertilization of rat oocytes is enhanced by FSH during in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes. *Theriogenology*. 1989;31:277 abstr.
67. Henderson K.M., McNatty K.P., Gibb M., O'Keeffe L.E., Lun S., Heath D.A., Prisk M.D. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 1987; 79:185-193.
68. Revel F., Mermillod P., Peynot N., Renard J.P., Heyman Y. Low developmentally capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *F. Reprod. Fert.* 1995;103:115-120.
69. Sirard M.A., Bilodeau S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 1990;43:777-783.
70. Mochizuki H., Fukui Y., Oho H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1991;36:973-986.
71. Matsuyama K., Miyakoshi H., Fukui Y. Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 1993;40: 595-605.
72. Fukui Y., Sonoyama T., Mochizuki H., Ono H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes

- matured in vitro. *Theriogenology*. 1990; 34: 579-591.
73. Konishi M., Aoyagi Y., Takedomi T., Itakura H., Itoh T., Yazawa S. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 1996;45:573-581.
 74. Sato E., Iritani A., Nishikawa Y. Effects of energy sources on oocyte maturation in pig and cattle. *Jap.J. Zootechn.Sci.*, 1977;48:333-335.
 75. Dominco T., First N.L. Maturation of denuded bovine oocytes resulting in normal fertilization and development. *Biol.Reprod.*, 1991; 44, Suppl. 1., p.141.
 76. Xu K.P., Loskutoff N.M., Betteridge K.J., King W.A. Immature zona free bovine oocytes can be matured, fertilized and cultured to the blastocyst stage in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 1990; Abstr. Ser. No.5, p.57.
 77. Romero-Arredondo A., Seidel G.E. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol. Reprod.* 1996;55(5):1012-1016.
 78. Sato E., Iritani A., Nishikawa Y. factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.* 1977;23;12-18.
 79. Yang N.S., Lu K.H., Gordon I. In vitro fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*. 1990;33:352.
 80. Abe S., Shioya Y. Effects of temperature and duration of preservation of ovaries of cattle in physiological saline on the development of embryos derived from follicular oocytes matured and fertilized in vitro. *Animal Science and Technology*. 1996;67:633-638.
 81. Avery B., Greve T. Impact of incubator type on the yield of in vitro produced bovine blastocysts. *Acta Vet. Scand.* 1992;33:341-348.
 82. Sirard M.A., ParrishJ.J.,WareC.B., Leibfried-Ruthledge M.L., First N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 1988;39:546-552.
 83. Thompson J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*. 1996; 45:27-40.
 84. Hawk H.W., Wall R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*. 1994; 41:1571-1583.
 85. Lim J.M.,Rocha A., Hansel W. A serum-free medium for use in a cumulus cell co-culture system for bovine embryos derived from in vitro maturation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 1996;45:1081-1089.
 86. Martino A., Pollard J.W., Leibo S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 45:503-512.
 87. Pollard J.W., Martino A., Rumph N.D., Songsasen N., Plante C., Leibo S.P. Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 1996;46:849-858.
 88. Lenz R.W., Ball G.D., Leibfried M.L., Ax R.L., First N.L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol. Reprod.* 1983;29:173-179.
 89. Greve T., Grondahl C., Schmidt M., Hunter R.H.F., Avery B. Bovine preovulatory follicular temperature: implications for in vitro production of embryos. *Die preovulatorische Follikeltemperatur beim Rind: Bedeutung und Auswirkungen fur die in-vitro-Production von Embryonen. Archiv fur Tierzucht*. 1996;39:SPEC-ISSUE,7-14.
 90. Edwards J.L., Hansen P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Repr. Dev.*, 1997;46:138-145.
 91. Jagiello G.M., Miller W.A., Ducayen M.B., Lin J.S. Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1974;10:354-363.
 92. Sato E., Iritani A., Nishikawa M. Maturation and activation of cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jap. J. Zootech. Sci.* 1978;49:236-242.
 93. King W.A., Bousquet D., Greve T., Goff A.K. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Acta Vet. Scand.* 1986; 27:267-279.
 94. Sirard M.A., Florman H.M., Leibfried-Rutledge M.L., Barnes F.L., Sims M.L., First N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1989; 40:1257-1263.
 95. Михайленко А.В., Пулина Г.А., Языков А.А., Газарян К.Г. Отдельные

- группы в популяции ооцитов коров, их цитогенетический анализ и способность к созреванию in vitro. Биологические науки. 1983, 9:57-62.
96. Hamano S., Koikeda A. Developmental capacity of F1 Hybrid embryos produced by in vitro fertilization between different breeds of Japanese beef cattle. J. Reprod. Dev. 1995; 41:149-152.
 97. Sirard M.A., Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim. Reprod. Sci. 1996;42:417-426.
 98. Driancourt M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology. 1991; 35:55-68.
 99. Sirard M.A., Coenen K., Bilodeau S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. Theriogenology. 1992;37:39-57.
 100. Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev. 1992; 31:63-67.
 101. Wassarman P.M., Letourneau G.E. RNA synthesis in fully grown mouse oocytes. Nature. 1976;261:73-74.
 102. Assey R.J., Hyttel P., Greve T., Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. Mol. Reprod. Dev. 1994;37:335-344.
 103. Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M.P., Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. Mol. Reprod. Dev. 1994;37:48-53.
 104. Голубев А.К., Кузьмина Т.И., Ткаченко С.В. Влияние аденозина и аденилатов на созревание ооцитов коров in vitro. Трансплантация и культивирование эмбрионов крупного рогатого скота: Сборник научных трудов ВНИИРГЖ. Ленинград, 1989, стр.48-52.
 105. Журавлева Н.И., Сметанина И.Г., Рябых В.П. Динамика белкового спектра ооцитов крупного рогатого скота в процессе дозревания in vitro. Тезисы докладов III Всесоюзного совещания: "Культивирование клеток животных и человека". Пушино. Москва. 1990, стр.23-24.
 106. Funahashi H., Cantley T.C., Day B.N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. Biol. Reprod., 1997;57:49-53.
 107. Seidel G.E., Larson L.L., Spilman C.H., Hahn J., Foote R.H. Culture and transfer of calf ova. J. Dairy Sci. 1971;54:923-925.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНА α s1-КАЗЕИНА БЫКА

Г.А. Дворянчиков, Л.Б. Иванова, В.А. Езерский, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии и радиоизотопного анализа

Проведено конструирование рекомбинантных плазмид, содержащих ген эритропоэтина человека под контролем регуляторных последовательностей гена α s1-казеина быка. 5'- и 3'-фланкирующие районы гена α s1-казеина быка были получены с помощью ПЦР-амплификации и проверены методом секвенирования ДНК. Созданные генные конструкции могут быть использованы для получения трансгенных животных - продуцентов биологически активного эритропоэтина.

Введение

Гены казеиновых белков крупного рогатого скота находят все большее применение в биотехнологических исследованиях, связанных с модификацией состава белков молока и при получении трансгенных животных – продуцентов биологически активных веществ. Регуляторные последовательности этих генов определяют тканеспецифический характер экспрессии в клетках молочной железы, вследствие чего используются в качестве промоторов в генных

конструкциях при создании животных-продуцентов биологически активных белков. При целенаправленном переносе данных генных конструкций, в случае их экспрессии в молочной железе трансгенных животных, вместе с молоком могут выделяться необходимые белки (1, 6). Следовательно, после соответствующих генетических манипуляций молочная железа сельскохозяйственных животных могла бы выполнять роль биореактора и стать экономически целесообразной альтернативой возможным системам культивирования клеточных культур для получения высокоценных фармакологически активных веществ.

Успехи последних лет показывают, что количество рекомбинантных белков в молочной железе может достигать нескольких миллиграммов и даже граммов на один литр молока (5, 13). Как правило в этих работах использовали 5'-фланкирующие районы казеиновых генов (3, 10). Следует отметить, что в последние годы проявилась тенденция применять при получении генных конструкций фланкирующие районы гена α s1-казеина быка. При этом выделенные из молока рекомбинантные белки обладают специфической активностью, что указывает на способность ферментных систем клеток молочной железы к посттрансляционной модификации типа гликозилирования (4). Однако уровень экспрессии чужеродного гена в молочной железе трансгенных животных в большинстве экспериментов является невысоким, что предполагает дальнейший поиск оптимальных генных конструкций для проведения работ в этом направлении.

Среди белков, имеющих терапевтическое значение, наибольшее внимание привлекают: фактор IX свертываемости крови, тканевой плазминогенный активатор, урокиназа, эритропоэтин человека (ЭПО) и др. Получение белков этого класса с помощью рекомбинантных бактерий в ряде случаев принципиально невозможно из-за низкой функциональной активности получаемого продукта.

Использование гена ЭПО человека для переноса в оплодотворенные яйцеклетки млекопитающих представляет особый интерес, так как он относится к числу наиболее перспективных биотехнологических продуктов. ЭПО нормализует кроветворную способность организма и чрезвычайно эффективен при терапии анемических состояний различного происхождения. Наряду с факторами роста и иммуномодуляторами ЭПО относится к новому поколению биопрепаратов. До недавнего времени единственно возможным источником получения ЭПО человека, полностью сохраняющего свою специфическую активность, было получение продуктов рекомбинантного ЭПО человека на основе линий клеток млекопитающих. Несмотря на большую потребность, рекомбинантный ЭПО человека до сих пор не получил широкого распространения в качестве лекарственного средства из-за высоких затрат при его производстве. Наиболее вероятным способом удешевления производства является возможность получения биологически активного ЭПО в молочной железе трансгенных животных.

К настоящему времени получить трансгенных животных с высокой экспрессией рекомбинантного ЭПО человека не удалось, несмотря на неоднократные попытки (7, 12). Этот факт объясняется высокой биологической активностью синтезируемого белка и необходимостью его строго тканеспецифической экспрессии. Тем не менее с использованием WAP промотора была получена экспрессия ЭПО человека у отдельных лабораторных животных в количестве 50 мкг/мл (9), несмотря на то, что этот промотор не является строго тканеспецифичным и не обеспечивает такого высокого уровня экспрессии как 5'- фланкирующая область α s1-казеина быка.

Исходя из вышеизложенного целью настоящей работы являлось создание генноинженерной конструкции, содержащей ген ЭПО человека под контролем регуляторных последовательностей гена α 1-казеина быка.

Материал и методы

Объектом исследований являлись регуляторные последовательности гена α 1-казеина быка. Амплификацию проводили в условиях, рекомендованных для ВЮТАQ-полимеразы с некоторыми модификациями. Продолжительность реакции составляла 30 циклов. Временные и температурные параметры амплификации подбирали в зависимости от структурного состава используемых праймеров.

Гидролиз ДНК рестриктазами и лигирование проводили стандартными методами (11). 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°C. 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.coli*. Трансформацию проводили по методу Кушнера (8) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия.

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E.coli* щелочным методом (2). Выделенную плазмидную ДНК растворяли в буфере TE 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 TE.

Секвенирование плазмидной и космидной ДНК проводили в соответствии с рекомендацией к секвенирующему набору фирмы Promega. Реакционные смеси разделяли в 8%-ом полиакриламидном геле, содержащем 100 mM трис-боратный буфер, pH 8,3 и 7M мочевины. Высушенные гели экспонировали при комнатной температуре с пленкой Hyperfilm- β max(Amersham).

Результаты и обсуждение

При получении генных конструкций была использована плазида pRSVEpo, любезно предоставленная д-ром Колобковым С.А. В состав плазмиды входит промоторная область LTR RSV, геномная последовательность ЭПО человека и последовательность, включающая сигналы сплайсинга и сайт полиаденилирования вируса SV40. Данная конструкция была использована для трансфекции клеток CHO-K1 и обеспечивала высокий уровень экспрессии рекомбинантного ЭПО *in vitro*. Первым вариантом генной конструкции в нашей работе была плазида, в которой промоторная область RSV заменена на 5'-фланкирующий район гена α 1-казеина быка.

5'-фланкирующая область гена α 1-казеина быка была получена с помощью ПЦР-амплификации, используя геномную ДНК быка в качестве матрицы. Подбор структур праймеров проводили на основании опубликованного сиквенса гена. Прямые и обратные праймеры подбирали с учетом их "некомплементарности" друг другу и неспособности к самообразованию вторичных структур. Локализация праймеров в последовательности гена α 1-казеина соответствовала

положению -650 нуклеотидов для прямого праймера и +50 нуклеотидов для обратного, относительно сайта инициации транскрипции гена. При этом в состав синтезированных олигонуклеотидов вводились дополнительные последовательности, содержащие сайты узнавания для рестриктаз SalI и BstEII в обоих 5'- и 3'- концах амплифицированного фрагмента. Выбор сайтов для указанных рестриктаз объясняется рестриктной картой вектора, в котором проходило клонирование.

При проведении оптимизации условий амплификации оказалось, что в присутствии 2мМ MgCl₂ в реакционной смеси наблюдается значительное количество неспецифически амплифицированной ДНК, в то время как при использовании 1мМ MgCl₂ неспецифическая амплификация отсутствует. Оптимальное количество праймера в реакции составляло 5 пкм каждого. Продукт амплификации разделяли в агарозном геле и элюировали с помощью ДЕАЕ-целлюлозы. Элюированную ДНК переосаждали спиртом, растворяли в буфере TE и получали "липкие" концы после обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Выделенный SalI/BstEII фрагмент размером 723 п.н. встраивали по SalI и BstEII сайтам плазмиды pRSVEpo, в которой была удалена промоторная область RSV. С этой целью плазмидную ДНК гидролизовали указанными рестриктазами, разделяли в 0,8%-ом агарозном геле и элюировали векторную ДНК размером 5,5 т.п.н. При этом из вектора вырезается внутренний SalI/BstEII фрагмент размером 800 п.н., от которого освобождались при элюции. Вместо него по указанным сайтам встраивали 5'-фланкирующую область гена α s1-казеина быка, полученную ПЦР-амплификацией.

Исходная плазида pRSVEpo содержит в своем составе фрагмент, близкий по размеру к клонируемому (промоторная область LTR RSV). С целью показать различие в структуре полученной нами рекомбинантной ДНК и исходной плазмиды, проводили рестрикционный анализ, который показал наличие дополнительных сайтов рестрикции для рестриктазы EcoRI в 5'-области генной конструкции. Клонированный фрагмент проверяли секвенированием на присутствие возможных ошибок при амплификации и клонировании (рис. 1).

Из анализа полученного радиоавтографа 8%-го акриламидного секвенирующего геля следует, что клонированная последовательность по своей структуре полностью соответствует опубликованной ранее 5'-фланкирующей области к α s1-казеина быка.

Аналогичная по структуре генная конструкция, содержащая в качестве репортерного гена последовательность гена гормона роста человека, обеспечивала секрецию продукта этого гена в клетках молочной железы опытных животных.

Поэтому данный вариант конструкции с геном ЭПО может быть использован для микроинъекции в зиготы животных. Тем не менее наиболее высокая и устойчивая экспрессия может быть в том случае, когда в состав конструкции входит специфическая для гена казеина 3'-фланкирующая область.

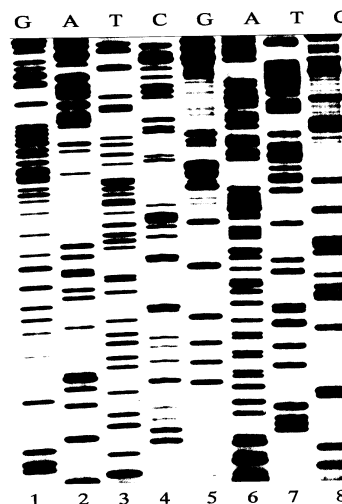


Рис. 1. Радиоавтограф секвенирующего геля 1-4 - pRSVEpo; 5-8 - paslEpo.

Выделение последовательностей, содержащих сигналы сплайсинга и полиаденилирования α s1-казеина быка, проводили так же с помощью ПЦР-амплификации. При этом из исходной генной конструкции удаляли собственную 3'-фланкирующую область в результате гидролиза рестриктазами NcoI и SacI.

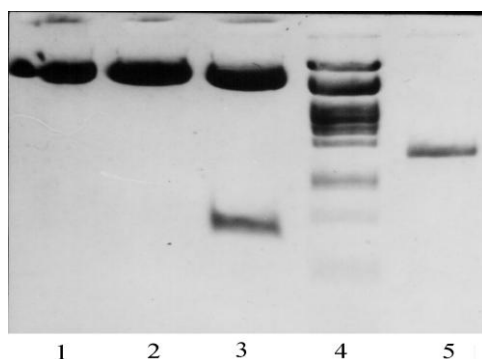


Рис. 2 Рестрикционный анализ плазмиды pslEpo. 1-3 ДНК плазмиды pslEpo рестрицированная: 1 - NcoI; 2 - SacI; 3 - NcoI/SacI; 4 - ДНК фага лямбда - PstI; 5 - амплиф. ДНК 3'as1-казеина быка

По данным сайтам рестрикции встраивали амплифицированный фрагмент α s1-казеина быка размером около 1300 п.н. (рис. 2). В этом случае в состав праймеров так же вводились дополнительные последовательности с учетом сайтов клонирования. Локализация прямого праймера соответствует 18-му экзону α s1-казеина быка, а обратного 3'-фланкирующей области этого гена. Праймеры были представлены олигонуклеотидами следующей структуры:

$\rho\alpha 1$ 5'- ctc gtc gac gtc aca aag aac tgg aca cga ctt a-3'
 $\rho\alpha 2$ 5'- ctc ggt gac ctg aac cca aga ctg gga aga a-3'
 $\rho\alpha 3$ 5'- gtc cca tgg act cca cag tta tgg tct ttg -3'
 $\rho\alpha 4$ 5'- ttc gag ctc ctc caa gaa gtc ctg cca aat -3'

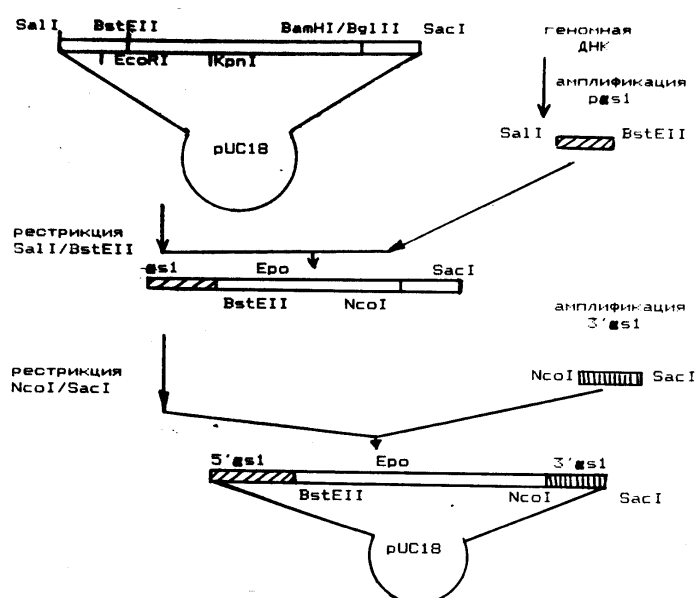


Рис. 3. Схема получения генной конструкции pas1.2Epo

На рис. 3 представлена описанная схема конструирования рекомбинантной ДНК. Полученная генная конструкция содержит полную структурную часть гена ЭПО, ограниченную 5'- и 3'-фланкирующими районами гена α s1-казеина быка и может быть применена при получении трансгенных животных – продуцентов ЭПО. Однако данный вариант генной конструкции оказался неудобным при приготовлении ДНК для микроинъекции. Клонированная ДНК,

используемая для микроинъекций, должна быть в линеаризованной форме и не иметь в своем составе векторную ДНК. Для этого она должна быть клонирована в полилинкерную последовательность соответствующего вектора. С этой целью было проведено клонирование SphI/SacI фрагмента, содержащего генную конструкцию, в вектор pUC21, обработанный такими же рестриктазами. В результате чего была получена плаزمида p α sl.2Еро, которая при однократном воздействии такими рестриктазами как SalI и SpeI, позволяла вырезать необходимую вставку для микроинъекции.

Заключение

Регуляторные районы гена α sl-казеина быка были получены методом ПЦР-амплификации с использованием синтетических олигонуклеотидов. Выделенные фрагменты ДНК включают функциональные элементы (ТАТА-бокс, сигналы полиаденилирования) гена. Введение в состав олигонуклеотидов дополнительных последовательностей, содержащих сайты узнавания для уникальных рестриктаз, позволило клонировать амплифицированные фрагменты ДНК в плазмиде с геном ЭПО человека. Сконструированные вектора обладают необходимыми компонентами для тканеспецифической экспрессии гена ЭПО человека в клетках молочной железы и могут быть использованы в трансгенной технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayna E.M., Rosen J.M. Tissue-specific, high level expression of the rat whey acidic protein gene in transgenic mice. Nucl. Acids Res., 1990, 18, 10:2977-2985.
2. Birnboim N.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for serening recombinant plasmid DNA. Nucl. Aids Res., 1979, 7:1513-1523.
3. Brem G., Hartl P., Besenfelder U. et al. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth f actor-1 (IGF-I) in to mammary gland of transgenic rabbits. Gene 1994, 149:31-355.
4. Denman J., Hayes M., O'Day C. et al., Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Purification and characterization of the recombinant enzyme. Bio/Technol., 1991, 9:839-843.
5. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminigen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. Bio/Technol., 1991, 9:835-838.
6. Henninghausen L. The mammary gland as a bioreactor: Production of foreign protein in milk. Protein expression and purification, 1990, 1:3-8.
7. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M. et al. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoetin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. EurJ Biochem. 1997, 245:482-489.
8. Kushner S.R. An improved method for transformation of E.coli with ColEI-derived plasmids. Genetic engeneering.- Amsterdam ets: Elsier., 1978:17-23.
9. Massoud M., Attal J., Thepot D. et al. The deleterious effectc of human erythropoietin gene driven by the rabbit wtey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. Reprod. Nutr. Dev., 1996, 36, 5:555-563.
10. Mead H., Gates L., Lacy E. et al. Bovine alpha si- casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. Bio/TechnoL, 1990, 8:443-446.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Uusi-Oukari M., Hyttinen J.M., Korhonen V.P. et al. Bovine alpha sl-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice.

Transgenic Res., 1997, 6:75-84.

13. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Bio/Technol, 1991, 9:830-834.

ВЫДЕЛЕНИЕ КОСМИДНЫХ КЛОНОВ С ГЕНАМИ БЕЛКОВ КАЗЕИНА БЫКА

Г.А. Дворянчиков, Л.Б. Иванова, В.Г. Шевченко

Лаборатория молекулярной биологии и радиоизотопного анализа

Проведен скрининг космидной библиотеки быка на предмет выявления клонов, содержащих нуклеотидные последовательности генов казеиновых белков крупного рогатого скота. При проведении скрининга использовали ПЦР-амплификацию с исключением гибридизационного анализа, что позволило использовать большее число зондов. В результате проведенных экспериментов выделены и частично охарактеризованы две космиды с протяженными 3'-фланкирующими районами генов α_{s1} - и β -казеина. Космидная ДНК клона $\alpha 1.1cos$ проклонирована в плазмиде pUC18 в форме EcoRI- и HindIII-фрагментов и частично просеквенирована.

Введение

Перспективы биотехнологического использования генов белков молока способствовали дальнейшему развитию исследований, связанных с изучением структуры этих генов и функциональной значимости фланкирующих районов. Основные усилия направлены на изучение тканеспецифической регуляции экспрессии генов казеиновых белков. Механизмы тканеспецифической регуляции, определяемые регуляторными последовательностями генов белков молока, еще недостаточно изучены.

Гены казеиновых белков (α_{s1} -, β -, α_{s2} -, и κ -казеинов) расположены в одной области на 6-й хромосоме и образуют кластер размером около 200-250 т.п.н. К настоящему времени последовательности всех четырех генов выделены и просеквенированы. Тем не менее в целом кластер этих генов еще не выделен. Основная часть последовательности кластера не изучена, что во многом определено большим расстоянием между генами. Так расстояние между генами α_{s2} и κ -казеина предположительно составляет 70 т.п.н. Да и сам вопрос экспрессии трансгенов с регуляторными последовательностями генов казеинов у трансгенных животных не совсем понятен. В частности, отсутствует экспрессия с конструкциями, содержащими фланкирующие районы гена κ -казеина (1). Следует отметить большое число генетических вариантов казеиновых белков, что указывает на присутствие в геномах млекопитающих многочисленных аллелей этих генов. Среди них известны казеины с делециями аминокислот.

Можно допустить, что в кластере генов казеинов расположен так называемый локус контролирующий район (LCR). К настоящему времени он не идентифицирован. Вполне вероятно, что предполагаемый LCR казеинового кластера расположен в фланкирующих районах этих генов. Элементы со свойствами LCR описаны для ряда семейств генов, например, для глобиновых генов и других (7). Использование LCR в генных конструкциях позволило не только обеспечивать тканеспецифическую, но и позиционно независимую экспрессию трансгена.

Последовательности промоторов генов казеинов содержат множественные сайты связывания для факторов транскрипции, регулирующих экспрессию рекомбинантных генов в молочной железе.

Уровень экспрессии трансгена находится в зависимости от комбинации регуляторных районов и репортерного гена. Тем не менее наиболее высокий его уровень наблюдался в том случае, когда использовали в генной конструкции фланкирующие области генов *asl*- и β -казеинов (3, 4, 11, 12). Следовательно, наибольший интерес представляют собой в кластере генов казеинов гены *asl*-и β -казеина и их протяженные фланкирующие области.

Стандартные методы скринирования геномных библиотек включают в себя иммобилизацию на фильтрах рекомбинантной ДНК бактериальных клонов с последующей ДНК/ДНК гибридизацией и проводятся как правило с использованием фаговых библиотек. Применение космидных библиотек позволяет выделять геномные последовательности большего размера (30-50 т.п.н.), что значительно расширяет возможности исследователя при работе с протяженными участками генома (9, 10). В последнее время начинают использовать ПЦР-амплификацию при проведении скрининга. Такая технология оказалась наиболее удобной при работе с YAC-библиотеками (5). Данные по системному скринингу космидных библиотек, основанному на ПЦР-амплификации, отсутствуют.

Исходя из вышеизложенного целью настоящей работы являлось выделение космидных клонов, содержащих последовательности генов казеинового кластера быка, для дальнейшего изучения фланкирующих районов казеиновых генов.

Материал и методы

Объектом исследований являлась космидная библиотека (предоставленная д-ром С.И. Городецким, ин-т биологии гена, РАН), созданная на основе вектора pWE15. Амплификацию проводили в условиях, рекомендованных для BIOTAQ-полимеразы с некоторыми модификациями. Временные и температурные параметры амплификации были подобраны экспериментально в зависимости от структуры используемых праймеров. Гидролиз ДНК и лигирование проводили стандартными методами (8). Для проведения рестрикции брали 0,2-1 мкг плазмидной или космидной 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°C. В зависимости от того, какие концы имеют фрагменты ДНК, реакцию лигирования проводили в различных условиях. Молярное отношение вектора и вставки составляло 1:2, концентрация ДНК в реакционной смеси составляла 20 мкг/мл. Лигазу добавляли из расчета 0,5 ед. на 1 мл. Для отбора необходимых рекомбинантов лигазную смесь брали на трансформацию клеток *E.coli*. Трансформацию проводили по методу Кушнера (6) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия.

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E.coli* щелочным методом (2). Выделенную плазмидную ДНК растворяли в буфере TE 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 TE. Секвенирование плазмидной и космидной ДНК проводили в соответствии с рекомендацией к секвенирующему набору фирмы "Promega".

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее распространенных подходов при скринировании геномных библиотек является гибридизационный анализ иммобилизованной на фильтрах ДНК клонов. Мы предприняли попытку разработать новую технологию скрининга космидной библиотеки быка и применить ее для выделения последовательностей генов казеиновых белков. В качестве альтернативы использовали скринирование библиотеки, основанное на применении ПЦР-амплификации. Идентификацию специфических космидных клонов проводили путем отбора клонов, несущих последовательности, гомологичные соответствующему ДНК-зонду. При этом использовали синтетические олигонуклеотиды, гомологичные выделенным ранее другими авторами фрагментам генов казеинов быка.

Синтезированные праймеры были представлены олигонуклеотидами следующей структуры:

- α 1 N928 5' - gtc aca aag aac tgg aca cga ctt a - 3' (25)
- α 2 N929 5' - tga acc caa gac tgg gaa gaa - 3' (21)
- β 1 N930 5' - tcg aat cca tct cta tca att a - 3' (22)
- β 2 N931 5' - cca aag tag agg aca aga agt - 3' (21)
- α 3 N932 5' - tga ctg tgt ttt tca ctt gt - 3' (20)
- α 4 N933 5' - cca gaa aaa tac att tgt - 3' (18)
- β 3 N934 5' - ccc aga cac agt ctc tag tc - 3' (20)
- β 4 N935 5' - cac gga ctg agg agg aaa ca - 3' (20)

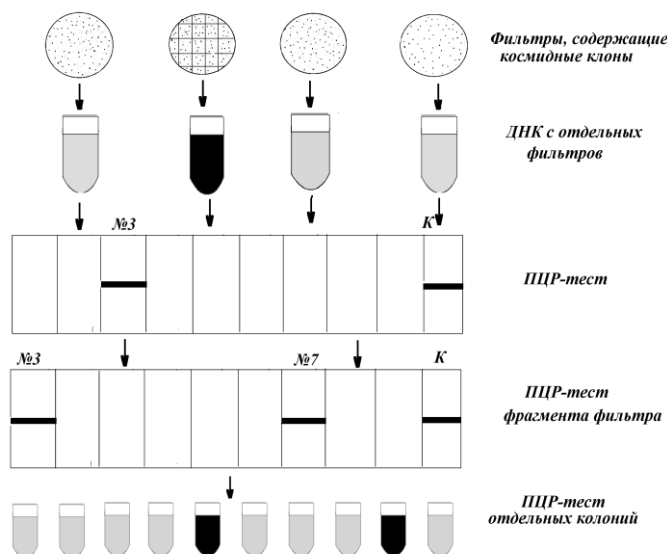
Локализация праймеров в последовательности генов α sl- и β -казеина соответствовала положению -671 для олигонуклеотида N928, +51 для N929, -1723 для N930, +37 для N931, +4340 для N932, +4470 для N933, +6275 для N934 и +6625 для N935 относительно сайта инициации транскрипции гена. Использование пар указанных праймеров позволило амплифицировать различные участки генов: N928/929 – 5'-область и N932/933 – 4-ый экзон гена α sl-казеина, N930/931 – 5'-область и N934/935 – 7-й экзон гена β -казеина.

Рассев библиотеки генов производили на 150 мм чашки общим числом около 100000 клонов, что предполагает представительство 99% всех последовательностей генома. Материалом для амплификационного анализа служили не сами бактериальные колонии, а их реплики на фильтрах. Высокая чувствительность ПЦР-амплификации обеспечила обнаружение искомой ДНК в суммарной ДНК более чем 1000 космидных клонов. Полная процедура скринирования библиотеки схематически представлена на рис. 1. С найлоновых фильтров смывали клетки, содержащие рекомбинантные космиды, затем выделяли ДНК с отдельных фильтров и проверяли ПЦР-амплификацией. Анализируемые пробы содержали ДНК в количестведостаточном для проведения более 1000 ПЦР-тестов, что является большим преимуществом разработанного нами метода по сравнению с гибридизационным методом, при использовании которого можно проводить скрининг только по 1-2 зондам.

Рис.1. Схема скрининга космидной библиотеки, основанного на ПЦР-амплификации

Продукты амплификации разделяли в агарозном геле и сравнивали по размеру с амплификатом, полученным в пробе с бычьей геномной ДНК, выступающей в качестве положительного контроля. Реакцию амплификации проводили в течение 30-35 циклов. Если при анализе суммарной ДНК космидных клонов мы проводили очистку ДНК анализируемых проб, то при работе с индивидуальными клонами амплификационный анализ осуществляли непосредственно в присутствии бактериальных клеток без предварительного лизиса и всего в течение 15-20 циклов.

Представленная на рис. 2 электрофореграмма свидетельствует о



наличии последовательности, соответствующей фрагменту α s1-казеина быка. В пробах N 2-3 присутствует амплифицированный фрагмент размером 720 п.н., соответствующий по размеру продукту амплификации, полученному в пробе с бычьей геномной ДНК (1-я дорожка).

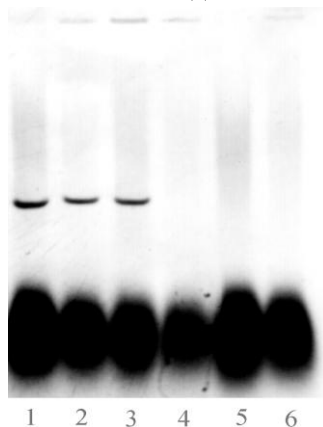


Рис 2 Электрофоретический анализ продуктов амплификации космидной ДНК, проводимой с суммарной ДНК бактериального клона без предварительной очистки (праймеры 928/929) в 1,5%-ом агарозном геле. 1-3 - ДНК положительных по гену α s1-казеина клонов.

Результаты первичного скрининга стали известны уже через 5-7 дней после посева библиотеки. При этом было получено 18 положительных ответов, при вторичном скринировании – 8 положительных ответов. Потеря ряда клонов с нужными рекомбинантными космидами может быть объяснена дифференциальным ростом космидных клонов. Как правило клоны с небольшими вставками обладают преимуществом в росте. Поиск индивидуальных клонов проводили так же без использования радиоактивных изотопов, основываясь исключительно на результатах амплификационного анализа.

Для дальнейших исследований было отобрано 6 рекомбинантных космидных клонов. Геномные вставки бычьей ДНК отделяли от вектора pWE15 с использованием фермента BamHI. Путем

рестрикционного анализа устанавливали соответствие отдельных фрагментов выделенных космид уже известным последовательностям генов казеинов (рис. 3, 4).

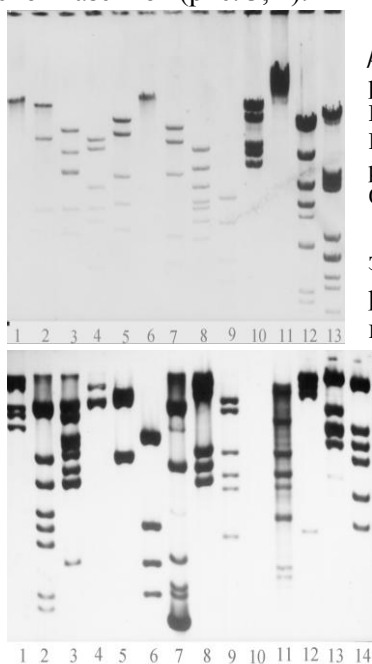


Рис. 3. Рестрикционный анализ космиды β 1cos: 1-9 - космидная ДНК рестрицированная: 1 - XbaI; 2 - BamHI; 3 - HindIII; 4 - EcoRI; 5 - BglII; 6 - KpnI; 7 - PstI; 8 - PvuII; 9 - AvaII 10-13 - ДНК фага лямбда рестрицированная; 10 - BamHI; 11 - SmaI; 12 - ClaI; 13 - PstI

На основе представленной на рис. 3 электрофореграммы определяли размер рестриктных фрагментов космиды β 1cos по относительной подвижности фрагментов контрольной ДНК фага λ . Сравнительный анализ с рестриктной картой гена β -казеина быка позволяет предположить, что данная космида содержит большую часть гена β -казеина (около 5 т.п.н.) и протяженную фланкирующую область (около 25 т.п.н.).

Аналогичный рестрикционный анализ проведен с другими выделенными космидами (рис. 4).

Наличие соответствующих по размеру рестриктных фрагментов не является окончательным доказательством, что идентифицированные ПЦР-амплификацией клоны содержат именно последовательности генов казеиновых белков. Поэтому был проведен анализ последовательностей космид с помощью секвенирования амплифицированных фрагментов и секвенирования непосредственно космидной ДНК. Во всех случаях анализируемые последовательности соответствовали опубликованному сиквенсу генов казеинов быка. Следует отметить, что оптимальным оказался вариант скринирования сразу по нескольким участкам одного и того же гена. Так космидный клон α 1.1cos давал положительный сигнал при использовании праймеров 932/933 и отрицательный для примеров 928/929.

Рис. 4. Рестрикционный анализ ДНК космид, содержащих последовательности гомологичные фрагментам генов казеиновых белков быка

1, 11-13 - ДНК фага лямбда рестрицированная: 1 - BamHI; 11 - ClaI; 12 - BglII; 13 - EcoRI; 2-4 - α 1.1cos: 2 - EcoRI; 3 - HindIII; 4 - BamHI. 5-6 - p5'P: 5 - HindIII; 6 - EcoRI. 7-8 - ppcos: 7 - EcoRI; 8 - HindIII. 9 - pcos - EcoRI; 10 - pHXI - фрагмент peas; 14 - pcos - BglII.

Для проведения детального анализа вставки бычьей ДНК, имеющей гомологию с геном α 1-казеина, был отобран космидный клон α 1.1cos. Космидная ДНК была разбита на более мелкие фрагменты путем переклонирования ее в вектор pUC18. Фрагменты обработанной рестриктазами EcoRI и HindIII космидной ДНК α 1.1cos (рис. 4, дорожки 3 и 4) лигировали с плазмидой pUC18, предварительно обработанной теми же рестриктазами. Для секвенирования интересующих нас фрагментов были отобраны 6 клонов с EcoRI-вставками и 1 клон с HindIII-фрагментом космиды. В итоге было просеквенировано около 3 т.п.н. геномной вставки бычьей ДНК, что еще не позволяет сделать окончательное заключение о молекулярной организации исследуемых последовательностей ДНК и предполагает дальнейшее их изучение. Тем не менее, удалось прокартировать начало вставки геномной ДНК.

Так второго интрона и до конца гена и протяженную 3'-фланкирующую область. При секвенировании ДНК клона 9-4 оказалось, что клонированный фрагмент начинался с участка космидного вектора pWE15 и продолжился последовательностью ДНК $\alpha 1$ -казеина, соответствующей второй половине второго интрона гена. Таким образом, можно заключить, что космидная ДНК $\alpha 1$.Icos включает геномную последовательность от второго интрона и до конца гена и протяженную 3'-фланкирующую область.

Заключение

Выделение космидных клонов, содержащих фрагменты казеинового кластера, осуществляли при комбинированном использовании ПЦР-амплификации и рестриктоного анализа. Последнее позволило отказаться от гибридизационного анализа и дало возможность использовать большее число зондов, что увеличило эффективность скрининга. В результате экспериментов из общего числа более 100 тыс. клонов были выделены и частично охарактеризованы две космиды с протяженными 3' фланкирующими районами генов $\alpha 1$ -и β -казеинов. В последующем, выделенные из них регуляторные последовательности будут использованы при создании генноинженерных конструкций для получения трансгенных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов Л.С., Коробко И.В., Андреева Л.Е. и др., О функциональной значимости 5'-области гена κ -казеина быка. Доклады Академии наук, 1995, 340, 1:111-113.
2. Birnboim N.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 1979, 7:1513-1523.
3. Denman J., Hayes M., O'Day C. et al. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Purification and characterization of the recombinant enzyme. Bio/Technol., 1991, 9:839-843.
4. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. Bio/Technol., 1991, 9:835-838.
5. Green E.D. and Olson M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990, 87:1213-1217.
6. Kushner S.R. An improved method for transformation of E.coli with ColEI-derived plasmids. Genetic engineering.- Amsterdam etc: Elsevier., 1978:17-23.
7. Li Q., Zhou B., Powers P. et al. Primary structure of the goat β -globin locus control region. Genomics, 1991, 9:488-499.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
9. Siemieniak D.R., Sieu L.C., Slightom J.L. Strategy and methods for directly sequencing cosmid clones. Analytical Biochemistry, 1991, 192:441-448.
10. Van den Ouweland Ans M.W., Kioschis P., Verdijk M. et al. Identification and characterization of a new gene in the human Xq28 region. Human Mol. Genet., 1992, 1(4):269-273.
11. Uusi-Oukari M., Hyttinen J.M., Korhonen V.P. et al. Bovine $\alpha 1$ -casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. Transgenic Res., 1997, 6(1):75-84.
12. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High level expression of active human $\alpha 1$ -antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Bio/Technol., 1991, 9:830-834.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

В.Н. Симоненко, Н.П. Корохов, В.Г. Шевченко

Лаборатория молекулярной биологии и радиоизотопного анализа

В настоящее время микросателлитные последовательности являются доминирующим источником генетических маркеров, наличие которых - необходимое условие построения подробных генетических карт с.-х. животных, которые в свою очередь являются основой для проведения работ по маркер-направленной селекции (MAS), клонированию генов, получению трансгенных животных с заданными свойствами.

Изучению структуры и функционирования генома с.-х. животных в последнее время уделяется все большее внимание. Значение таких исследований становится очевидным не только для фундаментальной науки, но и для сельского хозяйства. Они позволяют выявить генетические структуры, определяющие хозяйственно-полезные признаки, понять механизмы работы генов, определить меру генетической изменчивости той или иной популяции, осуществлять контроль происхождения животных, а также, в конечном итоге, расширить представление об организации генетического материала, путях и закономерностях его эволюции.

В настоящее время произошел переход от классической (“прямой”) генетики, двигавшейся к идентификации генов от признаков, кодируемых этими генами, к “обратной” генетике (2). Это объясняется тем, что “прямой” подход (функциональное клонирование) возможен в том случае, когда признак является моногенным и для выделения гена, определяющего данный признак, можно использовать какую-либо информацию о функциональной роли продукта искомого гена. Но, к сожалению, в большинстве случаев для выявления генетических основ хозяйственно-важных признаков сельскохозяйственных животных такой подход невозможен. Множество фенотипических признаков, в частности, количественные признаки сельскохозяйственных животных, являются результатом совокупного действия многих генов, кроме того, одни и те же фенотипические проявления могут быть следствием мутации разных генов. Поэтому, в данном случае наиболее доступным является подход (позиционное клонирование), предполагающий при поиске определенных генетических структур использовать полиморфные маркеры, сцепленные с фенотипическими проявлениями искомым генов.

Концепция поиска локусов количественных признаков (QTL) с помощью сцепленных с ними маркеров была предложена Карлом Саксом еще в 1923 году. Однако такой подход не получил развития из-за ограниченного количества маркеров. Появление иммунологических, биохимических и, наконец, ДНК-маркеров сняло эти ограничения (31).

До эпохи молекулярной генетики в качестве полиморфных маркеров использовали достаточно ограниченное число признаков – морфологические особенности, полиморфизм хромосом, белков, в особенности, ферментов. Широкое распространение белкового полиморфизма в популяциях позволило использовать его варианты в качестве маркеров в различных генетических исследованиях. Однако в селекционной практике применение этих маркеров носит ограниченный характер, что обусловлено низкой степенью

биохимического полиморфизма у многих видов сельскохозяйственных животных, хотя, многие авторы считают оценку средней гетерозиготности популяций, проведенную на основе анализа биохимического полиморфизма 30 локусов, существенно заниженной по сравнению с истинной гетерозиготностью популяций, что можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, некоторые из аминокислотных замен не сопровождаются изменением суммарного электрического заряда или заметными изменениями молекулярной конфигурации, а следовательно не могут быть обнаружены методом электрофореза. Во-вторых, анализ белков позволяет тестировать изменения только в белоккодирующих последовательностях ДНК экспрессирующихся генов. Если учесть, что значительную долю генома высших эукариот составляют повторяющиеся последовательности с часто неизвестной функцией, то становится очевидным, что при анализе белкового полиморфизма от внимания ускользает более 90% генома (3, 4).

Намного более информативными оказались открытые в последнее десятилетие маркеры, принадлежащие к повторяющейся фракции геномной ДНК – мини- и микросателлиты, демонстрирующие необычайно высокий уровень полиморфизма благодаря вариациям в количестве повторенных единиц (20, 22).

Открытие микросателлитных последовательностей обеспечило настоящий прорыв в изучении генома млекопитающих.

Микросателлиты присутствуют в составе всех эукариотических геномов, но при этом для них характерна видоспецифичная картина локализации и частота встречаемости (19).

Микросателлитная ДНК (STR) образована короткими – 1-6 п.н – tandemными блоками – моно-[поли(G), поли(A)], ди-[поли(TG), поли(TC)], три- [поли(CAC), поли(GAC)], тетрануклеотидными [поли(GATC)] и т.д. мотивами (33). Характерной чертой организации этих последовательностей является вариабельность в количестве tandemно повторенных единиц (от 2 до 200), именно она составляет основу их высокого полиморфизма, со средним размером PIC 0,6 (33).

Наиболее многочисленны в геноме млекопитающих динуклеотидные микросателлитные повторы $(TG)_n \cdot (CA)_n$ – от 5 до 10×10^4 на геном, а поскольку гаплоидный геном в среднем содержит 3×10^9 п.о., то на каждые 50-100 т.п.о. приходится по микросателлитному блоку поли(TG). Они составляют 57% (в среднем, в зависимости от вида) от общего числа микросателлитных повторов. За ними в нисходящем порядке представлены повторы $(CT)/(GA)_n$ (30%), $(TA)_n$ (12%), $(CG)_n$ (0,7%).

Количество микросателлитов на отдельных хромосомах пропорционально физическим размерам хромосом. У целого ряда эукариот существует прямая зависимость между размером генома и количеством в нем $(TG)_n$ повторов (14).

Для каждого типа повторов характерна своя определенная локализация. Так, $(TG)_n$ повторы разбросаны в основном по всему геному, но у крупного рогатого скота они локализованы преимущественно в теломерных и субтеломерных районах хромосом, тогда как у других видов млекопитающих они распределяются случайным образом по всей хромосоме (30). Результаты гибридизации *in situ* показали, что у человека и свиньи понижена плотность этих повторов в центромерной и теломерной области, районе ядрышкового организатора и промежуточного гетерохроматина (32, 38). Для повторов $(CT)_n$ наблюдается некоторая кластеризация, $(GACA)_n$

повторы локализованы в районах ядрышкового организатора (24), а (GATA)_n у некоторых видов располагаются на У хромосоме (29).

Было также показано, что у крупного рогатого скота (TG) повторы связаны с SINE элементами (19). Эти последовательности также могут входить в состав больших сателлитных повторов (33).

Согласно структуре, микросателлиты разделяются на три типа: совершенные (непрерывная последовательность одного типа), несовершенные (состоят из одной или нескольких прерывающихся последовательностей одного и того же типа) и сложные (состоят из совершенных или несовершенных повторов прерывающихся другими простыми последовательностями) (37, 38) (табл.1)

Таблица 1. Три типа повторов поли(TG)

Тип	5' фланкирующая последовательность	Повторяющаяся последовательность	3' фланкирующая последовательность
Совершенные	CACATTTAGTC CCACTTGTA	(GT) ₁₇ (CA) ₂₃	CGACCACATA TCTTCAATA
Несовершенные	CATGGAAAAT GGCTCAGAGA	(AC) ₄ (CA) ₂₃ (TG) ₁₆ TT(TG) ₁₁	GGCTTTGGAT TATGGTCTTA
Сложные	CTCTTGCTTT GGGAGGGTTT	(GT) ₁₄ (GA) ₁₆ (GT) ₇ (GA) ₈	GGATTAAAAT CTGTGTATAT

Совершенные повторы составляют до 70% микросателлитных последовательностей (33).

Таблица 2. Распределение разных типов микросателлитных последовательностей в геномах млекопитающих(%)

	КРС	Овца	Свинья	Человек	Собака
Совершенные	56	84	71	64	80
Несовершенные	24	10	19	25	8
Сложные	20	4	10	12	12

Средние размеры микросателлитных последовательностей варьируют в зависимости от вида. По некоторым данным, более чем из 20 повторов состоит 12% микросателлитов TG у человека и 43% у крыс (6). У крупного рогатого скота средний размер динуклеотидных повторов сравним с таковым у свиньи и человека и соответствует 14,89 единицам повтора (38).

До сих пор остается неясной функциональное значение микросателлитов. Некоторые гипотезы связаны со способностью многократно повторенных чередующихся пурип-пиримидиновых последовательностей, образующих эти повторы, принимать в определенных условиях левозакрученную Z-форму ДНК. Предполагается, что Z-форма ДНК имеет определенное биологическое значение. Доказательством этого является обязательное присутствие микросателлитных последовательностей в областях рекомбинации. «Липкость» левозакрученной формы ДНК способствует правильному спариванию гомологичных хромосом во время мейотической рекомбинации (9). Также было обнаружено, что в участках ДНК, связанных с синаптонемальным комплексом, повышена плотность динуклеотидных повторов, в особенности (TG)_n (26). Отсутствие (TG)_n, (CT)_n повторов в гетерохроматине и dot хромосом большинства видов (находится в соответствии) с общим свойством этих участков не подвергаться мейотической рекомбинации. Предполагают, что блоки (TG)_n могут быть «горячими» точками кроссинговера.

Изучение Z-ДНК сегментов в энхансере SV40 спровоцировало попытки найти связь между простыми повторами и регуляцией генов.

Было продемонстрировано, что инсерция (CA)_n повторов увеличивает генную экспрессию. Оказалось, что повторенным элементам присущи общие с *viral* энхансерами характеристики: они увеличивают генную экспрессию на расстоянии, более эффективны при близком расположении к промотору и работают безоотносительно ориентации. Кроме того предполагается, что если (TG)_n повторы и оказывают влияние на генную экспрессию, то оно неоднозначно. Так, было обнаружено, что экстремально длинная (TG)_n последовательность, локализованная на расстоянии 1260 п.о. от гена пролактина крысы оказывает негативное влияние на транскрипционную активность (25).

Также установлено, что вариации в длине некоторых тринуклеотидных повторов являются причиной ряда наследственных заболеваний: синдром хрупкости X-хромосомы, болезнь Хантингтона, миотоническая дистрофия. В частности, при увеличении числа тринуклеотидных повторов CGG в первом экзоне FMR1 гена с 50 до 200, внешне здоровые носители производят больное потомство, у которого полностью проявленная болезнь – синдром хрупкости X-хромосомы – начинается при увеличении числа повторов свыше 200.

Существует предположение, что простые повторы участвуют в конденсации и упаковке ДНК (32).

Достаточно равномерное распределение на хромосомах, высокий уровень полиморфизма и простота детекции микросателлитов с помощью полимеразной цепной реакции дают возможность использовать эти последовательности в качестве удобного инструмента для изучения генома и конструирования генетических и физических карт млекопитающих. Они также могут быть использованы в разведении животных, к примеру, для идентификации животных, установлении отцовства, оценке генетического потенциала (12). Генетические вариации микросателлитных локусов успешно используются для определения эволюционных связей и молекулярной биогеографии различных популяций скота из Африки, Европы и Азии.

За последнее время с помощью микросателлитов удалось осуществить маркировку некоторых важных генетических локусов, связанных с продуктивностью, различными заболеваниями генетического происхождения.

Так, Georges и соавт. было продемонстрировано генетическое сцепление микросателлитных маркеров I хромосомы GMPOLL-1 и GMPOLL-2 с геном комолости (16). Уже опубликованы первые итоги работ по повышению молочной продуктивности голштинской породы крупного рогатого скота с использованием ДНК-маркеров, сцепленных с генами количественных признаков, по которым ведется селекция. В работе M. Georges и соавт. установлено, что на пяти хромосомах – 1, 6, 9, 10, и 20 имеются микросателлитные локусы, сцепленные с молочной продуктивностью у голштинского скота (17). Наличие на 9-й хромосоме локусов, определяющих количество белка и молочную продуктивность, но уже на примере финского айширского скота, подтверждают также Vilkki и соавт. (35).

С помощью микросателлитных маркеров на второй хромосоме крупного рогатого скота картирован ген (MH) двойной мускулистости (10). Недавно, с помощью микросателлитных маркеров BNI и AGLA293, на хромосоме 5 крупного рогатого скота (порода Belgian Blue Cattle) картирован локус чалой окраски, характеризующийся двумя кодоминантными аллелями (r+(black) и R(white)). Было установлено, что аллель R играет решающую роль в определении White Heifer Disease (11).

Georges и соавт. идентифицировали микросателлитный локус TGLA116, тесно сцепленный с геном, ответственным за

миелоцефалопатию. С помощью микросателлитной последовательности TGLA116 этот ген был привязан к 13 хромосоме. Авторы предлагают использовать данный микросателлит для выявления носителей болезни, для селекции, направленной против этого генетического дефекта, для изучения эффекта соответствующей хромосомной области на молочную продуктивность у Brown Swiss и других пород скота (16).

Большая часть микросателлитов, которые используются при картировании генома коровы, позволяют фиксировать полиморфизм ДНК и у овцы. Для картирования гена *callipyge* (мутация мышечной гипертрофии) были использованы зонды и праймеры из числа тех, которые применялись при картировании генома коровы. Ген *callipyge* показал сцепление с маркером GMBT16, ранее картированный в теломерной области 18 хромосомы овцы. При использовании других маркеров, относящихся к 21 хромосоме коровы, было найдено, что в том же порядке, что и у коровы, эти маркеры располагаются в 18 хромосоме овцы, а ген CLPG локализован между двумя из них. Локализация гена CLPG позволяет приступить к его клонированию. Установление тесного сцепления этого гена с молекулярным маркером имеет непосредственное экономическое значение – этот маркер дает возможность легко отбирать баранов-производителей генотипа CLPG, фенотипически неотличимых от гетерозигот. Наличие таких производителей позволит получать 100% потомства (аутосомно-доминантный тип наследования), проявляющего хозяйственно- олезный признак – избыточное развитие мускулатуры.

В промежутке между EGF (epidermal growth factor) и двумя микросателлитными локусами, которые сцеплены с SSP1 (secreted phosphoprotein 1) картирован ген плодовитости овцы, один из аллелей которого увеличивает размер помета (5).

Одним из основных условий идентификации локусов, определяющих как моногенные, так и полигенные хозяйственно полезные признаки с.-х. животных является создание насыщенных полиморфными маркерами физических и генетических карт, которые дают возможность найти корреляцию между интересующими фенотипами и определяющими их генетическими структурами (30).

За последнее время был создан целый ряд генетических карт крупного рогатого скота. Генетические карты большинства видов сельскохозяйственных животных основываются на молекулярно-генетических маркерах. Для их создания в качестве основного источника маркеров выбраны микросателлиты. Простота типирования микросателлитных последовательностей посредством полимеразной цепной реакции при использовании минимального количества ДНК и двух сайт-специфичных олигонуклеотидных праймеров значительно интенсифицировала процесс создания генетических карт сцепления. Если еще в 1993 году для подавляющего большинства видов были установлены лишь группы синтении (группы генов, привязанные к отдельным хромосомам), но не были известны порядок и локализация генов в хромосомах (за исключением кролика и курицы), то, начиная с 1994 года, ситуация радикально изменилась: сразу для нескольких видов были опубликованы генетические карты с точной локализацией более чем 200 маркеров. Большинство картированных маркеров представляют собой полиморфные варианты последовательностей ДНК. Лишь малую долю от них составляют традиционные генетические маркеры (1).

Карты сцепления с низкой плотностью маркеров при использовании независимых семейств были опубликованы для крупного рогатого скота (6, 7, 17), свиньи (15, 29, 5), овцы (13) и козы (36).

Генетическая карта крупного рогатого скота, опубликованная Georges и соавт., содержит 171 маркер и покрывает 1645 сМ. Карты,

описанные Barendse и соавт. (6) и Bishop и соавт. (8) включают 202 и 313 маркеров и имеют протяженность 1793 сМ и 2464 сМ соответственно.

В 1996 г. R.Z. Ma и соавт. была опубликована еще одна карта бычьего генома, построенная на основе девяти больших полусибсовых семей, принадлежащих к четырем породам (Angus, Devon, Gelbrieh, Simmental). В карту были включены маркеры I и II типов из существующих карт и привязаны к настоящей карте с помощью 100 новых микросателлитных маркеров. Для построения карты было использовано 269 гетерозиготных маркеров, из которых 249 – микросателлиты и 20 – структурные гены. В среднем, на каждую хромосому приходится 8,2 маркера (от 2 до 22). Средняя генетическая дистанция – 9,73 сМ (для 72,1% карты расстояние ≤ 15 сМ и для 4,9% – ≥ 25 сМ). Общая протяженность карты составляет 2426 сМ (21).

Большинство этих локусов были картированы на участках хромосом, где расстояние между маркерами составляло >10 сМ. И хотя такая плотность достаточна для локализации большинства QTL, эти карты не могут эффективно использоваться для маркер-направленной селекции (MAS), точного картирования и позиционного клонирования (18).

В 1997 году Каррес и соавт. была опубликована генетическая карта генома крупного рогатого скота второго поколения. При общей протяженности 2990 сМ карта состоит из полоспецифичной группы сцепления X-хромосомы и 29 аутосомных групп сцепления. Карта построена при помощи 1236 полиморфных ДНК маркеров и 14 эритроцитарных антигенов и сывороточных белков. Среднее расстояние между маркерами на карте составляет 2,5 сМ (20). Эта карта интенсифицирует детектирование QTL, однако, несмотря на четырехкратное увеличение плотности маркеров, достигнутое на упомянутой карте, 14% генетических интервалов на ней имеют длину больше максимально допустимой для достоверного определения сцепления локусов (10 сМ). Кроме того, для перехода от поиска QTL к использованию маркеров в MAS необходима генетическая карта, имеющая в районе QTL еще большую плотность маркеров.

Следует также отметить, что построение более подробных генетических карт является одним из условий успеха и в клонировании генов, создает основу для работ по получению трансгенных животных с заданными свойствами (6), дает возможность получить новые сведения о путях эволюции генома в классе млекопитающих.

Несмотря на явные преимущества, ДНК-маркеры до сих пор не получили массового использования при исследовании генома животных (в особенности это относится к генетическим и генетико-селекционным исследованиям в России) и до сих пор существует необходимость их создания, исследования и использования для решения различных генетических задач (4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А. Генетические карты сельскохозяйственных животных. Информационно-справочные материалы. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 1995, 2: 34 с.
2. Сverdlov Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики. Молекулярная генетика. Микробиология и вирусология, 1995, 2: 3-15.
3. Сулимова Г.Е. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК у сельскохозяйственных животных. Успехи современной генетики, 1993: 3-30.
4. Сулимова Г.Е. Молекулярно-генетический анализ генома животных и человека с использованием ДНК-маркеров. Автореф. докт. дисс., Москва, 1998.

5. Archibald A.L., Haley J.F., Brown S. et al. The PiG-MaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm. Genome*, 1995, 6: 157-175.
6. Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M. et al. A genetic map of the bovine genome. *Nature genet.*, 1994, 6: 227-235.
7. Beckmann J.S. and Weber J.L. Surveys of human and rat microsatellites. *Genomics*, 1992, 12: 627-631.
8. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. et al. A Genetic Linkage map for cattle. *Genetics*. 1994, 136: 619-639.
9. Blaho J.A. and Wells R.D. Left-handed Z-DNA and genetic recombination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular biology*, 1989, 37: 107-126.
10. Charlier C., Coppiniers W., Farnir F. et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm. Genome*, 1995, 6: 788-792.
11. Charlier C., Denys B., Belanche J.I. et al. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: A major determinant of White Heifer Disease. *Mamm. Genome*. 1996, 7:138-142.
12. Ciampolini R., Moazami-Goudarsi K., Vainman D. et al. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds, *J. Anim. Sci.*, 1995, 73[11]: 3259-3268.
13. Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J. et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*. 1995, 140:703-724.
14. Ellegren H. *Genome Analysis with Microsatellite Markers*. Sweden. Uppsala, 1993: 85 p.
15. Ellegren H., Chowdhary B., Johansson M. et al. Integrating the porcine physical and linkage map using cosmid-derived markers. *Animal Genetics*. 1994, 25:155-164.
16. Georges M., Dietz A.B., Mishra A. et al. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993a, USA, 90: 1058-1062.
17. Georges M.D., Nielsen M., Mackinnon M. et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 1995, 139: 907-920.
18. Kappes M.S., Keele J.W., Stone R.T. et al. A second-generation linkage map of bovine genome. *Genome Res.*, 1997, 7[3]: 235-249.
19. Kaukinen J. and Vainio S.L. Artiodactyl retrotransposon association with microsatellites and use in SINE morph detection with PCR. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20:2955-2958.
20. Lagercrantz U., Ellegren H. and Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *NAR*. 1993, 21[5]:1111-1115.
21. Ma R.Z., Beever J. E., Da Y. et al. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *Y. J. of Heredity*, 1996, 87: 261-271.
22. Machugh D.E., Loftus R.T., Bradley D.G. et al. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1994, 256:25-31.
23. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Nat. Acad. Sci., USA*. 1988, 85: 6622-6626.
24. Nanda I., Deubelbeiss C., Guttenbach M. et al. Heterogeneities in the distribution of (GACA)_n simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Human Genetics*, 1990, 85:187-194.
25. Naylor L.H. and Clare E.M. d(TG)_n-d(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene from Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acid Res*. 1990, 18: 1595-1601.
26. Peariman R.E., Tsao N. and Moens P.B. Synaptonemal complex from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics*. 1992, 130: 865-872.
27. Rohrer G.A., Alexander L.J., Hu Z. et al. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res*. 1996, 6: 371-391.
28. Ron M., Band M.A., Yanai et al. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Animal Genetics*., 1994, 25:259-264.

29. Schafer R., Ali S, and Epplen J.T. The organization of the evolutionary conserved GATA/GAGA repeats in the mouse genome. *Chromosoma*. 1986, 5: 502-510.
30. Solinas-Toldo S., Lengauer C. and Fries R. Comparative Genome Map of human and Cattle. *Genomics*. 1995, 27: 489-496.
31. Solter 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.
32. Stallings R.L, Ford R., Nelson O. et al. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 1991, 10: 807-815.
33. 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.
34. Vainman D., Schibler L., Bourgeois F. et al. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*. 1996, 144:279-305.
35. Vilkkilä H.J., Koning D.J., Elo K. Et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci of Finnish dairy cattle by regression. *J.Dairy Sci*. 1997., 80[1]: 198-204.
36. Vogt P. Potential genetics functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the humane genome are based on a highly conserved "chromatin folding code" *Humane Genetics*, 1990,84:301-336.
37. Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dC-dT)_n polymorphism. *Genomics*, 1990, 7:524-530.
38. Wintero A.K., Fredholm M. and Thomsen P.D. Variable (dG-dT)_n(dC-dA)_n Sequences in the Porcine Genome, 1992, 12:281-288.

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (TG)_n-ТИПА ИЗ КОСМИДНОЙ ГЕНОМНОЙ БИБЛИОТЕКИ БЫКА

В.Н. Симоненко, Н.П. Корухов, Ю.А. Логинова, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии

Проведен анализ космидной геномной библиотеки быка как источника TG-содержащих микросателлитных последовательностей. TG-содержащие клоны составили 17% от общего числа анализируемых космидных клонов. На основе полученных данных можно сделать заключение, что геном крупного рогатого скота содержит около пятнадцати тысяч микросателлитных последовательностей (TG)_n-типа, т.е. один микросателлит приходится на каждые 203 т.п.о.. Методом флюоресцентной гибридизации *in situ* установлена хромосомная локализация TG-содержащих космид. Определена первичная структура семи микросателлитных последовательностей, входящих в состав хромосомоспецифичных космид. Для амплификационного анализа микросателлитных локусов было подобрано четыре пары праймеров. Из числа проанализированных локусов три – мономорфны, один – полиморфный.

Введение

В настоящее время микросателлитные последовательности, в силу широкого распространения в геноме эукариот (1, 23) и структурных особенностей, а именно – вариабельности в количестве образующих их тандемно повторенных единиц (от 2 до 200), играют исключительную роль в изучении генома млекопитающих (21). Открытие простых повторов, наряду с возможностью амплификации *in vitro* образцов ДНК посредством полимеразной цепной реакции, а также появление технологий флюоресцентной гибридизации *in situ* и конструирования рекомбинантных ДНК обеспечили прорыв в области исследования

генома сельскохозяйственных животных и построении высокоинформативных генетических карт (9, 6).

Для получения микросателлитных маркеров в основном используют геномные библиотеки, содержащие короткие фрагменты ДНК (14, 23). Основной недостаток такого подхода заключается в сложности определения хромосомной локализации выделенных последовательностей из-за вырожденности большей части клонированного фрагмента. Проблема может быть решена при использовании космидной геномной библиотеки (размер вставки 35-40 т.п.о.) в качестве источника микросателлитных маркеров.

В качестве зонда для скринирования геномных библиотек широко используется олигонуклеотид (TG)_n. Это вызвано тем, что (TG)_n-(CA)_n-последовательности обнаружены в составе генома всех изученных представителей эукариот и являются одними из наиболее многочисленных микросателлитных последовательностей в геноме млекопитающих (13, 7, 12) – в среднем они составляют 57% от общего числа микросателлитных повторов.

Материал и методы

Для поиска микросателлит-содержащих клонов использовалась геномная космидная библиотека быка, любезно предоставленная С.И.Городецким (Институт биологии гена РАН, Москва). Библиотека была получена клонированием фрагментов ДНК быка длиной 35-40 т.п.н. из Sau3A гидролизата в космиде pWE15.

При переклонировании использовалась плазмида pUC18, бактериальный штам JM109 E.coli.

В работе были использованы образцы крови и спермы крупного рогатого скота черно-пестрой породы, препараты метафазных хромосом крупного рогатого скота, козы и овцы, человека.

Все используемые в работе отечественные реактивы имели квалификацию о.с.ч. или х.ч.

В работе были использованы методы, описанные в лабораторных руководствах по молекулярному клонированию (26, 17).

Слот-блот гибридизационный анализ космидной ДНК

Слот-блот перенос. К 50-100 нг космидной ДНК добавляли щелочь до 0,2н. Денатурированную ДНК наносили на нейлоновый фильтр (Nylon 66 Plus, HoeferScientific Instruments) с помощью аппарата для вакуумного переноса (PR600 SlotBlot, HoeferScientific Instruments). После переноса фильтр нейтрализовали на смоченном в нейтрализующем растворе (1M Tris-HCl, pH 7,4) 3ММ фильтре. Фильтр сушили на воздухе и затем иммобилизовали ДНК на фильтре облучением УФ в течение 30-40 сек.

Гибридизация. На протяжении 15-20 мин фильтр с иммобилизованной ДНК выдерживали при 39-41⁰С в гибридизационном растворе (6×SSC, 0,5%SDS, 5 × раствор Денхарта) (предгибридизация). Обработанный таким образом фильтр помещали на 30 мин в раствор для гибридизации с добавленным в него меченным Р³² (TG)₈ зондом. После гибридизации фильтр дважды промывали (4×SSC, 0,1%SDS) по 15 мин при температуре 39-40⁰С. Фильтр сушили при комнатной температуре, заворачивали в пленку Saran Wrap и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение суток.

Электрофоретическое разделение ДНК. Гидролизованную ДНК разделяли электрофорезом в горизонтальном агарозном геле (0,7-1,5% в зависимости от размера фрагментов). Электрофоретическое разделение ДНК проводили в ТВЕ буфере при напряженности 15 В/см. По завершении электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5мкг/мл).

Локализация (TG)-содержащих фрагментов в геле. Локализацию разделенных в геле фрагментов ДНК устанавливали методом гибридизации по Саузерну. После электрофореза ДНК частично гидролизовали кислотной апуринизацией, помещая гель на 15 мин в 0,25н. HCl при комнатной температуре. Затем гель несколько раз промывали дистиллированной водой. После промывки гель помещали при комнатной температуре в денатурирующий раствор (0,4М NaOH, 0,6М NaCl). Ванночку с гелем периодически покачивали. Через 15 мин гель помещали в аппарат для вакуумного переноса (Red-Evac, HoeferScientific Instruments). Перенос ДНК из геля на нейлоновую мембрану (Nylon 66 Plus, HoeferScientific Instruments) осуществлялся в денатурирующем растворе на протяжении 30 мин. По завершению переноса мембрану помещали на пропитанный нейтрализующим раствором (1М Tris-HCl, pH7,4) 3ММ ватман. После нейтрализации мембрану высушивали при комнатной температуре и облучали с двух сторон ультрафиолетом в течении 30 сек для иммобилизации ДНК.

Гибридизацию иммобилизованных фрагментов ДНК с (TG)₈ зондом, меченным P³², проводили по методике, описанной выше для космидной ДНК.

Препаративное выделение (TG) положительных фрагментов

Электроэлюция (TG) положительных фрагментов. Для препаративного выделения фрагментов ДНК, давших положительный TG ответ в 1% агарозном геле, разделяли по 5 мкг гидролизованной ДНК. После разделения материала в геле и окраски бромистым этидием, кусочки геля с соответствующими фрагментами вырезали. Электроэлюцию проводили в предварительно подготовленных диализных трубках. Для этого в трубку длиной 2,5-3 см помещали кусочек геля, заполняли ее 1×ТВЕ буфером и элюировали 20-30 мин (в зависимости от величины геля) в камере для электрофореза. Материал концентрировали и очищали от бромистого этидия бутанолом, избавлялись от примесей стандартным фенол-хлороформным методом и осаждали этанолом. Растворенную в ТЕ буфере ДНК использовали для лигирования.

Субклонирование TG-содержащих фрагментов

Лигирование. Для лигирования использовали по 100нг рестрикционных фрагментов, выделенных в результате электроэлюции, по 50нг ДНК плазмиды pUC18, гидролизованной рестриктазой BamHI. Для уменьшения объема смесь плазмидной ДНК и ДНК фрагмента переосаждали этиловым спиртом и растворяли в деионизованной воде. Реакцию проводили в лигазном буфере следующего состава: (60мМ трис-HCl, pH7,5, 5мМ MgCl₂, 10мМ DTT, 1мМ АТР). Для лигирования использовали 4 е.а. T₄ ДНК-лигазы (Fermentas).

Трансформация. При проведении трансформации использовали компетентные клетки штамма JM109 E.coli.

Для получения компетентных клеток с помощью простерилизованной в пламени платиновой петли отбирали с

чашки несколько свежих колоний и переносили в колбу со средой SOB. Культуру инкубировали при 37⁰ с интенсивным перемешиванием до достижения средней логарифмической фазы роста, что соответствует $4-9 \times 10^7$ жизнеспособных клеток/мл и оптической плотности $D_{550} = 0,5-0,6$.

Для каждой пробы отбирали по 1,5 мл культуры клеток и охлаждали 10-15 мин во льду. Клетки осаждали центрифугированием при 1000g в течение 3 мин, надосадочную жидкость сливали и осторожно ресуспендировали клетки в простом буфере для трансформации SB (100мМ KCl, 50 мМ CaCl₂·2H₂O, 10мМ K-MES) в объеме равном 1/3 исходного объема культуры. Клеточную суспензию инкубировали во льду 15 мин и снова осаждали центрифугированием. Затем растворяли в 200 мкМ буфера SB.

К подготовленным таким образом клеткам добавляли лигазную смесь из расчета 50 нг ДНК на каждую пробирку с компетентными клетками. Пробирки выдерживали во льду 15-20 мин. После этого пробирки погружали на 90 сек в водяную баню, разогретую до 42⁰ С (тепловой шок) и быстро охлаждали во льду. Затем добавляли в каждую пробирку по 800 мкл среды SOB и инкубировали при умеренном покачивании и температуре 37⁰ С в течение 30 мин.

В состав селективной среды, на которую высевали трансформированные клетки, входил ампициллин (50 мкг/мл), X-gal(5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид, 20 мкг/мл), IPTG (200 мкг/мл).

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов из состава хромосомоспецифичных космид

Нуклеотидную последовательность определяли методом секвенирования с использованием терминаторов полимеразной реакции. Для этого использовали набор для секвенирования fmol DNA Cycle Sequencing System (Promega, USA). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. По завершению последнего цикла образцы выдерживали дополнительно 5 мин при 72⁰С. В каждую пробирку вносили по 4 мкл «стоп»-раствора. Перед нанесением на гель образцы денатурировали при 80⁰С.

Полученные продукты анализировали в секвенирующем геле толщиной 0,35 мм следующего состава: 5% акриламид, 1×ТБЕ, рН8,3, 7М мочевины, соотношение акриламид/бисакриламид = 20/1. Электрофорез проводили в аппарате «Poker Face» (Hoefer Scientific Instruments, USA) со стабилизацией по мощности 80W.

По окончании электрофореза гель вымачивали 20 мин в 10% уксусной кислоте, промывали дистиллированной водой и сушили. В течение суток гель экспонировали с рентгеновской пленкой.

Амплификационный анализ

Для направленной амплификации интересующих микросателлитных локусов были подобраны пары праймеров с помощью компьютерной программы PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Switzerland).

Для оценки полиморфизма анализируемых локусов использовали образцы ДНК крупного рогатого скота. Реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl, рН8,4, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% желатин, четыре дНТФ в концентрации 200 мМ каждый, 1-2 мКи α-³³P дАТФ

(5000Ки/ммоль), два подобранных праймера в концентрации 0,25-0,5 мМ, 5-10нг ДНК и 2,5 е.а. Taq ДНК полимеразы, соблюдая следующий температурный режим: 94⁰С - 0,7 мин, 55⁰С-58⁰С - 0,7 мин, 72⁰С - 1 мин (27 циклов). По завершению амплификации к образцам добавляли по 5 мкл раствора, содержавшего 10 мМ NaOH, 90% формамид, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилен цианол. Полученную смесь прогревали в течение 2 мин при 70⁰С и по 3 мкл наносили на секвенирующий 5% полиакриламидный гель толщиной 0,35мм (состав раствора, используемого для приготовления геля - 7М мочевины, 1хТБЕ, 5% акриламид, 0,25% бисакриламид). Электрофорез проводили в аппарате «Poker Face» (Hoefer Scientific Instruments, USA) со стабилизацией по мощности – 80 Вт – до выхода ксиленцианола из геля. После электрофореза, иммобилизованный на одном из стекол гель, помещали на 20 мин в 10% раствор уксусной кислоты, ополаскивали водой, сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой 18-24 ч при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

Из космидной геномной библиотеки быка было отобрано 400 клонов, которые использовали для гибридизации с олигонуклеотидом (TG)₈ (рис. 1).

TG-содержащие клоны составили 17% от общего числа анализируемых клонов. На основе этих данных можно оценить частоту встречаемости (TG)_n последовательности в геноме быка – при среднем размере космидной вставки 35 т.п.о. это соответствует одному микросателлиту на 203 т.п.о.

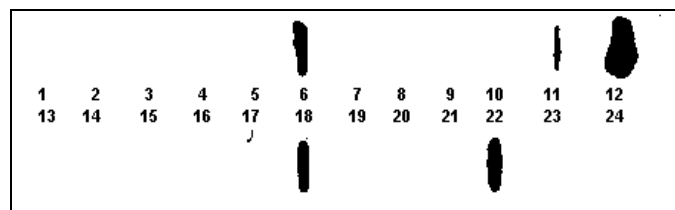


Рис. 1. Результаты слот-блот гибридизационного анализа космидных клонов 1-24 с меченным P³² (TG)₈ зондом

Solinas-Toldo и соавт. после скринирования 300 космидных клонов обнаружили лишь 11 TG-содержащих клонов, что соответствует одному микросателлитному блоку на 1091 kb (19). По данным Steffen и соавт., полученным в результате скринирования плазмидной библиотеки, один TG-микросателлит приходится на 188 т.п.о (20). По данным Vainman и соавт., полученным при анализе плазмидной библиотеки, один микросателлит приходится на каждые 120 т.п.п (23). По данным этих же авторов, полученным при анализе сконструированной ими геномной космидной библиотеки, встречаемость микросателлитов в геноме крупного рогатого скота еще ниже – 1-3 на 100 космид или на каждые 1320 kb. Feretti и соавт., проанализировав бычью геномную космидную библиотеку (Clontech, Palo Alto, USA), из 186 проанализированных клонов получили 56 TG-положительных (6). По заключению Moore и соавт., сделанному на основании анализа космидной библиотеки, один микросателлит приходится на каждые 150 т.п.о., исходя из среднего размера вставки 38 т.п.о. (15). Все эти данные свидетельствуют о существенно более низком содержании TG-последовательностей в геноме крупного рогатого

скота по сравнению с таковым у человека (один TG-микросателлит на каждые 28 т.п.о.) (15, 20) мыши (один TG-микросателлит на 18 т.п.о.) (19); свиньи (один на 47 т.п.о.) (24). Vainman и соавт. считают, что общее количество микросателлитов в геноме крупного рогатого скота можно оценить от нескольких до тридцати тысяч на геном (23). На основании полученных нами результатов общее количество микросателлитных последовательностей в геноме крупного рогатого скота можно оценить в пределах пятнадцати тысяч.

Как упоминалось выше, важным преимуществом геномной космидной библиотеки является большой размер вставки – 35 - 40 т.п.о., что дает возможность установить ее хромосомную локализацию методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Анализ метафазных пластинок после гибридизации *in situ* показал, что из 53 проанализированных космид 20 (2, 37, 14', 16', 18', 24', 29', 35', 36', 33', 14, 22, 25, 27, 30, 34, 35, 37, 39, 43) гибридизуются как сателлитные последовательности в центромерном гетерохроматине всех хромосом. 12 космид (8, 28, 32, 52, 53, 4', 6', 11', 15', 20', 26', 33') дают гибридизацию типа «painting» (т.е. равномерное мечение) с эухроматином всех хромосом. Для 10 космид (3, 4, 23, 31, 44, 9', 25', 28', 30', 38', 39') специфического мечения не обнаружили.

В результате проведенного анализа установлено, что одиннадцать (TG)n-положительных космид являются хромосомоспецифичными (№№1, 5, 6, 11, 12, 29, 42, 9, 10, 17, 25). Из их числа три космиды содержат аутосомоспецифичные повторяющиеся последовательности, общие для геномов представителей семейства Bovidae; три космиды содержат фрагменты ДНК, специфичные для отдельных хромосом *Bos taurus*; пять космид содержат Y-специфичные повторяющиеся последовательности ДНК, гомологичные Y-специфичным последовательностям козла и барана.

Анализ метафазных пластинок после гибридизации *in situ* с космидой №5 показал, что последовательность ДНК, клонированная в ней, находится в прицентромерном районе хромосомы 28 дистальнее гетерохроматинового района и занимает около трех хромосомных дисков.

Специфическую гибридизацию с хромосомой 28 дает также космида 9'. Клонированный в ней ДНК фрагмент располагается в теломерном районе ее длинного плеча (28q18-q19).

Таким образом, обнаружено два специфичных ДНК-фрагмента для хромосомы 28. Использование космид 5 и 9' дает возможность не только идентифицировать хромосому 28 в различных экспериментах по гибридизации *in situ*, но и изучать ее поведение в интерфазных ядрах.

Хромосомоспецифичное мечение дали космиды 1 (рис.2), 17', 14, 29 – крупные блоки, находящиеся дистальнее прицентромерного гетерохроматина хромосом 14, 29, 20, 22; космида 6 гибридизуется в прителомерном R-диске хромосомы 1 (1q45); ДНК фрагмент, клонированный в космиде 25' специфически гибридизуется на хромосоме 11 (11q28).

Космиды 6 и 25' также могут быть использованы в качестве районспецифических хромосомных маркеров хромосом 1 и 11 соответственно, а космиды 1 и 17' можно использовать как пробы, маркирующие одновременно хромосомы 14 и 25, так как эти

хромосомы очень отличаются по размеру. Все шесть ДНК-проб могут быть использованы для рутинного обозначения маркированных хромосомных районов и хромосом в целом в экспериментах с использованием "одноцветной" и "многоцветной" гибридизации *in situ* и идентификации этих хромосом в интерфазном ядре. Такие хромосомоспецифические маркеры с успехом используются для цитогенетического анализа и изучения генома человека (16).

Кроме того, космиды 1, 17' и 5 можно использовать для идентификации хромосом, гомологичных маркируемым хромосомам быка у других представителей семейства Bovidae, давая дополнительные возможности для исследования структуры геномов этих животных и изучения эволюции семейства.

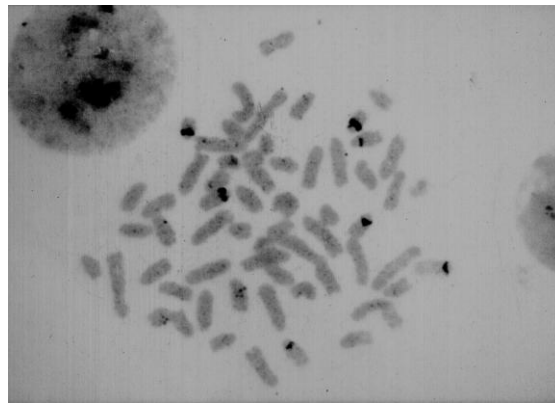


*Рис. 2. Метафазные хромосомы быка после гибридизации *in situ* с меченой биотином ДНК, выделенной из космидного клона 1.*

На метафазных пластинках быка после FISH с космидами 11, 12, 29, 42 и 10' наблюдалось флуоресцентное "окрашивание" всего длинного плеча Y-хромосомы. Большинство известных Y-специфических последовательностей находятся в ее коротком плече или прицентромерном районе (18, 4). Для длинного плеча описаны только ген ZFY и несколько Y-специфических повторов (3, 22). Известны только единичные сообщения о космидных маркерах этого плеча (6).

Все описанные Y-хромосомоспецифичные клоны – потенциальный источник микросателлитных последовательностей, что позволяет предполагать возможность их использования для построения генетической карты хромосомы. Это тем более актуально, что Y-хромосома быка бедна полиморфными маркерами, на генетической карте 1997 г. их только три (2).

Выделение (TG)n-содержащих фрагментов хромосомоспецифичных космид и определение их нуклеотидной последовательности

В результате секвенирования определены нуклеотидные последовательности двух фрагментов (5.2 и 5.1) из космиды №5, локализованной на 28 хромосоме; двух фрагментов из космиды №42 (42.2, 42.3), локализованной на Y-хромосоме; двух фрагментов космиды №1 (1.1, 1.3), которая гибридизуется с хромосомами 14, 29, 20, 22. Четыре из них зарегистрированы Европейским институтом биоинформации: две из космиды №1 (X81898 (1.3), Y07736 (1.1)) и две из космиды № 42 (Y07735 (42.3), Y07737 (42.2)).

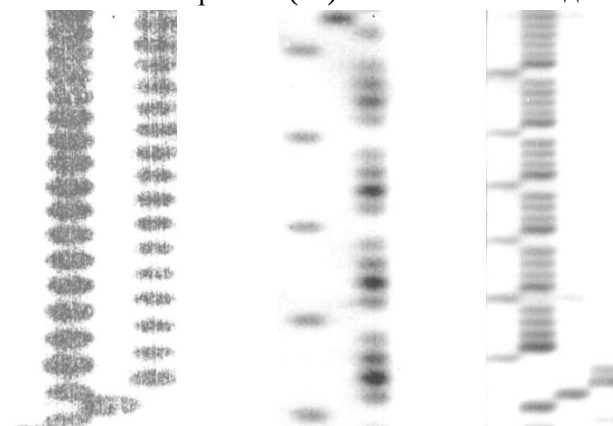
А

Б

В

Рис. 3. Типы микросателлитных повторов из состава секвенированных последовательностей: А - динуклеотидная последовательность поли- TG), Б - пентануклеотидная последовательность поли-(СТТТТ), (В - пентануклеотидная последовательность поли-(ТGGGG).

В составе семи секвенированных фрагментов обнаружено десять микросателлитных последовательностей. Шесть из них являются совершенными и четыре несовершенными (по классификационной системе микросателлитных повторов предложенной Вебером (24). Семь последовательностей



образованы динуклеотидными элементами, одна – тринуклеотидами и две – пентануклеотидами (табл. 1), (рис. 3).

Таблица 1. Хромосомная локализация, типы повторов и размер секвенированных фрагментов из состава исследуемых локусов

Космида	Фрагмент	Хромосомная локализация	Размер секвенированного фрагмента	Повторы, входящие в состав фрагмента
1	1.1	14, 29, 20, 22	826	(TG) ₂ (TC)(TG)(TC)(TG) ₃ (TC)(TG) ₂ ; (TG) ₁₈
	1.3.	14, 29, 20, 22	685	(GT) ₁₂ (CT)(GT)
5	5.1	28q12-q13	127	(TGGGG) ₇
	5.2.	28q12-q13	246	(CTTTT) ₆
	42.1	Yq	359	(TGG) ₅
42	42.2.	Yq	797	(TG) ₄ T ₂ (TG) ₂ ; (TG) ₇

Анализ полиморфизма

Высокий уровень полиморфизма микросателлитных последовательностей крайне полезен при решении задач, связанных с картированием генов и идентификацией локусов, ответственных за те или иные интересующие признаки. Широкое применение находят полиморфные микросателлитные последовательности для описания гетерогенности геномной ДНК, оценки генетического расстояния, контроля происхождения и т.д.

Одним из основных преимуществ микросателлитов при картировании генома является возможность их типирования с помощью полимеразной цепной реакции. Это позволяет быстро и эффективно генотипировать образцы ДНК, используя следовые количества материала. Для этого необходимо, зная структуру уникальных последовательностей, окружающих конкретный микросателлит, подобрать пару праймеров ограничивающих TG-фрагмент.

Для оценки полиморфизма были выбраны четыре микросателлитных района из локусов X81898 (1.3), Y07736 (1.1), Y07735 (42.3), 5.2 с наибольшим числом повторенных единиц, так как известно, что уровень полиморфизма напрямую связан с длиной повтора, а динуклеотидные последовательности, с числом повторенных единиц меньше десяти, в основном мономорфны (24, 4).

Пары праймеров для амплификации исследуемых локусов были подобраны с помощью компьютерной программы PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Switzerland) (табл. 2).

При подборе праймеров одним из задаваемых условий было максимально допустимое уменьшение размера амплифицируемого фрагмента. Подобное ограничение является следствием малого размера единицы повтора (2 п.о.), что при большом размере амплифицируемого фрагмента (>350 п.о.) может не позволить зарегистрировать различия между фрагментами отличающимися на два нуклеотидных остатка.

Таблица 2. Пары праймеров для амплификации микросателлитных районов локусов X81898 (1.3.), Y07736 (1.1.), Y07735 (42.3.), 5.2

Локус	Длина праймера	T ⁰ C отжига	Праймеры
Y07736 (1.1)	21	58	TCCGAGACAGACTCCAAGACG
	21		CGTAGTGTCTGGATTGAGCCC
X81898 (1.3)	20	58	GGCTCAATCCAGCAACTACG
	20		GCCTGCTGCTCTCTCAGGA
Y07735 (42.3)	21	58	GTTGCACACTGTGTCTTCAAG
	21		GGTCTCTGACCTGTTCCTGT
5.2	21	58	GTTAGTACTTGGATGGGAGAC
	20		GCTGCAGACCTGGGTTGCCT

Полиморфизм локусов оценивали на тридцати двух неродственных быках черно-пестрой породы.

В результате амплификационного анализа и последующего разделения полученных амплификатов в денатурирующем ПААГ (рис. 3) (условия ПЦР и электрофореза приведены в методической части работы) было установлено, что микросателлитные локусы 1.1, 1.3, 5.2 являются мономорфными. Для локуса 4.3 было выявлено восемь аллелей. Обнаруженные аллели локуса 4.3 имеют следующие размеры: 105 п.н., 111 п.н., 113 п.н., 115 п.н., 117 п.н., 123 п.н., 131 п.н..

Рис. 3. Амплификаты неродственных предстатителей черно-пестрой породы, разделенные в 6% денатурирующем ПААГ

Поскольку различия в размерах обусловлены различиями в числе повторенных единиц, входящих в состав амплифицированного фрагмента, а фрагмент, имеющий размер 113 п.н., содержит двадцатичленный повтор, то фрагмент, имеющий размер 105 п.н. содержит 16 единиц, образующих повтор, 111 п.н. – 19, 115 п.н. – 21, 117 п.н. – 22, 123 п.н. – 25, 129 п.н. – 28, 131 п.н. – 29. Это позволяет ввести обозначения для выявленных аллелей, соответствующие числу единиц, образующих повтор (рис. 3). Такой подход дает возможность описывать абсолютное состояние повторенной последовательности, представлять результаты вне зависимости от относительных размеров амплифицируемой области, связанных с подбором праймеров. Среди обнаруженных аллелей локуса 42.3 наиболее часто встречаются аллели 20 (0,4), 19 (0,28) и 21 (0,19) (табл. 4).

Анализируя полученные результаты, можно предположить, что при работе с большим количеством животных будут дополнительно обнаружены аллели, хотя на частоту встречаемости наиболее распространенных вариантов это вряд ли повлияет.

Таблица 4. Значение частот встречаемости аллелей локуса 42.3. среди 32 неродственных быков черно-пестрой породы

№п/п	Номер аллели	Длина, п.н.	Частота встречаемости
1	16	105	0,03±0,02
2	19	111	0,28±0,05
3	20	113	0,40±0,06
4	21	115	0,19±0,04
5	22	117	0,02±0,017
6	25	123	0,05±0,027
7	28	129	0,02±0,017
8	29	131	0,02±0,017

Распределение аллелей по частотам имеет резко выраженный мономодальный характер (рис. 4), что, по-видимому, отражает существующие ограничения на возникновение новых вариантов. Подобное наблюдение косвенным образом подтверждает структурную значимость повторенных последовательностей, одним из предполагаемых назначений которых может быть интеграция «функциональных» единиц генома.

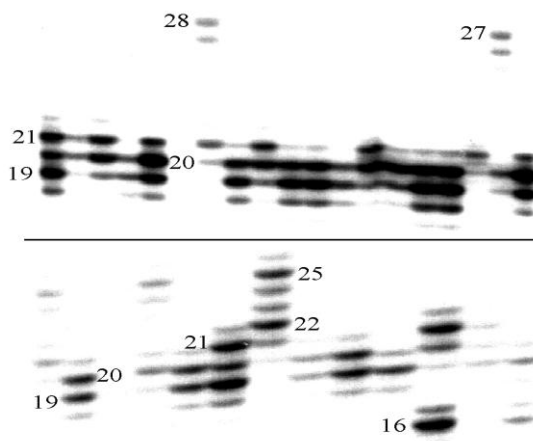
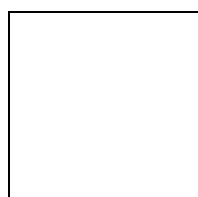


Рис. 4. Распределения аллелей по частотам встречаемости для локуса 4.3

В результате проведенного анализа обнаружено 14 вариантов генотипов. Среди них наиболее часто встречается комбинация аллелей 19/20.

Для оценки состояния и случайности данной выборки было определено теоретически ожидаемое количество конкретных фенотипов образованных наиболее распространенными аллелями как в случае гомо-, так и в случае гетерозиготного состояния (табл. 5).

Таблица 5. Наблюдаемое и ожидаемое количество генотипов для наиболее распространенных аллелей локуса 42.3

Генотип	Наблюдаемое к-во	Ожидаемое к-во
19/19	1	2,5±1,5
20/20	4	5±2,0
21/21	1	1±1,0
19/x	15	13±2,8
20/x	18	15±1,6
21/x	8	10±2,6

Во всех случаях наблюдается соответствие обнаруженных и ожидаемых фенотипов, что позволяет сделать вывод как о случайности выборки, так и о равновесном состоянии популяции по данному локусу.

Степень гетерозиготности исследуемого локуса у проанализированных животных составляет 81%, а поскольку исследуемая микросателлитная последовательность находится в составе космиды с установленной хромосомной локализацией – длинное плечо Y-хромосомы, она может быть использована как «якорный» локус для генетического картирования.

Выводы

- Геном крупного рогатого скота содержит около пятнадцати тысяч микросателлитных последовательностей (TG)_n-типа, т.е. один микросателлит приходится на каждые 203 т.п.о.
- В результате проведенного анализа установлено, что одиннадцать (TG)_n-положительных космид являются хромосомоспецифичными. Из их числа шесть космид содержат аутосомоспецифические повторяющиеся последовательности, пять космид содержат Y-специфические повторяющиеся последовательности ДНК, гомологичные Y-специфичны последовательностям козла и барана.
- В составе семи секвенированных фрагментов обнаружено десять микросателлитных последовательностей, шесть из которых являются совершенными и четыре – несовершенными повторами. У четырех последовательностей количество повторов больше десяти. Среднее количество единиц повтора равно двенадцати.
- Из четырех проанализированных последовательностей три (локусы X81898 (1.1), Y07735 (1.3), и 5.2)) – мономорфны, одна - (локус Y07736 (42.3)) – полиморфна. Последняя может быть использована как «якорный» локус для генетического картирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Band M., Ron M. Isolation of polymorphic AGC repeats located 3' to bovine SINEs. *Animal Genetics*, 1994, 25: 281-283.
2. Barendse W., Vaiman D., Kemp S.J. et al. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian genome*, 1997, 8:21-28.
3. Egen A., Fries R. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Animal Genetics*, 1995, 26:215-236.

4. Ellegren H., Johansson M., Sandberg K et al. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics*, 1992, 23: 133-142.
5. Ferretti L. Bovmap Project - Individual Laboratory Report - January 1995 -Lab 9
6. Ferretti L., Leone P., Pilla P. et al. Direct characterization of bovine microsatellites from cosmids polymorphism and syntenic mapping. *Animal Genetics*, 1994, 25: 209-214.
7. Fries R., Eggen A., Stranzinger G. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 1990, 8: 403-406.
8. Gortari M.J., Freking B.A., Kappes S.M. et al. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics*, 1997, 28: 274-290.
9. Hearne C.M., Chosn S., Todd J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 1992, 8: 288-294.
10. Hudson T.J., Engelstein M., dracopoli N.C. Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms. *Genomics*, 1992, 13: 622-629.
11. Litt M., Luty J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet*, 1989, 44:397-401.
12. Love J.M., Knight A.M., McAleer M.A. et al. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acid Res.*, 1990, 18:4123-4130.
13. Miesfeld R., Krystal M., Arnheim N. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9: 5931-5947.
14. Moore S.S., Barendse W., Berger K.T. et al. Bovine et ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases// *Animal Genetics*, 1994, 23:463-467.
15. Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 1991, 10:654-660.
16. Price C.M. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Reviews*, 1993, 7: 127-134.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.,1989.
18. Schwerin M., Gallagher D.S., Miller J.R. et al. Mapping of repetitive DNA sequences on cattle Y chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet*, 1992, 61: 189-194.
19. Solinas-Toldo S., Mezzelani A., Hawkins G.A. et al. Combined Q-banding and fluorescence in situ hybridization for the identification of bovine chromosomes 1 to 7. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 69: 1-6.
20. Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D. et al. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 1991, 10: 807-815.
21. Steffen P., Effen A., Diets A.B. et al. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics*, 1993, 24: 121-124.
22. Thomsen P.D., Jorgensen C.B. Distribution of two conserved, male-enriched repeat families on the *Bos taurus* Y chromosome. *Mammalian Genome* 1994, 5: 171-173.
23. Vainman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi et al. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism. *Mammalian genome*, 1994, 5:288-297.
24. Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dc-dt)_n polymorphism. *Genomics*, 1990, 7:524-530.
25. Wintero A.K., Fredholm M. and Thomsen P.D. Variable (dG-dT)_n·(dC-dA)_n Sequences in the Porcine Genome. *Genomics*, 1992, 12:281-288.
26. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОБИОТИКОВ

Б.В. Тараканов

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

В обзоре прослежена эволюция понятия "пробиотики" и дана формулировка наиболее приемлемого из них. Показано многогранное и разностороннее положительное действие пробиотиков на организм животного-хозяина, которое опосредуется через регулирование кишечного микробного баланса (образование антибактериальных веществ и ингибирование кишечных патогенов, конкуренция за питательные вещества и места адгезии), изменение микробного метаболизма, стимуляцию иммунной системы, противораковые и антихолестеринемические эффекты. Сформулированы основные требования, предъявляемые к бактериальным штаммам используемым для приготовления пробиотиков.

Введение

В странах с развитым животноводством при выращивании молодняка сельскохозяйственных животных и птицы все более широкое применение находят пробиотики. Как показывает опыт, они могут быть использованы: для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней инфекционной природы, а также стимуляции неспецифического иммунитета; профилактики и лечения расстройств пищеварительного тракта алиментарной этиологии (дисбактериозы, острые молочнокислые ацидозы, депрессии 90 дней и др.), возникающих вследствие резкого изменения состава рациона, нарушений режимов кормления, технологических стрессов и других причин; переустановления микрофлоры пищеварительного тракта после лечения антибиотиками и антибактериальными химиотерапевтическими средствами; замены антибиотиков в комбикормах для молодняка животных, пушных зверей и птицы; улучшения процессов пищеварения, ускорения адаптации животных к высокоэнергетическим рационам и небелковым азотистым веществам; повышения эффективности использования корма и продуктивности животных (1-6).

Необходимо, однако, отметить, что применение пробиотиков не всегда сопровождается положительным эффектом. В ряде исследований получены противоречивые результаты. Это обусловлено, по-видимому, недостаточной изученностью пробиотических препаратов, неудачным подбором входящих в их состав штаммов бактерий, технологическими проблемами при производстве препаратов и другими причинами.

Весьма важным представляется однозначно трактовать понятие "пробиотик", поскольку оно в последние годы использовалось в нескольких различных значениях. Первоначально это название было применено для описания субстанций, продуцируемых одним простейшим, который стимулировал рост других (15), но позднее оно было использовано для описания кормовых добавок, оказывающих полезный эффект на животное-хозяина путем влияния на его кишечную микрофлору (16). В этой последней роли оно было определено как «организмы и вещества (субстанции), которые делают вклад в микробный баланс кишечника». Однако это определение представлялось неудовлетворительным, поскольку оно включает антибиотики, существенно отличающиеся по механизму действия.

В 1981 году Torben Riise, директор фирмы «Кристиан Хансен Био Системы» (Дания), опубликовал обзор, в котором предложил под названием пробиотик понимать «... увеличение полезных микроорганизмов в пищеварительном тракте животного-хозяина путем

введения больших количеств желательных бактерий для переустановления и поддержания идеальной ситуации в кишечнике», а в 1989 году Fuller (11) сформулировал определение понятия пробиотик, как "живая микробная кормовая добавка, которая оказывает полезное действие на животное-хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса". Это последнее определение пробиотиков прочно укрепилось в научной литературе и не модифицировалось до настоящего времени. Оно подчеркивает важность живых микробных клеток как необходимого компонента эффективного пробиотика и устраняет беспорядок, создаваемый использованием слов "субстанции" или "вещества", имеющими очень широкое значение и включающими антибиотики и другие антибактериальные химико-терапевтические средства.

Микрофлора кишечника и здоровье животных. В природных условиях установление микробной популяции в пищеварительном тракте всех теплокровных животных вскоре после рождения является неизбежным. Микробные виды, которые первыми устанавливаются, в большинстве случаев являются предшественниками конечных организмов, которые будут колонизировать и персистировать в пищеварительном тракте в течение всей жизни животного. Известно, что различные виды колонизирующих бактерий чувствительны к изменениям, которые могут встречаться в пищеварительном тракте животного-хозяина. Пищеварительный тракт должен поставлять факторы, необходимые для существования любого организма, который окончательно устанавливается в кишечнике. Эти факторы включают благоприятную температуру, постоянное обеспечение питательными веществами, необходимыми жидкостями, биохимически активными веществами. В этой ситуации микроорганизмы извлекают пользу из условий, а животные поддерживают микрофлору, которая не вызывает заболеваний.

Обычно имеется два различных типа бактериальных популяций, которые могут устанавливаться в пищеварительном тракте. Первой является та, которая существует в тесной связи с эпителием кишечника, а вторая встречается свободной в кишечном содержимом. Популяции, которые самопроизвольно устанавливаются в пищеварительном тракте, могут быть полезными или вредными для хозяина. Если устанавливаются полезные бактерии, то они оказывают благоприятное влияние на животное-хозяина.

Идеальная ситуация для жизни животного состоит в поддержании специфических количеств полезных бактерий в пищеварительном тракте. Поэтому при выращивании животных должны быть гарантированы условия, обеспечивающие собственный микробный баланс. В природных полевых условиях это, конечно, трудно поддерживать, однако если микроорганизмы и субстраты, которые способствуют собственному микробному балансу, добавляются с кормом, то животное непрерывно будет получать добавку к установлению собственной микробной популяции.

Конечная местная кишечная микрофлора, которая стабилизируется в кишечнике, является очень сложной и содержит около 10^{14} микроорганизмов, представляющих более 400 различных видов бактерий (19). Внутри такой сложной системы имеются многие взаимосвязи между различными микроорганизмами, а также между микробами и животным. Однако вопреки всему этому размаху вариабельности, микрофлора быстро превращается в стабильную популяцию, которая помогает животному в устойчивости к инфекциям, возникающим в же-лудочно-кишечном тракте. Этот феномен, описанный различными авторами, получил название "бактериальный

антагонизм", "бактериальное вмешательство", "барьерный эффект", "колонизационная резистентность" и "конкурентное исключение" (11).

Мнение о полезном эффекте пробиотиков основано на знании, что нормальная кишечная микрофлора предохраняет животных от заболеваний и в особых доказательствах не нуждается. Оно базируется на следующих фактах. Во-первых, установлено, что безмикробные животные являются более чувствительными к заболеваниям, чем их близнецы с полной кишечной флорой. Например, безмикробные морские свинки могут быть убиты 10-ю клетками *Salmonella enteritidis*, тогда как для того, чтобы убить морскую свинку с нормальной микрофлорой, необходимо 10^9 клеток сальмонеллы. Во-вторых, известно, что введение антибиотиков животным уменьшает их резистентность к заболеваниям. Это показано на мышах относительно сальмонеллезной, шигелловой и вибриозной инфекций, а у птицы повышенная выживаемость сальмонелл в кишечнике часто связана с включением в рационы антибактериальных ростовых стимуляторов. В-третьих, имеются данные о том, что устойчивость к заболеваниям может быть повышена путем введения фекальных суспензий. У птицы носительство сальмонелл в кишечнике может быть фактически устранено путем дачи вылупившимся цыплятам фекальной суспензии от взрослой птицы.

Итак, имеются убедительные свидетельства того, что кишечная микрофлора животных предохраняет их от заболеваний. Если это так, то почему возникает потребность в применении пробиотиков? Проблемы появляются при несоблюдении условий выращивания молодняка. Ограниченный контакт с матерями, антисанитария ферм, неполноценные и несбалансированные рационы кормления приводят к тому, что устанавливающаяся в кишечнике микрофлора становится дефицитной по бактериям, которые ответственны за здоровье животного-хозяина и предохраняют его от заболеваний. Исходя из этого становится очевидно, что цель пробиотического подхода состоит в устранении дефицитов в кишечной микрофлоре и поддержании ее защитного эффекта на возможно высоком уровне.

Механизмы действия пробиотиков. Несмотря на то, что имеются убедительные свидетельства воздействия пробиотиков на микроэкологию кишечника, все еще мало данных относительно того, каким образом эти эффекты достигаются. Тем не менее, современные знания позволяют констатировать, что полезные эффекты пробиотиков могут опосредоваться через прямое антагонистическое действие против специфических групп микроорганизмов (образование антибактериальных веществ, конкуренция за питательные вещества и места адгезии), изменение микробного метаболизма (увеличение или уменьшение ферментативной активности), стимуляцию иммунной системы, противораковые и антихолестеринемические эффекты.

Как было обнаружено, представители рода *Lactobacillus* spp. и, в частности *Lactobacillus acidophilus*, обладают выраженными ингибирующими свойствами против кишечных патогенов и это специфическое действие обусловлено продукцией таких антибиотиков, как ацидофилин, лактолин и ацидолин. Образующий ацидолин вместе с молочной кислотой обеспечивает высокую антимикробную активность против энтеропатогенных видов *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staph. aureus*, *Clostridium perfringens* и ряда других спорообразователей.

Помимо образования специфических антибиотиков, ингибирование патогенов лактобациллами может быть обусловлено продуктами их метаболизма. Они образуют значительные количества уксусной, муравьиной, молочной кислот и перекиси водорода, ингибирующие свойства которых хорошо известны. В процессе

метаболизма многие лактобациллы закисляют pH ростовой среды до 4,5 и ниже. Сами они толерантны к низкому pH, но его снижение до значения 4,5 оказалось строго бактерицидным для ряда штаммов *Micrococcus* sp. и *B. cereus*. Вместе с тем лактобациллы в результате образования метаболитов, уменьшают окислительно-восстановительный потенциал, что способствует более полному ингибирующему действию на облигатно- и факультативноанаэробные бактерии.

Что касается конкуренции за питательные вещества, то, несмотря на то, что кишечник является богатым источником нутриентов, дефицит отдельных из них исключить не представляется возможным. Различия в метаболических активностях позволяют организму истощать необходимые питательные вещества из ростовой среды и, таким образом, ингибировать рост других бактерий. В этом отношении очень эффективна *L. acidophilus*. Показано также, что пищевая конкуренция является фактором, ограничивающим рост *Clostridium difficile* в кишечнике (20).

Другим механизмом предотвращения колонизации кишечника патогенами является конкуренция за места адгезии на поверхности кишечного эпителия. Бактерии, которые растут медленно, но прикрепляются к кишечной стенке, могут колонизировать кишечник, в то время как неадгезирующие виды компенсируются за счет повышения скорости роста. Прикрепление обеспечивает микроорганизму устойчивость к вымыванию из кишечника при перистальтических потоках содержимого. Из этого следует, что если пробиотический штамм может оккупировать места адгезии на слизистой кишечной стенки, то он приживается в пищеварительном тракте, и наоборот. Исследования с *E. coli* показали, что принцип является правильным. Если поросят обрабатывали непатогенным штаммом *E. coli* K88, а затем давали патогенный штамм *E. coli* K88, то они были более резистентны к инфекции, чем контрольные животные. Показано также, что адгезия *E. coli* на уроэпителиальных клетках может быть предотвращена предобработкой последних фрагментами клеточных стенок или целыми клетками лактобацилл (10).

Зоб домашней птицы в норме содержит микрофлору, в которой лактобациллы преобладают над колиформами и стрептококками. Эта популяция лактобацилл может оказывать влияние на микрофлору тонкого кишечника. Экологические исследования по флоре лактобацилл, связанных с кишечной стенкой показали, что зоб был источником лактобацилл для поддержания бактериального баланса в кишечнике. Эта адгезированная популяция служит инокулятом для поступающего корма и обеспечивает подавление популяций эшерихий. Показано, что после скормливания культуры лактобацилл цыплятам, сбалансированная молочнокислая микрофлора устанавливалась в дуоденуме, тощей и слепой кишках в пределах 24 ч. В этой связи представляется целесообразным использовать пробиотики вслед за исключением из рационов антибиотиков, чтобы обеспечить переустройство в кишечнике благоприятной микробной популяции (11).

При выборе штаммов для приготовления пробиотиков следует однако помнить, что адгезия является специфичным для хозяина феноменом, она варьирует между штаммами одного вида и может быть изменена условиями роста и используемыми средами (11).

Что касается воздействия пробиотиков на микробный метаболизм, то в этом плане проведено мало исследований. Тем не менее, установлено, что при скормливании человеку *L. acidophilus* в кишечнике подавлялась активность β -глюкуронидазы, нитроредуктазы и

азоредуктазы. В опытах на крысах при даче того же штамма ацидофильной палочки наблюдалось снижение активности β -глюкуронидазы и β -глюкозидазы. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что пробиотики могут проявлять свое влияние путем увеличения активности полезных ферментов и, в частности β -галактозидазы, которая облегчает лактозную нетолерантность у человека.

Известно, что конвенциональные животные с полной кишечной флорой имеют повышенную фагоцитарную активность и уровни иммуноглобулинов в сравнении с безмикробными животными. Штамм *Enterococcus faecium* (вид, часто используемый в пробиотических препаратах), установленный как моноассоциат у безмикробной мыши, был способен снижать количества *S.typhimurium* в селезенке, что указывает на его системное действие. Показано, что при скормливания безмикробным мышам йогурта в их крови увеличивался уровень антител, а лактобациллы вовлекались в стимуляцию фагоцитарной активности. При этом особенно активной была культура *L.casei*, когда вводилась мышам через рот. Лактобациллы способны мигрировать из кишечника в системную циркуляцию и могут много дней выживать в селезенке, печени и легких. *L.casei* и *L.plantarum*, вводимые парэнтерально, стимулируют фагоцитарную активность, а при даче *L.plantarum* также увеличивалась природная килерная клеточная активность (7). Эти данные о системном действии лактобацилл на иммунитет показывают, что пробиотики имеют потенциал не только в балансирующем действии на кишечную флору, но и влияют на патогенез заболеваний, которые встречаются в тканях, удаленных от пищеварительного тракта.

Первое сообщение о противоопухолевой активности *L. bulgaricus* было опубликовано 35 лет назад (8). За прошедшие годы в печати появилось более десятка работ, в которых обсуждается антиопухолевая активность различных видов лактобацилл. Полученные данные свидетельствуют, что противораковые свойства лактобацилл проявляются: а) в ингибирующем действии на опухолевые клетки (17); б) подавлении бактерий, которые продуцируют β -глюкуронидазу, азоредуктазу и нитроредуктазу, конвертирующие в пищеварительном тракте проканцерогены в канцерогены (14); в) разрушении канцерогенов типа нитрозаминов (18) и подавлении нитроредуктазы, которая вовлекается в синтез нитрозаминов (14).

Механизм того, как молочнокислые бактерии продуцируют противоопухолевую активность, неясен. В одном сообщении предполагалось, что антиопухолевая активность, экстрагированная из клеток, *L.bulgaricus*, была обусловлена гликопептидами (9). Варьирующие результаты противоопухолевой активности у молочнокислых бактерий, особенно *L.bulgaricus*, могут быть частично объяснены лабильностью активного начала.

В ряде исследований было показано, что кишечная микрофлора может изменять уровни холестерина в сыворотке крови. Безмикробные животные на обогащенных холестерином рационах аккумулируют приблизительно в два раза больше холестерина в крови, чем животные с обычной микрофлорой на таком же рационе. Последние экскретируют много больше холестерина в кале, чем безмикробные животные, и этот факт дает основание полагать, что кишечная микрофлора препятствует всасыванию холестерина из кишечника.

В чем же состоит механизм антихолестеринемического действия? Исследования с чистыми культурами лактобацилл, бифидобактерий, молочнокислых стрептококков и эшерихий показали, что они способны ассимилировать холестерин. Так было установлено, что *L. acidophilus* в

присутствии желчи и в анаэробных условиях активно удаляла холестерин из лабораторных сред (12). В результате скрининга штаммов *L. acidophilus* на способность потреблять холестерин были отобраны штаммы RP32 и P47, ассимилирующие много и немного холестерина в лабораторных тестах соответственно, которые были использованы в опытах по кормлению.

Свиней, размещенных в индивидуальных клетках, наугад разделили на 3 группы. Затем в недельном уравнительном периоде все животные получали рацион с добавкой холестерина, который скармливали дважды в день в дозе 1000 мг на одно кормление. Дополнительно каждой свинье в I группе (контроль) давали 50 мл молока в день. Животным 2-ой группы давали 50 мл молока, содержащего 5×10^{10} клеток штамма *L. acidophilus* P47 в день, а свиньи 3-ей группы ежедневно получали 50 мл молока с 5×10^{10} клеток *L. acidophilus* P32. Исследования показали, что штамм RP32, ассимилирующий много холестерина, в опытах *in vitro* достоверно снижал, в сравнении с контролем и 2-й группой, его уровни в сыворотке крови свиней 3-й группы, то есть оказался перспективным для приготовления пробиотика, обладающего антихолестеринэмическим эффектом.

Другой активностью, проявляемой *L. acidophilus*, которая может оказывать существенное влияние на уровни холестерина в крови, является способность к деконъюгации желчных кислот. Различные виды лактобацилл, обитающих в пищеварительном тракте, деконъюгируют таурохолиевую и гликохолиевую кислоты. Такая деконъюгационная активность обычно проявляется у организмов в анаэробных условиях и она становится важной по отношению к уровню холестерина в сыворотке крови потому, что деконъюгированные желчные кислоты обеспечивают меньшее всасывание липидов из кишечного тракта, чем конъюгированные. Это может приводить к уменьшению всасывания холестерина в крови (13).

Заключение

Представленные выше данные однозначно свидетельствуют, что пробиотики оказывают многообразное действие как на микрофлору желудочно-кишечного тракта, так и на обменные функции организма животных, а пробиотический эффект различных бактерий определяется суммой специфических активностей, которыми эти организмы обладают. Молочнокислые бактерии, например, оказывают полезное действие посредством образуемых антибиотиков, продукции органических кислот и изменения величины pH, образования перекиси водорода, снижения окислительно-восстановительного потенциала среды, конкуренции за места адгезии и питательные вещества и другие эффекты. Бактерии других систематических групп, и в частности рубцовые виды, могут продуцировать биологически активные вещества, необходимые для роста других бактерий, утилизировать вредные продукты обмена и, таким образом, поддерживать экологическое равновесие в пищеварительном тракте. Поэтому наиболее перспективными, хотя технологически более сложными, могут быть пробиотические препараты, которые состоят из бактерий различных видов (микробный консорциум), находящихся в синтрофных взаимоотношениях. При этом однако не исключается использование отдельных видов бактерий, обладающих необходимыми свойствами, или улучшенных генноинженерными методами. При отборе культур для приготовления пробиотиков следует помнить, что они должны удовлетворять определенным требованиям.

1. Микроорганизмы должны быть нормальными обитателями желудочно-кишечного тракта здоровых животных, быть непатогенными и нетоксичными, поскольку использование других бактерий может привести к непредвиденным эффектам.

2. Культура бактерий должна быть метаболически активной в экосистеме рубца; в случае приготовления пробиотика для жвачных – переносить пассаж через желудок и метаболизировать в кишечнике моногастричных животных и птицы, увеличивая их рост или резистентность к заболеванию.

3. Бактерии должны быть способны к адгезии на эпителии и приживлению в пищеварительном тракте, где высоки ферментативные активности, связанные с перевариванием корма, и агрессивная среда.

4. Штаммы должны быть стабильными и способными длительное время оставаться жизнеспособными при хранении в производственных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов В.А., Субботин В.М. Эффективность и перспективы применения пробиотиков, Ветеринария. 1980, 12: 55-57,
2. Калунянц К.А, Ездаков Н.В., Ливних И.Г. Применение продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. К.: Колос, 1980: 288 с.
3. Платонов А.В. Производство препаратов для животноводства на основе микроорганизмов – симбионтов желудочно-кишечного тракта. М.: ВНИИСЭНТИ, 1985: 43 с.
4. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова думка, 1982: 280 с.
5. Тарканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. М.: ВНИИТЭИагропром, 1987: 48 с.
6. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев: Штиинца, 1990: 188 с.
7. Bloksma N., Ettekooven H. et al. Effects of lactobacilli on parameters of non-specific resistance of micell. Med. Microbiol. Immunol., 1981, 170:45-53.
8. Bogdanov I.G., Popkhirstov P. et al. Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on sarcoma 180 and on the select form of Erlich carcinoma. Abstr. VII Intern. Cancer. Congress, 1962:364.
9. Bogdanov I.G., Dalev P.G. et al. Antitumor glucopeptides from Lactobacillus bulgaricus cell wall. FEBS Lett., 1975, 57:259-261.
10. Chan R.C.Y., Reid G. et al. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by Lactobacillus whole cells and cell wall fragments. Infection and Immunity, 1985, 47:84-89.
11. Fuller R. Probiotics in man and animals. A review. J. Appl. Bacteriol., 1989, 66, 5:365-378.
12. Gilliland S.E., Nelson C.R. et al. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49, 2:377-381.
13. Gilliland S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 1990, 87, 1-2:175-188.
14. Goldin B.R., Gorbach S.L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Amer. J. Clin. Nutr., 1984, 39:756-761.
15. Lilly D.M., Stilwell R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 1965, 147:747-748.
16. Parker R.B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. Anim. Nutrition and Health, 1974, 29:4-8.

- 17.Reddy G.V., Shahani K.M. et al. Inhibitory effect of the yoghurt on Erlich ascites tumor on cell proliferation. J. national Cancer Institute, 1973, 50:815-817.
18. Rowland I.R., Grasso P. Degradation of N-nitrosamine by intestinal bacteria. Appl. Microbiol., 1975., 29:7-12.
- 19.Tannock G.W. The normal microflora: new concepts in health promotion. Microbiol. Sci., 1988, 5:4-8.
- 20.Wilson K.H., Perini F. Role of competition for nutrients in Suppression of Clostridium difficile by the colonic microflora. Infection and Immunity, 1988, 56:2610-2614.

НОВЫЕ ПРОБИОТИКИ И МИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

*Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, И.А. Долгов,
Г.К. Соколовская, А.М. Соловьев*

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

Из пищеварительного тракта жвачных, свиней и птицы выделено 57 штаммов лактобацилл, 2 штамма пропионибактерий и 128 штаммов амилолитических стрептококков; детально изучены их физиолого-биохимические свойства, проведена идентификация, подобраны совместимые ассоциации бактерий разных систематических групп и отобраны штаммы, перспективные для использования в качестве пробиотиков и для создания микробных биоконсервантов. Представлены данные о новом биопрепарате стрептофагине, предложенном для использования в молочном скотоводстве в качестве средства, предотвращающего снижение содержания жира в молоке у коров при высококонцентратном кормлении (40% и более концентратов по питательности). Показано, что механизм действия препарата опосредуется через регуляцию микробных процессов в рубце, а его применение в рекомендуемой дозе безвредно для животных и повышает уровень жира в молоке на 0,2-0,3%.

Введение

В последние годы все большее внимание уделяется разработке новых пробиотических препаратов для использования в животноводстве. Пробиотиками называют живые микробные кормовые добавки, которые оказывают полезное действие на животное-хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса. В этой связи одной из важнейших задач является поиск новых микроорганизмов, пригодных для приготовления пробиотических препаратов. С этой целью наиболее часто используются бактерии родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* и *Bacillus* и на их основе сейчас разработан широкий спектр пробиотиков как эффективных, так и недостаточно эффективных. Низкая эффективность последних объясняется, по-видимому, тем, что используемые для их приготовления штаммы часто не обладают всеми необходимыми свойствами, а в комплексных (мультиассоциативных) пробиотиках нередко применяются малосовместимые или несовместимые культуры, что естественно отражается на их качестве.

В кормопроизводстве при силосовании кормов все более широко используют микробные биоконсерванты. С этой целью применяют лактобациллы, стрептококки, пропионибактерии и другие микроорганизмы как в виде монокультур, так и различных ассоциаций. В этой области достигнут известный прогресс, но пока еще не

разработаны хорошие биоконсерванты для приготовления силосов из бобовых растений и не используются в силосовании бактерии с высокой нитратредуктазной активностью. Поэтому важнейшей задачей исследований является создание совместимых ассоциаций (консорциумов) бактерий, которые позволяли бы получать высококлассные, малонитратные и обогащенные витаминами силоса.

Проблеме создания новых пробиотиков и биоконсервантов для использования в животноводстве и кормопроизводстве наша лаборатория уделяет значительное внимание и результаты исследований, проведенных в последние годы, частично обобщены в предлагаемом вниманию читателей обзоре.

Поиск штаммов бактерий с необходимыми для приготовления пробиотиков и биоконсервантов свойствами. Из рубца жвачных (телят и ягнят), пищеварительного тракта свиней и птицы выделено 57 штаммов лактобацилл, 2 штамма пропионибактерий и 128 штаммов амилотических стрептококков.

Детальное изучение свойств лактобацилл показало, что 53 штамма продуцировали антагонистические вещества, ингибирующие бактерии родов *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*. По сумме культуральных и физиолого-биохимических свойств антагонистические лактобациллы рубца телят отнесены к видам *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* и *L. fermentum*, а также выявлена группа штаммов, утилизирующих крахмал, которые предложено отнести к новому виду *Lactobacillus amiloliticus* sp.nov. (11). Антагонистические лактобациллы, выделенные из рубца ягнят Монголии, идентифицированы как *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* и *L. cellobiosus*. Из слепой кишки поросят выделен высокоактивный антагонистический штамм *Lactobacillus amylovorus* БТ-24/88.

Установлено, что все изученные культуры антагонистических лактобацилл проявляли устойчивость к хлорамфениколу, тетрациклину и полимиксину, но были чувствительными к гентамицину и линкомицину. Некоторые культуры не подавлялись при наличии в среде различных концентраций эритромицина, ампициллина, цефазолина. Наличие генетических маркеров у антагонистических лактобацилл (антибиотикоустойчивость, способность утилизировать крахмал) дает основание полагать, что в перспективе они могут быть использованы в качестве доноров и реципиентов генов при получении рекомбинантных штаммов.

Исследование совместимости лактобацилл в ассоциативных культурах и перекрестное испытание их антагонистической активности методом отсроченного антагонизма показало, что подобрать стабильные бинарные ассоциации антагонистических лактобацилл достаточно сложно. Тем не менее, по нашим данным, перспективной представляется ассоциация *L. amylovorus* БТ-24/86 и *L. plantarum* LBO 35/91, в которой хотя и проявляется взаимное ингибирующее действие, но составляющие ее культуры находятся в высоком титре.

Из 128 культур стрептококков, выделенных из рубца коров, отобрано 8 штаммов, отличающихся высоким накоплением биомассы, способностью сбраживать углеводы и обладающих повышенной карбогидразной активностью (1). Все штаммы по своим культуральным и физиолого-биохимическим свойствам соответствовали виду *Streptococcus bovis*, обладали амилазной и протеазной активностями, устойчивостью к левомицитину, ампициллину, канамицину, эритромицину (10-20 мкг/мл). Вместе с тем, все культуры оказались чувствительными к окситетрациклину (5 мкг/мл) и стрептомицинозависимыми (5-10 мкг/мл). Все штаммы обладали

выраженной антагонистической активностью по отношению к культуре *E. coli*, выделенной от больных диспепсией телят. Выживание клеток тест-культуры в смешанных посевах, по сравнению с контролем, составляло 1,3-3,2%.

Известно, что пропионовокислые бактерии способны сбраживать широкий круг углеводных субстратов, восстанавливать нитраты и используются как закваски при силосовании кормов. Одним из лучших доноров электронов для нитратредукции является лактат, и в связи с этим представлялось целесообразным выяснить совместимость лактобацилл и нитратредуцирующих бактерий в ассоциативных культурах. Культуры лактобацилл, пропионибактерий и аэробных бацилл выращивали в чистых культурах и ассоциациях на соответствующих средах с добавлением 1 г/л нитрата калия. Из 27 штаммов лактобацилл были отобраны активные кислотообразователи. В дальнейшем трехсуточные культуры лактобацилл центрифугировали в стерильных условиях, а культуральную жидкость использовали в качестве питательной среды для выращивания испытуемых нитратредуцирующих бактерий. Максимальный рост пропионовокислых бактерий, высокая нитрат- и нитритредуктазная активность позволили отобрать 12 культур лактобацилл для совместного выращивания ассоциаций бактерий (3).

При культивировании каждой из 12 лактобацилл в паре с нитратредукторами 5М, 3S и 76б на модифицированной среде Рогозы (МРТ) с нитратом калия через сутки величина pH снижалась до 4,2-5,5, оптическая плотность возрастала до 0,3-0,75, уровень нитрата убывал до 2,0 74%, от исходного уровня в среде, а содержание нитрита варьировало от 0,8 до 37 мг нитратного азота на 1 л среды. Самые высокие нитрат- и нитритредуктазные активности отмечены при совместном росте лактобацилл с культурой рода *Bacillus* sp. 76б, в то время как у *Propionibacterium* sp. 5М в ассоциации с лактобациллами скорость восстановления нитрата была ниже, чем в чистой культуре, а у *Propionibacterium* sp. 3S в среде накапливались высокие концентрации нитрита. В составе ЛЖК преобладала уксусная кислота, а пропионовая составляла от 7 до 25%. Небольшие количества масляной кислоты образовывали ассоциации с 6 лактобациллами, однако их количество не превышало 2% от общей суммы кислот. Лучшие показатели роста, минимальное накопление нитрата, высокое кислотообразование при отсутствии масляной кислоты отмечено при совместном выращивании *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplatarum* LBR 33/90 с нитратредуцирующими бактериями *Propionibacterium* sp. 5М, 3S и штаммом *Bacillus* sp. 76б (3).

Дальнейшее детальное изучение пропионибактерий штаммов 5М и 3S, выделенных из рубца крупного рогатого скота, показало, что по сумме физиолого-биохимических свойств они принадлежали к видам *Propionobacterium acidipropionici* и *Propionibacterium asnes* соответственно. Нитратредуктазная активность и продукция витамина B₁₂ при разных условиях культивирования у штаммов *P. acidipropionici* 5М и *P. asnes* 3S варьировали в пределах 5,4-8,0 и 5,9-7,8 мг убыли N-NO₃/л/ч, 0,6-1,53 и 0,41-1,49 мкг/мл соответственно.

Установлено, что обогащение питательной среды органическим азотом за счет внесения пептона и дрожжевого экстракта (до 10г/л) сопровождается снижением нитратредуктазной активности и степень анаэробноза при этом не влияет на ферментативную активность. Увеличение уровня нитрата до 5 г/л угнетало рост пропионибактерий. Повышение концентрации молибдена в питательной среде до 5 мг/л вызывало незначительное усиление активности нитратредуктаз, тогда как более высокие уровни молибдена не влияли на активность

ферментов. Стимуляция синтеза цианкобаламина наблюдалась при концентрациях хлористого кобальта в пределах 3-5 мг/л среды, но дальнейшее увеличение его уровня до 20 мг/л не повышало выход витамина В₁₂ у изученных штаммов (5).

Совместное культивирование штаммов *P. acidipropionici* 5М и *P. acnes* 3S, со штаммами *L. amylovorus* БТ-24/88 и *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* LBR 33/90 показало, что рост штамма 5М стимулируется штаммом LBR 33/90, тогда как рост штамма 3S в комбинации с последним несколько сдерживается. Рост обоих штаммов пропионибактерий на среде MRT (11) в присутствии *L. amylovorus* БТ-24/86 угнетается, а титр клеток молочнокислых бактерий при этом снижается. Эти данные побуждают к дальнейшим поискам совместимых ассоциаций лактобацилл и пропионовокислых бактерий.

Таким образом, в результате исследований собрана коллекция высокоактивных антагонистических штаммов бактерий родов *Lactobacillus*, *Propionibacterium* и *Streptococcus*, обладающих необходимыми для пробиотиков свойствами и несущих генетические маркеры, позволяющие использовать эти штаммы в качестве доноров и реципиентов генов при конструировании рекомбинантных штаммов.

Оценка перспективности применения новых штаммов бактерий в качестве биопрепаратов. С целью определения эффективности штамма *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplatantarum* LBR 33/90 для профилактики и лечения диспепсии телят были проведены опыты на телятах, начиная от рождения до месячного возраста, в ОПХ "Ермолино", АО "Асеньевское" и колхозе им. Циолковского Боровского района, Калужской области. С профилактической целью препарат из штамма LBR 33/90 выпаивали новорожденным телятам с первой порцией молозива. При заболевании животных диспепсией дозу препарата увеличивали в 2-3 раза и задавали его до выздоровления. Для лечения заболевших телят при необходимости использовали также и медикаментозную терапию.

Исследования показали, что выпаивание животным препарата оказало существенное влияние на становление микрофлоры в пищеварительном тракте, показатели неспецифического иммунитета, снижение заболеваемости и сохранность молодняка. Так, в кале телят, получавших штамм LBR 33/90, снижалось количество эшерихий, гемолитических и паратифозных бактерий и увеличивалась численность молочнокислых, крахмалгидролизующих и бифидобактерий (4). В крови у молодняка возрастало содержание гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов, а также фагоцитарная активность. Использование пробиотика при лечении телят на 2-3 дня сокращало продолжительность болезни, уменьшало затраты на лекарственные средства и повышало сохранность молодняка на 5-8%. Прирост живой массы у получавших препарат телят в течение первого месяца жизни превосходил таковой у контрольных животных на 17,4%. Таким образом, установлено, что антагонистический штамм *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* LBR 33/90 является перспективным для применения в качестве пробиотика при выращивании телят.

При определении эффективности применения штамма *Streptococcus bovis* при дисбактериозах телят, под опытом были две группы телят (по 17 голов в каждой), начиная с первого дня после рождения. Животные обеих групп получали молочные корма, а телятам опытной группы, с целью профилактики диареи, через 40-60 мин после рождения вместе с молозивом выпаивали 50 мл культуры *Str. bovis* №19, которую затем продолжали выпаивать в очередное кормление в этой же дозе в течение трех дней подряд. С лечебной целью пробиотик выпаивали в дозе 50-100 мл 3 раза в день до выздоровления.

Исследования показали, что в контрольной группе на 2-3 день после рождения заболело диспепсией 12 телят, или 70% (2). У больных животных в пищеварительном тракте уменьшалось количество молочнокислых, амилалитических и протеолитических бактерий в 2,4; 2 и 1,9 раза, а амилалитическая и протеолитическая активности снижались в 2,7 и 2 раза соответственно. При этом численность лактозопозитивных и лактозонегативных бактерий группы кишечной палочки возрастала в 1,5 и 4,4 раза, а отношение числа эшерихий к молочнокислым бактериям с 1,9:1 у здоровых контрольных животных, расширялось до 8,9:1 у больных. В опытной группе, получавшей культуру *Str. bovis* №19, из 17 телят заболело только 4, или 23,5%, причем заболевание начиналось на 4-5-й день после рождения и протекало менее остро, чем в контроле. Дача пробиотика сопровождалась увеличением количества амилалитических, молочнокислых и протеолитических бактерий в 3,5; 1,4 и 2,8 раза, также повышением амилазной и протеолитической активностей в 2,7 и 2 раза соответственно. Численность лактозоположительных эшерихий при этом снижалась в 1,7 раза, лактозонегативные бактерии группы кишечной палочки отсутствовали и отношение эшерихий к молочнокислым бактериям составило 1:1,5. Таким образом, установлено, что дача телятам с профилактической целью препарата из штамма *Str. bovis* №19 обеспечивает формирование в пищеварительном тракте нормального микробиоценоза, снижает заболеваемость животных диспепсией на 47% и сокращает продолжительность болезни на 2-3 дня.

В трех лабораторных опытах изучена эффективность использования восьми вариантов микробных биоконсервантов из чистых культур лактобацилл и их комбинаций с нитратредуцирующими бактериями родов *Propionibacterium* и *Bacillus* для приготовления малонитратных силосов из зеленой массы злаковых трав, клевера и кукурузы.

Установлено, что при добавлении в силосуемую массу злаковых трав биоконсервантов, в готовом корме повышалась концентрация молочной кислоты, показатель pH находился в пределах 3,9-4,3, содержание протеина практически не изменялось, в то время как количество клетчатки несколько снижалось, а каротина возрастало в 1,2-1,9 раза (7). При этом в большинстве случаев уменьшались концентрации нитратов, а при включении в биоконсервант пропионибактерий и бацилл уровни $N-NO_3$ в силосе, в сравнении с контролем, снижались в 1,5-2,7 раза ($P<0,02-0,001$). Использование испытуемых биоконсервантов при силосовании клевера показало, что хотя они и не увеличивали образование органических кислот (дефицит углеводов), но обеспечивали существенное ($P<0,05-0,001$) снижение (на 54-77%, против 42% в контроле) концентрации нитратов. Внесение биоконсервантов при силосовании кукурузы сопровождалось большей продукцией органических кислот и оптимальным их соотношением, что позволило получить силоса первого класса с пониженным количеством нитратов. Их уровень с 282 мг $N-NO_3$ в 1 кг сухого вещества исходной зеленой массы уменьшался в контрольном силосе до 64,1 мг, тогда как при использовании комплексных препаратов он варьировал в пределах 28-56 мг ($P<0,05-0,001$). Таким образом, установлена возможность приготовления малонитратных силосов с использованием микробных биоконсервантов.

Новый фаговый препарат стрептофагин. В кормлении высокопродуктивных молочных коров широко используются рационы, в которых на долю концентратов приходится до 40-50% общей питательности. Такие высокоэнергетические рационы содержат много

крахмала и благоприятствуют размножению в рубце амилолитических стрептококков вида *Streptococcus bovis*. Эти бактерии отличаются высокой интенсивностью роста, образуют много молочной кислоты, что резко снижает pH в содержимом рубца, ухудшает условия для жизнедеятельности бактерий, гидролизующих целлюлозу и гемицеллюлозу и может приводить к развитию ацидотических явлений в организме животных и синдрому низкой жирности молока. Хронический молочнокислый ацидоз неблагоприятно отражается на здоровье коров и укорачивает срок их продуктивного использования.

Природа и механизмы действия стрептофагина. Для предотвращения указанных выше нежелательных явлений предложено использовать новый биопрепарат стрептофагин, действующим началом которого являются бактериофаги *Streptococcus bovis*.

Исследования показали, что скармливание стрептофагина лактирующим коровам, содержащимся на рационах с 40-50% концентратов, приводит к продуктивной инфекции чувствительных к ним бактерий в рубце и сопровождается нарастанием концентрации бактериофагов в содержимом, снижением численности амилолитических бактерий и их активности. При этом через 3 часа после введения фагов процент бактерий, утилизирующих глюкозу и мальтозу, существенно не различался, тогда как доля бактерий, использующих ксилан и ксилозу, заметно возрастала. Эти данные свидетельствуют, по-видимому, о том, что фаги, сдерживая развитие крахмал утилизирующих бактерий, способствовали лучшему гидролизу гемицеллюлоз и использованию образующегося при этом древесного сахара (ксилозы). Через сутки после введения фагов ситуация несколько изменялась. На фоне пониженной доли крахмал утилизирующих бактерий уменьшался процент организмов, использующих глюкозу, ксилан и ксилозу, но повышалось количество бактерий, утилизирующих целлобиозу, являющуюся основным продуктом гидролиза целлюлозы (9). Исходя из этих данных, можно заключить, что депрессирование популяции амилолитических стрептококков фагами *Streptococcus bovis* вскоре после кормления способствует интенсивному развитию бактерий, гидролизующих гемицеллюлозы и использующих продукты их гидролиза. По мере расщепления гемицеллюлоз доля бактерий, участвующих в их метаболизме, снижается. В последующие часы перед кормлением стимулируется гидролиз целлюлозы и интенсивное развитие бактерий, использующих целлобиозу. Следовательно, введение фагов способствует лучшему использованию трудногидролизуемых углеводов грубых кормов.

Ветеринарно-токсикологическая оценка безвредности стрептофагина для животных. Определение безвредности стрептофагина для лактирующих коров, проведенное в предыдущие годы, показало, что препарат, скармливаемый в рекомендуемой (25×10^9 частиц/голову/сут) и в 4-кратно повышенной дозах в течение трех месяцев, безвреден для коров.

Дальнейшие испытания стрептофагина в рекомендуемой дозе 1,5 млрд. фаговых частиц на 1 кг живой массы ежедневно, а также в 10-ти и 100-кратно повышенных дозах в хроническом 5-месячном эксперименте на кроликах подтвердили безвредность препарата для животных. Случаев заболеваний и гибели кроликов, получавших препарат, не зарегистрировано. Со стороны функций органов пищеварения, дыхания, сердечно-сосудистой, кроветворной и мочевой систем каких-либо отклонений не отмечено. Прирост живой массы в контроле и у животных, получавших препарат в рекомендуемой, 10- и 100-кратно увеличенных дозах, составил 1830 г, 1847 г, 1840 г и 1805 г соответственно (6).

В заключительном 2-летнем эксперименте на кроликах, получавших стрептофагин в дозах 3, 30 и 300 млрд. фаговых частиц на голову ежедневно или рекомендуемую, 10- и 100-кратно повышенные соответственно, было установлено, что скармливание рекомендуемой и 10-кратно увеличенной доз стрептофагина в течение первых 6 мес не оказало отрицательного влияния на состояние здоровья животных. При даче 100-кратной дозы препарата и клиническом благополучии кроликов гистологические исследования выявили структурные изменения генерализованного характера в печени, почках и надпочечниках. По химическим, органолептическим и микробиологическим показателям мясо кроликов, получавших фаговый препарат, отвечало требованиям, предъявляемым к свежему доброкачественному мясу (10).

При дальнейших наблюдениях в течение 18 мес общее состояние животных было удовлетворительным. За это время в контрольной группе пали одна самка после окрола и одна с опухолью молочной железы.

В группах, получавших рекомендуемую и 10-кратно повышенную дозу, падежа не было. В группе со 100-кратной дозой препарата пало три кролика – два с явлениями снижения упитанности и парезом задних конечностей и один с перерождением печени.

При патологоанатомических и гистологических исследованиях у кроликов контрольной группы и получавших рекомендуемую дозу стрептофагина патологических и структурных изменений в органах и тканях не обнаружено. У животных после 20-месячного скармливания 10-кратно повышенной дозы препарата незначительно увеличивалась масса печени и селезенки, что сопровождалось поражениями их гистоструктуры. Длительное введение в рацион кроликов 100-кратно увеличенной дозы стрептофагина привело к появлению в печени и почках микрокровоизлияний, стазов и отеков.

Двухлетние исследования по выяснению влияния стрептофагина на воспроизводство и выяснению отдаленных последствий его применения на потомство показали, что в рекомендуемой дозе препарат не оказывает вредного воздействия на потомство кроликов в четырех поколениях.

Таким образом, результаты исследований по ветеринарно-токсикологической оценке стрептофагина позволяют заключить, что применение препарата в рекомендуемой дозе не представляет опасности для животных. Длительное, на протяжении 2-х лет, скармливание препарата в дозах 30-300 млрд. фаговых частиц на голову в сутки нецелесообразно, так как приводит к структурным нарушениям в иммунной и сосудистой системах и, следовательно, оказывает неблагоприятное влияние на здоровье животных.

Эффективность использования стрептофагина в кормлении молочных коров. В физиологических опытах на коровах, получавших рационы с 40-50%-ным содержанием концентратов по питательности, ежедневное скармливание стрептофагина не оказало влияния на удои, но на 0,2-0,3% увеличивало содержание жира в молоке. При этом затраты кормовых единиц на производство 1 кг молока 4%-ной жирности снижались на 15,3%, а переваримого протеина – на 4,7-12,1%. При скармливании препарата фагов с периодичностью один раз в 3, 5 или 7 суток, его эффективность снижалась: содержание жира в молоке возрастало лишь на 0,1-0,16%, а затраты кормовых единиц и переваримого протеина на 1 кг молока 4%-ной жирности уменьшались только на 1,2-4,2% и 2,4-3,6% соответственно (8).

Положительные результаты от скармливания стрептофагина получены и при апробации в производственных условиях. Так, при

ежедневной даче препарата коровам черно-пестрой породы в первую половину лактации удои возрастали на 18%, а жирность молока – на 0,21%. За 74 сут опыта это позволило дополнительно получить на каждую из 26 коров по 361 кг молока базисной жирности (3,4%) и снизить затраты кормовых единиц и переваримого протеина на производство 1 кг молока 4%-ной жирности на 20,7 и 20,4%. При испытании стрептофагина на производственной группе из 43 холмогорских коров, находившихся на разных стадиях лактации, ежедневная его дача не оказывала существенного влияния на удои, но способствовала повышению жирности молока с 3,77 до 3,96%. Положительное действие препарата на жирномолочность коров подтверждается еще и тем фактом, что спустя 10 суток после прекращения его дачи при тех же условиях кормления и содержания, уровень жира в молоке снизился до 3,6%.

Производственная проверка эффективности применения стрептофагина, проведенная в 1996 году в ОПХ "Ермолино" в первые 5 мес лактации на коровах, получавших в стойловый период рационы с 38-45% концентратов по питательности, показала, что дача препарата увеличивала содержание жира в молоке в среднем на 0,24 абсолютных процента, что подтвердило эффективность и перспективность применения препарата в молочном скотоводстве. Вместе с тем, данные, подученные в ГПЗ "Ворсино", свидетельствуют, что дача молочным коровам стрептофагина при ограниченном и несбалансированном кормлении с уровнем концентратов в рационах в пределах 27-29% по питательности, существенного влияния на удои и содержание жира в молоке не оказала, то есть была неэффективной.

Впервые показано, что скармливание стрептофагина в период перехода коров на пастбище, повышало уровень жира в молоке на 0,15-0,47 абсолютных процента, то есть препарат может быть использован в качестве профилактического средства при жирдепрессирующем действии молодых зеленых кормов на продуктивность коров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгов И.А., Тараканов Б.В. Биология *Streptococcus bovis* из рубца коров. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет за 1990-1991 гг. Боровск, 1991: 213-232.
2. Долгов И.А., Тараканов Б.В. Эффективность применения штамма *Streptococcus bovis* при дисбактериозах у телят. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет за 1992-1993 гг. Боровск, 1993: 377-378.
3. Тараканов Б.В., Соколовская Г.К. Метаболическая активность молочнокислых, пропионовокислых и бактерий рода *Bacillus* в совместных культурах. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет за 1990-1991 гг., Боровск, 1991: 233-234.
4. Тараканов Б.В., Николичева Т.А. Использование штамма *Lactobacillus* sp. LBR 33/90 для профилактики и лечения диспепсии телят. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет за 1992-1993 гг., Боровск, 1993: 356-357.
5. Тараканов Б.В., Соколовская Г.К. Физиолого-биохимические свойства двух штаммов пропионовокислых бактерий из рубца коров. Там же: 360-361.
6. Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Подураго Н.М. Ветеринарно-токсикологическая оценка безвредности и токсичности нового биопрепарата стрептофагина для животных. Там же: 369.
7. Тараканов Б.В., Соколовская Г.К., Соловьев А.М., Боброва Т.А., Сорокин В.М., Омельченко В.Д. Приготовление малонитратных силосов с использованием микробных биоконсервантов. Там же: 372-373.

8. Тараканов Б.В. Микробиологические процессы в рубце и эффективность применения нового биопрепарата стрептофагина в кормлении лактирующих коров. Сельхоз. биология, 1993, 6: 94-105.
9. Тараканов Б.В. Регуляция микробиологических процессов в рубце жвачных животных бактериофагами *Streptococcus bovis*. Микробиология, 1994, 63, 4: 657-667.
10. Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Подураго Н.М., Манухина А.И., Фофана Н.В. Влияние длительного скормливания нового биопрепарата стрептофагина на организм кроликов. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет за 1994 г. Боровск, 1994: 164-165.
11. Тараканов Б.В. Физиолого-биохимическая характеристика антагонистических лактобацилл, выделенных из рубца телят. Сельхоз. биология, 1995, 6: 119-128.

МИКРОФЛОРА И ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У ТЕЛЯТ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ НОВОГО ПРОБИОТИКА ЛАКТОАМИЛОВОРИНА

Б.В. Тараканов, Л.В. Харитонов, Л.Н. Клабукова, Л.В. Пузач
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

Лаборатория белково-аминокислотного питания

В двух физиологических опытах на телятах-молочниках установлено, что применение нового пробиотика лактоамиловорина ингибирует размножение в пищеварительном тракте бактерий группы кишечной палочки и сальмонелл, изменяет соотношение между утилизирующими глюкозу и крахмал лактобациллами, несколько активизирует процессы пищеварения, на 34,7-42,3% увеличивает потребление животными комбикорма, стимулирует реакции неспецифического иммунитета, оказывает гипохолестеринэмическое действие и повышает прирост живой массы на 9,8-12%.

Введение

В последние годы все большее применение при выращивании молодняка животных и птицы находят микробные препараты или пробио-тики, которые содержат живые микроорганизмы-симбионты желудоч-но-кишечного тракта. Чаще всего в качестве таких препаратов используют лактобациллы, бифидобактерии или энтерококки, которые являются преобладающими в микрофлоре пищеварительного тракта молодняка (10-12).

При создании пробиотиков выбирают, как правило, лактобациллы, вырабатывающие антибиотические вещества и подавляющие рост патогенной микрофлоры. В лаборатории биотехнологии микроорганизмов получена коллекция лактобацилл, продуцирующих антагонистические вещества широкого спектра действия, среди которых перспективным представляется штамм нового вида *Lactobacillus amylovorus* БТ-24/88. Он проявляет антагонистическую активность против стафилококков, микрококков, стрептококков, бацилл, эшерихий, псевдомонад, сальмонелл и некоторых видов лактобацилл; устойчив к левомецетину, цефазолину, тетрацеклину, канамицину, рифампицину и полимиксину; не вирулентен для теплокровных животных, не обнаруживает токсических и токсигенных свойств, не способен проникать через тканевые барьеры и десеминировать во внутренних органах, то есть относится к безопасным для человека и животных микроорганизмам. На его основе приготовлен новый пробиотик лактоамиловорин, испытание которого на поросятах-сосунах и отъемышах показало, что скормливание этого

пробиотика в течение двух месяцев обеспечивает хорошее здоровье животных, ингибирует гемолитические бактерии и стимулирует микроорганизмы, гидролизующие сложные полисахариды растительных клеточных стенок в пищеварительном тракте, не оказывает отрицательного действия на гистоструктуру паренхиматозных органов и эндокринных желез, повышает неспецифическую резистентность животных, их сохранность, прирост живой массы и качество мяса.

Высокая эффективность применения лактоамиловорина в свиноводстве побудила нас выяснить его воздействие на организм телят-молочников, результаты которого и суммированы в данной статье.

Материал и методы

Проведено два опыта. Первый из них выполнен в виварии института на 3-х группах телят (по 3-4 головы в каждой), начиная с 20-25-дневного возраста. Постановочная живая масса варьировала в пределах $45,2 \pm 1,9$ кг. Животные получали по 2,5 кг цельного молока, 3,2 кг восстановленного ЗЦМ (ТУ 10-02-365-87) на голову в сутки и комбикорм-стартер вволю. Жидкие корма задавали два раза в день с интервалом 8ч. Первая группа служила контролем, а животные 2-й и 3-й групп получали с молочными кормами в утреннее кормление пробиотик лактоамиловорин в дозе 5 и 25 млрд. колоний образующих единиц (к.о.е.) на голову в день соответственно. В период с 14-го по 18-й день с начала скармливания препарата провели балансовый опыт, а на 18-й день до кормления и через 3 ч после него брали пробы содержимого рубца, кала и крови для микробиологических, биохимических и гематологических исследований.

Для изучения влияния лактоамиловорина на становление микрофлоры, процессы пищеварения и усвоение питательных веществ телятами-молочниками, в условиях вивария института проведен второй опыт на 2-х группах телят. В каждой группе было по три животных с постановочной живой массой $42,2 \pm 2,1$ кг, по два из которых имели возвратные канюли начальной части двенадцатиперстной и подвздошной кишок. В первом молочном периоде, длившемся 10 дней, животные получали по 6 кг цельного молока на голову в сутки за 2 раза. Во втором переходном периоде, продолжавшемся 20 дней, телятам скармливали по 4 кг молока на голову в сутки за 2 раза и комбикорм-стартер вволю. Первая группа была контрольной, а животным 2-й группы в утреннее кормление с молоком в оба периода задавали лактоамиловорин в дозе около 7 млрд. к.о.е.

В конце каждого периода брали пробы рубцовой жидкости с помощью пищевода зонда до утреннего кормления телят и через 3 ч после него. Кроме того, отбирали пробы химуса двенадцатиперстной и подвздошной кишок в течение 3 ч после кормления, а также пробы кала и крови для микробиологических, биохимических и гематологических исследований.

В содержимом рубца и кале учитывали бактерии группы кишечной палочки на среде Эндо, паратифозные бактерии на среде Плоскирева, а количество лактобацилл, утилизирующих глюкозу и крахмал, определяли путем подсчета колоний, выросших на модифицированной среде Rogosa с соответствующими углеводами при посеве методом "ролл-тьюб". Определение pH, концентраций аммонийного азота, ЛЖК и их молярных соотношений проведено в соответствии с методическими рекомендациями ВНИИФБиП с.-х. животных (3).

В крови гемоглобин определяли с помощью гемометра Сали (4), лейкоциты – в счетной камере Горяева, общий белок – по биуретовой

реакции (5), белковые фракции – турбидиметрическим методом (6), общий холестерин сыворотки крови – по реакции Либермана-Бурхарда в модификации Илька (7), активность лизоцима – по методу Кисель (2), бактерицидную активность сыворотки крови - по методу Смирновой и Кузьминой (1), β -лизины – по методу Бухарина, Фролова и Луды (8), фагоцитарную активность лейкоцитов крови – по Кост и Стенко (9).

Результаты и обсуждение

Исследования показали (1-й опыт), что ежедневное скармливание телятам лактоамиловорина оказало существенное влияние на микрофлору их желудочно-кишечного тракта. При этом как до кормления, так и через 3 ч после него в содержимом рубца значительно уменьшалось количество лактозоположительных и лактозоотрицательных бактерий группы кишечной палочки, а также паратифозных бактерий, которые при максимальной дозе пробиотика через 3 ч после кормления исчезали совсем (табл. 1).

Таблица 1. Количество бактерий разных групп в содержимом рубца и кале телят

Группы бактерий	Группы животных		
	основной рацион	ОР±5млрд. к.о.е. лактоамиловорина	ОР±25млрд к.о.е. лактоамиловорина
Рубец (до кормления)			
Бактерии группы кишечной палочки:			
лактозоположительные, тыс/мл	98,0±90,0	20,0±14,0	19,0±10,0
лактозоотрицательные, тыс/мл	81,0±80,0	40,0±23,0	15,0±10,0
Бактерии паратифозной группы, тыс/мл	5,5±2,5	2,7±2,0	9,0±8,0
Лактобациллы, утилизирующие:			
глюкозу, млн/мл	163,0±28,3	44,3±28,0	0,7±0,7*
крахмал, млн/мл	2,1±1,4	1,7±1,5	1,2±0,5
Рубец (через 3 ч после кормления)			
Бактерии группы кишечной палочки:			
лактозоположительные, тыс/мл	149,0±71,0	108,0±101,0	33,0±5,0
лактозоотрицательные, тыс/мл	25,0±2,5	0,7±0,3*	14,0±9,7
Бактерии паратифозной группы, тыс/мл	3,0±1,0	2,0±1,0	0
Лактобациллы, утилизирующие:			
глюкозу, млн/мл	39,5±8,5	20,0±2,0	14,3±8,3
крахмал, млн/мл	0,7±0,2	2,9±0,9	0,3±0,2
Кал			
Бактерии группы кишечной палочки:			
лактозоположительные, тыс/г	98,3±9,8	18,1±8,9*	14,3±5,2*
лактозоотрицательные, тыс/г	0,8±0,5	0,6±0,3	0,05±0,02
Бактерии паратифозной группы, тыс/г	1,3±1,0	1,8±0,9	0,2±0,1
Лактобациллы, утилизирующие:			
глюкозу, млн/г	65,0±39,0	40,7±19,3	38,5±25,5
крахмал, млн/г	14,3±3,2	26,3±19,8	31,3±21,6

Примечание: * – различия достоверны при $P < 0,001$

Аналогичная закономерность в численности этих бактерий наблюдалась и в кале телят обеих опытных групп, что свидетельствует о сильном антагонистическом действии задаваемого животным штамма

Z. amylovorus БТ-24/88 на эшерихии и сальмонеллы на всем протяжении желудочно-кишечного тракта. Следует также отметить, что это действие пробиотика не ограничивалось только потенциально патогенными бактериями, а проявлялось на лактобациллах, утилизирующих глюкозу. Их количество в содержимом рубца до кормления животных 2-й и 3-й групп уменьшилось в сравнении с контролем в 3,7 и 232,8 раза соответственно. Подобная картина в содержимом рубца наблюдалась и через 3 ч после кормления, а также в кале телят опытных групп (табл. 1). Вместе с тем, общая численность лактобацилл в кале снижалась незначительно, тогда как отношение глюкозоутилизирующих лактобацилл к крахмалутилизирующим с 4,5 в контроле снижалось до 1,55 и 1,23 у молодняка 2-й и 3-й групп соответственно. Повышение в молочнокислой флоре доли амилотических лактобацилл может свидетельствовать о колонизации кишечника штаммом *L. amylovorus* БТ-24/88 и о большей потенциальной способности получавших лактоамиловорин животных к использованию крахмалистых кормов.

Отмеченные в микрофлоре изменения не оказали существенного влияния на процессы преджелудочного пищеварения, но тем не менее дача пробиотика сопровождалась повышением в рубцовой жидкости концентрации ЛЖК, в основном за счет пропионовой кислоты, и тенденцией к снижению уровней аммонийного азота и pH (табл. 2).

Таблица 2. Показатели рубцовой жидкости телят

Показатели	Группы животных		
	1	2	3
Аммонийный азот, мг/100мл	16,2±0,8	13,8±0,7	15,0±1,3
ЛЖК, ммоль/100 мл	8,42±0,21	8,78±0,52	9,15±0,27
Молярное соотношение ЛЖК, %			
укусная	59,3±2,2	55,4±1,8	59,1±1,2
пропионовая	22,3±0,6	26,8±2,3	23,8±1,1
изомасляная	4,9	4,5	4,8
масляная	8,8±0,6	9,5±0,2	8,9±0,3
изовалериановая	1,4	1,2	0,9
валериановая	1,7	1,4	1,2
капроновая	1,6	1,2	1,3
pH	5,75±0,07	5,61±0,06	5,58±0,06

Слабая выраженность изменений, вероятно, объясняется условиями проведения опыта. Поскольку пробиотик задавали с жидкими молочными кормами, он преимущественно поступал в сычуг и, следовательно, оказывал меньшее воздействие на процессы пищеварения в рубце. На уровень метаболитов в рубцовой жидкости могло также повлиять «разбавление» комбикормом, потребление которого животными 2-й и 3-й опытных групп возрастало на 42,3 и 34,7% соответственно.

В балансовом опыте не установлено достоверных различий в переваримости сухого вещества и протеина рациона между животными разных групп. Однако отложение азота по сравнению с контролем было большим во 2-й группе на 23% и в 3-й – на 23,8%, что связано в основном с увеличением потребления комбикорма телятами этих групп (табл. 3).

Таблица 3. Баланс азота у телят

Показатели	Группы животных		
	1	2	3

Принято с кормом, г	59,40±1,20	70,65±1,23	68,75±2,02
в т.ч. с комбикормом	26,60±1,32	37,85±1,21*	35,85±2,13*
Переварилось:			
г	48,87±0,52	56,83±1,17*	57,22±1,83*
% от принятого	82,27	80,43	83,22
Отложилось в теле:			
г	27,55±0,16	33,89±1,42*	34,12±1,35*
% от принятого	46,38	47,95	49,62

Примечание: * – различия достоверны при $P < 0,05$.

Среднесуточный прирост живой массы телят разных групп за период опыта в основном соответствовал уровню отложения азота за период балансового опыта и составил 605, 678 и 664 г на животное в 1-й, 2-й и 3-й группах соответственно.

Исследования крови телят показали, что все изученные показатели не выходили за пределы физиологической нормы и, как правило, несущественно различались между группами (табл. 4). Достоверные различия наблюдались лишь в содержании холестерина, уровень которого резко снижался при скармливании животным лактоамиловорина в обеих дозах. Следовательно, использованный для приготовления пробиотика штамм *L. amylovorus* БТ-24/88 обладает выраженным гипохолестеринэмическим действием, что имеет важное значение для здоровья животных.

В лейкоцитарной формуле статистически значимых различий не выявлено, однако, проявилась тенденция к снижению количества всех форм нейтрофилов и увеличению числа лимфоцитов, моноцитов, базофилов и эозинофилов в крови у телят опытных групп. Следует также отметить тенденцию к увеличению активности лизоцима, β -лизинов и фагоцитарной активности лейкоцитов крови у молодняка, получавшего лактоамиловорин. С одной стороны, эти показатели защитной системы организма свидетельствуют о сдвиге в иммунном гомеостазе в связи с дачей пробиотика, а с другой стороны, пероральное поступление лактобацилл штамма *L. amylovorus* БТ-24/88, индуцирующих иммунные реакции, представляется биологически целесообразным и полезным.

Подобные данные получены нами и во втором опыте. В кале у животных, получавших лактоамиловорин, в молочном периоде максимальным было количество лактобацилл, утилизирующих крахмал, и лактатферментирующих бактерий, и минимальным число микробов кишечной и паратифозной группы (табл. 5). Сходная ситуация, за исключением лактатферментирующих микроорганизмов, сохранялась и в переходном периоде, что подтвердило полученные в первом опыте данные о сильном антагонистическом действии входящего в лактоамиловорин штамма *L. amylovorus* БТ-24/88 на потенциальных возбудителей кишечных инфекций.

Вместе с тем, скармливание телятам лактоамиловорина не оказало отрицательного влияния на брожение в рубце (табл. 6), но активизировало пищеварение в сычуге (табл. 7).

Таблица 4. *Морфологические и биохимические показатели крови телят*

Показатели	Группы животных		
	1	2	3
Количество гемоглобина, г/л	134,0±13,65	132,0±9,33	142,0±6,14
Количество лейкоцитов, тыс/мм ³	11,0±3,11	7,8±0,88	10,4±1,32
Лейкоформула:			
Нейтрофилы:			
юные	-	0,33±0,24	-
палочкоядерные	13,2±3,11	6,3±2,73	9,7±5,8

<i>сегментарные</i>	33,0±6,14	24,0±3,07	22,0±2,04
Лимфоциты	51,0±7,50	63,0±6,48	58,0±6,48
Моноциты	2,0±2,00	2,7±1,36	6,0±2,73
Базофилы	0,50±0,50	1,7±0,34	1,3±0,34
Эозинофилы	0,50±0,34	2,0±0,68	3,0±3,04
Общий белок сыворотки крови, г/л	61,0±2,0	62,5±1,60	61,5±0,80
в том числе:			
альбумины	29,0	28,5	29,5
α-глобулины	10,0	9,5	10,0
β-глобулины	10,0	12,0	12,5
γ-глобулины	12,0	12,5	9,5
Содержание холестерина, мг/100мл	251±22,5	151,0±3,1*	160,0±10,9
Лизоцим, ед/мл	14,39±1,70	15,15±1,36	18,18±0,68
β-лизины, %	9,69±2,01	15,66±4,43	13,97±1,53
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	28,14±8,18	35,19±3,38	24,42±2,38
Фагоцитарная активность, %	22,0±3,75	28,0±1,36	31,0±4,10

Примечание: * – различия достоверны при $P < 0,06$.

Таблица 5. Количество бактерий разных групп в кале телят, млн/г

Группы микроорганизмов	Группы животных			
	I период выращивания		II период выращивания – переходный	
	1 – контрольная, ОР	2 – опытная, ОР±лактоами- ловорин	1 – контрольная, ОР	2 – опытная, ОР±лактоами- ловорин
Лактобациллы, утилизирующие:				
глюкозу	<u>1824-1985*</u> 1904	<u>178-1514</u> 846	<u>14,6-261,6</u> 159,5	<u>113,6-264,3</u> 200
крахмал	<u>628-806</u> 717	<u>1993-3336</u> 2664	<u>10,1-165,9</u> 109	<u>81,0±131,0</u> 105
Лактатферментирующие бактерии	271±79	395±97	54,0±22,0	43,6±9,6
Бактерии группы кишечной палочки:				
лактозоположительные	<u>74,6-122</u> 98,3	<u>6,8-42,6</u> 24,7	<u>4,3-60,8</u> 27,9	<u>1,9-23,3</u> 16,0
лактозоотрицательные	<1,10 ⁴ до 2,25	<1,10 ⁴ до 0,1	<1,10 ⁴	<1,10 ⁴
Паратифозные бактерии	<u>0,9-3,2</u> 3,05	<1,10 ⁴	<u>0,2-3,4</u> 1,2	<1,10 ⁴

Примечание: * – числитель - пределы колебаний; знаменатель – среднее значение.

Таблица 6. Показатели рубцовой жидкости телят через 3 ч после кормления

Показатели	Группы животных			
	I период выращивания – молочный		II период выращивания – переходный	
	1 – контрольная, ОР	2 – опытная, ОР±лактоами- ловорин	1 – контрольная, ОР	2 – опытная, ОР±лактоами- ловорин
рН	6,60	6,62	6,40±0,15	6,55±0,10
Аммонийный азот, мг/100мл	36,47	24,17	7,34±1,12	6,54±0,61
ЛЖК, ммоль/100мл	8,35	8,41	10,2±1,1	9,3±0,7
Молярное соотношение ЛЖК, %:				
уксусная	59,7	57,6	58,1±1,2	58,4±1,4
пропионовая	28,1	24,8	26,3±1,3	27,2±0,8
изомасляная	2,7	2,8	3,9±0,4	3,2±0,2
масляная	5,6	8,2	8,3±0,1	7,3±0,7
изовалериановая	1,2	2,3	1,2	1,1
валериановая	1,5	2,0	1,2	1,3
капроновая	1,2	2,3	1,0	1,5

Таблица 7. Показатели сычужного химуса телят (средние данные за 3 ч после кормления)

Показатели	Группы животных			
	I период выращивания – молочный		II период выращивания – переходный	
	1 – контрольная ОР	2 – опытная, ОР+лактоамиловирин	1 – контрольная ОР	2 – опытная, ОР+лактоамиловирин
pH	4,10	4,06	2,63	2,47
Общий азот, мг/100 мл	280,2	255,3	288,5	248,5
Небелковый азот, мг/100 мл	156,8	147,7	141,1	128,1
% небелкового в общем азоте	56,0	57,8	49,0	51,4
Активность пепсина, Е/мл	0,82	0,89	0,88	0,97

Так, более низкий pH химуса, покидающего сычуг, у животных опытной группы в определенной степени указывает на повышенное выделение соляной кислоты сычужными железами, что обычно сопровождается повышенным уровнем секреции сока. В оба периода у телят, получавших пробиотик, наблюдалось увеличение активности пепсина в сычужном химусе. Результатом повышения секреторной деятельности сычуга явилось увеличение степени протеолиза в сычуге, о чем можно судить по возрастанию процента небелкового азота в общем азоте сычужного химуса. Вероятно, воздействие лактоамиловорина на пищеварение в сычуге телят осуществляется через микробные метаболиты со стороны рубца, сычуга и кишечника. Известно стимулирующее действие ЛЖК, особенно пропионовой кислоты, на сычужную секрецию, а также других веществ, образующихся в процессе жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Кроме того, во II периоде опыта существенно увеличивалось потребление комбикорма животными опытной группы, что увеличивало объем и поступление рубцовой жидкости в сычуг и тем самым стимулировало сычужное соковыделение.

Что касается показателей крови, то они между группами существенно не различались, но у животных, получавших лактоамиловирин, на 14,3% возростала активность лизоцима, а концентрация общего холестерина снижалась на 22,15%.

Заключение

Полученные данные однозначно свидетельствуют, что применение лактоамиловорина при выращивании телят-молочников ингибирует размножение в пищеварительном тракте бактерий группы кишечной палочки и сальмонелл, изменяет соотношение между утилизирующими глюкозу и крахмал лактобациллами в кишечнике, несколько активизирует процессы пищеварения в рубце и кишечнике, на 34,7-42,3% увеличивает потребление животными комбикорма, стимулирует реакции неспецифического иммунитета, оказывает гипохолестеринэмическое действие и повышает прирост живой массы на 9,8-12%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Емельяненко П.А. и др. Метод определения бактерицидной активности сыворотки крови. Методические указания тестирования естественной резистентности у крупного рогатого скота. М.: МВА, 1980: 60.
2. Кисель С.С. Улучшенная турбидиметрическая методика определения активности лизоцима. Здравоохранение Белоруссии, 1972, 5: 36-38.
3. Курилов Н.В., Севастьянова И.А. и др. Изучение пищеварения у жвачных. Методические указания. Боровск, 1987.
4. Определение гемоглобина гемометром Сали. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А., Приволнев Т.И. Гематология животных и рыб. М.: Колос, 1969: 62-63.
5. Определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. (Справочное пособие, Сост. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. и др.). М.: Агропромиздат, 1985: 72-73.
6. Определение белковых фракций сыворотки крови турбидиметрическим методом. Там же, 74-75.
7. Определение общего холестерина в сыворотке крови. Там же, 100-101.
8. Определение бета-лизинов по методу Бухарина О.В., Фролова Б.А., Луды А.П.. В кн.: Особенности неспецифического иммунитета у норок и песцов. Л.: Наука, 1991: 36-37.
9. Определение фагоцитарной активности клеток по Кост и Стенко. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. (Справочное пособие. Сост. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. и др.). М.: Агропромиздат: 1985: 212.
10. Платонов А.В. Производство препаратов для животноводства на основе микроорганизмов-симбионтов желудочно-кишечного тракта. М.: ВНИИСЭНТИ, 1985: 42 с.
11. Тараканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. М.: ВНИИТЭИагропром, 1987: 48.
12. Fuller R. Probiotics in a man and animals. A.review. J. Appl. Bacteriol., 1989, 66, 5:365-378.

НОВЫЕ МОБИЛИЗУЕМЫЕ ВЕКТОРЫ СЕМЕЙСТВА pLF1311 ДЛЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, НЕСУЩИЕ *nic* САЙТ RP4 С РАЗЛИЧНЫМИ ФЛАНГАМИ

В. В. Алёшин, Б. В. Тараканов

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта с.-х. животных, ВНИИФБиП, г.Боровск

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва

*Описана структура и способ конструирования новых мобилизуемых плазмидных векторов для молочнокислых бактерий, основанных на репликоне pLF1311. Все они несут участок *mob* плазмиды RP4 *IncPα* группы несовместимости с различными флангами *nic* сайта. В состав флангов входят гены *traJ* и *traK*, в других случаях фланги лишены названных генов. Получены плазмиды с взаимно противоположной ориентацией *nic*.*

Разработана универсальная экспрессионная система, обеспечивающая конститутивную транскрипцию бестерминаторных последовательностей в широком круге бактерий - реципиентов плазмид семейства pLF. Принцип основан на использовании промотора гер-оперона векторной плазмиды.

Введение

Молочнокислые бактерии (лактобациллы, лактококки, энтерококки) имеют большое практическое значение. Они являются

симбионтами человека и животных, играя важную роль в их жизнедеятельности (6), их применяют в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве, ветеринарии и медицине. Однако до настоящего времени используемые штаммы представляют собой главным образом природные изоляты. Генетическая инженерия лактококков находится на начальной стадии развития, а для лактобацилл практически не развита. Ранее мы сообщали о разработке систем векторов для клонирования генов в молочнокислых бактериях (8-10). Здесь мы сообщаем о новых членах семейства однорепликонных челночных векторов, основанных на репликоне природной плазмиды pLF1311 из *Lactobacillus fermentum* BKM 1311.

Молочнокислые относятся к числу тех бактерий, для которых не найдено эффективной методики трансформации. Для таких микроорганизмов введение ДНК при генноинженерных манипуляциях представляет серьезную проблему. Для этого используют трансформацию протопластов (с последующей их регенерацией), электротрансформацию или конъюгативную мобилизацию. В последнем случае необходимо применять так называемые мобилизуемые векторы. Именно к такому типу относятся сконструированные нами векторы для молочнокислых бактерий, о которых идет речь ниже.

По правилам безопасной работы с генноинженерными микроорганизмами, векторы, используемые вне лаборатории, например, в промышленных штаммах, не должны быть трансмиссивными. Для мобилизации таких неконъюгативных плазмид используют двухплазмидную систему (рис. 1).

Донорная клетка должна содержать одновременно две плазмиды: целевой вектор с клонированной в него цис-действующей областью начала конъюгативного переноса (*oriT*), и транс-действующую соответствующую конъюгативную плазмиду-помощник. Мы клонировали RP4-специфичную *oriT* (17, 18) в векторы, основанные на репликоне природной плазмиды pLF1311. (Нуклеотидная последовательность pLF1311 полностью известна, номер X74860 в базе EMBL; соответственно известны и последовательности производных от нее векторов). Все полученные плазмиды удалось мобилизовать из доноров *Escherichia coli*, содержащих плазмиду-помощник RP4, в клетки молочнокислых и других грамположительных бактерий (10). Не лишне отметить, что плазида-помощник RP4 не способна реплицироваться в грамположительных бактериях. По этой причине полученные описанным путем рекомбинантные штаммы не могут далее передавать векторную плазмиду, так как она не способна, в отсутствие помощника, к самостоятельной конъюгативной передаче. Следовательно, при этом сведена к минимуму опасность диссеминации рекомбинантной плазмиды в природе при широкомасштабном использовании штаммов.

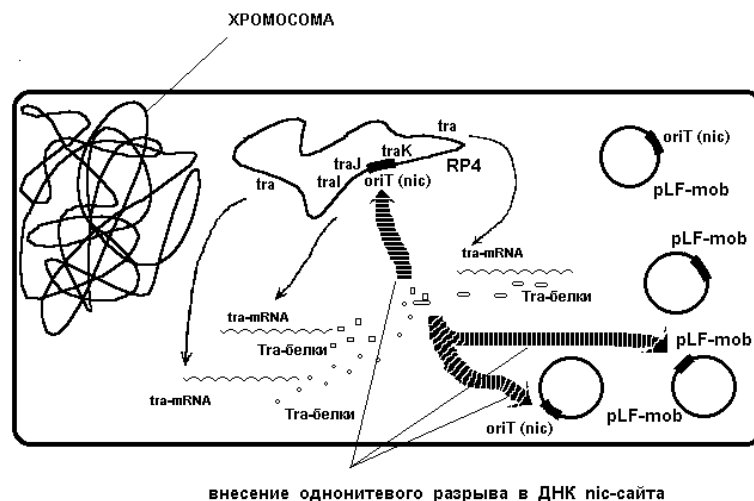


Рис. 1. Схема конъюгативной мобилизации малой плазмиды, содержащей *oriT*, из биплазмидного донора

Сконструированные нами ранее челночные векторы семейства pLF обладают рядом свойств, облегчающих манипулирование с ДНК в ходе генноинженерных экспериментов. Среди них есть векторы малого размера, несущие многочисленные уникальные сайты рестрикции, пригодные для клонирования фрагментов ДНК; векторы, позволяющие выбирать селективный маркер (хлорамфеникол или канамицин) и, соответственно, проводить селекцию рекомбинантов по признаку инсерционной инактивации; векторы, содержащие ген α -пептида *lacZ* α с полилинкером, позволяющие вести отбор рекомбинантов по цвету колоний на индикаторных чашках с X-gal (10). Они также, как было сказано выше, содержат *oriT* плазмиды RP4 и могут быть мобилизованы из клеток кишечной палочки в целевой грамположительный реципиентный штамм.

В этих векторах были успешно клонированы гены, такие как ген препрокарбокисептидазы T из *Thermoactinomyces vulgaris* 936, ген нейтральной протеиназы из *Bacillus brevis* и другие (1, 8).

Мобилизуемые векторы раннего поколения несут гены *traJ* и *traK* плазмиды RP4, продукты которых входят в состав релаксосома при конъюгативном переносе. Их дополнительная продукция с мобилизуемой плазмиды является нежелательной. Кроме того, ориентация *nic*-сайта первоначально была выбрана случайно, и может быть не оптимальна в большинстве полученных векторов. Это снижает эффективность репликации плазмиды в донорных биплазмидных штаммах кишечной палочки, содержащих плазмиду-мобилизатор, и как следствие, снижается частота мобилизационного переноса. Она вполне достаточна для введения плазмид в бациллы и молочнокислые стрептококки, но не оптимальна для опытов с лактобациллами. Таким образом, векторы раннего поколения могут быть усовершенствованы. В связи с изложенным была проведена работа по эксцизии лишних генов *traJ* и *traK* и изменению ориентации *oriT*.

Материал и методы

Плазмиды, штаммы, культивирование. Исходные векторы семейства pLF и их конструирование описаны ранее (10). Плазмиды pLF10 и pLF11 получены от А. Б. Шевелева с соавт. (ГНИИгенетика). Они представляют собой производные pLFmob76 с измененным с помощью сайтнаправленного мутагенеза геном *repB*. Произведено четыре транзиции: C $\rightarrow$ T (1421), G $\rightarrow$ A (1430), A $\rightarrow$ G (1679 и 1688) (все позиции указаны относительно последовательности pLF1311,

номер X74860 в базе EMBL). Произведенные замены удаляют сайты рестриктаз *ClaI*, *KpnI*, *BglIII* и *SacI* из гена *repB*.

Плазмиды семейства *pLF* выращивали в кишечных палочках штаммов TG1 (11), C600 или HB101 (4). В качестве донора при конъюгативной мобилизации использовали штамм C600 *recA:Tn10*, содержащий плазмиду-помощник *IncPα*-группы несовместимости – RP4 (17). Культивирование кишечных палочек, несущих производные *pLF1311*, проводили с интенсивной аэрацией при 37°C в жидкой среде LB (5) или на агаризованной LB, с добавлением хлорамфеникола до концентрации 15 мкг/мл в агаризованные среды и 4 – 8 мкг/мл в жидкие среды. Для селекции штаммов с RP4 в среды добавляли ампициллин, тетрациклин или канамицин в концентрации соответственно 50 мкг/мл, 15 мкг/мл и 40 мкг/мл.

В качестве реципиентов использовали лактобациллы *Lactobacillus acidophilus* K3, *L. fermentum* 90Tc4 и *L. plantarum* 8PA3 и молочнокислые стрептококки *Enterococcus faecalis* OG1 и *E. faecium* M74 из лабораторной коллекции. Все штаммы являются нормальными непатогенными обитателями кишечника. Энтерококки культивировали при 38°C без аэрации в жидкой среде M21 (7), лактобациллы – на среде MRS (15). В качестве твердых сред использовали агаризованную MRS, M21 или трипозный агар ("Ferak") с добавлением 1 % глюкозы и индикатора - бромкрезолового пурпурового. Для создания селективных условий в среды вносили хлорамфеникол до концентрации 10 мкг/мл.

Конъюгативная мобилизация. Для введения плазмидной ДНК в молочнокислые бактерии использовали методику конъюгативной мобилизации. Скрещивания проводили на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм (Millipor) (18, 19). Ночные культуры донора и реципиента (приблизительно 10⁹ кл/мл) смешивали в соотношении 10:1 и осаждали на стерильных фильтрах. Фильтры помещали на чашки с полноценной средой, ориентируя их вверх поверхностью, на которой находятся бактерии, и инкубировали 18-24 ч при температуре 37°C. Затем клетки смывали с фильтров 1 мл физиологического раствора NaCl и высевали на селективные среды для отбора эксконъюгантов.

Проводили как скрещивания с предварительно полученным биплазмидным донором, так и тройные скрещивания. Для тройных скрещиваний смешивали культуры трех штаммов: кишечных палочек с мобилизуемой плазмидой, кишечных палочек с плазмидой-помощником (RP4) и реципиентного штамма. Дальнейшие процедуры были аналогичны описанному выше.

Контрселекцию грамотрицательного донора в скрещиваниях осуществляли, добавляя в селективные среды полимиксин В до концентрации 100 мкг/мл.

Выделение плазмидной ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили по методу Бирнбойма и Доли (11) с той особенностью, что кишечные палочки, содержащие плазмиды семейства *pLF*, для выделения плазмид выращивали до поздней стационарной фазы (от 18 до 40 часов). Использование для выделения более ранней культуры, равно как более высокая, чем 8 мкг/мл концентрация хлорамфеникола, приводят, несмотря на высокую оптическую плотность культуры, к низкому выходу плазмидной ДНК.

Клонирование ДНК. Для манипуляций с ДНК *in vitro* использовали рестриктазы производства "MBI Fermentas" (Вильнюс), "SibEnzyme Ltd." (Новосибирск), "Бион" (Москва), ДНК-лигазу фара Т4 производства "Sileks" (Москва), нуклеазу из золотистой фасоли производства "Pharmacia P-L Biochemicals" (Швеция), другие ферменты

нуклеинового обмена, а также линкер XhoI состава d(GCTCGAGC) производства "MBI Fermentas" (Вильнюс). Клонирование осуществляли по общеизвестным методикам (4).

Результаты и обсуждение

Усовершенствованные векторы семейства pLF. Поставленные задачи по усовершенствованию векторов семейства pLF решали с помощью следующих манипуляций (рис. 2).

Рис.2. Схема конструирования новых мобилизуемых векторов семейства pLF 1311.

1) ДНК плазмиды pLF11 была подвергнута частичному гидролизу рестриктазой FokI и полному гидролизу SmaI, липкие концы, образованные FokI затуплены с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I кишечной палочки в присутствии смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, и после лигирования и трансформации отобрана искомая плазмида pLF13. Эта плазмида не содержит функционально активного гена *traJ*, от которого сохранилось только 5 начальных триплетов.

2) ДНК плазмиды pLF10 была подвергнута гидролизу рестриктазами SalI и Eco47III, липкие концы удалены с помощью нуклеазы из золотистой фасоли, и после лигирования и трансформации отобрана плазмида pLF15S, не содержащая гена *traK*.

3) Комбинацией PvuII-CfrI фрагментов 1105 п.н. плазмиды pLF13 и 1495 п.н. плазмиды pLF15S получена плазмида pLF16, не содержащая генов *traJ* и *traK*. Эта плазмида является минимальным по размеру мобилизуемым вектором.

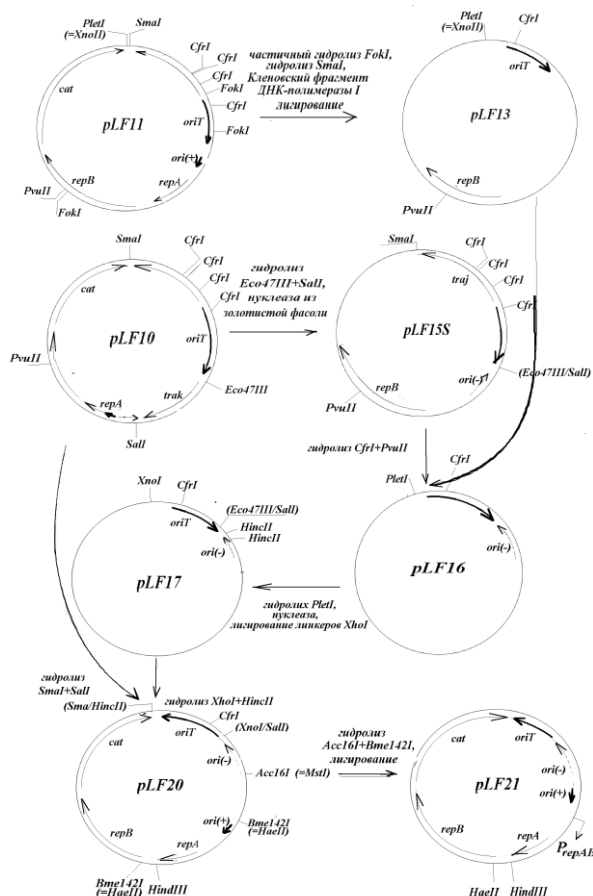
4) ДНК плазмиды pLF16 была расщеплена рестриктазой PstI (изоизомер XhoII), к образовавшимся концам, после затупления с помощью нуклеазы из золотистой фасоли, был присоединен линкер XhoI. Полученная плазмида, имеющая уникальный сайт XhoI, названа pLF17.

5) ДНК плазмиды pLF17 была расщеплена рестриктазами HincII и XhoI, и фрагмент HincII-XhoI был клонирован в плазмиду pLF10 по сайтам SmaI-SalI. Это обеспечило инверсию соответствующего фрагмента, несущего *oriT*, относительно репликативных генов. Полученная плазмида pLF20 не содержит генов *traJ* и *traK*, имеет желаемую ориентацию *oriT* и, кроме того, в ней сохранен *ori(-)* pLF1311.

6) Плазмида pLF20 имеет два сайта для рестрикции HaeII, один из которых, предположительно, будет неоднократно требоваться при последующих клонированиях. Для того, чтобы сделать этот сайт уникальным, был проведен последовательно гидролиз ДНК pLF20 рестриктазами Acc16I (изошизомер MstI) и Bme142I (тупоконечный неизошизомер HaeII). После лигирования и трансформации были отобраны колонии кишечных палочек, содержащие плазмиду с делецией необязательного для репликации фрагмента Acc16I-Bme142I. Полученная плазмида названа pLF21. Она не содержит генов *traJ* и *traK*, имеет желаемую ориентацию *oriT*, в ней сохранен *ori(-)* pLF1311 и в области межгенного транскрибируемого спейсера (между *repA* и *repB*) имеются уникальные сайты HindIII и HaeII.

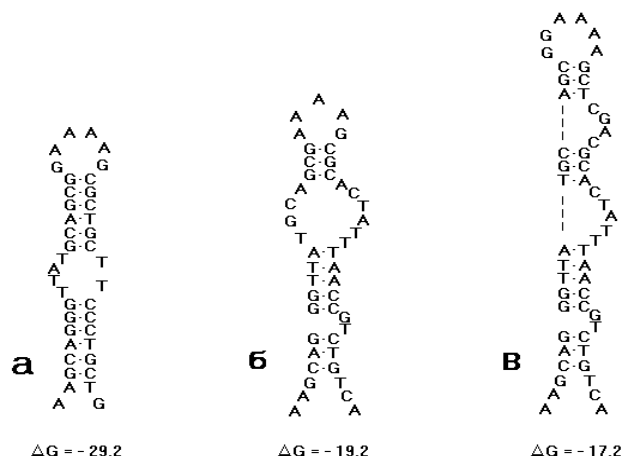
Структура tob и мобилизация полученных плазмид. Все описанные выше мобилизуемые плазмиды содержат фрагмент *tob*, границы которого находятся снаружи от минимальной области, необходимой для конъюгативного переноса (13). Однако эффективность переноса может изменяться стократно в зависимости от состава фланкирующих последовательностей (13). В природной RP4 область начала конъюгативного переноса имеет последовательность, потенциально способную к образованию нескольких элементов вторичной структуры типа "шпильки для волос" или "креста". Эти элементы вторичной структуры не обязательны для внесения сайт-

специфического однострессового разрыва (ника), инициирующего конъюгативный перенос. Тем не менее, можно предполагать, что они способствуют правильной и более эффективной сборке релаксомомы. При



конструировании pLF15S был затронут сайт Eco47III, который находится на краю области RP4, которая была картирована как минимальная область, необходимая для эффективного конъюгативного переноса (16, 20). Сайт Eco47III затрагивает крайнюю из серии шпилек, ограничивающих *nic* сайт (рис. 3, а). Мы, однако, предусмотрели возможность формирования гибридной шпильки, одна ветвь которой образована ДНК, происходящей из RP4, а другая ветвь – ДНК из

pLF1311 (рис. 3, б). Свободная энергия образования шпильки, состоящей из гибридной последовательности, вычисленная с помощью программы PCFOLD по алгоритму М. Зукера (14, 21), составляет -19,2



ккал/моль против -29,2 ккал/моль природной шпильки в RP4, то есть остается достаточной для осуществления этого процесса. Двухцепочечные стебли и однонитевые петли гибридной и природной шпилек близки по размеру и последовательностям. Можно заметить, что небольшие отличия от описанных условий конструирования привели бы к более сильным различиям в потенциальной вторичной структуре этого участка. Например, затупление выступающих концов сайта SalI достраиванием цепи с помощью фрагмента Клёнова ДНК полимеразы I (вместо удаления их нуклеазой, использованной при конструировании pLF15S) привело бы к образованию последовательности, вторичная структура которой сильнее бы отличалась от природной и выигрыш в свободной энергии при ее формировании был бы меньше (-17,2 ккал/моль) (рис. 3, в).

Рис. 3. Вероятная вторичная структура ДНК в области границы *oriT* плазмиды RP4.

а - вероятная структура “шпильки” в ДНК природной плазмиды RP4; б - вероятная структура гибридной “шпильки”, одна ветвь которой образована ДНК плазмиды RP4 (ограничена сайтом *Eco47III*), а другая - ДНК плазмиды pLF, ограниченная сайтом *SalI*, где липкие концы удалены нуклеазой из золотистой фасоли; в - вероятная структура гибридной “шпильки”, одна ветвь которой образована ДНК плазмиды RP4 (ограничена сайтом *Eco47III*), а другая - ДНК плазмиды pLF, ограниченная сайтом *SalI*, где липкие концы заполнены Клёновским фрагментом ДНК-полимеразы I; приведены расчетные значения разницы свободной энергии образования “шпилек”.

Реально было установлено, что новые векторы pLF16, pLF20, pLF21 эффективно мобилизуются плазмидой-помощником RP4 в грамположительные реципиенты с частотами, близкими к установленным ранее для других мобилизуемых производных pLF1311 (10).

Разработка системы экспрессии для грамположительных бактерий. Репликация плазмид семейства pLF1311 требует присутствия в клетке продукта гена *repB* (2). Следовательно, во всех штаммах, где они реплицируются, происходит экспрессия плазмидного гена *repB*. Мы предполагаем использовать эту особенность для экспрессии целевых генов в тех случаях, когда не требуется получать особенно высокую продукцию, например, для генов регуляторных белков или генов устойчивости к лекарственным средствам.

Транскрипция гена *repB* осуществляется с промотора, общего с геном *repA*. Любая последовательность, встроенная между промотором и структурной областью *repB*, должна транскрибироваться. Условием существования (репликации) такой конструкции является отсутствие сильного полярного эффекта встроенной последовательности на ген

repB, в частности, она не должна содержать сигналов терминации транскрипции, чтобы не нарушить синтез белка RepB.

Экспрессионными векторами, приспособленными для этих целей, являются плазмиды pLF20 и pLF21. В спейсерной области между генами *repA* и *repB* вектора pLF20 расположен уникальный сайт рестриктазы HindIII, а вектора pLF21 - уникальные сайты HindIII и HaeII.

В специальной работе мы сообщаем о клонировании на векторе pLF21 синтетической последовательности пептидного гормона позвоночных – соматолиберина (рилизинг-фактора гормона роста) (3).

Заключение

Сконструированы новые мобилизуемые плазмидные векторы для молочнокислых бактерий, основанные на репликоне pLF1311. Все они несут участок *mob* плазмиды RP4 IncP α группы несовместимости с различными флангами *nis* сайта. В состав флангов входят гены *traJ* и *traK*, в других случаях фланги лишены названных генов. Получены плазмиды с взаимно противоположной ориентацией *nis*. Проверена их способность к мобилизации в грамположительные бактерии из донора – кишечной палочки, содержащей вектор и плазмиду-помощник, и в условиях тройных скрещиваний.

Разработана оригинальная стратегия транскрипции клонированных бестерминаторных (без собственного терминатора транскрипции) последовательностей в широком круге грамположительных бактерий, поддерживающих репликон pLF1311. Она состоит в клонировании целевых последовательностей внутрь гер-оперона. Сконструированы новые векторы, поддерживающие клонирование в соответствии с указанной стратегией. В частности, челночный мобилизуемый однорепликонный вектор pLF21 позволяет клонировать бестерминаторные последовательности по уникальным сайтам HindIII и HaeII и введение этих последовательностей в широкий круг грамположительных бактерий, включая лактобациллы и молочнокислые стрептококки с последующей их транскрипцией в молочнокислом реципиенте.

Авторы выражают благодарность В. А. Лившицу, любезно предоставившему материальную базу для проведения этой работы, а также Е. В. Семенову, сообщившей неопубликованные сведения о мобилизации описываемых здесь плазмид и некоторых фенотипических особенностях несущих их штаммов. Работа была поддержана Фондом фундаментальных исследований РАН, грант 96-04-49239.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аваков А.С. и др. Клонирование и экспрессия в *Bacillus subtilis* гена нейтральной протеазы *Bacillus brevis*. Молекулярная биология, 1990, 24, 1001-1009.
2. Алёшин В. В., Дорошенко В. Г., Тараканов Б. В. 3'-конец гена *repB* лактобациллярной плазмиды pLF1311 удлинился вследствие утраты стоп-кодона гена-предшественника. Молекулярная биология. 1998:32 (в печати).
3. Алёшин В. В., Семёнова Е. В., Тараканов Б. В., Карпушина С. Г., Лившиц В. А. Клонирование гена соматолиберина в молочнокислых бактериях и его экспрессия с промотора репликативных генов вектора, (в печати).
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике, М., Мир, 1976.

6. Пивняк И. Г., Тараканов Б. В. Микробиология пищеварения жвачных. - М.: Колос, 1982: 247с.
7. Румер Л.М. Изучение процессов генетического обмена у молочнокислых стрептококков. Дисс. ... канд. биол. наук, Москва, 1993.
8. Семёнова Е. В. Мобилизуемые векторы для лактобацилл и других грамположительных бактерий. Дисс. ... канд. биол. наук. Москва, 1994.
9. Семёнова Е. В., Тараканов Б. В., Лившиц В. А. Мобилизуемые векторы для лактобацилл и других грамположительных бактерий на основе плазмиды pCB20. В кн.: Генноинженерные сельскохозяйственные животные. Сб. научных трудов. М., 1995, 1:387 - 394.
10. Тараканов Б. В., Алёшин В. В., Дорошенко В. Г., Семенова Е. В., Лившиц В. А. Конструирование мобилизуемых векторов для молочнокислых бактерий. В кн.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Материалы II Международной конференции 5 - 8 сентября 1995. г. Боровск: 1997: 289 - 297.
11. Birnboim, H. C., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 1979, 7, 1513.
12. Gibson, T. The structural organization of Epstein-Barr virus. Ph. D. Thesis, Cambridge, 1984.
13. Guiney D.G., Jakobson E. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3595-3598.
14. Jacobson A.B., Good L., Simonetti J., Zuker M. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12:45-52.
15. Man J.C., de Rogosa, M. and Sharp, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 1960, 23:130-135.
16. Pansegrau W., Ziegelin G., Lanka E. The origin of conjugative IncP plasmid transfer: Interaction with plasmid-encoded products and the nucleotide sequence at the relaxation site. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988, 951:365-374.
17. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon. *Mol. Gen. Genet.*, 1984, 196:413-420.
18. Trieu-Cuot P., Carlier C., Martin P., Courvalin P. Plasmid transfer by conjugation from E. coli to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 48:289-294.
19. Trieu-Cuot P., Carlier C., Poyart-Salmeron C., Courvalin P. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *lacZ* gene for conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Gram-positive bacteria. *Gene*, 1991, 102:99-104.
20. Ziegelin G., Pansegrau W., Strack B., Balzer D., Kroeger M., Kruft V., Lanka E. Nucleotide sequence and organization of genes flanking the transfer origin of promiscuous plasmid RP4. *DNA Seq.*, 1991, 1: 303-327.
21. Zuker M., Stiegler P. *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9: 133-148.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА СОМАТОЛИБЕРИНА В МОЛОЧНО- КИСЛЫХ БАКТЕРИЯХ И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ С ПРОМОТОРА РЕПЛИКАТИВНЫХ ГЕНОВ ВЕКТОРА

*В.В. Алёшин, Е.В. Семёнова, Б.В. Тараканов,
С.Г. Карпушина, В.А. Лившиц*

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного
тракта с.-х. животных, ВНИИФБиП, г. Боровск

Государственный научно-исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва

*Синтетическая последовательность гена соматолиберина
(рилизинг-фактора гормона роста) клонирована на челночном
плазмидном векторе pLF21 в молочнокислых бактериях, а также в
кишечных палочках под промоторами лактозного оперона и*

бактериофага T7. Оригинальная конструкция, объединяющая репликативные гены вектора pLF21 с клонированной последовательностью соматолиберина, обеспечивает конститутивную транскрипцию гена соматолиберина во всех штаммах, поддерживающих репликацию вектора. Инициаторному кодону гена соматолиберина предшествует сигнал начала трансляции бактериальных мРНК (SD), который предполагает трансляцию целевой последовательности. Репликация плазмиды в *Enterococcus faecalis* OG1, *E. faecium* M74, *Lactobacillus acidophilus* K3, *L. fermentum* 90Tc4, *L. plantarum* 8PA3 и кишечных палочках свидетельствует о сквозной транскрипции последовательностей *gerA* + ген соматолиберин + *gerB* мРНК с репликативного промотора вектора. Все перечисленные штаммы грамположительных бактерий являются нормальными непатогенными обитателями кишечника, причем природный штамм *E. faecium* M74 входит в состав пробиотика «Энтерацид ПЭ», а исходные штаммы *L. fermentum* 90Tc4 и *L. plantarum* 8PA3 входят в состав препарата «Лактобактерин».

Введение

Молочнокислые бактерии имеют большое практическое значение. Издавна живые культуры молочнокислых бактерий используют как закваски. Кроме того, многие молочнокислые (лактобациллы, энтерококки) являются симбионтами человека и животных, играя важную роль в их жизнедеятельности (7). Избранные природные изоляты этих видов входят в состав пробиотиков – ветеринарных и медицинских препаратов, содержащих живые микроорганизмы. Пробиотики оказывают лечебно-профилактическое, иммуностимулирующее действие, особенно эффективное на молодняке. Однако до настоящего времени используемые штаммы представляют собой главным образом природные изоляты. Генетическая инженерия – мощное средство создания штаммов микроорганизмов с заданными свойствами – для молочнокислых бактерий развита недостаточно. Между тем использование в пробиотиках или заквасках штаммов – продуцентов полезных веществ (аминокислот, витаминов, гормонов) могло бы иметь немалое экономическое значение. Также и для выделения некоторых веществ микробного синтеза, используемых в медицине, предпочтительнее использовать молочнокислые вместо кишечных палочек. Хотя затраты на ферментацию в этом случае могут обходиться дороже, безвредность молочнокислых делает такие продуценты предпочтительнее.

Ранее мы сообщали о разработке систем векторов для клонирования генов в молочнокислых бактериях (9-11). Молочнокислые относятся к числу бактерий, для которых не найдено эффективной методики трансформации. Для введения ДНК в их клетки мы применяли специальные векторы, несущие фрагмент *oriT* плазмиды RP4, способные к конъюгативной мобилизации плазмидой-помощником (20, 21). Нами разработано семейство мобилизуемых векторов различного назначения, основанных на репликоне природной плазмиды pLF1311 из *Lactobacillus fermentum* BKM 1311. Здесь мы сообщаем об использовании нового экспрессионного вектора pLF21 (3) для клонирования и экспрессии в клетках бактерий – лактобацилл и энтерококков, синтетической последовательности пептидного гормона позвоночных – соматолиберина (рилизинг-фактора гормона роста).

Материал и методы

Штаммы и культивирование. Используемые в работе плазмиды выращивали в кишечных палочках штаммов TG1 (17), C600 или HB101 (4). В качестве донора при конъюгативной мобилизации использовали

штамм C600 *recA::Tn10*, содержащий плазмиду-помощник IncP α -группы несовместимости – RP4 (20, 21). Культивирование кишечных палочек, несущих производные pLF1311, проводили с интенсивной аэрацией при 37°C в жидкой среде LB (6) или на агаризованной LB, с добавлением хлорамфеникола до концентрации 15 мкг/мл в агаризованные среды и не более 8 мкг/мл в жидкие среды.

В качестве реципиентов были использованы лактобациллы *Lactobacillus acidophilus* K3, *L. fermentum* 90Tc4 и *L. plantarum* 8PA3 и молочнокислые стрептококки *Enterococcus faecalis* OG1 и *E. faecium* M74 из лабораторной коллекции. Все штаммы являются нормальными непатогенными обитателями кишечника. Штамм *E. faecium* M74 входит в состав ныне используемого пробиотика "Энтерацид П" (4), а штаммы *L. fermentum* 90Tc4 и *L. plantarum* 8PA3 входят в состав препарата "Лактобактерин". Энтерококки культивировали при 37°C без аэрации в жидкой среде M21 (8), лактобациллы - на среде MRS (18). В качестве твердых сред использовали агаризованную MRS, M21 или триптозный агар с добавлением 1% глюкозы и индикатора - бромкрезолового пурпурового. Для создания селективных условий в среды вносили хлорамфеникол до концентрации 10 мкг/мл.

Плазмиды. Векторы семейства pLF и их конструирование описаны ранее (3, 9, 11). В качестве плазмиды-помощника при конъюгативной мобилизации использовали RP4 из IncP α -группы несовместимости. Для создания рекомбинантных плазмид с геном соматолиберина использовали плазмиду pMTGRF1, содержащую синтетическую последовательность гена, сконструированную Г. Брэмом с соавторами (16). Вектор pBluescriptKS(+) получен от фирмы Stratagene (США).

Выделение плазмидной ДНК проводили по методу Бирнбойма и Доли (15) с той особенностью, что кишечные палочки, содержащие плазмиды семейства pLF, для выделения плазмид выращивали до поздней стационарной фазы (не менее 20 часов). Введение плазмидной ДНК в кишечные палочки осуществляли по методу трансформации с хлористым кальцием (14).

Для введения плазмидной ДНК в молочнокислые бактерии использовали методику конъюгативной мобилизации. Скрещивания проводили на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм (Millipor) (21, 22). Ночные культуры донора и реципиента (приблизительно 10⁹ кл/мл) смешивали в соотношении 10:1 и осаждали на стерильных фильтрах. Фильтры помещали на чашки с полноценной средой, ориентируя их вверх поверхностью, на которой находятся бактерии, и инкубировали 18-24 ч при температуре 37°C. Затем клетки смывали с фильтров 1 мл физиологического раствора NaCl и высевали на селективные среды для отбора эксконъюгантов.

Проводили как скрещивания с предварительно полученным биплазмидным донором, так и тройные скрещивания. Для тройных скрещиваний смешивали культуры трех штаммов: кишечных палочек с мобилизуемой плазмидой, кишечных палочек с плазмидой-помощником (RP4) и реципиентного штамма. Дальнейшие процедуры были аналогичны описанным выше.

Контрселекцию грамотрицательного донора в скрещиваниях осуществляли, добавляя в селективные среды полимиксин В до концентрации 100 мкг/мл.

Электротрансформация. В качестве альтернативного способа введения плазмидной ДНК в грамположительные бактерии был использован метод электротрансформации. Первоначально проводили оптимизацию условий, варьируя продолжительность, форму электрического импульса, способ подготовки компетентных клеток

(12). Электротрансформацию осуществляли на приборе, разработанном М. В. Тюриным (13).

Оптимизированная методика состояла из двух этапов. На первом этапе клетки готовили к электропорации. Для этого одну колонию свежей агаровой культуры вносили в 10 мл свежеприготовленной среды M21 и инкубировали 18 ч при 37°C. 1/200 ночной культуры вносили в 10 мл свежей среды M21 и инкубировали 16 ч при 37°C. 10 мл такой культуры вносили в 200 мл среды M21 и подращивали до $OD_{600} = 0,8$. Охлаждали во льду, центрифугировали (4000 g; 30 мин; 0°C). Осадок ресуспендировали в равном объеме холодного (0°C) раствора следующего состава: 0,25 М сахарозы, 0,001 М $MgCl_2$, 0,001 М HEPES, pH 7,2. Центрифугировали на холоду, осадок снова обрабатывали как описано выше. Затем вновь центрифугировали и осадок ресуспендировали в 1/100 начального объема раствора состава: 0,075 М сахарозы, 10% объема глицерина, 0,007 М HEPES (pH 7,4), 0,001 М $MgCl_2$. Микробную суспензию распределяли аликвотами по 550 мкл в стерильные пробирки Eppendorf, выдерживали в ледяной бане 10 мин и замораживали при -70°C.

Второй этап электротрансформации проводили следующим образом. Одну пробирку переносили из кельвинатора в ледяную баню. Оттаявшие клетки распределяли в охлажденные кюветы по 50 мкл и помещали в ледяную баню. Вносили препарат ДНК pLF-SL2 до конечной концентрации 0,1 мкг на 50 мкл клеточной суспензии, перемешивали с клетками встряхиванием. Электроды погружали в пробирку, находящуюся в ледяной бане. Прикладывали к электродам одиночный прямоугольный импульс положительной полярности длительностью 2,6 мс и напряженностью электрического поля 17 кВ/см. Немедленно после приложения импульса образец разводили охлажденной культуральной средой и выдерживали в ледяной бане 10 мин, затем 1 ч при 37 °C. После этого готовили десятикратные разведения клеточной суспензии, которые высевали на неселективную и селективную среды.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Ген соматолиберина из плазмиды pMTGRF1 извлекли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификационные олигонуклеотидные затравки (праймеры) имели следующую первичную структуру: MI: 5'-GAAGGATAAATTTATGTACGCTGACGCTATCT-3' (праймер к 5'-концу гена); MII: 5'-TCCATATTGGTCGACATTA-3' (праймер к 3'-концу гена). 32-нуклеотидный праймер содержал последовательности, необходимые для трансляции гена в системе прокариотической клетки. Амплификацию осуществляли в следующем режиме: 93°C - 1 мин, 50°C - 1 мин, 72°C - 2 мин, всего 25 циклов на автоматическом термоциклере Techne-3 (Англия) с использованием набора "Амплификация" с Taq-полимеразой производства "Силекс" (Москва); рабочая концентрация $MgCl_2$ - 1 mM. По окончании процесса образцы экстрагировали хлораформом для удаления масла и наносили на агарозный гель для электрофореза. Для электрофореза использовали 4% агарозу тип VII (Sigma, США).

Клонирование ДНК. Клонирование осуществляли по общеизвестным методикам (5). Для клонирования продуктов ПЦР их предварительно подвергали очистке в агарозном геле, затуплению концов с помощью Клёновского фрагмента ДНК-полимеразы I E. coli и фосфорилированию с помощью полинуклеотидкиназы бактериофага T4. Трансформанты кишечных палочек TG1, содержащие клонированный ген соматолиберина, тестировали на индикаторных чашках LB, содержащих антибиотик ампициллин в концентрации 100

мкг/мл, индуктор лактозного оперона изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ) в концентрации 30 мкг/мл и хромогенный субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-gal) в концентрации 50 мкг/мл.

Результаты и обсуждение

Клонирование гена соматолиберина в кишечных палочках. В качестве ДНК, кодирующей пептидный гипоталамический гормон соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропного гормона), использовали синтетическую последовательность, включенную в плазмиду pMTGRF1 (16). Данная последовательность находится под контролем эукариотического промотора гена металлотионеина мыши и непосредственно не может быть использована для экспрессии в клетках бактерий. Для последнего необходимо наличие как минимум двух регуляторных элементов: бактериального промотора для транскрипции и последовательности для связывания рибосом на мРНК.

Соединение синтетической ДНК с ДНК металлотионеинового промотора в плазмиде pMTGRF1 осуществлено после затупления концов, образованных рестриктазами BglII и EcoRI. Соответственно, произошло уничтожение сайтов этих рестриктаз. В последовательности отсутствуют сайты узнавания каких-либо рестриктаз, которые позволили бы произвести точную эксцизию структурной части гена рилизинг-фактора в области 5'-конца.

Задачи получения структурной части гена и соединения ее с регуляторной последовательностью SD (для последующего связывания соответствующей мРНК с бактериальной рибосомой), решали методом амплификации фрагмента ДНК в системе *in vitro* под контролем термостабильной ДНК-полимеразы Taq (полимеразная цепная реакция, ПЦР). Выбранный олигонуклеотидный праймер для ПЦР к 5'-концу гена (М1) состоял из 32 нуклеотидных остатков, из которых 19, составляющих 3'-конец олигонуклеотида – комплементарны последовательности pMTGRF1, а 5'-концевой сегмент содержит последовательность 5'-GAAGGA...3', соответствующую консенсусу SD бактериальных генов (19), и канонический спейсерный участок между SD и инициаторным кодоном ATG, обогащенный остатками аденозина и тимидина (1). Для облегчения возможных последующих генноинженерных манипуляций в спейсерную последовательность между SD и инициаторным кодоном введена последовательность узнавания рестриктазы AroI.

ПЦР приводила к накоплению в реакционной смеси продукта – фрагмента ДНК с размером, близким к расчетному (162 пары нуклеотидов), который был идентифицирован как структурная часть гена соматолиберина, и который лигировали с вектором pBluescriptKS(+), гидролизованным по сайту EcoRV. Рекомбинанты отбирали на индикаторных чашках с добавлением ампициллина, ИПТГ и X-gal.

Среди проанализированных клонов были найдены искомые рекомбинанты, содержащие ген соматолиберина под управлением лактозного промотора, а также клонированный в этой же ориентации димер, представляющий собой прямой tandemный повтор по типу "голова к хвосту". В полученных конструкциях ген соматолиберина находится также под промотором бактериофага T3. Полученные конструкции названы pSLD1 и pSLD2 (рис. 1).

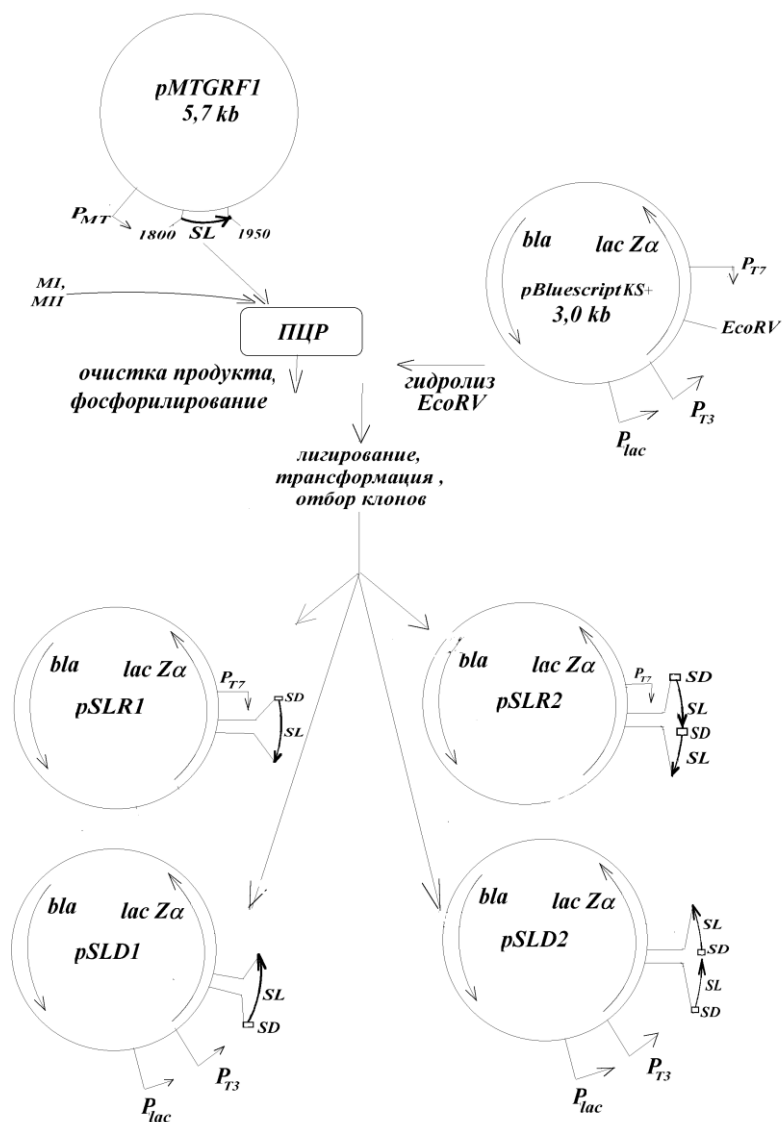


Рис. 1. Конструирование плазмид, обеспечивающих экспрессию гена соматолиберина в клетках кишечных палочек.

Обозначения: ПЦР - полимеразная цепная реакция; SD - участок Шайн-Дальгарно рибосомсвязывающей области; SL - синтетическая последовательность гена соматолиберина; MI, MII - амплификационные праймеры (праймер MII несёт участок SD); P_{MT} - промотор металлотионеинового гена мыши; P_{T7} - промотор бактериофага T7; P_{T3} - промотор бактериофага T3; P_{lac} - промотор β-галактозидазы кишечной палочки.

Отобраны также конструкции с геном соматолиберина, ориентированным против лактозного промотора (pSLR1 и pSLR2). В этих плазмидах ген соматолиберина находится под промотором бактериофага T7.

Экспрессия соматолиберина в кишечных палочках. По условиям конструирования последовательность соматолиберина в полученных клонах снабжена регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и трансляцию в бактериальной клетке. Светло-голубая окраска на среде с X-gal рекомбинантных колоний, содержащих плазмиды pSLD1 и pSLD2, свидетельствует о сквозной транскрипции соматолиберин + lacZα мРНК с бактериального лактозного промотора кишечной палочки и о том, что экспрессия соматолиберина может быть индуцирована ИПТГ. В полученных

конструкциях ген соматолиберина находится также под промотором бактериофага Т3 и может быть экспрессирован в системах *in vitro* или *in vivo* в различных модификациях.

Плазмиды pSLR1 и pSLR2, в которых ген соматолиберина находится под промотором бактериофага Т7, еще более удобны для экспрессии гормона. В настоящее время разработаны многочисленные системы экспрессии генов под управлением промотора РНК-полимеразы Т7 в системах, как предусматривающих заражение кишечных палочек бактериофагом в конце ферментации, так и использование специальных штаммов, содержащих клонированный под регулируемым промотором ген РНК-полимеразы Т7. Целевой продукт в таких системах может составлять до 50 % общего клеточного белка.

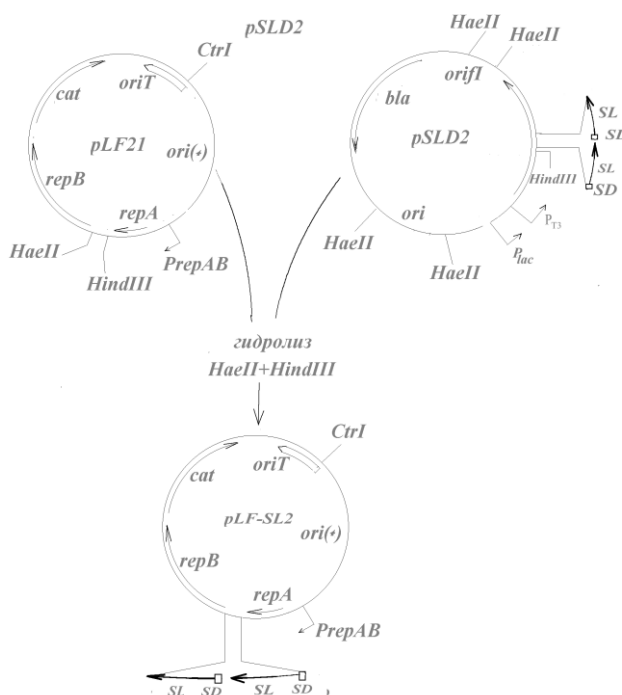
Экспрессия соматолиберина в системе грамположительных бактерий. Нами разработана универсальная экспрессионная система, обеспечивающая конститутивную транскрипцию бестерминаторных последовательностей в широком круге бактерий – реципиентов плазмид семейства pLF, в том числе молочнокислых и других грамположительных. Принцип состоит в использовании гер-оперона, транскрибируемого в любом реципиенте pLF (2). В спейсерной области между генами герА и герВ расположены сайты рестриктаз HindIII и HaeII, и любая последовательность, клонированная в эти сайты, будет транскрибироваться, если клонирование не нарушит репликацию плазмиды. Экспрессионными векторами, приспособленными для этих целей, являются плазмиды pLF20 и pLF21 (3).

Клонирование гена соматолиберина в молочнокислых бактериях. Последовательности соматолиберина в составе плазмид pSLD1 и pSLD2 не содержат терминаторов транскрипции, также как и фрагмент *lacZα*. Причем асимметричное расположение сайтов HindIII и HaeII в pSLD2 обеспечивает клонирование целевого фрагмента в требуемой ориентации. Для решения этой задачи ДНК вектора pLF21 и плазмиды pSLD2 гидролизовали последовательно рестриктазами HaeII и HindIII, лигировали полученные фрагменты и трансформировали кишечные палочки. Отбор рекомбинантов осуществляли на селективных чашках с хлорамфениколом. Анализ полученных трансформатов позволил отобрать целевую конструкцию – плазмиду pLF-SL2 (рис. 2).

Рис. 2. Конструирование плазмиды pLF-SL2, обеспечивающей экспрессию гена соматолиберина в клетках молочнокислых бактерий.

Обозначения: *cat* - ген ацетилхлорамфениколтрансферазы; *oriT* -- область начала конъюгативного переноса, происходящая из плазмиды RP4; *repA* и *repB* - репликативные гены векторной плазмиды; P_{repAB} -- единый промотор репликативных генов векторной плазмиды; P_{T3} - промотор бактериофага T3; P_{lac} - промотор β -галактозидазы кишечной палочки; SD - участок Шайн-Дальгарно рибосомсвязывающей области; SL - синтетическая последовательность гена соматолиберина.

Она содержит двойную дозу гена соматолиберина, и перед каждой из дублированных кодирующих областей имеется бактериальный сигнал трансляции. Транскрипция клонированных генов соматолиберина происходит с универсального репликативного промотора, она конститутивная и регулируется в основном через копийность плазмиды в клетке.



Нами сделано также наблюдение, что при длительном хранении (более недели) штамма TG1 (pLF-SL2) на индикаторных чашках, содержащих хлорамфеникол и X-gal, развивается светло-голубая окраска колоний. Развитие окраски не зависит от присутствия индуктора лактозного оперона ИПТГ. Следовательно, происходит постулированная транскрипция соматолиберин + *lacZ α* мРНК с промотора репликативных генов плазмиды *repA* и *repB* и трансляция α -пептида.

Особенность рекомбинантной плазмиды pLF-SL2 состоит в том, что ее векторная часть содержит в своем составе область начала конъюгационного переноса (*oriT*) RP4 – плазмиды IncP α -группы несовместимости. Нуклеотидная последовательность *oriT* – это cis-действующий генетический фактор, который в присутствии транс-действующих продуктов *tra*-генов конъюгативной плазмиды-

помощника, содержащейся в донорной клетке, обеспечивает конъюгативную мобилизацию данной плазмиды.

Для скрещивания аликвоты ночных культур донора – кишечной палочки C600 (pLF-SL2, RP4) или HB101 (pLF-SL2, RP4) и реципиента смешивали в соотношении 10:1 и осаждали на стерильных нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм (Millipor) (21, 22). В качестве реципиентов использовали *Lactobacillus acidophilus* K3, *L. fermentum* 90Tc4, *L. plantarum* 8PA3 и *Enterococcus faecium* M74. Фильтры с клетками помещали на чашки с полноценной средой и инкубировали 18-24 ч при температуре 37°C. Затем клетки смывали с фильтров 1 мл физиологического раствора NaCl и высевали на селективные среды, содержащие хлорамфеникол и полимиксин В для отбора эксконъюгантов. Проводили также и тройные скрещивания TG1 (pLF-SL2) x C600 (RP4) x реципиентный штамм.

Для анализа эксконъюгантов на наличие ДНК pLF-SL2 выросшие колонии рассеивали секторами на селективной среде и полученные колонии использовали для выделения ДНК. Выделенную ДНК обрабатывали ферментами рестрикции и анализировали образующиеся фрагменты с помощью электрофореза в агарозном геле.

В результате были отобраны колонии рекомбинантных лактобацилл и молочнокислых стрептококков. Во всех случаях, кроме *L. acidophilus*, выделенная из реципиента плазида не отличалась от исходной pLF-SL2.

В случае *L. acidophilus* выделенная плазида имела меньший размер. Так как в pLF-SL2 имеется tandemная дупликация последовательности гена соматолиберина, такой повтор может проявлять структурную нестабильность, вследствие рекомбинации по участкам гомологии. Такая рекомбинация должна приводить к эксцизии элемента повтора из плазмиды с сохранением в ее составе только одной из двух копий гена соматолиберина. Рестрикционное картирование показало, что это предположение соответствует действительности, и в клетках *L. acidophilus* рекомбинантная плазида несет одну копию гена соматолиберина.

Для получения рекомбинантных энтерококков *E. faecalis* OG1 использовали методику электротрансформации. В результате были отобраны колонии рекомбинантных молочнокислых стрептококков *E. faecalis* OG1. Репликация в полученных рекомбинантных штаммах плазмиды pLF-SL2 свидетельствует о сквозной транскрипции соматолиберин + *repB* мРНК с репликативного промотора вектора.

Гены пептидных гормонов - кандидаты для экспрессии в бактериях. Одним из направлений в промышленной микробиологии является создание пробиотиков. Пробиотики представляют собой препараты, которые содержат живые микроорганизмы, способные развиваться в желудочно-кишечном тракте животных в качестве компонента нормальной микрофлоры. Применение пробиотиков позволяет ускорить рост молодняка и уменьшить его отход, способствует лечению и профилактике кишечных инфекций. По эффективности действия пробиотики не уступают некоторым антибиотикам и химиотерапевтическим средствам, но они не оказывают побочного действия на микрофлору пищеварительного тракта, не загрязняют продукты животноводства и окружающую среду, то есть являются экологически чистыми.

Другим перспективным направлением современного животноводства считается получение трансгенных животных. Трансгенные линии сельскохозяйственных животных, несущие ген гормона роста или ген соматолиберина (рилизинга гормона роста), могли бы отличаться повышенной скоростью роста без добавления к

корму каких-либо ростовых факторов, включая кортикостероиды. Это повысило бы эффективность и экологическую безопасность интенсивного животноводства. К сожалению, при трансформации яйцеклеток целевой ДНК трудно обеспечить ее интеграцию в определенное место хромосомы, в результате ДНК интегрируется в случайные места, приводя к нарушению резидентных генов или попадая в гетерохроматиновые области, отличающиеся недостаточным уровнем транскрипции. В результате большинство особей трансгенных животных либо не поддерживает необходимый уровень экспрессии целевого гена, либо положительные эффекты его экспрессии нивелируются отрицательными, вызванными мутагенезом.

К настоящему времени не реализованы возможности, которые сочетали бы в себе два названных подхода, то есть состояли бы в получении пробиотических штаммов, продуцирующих биологически активные вещества, в частности, гормоны. Причем наибольший интерес представляют пептидные гормоны, эффективные в малых дозах и не накапливающиеся в органах и тканях животного, а также во внешней среде, следовательно, экологически безвредные. Предпринятое нами клонирование гена соматолиберина в пробиотических штаммах молочнокислых бактерий есть такая попытка, сочетающая два описанных подхода.

Конечно, физиологический эффект от рекомбинантных бактерий, населяющих кишечный тракт, будет зависеть от множества факторов, в том числе от уровня транскрипции клонированных генов, эффективности трансляции чужеродной мРНК, устойчивости белка к бактериальным внутриклеточным протеазам, способа выхода молекул белка из клеток бактерий (путем секреции или в результате лизиса клеток), устойчивости белка в кишечном содержимом и эффективности его транспорта из кишечника. Для таких гормонов как соматолиберин, мишень действия которого – гипофиз топографически находится далеко от кишечника, немаловажными дополнительными факторами могут оказаться сохранность пептидных молекул в кровяном русле и преодоление ими гематоэнцефалического барьера.

В настоящее время мы не можем точно оценить влияние перечисленных факторов в системе пробиотический штамм – макроорганизм. Некоторые из перечисленных проблем могут не иметь большого значения, например, транспорт негидролизированных пептидов и небольших белков из кишечника показан для молодняка сельскохозяйственных животных. Секреция целевых пептидов бактериями, адгезированными непосредственно на кишечном эпителии, какими являются многие виды лактобацилл, будет способствовать этому. Другие проблемы, связанные с оптимизацией экспрессии в клетках бактерий, а также, может быть, с созданием специальных реципиентных штаммов с измененными внутриклеточными протеазами, должны решаться с применением методов генетики и геной инженерии.

Безопасность мобилизуемых векторов семейства pLF1311. По правилам безопасной работы с генно-инженерными микроорганизмами, векторы, используемые вне лаборатории, например, в промышленных штаммах, не должны быть трансмиссивными. Малые плазмиды, подобные pLF1311, не бывают конъюгативными. С точки зрения безопасности это положительная их характеристика, хотя и недостаточная. Известно, что малые плазмиды иногда мобилизуются резидентными конъюгативными плазмидами грамположительных бактерий. Таким образом они распространяются в природе. Эффективность этого процесса определяется плазмидным геном *trc*, вносящем односторонний разрыв в специфическое место плазмиды – сайт

R_{SA}. Исходная природная плазмида pLF1311 не имеет гена *rge* и сайта R_{SA}, следовательно, конъюгативная мобилизация ее из грамположительных бактерий не должна быть эффективной. Можно было бы предположить, что взамен сайта R_{SA} использованные векторы несут иной, пока неизвестный науке усилитель мобилизуемости. Однако проведенный нами структурный анализ pLF1311 дает основание предполагать в ее составе делецию, которая затронула как раз ту область, в которой в родственных плазмидах находятся генетические элементы *rge* и R_{SA}. Это позволяет надеяться, что элементы, усиливающие мобилизацию, удалены из природной плазмиды и в настоящее время на векторе их не имеется.

Для мобилизации плазмид в наших условиях (из грамотрицательного донора) была использована двухплазмидная система. Сама по себе векторная плазмида семейства pLF не способна к конъюгативному переносу. Донорная клетка должна содержать одновременно две плазмиды: целевой вектор с клонированной в него цис-действующей областью начала конъюгативного переноса (*oriT*), специфичной именно для используемого мобилизатора RP4, и транс-действующую соответствующую конъюгативную плазмиду-помощник RP4. Векторные плазмиды семейства pLF1311 в кишечных палочках (в отличие от грамположительных бактерий) сегрегационно нестабильны, и в отсутствие селективирующего агента (хлорамфеникола) теряются бактериями за несколько клеточных поколений. Плазмида-помощник RP4, в свою очередь, не способна реплицироваться в грамположительных бактериях. По этой причине полученные описанным путем рекомбинантные штаммы не могут далее передавать векторную плазмиду, так как она не способна, в отсутствие помощника, к самостоятельной конъюгативной передаче. Следовательно, при этом сведена к минимуму опасность диссеминации рекомбинантной плазмиды в природе при широкомасштабном использовании штаммов.

Заключение

Синтетическая последовательность гена соматолиберина (рилизинг-фактора гормона роста) клонирована в экспрессионный вектор для кишечной палочки pBluescript KS(+) и в универсальный челночный экспрессионный вектор для грамположительных бактерий pLF21. Последовательность соединена с сигналами начала трансляции мРНК, предусматривающими функционирование в системе прокариотической клетки. Клонирован также димер последовательности гена соматолиберина в виде прямого tandemного повтора по типу "голова к хвосту".

В полученных конструкциях для кишечной палочки ген соматолиберина находится под лактозным промотором и может быть экспрессирован в стандартной системе с индуктором лактозного оперона – изопропил-β-тиогалактозидом (ИПТГ). Кроме того, ген соматолиберина находится под промотором бактериофага T3 (в других конструкциях – под промотором бактериофага T7) и может быть экспрессирован *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T3 (T7) или *in vivo* в бактериальной системе, включающей кишечную палочку и вирулентный бактериофаг T3 (T7), либо плазмиду с клонированным геном РНК-полимеразы T3 (T7).

Плазмида для экспрессии соматолиберина в клетках грамположительных бактерий – pLF-SL2 основана на оригинальной конструкции, объединяющей репликативные гены вектора с клонированной последовательностью соматолиберина в единый транскриптон. Это обеспечивает конститутивную транскрипцию гена соматолиберина во всех штаммах, поддерживающих репликацию

вектора. Нами подтверждена транскрипция гена соматолиберина в составе рассматриваемого вектора в клетках кишечных палочек и трансляция находящегося за ним гена α -пептида β -галактозидазы. Инициаторному кодону соматолиберина предшествует сигнал начала трансляции бактериальных мРНК (SD), который предполагает трансляцию целевой последовательности.

На настоящем этапе работы получены рекомбинантные штаммы пяти видов молочнокислых бактерий: трех видов лактобацилл – *Lactobacillus acidophilus* K3, *L. fermentum* 90Tc4, *L. plantarum* 8PA3 и двух видов кишечных стрептококков – *Enterococcus faecalis* OG1 и *E. faecium* M74. Репликация в них плазмиды свидетельствует о сквозной транскрипции соматолиберин + *repB* мРНК с репликативного промотора вектора. Все штаммы являются нормальными непатогенными обитателями кишечника, а некоторые из исходных штаммов входят в состав ныне используемых пробиотиков: "Лактобактерин" (*L. fermentum* 90Tc4 и *L. plantarum* 8PA3) и "Энтерацид П" (*E. faecium* M74). Они прошли необходимые ветеринарные испытания и их эффективность в качестве пробиотиков подтверждена в ходе многолетнего использования препаратов.

Плазмида pLF-SL2 содержит двойную дозу гена соматолиберина во всех рекомбинантных бактериях, кроме *L. acidophilus* K3, где имеется одна копия гена. Транскрипция клонированных генов соматолиберина происходит с репликативного промотора вектора, она конститутивная и регулируется в основном через копийность плазмиды в клетке. Конечная эффективность экспрессии соматолиберина в бактериальных клетках в настоящее время, однако, не измерена. В последующем предполагается также исследование влияния клонированного гена на показатели роста и развития лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Авторы выражают благодарность М. В. Тюрину за помощь в проведении опытов по электротрансформации, а также Фонду фундаментальных исследований РАН (грант 96-04-49239), поддержавшему работу по исследованию репликативного оперона плазмид семейства pLF.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров Н. Н., Каламбет Ю. А. Распознавание функциональных сигналов. В кн.: Компьютерный анализ генетических текстов. М.: Мир, 1990: 113-154.
2. Алёшин В. В., Дорошенко В. Г., Тараканов Б. В. 3'-конец гена *repB* лактобациллярной плазмиды pLF1311 удлинился вследствие утраты стоп-кодона гена-предшественника. Молекулярная биология. 1998: 32 (в печати).
3. Алёшин В. В., Тараканов Б. В. Новые мобилизуемые векторы семейства pLF1311 для молочнокислых бактерий, несущие *pic* сайт RP4 с различными флангами, 1998 (в печати).
4. Карпушина С. Г., Воронина Л.Н., Лившиц В.А., Короткова В.С. Комплексный бактериальный препарат для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний животных. Патент РФ No 2091075. Регистрация 27 сентября 1997 г.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике, М.: Мир, 1976.
7. Пивняк И. Г., Тараканов Б. В. Микробиология пищеварения жвачных. М.: Колос, 1982: 247.
8. Румер Л. М. Изучение процессов генетического обмена у молочнокислых стрептококков. Дисс. ... канд. биол. наук, Москва, 1993.
9. Семёнова Е. В. Мобилизуемые векторы для лактобацилл и других

- грамположительных бактерий. Дисс. ... канд. биол. наук, Москва, 1994.
10. Семёнова Е. В., Тараканов Б. В., Лившиц В. А. Мобилизуемые векторы для лактобацилл и других грамположительных бактерий на основе плазмиды pCB20. В кн.: Генноинженерные сельскохозяйственные животные. Сб. научных трудов, М.:1995, 1: 387 - 394.
 11. Тараканов Б. В., Алёшин В. В., Дорошенко В. Г., Семёнова Е. В., Лившиц В. А. Конструирование мобилизуемых векторов для молочнокислых бактерий. В кн.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Материалы II Межд. конф. 5 - 8 сентября 1995 г, Боровск: 1997: 289 - 297.
 12. Тюрин М.В. Устройство для обработки суспензии клеток импульсным электрическим током для генетических исследований и способ его использования. Патент РФ 2-005776. Б.И. 15.01.1994:90.
 13. Тюрин М.В., Лившиц В.А. Некоторые практические аспекты электротрансформации бактерий. Биол. мембраны. 1994, 11: 117-139.
 14. Ханаан Д. Методы трансформации *E. coli*. В кн.: Клонирование ДНК. Методы. Под ред. Гловера Д. М.: Мир, 1988: 140 - 174.
 15. Birnboim, H. C., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res., 1979, 7: 1513.
 16. Brenig, B., Muller, M. and Brem, G. Gene transfer in pig. 199: 41-48.
 17. Gibson, T. The structural organization of Epstein-Barr virus. Ph. D. Thesis. Cambridge, 1984.
 18. Man, J.C., de Rogosa, M. and Sharp, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact., 1960, 23:130-135.
 19. Shine, J. and Dalgarno, L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71:1342- 1346.
 20. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon. Mol. Gen. Genet., 1984, 196: 413-420.
 21. Trieu-Cuot P., Carlier C., Martin P., Courvalin P. Plasmid transfer by conjugation from *E. coli* to gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 1987, 48: 289-294.
 22. Trieu-Cuot P., Carlier C., Poyart-Salmeron C., Courvalin P. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *LacZ* gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. Gene, 1991, 102: 99-104.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СТРЕПТОФАГИНА

А.И. Манухина, Б.В. Тараканов, Т.А. Николочева

Кабинет морфологических исследований
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

При использовании стрептофагина в рекомендуемой нами дозе ($1,5 \times 10^9$ фагов/кг живой массы) отмечено увеличение площади коркового вещества в лимфоузлах, площади сечения белой пульпы селезенки, "клеточность" коркового вещества тимуса. Во всех структурах изучаемых органов отмечена тенденция к увеличению числа зрелых и незрелых плазматических клеток и усиление митотической активности клеток лимфоидного ряда. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии стрептофагина в рекомендуемой дозе на структуру органов иммунной системы кроликов. Длительное использование препарата в 100-кратной дозе вызвало развитие "фиброадении" фолликулов лимфоузлов, селезенки и кишечника с одновременной атрофией специфической паренхимы, которая сопровождалась усилением дегенерации клеток, уменьшением числа бластов (больших лимфоцитов, плазмобластов), что

свидетельствует об ослаблении иммуноцитопозитической функции изучаемых органов по сравнению с показателями контрольной группы.

Введение

Создание пробиотиков – новое и перспективное направление исследований в сельскохозяйственной биологии. Зарубежный опыт и сравнительно немногочисленные отечественные исследования свидетельствуют, что применение пробиотиков в животноводстве позволяет ускорить рост молодняка и уменьшить его отход. Многие препараты являются лечебно-профилактическими средствами в борьбе с бактериальными заболеваниями животных. Они используются для профилактики и лечения расстройств пищеварительной системы алиментарной этиологии. По эффективности действия пробиотики не уступают некоторым антибиотикам, химио-терапевтическим средствам, но при этом не оказывают побочного действия на микрофлору, не загрязняют продукты животноводства и окружающую среду, то есть являются экологически чистыми, что имеет решающее значение при выборе стратегии научного поиска (4, 5, 7, 12).

Однако, ознакомившись с литературными данными по вопросу применения пробиотиков в животноводстве, мы пришли к выводу, что использование этих препаратов носит скорее эмпирический характер, чем научно обоснованный. Так, во многих исследованиях описаны свойства препарата и его влияние на переваримость корма, привесы и другие зоотехнические показатели, без выяснения механизма действия пробиотика. Между тем известно, что все микроорганизмы, а тем более живые, обладают антигенными свойствами и могут сильно влиять на иммунную и другие системы организма, то есть быть иммуномодуляторами, в зависимости от дозы препарата и сроков его использования.

Установлено, что пищевые антигены, а вместе с ними и другие чужеродные вещества и патогенные микроорганизмы воздействуют на слизистую оболочку органов пищеварения (2, 8). В связи с этим желудочно-кишечный тракт фактически имеет двойную иммунную защиту. С одной стороны, это многочисленные лимфатические узлы, являющиеся биологическими фильтрами на пути тока лимфы от органов пищеварения. С другой стороны, непосредственно в толщине слизистой оболочки органов пищеварения находятся многочисленные и густо расположенные лимфоидные узелки и бляшки, а также диффузная лимфоидная ткань. Они осуществляют в толще слизистой оболочки и даже в покрывающем ее эпителии иммунный контроль за всем, что оказывается на поверхности слизистой оболочки и в ее толще. Антигенное воздействие на организм вызывает заметную активацию лимфоидного аппарата тонкой и толстой кишок (8, 10, 11, 14). При иммунизации собак брюшнотифозной вакциной в лимфоидных узелках кишечника, по данным Шатровой К.М. (9), через сутки после начала опыта число плазматических клеток увеличивается до 40, а средних и больших лимфоцитов до 50% и возрастает число митотически делящихся клеток. Установлено, что введенные мышам через рот убитые формалином коклюшные палочки и их антигены проникают через эпителиальный покров кишки и фиксируются лимфоцитами собственной пластинки слизистой оболочки и лимфоидных бляшек подвздошной кишки с развитием макрофагальной реакции (1). Автор полагает, что в стенках тонкой кишки развивается реакция местного иммунного ответа с одновременной генерализованной иммунной реакцией, на что указывают сходные изменения в регионарных для кишки брыжеечных лимфоузлах.

Важными элементами иммунной системы являются тимус и селезенка. К настоящему времени выяснено, что тимус обеспечивает им-мунокомпетентность лимфоцитов, осуществляющих иммунный надзор. Участие тимуса выражается в пролиферации, в дифференцировке и миграции клеток, а также секреции биологически активных веществ (4, 5). Селезенку признают одним из органов периферической иммунной системы. В ней раньше, чем в каком-либо ином органе, в ответ на введение антигенных частиц начинается синтез антител (14).

Приведенные выше данные и наши исследования свидетельствуют о том, что пробиотики могут служить иммуномодуляторами. Для того, чтобы подтвердить это на вновь создаваемых препаратах, мы изучали морфологию органов иммунной системы кроликов, получающих в рационе разные дозы стрептофагина в течение 18 месяцев.

Материал и методы

Опыты проведены на кроликах калифорнийской породы. Из крольчат 2-месячного возраста было сформировано три группы по 12 голов в каждой. Животные контрольной (1-й) группы получали сбалансированный основной рацион (ОР) по существующим нормам кормления. Кролики 2-й группы получали рекомендуемую дозу ($1,5 \times 10^9$ частиц бактериофага/кг живой массы) в составе комбикорма и 3-ей – 100-кратную дозу препарата в течение 18 месяцев. После убоя животных по 3 головы из группы у них были взяты для исследований двенадцатиперстная, подвздошная и слепая кишки, брыжеечный лимфоузел, селезенка и тимус. Материал фиксировали в забуференном нейтральном формалине, заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали азур-2-эозином, гематоксилин-эозином по Браше (3). Распределение клеток рассчитывали на единице площади (880 мкм^2) в каждом из 10 полей зрения. Цифровой материал обрабатывали статистически с учетом абсолютных показателей и доли различных клеток в исследуемых структурах кишечника, лимфоузла, тимуса и селезенки.

Результаты и обсуждение

У кроликов 1-й (контрольной) группы в стенке двенадцатиперстной кишки обнаружено большое количество лимфоидной ткани, которая представлена отдельными клетками: лимфоцитами, плазматическими клетками, зернистыми лейкоцитами, макрофагами. В слизистой оболочке и подслизистой основе тонкой кишки расположены лимфоидные бляшки, состоящие из скоплений диффузной лимфоидной ткани. Эпителий лимфоидной бляшки над лимфоидными узелками способен абсорбировать из просвета тонкой кишки интактные белковые макромолекулы (13). В слепой кишке находилось большое число лимфоидных узелков, которые лежали скученно, окружая со всех сторон просвет кишки. Эпителий инфильтрирован лимфоидными клетками, в основном средними лимфоцитами (рис. 1).

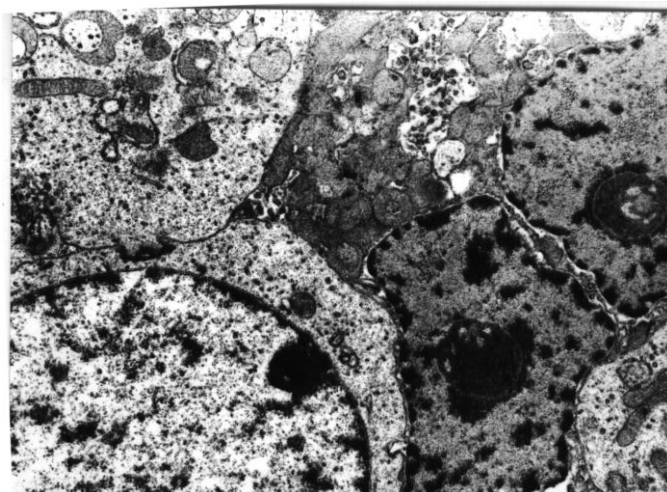


Рис.1. Покровный эпителий слепой кишки кролика

Контроль. Среди эпителиоцитов (темные клетки) лежат лимфоциты (светлые клетки). Электронограмма. Ув. 14000.

В брыжеечных лимфоузлах контрольных животных корковое и мозговое вещество было четко выражено. Корковое вещество, более темное из-за плотно лежащих лимфоцитов, занимало периферические отделы, в нем располагались лимфоидные узелки, которые состояли из ретикулярных клеток, макрофагов и клеток лимфоидного ряда (малые, средние и большие лимфоциты). В центрах размножения выявлены митотически делящиеся клетки (рис. 2). Мозговое вещество более светло окрашено, его паренхима состояла из лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов.

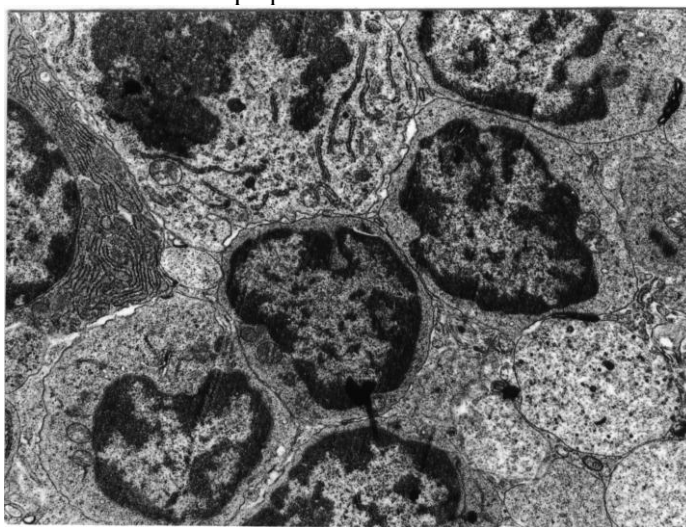


Рис.2. Лимфоузел кролика

Контроль. Митоз (профаза) лимфоцитов в герминативном центре вторичного узелка. Электронограмма. Ув. 7000.

В селезенке контрольных животных границы фолликулов были четкими, красная пульпа полнокровна, со значительным количеством лимфобластов и макрофагов. В тимусе обнаружена бластная реакция в субкапсулярной зоне, клеточность коркового слоя была достаточно высокой (табл.).

Таблица. Структурные изменения селезенки и тимуса кроликов, получавших в рационе стрептофагин

Орган	Показатели	Группы животных		
		1	2	3

Селезенка	Удельная площадь сечения белой пульпы	40,6±1,1	87,7±1,4	32,3±1,9
	Количество герминативных центров (на 10 фолликулов)	0,52±0,1	2,2±0,5	0,4±0,3
	Количество клеток-предшественников с признаками митотической активности	0,11±0,06	0,8±0,02	0,3±0,09
Тимус	Удельная плотность коркового вещества	62±1,7	64±1,5	46±1,0
	Удельная плотность сечения мозгового вещества	31,5±1,4	25,8±2,2	23,4±2,7
	Плотность расположения клеток в 10 полях зрения:			
	в корковом веществе	12,8±1,4	15,4±0,4	10,8±0,5
	в мозговом веществе	7,3±0,4	7,8±0,4	5,6±0,1

У кроликов, получавших рекомендуемую дозу стрептофагина, отмечена заметная активация лимфоидного аппарата тонкой и толстой кишок. Так, в лимфоидных узелках увеличено в 2 раза число плазматических клеток, главным образом за счет незрелых форм клеток; в 4 раза возросло число средних и больших лимфоцитов и митотически делящихся клеток. В узелках обнаружена макрофагальная реакция.

При использовании 100-кратной дозы стрептофагина наблюдали уменьшение количества и величины центров размножения, иногда атрофию лимфоидных узелков, при сохранении лимфоидной ткани.

В брыжеечных лимфоузлах при использовании рекомендуемой дозы стрептофагина в 3 раза возросло число макрофагов, в 6 – митотически делящихся клеток, в 2 – бластных форм клеток и в 3 – незрелых плазматических клеток, по сравнению с контролем. При использовании 100-кратной дозы препарата в брыжеечных лимфоузлах про-изошел комплекс изменений, свидетельствующих об ослаблении их иммунопоэтической функции по сравнению с показателями контрольной группы. В лимфоидных узелках и корковом плато выявлена тенденция к исчезновению малодифференцированных клеток (бластов, больших лимфоцитов), в герминативных центрах обнаружено увеличение в 6 раз числа дегенерирующих клеток. Для мозговых тяжей характерно уменьшение в 1,4 раза количества зрелых и незрелых плазматических клеток с одновременным увеличением в 3 раза числа макрофагов и в 2 раза – клеток с признаками деструкции. кроликов, получавших стрептофагин в рекомендуемой дозе, отмечалась выраженная гиперплазия центральной и периферической зон лимфоидных фолликулов селезенки. За счет образования розеткоподобных структур из бластных форм лимфоцитов и мононуклеарных клеток, в синусах красной пульпы, а также вокруг мелких артериол происходило тотальное заполнение красной пульпы и слияние между собой краевых зон фолликулов, что вело к увеличению площади сечения белой пульпы (табл.). В тимусе этой группы животных границы между корковым и мозговым веществом были четкими, несколько было увеличено количество лимфобластов в субкапсулярных областях коры, возросла плотность упаковки (клеточности) коркового слоя. У животных, получавших длительное время 100-кратную дозу стрептофагина, было отмечено полнокровие красной пульпы селезенки и мозгового вещества тимуса, склеивание эритроцитов (рис. 3), размытость границ фолликулов, коркового и мозгового вещества вилочковой железы. В селезенке было установлено выраженное уменьшение клеточности стромы, развитие "фиброадении" фолликулов с одновременной атрофией специфической паренхимы. Значительные изменения сосудистого русла и клеточного состава тимуса и селезенки сопровождалась делимфотизацией Т-зависимых зон.

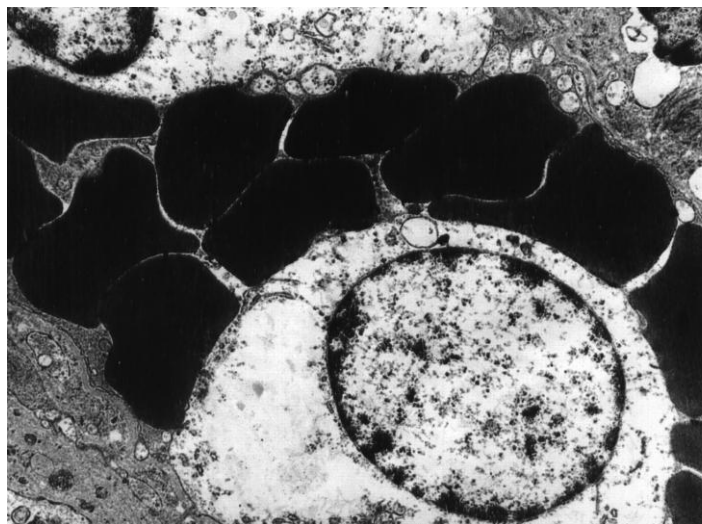


Рис. 3. Селезенка кролика, получавшего стократную дозу стрептофагина.
В красной пульпе наблюдается склеивание эритроцитов. Электонотомия. Ув. 10000.

Заключение

При действии стрептофагина в рекомендуемой дозе выявлен комплекс морфологических изменений органов иммунной системы, свидетельствующих об усилении их иммуноцитопозитической деятельности, что подтверждается увеличением площади коркового вещества и количества лимфоидных узелков с герминативным центром в брыжеечных лимфоузлах, селезенке и кишечнике. Во всех структурах изучаемых органов отмечена тенденция к увеличению числа зрелых и незрелых плазматических клеток и усиление митотической активности клеток лимфоидного ряда. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии стрептофагина в рекомендуемой дозе на органы иммунной системы кроликов. Однако длительное использование 100-кратной дозы препарата вызвало развитие "фиброадэнии" фолликулов лимфоузлов, селезенки и кишечника с одновременной атрофией специфической паренхимы, которая сопровождалась усилением дегенерации клеток (бластов, больших лимфоцитов, плазмобластов). Указанные изменения свидетельствуют об ослаблении иммуноцитопозитической функции изучаемых органов у животных этой группы по сравнению с контрольной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кассина Т.Ф. Начальный этап клеточных реакций в стенке тонкого кишечника и брыжеечных лимфоузлах у мышей на энтериальное введение коклюшной вакцины. Труды Перм. мед. ин-та, 1976, 139: 63-70.
2. Коньшев В.А. Механизм адаптации роста тканей к поступлению в организм экзогенных веществ. Успехи совр. биологии, 1979. 87. 1: 133-147.
3. Лилли Р. Патогистодогическая техника и практическая гисто-химия. М.: Мир. 1969: 645 с.
4. Новиков В.Д., Труфакин В.А. Органы тимолимфатической системы. Новосиб. гос. мед. ин-т, 1980: 29 с.
5. Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина, 1976: 336 с.
6. Смирнов В.В., Резник С.Р. Василевская И.А. Споробразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова думка, 1982: 280 с.
7. Тараканов В.В. Микробиологические процессы в рубце высокопродуктивных коров и эффективность использования корма при применении биопрепарата стрептофагина. Сельхоз. биология, 1993, 6:94-105.
8. Уланова М.А. Система местного иммунитета пищеварительного тракта и

- ее особенности в детском возрасте. Успехи совр. биологии, 1988. 105. 2: 202-216.
9. Шатрова К.М. Состояние лимфоидных фолликулов тонкого кишечника в различные сроки после антигенного воздействия на организм животного. Врач. дело. 1979. 7: 15-17.
 10. Bard M.A., Draper Y.R. Development of rabbit appendix. Acta anat (Basel), 1977:98.
 11. Hoefsmiff S.C., Dujvefifan A.M. et al. Relation between langerhans cells, vieled and interdigitating cells. Immunology, 1982, 161, 3-4:253-265.
 12. Yernigan M.A. et al. Probiotics in poultry nutrition. Review Words Poultry Sci., 1985, 2:97-107.
 13. Yarrya A. et al. Immune cells associated with M. cells in the follicle-associated epithelium at Peyec's patches in the rat. Cell. Tiss. Res., 1989, 255, 2:293-298.
 14. Tannock G.W. The normal micioflora: new concepts in health promotion Microbial. Sci., 1988, 5:4-8.

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ КОНЬЮГАТОВ С-КОНЦЕВЫХ ОКТА- И ТЕТРАПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ХОЛЕЦИСТОКИНИНА С ПРИРОДНЫМИ И СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИМЕРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ, В СВОБОДНОЙ И ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ФОРМАХ, КАК ОСНОВЫ ВАКЦИНЫ АППЕТИТА

Н.А. Назаров, Е.М. Колоскова, В.А. Галочкин
Лаборатория иммунобиотехнологии

Конъюгаты тетра- и октапептидных синтетических фрагментов холецистокинина с бычьим сывороточным альбумином и сополимером винилпирролидона с кротоновой кислотой иммуногенны. Разработанная и испытанная пролонгированная форма описанных конъюгатов может быть использована в качестве основных компонентов при разработке принципиально новой физиологической вакцины аппетита.

Введение

В научном мире идет неустанный поиск новых путей повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Работы ведутся на самых разных уровнях, начиная с молекулярно-биологического и кончая зоотехническим. Уже не редкостью, а правилом стало проводить теоретические и практические изыскания на стыке многих наук. В ряду известных способов регуляции продуктивности сельскохозяйственных животных видное место занимает новый и интенсивно разрабатываемый во всем мире иммунобиотехнологический подход, теоретической основой которого являются современные представления о тесной функциональной взаимосвязи иммунной, нервной и эндокринной систем организма (5).

В последнее время в литературе появились сведения о непосредственной причастности иммунной системы к регуляции ряда физиологических процессов(1, 2). Доказано, что в здоровом организме человека и животных могут вырабатываться аутоантитела к некоторым собственным биологическим регуляторам (2, 8, 12). Незначительное, но постоянное присутствие аутоантител к определенным биологически активным веществам позволяет организму осуществлять долговременную коррекцию физиологических процессов, подконтрольных этим веществам. Таким образом, иммунная сиситема способна не только поддерживать гомеостаз внутренней среды организма, но и принимает активное участие в регуляции физиологических функций и обмена веществ, путем поддержания

концентраций эндогенных регуляторных веществ на определенном уровне.

Обнаружение в организме естественных (непатологических) аутоантител подтолкнуло ученых к идее искусственной инициации антителогенеза к эндогенным биорегуляторам, а следовательно, к идее коррекции ряда физиологических функций, что и составляет сущность иммунобиологического подхода к регуляции продуктивности. Проработка данного направления вылилась в целой серии успешных попыток отечественных и зарубежных ученых разработать подходы к созданию вакцин "стерилизации" и "аппетита" – физиологических вакцин нового типа и нового поколения (3, 16).

Иммунокоррекция избранной физиологической функции осуществляется методом иммунонейтрализации биологически активного вещества – ключевого регулятора данной функции. В свою очередь, иммунонейтрализация достигается за счет иммунизации животных иммуногенными конъюгатами синтетических аналогов избранных для ингибирования эндогенных веществ. Результатом данной манипуляции является выработка животным антител, способных избирательно взаимодействовать и лишать биологической активности конкретный регуляторный пептид. Вследствие такого воздействия наступает продолжительное (в случае повторных иммунизаций) аутоиммуноингибирование избранного пептида и аутоиммунокоррекция конкретной функции, контролируемой данным пептидом, что влечет за собой достижение желаемых биохимических и зоотехнических эффектов. Иммунизированное таким образом животное, к тому же, представляет собой весьма ценный и информативный объект для научных исследований (2).

Одним из наиболее важных и значимых для сельскохозяйственной науки и практики путей практической реализации данного направления является иммунизация животных против некоторых эндогенных регуляторов, выполняющих функцию ингибиторов ряда физиологических процессов(2). К числу ярких представителей последних относятся соматостатин и холецистокинин (ХЦК) (10, 17).

Установлено, что ХЦК является физиологическим ингибитором потребления пищи у человека и животных – гормоном сытости (17). Проблема регуляции аппетита имеет большое значение для теории и практики сельскохозяйственной науки. Известно, что рост и развитие свиней с консолидированным генотипом лимитируется количеством потребляемых кормов. Поэтому логично поставить задачу повысить продуктивность свиней стимулируя у них аппетит. Последнее можно достигнуть путем иммунонейтрализации эндогенного ХЦК – основного ингибитора потребления корма. К тому же, в последнее время появились работы, показывающие отрицательную взаимосвязь уровня ХЦК в организме свиней и других животных, с одной стороны, и концентрации гормона роста и мясной продуктивности, с другой, и положительную взаимосвязь с количеством жира в организме (13, 14, 18). Поэтому иммунонейтрализация эндогенного ХЦК, также, может оказать положительный эффект на рост и качество продукции у свиней.

Следует отметить, что современная иммунобиотехнология ориентируется на использование в качестве антигенов полностью синтетических веществ (11). Как правило, эти вещества представляют собой последовательность из нескольких аминокислотных остатков, являющуюся аналогом антигенной детерминанты (эпитопом) цельной эндогенной молекулы. Однако синтетический эпитоп, в большинстве случаев, является гаптенем, т.е. он неиммуногенен. Поэтому в организм животного вводят не один гаптен, а его комбинацию с высокомолекулярным носителем (иммуногенный конъюгат), которая

бы обеспечила преимущественный ответ на гаптен. В настоящее время одними из наиболее перспективных носителей – иммуностимуляторов являются синтетические полиэлектролиты. О некоторых интересных свойствах этих веществ, как иммуномодуляторов, будет сказано ниже.

Обычно иммунизация животных проводится в несколько приемов, что позволяет добиться достаточно высокого титра антител. При этом заведомо увеличивается расход антигена, а сама процедура многократного инъектирования животных трудоемка и нетехнологична. Применение препаратов пролонгированного действия позволяет существенно снизить расход дорогостоящих антигенов и упростить традиционную процедуру вакцинации животных. К настоящему моменту в литературе крайне ограничены сведения об использовании пролонгированных антигенных препаратов.

Таким образом, настоящая работа предпринята с целью экспериментальной проверки исходного теоретического положения о потенциальной возможности повышения потребления корма сельскохозяйственными животными, используя иммунобиотехнологический прием аутоиммунонейтрализации гормона желудочно-кишечного тракта – холецистокинина, рассматриваемого в настоящее время в качестве одного из ведущих факторов ингибирования потребления корма.

В рамках реализации высказанной идеи, задачей работы явилось:

1. Поиск иммуногенных форм конъюгатов С-концевых окта- и тетрафрагментов ХЦК с природными и синтетическими полимерными носителями, способными индуцировать в организме животных синтез антител перекрестно реагирующих с эндогенным гормоном.

2. Разработка и испытание пролонгированных форм для иммуногенных конъюгатов С-концевых пептидов ХЦК с носителями различной природы, как основных компонентов разрабатываемой в институте принципиально новой физиологической вакцины - вакцины аппетита, предназначенной для повышения продуктивности здоровых, растущих, откармливаемых на мясо свиней, улучшения качества получаемой продукции и снижения затрат кормов на ее производство.

Материалы и методы

Для осуществления поставленной цели, совместно с ВНИИЗЖ, были синтезированы пептиды, отвечающие аминокислотной последовательности С-концевых окта- и тетрафрагментов холецистокинина ХЦК 26-33 (ХЦК-8) и ХЦК 30-33 (ХЦК-4) и их конъюгаты – с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и с сополимером винилпирролидона с кротоновой кислотой (СП).

Выбор составных частей конъюгатов обусловлен следующими соображениями. Известно, что ХЦК-8 обладает полной биологической и иммунологической активностью целой молекулы ХЦК (4). В свою очередь, антитела к ХЦК-4 могут перекрестно реагировать с ХЦК-8 (9). Поэтому иммунизация конъюгатами этих фрагментов способна вызвать выработку в организме иммунизированных животных антител к эндогенному ХЦК и, тем самым, обеспечить снижение его концентрации в кровяном русле. Выбор самого короткого фрагмента – ХЦК-4 продиктован также потребностью поиска наиболее дешевых способов стимуляции аппетита у животных.

ХЦК-8 и ХЦК-4 сами по себе не являются антигенами, хотя и заключают в себе антигенные детерминанты целой молекулы ХЦК. Следовательно, для достижения специфического антительного ответа к ХЦК-8 и ХЦК-4 необходимо построить иммуногенную конструкцию, состоящую из соответствующего пептидного фрагмента и иммуногенного полимерного носителя.

В качестве носителей были выбраны: БСА, как типичный и наиболее используемый в конъюгатах представитель природных белковых носителей и сополимер винилпирролидона с кротоновой кислотой (СП – 30-50 кДа).

СП является характерным представителем синтетических полиэлектролитов (полианионов). Важная особенность данных соединений заключена в их способности неспецифически стимулировать Т-независимый иммуно- и антителиогенез, т.е. выполнять функцию Т-хелперов (адьювантные свойства). Помимо этого, синтетические полиэлектролиты реализуют свою иммуностимулирующую функцию в обход Ig-генного контроля силы иммунного ответа на Т-зависимые антигены, тем самым способствуя формированию практически одинаковой по силе иммунной реакции у биологических объектов сильно и слабо реагирующих на эти антигены (7).

Синтез ХЦК-8 и ХЦК-4 проведен на аминокислотном анализаторе, твердофазным способом. Конъюгация пептидов с БСА осуществлена глутаральдегидным способом. Соотношение реагентов при конъюгировании ХЦК-8 и ХЦК-4 с БСА составило: 10 мг соответствующего пептида, 10 мг БСА, 500 мкл 0,04 М раствора глутарового альдегида. Для прекращения реакции конъюгации и стабилизации системы в реакционную смесь добавляли 37,5 мг глицина. Конъюгаты ХЦК-8 и ХЦК-4 с СП получены с использованием водорастворимого карбодиимида. Использовано следующее соотношение реагирующих компонентов: 10 мг соответствующего пептида, 13 мг синтетического полиэлектролита, 102 мг водорастворимого карбодиимида и 37,5 мг глицина для остановки реакции и стабилизации системы.

Стехиометрическое соотношение всех полученных конъюгатов составило приблизительно 8-10 молекул гаптена на одну молекулу носителя.

Для приготовления пролонгированных препаратов иммуногенных конъюгатов С-концевых фрагментов ХЦК использовали свойство поливинилкапролактама (ПВК), нового отечественного полимера, и его сополимеров образовывать гидротермогели при температурах выше 30 С, а также способность этих полимеров к неспецифическому взаимодействию с белками и некоторыми другими соединениями. Целью работы было создание простого в приготовлении и удобного в использовании препарата для иммунизации животных, способного однократной инъекцией вызвать достаточно длительный и выраженный антительный ответ.

Состав иммунизирующей смеси (пролонгированной формы конъюгатов): соответствующий конъюгат и сополимер винилкапролактама с винилацетатом (85%:15% по массе, М.м.-200000 Да) в качестве основы-носителя, способной к образованию гидротермогеля при физиологических условиях и тем самым – к пролонгированию выделения иммобилизованных в нем биологически активных веществ. Пропорции компонентов: конъюгат – 1,5 мг, ПВК или его сополимер – 1-1,5 мл 10-15%-ного раствора в 0,05 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 на одного кролика.

Оценка иммуногенной активности конъюгатов. Иммуногенная активность конъюгатов была испытана на взрослых кроликах, в условиях вивария ВНИИФБиП с-х животных. Кроликов иммунизировали синтезированными антигенами по стандартной схеме: 4 еженедельные инъекции в течение месяца. Антигены инъецировали подкожно, вдоль позвоночника, в 7-8 точек. Доза вводимых препаратов составила 300-500 мкг пептида в конъюгате на голову, в одном мл

полного адьюванта Фрейнда. Каждый конъюгат испытывали на двух кроликах.

Для оценки иммуногенной активности конъюгатов в сыворотке крови определяли титр антител к ХЦК-8, ХЦК-4 и БСА в составе конъюгатов. С этой целью, перед началом опыта и через 7 дней после каждого введения испытуемых конструкций, из краевой ушной вены кроликов брали кровь в количестве 5-10 мл. Сыворотку крови получали общепринятым методом.

Испытание пролонгированной формы конъюгатов ХЦК. Опыт проводили в условиях вивария. Были сформированы 4 группы животных по 3 кролика в каждой, которым вводили соответствующие конъюгаты в одной и той же пролонгированной форме. Однократное инъектирование осуществляли подкожно в область спины. Взятие крови из краевой ушной вены для определения титра антител к пептидам проводили спустя 2 недели после инъектирования и далее – трижды, с интервалом в 7 дней.

Титры антител к пептидам ХЦК в обоих опытах определяли с помощью разработанной для этих целей тест-системы твердофазного, гетерогенного, неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) (6).

Результаты и их обсуждение

В первом опыте оценивали иммуногенную активность конъюгатов С-концевых фрагментов ХЦК с носителями различной природы. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Анализ динамики развития титра антител к фрагментам ХЦК и его величина после последней иммунизации позволяют сделать вывод, что максимальной иммуногенной активностью обладает конъюгат ХЦК-8-БСА, минимальной – ХЦК-4-СП, промежуточной – ХЦК-8-СП и ХЦК-4-БСА. Испытуемые конъюгаты, на базе носителей различной природы, вызвали различный по интенсивности антительный ответ: конъюгаты на основе БСА оказали более выраженное действие, чем на основе сополимера винилпирролидона с кротоновой кислотой. Также, конъюгаты октапептида ХЦК были более иммуногенны, чем конъюгаты тетрапептида с аналогичными носителями.

Таблица 1. Иммуногенная активность испытуемых конъюгатов

Конъюгаты	Титры антител (взятие крови после очередной иммунизации)				
	до опыта	1-е взятие	2-е взятие	3-е взятие	4-е взятие
ХЦК-8-БСА	0	1:16	1:4	1:16	1:32
ХЦК-8-СП	0	1:8	1:4	1:4	1:16
ХЦК-4-БСА	0	1:4	1:2	1:8	1:16
ХЦК-4-СП	0	0	1:16	1:4	1:8

Сходный характер формирования титра антител к фрагментам ХЦК для всех конъюгатов, с характерным падением его величины после 2-й иммунизации (для конъюгатов ХЦК-8-БСА, ХЦК-8-СП, ХЦК-4-БСА) и после 3-й иммунизации (для конъюгата ХЦК-4-СП), с последующим ростом, предполагает развитие в организме иммунизированных животных временной компенсаторной реакции в ответ на введение антигенов, выраженной в стимуляции синтеза или выделения из секреторных клеток кишечника эндогенного ХЦК. Соответственно, для связывания большего количества циркулирующего в кровяном русле ХЦК требуется больше гормоннейтрализующих антител. Следовательно, меньше остается свободных антител для определения в ИФА, что и демонстрирует

рассмотренное выше снижение величины титра антител к ХЦК-8 и ХЦК-4.

Из таблицы 1 видно, что полученные титры антител к фрагментам ХЦК, даже после последней иммунизации были невелики (максимально – 1:32). Возникает закономерный вопрос о развитии малой силы иммунного ответа у кроликов на данный вид антигенов (испытываемые конъюгаты). Однако анализ величин титра антител к БСА в составе части конъюгатов после третьей иммунизации, выраженный в кратности разведения сыворотки и равный 1:10000 для конъюгата ХЦК-8-БСА и 1:1000 для конъюгата ХЦК-4-БСА позволяет дать отрицательный ответ на поставленный вопрос.

Следует отметить, что в крови животных, взятой до иммунизации, аутоантител к эндогенному ХЦК обнаружено не было, хотя это может быть связано с недостаточной чувствительностью разработанного метода ИФА. Возможно присутствие в здоровом организме животных аутоантител к полной молекуле ХЦК, но обладающих низкой перекрестной активностью к С-концевым фрагментам гормона, а следовательно не регистрируемых в данном ИФА. В контексте идеи существования регуляторных аутоантител (1, 2) можно предположить возможность выработки в организме таких антител к ХЦК в случае повышенной концентрации этого гормона, например при гиперфункции поджелудочной железы.

Также, может возникнуть вопрос о достаточности такого количества выработанных к ХЦК антител для его нейтрализации. Ответить на него можно вполне утвердительно. Так в опытах Pekas J.C. с соавторами (16), у боровков, иммунизированных против десульфатированного ХЦК-8, значимый биологический эффект для иммунонейтрализации ХЦК, а именно усиление аппетита и повышение скорости роста животных, наблюдался при величине титра антител – 1:200. У ряда других исследователей (15) величина титра антител к ХЦК равная 1:50, оказалась достаточной, чтобы после иммунизации у крыс линии Zucker увеличилось количество потребляемого корма и возросла скорость прироста живой массы.

Исходя из анализа величин титра антител в разных опытных группах видно, что конъюгаты пептидных фрагментов с БСА оказались более иммуногенными, нежели конъюгаты с СП. Причина пониженной иммуногенности конъюгатов с СП кроется, видимо, в недостаточной молекулярной массе синтетического полимера (30-50 кДа), так как согласно Петрову Р.В. с соавторами (7) иммуностимулирующая активность в каждом ряду полимергомологов возникает и увеличивается лишь после достижения ими определенной степени полимеризации. Тем не менее, уже проведенный эксперимент показал перспективность использования данных носителей, благодаря адъювантным свойствам которых в дальнейшем можно будет отказаться от использования полного адъюванта Фрейнда.

Как уже упоминалось, ХЦК-8 обладает полной биологической и иммунологической активностью целой молекулы ХЦК. В свою очередь, антитела к ХЦК-4 способны перекрестно реагировать с ХЦК-8. Поэтому на основании анализа величин титра антител к ХЦК-8 и ХЦК-4 и литературных данных о незначительной концентрации эндогенного ХЦК в крови (4) нужно признать, что все испытанные конъюгаты вполне могут быть использованы в дальнейшей работе по созданию вакцины аппетита для сельскохозяйственных животных, базирующейся на принципе аутоиммунонейтрализации эндогенного ХЦК, как ингибитора потребления корма.

Полученные данные (табл. 1) дают основание полагать, что использование самого короткого фрагмента – ХЦК-4 и

высокомолекулярных синтетических полиэлектролитных носителей для инициации антителогенеза к нативному ХЦК сможет оказаться эффективным. Это позволит осуществить разработку более дешевой вакцины стимуляции аппетита, а следовательно продуктивности сельскохозяйственных животных, на основе фрагмента – ХЦК-4, не уступающей по силе вакцине на основе ХЦК-8. Необходимо отметить, что ХЦК-4 не обладает гормональной активностью ХЦК-8.

Поэтому вакцина на базе ХЦК-4 не сможет проявить нежелательного прямого физиологического действия в организме, свойственного эндогенному ХЦК, как в случае распада иммуногенного конъюгата на гаптен и носитель, что делает вакцину с тетрапептидом более надежной.

Во втором опыте испытывали пролонгированную форму конъюгатов С-концевых фрагментов ХЦК, приготовленную на основе сополимера винилкапролактама с винилацетатом. Результаты опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2. Титры антител к конъюгатам холецистокинина

Конъюгаты	Титры антител (взяты крови после инъекции)			
	2 недели	3 недели	4 недели	5 недель
ХЦК-8-БСА	1:4	1:8	1:16	1:32
ХЦК-8-СП	1:4	1:4	1:8	1:16
ХЦК-4-БСА	1:2	1:4	1:16	1:16
ХЦК-4-СП	0	1:4	1:16	1:8

Из таблицы 2 видно, что однократная инъекция испытуемой пролонгированной формы конъюгатов ХЦК обеспечила сравнимый (практически равный) по величине и продолжительности иммунный ответ к ХЦК-8 и ХЦК-4, с силой иммунной реакции организма кроликов на 4-х разовую иммунизацию просто конъюгатами ХЦК в смеси с полным адъювантом Фрейнда (табл. 1).

Помимо этого, можно видеть, что после однократной инъекции пролонгированной формы конъюгатов ХЦК, в отличие от многократной иммунизации, нарастание титра антител было плавным, без каких либо скачков и падений. Такая динамика роста титра антител к ХЦК-8 и ХЦК-4 вполне согласуется и объясняется динамикой высвобождения конъюгатов ХЦК из пролонгированной формы и нарастанием концентрации препаратов в организме животных. Как видно из таблицы 2, в отличие от одномоментного поступления всей дозы непродолговременного препарата ХЦК в организм из места инъекции (опыт 1), постепенность высвобождения конъюгатов ХЦК из пролонгированной формы дало возможность иммунной системе кроликов адекватно реагировать на постепенное повышение концентрации антигена в организме в виде плавного нарастания титра антител к ХЦК-8 и ХЦК-4, тем самым предоставляя организму время на адаптацию к изменению в уровне циркулирующего ХЦК, вследствие его частичной нейтрализации антителами. Другими словами, в опыте 2 не было отмечено снижение титра антител к ХЦК в середине тестируемого периода, как это наблюдалось в опыте 1 после второй иммунизации.

С позиции степени иммуногенности разных конъюгатов С-концевых фрагментов ХЦК, в опыте 2 наблюдалась такая же закономерность, как и в опыте 1, т.е. максимальной иммуногенностью обладал конъюгат ХЦК-8-БСА, минимальной – ХЦК-4-СП, промежуточной – ХЦК-8-СП и ХЦК-4-БСА. Следовательно, сам по себе пролонгирующий состав не оказал значимого влияния на

иммуногенность конъюгатов, но регулировал динамику высвобождения препаратов ХЦК, а значит динамику иммунного ответа.

Таким образом, результаты иммунологического тестирования испытуемой пролонгированной формы иммуногенных конъюгатов С-концевых фрагментов ХЦК показали пригодность данной формы для ее использования при разработке более технологичных и дешевых компонентов создаваемой вакцины аппетита с целью получения достаточного по величине и продолжительного по времени антительного ответа к эндогенному ХЦК.

Выводы

1. Конъюгаты синтетических пептидов ХЦК-8 и ХЦК-4 с БСА и с сополимером винилпирролидона с кротоновой кислотой (СП) иммуногенны.

2. Выявленные титры антител к ХЦК-8 и ХЦК-4 позволили построить следующий ряд испытуемых конъюгатов по степени убывания иммуногенной активности: ХЦК-8-БСА, ХЦК-8-СП, ХЦК-4-БСА, ХЦК-4-СП.

3. Препараты пролонгированного действия конъюгатов ХЦК-8 и ХЦК-4, приготовленные на основе сополимера винилкапролактама с винилацетатом, вызвали у иммунизированных кроликов, в результате однократной инъекции, образование выраженного антительного ответа, вполне сопоставимого с таковым после многократного введения.

4. Титры антител к ХЦК-8 и ХЦК-4 указывают на потенциальную пригодность всех иммуногенных конъюгатов для дальнейшего их использования при проверке исходного теоретического положения о потенциальной возможности повышения потребления корма сельскохозяйственными животными, используя иммунобиотехнологический прием аутоиммунонейтрализации гастроинтестинального гормона ХЦК, как ингибитора потребления корма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Фрейдлин И.С. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией Журн. эволюц., биохимии и физиологии, 1989, 25, 2:176-181.
2. Галочкин В.А., Эрнст Л.К., Триндо Л.И., Колоскова Е.М., Назаров Н.А., Черных В.Я. Иммунобиотехнологический подход к регуляции репродуктивной функции, обмена веществ и продуктивности животных. С.-х. биология, 1994, 2:3-19.
3. Данилова Р.А., Ашмарин И.П. Инверсная иммунорегуляция поведения и проблема существования регуляторных аутоантител. Успехи физиол. наук, 1994, 25, 1:3-23.
4. Климов П.К. Пептиды и пищеварительная система. Л.:Наука, 1983:271с.
5. Корнев Е.А. Иммунофизиология. СПб. Л.:Наука, 1993:684с.
6. Назаров Н.А., Галочкин В.А. Разработка тест-системы иммуноферментного анализа для определения титра антител к окта- и тетрафрагментам холецистокинина. Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания с.-х. животных. Отчеты ВНИИФБиП, Боровск, 1994:184-185.
7. Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. Журн. Всес. хим. о-ва, 1988,33, 5:502-522.
8. Полосатов М.В., Самарцев М.А., Климов П.К., Прусаков А.Н. Антитела (Ig G) к гастрину в крови у здоровых людей и животных. ДАН СССР, 1975, 255, 1:235-237.
9. Прусаков А.Н., Самарцев М.А., Полосатов М.В. Иммунохимическое изучение пептидов, отвечающих аминокислотной последовательности гастрин. Биооргани. химия, 1979, 5, 7:1025-1032.

10. Уголев А.М. Энтеринная (кишечная гормональная) система. Л.: Наука, 1978:314с.
11. Хаитов Р.М. Разработка вакцин нового поколения на основе структурного объединения антигенов и синтетических полимерных иммуномодуляторов. Вопросы мед. химии, 1997, 43, 5:390-400.
12. Chao J., Mayfield R.W., Chao L. Circulating autoantibodies to mammalian tissue kallikreins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1988, 187:320-326.
13. Elmgist J.K., Lynne R., Ross Hsu W., Rothcheld M.F., Jacobson C.D. Cholecystokinin like immunoreactivity in the brain of young Meishan and Duroc pigs. J. Anim. Breed. Genet., 1993, 110, 6:473-479.
14. Hashizume T. and Kanematsu. Effect of cholecystokinin octapeptide on the release of growth hormone in perfused pituitary and hypothalamus of the Goat. Animal Sci. Technol. (Jpn.), 1991, 62, 4:343-350.
15. McLaughlin C.L., Baile C.A., Buonomo F.C. Effect of CCK antibodies on food intake gain in Zucker rats. Physiol. Behav., 1985, 34:277.
16. Pekas J.C. and Trout W.E. Stimulation of food intake and growth of swine by CCK-immunization. Growth Development and Aging, 1990, 54:51-56.
17. Silver A.J. and Morley J.E. Role of CCK in regulation of food intake. Progress in neurobiology, 1991, 36, 23-34.
18. Trout W.L., Pekas J.C., Schanbacher B.D. Immune, growth and carcass responses of ram lambs to active immunization against desulfated cholecystokinin (CCK-8). J. Anim. Sci., 1989, 67:2709-2714.

РЕГУЛИРОВАНИЕ СКОРОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ НИЗКО- МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ОБРАЗОВАНИЕМ ИНТЕРПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Е.М. Колоскова, В.А. Галочкин

Рассматриваются препараты пролонгированного действия – полиакриламидные микросферы и гидротермогели на основе нового отечественного полимера – поливинилкапролактама, иммобилизация в которых низкомолекулярных биологически активных веществ осуществляется образованием интерполимерных комплексов с полимерами различной природы. Продемонстрирована возможность создания препаратов пролонгированного действия с различной кинетикой высвобождения иммобилизованного низкомолекулярного вещества.

Введение

При внедрении в практику новых биологически активных веществ (БАВ), особенно белковой природы, быстро разрушающихся под действием эндопротеаз или ферментов желудочно-кишечного тракта, остро стоит вопрос о продлении срока их жизни в организме. С другой стороны, применение таких веществ предполагает высокую частоту их перорального или парентерального приема. Разработка и использование препаратов пролонгированного действия (ППД) БАВ позволяет в значительной степени избавиться от этих проблем: при иммобилизации активного вещества в матрицах-носителях, образовании гидролизующих ковалентных или нековалентных комплексов с векторными молекулами, при даже механической защите препарата постепенно деградирующими пленками и прочих многочисленных способах защиты стабилизируются молекулы БАВ, контролируется скорость их выделения в организм из матрицы-носителя (1, 8).

Одним из перспективных и уже достаточно широко применяемых способов пролонгирования действия БАВ является их иммобилизация в матрицу-гидрогель с контролируемым или неконтролируемым размером пор (3). Другое самостоятельное направление в поисках решения пролонгирования и адресной доставки заключается в создании интерполимерных комплексов с молекулами-носителями, "нагруженными" хитроумно иммобилизованными БАВ, "адресами" и даже серверными компонентами, выполняющими дополнительные полезные функции, например, иммуностимулирующие или антикоагулянтные (4).

Сочетание указанных способов очень перспективно для иммобилизации низкомолекулярных БАВ, в частности, пептидов: регулирование размера пор, например, полиакриламидного гидрогеля, не приводит к заметному пролонгированию выделения соединений с молекулярной массой ниже 2000 Да, при этом резко замедляется скорость деградации матрицы. Однако, использование в составе матрицы соединений, способных той или иной химической связью к взаимодействию с БАВ, в зависимости от прочности этой связи, существенно замедляет скорость его высвобождения.

Гонадолиберин, видонеспецифичный гипоталамический пептид, стоящий на вершине пирамиды половых гормонов, и его синтетические аналоги нашли широкое применение как в медицине, так и в ветеринарии и животноводстве. Регулируя концентрацию пептида в крови, можно нормализовать, подавить и активизировать репродуктивную систему организма (5, 6). Отечественный синтетический аналог гонадолиберина – сурфагон – давно исследуется и применяется в животноводстве с целью синхронизации наступления охоты и повышения оплодотворяемости сельскохозяйственных животных, были предприняты успешные попытки иммунокастрации бычков его конъюгатами с высокомолекулярными носителями (7). Использование сурфагона в его пролонгированной форме позволило бы во всех случаях решить любую из поставленных производственных задач с меньшими затратами, позволяя вместо многочисленных инъекций обойтись несколькими или даже единственной.

Материалы и методы

В качестве матриц-носителей нами были выбраны полиакриламидные (ПААГ) микросферы (МС) и гидротермогели на основе поливинилкапролактама (ПВК) и его сополимеров, способных к образованию гидрогелей при физиологических температурах (8).

Формирование ПААГ МС осуществляли методом эмульсионной полимеризации (9) в нашей модификации. Готовили МС с соотношением акриламида и метилен-бис-акриламида 40/5. Высокомолекулярные наполнители различной химической природы вводили в процессе формирования МС. Нами были выбраны поливинилпирролидон (ПВП), декстран-сульфат (ДС), декстран (М.м.=70кДа), сывороточный альбумин (СА), гепаринат и альгинат натрия. В качестве низкомолекулярных испытуемых соединений брали бромфеноловый синий (БФС) (М.м.=670Да) и сурфагон (М.м.=1200Да). МС отмывали от непрореагировавших мономеров и катализатора и лиофилизировали. Размер МС не превышал 100 мкм.

Для определения эффективности работы гидротермогелей готовили 10-15% раствор сополимера винилкапролактама с виниловым спиртом (85:15%, М.м.=200000Да). В качестве стабилизаторов-наполнителей брали декстран-сульфат и БСА. Иммобилизованным веществом был сурфагон. Каждому опытному образцу соответствовал свой контроль.

Эксперименты *in vitro* по определению длительности выделения иммобилизованных соединений проводили в 0.05 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, с 0,05% азида натрия. Навеску МС помещали в диализный мешок с размером пор до 6000 Да. Концентрацию красителя или пептида в приемном буфере определяли спектрофотометрически: для БФС при длине волны 490 нм, для сурфагона – 280 нм. Контролем был диализ БФС и сурфагона и МС без иммобилизованного низкомолекулярного вещества. Буфер меняли каждые двое суток.

Результаты и обсуждение.

Определяли влияние плотности, степени сшивки матрицы ПААГ

МС и высокомолекулярных наполнителей на скорость выделения иммобилизованного БФС и сурфагона. Были приготовлены МС следующего состава: 25/5/10% ПВП (10000 Да), 25/5/10% ПВК (100000 Да), 25/5/2% альгинат натрия, 25/5/2% гепаринат и 25/5/5% БСА, где x/y/z – соотношение компонентов матрицы. x – % содержания акриламида, y – % содержание метиленбисакриламида от общего количества мономеров, z – % содержание полимера-наполнителя в объеме "сырых" микросфер. Динамика выделения БФС и сурфагона из таких микросфер представлена на рис. 1 и рис. 2 соответственно.

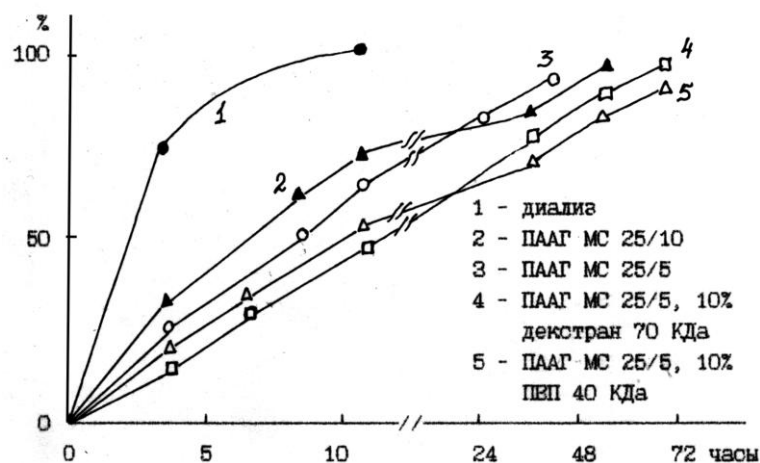


Рис.1. Динамика выделения бромфенолового синего из ПААГ МС при его совместной иммобилизации с высокомолекулярными наполнителями

Использовали свойство поливинилкапролактама и его сополимеров образовывать при 37 С биосовместимые гидротермогели с ячеистой структурой. Были приготовлены следующие формы: 1) раствор полимера + сурфагон, 2) раствор полимера + ДС + сурфагон, 3) раствор полимера + БСА + сурфагон. Эксперимент проводили при 37 С в условиях, описанных выше. В качестве контроля брали перечисленные растворы, не содержащие пептид. Динамика выделения сурфагона представлена на рис. 3.

Иммобилизация низкомолекулярных веществ в полиакриламидные матрицы без высокомолекулярного наполнителя не позволяет получить длительно работающий препарат. Однако, использование полимеров с достаточно высокой молекулярной массой уменьшает свободный объем матрицы и замедляет выход БФС и сурфагона. Так как ни декстран, ни ПВП в растворах не образуют с БФС и сурфагоном прочных химических связей, изменение скорости диффузии связано только с уменьшением свободного внутреннего объема геля за счет высокой концентрации наполнителя, неспособного при данных параметрах матрицы быстро диффундировать из нее. Учитывая низкую скорость биodeградации ПААГ с высокой степенью сшивки, мы в состоянии решить эту проблему, "нагружая" низкосшитую матрицу

высокомолекулярным веществом, биосовместимым с организмом и способным к выведению из нее. Если в качестве наполнителя брать вещества, способные образовывать интерполимерные комплексы различной степени взаимодействия с иммобилизуемым биологически активным веществом, скорость выделения существенно замедляется. Введение в состав МС полианионов, образующих достаточно прочные ионные комплексы с сурфагоном, резко замедляет выделение пептида до 10 и более суток (рис. 2).

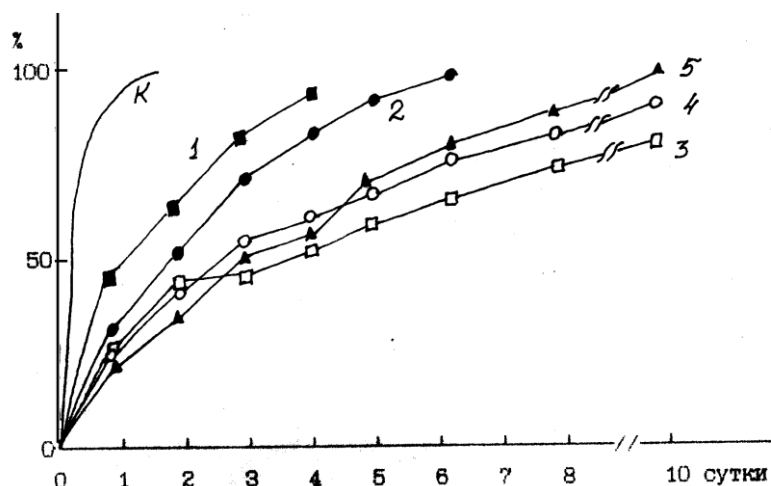


Рис. 2. Динамика выделения сурфагона из полиакриламидных микросфер при совместной иммобилизации с высокомолекулярными наполнителями. К - диализ, 1 - 25/5/10 ПВП 40 КДа, 2 - 25/5/10 ПВК 100 КДа, 3 - 25/5/2 альгинат Na, 4 - 25/5/2 гепаринат, 5 - 25/5/5 ЧСА

Если в предыдущих примерах характер взаимодействия пептида с полимерами определялся только гидрофобными или ионными связями, то при совместной иммобилизации сурфагона с альбумином речь идет о совокупности всех возможных химических контактов. В итоге высвобождение пептида протекало более равномерно, хотя и не дольше, чем при иммобилизации с анионами.

Для полного выделения сурфагона из гидрогеля 1 (рис. 3) понадобилось 3-е суток. Но совместная иммобилизация с альбумином способствовала более равномерному и длительному выделению пептида. Использование же ДС еще существенно замедлило процесс.

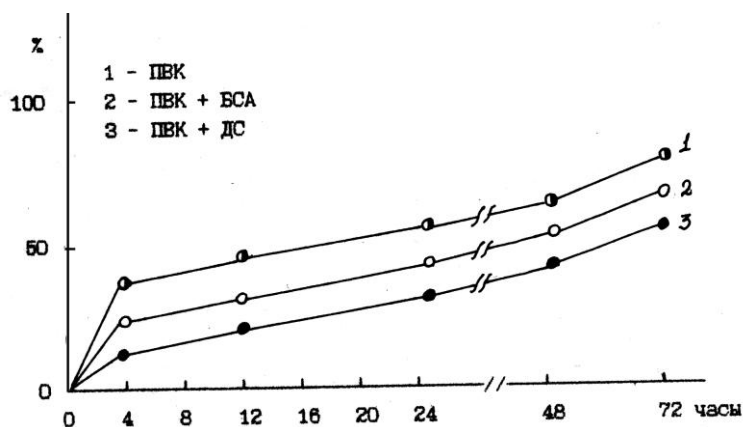


Рис.3. Динамика выделения сурфагона из поливинилкапролакта темного термогеля при 37 °C. о совокупности всех возможных химических контактов. В итоге высвобождение пептида протекало более равномерно, хотя и не дольше, чем при иммобилизации с анионами.

В экспериментах *in vitro* мы отслеживали только выделение свободного сурфагона из матриц, скорость которого определялась только структурными характеристиками микросфер и степенью диссоциации комплекса полимер-сурфагон. В условиях *in vivo* в кровеносную систему животного могут проникать и непродиссоциировавшие комплексы, характеризующиеся высокой степенью взаимодействия БАВ-полимер. В частности, нековалентный комплекс декстран сульфат – сурфагон при определенных стехиометрических соотношениях дает нерастворимый осадок, что свидетельствует о низкой степени диссоциации. Возможно, такие устойчивые интерполимерные системы способны обладать иммуногенными свойствами. Для дифференциации процессов, происходящих после введения животным некоторых из перечисленных ППД, необходимо иметь на вооружении систему определения, в частности, концентрации сурфагона и гонадолиберина, а также уметь определять титр антител к их иммуногенным комплексам. Это условие мы считаем необходимым для дальнейшей успешной работы над задачей создания препаратов пролонгированного действия сурфагона и других низкомолекулярных биологически активных веществ.

Выводы

В экспериментах *in vitro* показана принципиальная возможность регулирования скорости выделения низкомолекулярных биологически активных веществ из ПААГ микросфер и гидротермогелей на основе поливинилкапролактама и его сополимеров их совместной иммобилизацией с полимерами-наполнителями, способными к образованию интерполимерных комплексов с биологически активным веществом. Степень взаимодействия БАВ с исследуемыми наполнителями определяет длительность работы ППД. Предложенный метод пролонгирования действия образованием интерполимерных комплексов в матрицах-гидрогелях является универсальным для любого типа низкомолекулярных гидрофильных БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П. Пути пролонгации действия нейропептидов Вестник РАМН. 1992 8:7-10.
2. Banerjee P.S., Hosny E.A., Robinson J.R. Parenteral delivery of peptide and protein drugs In: Peptide and protein drug delivery (ed. V.H.L.Lee) Marcel Dekker Inc., 1990:487-543.
3. Gehrke S.H., Lee P.I. Hidrogeles for drug delivery systems. Ed. by P. Tyle, M. Dekker Inc., N.-Y., 1990.
4. Хаитов Р.М. Разработка вакцин нового поколения на основе структурного объединения антигенов и синтетических полимерных иммуномодуляторов. Вопросы мед. химии, 1997, 43, 5:390-401.
5. Остин К., Шорт Р. (ред.). Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. М.:Мир, 1987.
6. Шаляпина В.Г. (ред.). Эндокринология репродукции. С.-П., Наука, 1991:5-41.
7. Галочкин В.А., Эрнст Л.К., Триндо Л.И. и др. Иммунобиотехнологический подход к регуляции репродуктивной функции, обмена веществ и продуктивности животных. Сельскохозяйственная биология, 1994, 2:3-14.
8. Марквичева Е.А., Пашкин И.И., Кириш Ю.Э. и др. Новый метод иммобилизации протеолитических ферментов в полимерных гидрогелях. Биоорганическая химия, 1994, 20, 3:257-260
9. Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В. В кн. Иммобилизованные клетки микроорганизмов (п/ред. Кощеенко К.А.), Пушкино, 1978:36-48.

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА СВИНЬИ И ЕГО ПРЕПАРАТЫ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Е.М. Колоскова, В.А. Матвеев, В.А. Галочкин

Лаборатория иммунобиотехнологии, лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности с.-х. животных

Рекомбинантный соматотропный гормон свиней неактивен в своей кристаллической форме. Его повышенная способность к образованию в растворах неактивных димеров и агрегатов затрудняет создание препаратов пролонгированного действия. Были подобраны условия, в которых рСТГс сохраняет активность в течение длительного времени даже при высоких концентрациях. В экспериментах на животных продемонстрирована возможность создания препаратов пролонгированного действия свиного соматотропина. Показано, что для разработки пролонгированных форм гормона необходима предварительная обработка: растворение в присутствии хаотропных агентов с последующей лиофилизацией или использование его в стабилизированных водно-масляных эмульсиях.

Введение

К настоящему времени химически синтезировано и получено биотехнологическими методами множество пептидов и белков, которые находят все более широкое применение в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Наряду с традиционными, разрабатываются новые способы введения этих препаратов в организм, позволяющие сохранить их биологическую активность, продлить физиологическое и терапевтическое действие, при этом обходясь минимальным количеством доз. Детально исследовано влияние длительного введения бычьего и свиного рекомбинантных гормонов (рСТГб и рСТГс) на обмен веществ и продуктивность животных (6, 9). По заключению экспертов ВОЗ признана полная безопасность для здоровья продукции, полученной от коров, обрабатывавшихся рСТГб (5). Во многих странах применяют пролонгированные формы рСТГб американских фирм "Монсанто" и "Эли Лилли", длительность действия однократной инъекции которых достигает 14 и 28 суток соответственно. Но пролонгированные формы рСТГс, приготовленные по аналогичной технологии, оказались совершенно неэффективны, несмотря на то, что оба гормона очень близки по составу, молекулярной массе и физико-химическим свойствам. Из колоссального количества предложенных патентных разработок до сих пор нет надежного коммерческого препарата пролонгированного действия (ППД) рСТГс, что резко ограничивает возможность его широкомасштабного использования. Промышленное производство и использование рСТГс открывает реальные перспективы повышения количества производимой свинины, улучшения диетических качеств и снижения затрат кормов на ее производство.

Трудности пролонгирования рСТГс в основном связаны как с низкой его растворимостью в буферах с физиологическими значениями pH, так и с его нестабильностью в растворах, выражающейся в

тенденции к образованию неактивных димеров и агрегатов, усиливающейся в высококонцентрированных растворах гормона. Использование же растворов с низкими концентрациями приводит к неоправданно большому объему вводимого препарата. Физиологическая температура резко ускоряет процесс агрегации. Уменьшению и замедлению процессов агрегации способствует введение в водную фазу стабилизирующих веществ: глутаминовой и аскорбиновой кислот, глицерина и других полиолов, сурфактантов, видоспецифических альбуминов и др.. При некоторых сочетаниях компонентов стабилизирующего состава 30%-й раствор рСТГс, при выдерживании 100 суток при 37°C, теряет всего 10% активности (7).

Материалы и методы

Решение поставленной перед нами задачи создания отечественного ППД рСТГс, предложенного американской фирмой "Питман Мур", мы начали с традиционного предположения: если работают простые в решении ППД рСТГб – должны работать и аналогичные рСТГс, в чем и потерпели неудачу. Следующим этапом исследований было изучение физико-химических свойств рСТГс: растворимость гормона, поиск условий для сохранения его стабильности и предотвращения образования неактивных димеров и агрегатов. Далее следовала разработка ППД рСТГс и носителей для парентерального введения препарата в экспериментах *in vitro* и *in vivo* определяли эффективность работы отобранных на предыдущем этапе препаратов.

В качестве матриц-носителей нами были выбраны: 1) ацетил-/ацетилфталилцеллюлозные микросферы (МС), приготовленные методом выпаривания растворителя (6), 2) полиакриламидные микросферы (ПААГ МС), приготовленные способом эмульсионной полимеризации (1) в нашей модификации. Диаметр полученных МС был не более 100 мкм. Инъецируемой основой, обладающей собственным пролонгирующим действием, брали вазелиновое и растительное масла с загущающими добавками (воск или моностеарат алюминия). Эксперименты *in vitro* по определению длительности выделения рСТГс проводили помещением навески ППД в диализный мешок с размером пор свыше 60 КДа, погруженный в приемный 0,05М фосфатно-солевой буфер с 0,05% азида натрия, pH 7,4. Концентрацию гормона определяли методом иммуноферментного анализа (2).

Результаты и их обсуждение

Некоторые свойства рСТГс. Используемая нами цинковая соль рСТГс фирмы "Питман Мур" обладает чрезвычайно низкой растворимостью и склонностью к образованию биологически неактивных димеров и агрегатов. Методом гель-хроматографии показано, что даже исходный препарат имеет до 3,4% димера. Растворимость гормона повышается с ростом pH, но и в щелочных условиях ионная сила и состав буфера имеют большое значение. Наиболее подходящим был найден 0,05М бикарбонатный буфер, pH 9,5, растворимость в котором без добавления хаотропных агентов составила 0,5-2%.

Исследование влияния условий хранения растворов с низкими концентрациями рСТГс на его стабильность показало, что растворы гормона даже с концентрацией 0,1-0,3% при комнатной температуре и при +4°C спустя 3-е суток теряли 80% исходной активности, определенной методом ИФА. 1-2%-ые замороженные растворы после оттаивания сохраняли 70-50% активности. Добавление в тот же буфер

мочевины до 4М-ой концентрации приводило всего к 5-10%-ной потере активности спустя 7 суток хранения при комнатной температуре.

При формировании целлюлозных МС методом выпаривания растворителя, частицы рСТГс контактируют с ацетоном, что может привести к потере биологической активности гормона. В результате дополнительных экспериментов было показано, что независимо от наличия протекторов при комнатной температуре после контакта с органическим растворителем в течение 1 часа теряется до 40% иммунологической активности, тогда как снижение температуры до +4 С существенно не сказывается на потерях активности гормона (до 0-5%).

Для приготовления ПААГ МС, содержащих до 10-40% рСТГс, необходимы высококонцентрированные растворы гормона. В 30% растворе аргинин-НС1 в 0,2 М трис-буфере, рН 7,4 белок растворяется до 10%-ой концентрации. Замена аргинина 24% мочевины дает такую же растворимость рСТГс. Акриламид оказывает аналогичное мочеvine хаотропное действие: уже в 15% растворе мономера можно получить 10%-ю концентрацию гормона, а в 30%-ном – 20%-ный раствор. Этот факт чрезвычайно полезен: рСТГс можно вносить непосредственно в раствор мономеров, поскольку в процессе полимеризации белок не включается в состав матрицы, а иммунологическая активность гормона, экстрагированного из гомогената готовых МС соответствует 90-95% исходной. Добавление в высококонцентрированные растворы рСТГс наряду с хаотропными агентами низкомолекулярных сахаров, глицерина до 10% способствовало сохранению иммунологической активности образцов в течение длительного времени, что согласуется с данными других исследователей (8).

По-видимому, низкая растворимость рСТГс обусловлена содержанием цинка в его составе и спецификой приобретенной в процессе промышленного производства кристаллической структуры, в результате чего внутримолекулярные взаимодействия приводят к выведению гидрофобных аминокислотных остатков на поверхность молекулы, делая ее малорастворимой и склонной к агрегации с другими молекулами. Присутствие в растворе хаотропных агентов раскрывает молекулу, высвобождает гидрофильные остатки и увеличивает растворимость. Полиолы или амины образуют многочисленные водородные связи с освободившимися остатками, тем самым стабилизируя рСТГс в растворе.

Вся вышеизложенная информация свидетельствует о возможности создания ППД рСТГс на основе водно-масляных эмульсий.

Эксперименты in vitro. Определяли влияние характеристик полиакриламидной матрицы и высокомолекулярного наполнителя декстран 70Т на скорость выделения соматотропина из ПААГ МС. Полезная нагрузка составляла 10% гормона от веса МС, размер МС – менее 100 мкм. Контроль – диализ 10%-го раствора рСТГс. Результаты представлены на рис. 1. В аналогичном эксперименте проверяли влияние соотношения растворимой (ацетилфталилцеллюлоза) и нерастворимой (ацетилцеллюлоза) компонентов целлюлозных МС на скорость высвобождения соматотропина. Результаты представлены на рис. 2.

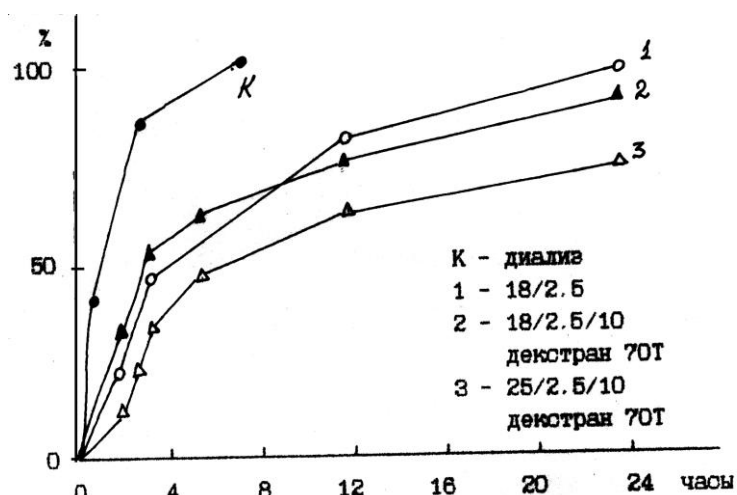


Рис.1. Динамика выделения рСТГс из ПААГ МС в зависимости от плотности матрицы и присутствия высокомолекулярных наполнителей.

Если диализ рСТГс завершался за 8 часов, иммобилизация гормона в ПААГ МС способствовала увеличению этого периода втрое. Введение в состав матриц декстрана 70Т уменьшило количество выделившегося за этот срок белка на 10%. При прочих равных параметрах увеличение плотности геля на 7% позволило высвободиться меньшему на 20% количеству гормона.

Динамика высвобождения рСТГс из целлюлозных МС очевидным образом зависела от соотношения растворимого и нерастворимого компонентов матрицы. Однако, на форму кривой выделения существенным образом влияли размер иммобилизуемых частиц рСТГс, размер полученных МС, соотношение белок:полимер.

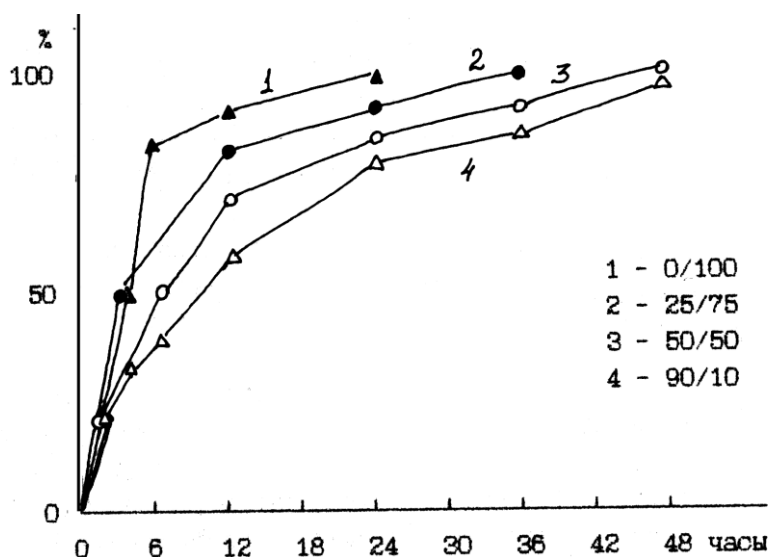


Рис.2. Динамика выделения рСТГс из целлюлозных МС с различными соотношениями ацетил- и ацетилфталилцеллюлозы. Соотношение белок:полимер 40:60 по весу.

Более длительное проведение эксперимента при выбранных условиях оказалось неэффективным, поскольку рСТГс димеризуется, выходя из матрицы, а низкомолекулярные стабилизирующие добавки быстро диффундируют в раствор, что, возможно, спустя какое-то время делает гормон неэффективным и в составе матрицы. Это свидетельствует о необходимости введения в приемный буфер как хаотропных агентов, так и стабилизирующих добавок. К сожалению, приняв привычную нам схему проведения экспериментов *in vitro*, мы не учли специфические свойства исследуемого белка.

Эксперименты на животных. В экспериментах на свиньях и кроликах, проведенных в условиях вивария ВНИИФБиП, сравнивали эффективность различных вариантов ППД рСТГс, в состав которых включали как микронизированный порошок необработанного рСТГс, предварительно лиофилизированный из растворов с добавлением хаотропных и стабилизирующих агентов, так и гормон, включенный в состав микросфер. Шприцуемой основой и носителем, обладающим самостоятельным пролонгирующим действием, брали вазелиновое или растительное масло с добавлением воска или моностеарата алюминия. Препарат животным инъецировали однократно и регулярно брали кровь для определения динамики концентрации соматотропина методом ИФА.

Подсвинкам массой 40 кг вводили суспензию измельченного кристаллического рСТГс и суспензию гормона, лиофилизированного из 30%-ного раствора аргинина (белок:аргинин-НС1 1:3 по весу) в носителе вазелиновое масло:4% моностеарат алюминия. Оказалось, что у животных первой группы концентрация гормона в крови была незначительно повышена относительно исходного уровня на протяжении 3-х суток после инъекции, тогда как у животных второй группы на 3-4-е сутки наблюдали более чем 10-кратный рост содержания соматотропина, уровень которого вернулся к исходному на 7-е сутки. Эксперимент на животных подтвердил неэффективность исходного кристаллического препарата рСТГс.

В опыте на кроликах сравнивали эмульсионный ППД рСТГс, в котором водная фаза содержала 10% гормона в 30% -ном растворе аргинин-НС1 в 0,2М Трис-НС1 буфере, pH 7.8, и аналогичную суспензионную форму, включающую измельченный лиофилизат указанного раствора. Носитель – соевое масло-4% моностеарата алюминия. В обоих случаях высокую концентрацию свиного соматотропина фиксировали на протяжении 14 суток. Полученный результат говорит о сохранении биологической активности рСТГс в растворах с высокой его концентрацией и в условиях организма. Длительность работы предложенных ППД, по-видимому, напрямую зависит от скорости биodeградации масляного носителя и уровня метаболизма животных, так как в опыте на свинках та же самая суспензия с лиофилизатом гормона работала не более 6 суток. Естественно полагать, что примерно такое же время будет работать и эмульсионная форма.

В следующем опыте на свинках проверяли влияние иммобилизации рСТГс в ПААГ МС на скорость выделения гормона. Приготовленные ПААГ МС (25/2,7), содержащие 10% гормона, были лиофилизированы и суспендированы в носителе соевое масло-4% моностеарат алюминия. Чтобы проверить, насколько эффективна иммобилизация соматотропина в микросферы, лиофилизированный раствор полиакриламида (М.м.=500000 Да), аргинина и рСТГс (1:3:1) суспендировали в том же носителе. В первом случае высокая после инъекции концентрация соматотропина постепенно снижалась, и через 9 суток в 2 раза превышала исходный уровень. Скорость выделения гормона из второго препарата не отличалась от таковой для случая без полиакриламида – длительность его работы составила 5-6 суток.

В описанном ранее эксперименте на боровках (3) сопоставление эмульсионной формы и ПААГ МС в одном и том же носителе показало, что иммобилизация рСТГс в микросферы способствует продлению работы препарата примерно в 2 раза (до 2-х недель). Сравнение эффективности носителей на основе растительного масла с моностеаратом алюминия или с пчелиным воском говорит в пользу последнего.

Выводы

Многочисленные эксперименты на животных показали, что несмотря на эффективность рСТГс производства фирмы "Питман Мур", при ежесуточных инъекциях растворов его кристаллическая форма в суспензионных препаратах не работает. Только растворы гормона в присутствии хаотропных агентов и стабилизирующих добавок при последующей лиофилизации делают рСТГс пригодным для использования в препаратах пролонгированного действия на основе суспензий или микросфер. Гормон, склонный к быстрому образованию неактивных димеров и агрегатов в традиционных буферных системах, в присутствии стабилизаторов и хаотропных агентов даже в концентрациях 10-30%, стабилен при физиологических температурах, что дает возможность использования его водно-масляных эмульсий как ППД, работающих в среднем 7 суток. Иммобилизация таких растворов в ПААГ МС в соответствующем носителе масло:воск продлевает работу препарата до 2-х недель.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В. В кн. Иммобилизованные клетки микроорганизмов (п/ред. К.А.Кошеченко), Пущино, 1978:36-48.
2. Галочкин В.А., Крюков О.А., Поташевский С.Н. и др. Тест-системы иммуноферментного анализа гормонов роста крупного рогатого скота и свиней (ИФА СТГк и СТГс). Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания с.-х. животных. Сб. тр. ВНИИФБиП с.-х. жив., 1990-1991:251.
3. Колоскова Е.М., Галочкин В.А. Испытание пролонгированных форм свиного соматотропина. Проблемы физиологии, биохим., биотехн. и питания с.-х. жив. Отчет ВНИИФБиП с.-х. жив., 1994:186.
4. Кольчик Ю.А., Драганов И.Ф. Использование гормонально активных биостимуляторов для повышения мясной продуктивности. НИИТЭИ, М:Агропром, 1994.
5. Оценка остаточных количеств некоторых ветеринарных препаратов в пище. Серия тех. докладов ВОЗ. 40-й доклад объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам. Женева, 1994.
6. Солодовник В.Д. Микрокапсулирование. М.:Химия, 1980.
7. Azain M.J. Composition for controlled release of polypeptides. EP N 0 374 120 A2, 1989.
8. Blum A., Sivaramakrishnan K.N., Viswanathan R. Stabilization of growth promoting hormones. EP N 0 211 601 A2, 1986.
Noblet J., Dubois S. Effect of porcine somatotropin on growing pigs Feed Mix., 1994, 2, 1:22-25.

ФИЗИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ЖИВОТНЫХ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА МЯСО

УРОВЕНЬ ГОРМОНОВ И ОБМЕН ВЕЩЕСТВ У РАСТУЩИХ БЫЧКОВ

*В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, Г.М. Ельченинов, Б.Д. Кальницкий,
М.Д. Аитова, К.Ш. Еримбетов, А.М. Материкин,
Н.Н. Семина, В.И. Агафонов, М.В. Сорокин*

В опыте на бычках холмогорской породы изучали взаимосвязь функционального состояния эндокринной системы с использованием питательных веществ корма и интенсивностью процессов биосинтеза белков и липидов. Показано, что функциональная активность инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота является ведущим фактором в регуляции субстратного обеспечения процессов биосинтеза белков и липидов и, соответственно, в реализации продуктивного потенциала животных. Бычки с высокой функциональной активностью инсулярного аппарата способны более эффективно использовать обменную энергию потребленного корма на рост, проявляют более высокую скорость отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани, и в результате этого, у них выше содержание мяса в туше. Исходя из полученных данных предлагается тест для условного деления бычков на метаболические типы на основании определения у них индекса функциональной активности инсулярного аппарата.

Введение

Исследование природы высокой мясной продуктивности животных продолжает оставаться приоритетным направлением фундаментальных исследований в области сельскохозяйственной биологии. Несмотря на определенные успехи, крайне недостаточно изучены механизмы, регулирующие степень биоконверсии корма на прирост тела и интенсивность биосинтеза основных компонентов мяса – белков и липидов. Актуальность и научно-практическое значение предлагаемых исследований в этом направлении связаны с возможностью разработки новых или усовершенствования имеющихся способов регулирования метаболизма с целью оптимальной реализации продуктивного потенциала животного и повышения конверсии корма в животноводческую продукцию, а также прогнозирования продуктивных реакций и обоснования рациональной системы питания.

Рост и развитие организма и, в частности, накопление мышечной ткани находятся под контролем центральных механизмов регуляции – нервной и эндокринной систем (11, 13). Результаты исследований этой проблемы показали, что в основе механизмов регуляции процессов биосинтеза в клетках различных органов и тканей имеются два направления – регуляция на уровне генома и регуляция на уровне субстратного обеспечения. Изменяя условия питания животных или применяя определенные биологически активные вещества можно регулировать обеспечение субстратами процессов биосинтеза белков, липидов и углеводов в органах и тканях, и в результате этого

обеспечить разную степень реализации продуктивного потенциала животного (12, 16).

Имеется достаточно большая информация о влиянии на продуктивность животных различных гормональных препаратов, активаторов и ингибиторов функции отдельных эндокринных желез. Однако, до настоящего времени механизмы гормональной регуляции обмена веществ и, в первую очередь, регуляции метаболических потоков для обеспечения основных физиологических функций у продуктивных животных изучены недостаточно.

В течение ряда лет в институте проводятся комплексные исследования на молодняке крупного рогатого скота. Основной целью их является познание механизмов, участвующих в регуляции распределения энергетических и пластических субстратов для обеспечения процессов биосинтеза белков и липидов.

В задачу данной работы входило изучение взаимосвязи функционального состояния эндокринной системы с количественными показателями биосинтеза белков и липидов, и интенсивностью обмена веществ в организме молодняка крупного рогатого скота, что необходимо для обоснования понятия и характеристики метаболического типа продуктивных животных.

Материал и методы

Исследования выполнены в виварии института на 7 бычках холмогорской породы 7-месячного возраста. Содержание бычков привязное, кормление –индивидуальное. Исследования проведены методом периодов – уравнительного и опытного. Рацион бычков на протяжении всего эксперимента состоял из злакового сена, силоса разнотравного и комбикорма. В уравнительный период животных в течение 49 дней приучали к потреблению данных кормов. В дальнейшем кормили бычков по нормам, разработанным для интенсивного выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота (8). При этом исходили из принципа нормированного скормливания комбикорма и максимального потребления сена и силоса. В среднем в течение опытного периода доля концентрированного корма в рационе составляла от 40 до 55 % по обменной энергии. В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма и корректировали рацион с учетом фактического потребления сена и силоса. В 9- и 12-месячном возрасте провели балансовые опыты, исследовали показатели газообмена масочным методом (7), брали пробы крови, рубцового содержимого и образцы мышечной и жировой ткани для биохимических исследований. Интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешиваний. В конце опыта 14-месячных бычков убили и провели оценку состава туши и биохимические исследования проб мышечной и жировой ткани.

Для оценки процессов пищеварения у бычков определяли потребление корма, переваримость основных питательных веществ рациона и поступление субстратов и метаболитов из пищеварительного тракта в кровь. Пробы рубцового содержимого в конце каждого баланса извлекали с помощью пищеводного зонда до утреннего кормления животных и через 3 и 5 часов после него. В пробах корма и кала определяли содержание сухого и органического вещества, сырого протеина, крахмала, разных фракций клетчатки, общих липидов и золы. В пробах содержимого рубца определяли: величину pH, уровень летучих жирных кислот и их молярное соотношение, концентрацию аммиака, общее количество бактерий и инфузорий и их видовой состав, а также протеолитическую, амилалитическую и целлюлозолитическую

активность микрофлоры. Пробы мышечной и подкожной жировой тканей брали биопсией длиннейшей мышцы спины в области 1-3 поясничных позвонков и в области грудины, соответственно.

Взятие крови проводили пункцией яремной вены до утреннего кормления животных и через 1 и 3 часа после него. В пробах цельной крови определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом (10). В образцах плазмы крови исследовали содержание инсулина, тироксина, трийодтиронина, кортизола радиоиммунологическим методом (9), НЭЖК, свободных аминокислот и мочевины (14).

Количественные характеристики синтеза и распада мышечных белков в организме бычков устанавливали по уровню выделения с мочой 3-метилгистидина и креатинина. Концентрацию 3-метилгистидина определяли на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339, а содержание креатинина химическим методом (5). При этом учитывали также результаты исследований *in vitro* по интенсивности включения ^{14}C -лейцина в образцы длиннейшей мышцы.

Интенсивность процессов липогенеза в подкожной жировой ткани оценивали *in vitro* по скорости включения ^{14}C -ацетата. Интенсивность липолиза определяли в опытах *in vitro* по выделению в инкубационную среду НЭЖК и глицерола при инкубации срезов жировой ткани в отсутствии ацетата и глюкозы (1).

Механизм реализации биологического действия гормонов в ряде случаев включает регуляцию активности ферментов, участвующих в транспорте кальция через клеточную мембрану. Наиболее важными из них являются кальций-аденозинтрифосфатаза (Са-АТФаза), которая обеспечивает магнийзависимый транспорт кальция через мембраны клетки и ее субклеточных структур, и магний-аденозинтрифосфатаза (Mg-АТФаза), участвующая в транспорте магния через мембраны.

Для определения активности Са-АТФазы применили принцип, описанный в литературе (2) с использованием метода определения аденозинтрифосфатазной активности миозина (6). Активность Са, Mg-АТФазы определяли исключением из общей аденозинтрифосфатазной активности Mg-АТФазы за счет добавления в инкубационную среду 0,1 мМ ЭДТА вместо кальция хлорида. Количество образовавшегося неорганического фосфора определяли в безбелковом супернатанте (15).

Математическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (4).

Результаты и обсуждение

Ранее проведенные нами исследования показали, что у бычков молочных пород индивидуальные различия по скорости роста, эффективности использования корма и гормональным показателям наиболее четко проявляются при уровне кормления, обеспечивающем среднесуточный прирост живой массы более 900 г. Определение функциональной активности инсулярного аппарата у бычков по реакции поджелудочной железы на прием корма позволяет в этот период выявить животных, способных при равных условиях кормления более полно реализовать продуктивный потенциал. Данный методический прием использовали для условного разделения животных на группы – с низкой (1-я группа) и высокой (2-я группа) функциональной активностью инсулярного аппарата и последующего анализа взаимосвязи между состоянием эндокринной системы, показателями продуктивности и параметрами обмена веществ у растущего молодняка крупного рогатого скота.

Результаты взвешивания животных показали, что в период с 8-и до 9-месячного возраста среднесуточный прирост живой массы у бычков

составил 802 грамма. В последующем интенсивность роста животных была выше и в период с 10-и до 12-месячного возраста среднесуточный прирост живой массы бычков составил 1119 г; в дальнейшем высокая интенсивность роста животных сохранилась. Поэтому для условного разделения бычков на группы были взяты результаты оценки функционального состояния инсулярного аппарата поджелудочной железы у животных в период интенсивного роста в 12-месячном возрасте.

Данные приведенные в таблице 1 свидетельствуют, что в 12-месячном возрасте бычки существенно различались по характеру реакции инсулярного аппарата на прием корма. У животных 1-й группы через час после приема корма концентрация инсулина увеличилась незначительно. Через 3 часа после кормления у бычков этой группы сохранилась тенденция к дальнейшему увеличению уровня инсулина. Животные 2-й группы отличались значительным подъемом содержания инсулина через 1 час после приема корма. В дальнейшем у большинства бычков этой группы уровень инсулина оставался высоким.

В качестве показателей, характеризующих функциональную активность инсулярного аппарата поджелудочной железы, можно использовать следующие индексы.

1. Среднюю скорость увеличения концентрации инсулина в плазме крови бычков в течение часа после приема корма – V (пг/мин.). Данный показатель характеризует скорость поступления инсулина из β -клеток поджелудочной железы в кровяное русло в ответ на прием корма.
2. Суммарную концентрацию инсулина в плазме крови через 1 и 3 часа после приема корма – C (пг /мл). По современным представлениям, биологический эффект при взаимодействии гормона с рецептором в значительной мере связан с их концентрацией. Поэтому значение индекса C должно в определенной степени отражать величину биологического действия инсулина.

Данные индексы рассчитали по следующим формулам:

$$V = I_1 - I_0 : 60; C = I_1 + I_3$$

где: I_0 – концентрация инсулина в плазме крови до кормления, пг/мл; I_1 – концентрация инсулина в плазме крови через 1 час после приема корма, пг/мл; I_3 – концентрация инсулина в плазме крови через 3 часа после приема корма, пг/мл.

Величина индексов у бычков разных групп приведена в таблице 2. Бычки 2-й группы отличались от животных 1-й группы более высокими значениями обоих индексов. Следовательно, реализация генетического потенциала продуктивности у этих животных происходит на фоне быстрого достижения высокого уровня инсулина в плазме крови в течение одного часа после приема корма.

Известно, что инсулин участвует в регуляции синтеза белков и липидов не только на внутриклеточном уровне, но и путем регуляции транспорта субстратов в клетки жировой и мышечной ткани. Можно предположить, что бычки с высокой функциональной активностью инсулярного аппарата могли иметь отличия в интенсивности отдельных метаболических потоков в период после приема корма и последующего переваривания и всасывания питательных веществ. В частности, под влиянием высокого уровня инсулина в крови возможно усиление транспорта глюкозы и аминокислот в клетки мышечной ткани, а также глюкозы и жирных кислот в адипоциты. В конечном итоге, при условии адекватного питания, у животных с высокой функциональной активностью инсулярного аппарата возможен повышенный синтез

липидов и мышечных белков, что, в свою очередь, может проявиться в более полной реализации продуктивного потенциала.

Таблица 1. Концентрация инсулина в плазме крови 12-месячных бычков, пг/мл

Группа	№ животного	Время после приема корма, часы		
		0	1	3
1	2	214	260	245
1	3	152	199	228
1	5	140	154	337
	M±m	169±22,9	204±30,7	270±33,9
2	1	145	316	317
2	4	116	381	326
2	6	244	317	411
2	7	256	487	221
	M±m	190±35,1	375±40,2	319±38,9
	% к 1-й гр.	112,4	183,8*	118,2

Здесь и далее: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001.

Для подтверждения данной гипотезы провели анализ полученных данных с учетом условного распределения бычков на группы.

Таблица 2. Значение индексов функциональной активности инсулярного аппарата у 12-месячных бычков

Группа	№ животного	V, пг/мин	C, пг/мл
1	2	0,77	505
1	3	0,78	427
1	5	0,23	491
	M±m	0,59±0,18	474±24,0
2	1	2,85	633
2	4	4,42	707
2	6	1,22	728
2	7	1,22	708
	M±m	2,43±0,77	694±20,9
	% к 1-й гр.	411,9**	146,4**

Результаты взвешивания показали, что в целом за весь период опыта среднесуточный прирост живой массы бычков 2-й группы был выше на 11,1 % , чем 1-й группы (табл. 3).

Таблица 3. Масса тела и среднесуточный прирост у бычков с разным индексом активности инсулярного аппарата

Показатели	1-я группа	2-я группа	% к 1-й группе
Масса тела, кг:			
8 месяцев	124±5,8	118±7,3	95,2
9 месяцев	149±4,4	147±7,5	98,7
12 месяцев	235±11,9	232±10,2	98,7
14 месяцев	282±4,4	295±11,9	104,6
Среднесуточный прирост, г:			
8-9 месяцев	735±44,8	853±40,0	116,1
10-12 месяцев	1103±85,4	1130±32,8	102,4
8-14 месяцев	904±28,1	1004±31,5	111,1

В результате этого животные 2-й группы, имевшие меньшую массу тела в начале опыта, в 14-месячном возрасте на 13 кг оказались тяжелее бычков 1-й группы.

Прирост массы тела является суммарным значением ряда процессов, протекающих в организме животного – накопление массы мышечной и жировой ткани, увеличение массы скелета и внутренних

органов. Поэтому в 14-месячном возрасте провели убой животных и последующий анализ показателей, характеризующих мясную продуктивность бычков.

Согласно данным таблицы 4, у животных 2-й группы по сравнению с 1-й было больше абсолютное и относительное содержание мяса в туше, меньше масса костей, выше соотношение мясо/кости и большее количество внутреннего жира. Эти данные свидетельствуют, что бычки с высокой функциональной активностью инсулярного аппарата способны при равных условиях кормления и содержания более полно реализовать продуктивный потенциал.

Таблица 4. Показатели мясной продуктивности 14-месячных бычков с разным индексом активности инсулярного аппарата

Показатели	1-я группа	2-я группа	% к 1-й группе
Масса туши, кг	146,6±1,3	147,7±5,4	100,8
Количество мяса в туше:			
%	71,6±0,12	74,0±0,64	103,4
кг	105,0±0,74	111,2±4,76	105,9
Количество костей в туше:			
%	28,4±0,12	26,0±0,64	91,5*
кг	41,6±0,55	38,1±1,01	91,6*
Соотношение мясо/кости	2,52±0,01	2,85±0,10	113,1*
Содержание внутреннего жира в туше, кг	4,88±0,09	6,23±0,33	127,7*
Содержание сухого вещества в длиннейшей мышце спины, %	26,2±0,89	27,7±1,54	105,7
Содержание энергии в длиннейшей мышце спины, кДж/г нативной ткани	5,85±0,19	6,04±0,39	103,2
Концентрация липидов в длиннейшей мышце спины, %	0,93±0,046	0,99±0,05	106,5

Не вызывает сомнения тот факт, что рост, развитие и формирование продуктивных качеств у животных связано с функционированием целого ряда генов. Соответственно, и эндокринная система является высокоорганизованной интегрированной системой, обеспечивающей эффективную регуляцию процессов метаболизма. Изменение функциональной активности одной из эндокринных желез через некоторое время, как правило, сопровождается адаптивными изменениями активности других эндокринных желез. В частности, проявление биологического действия инсулина в значительной мере зависит от количества таких гормонов, как соматотропин, кортизол, тиреоидные гормоны и катехоламины.

Анализ полученных данных показал, что в 9-месячном возрасте у бычков 2-й группы по сравнению с 1-й группой установлена тенденция к более высокому содержанию тироксина до и после приема корма и достоверно более высокому базальному уровню кортизола (табл. 5). Можно предполагать, что у этих животных за счет повышенной функции щитовидной железы больше субстратов использовалось на энергетические цели, а за счет высокого уровня кортизола повышалась интенсивность процессов глюконеогенеза в печени из аминокислот, поступающих из мышечной ткани.

При данном уровне кормления, который обеспечивал среднюю интенсивность роста животных, подъем концентрации инсулина в плазме крови бычков обеих групп после приема корма происходил без снижения содержания глюкозы в крови. Следовательно, поступление глюкозы в кровь в этот период за счет процессов глюконеогенеза в печени и всасывания их из желудочно-кишечного тракта соответствовало интенсивности использования ее органами и тканями.

Таблица 5. Концентрация гормонов и глюкозы в крови 9-месячных бычков с разным индексом функционального состояния инсулярного аппарата

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Тироксин, нг/мл			
1	50,9±2,50	42,7±1,81	42,6±3,20
2	55,5±3,25	47,7±2,52	50,4±4,32
% к 1-й гр.	109,0	111,7	118,3
Трийодтиронин, нг/мл			
1	1,72±0,16	1,91±0,23	1,79±0,13
2	1,70±0,11	1,89±0,03	1,89±0,03
% к 1-й гр.	98,8	99,0	105,6
Кортизол, нг/мл			
1	9,8±0,92	8,2±0,40	13,0±1,43
2	17,2±2,48	8,3±0,25	10,4±1,32
% к 1-й гр.	175,5*	101,2	80,0
Глюкоза, мг%			
1	69,3±1,20	72,0±2,65	76,3±3,20
2	69,8±2,95	75,0±2,12	74,8±1,80
% к 1-й гр.	100,7	104,2	98,0

Этот период опыта проводился в январе. Температура воздуха в помещении была +2 – +5°C градусов при относительной влажности воздуха более 90%. По-видимому, в этих условиях бычки были вынуждены дополнительно тратить часть субстратов для поддержания температурного баланса организма и, соответственно, меньше использовать их для синтеза белков и липидов.

В период интенсивного роста животных в 12-месячном возрасте у бычков 2-й группы по сравнению с 1-й группой так же была более высокая концентрация тироксина в плазме крови до и после приема корма (табл. 6). Следовательно, независимо от температурных условий содержания животных (данный период опыта проводили в апреле при температуре воздуха в помещении +10 – +15°C) бычки с повышенной функциональной активностью инсулярного аппарата имели выше содержание тироксина.

В отличие от 9-месячного возраста, в данный период опыта не отмечено увеличения базального уровня кортизола у животных 2-й группы по сравнению с 1-й группой (табл. 6). Можно предположить, что бычки обеих групп с одинаковой интенсивностью использовали аминокислоты для образования глюкозы.

Таблица 6. Концентрация гормонов и глюкозы в крови 12-месячных бычков с разным индексом функционального состояния инсулярного аппарата

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Тироксин, нг/мл			
1	57,8±3,59	65,2±4,09	66,4±5,00
2	60,7±4,30	69,9±4,57	82,5±1,52
% к 1-й гр.	105,0	107,2	124,2*
Трийодтиронин, нг/мл			
1	1,99±0,10	2,15±0,13	2,05±0,06
2	2,08±0,05	2,06±0,07	2,22±0,10
% к 1-й гр.	104,5	95,8	108,3
Кортизол, нг/мл			
1	12,6±2,89	7,8±0,32	15,1±0,62
2	11,2±2,02	9,0±0,58	13,5±2,37
% к 1-й гр.	88,7	115,4	89,4
Глюкоза, мг%			
1	90,7±1,86	79,0±5,57	74,7±1,76
2	86,0±5,94	76,8±3,42	77,8±2,06
% к 1-й гр.	94,8	97,2	104,1

В 12-месячном возрасте у бычков обеих групп установлено снижение концентрации глюкозы после приема корма (табл. 6). Следовательно, в период высокого среднесуточного прироста живой массы (более 1000 г) организм жвачных животных испытывает напряженность с обеспечением гомеостаза глюкозы. Контринсулярные механизмы в этот период не способны адекватно потребностям организма активизировать процессы глюконеогенеза. В результате значительного увеличения концентрации инсулина в плазме крови после приема корма в этот период возрастает использование глюкозы органами и тканями. При этом, по-видимому, усиливается использование глюкозы не только для обеспечения процессов биосинтеза белков и липидов, но и для нормального функционирования пищеварительной системы, которая должна испытывать существенные перегрузки с возросшим потреблением питательных веществ.

До настоящего времени не ясна роль инсулина в регуляции процессов пищеварения у жвачных животных. Многочисленные экспериментальные данные по этому вопросу больше поставили вопросов, чем дали ответов. Установлено, что увеличение уровня кормления в большинстве случаев приводит к усилению поступления инсулина в кровь (23). В то же время недостаточно информации о роли повышенного уровня инсулина в регуляции процессов пищеварения. По-видимому, при изучении этих вопросов мало использовать экспериментальный материал, полученный в опытах на объектах с различной патологией инсулярного аппарата поджелудочной железы или при введении животным или людям лечебных доз инсулина. В наших опытах уровень инсулина в плазме крови бычков не выходил за рамки физиологических норм. Поэтому, исследование взаимосвязи между функциональной активностью инсулярного аппарата и характером процессов пищеварения у бычков разных метаболических типов является достаточно обоснованным методическим приемом для познания роли инсулина в регуляции процессов метаболизма у жвачных животных. Для анализа взаимосвязи были использованы данные по балансу сухого вещества, энергии и азота.

Анализ результатов исследования процессов пищеварения показал, что различия между животными в функциональной активности эндокринных желез, показателях обмена веществ и продуктивности не связаны с дополнительным потреблением бычками 2-й группы питательных веществ и энергии (табл. 7, 8 и 9).

Таблица 7. Потребление и переваримость сухого вещества и фракций клетчатки 12-месячными бычками

Показатели	1-я группа	2-я группа	% к 1-й группе
Потреблено, кг:			
сухого вещества	6,30±0,11	5,74±0,11	91,1*
сырой клетчатки	1,22±0,04	1,04±0,03	85,2*
НДК	2,38±0,07	2,03±0,07	85,3*
КДК	1,29±0,04	1,09±0,04	84,5*
Переваримость, %			
сухого вещества	61,4±4,87	58,7±0,98	95,6
сырой клетчатки	36,5±7,2	25,1±1,79	68,8
НДК	35,8±7,01	27,8±1,75	77,7
КДК	30,3±7,75	19,9±2,41	65,7

Приведенные в таблицах данные свидетельствуют о парадоксальном, на первый взгляд, снижении потребления животными 2-й группы по сравнению с 1-й группой сухого вещества, сырой клетчатки и ее фракций. При этом обнаружено снижение переваримости этих

компонентов корма, что в свою очередь способствовало снижению у этих бычков количества переваренных питательных веществ.

Аналогичные, но менее выраженные изменения установлены в потреблении и переваривании энергии и азота бычками с разной функциональной активностью инсулярного аппарата (табл. 8 и 9). Следовательно, бычки, отличающиеся повышенной функциональной активностью инсулярного аппарата, способны обеспечивать на высоком уровне процессы биосинтеза белков и липидов за счет более экономного использования поступивших субстратов. Это согласуется с тенденцией к снижению затрат энергии на теплопродукцию на 8,8 %, увеличению энергии, отложенной в продукцию, на 8,0% и, в конечном итоге, увеличению эффективности использования обменной энергии на рост и биосинтез на 19,7 %.

Таблица 8. Потребление и использование энергии 12-месячными бычками

Показатели	1-я группа	2-я группа	% к 1-й группе
Валовая энергия, МДж	110,7±4,48	105,3±1,49	95,1
Переваримая энергия, МДж	68,8±4,59	65,2±1,18	94,8
Обменная энергия, МДж	53,8±3,73	51,0±0,94	94,8
Теплопродукция, МДж	41,7±2,65	38,0±0,92	91,2
Энергия продукции, МДж	12,1±1,88	13,0±0,79	108,0
Эффективность использования обменной энергии на рост	48,9±3,49	58,5±4,09	119,7
Уровень кормления, МДж/кг метаболической массы	0,905±0,139	0,861±0,018	95,1

Таблица 9. Потребление и использование азота 12-месячными бычками

Показатели	1-я группа	2-я группа	% к 1-й группе
Принято с кормом, г	120,4±2,3	117,3±1,33	97,4
Переварено, г	79,1±3,43	76,3±1,39	96,5
Переваримость, %	65,7±3,4	65,0±1,35	98,9
Выделено с мочой, г	35,4±2,93	33,6±0,44	94,9
Отложено в теле, г	43,7±2,04	42,7±1,22	97,7

В качестве интегрирующего показателя, характеризующего интенсивность и направленность процессов метаболизма в организме бычков, были приняты показатели скорости отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани. Для расчета этих показателей использовали следующие методические приемы. В 9- и 12-месячном возрасте у животных определили суточную экскрецию с мочой креатинина, которая пропорциональна количеству мышечной ткани в организме животных. На основании этих данных рассчитали количество мышечной ткани и среднесуточную скорость накопления ее в данном возрастном периоде. В образцах мышечной ткани определили концентрацию белков и по этим данным, с учетом накопления мышечной ткани, рассчитали скорость отложения мышечных белков. Определение суточной экскреции 3-метилгистидина с мочой в эти периоды позволило рассчитать скорость распада мышечных белков и, с учетом скорости отложения мышечных белков, определить параметры синтеза и оценить в целом эффективность процесса биосинтеза мышечных белков.

Данные по интенсивности отложения мышечных белков и накоплению мышечной ткани сравнили с функциональной активностью инсулярного аппарата (табл. 10). У бычков 2-й группы отмечена тенденция к более высокой скорости отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани. Из семи животных только у двух бычков не было соответствия между индексом активности инсулярного аппарата и показателями интенсивности биосинтеза

мышечных белков. Возможно это связано с недостаточным количеством животных в группах.

Таблица 10. Показатели интенсивности отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани у бычков в период с 9- до 12-месячного возраста

№ животного	Группа	Скорость отложения мышечных белков, г/сут	Скорость накопления мышечной ткани, г/сут
2	1	94,0	485
3	1	65,5	385
5	1	74,5	398
	M±m	78,0±8,41	423±31,4
1	2	87,8	411
4	2	95,2	523
6	2	65,5	345
7	2	97,4	465
	M±m	86,5±7,29	436±38,0
% к 1-й гр.		110,9	103,1

Следовательно, еще раз подтверждается факт положительного влияния повышенной функциональной активности инсулярного аппарата в реализации продуктивного потенциала при интенсивном выращивании молодняка крупного рогатого скота.

Реализация биологического действия большинства гормонов в определенной степени связана с изменением внутриклеточной концентрации ц-АМФ, ионов кальция, натрия и калия. Активный транспорт ионов через клеточную мембрану осуществляется с участием ряда АТФаз. Определение активности последних в печени и длиннейшей мышце спины бычков с разной функциональной активностью инсулярного аппарата позволило установить определенные закономерности.

Содержание внутреннего жира в туше бычков отрицательно коррелировало с активностью Na^{++} , K^{+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины ($r = -0,51$; $P > 0,05$) и положительно с ее активностью в печени ($r = 0,73$; $P < 0,01$). Это может быть связано с тем, что в клетках печени преобладает процесс синтеза триглицеридов над их распадом, а в мышечной ткани происходит как липогенез, так и липолиз.

Выявлена отрицательная корреляция между активностью Са-АТФазы в длиннейшей мышце спины и концентрацией инсулина до приема корма и через 1 и 3 часа после него ($r = -0,41$; $-0,80$ и $-0,26$). Повидимому, данная зависимость связана с тем, что в результате взаимодействия инсулина с рецептором на клеточной мембране клеток в мышечной ткани усиливается жесткость мембраны и в результате этого снижается активность Са-АТФазы (3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что инсулин у жвачных животных играет ведущую роль в распределении субстратов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, между органами и тканями для обеспечения основных физиологических процессов. После приема корма увеличивается поступление в кровь из желудочно-кишечного тракта летучих жирных кислот, аминокислот, глюкозы, лактата и жирных кислот. В результате пул субстратов временно превышает потребности организма, необходимые для обеспечения основных физиологических функций. Усиление секреции инсулина в это время обеспечивает перераспределение метаболических потоков между органами и тканями. Под влиянием высокого уровня инсулина активизируется транспорт аминокислот, глюкозы и жирных кислот в клетки мышечной и жировой ткани, что обеспечивает усиление синтеза белка в мышечной ткани и липогенеза в жировой ткани. Этот факт

объясняет механизм повышенного отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани у бычков 2-й группы, имевших повышенную концентрацию инсулина в плазме крови после приема корма.

Таким образом, внутри групп чистопородного молодняка крупного рогатого скота молочного направления (холмогорской породы) наблюдаются существенные различия по функциональному состоянию инсулярного аппарата поджелудочной железы, что сопровождается разной скоростью накопления мышечной массы при одинаковых условиях кормления. Эти исследования являются основой для разработки селекционных тестов для раннего отбора и последующего интенсивного выращивания и откорма животных, способных при существующих системах питания более эффективно реализовать свой продуктивный потенциал.

Выводы

1. Функциональная активность инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота является ведущим фактором в регуляции субстратного обеспечения процессов биосинтеза белков и липидов и, соответственно, в реализации продуктивного потенциала животных.

2. Бычки с высокой функциональной активностью инсулярного аппарата способны более эффективно использовать обменную энергию потребленного корма на рост, проявляют более высокую скорость отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани и в результате этого у них больше содержание мяса в туше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вовк С.И., Янович В.Г. Исследование синтеза белков в тканях сельскохозяйственных животных (Методические рекомендации). Львов, 1988:10-18.
2. Губский Ю.И., Курский М.Д., Задорина О.В., Федоров А.Н., Брюзгина Т.С., Юрженко Н.Н. Транспорт кальция в эндоплазматическом ретикулеуме печени крыс при активации перекисного окисления липидов. Биохимия, 1990, 55, 1:12-22.
3. Костерин С.А., Слинченко Н.Н., Гергалова Г.Л. Энергетические характеристики АТФ-гидролазной реакции, катализируемой солибилизированной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азой плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Биохимия, 1994, 59, 6: 889-904.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1980:293 с.
5. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968:48
6. Мешкова Н.П., Северин С.Е. Практикум по биохимии животных. М.: Сов. наука, 1950.
7. Надальяк Е.А. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных (Методические указания). Боровск, 1986:58с.
8. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971:30.
9. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. (Методические указания). Боровск, 1985: 66.
10. 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, 1986:9.
11. Baile C.A., Mary Anne DellaFera, Frances C. Buonomo. The neurophysiological control of growth. Control and Manipulation of Animal Growth. London: Butterworths. 1986:105 - 118.

12. Bassett J.M. Endocrine factors in the control of nutrient utilization: ruminants. Proc. Nutr. Soc., 1978, 37, 3:273-280.
13. Brockman R.P., Laarveld B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants; a review. Livestock Production Science, 1986, 14, 4:313 - 334.
14. Coulambe, Favreon. New the simimicro method determination of urea. Clin. Chem., 1963, 9, 1.
15. Delsal J.L., Manhuri H. Stude comparative des dosages colorimetriques du phosphore. IV. Dosage de l' orthophosphate en pressense d'esters phosphoriques. Bull. Chim. Biol., 1958, 40, 11: 1623.
16. Oddy V.H., Lindsay D.B. Metabolic and hormonal interactions and their potential effects on growth. Control and Manipulation of Animal Growth. London: Butterworths. 1986:231 - 248.

АКТИВНОСТЬ АТФаз В ТКАНЯХ ОТКАРМЛИВАЕМЫХ БЫЧКОВ

В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, Г.М. Ельченинов, Т.И. Назарова

Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности

В опыте на откармливаемых бычках с целью выявления некоторых механизмов регуляции обмена веществ и дальнейшего использования этих данных для формирования животных (при выращивании на мясо) с оптимально высокой продуктивностью, исследовали взаимосвязь активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы в длиннейшей мышце спины и печени с интенсивностью роста животных, содержанием мяса и жира в туше и концентрацией гормонов в плазме крови. Выявлена отрицательная зависимость активности Ca^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины с содержанием внутреннего жира и мяса в туше и среднесуточным приростом живой массы бычков, а также с функциональной активностью поджелудочной железы, свидетельствующая о влиянии, наряду с другими факторами, активности Ca^{2+} -АТФазы (ионов Ca^{2+}) на наращивание мышечной массы (отложение мышечного белка) и перераспределение липидов в жировой ткани.

Введение

Анализ и логическое осмысление накопленных знаний по механизму передачи регуляторной информации гормонами и медиаторами из вне в клетку позволяют заключить, что эти механизмы сводятся в основном к изменению внутриклеточной концентрации ц-АМФ и ионов кальция (вторичных сигнальных веществ). Если ионы кальция не являются непосредственно внутриклеточным мессенджером, то являются внутриклеточным откликом на другие секондмессенджеры и влияют на метаболические процессы в клетке, т.е. участвуют непосредственно в регуляции направленности обменных процессов в ней и в целом в организме. Регуляция внутриклеточной концентрации ионов кальция обеспечивается активностью механизмов их ввода и вывода.

Если процессы синтеза белка и обеспечение их энергией регулируются повышенной внутриклеточной (цитозольной) концентрацией ионов Ca^{2+} , то должен быть и путь снижения его концентрации в цитозоле, адекватный механизмам ввода. И тогда по активности этого пути можно было бы косвенно судить о процессах, являющихся следствием изменения его активности.

Основным механизмом снижения внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} в мышечной ткани является их активный транспорт Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -аденозинтрифосфатазой сарко-(эндо)плазматического ретикулума (Mg^{2+} -зависимая, Ca^{2+} -АТФаза, $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза, К.Ф.3.6.1.38) (7), активность которой повышается с усилением

жидкости мембраны (16). Другой механизм связан с обратимой системой Na^+ - Ca^{2+} -обмена, обеспечивающей как ввод, так и вывод ионов Ca^{2+} из клетки. Оба эти механизма зависят от физического состояния мембран и их фосфолипидного состава (8, 4).

Поддержание определенной концентрации ионов Na^+ в клетке, наряду с другими механизмами, обеспечивается мембранным ферментом Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатозой (Na^+ , K^+ -АТФаза, К.Ф.3.6.1.3). Данная АТФаза, являясь универсальным ферментом, способствует поддержанию жизнедеятельности всех клеток организма путем трансмембранного переноса ионов натрия и калия против их концентрационного градиента. Na^+ , К-АТФаза, способствуя удалению ионов Na^+ из клетки, создает направленный внутрь клетки градиент ионов Na^+ , что является источником энергии для активного переноса некоторых аминокислот и глюкозы (6). Переносчик ионов натрия, транспортируя эти ионы по их градиенту концентрации, может переносить внутрь клетки и глюкозу, и некоторые аминокислоты. Поэтому в какой-то степени с активностью фермента связан транспорт глюкозы в клетку. Транспорт глюкозы в клетку обеспечивает и инсулин, который, связываясь с рецептором и усиливая вязкость плазматической мембраны (снижение жидкости) (19, 20), в свою очередь способствует активации Na^+K^+ -АТФазы (2). В контексте с влиянием инсулина на липогенез можно заключить, что усиление активности этой АТФазы так же должно быть связано с усилением липогенеза. Вместе с тем, активатором Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -АТФазы являются ионы Mg .

В задачу исследования входило изучить взаимосвязь активности АТФаз с функциональным состоянием эндокринной системы, интенсивностью роста, интенсивностью накопления мышечной массы и жира в туше. Предполагаемая тесная взаимосвязь активности АТФаз с биологической активностью инсулина позволит по активности этих ферментов судить об относительной активности инсулиновых рецепторов, следовательно и увеличении доли белка в мышечной ткани и липидов в жировом депо, что и даст подход для решения поставленной цели исследования – выявления некоторых механизмов регуляции обмена веществ и дальнейшего использования полученных данных для направленного выращивания откармливаемых на мясо животных с относительно высокой продуктивностью.

Материал и методы

Под опытом в условиях вивария находились бычки холмогорской породы с живой массой 148 кг (в среднем по группе). Все животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Кормление – согласно принятым нормам для бычков, выращиваемых на мясо (10). Опыт был разбит на 3 периода: предварительный (34 дня) – привыкание животных к условиям содержания и кормления и выведение бычков на высокий уровень прироста массы тела; опытный (99 дней) – животные находились на одинаковом кормлении при высокой интенсивности роста, а в 9,5- и 12-месячном возрасте было проведено взятие крови; заключительный (31 день) – период откорма и проведение контрольного убоя животных.

Для определения прироста живой массы бычков ежемесячно взвешивали. В конце опыта убивали животных и проводили обвалку туши. Пробы крови брали пункцией яремной вены до кормления, через 1 и 3 часа после него. Концентрацию гормонов (инсулина, тироксина, трийодтиронина, кортизола) определяли в плазме крови радиоиммунологическим методом.

Определение накопления Ca^{2+} в цитоплазме возможно с использованием изотопной метки. Нами был выбран другой подход - определение активности основного пути, обеспечивающего снижение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, а именно, определение активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в пробах длиннейшей мышцы спины и печени, взятых при убое животных. В этих же тканях исследовали активность Na^+ , K^+ -АТФазы. Активность ферментов определяли по нарастанию неорганического фосфора, отщепленного от АТФ, в результате АТФазной реакции в специальных средах по методу, описанному в работе Иващенко А.Т. и Бушневой И.А.(5). Среда инкубации для определения АТФаз отличалась количественным составом ее компонентов. Активность выражали в микромолях неорганического фосфора на грамм ткани за минуту инкубации (мкмоль Рн/г/мин). В безбелковом супернатанте определяли количество неорганического фосфора по Делзал и Манхоури (18). Концентрацию гормонов определяли радиоиммунологическим методом (15).

Результаты и обсуждение

Активность ферментов в длиннейшей мышце спины и печени у каждого из 7 бычков представлена в таблице 1.

Как и в нашем предыдущем опыте (11) активность ферментов в группе отличалась большой вариабельностью, но величины активности Ca^{2+} -АТФазы в обоих опытах были сопоставимы.

Таблица 1. Активность АТФаз в тканях, мкмоль Рн/г/мин

№ животных	Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза		Na^+ , K^+ -АТФаза	
	длиннейшая мышца спины	печень	длиннейшая мышца спины	печень
1	390	1967	897	1748
2	979	717	3365	1486
3	1460	1049	323	481
4	760	1486	979	2185
5	1635	1269	1967	1106
6	760	787	323	2185
7	656	1198	149	1119

В соответствии с важной функцией внутриклеточной концентрации ионов кальция в передаче регуляторной информации в клетку и, следовательно, в регуляции обменных процессов в ней, была прослежена взаимосвязь активности Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -АТФ- и Na^+ , K^+ -АТФаз в длиннейшей мышце спины и печени с интенсивностью роста бычков, содержанием мяса и жира в туше и концентрацией гормонов в плазме крови. Показатели, характеризующие интенсивность роста бычков, показаны в таблице 2.

Таблица 2. Среднесуточный прирост живой массы и живая масса бычков по периодам опыта

№ животных	Периоды опыта, прирост живой массы (г) и живая масса (кг)						
	предварительный		опытный		заключительный		за опыт
	среднесут. прирост	живая масса	среднесут. прирост	живая масса	среднесут. прирост	живая масса	среднесут. прирост
1	824	163	1212	283	839	309	1061
2	706	156	1152	270	-	276	878
3	824	141	1000	240	1000	271	963
4	971	148	1030	250	1177	287	1046
5	677	151	1020	252	1097	286	963

6	794	127	950	221	1194	258	963
7	824	151	1040	254	1758	307	1131
В среднем	803	148	1058	253	1178	285	1021

Приведенные в ней данные свидетельствуют, что среднесуточный прирост живой массы за опыт по группе был в пределах 1000г, а разница между животными по интенсивности роста составила 17%. Из них бычки N 1, 4, 6, 7 имели более высокий прирост живой массы. У этих же животных оказалась тяжелее туша и большее содержание в ней мяса и жира, что составило в процентном отношении 0,8, 1,7 и 1,4 % соответственно (табл. 3). Соотношение мясо/кости у них также было в пользу животных с большей интенсивностью роста (на 7,9%).

Таблица 3. Результаты убоя бычков

№ животн ых	Живая масса, кг	Масса туши, кг	Убойный выход, %	Содержание в туше				Соотношение		Внутре нный жир, кг
				мясо		кости		мясо/ кости	мясо/ жир	
				кг	%	кг	%			
1	314	150,4	47,97	105,3	70,00	45,1	30,00	2,34	17,6	6,00
2	280	146,1	52,18	104,6	71,62	41,5	28,38	2,52	21,1	4,95
3	275	144,6	52,58	103,9	71,82	40,7	28,18	2,55	20,8	5,00
4	288	145,7	50,70	107,6	72,86	38,1	26,14	2,82	18,9	5,70
5	290	149,0	51,40	106,4	71,40	42,6	28,60	2,50	22,4	4,70
6	265	134,3	50,70	98,0	73,00	36,3	27,00	2,70	13,6	7,20
7	315	160,4	50,90	120,6	75,20	39,8	24,80	3,03	20,1	6,00

Наряду с показателями, характеризующими интенсивность роста и качество туши, был проведен расчет коэффициентов корреляции между активностью Са-АТФазы и количеством мяса в туше, а также концентрацией гормонов, по которым косвенно можно судить о путях регуляции процессов синтеза и деградации в клетке и биологической активности гормонов, и использовать полученные данные для прогнозирования направленности обменных процессов в организме животных.

Как и в предыдущем опыте на бычках со среднесуточным приростом живой массы 1160 г (11) однозначного ответа на эти вопросы не выявлено (табл. 4). Однако, имеются некоторые тенденции. Так, активность Са-АТФазы в длиннейшей мышце спины имела отрицательную корреляцию со среднесуточным приростом живой массы (r от -0,54 до -0,65 в опыте 1997 года и r = -0,84 в опыте 1996 года). В работе (1) была тоже получена аналогичная закономерность (отрицательная зависимость активности фермента в грудной мышце кур с интенсивностью роста). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что более низкая активность Са²⁺-АТФазы (повышенная концентрация ионов Са²⁺ в цитозоле) способствует наращиванию живой массы животного, следовательно усиленному синтезу и отложению компонентов мышечной ткани. Более четкая закономерность выявлена между активностью АТФаз и содержанием внутреннего жира в туше (табл. 4).

Таблица 4. Зависимость активности Са²⁺-АТФазы в длиннейшей мышце спины с показателями, характеризующими интенсивность роста и качество продукции (по данным опытов 1996-97гг)

Коррелируемый признак	Коэффициент корреляции, ч	
	1997 год	1996 год
Среднесуточный прирост живой массы	-0,54	-0,84
Количество мяса в туше	-0,94**	-0,94**
Соотношение мясо/кости	-0,51	—

Здесь и далее: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$.

Как видно из таблицы, наиболее четкая (отрицательная) зависимость выявлена между активностью Ca^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины и содержанием мяса и внутреннего жира в туше. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в мышце также отрицательно коррелировала с количеством внутреннего жира ($r = -0,51$), что не соответствовало нашей предположительной гипотезе о том, что количество жира должно было отрицательно коррелировать с Ca^{2+} -АТФазой, а с Na^+ , K^+ -АТФазой положительно. С активностью ферментов в печени ситуация оказалась близка к предполагаемой. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в печени коррелировала положительно ($r = +0,73$, $n = 7$) с содержанием внутреннего жира, а Ca^{2+} -АТФаза в печени – отрицательно, но с низкой степенью вероятности. Видимо, полученную зависимость можно объяснить тем, что в печени процессы синтеза триглицеридов, транспортируемых затем в жировые депо, преобладают над их использованием, а в мышечной ткани имеет место как отложение, так и использование их в соответствии с потребностями ткани. Причем процесс липолиза активируется повышенной концентрацией ионов кальция в цитозоле клетки. Концентрация ионов Ca^{2+} в клетке регулируется, наряду с Ca^{2+} -АТФазой, еще и с помощью Na^+ - Ca^{2+} обмена (8), а Na^+ , K^+ -АТФаза, удаляя ионы Na^+ из клетки, по-видимому, способствует вводу ионов Ca^{2+} в клетку и, активируя повышенной концентрацией ионов Ca^{2+} в клетке липолиз, отрицательно коррелирует с содержанием внутреннего жира (отложением жира в туше). Эти данные, как и ранее полученные (11), мы склонны объяснять тем, что интенсивно растущие животные более экономно расходуют энергетический материал (более рациональный оборот липидов) на биосинтетические цели, в том числе и на мышечные сокращения. Причем в этой метаболической ситуации должен снижаться глюконеогенез, и в частности из аминокислот, следовательно снижаться деградация мышечных белков, по сравнению с животными меньшей интенсивности роста. Подтверждением этому могут служить и данные нашего опыта 1990 года, в котором отношение активности ферментов, связанных с процессом сокращения мышц (лактатдегидрогеназы и Ca^{2+} -АТФазы), имело отрицательную корреляцию с интенсивностью роста животных, что и было объяснено повышенной стрессчувствительностью животных с меньшей интенсивностью роста и повышенными двигательными реакциями у них (12). Таким образом, снижение активности Ca^{2+} -АТФазы приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, что в свою очередь ведет к метаболической ситуации, сопровождающейся повышенной интенсивностью роста, большим отложением мышечной массы и внутреннего жира в туше, т.к. энергия, заключенная в АТФ, активнее используется на синтез пластического материала и его экономию, а не на транспорт кальция во внутриклеточное депо. Видимо, в связи с этим в опыте 1996 года также была обнаружена отрицательная связь активности Ca^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины с показателями эффективности использования обменной энергии у бычков, причем как с меньшим, так и с большим отложением жира на единицу метаболической массы ($r = -0,96$ и $-0,82$) (11).

Помимо этого, повышенная концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле (снижение активности Ca^{2+} -АТФазы) влияет и на биосинтез белка. Подтверждением этому может служить предположительная логическая цепь заключений. В работе Перцевой М.Н. (13) была предложена гипотетическая схема действия цАМФ на транспорт кальция и

процессы его связывания – освобождения в клетке. Заключительным этапом этого действия является торможение активности аденилатциклазы и цАМФ-протеинкиназы. В результате этого снижаются процессы фосфорилирования и активируются процессы дефосфорилирования. Дефосфорилированием, в свою очередь, активируется S-РНК-синтетаза (цитировано по 9). Ингибирование аденилатциклазы и протеинкиназы С приводит к активации синтеза ДНК (17). Следствием изменения этих процессов является усиление синтеза белка. Косвенным подтверждением ингибирования повышенными концентрациями ионов Ca^{2+} протеинкиназы С может служить недавно подтвержденный на печени кролика механизм, при котором повышенные концентрации ионов Ca^{2+} и кальмодулина, ингибирующего Ca^{2+} -кальмодулинзависимую протеинкиназу С, активируют НАДФ-киназу – единственный фермент, осуществляющий синтез НАДФ, восстановленная форма которого является обязательным участником как синтеза белка, так и липогенеза (3). Исходя из сказанного, Ca^{2+} -АТФаза должна иметь отрицательную зависимость с показателями синтеза белка. В опыте на это достоверного ответа мы не получили. Коэффициенты корреляции активности Ca^{2+} -АТФазы с показателями, косвенно характеризующими биосинтез белка, имели отрицательное значение, но не всегда достоверное (табл. 4). К тому же процесс наращивания мышечной ткани – это не только усиление синтеза белка, но и снижение его деградации. Эти данные свидетельствуют о том, что активность АТФазы влияет на биосинтез белка, но регуляторную функцию несет в определенных процессах и определенных метаболических ситуациях. Система регуляции биосинтеза белка – многогранный и многофакторный механизм, поэтому трудно выявить из систем, непосредственно не связанных с биосинтезом белка, определенное звено, ответственное за регуляцию этого процесса. Липолиз и липогенез более ограничены в активаторах, ингибиторах и системах регуляции этих процессов, поэтому выявлена более четкая взаимосвязь активности изучаемых ферментов с отложением жира в жировом депо.

Не обнаружено четкой зависимости между активностями Ca^{2+} , Mg^{2+} и Na^+ , K^+ -АТФазами и это, по всей вероятности, закономерно. Как было указано выше, взаимоотношения ионов Ca^{2+} и Na^+ определяются на уровне транспорта Ca^{2+} через мембрану клетки, который осуществляется соответствующими АТФазами и через ионные каналы, активность которых регулируется определенными пороговыми концентрациями ионов. Эту взаимосвязь дополняет активация ионами Mg^{2+} , как Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -АТФазы, так и Mg^{2+} -зависимой Na^+ , K^+ -АТФазы. Кроме этого, только в присутствии ионов Mg^{2+} и ГТФ осуществляется передача информации с гормон-рецепторного комплекса на каталитическую субъединицу рецептора, что в итоге приводит к соответствующим изменениям регуляторных процессов и связанного с ними внутриклеточного метаболизма (14).

В 12-месячном возрасте установлена отрицательная корреляция между активностью Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины бычков с концентрацией инсулина (табл. 5) до кормления ($r=-0,41$), через час ($r=-0,80$, $p<0,05$) и 3 часа после приема корма ($r=-0,26$). В 9,5-месячном возрасте существенная связь выявлена между этими показателями только через час после кормления ($r=-0,69$). Зависимости активности ферментов с концентрацией других гормонов не обнаружено.

Таблица 5. Концентрация инсулина в плазме крови и индексы функциональной активности инсулярного аппарата у бычков

№ животных	Концентрация инсулина, пг/мл			Индексы	
	9,5 мес	12 мес		V, пг/мин	C, пг/мин
	через 1 час	до кормл.	через 1 час		
1	222	316	317	2,85	633
2	167	260	245	0,77	505
3	114	199	228	0,78	427
4	113	381	326	4,42	707
5	94	154	337	0,23	491
6	208	317	411	1,22	728
7	131	487	221	1,22	708

Мы предполагали, что активность Ca^{2+} -АТФазы в тканях будет отрицательно коррелировать с концентрацией инсулина в крови, основываясь на том, что при взаимодействии инсулина с рецептором жесткость мембраны должна усиливаться, а активность Ca^{2+} -АТФазы в этом случае должна снижаться. Результаты исследований показали, что у бычков в 9,5- и 12-месячном возрасте активность Ca^{2+} -АТФазы в мышечной ткани в большинстве случаев имела обратную зависимость с концентрацией инсулина в плазме крови до кормления и через час после него.

Для более полной оценки функциональной активности инсулярного аппарата поджелудочной железы рассчитали значение индексов V и C (табл. 5) и провели корреляционный анализ зависимости этих показателей с активностью Ca^{2+} -АТФазы. Индекс V (пг/мин), характеризует среднюю скорость увеличения концентрации инсулина в течение часа после приема корма, что отражает интенсивность поступления инсулина из В-клеток поджелудочной железы. Индекс C (пг/мл) это суммарная концентрация инсулина в плазме крови бычков через 1 и 3 часа после приема корма, которая характеризует величину максимального ответа инсулярного аппарата на прием корма и, соответственно, потенциальную возможность биологического эффекта при взаимодействии инсулина с рецептором.

Установлена отрицательная корреляционная зависимость между активностью Ca^{2+} -АТФазы в мышце значениями индексов V ($r = -0,56$) и C ($r = -0,79$; $P < 0,05$). Биологическое действие инсулина проявляется в активизации процессов биосинтеза белков и липидов в жировой и мышечной ткани. Поэтому, отрицательная связь активности Ca^{2+} -АТФазы с функциональной активностью инсулярного аппарата поджелудочной железы является закономерным отражением полученной в опыте отрицательной корреляции между активностью данного фермента и количеством жира в туше и накоплением мышечной массы. По-видимому, с повышением связывания инсулина с рецептором повышается жесткость мембраны клетки и снижается активность Ca^{2+} -АТФазы, что в итоге должно привести к повышению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и усилению липолиза и биосинтеза белка. Установленная в эксперименте зависимость между активностью фермента и функциональным состоянием инсулярного аппарата является основой для разработки теста, который позволил бы по активности Ca^{2+} -АТФазы судить о величине биологического эффекта инсулина в мышечной ткани бычков. При взаимодействии инсулина с рецептором на клеточной мембране происходит повышение жесткости последней, что должно повлечь повышение активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы. Поэтому мы предполагали наличие положительной зависимости между концентрацией инсулина и активностью фермента. Однако, результаты исследований показали, что активность данной

АТФазы отрицательно, хотя и недостоверно, связана как с концентрацией гормона в плазме крови, так и с функциональной активностью инсулярного аппарата. Не подтвердилась предполагаемая положительная зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФазы с жиросотложением.

На основании полученных данных и данных литературы можно заключить, что плазматическая мембрана клетки, как и мембраны внутриклеточных структур, составной частью которых являются изучаемые ферменты и гормональные рецепторы, представляют сложноорганизованные и динамичные системы, ответственные за метаболическое состояние клетки. Концентрация инсулина в плазме крови бычков в течение дня колеблется с определенным ритмом. Частота и амплитуда этих колебаний по времени, по-видимому, не всегда совпадает с динамикой изменений активности ферментов и функциональным состоянием рецепторов в клеточной мембране. Видимо, поэтому не всегда возможно ожидать постоянно строгую достоверную зависимость между ключевыми и регуляторными звеньями этих процессов, интенсивностью роста, а также параметрами синтеза и распада белков и липидов.

Таким образом, поставленная цель выявления некоторых механизмов регуляции обмена веществ у откармливаемых бычков достигнута, т.к. найдена тенденция отрицательной корреляции активности Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -АТФазы с концентрацией инсулина в плазме крови и с индексом его биологического действия, отложением мышечной массы (значит и белка в ней) и внутреннего жира в туше. Полученные данные говорят о том, что инсулин, связываясь на плазматической мембране клетки с рецептором, вызывает снижение активности Ca^{2+} -АТФазы и повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, что в свою очередь влечет повышение синтеза пластических компонентов мышечной ткани и усиление резервирования избытка энергии в виде липидов в жировой ткани.

Выводы

1. Выявлена отрицательная зависимость активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины с содержанием мяса и внутреннего жира в туше и со среднесуточным приростом живой массы откармливаемых бычков, свидетельствующая, о зависимости этих процессов от концентрации ионов кальция в клетке.
2. Установлена отрицательная зависимость активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в длиннейшей мышце спины с функциональным состоянием инсулярного аппарата поджелудочной железы, что указывает на роль данного фермента в реализации биологического действия инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абашидзе У.Э. Влияние цинка, магния и комплекса их в рационе на активность некоторых металлоэнзимов в тканях кур. Автореф. дис ... к.б.н. Боровск, 1975: 17с.
2. Болдырев А.А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М.: Изд-во МГУ, 1977: 208.
3. Булыгина Е.Р., Воронина О.Л., Телепнева В.И. Влияние кальмодулина на активность NAD-киназы из печени кролика. Биохимия, 1993, 58, 4: 632-635.
4. Губский Ю.И., Курский М.Д., Задорина О.В. и др. Транспорт кальция в эндоплазматическом ретикулуме печени крыс при активации перекисного окисления липидов. Биохимия, 1990, 55, 1: 12-22.
5. Иващенко А.Г., Бушнева И.А. Выделение и свойства аниончувствительной аденозинтрифосфатазы из мембран эритроцитов. Биохимия, 1981, 46, 3: 486-488.

6. Костерин С.А., Сличенко Н.Н., Гергалова Г.Л. Энергетические характеристики АТФ-гидролазной реакции, катализируемой солюбилизированной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Биохимия, 1994, 59, 6: 889-904.
7. Костин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наукова Думка, 1990: 216с.
8. Конев С.В., Аксенцев С.Л., Окунь И.М. и др. Транспорт кальция в синапсоммах мозга при деполяризации. Роль потенциалзависимых каналов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена. Биохимия, 1989, 54, 7:1150-1162.
9. Коэн Ф. (Cohan F.) Регуляция ферментативной активности. М.: Мир, 1986: 143 с.
10. 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.
11. Отчет ВНИИФБиП. 1996.
12. Отчет ВНИИФБиП. 1990.
13. Перцева М.Н. Циклический аденозинмонофосфат и ионы кальция в механизме действия катехоламинов. Успехи современ. биологии, 1976, 82, 1(4): 18-33.
14. Перцева М.Н. Молекулярные основы развития гормоно-компетенции. Л.: Наука, 1989: 250 с.
15. Радченков В.П., Аверин В.С., Бутров Е.В. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. Методические рекомендации. Боровск, 1985: 75 с.
16. Рубцов А.М., Болдырев А.А., Личунь Янг и др. Исследование вращательной подвижности E1- и E2-конформеров Ca^{2+} -АТФазы в мембранах саркоплазматического ретикула с использованием метода анизотропии с высоким временным разрешением. Биохимия, 1994, 59, 11: 1698-1706.
17. Северин Е.С. Избирательная регуляция клеточного метаболизма. М.: Наука, 1991: 62с.
18. Delsal J.L., Manhour N. Etude comparative des dosages colorimetriques du phosphore. IV. Dosage de l' orthophosphate en pressense d' esters phosphorigues. Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 11: 1623-1630.
19. Luly P. Interaction of insulin with plasma membrane fluidity. Peptide hormone biomembranes and cell growth: Proc. int. meet. New.York; London, 1984, 3: 39-50.
20. Luly P., Shinitzky M. Gross structural changes in isolated liver cell plasma membranes upon binding of insulin. Biochemistry, 1979, 18, 3: 445-450.

МЕТАБОЛИЗМ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У БЫЧКОВ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ В ПЕРИОД ДОРАЩИВАНИЯ И ОТКОРМА

*М. Д. Аутова, Б.Д. Кальницкий, К. Т. Еримбетов,
П.В. Матющенко, Е. И. Кузнецова*

Лаборатория белково-аминокислотного питания

В двух экспериментах на бычках черно-пестрой и холмогорской пород показано, что животные, имеющие более высокую интенсивность роста и накопления мышечной ткани и белка, как правило, отличаются более высоким содержанием саркоплазматической белковой фракции в длиннейшей мышце спины, высокой липогенно-липолитической активностью подкожной жировой ткани и более низкими показателями деградации миофибриллярного белка в скелетных мышцах. Однако, на настоящий момент указанные показатели метаболизма не могут служить тестами, прогнозирующими потенциал мясной продуктивности, поскольку их связь с продуктивностью не всегда носит закономерный характер в силу

больших индивидуальных колебаний и математической недостоверности получаемых величин.

Введение

В последнее время усилия исследователей направлены на поиск путей и способов управления качеством мясной продукции молодняка крупного рогатого скота. С этой целью интенсивно ведутся исследования по изучению факторов и механизмов, стимулирующих или лимитирующих процессы синтеза компонентов мяса. К факторам, тормозящим с возрастом синтез и накопление белка в скелетных мышцах и сдерживающим рост животных, многие исследователи относят замедление процессов обновления мышечных белков, вследствие изменения с возрастом их фракционного состава – соотношения между белками стромы, саркоплазматическими и миофибриллярными (2, 11, 14). Другие авторы связывают снижение темпов наращивания скелетной мускулатуры, по мере созревания животных, с усилением отложения жира в теле и ингибированием, вследствие этого, процессов белкового синтеза (8, 9, 10). Наряду с генетическими факторами, контролирующими указанные процессы, важную роль в реализации потенциала мясной продуктивности играют и условия питания (8, 12, 13). В этой связи знание возрастных и породных закономерностей синтеза и накопления отдельных мышечных белков и особенностей метаболизма липидов позволит с помощью факторов питания и селекции воздействовать на формирование компонентов мяса, изменяя не только его качественный состав, но и количественные параметры.

В задачу настоящих исследований входило изучение закономерностей метаболизма основных белков скелетных мышц и липидов жировой ткани у бычков разной интенсивности роста с целью познания механизмов, регулирующих процессы биосинтеза белка и липогенеза в тканях, и выявления тестов, характеризующих потенциал мясной продуктивности у бычков молочного скота.

Материал и методы

Проведены два опыта в виварии института на 7 бычках чернопестрой и 7 бычках холмогорской пород в период с 6- до 14-месячного возраста. Рационы бычков были сбалансированы по всем питательным и биологически активным веществам в соответствии с нормами, разработанными для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков(6), и на протяжении всего эксперимента состояли из злакового сена, силоса разнотравного и комбикорма. Уровень концентрированных кормов в период дорастивания составлял 42% по обменной энергии, в период откорма – около 62%. Содержание бычков привязное, кормление индивидуальное. В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма, а интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешивания. В конце каждого опытного периода проводили 7-дневный балансовый опыт и брали методом открытой биопсии пробы длиннейшей мышцы спины (на уровне последнего ребра) и подкожного жира в области подгрудка. В длиннейшей мышце спины определяли фракционный состав белков методом высаливания (1, 3). В подкожной жировой ткани определяли интенсивность процессов липогенеза методом инкубации срезов ткани с C14-ацетатом и интенсивность липолиза – по выделению в инкубационную среду НЭЖК при инкубации срезов жировой ткани в отсутствии ацетата и глюкозы.

Кровь брали пункцией яремной вены до утреннего кормления и через 3 часа после него. В плазме крови определяли концентрацию свободных аминокислот и НЭЖК (7).

Количественные параметры синтеза и распада мышечных белков определяли на основе данных по выделению с мочой 3-метилгистидина и креатинина (14). Концентрацию 3-метилгистидина измеряли на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339 (4), содержание креатинина химическим методом (5). В конце опыта бычки были убиты, проведена обвалка туш, определено содержание жира и протеина в длиннейшей мышце спины и средней пробе мышц, полученной при обвалке сегмента между 9 и 11 ребром.

Результаты и обсуждение

В первом эксперименте, как указывалось выше, под опытом находилось 7 бычков черно-пестрой породы. По результатам взвешивания бычки в 12-месячном возрасте были разделены на две группы – животные с относительно низкой (1-я группа) и высокой (2-я группа) интенсивностью роста. В группу с низкой интенсивностью роста отнесены бычки, имевшие прирост живой массы в период с 12- по 14- месячный возраст в среднем по группе 1201 ± 29 г/сут, в группу высокой интенсивности – бычки со среднесуточным приростом 1471 ± 77 г/сут. Анализ результатов исследования показал, что бычки, отнесенные в разные группы, существенно отличались между собой по большинству изучаемых показателей.

Как следует из рисунка 1, интенсивнорастущие животные (2-я группа) по сравнению с бычками низкой интенсивности роста лучше усваивали азот корма и имели более интенсивное накопление мышечной массы, о чем свидетельствуют данные по выделению креатинина с мочой ($7,81 \pm 0,30$ против $6,48 \pm 0,23$ г/сут) и результаты обвалки туш после убоя – 110,8 против 105,4 кг мышечного мяса. Обнаружены различия между группами по содержанию саркоплазматических белков в длиннейшей мышце спины и скорости распада миофибриллярного белка в скелетных мышцах (ОДБ) – интенсивнорастущие бычки имели более высокое содержание саркоплазматических белков в мышце и более низкую относительную деградацию мышечного белка.

Метаболическая активность подкожной жировой ткани также была выше у бычков высокой интенсивности роста. Так, если интенсивность липогенеза жировой ткани бычков 1-й группы составила $195,2 \pm 58,7$ нмоль ацетата натрия/г/2 часа, а липолиза – $1690,8 \pm 328,2$ нмоль НЭЖК/г/2 часа, то у интенсивнорастущих бычков эти показатели достигали соответственно $448,1 \pm 114,6$ и $2159,3 \pm 148,0$ (рис. 1).

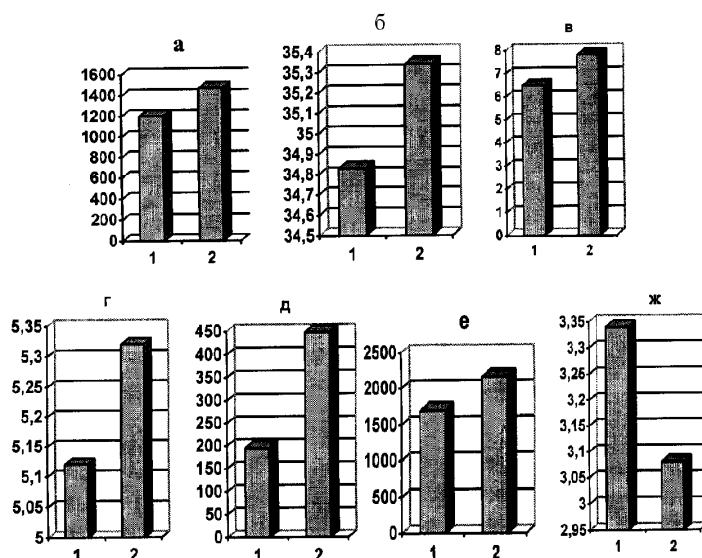


Рис.1. Интенсивность роста и показатели метаболизма у бычков черно-пестрой породы (1-й эксперимент)

а – среднесуточный прирост живой массы, г/сут, б – усвоение азота корма, г/сут, в – экскреция креатинина с мочой, г/сут, г – саркоплазматические белки в длиннейшей мышце спины, г%, д – липогенез, нмоль ацетата/г/2 часа, е – липолиз, нмоль НЭЖК/г/2 часа, ж – ОДБ, %/сут; группы бычков: 1 – с низкой интенсивностью роста, 2 – с высокой интенсивностью роста.

Концентрация НЭЖК в плазме крови, напротив, была более низкой у бычков 2-й группы (рис. 2), что указывает на лучшее их использование в метаболических процессах.

В итоге можно предположить, что бычки высокой энергии роста обладают более мобильным метаболизмом, позволяющим эффективно использовать субстраты в биосинтетических процессах. Очевидно, как полагают некоторые исследователи (11), подкожная жировая ткань участвует в равномерном в течение суток обеспечении других тканей, в том числе и мышечной, энергетическими субстратами, а повышенное содержание в скелетных мышцах саркоплазматической фракции белка, состоящей главным образом, из энзимов всех уровней метаболизма, способствует поддержанию биосинтетических процессов в мышцах на более высоком уровне.

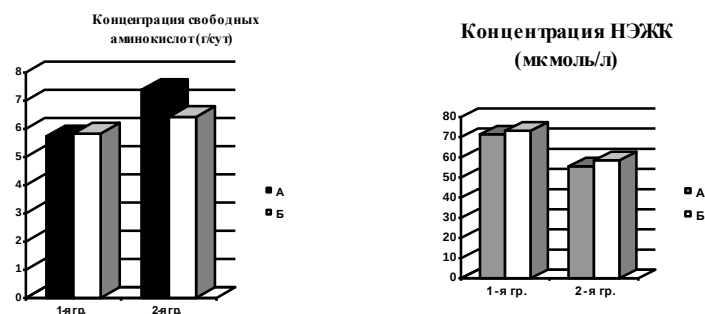


Рис. 2. Концентрация метаболитов в плазме крови бычков черно-пестрой породы

А – до кормления, Б – через три часа после кормления; группы бычков: 1 – с низкой интенсивностью роста, 2 – с высокой интенсивностью роста.

Во втором эксперименте на бычках холмогорской породы были продолжены исследования по изучению метаболического статуса, характеризующего потенциал мясной продуктивности бычков молочного направления. По уровню саркоплазматических белков в длиннейшей мышце спины подопытные животные в 12-месячном

возрасте были разделены на две группы. В первую группу отнесены бычки, имевшие в этом возрасте высокое содержание саркоплазматической фракции – $8,10 \pm 0,07$ г%, во вторую – с более низким уровнем – $7,20 \pm 0,23$ г% (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация основных белковых фракций в длиннейшей мышце спины бычков холмогорской породы, г%

№ жив.	Группы	Саркоплазматические	Миофибриллярные	Стромальные
5	1	8,1	7,88	1,75
6	1	8,0	7,00	2,36
7	1	8,2	7,88	2,19
М±м		$8,10 \pm 0,07$	$7,59 \pm 0,36$	$2,10 \pm 0,22$
1	2	7,0	7,88	2,10
2	2	7,5	7,44	3,06
3	2	7,5	7,61	2,36
4	2	6,7	6,74	2,89
М±м		$7,2 \pm 0,23^*$	$7,42 \pm 0,28$	$2,62 \pm 0,24$

* $p < 0,05$

Судя по данным, представленным в табл. 2, как и в предыдущем опыте, животные, имеющие высокий уровень саркоплазматических белков мышц, отличались от бычков 2-й группы и высокой метаболической активностью подкожной жировой ткани. Интенсивность липогенеза жировой ткани у бычков 1-й группы в 12-месячном возрасте составляла в среднем $881,57 \pm 46,1$ нмоль ацетата/г/2часа, липолиза- $2243,1 \pm 313,9$ нмоль НЭЖК/г/2часа, у бычков 2-й группы соответственно $158,84 \pm 28,5$ и $1425,3 \pm 81,8$. Что касается эффективности усвоения азота корма и интенсивности роста, так они также были выше у животных 1-й группы. Абсолютные показатели усвоения азота у бычков 1-й группы достигали $44,06$ г/сут, у бычков 2-й группы- $42,38 \pm 1,61$ г/сут. Процент усвоенного азота от переваренного был соответственно $57,6$ и $53,9$ (табл.3), среднесуточный прирост живой массы – 1082 ± 171 против $947,7 \pm 21,8$ г/сут (табл. 4).

Таблица 2. Интенсивность липолиза и липогенеза в подкожной жировой ткани бычков(2-й эксперимент)

№ животных	Группа	Липогенез нмоль ацетата/г/2часа	Липолиз нмоль НЭЖК/г/2часа
5	1	942,17	2431,8
6	1	889,94	1736,1
7	1	812,60	2561,3
М±м		$881,57 \pm 46,1$	$2243,1 \pm 313,9$
1	2	164,78	1482,1
2	2	194,02	1586,5
3	2	189,31	1376,3
4	2	87,24	1256,1
М±м		$158,84 \pm 28,5^{***}$	$1425,3 \pm 81,8$

*** $p < 0,01$

На лучшее использование азота в тканевом метаболизме указывают и данные, представленные в таблице 5.

Таблица 3. Показатели усвоения азота корма бычками холмогорской породы, г/сутки

№ животных	Принято азота с кормом, г/сутки	Усвоено, г	Усвоено, % от переваренного
1-я группа			
5	117,11	45,84	60,2
6	114,68	40,78	55,7

7	116,75	45,56	57,0
M±m	116,18±0,93	44,06±2,01	57,6±1,64
2-я группа			
1	121,02	40,51	54,0
2	124,85	39,60	52,6
3	119,29	45,59	53,0
4	116,68	43,68	56,0
M±m	120,46±1,98	42,35±1,61	53,9±0,88

Концентрация свободных аминокислот в плазме крови бычков 1-й группы, по сравнению с животными 2-й группы, была существенно ниже. Судя по концентрации НЭЖК в плазме крови (табл. 5), животные 1-й группы эффективнее использовали липидные субстраты в энергетических процессах. По массе туши, определенной после убоя, животные этой группы не уступали бычкам 2-й группы, а масса мякоти в их туше была на 3,6 кг выше.

Важно при этом отметить, что бычки 1-й группы более выгодно отличались от бычков 2-й группы как по содержанию белка в длиннейшей мышце спины, так и в гомогенате средней пробы мышечной ткани (20,37±0,84 и 19,67±0,54 против 19,01±0,45 и 17,66±0,47 г% соответственно). Содержание липидов, напротив, было выше в мышцах животных 2-й группы: 2,41±0,06 и 2,82±0,22 г% – в длиннейшей мышце спины и 12,44±2,40 и 15,25±4,35 г% – в гомогенате средней пробы мышц соответственно бычков 1-й и 2-й групп (табл. 7).

Таблица 4. Уровень среднесуточного прироста живой массы бычков холмогорской породы (за период с 12- по 14-месячный возраст)

№ животных	1-я группа	№ животных	2-я группа
	Прирост, г/сутки		Прирост, г/сутки
5	934	1	926
6	951	2	-
7	1361	3	983
		4	934
M±m	1082±171	M±m	947,7±21,8

Все это подтверждает предположения, сделанные в предыдущем опыте о том, что бычки, имеющие более высокую липогенно-липолитическую активность подкожной жировой ткани и высокое содержание саркоплазматических белков в скелетных мышцах, отличаются более высокими показателями роста, отложения белка в мышцах и накопления мышечной массы.

Таблица 5. Концентрация свободных аминокислот и НЭЖК в плазме крови 12-месячных бычков

Показатели	Группы животных	До кормления	После кормления
Сумма свободных аминокислот, мг%	1	12,25±1,89	10,6±2,05
	2	15,13±2,13	12,07±1,98
в т. ч. незаменимые, мг%	1	7,06±1,05	4,97±1,46
	2	8,58±1,53	6,48±1,21
НЭЖК, мкмоль/л	1	38,5±5,26	52,3±8,50
	2	81,1±17,50	66,4±14,1

Таблица 6. Результаты обвалки туш подопытных бычков (2-й эксперимент)

N животных	Живая масса, кг		Масса туши, кг	Масса мякоти, кг
	в начале опыта	перед убоем		
1-я группа				
5	96	290	149	105,2
6	78	265	134	98,0
7	96	315	160,4	120,6
M±m	90±7,35	290±18	147,8±9,4	107,9±8,2
2-я группа				
1	110	313,6	150,4	105,3
2	110	280	146,1	104,6
3	86	275	144,6	103,9
4	83	287	142,5	103,3
M±m	97,3±8,5	289±10	146,0±1,85	104,3±0,5

Таблица 7. Концентрация протеина и липидов в мышцах подопытных бычков, г%

Показатели		Группы животных	Протеин	Липиды
Длиннейший мускул спины		1	20,37±0,84	2,41±0,06
		2	19,09±0,45	2,82±0,22
Гомогенат средней пробы мышц		1	19,67±0,54	12,44±2,40
		2	17,66±0,47	15,25±4,35

Заключение

Эксперименты, проведенные на бычках черно-пестрой и холмогорской пород, позволили выявить некоторые особенности метаболизма, характерные для бычков с высокой интенсивностью роста. Они включают наличие механизмов, ускоряющих биосинтетические процессы в мышцах. Повышенное содержание в скелетных мышцах саркоплазматической белковой фракции, богатой ферментами энергетического обмена и белкового синтеза, позволяет поддерживать биосинтетические процессы в мышечной ткани на более высоком уровне. Повышенная липогенно-липолилитическая активность подкожной жировой ткани, характерная для животных с высокой энергией роста, способствует лучшему обеспечению энергетическими субстратами биосинтетических процессов в мышечной ткани. Важным составляющим метаболизма, обнаруженным у животных с высокой энергией роста, является и более низкая скорость катаболизма белка в скелетных мышцах. Однако, следует подчеркнуть, что указанные показатели (уровень саркоплазматических белков в скелетных мышцах, метаболическая активность подкожной жировой ткани и относительная деградация мышечного белка) пока еще не могут быть включены в число тестов раннего прогнозирования потенциала мясной продуктивности молодняка молочного скота, поскольку они получены на небольшом поголовье, в большинстве случаев недостоверны не носят закономерного характера. Требуется дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вовк С. И., Янович В.Г. Исследования синтеза белков в тканях с.-х. животных. (Методические рекомендации). Львов, 1988: 10-18
2. Григорян Г. Ш. Биотехнологические основы повышения производства говядины, свинины и сокращения потерь в процессе переработки.

ВНИИплем, 1993, 241 с.

3. Кальницкий Б. Д., Григорьев Н. Г. Изучение белкового обмена у птиц. (Методические рекомендации). М., 1977: 9-10.
4. Пьянков Н.Р. Определение 3-метилгистидина в моче животных. В кн.: Методы биохимического анализа. Боровск, 1997: 214-216.
5. Лемперт М. Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968: 18-20.
6. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971.
7. Определение количества и удельной радиоактивности жирных кислот в тканях. В кн.: Методы биохимических исследований. 1982: 155-157.
8. Bergen W. G. Protein synthesis in animal methods. J. Anim. Sci., 1974, 38, 5: 1079-1091.
9. Byers F. M. Nutritional factors affecting growth of muscle and adipose tissue in ruminants. Fed. Proc., 1982, 41: 2562-2566.
10. Henry V. Lobesite chez le porc comment la maitriser. Economic et Medicins Animals, 1975, 16, 5-6: 261-293.
11. Hoconette J. F., Brazi S., Olivecrona T., Bengtsson-Olivecrona G., Leay V. Lipoprotein lipase activity in muscular and adipose tissues from normal and double-muscling growing calves. Proc. Nutr. Soc., 1995, 54, 1: 42.
12. Munro H. N. A general survey of mechanisms regulating protein metabolism in mammals. In H. N. Munro (Ed). Mammalian Protein Metabolism. 1970, 4: 3.
13. Wannemacher R. W. Ribosomal RNA synthesis and function as influenced by amino acid supply and function as influenced by amino acid supply and stress. Prod. Nutr. Soc., 1972, 31: 281.
14. Williams P. E. V. Effect of a beta-agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves. Brit. J. Nutr., 1987, 57, 3: 417-428.

ПРИМЕНЕНИЕ БАЗОВОЙ СИСТЕМНОЙ МОДЕЛИ РОСТА ДЛЯ РАЗНЫХ ФЕНОТИПОВ: ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ КЛЕНБУТЕРОЛА У БЫЧКОВ НА ОТКОРМЕ

Г.Г. Черепанов, В.А. Матвеев, К.Т. Еримбетов

Для прогноза зоотехнических эффектов действия кленбутерола использована базовая имитационная модель, в которой изменены два параметра: относительная скорость распада белков мышц и скорость жиросотложения. Предсказанные откормочные и убойные качества сопоставлены с фактическими данными, полученными на 12 бычках холмогорской породы в возрасте 12-15 месяцев.

Введение

Исследования, проведенные в последние годы зарубежными и отечественными авторами, показали, что задачи прогнозирования продуктивных реакций и обоснования рационального питания животных разных генотипов в принципе могут быть решены на основе разработки систем имитационных моделей (1-5). В исследованиях прошлых лет была предложена методика прогнозирования роста животных разных генотипов (на примере бычков и телок черно-пестрой породы) на основе использования базовой имитационной модели роста с коррекцией ключевых морфофизиологических показателей, определяемых с помощью упрощенных экспрессных измерений. Было показано, что в модели, описывающей рост бычков, достаточно

изменить значения пяти параметров, характеризующих предельные размеры и скорость линейного роста скелета, омускуленность и скорость накопления жира в теле, чтобы получить удовлетворительный прогноз динамики роста мышц и живой массы, теплопродукции, потребности в обменной энергии и другие физиологические показатели для телок и нетелей этой же породы (2).

Целью исследований текущего года было испытание этой методики применительно к экспериментальной модели, имитирующей генотип с высоким выходом мяса и низким выходом жира. Известно, что у растущего скота при использовании кленбутерола изменяются некоторые параметры метаболизма, что приводит к снижению жиरोобразования и к ускорению роста скелетных мышц (7, 8).

Материал и методы

Эксперименты были проведены в виварии института на 12 бычках холмогорской породы в период с 12- до 15-месячного возраста. Содержание животных привязное, кормление 3-разовое, индивидуальное по нормам, разработанным для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков (6). Рацион кормления приведен в цитируемом отчете (8). Кленбутерол скармливали в дозе 0,5 мг на голову в сутки в течение 60 дней, затем в течение 30 дней кленбутерол не применяли и после проведения прижизненных физиологических исследований производили убой животных, обваловку туши и анализ химического состава тканей.

Для целей прогнозирования использовали ранее описанную системную морфофизиологическую модель роста (1) по следующей методике:

1. Производили несколько прогонов программы, варьируя уровень питания Q с таким расчетом, чтобы найти значение Q , при котором возраст и живая масса в контрольной группе в начале и в конце анализируемого периода соответствуют фактически измеренным данным.

2. Поскольку в опытах с применением кленбутерола статистически достоверные различия в опытной и контрольной группах были отмечены лишь для скорости распада белков мышц и для величины жиροотложения, во входные данные модели для опытной группы были внесены изменения, касающиеся темпов распада белков мышц и жиροотложения, а именно, были изменены численные значения параметра k_{po} в уравнении (1):

$$k_p(t) = k_{po} \exp(-t/T_{kp}) + k_{po0},$$

где $k_p(t)$ – текущее значение относительной скорости распада белков мышц, 1/сут, k_{po0} – то же для зрелого животного и параметра L_6 в уравнении, описывающем динамику увеличения процентного содержания жира в пустой массе тела (f , %):

$$df(t)/dt = L_6 Q f (f_{00} - f),$$

где $f(t)$ – текущее значение процентного содержания жира в "пустой" массе тела, f_{00} – то же для зрелого животного, Q – переменная, характеризующая энергетический статус клетки, которая для молодых животных приблизительно равна величине:

$$Q = (E/E_0) - 1,$$

где E – обменная энергия, т.е. теплопродукция + энергия продукции (теплосодержание отложенного в теле белка и жира), МДж/сут, E_0 – потребность в обменной энергии на поддержание, МДж/сут.

3. Производили прогон программы с измененными значениями параметров k_{po} и L_6 , анализировали выходные данные, сопоставляя их с фактическими данными по комплексу проведенных измерений.

Учитывая небольшую величину выборки (по большинству измерений $n=3$) и погрешность измерений, количественные меры соответствия прогнозируемых и измеряемых показателей (например, по критерию наименьших квадратов, минимакса и др.) не вычисляли. Одновременное варьирование большим числом параметров, как показали проведенные вычислительные эксперименты, не приводило к улучшению адекватности прогноза, поэтому исходная модель с измененными значениями k_{roo} и L_6 была принята в качестве "минимальной" модели, прогнозирующей динамику роста животных опытной группы с измененным типом метаболизма (аналог измененного генотипа).

Результаты и обсуждение

Согласно данным контрольного прогона базовой модели, при выращивании бычков с уровнем питания $Q=1,15$ (величина обменной энергии в 2,15 раза превышает потребность на поддержание) в возрасте 12 мес существенно изменяющиеся показатели (переменные состояния) имели следующие значения, принятые в дальнейшем в качестве начальных значений:

$H(0) = 106,75$ (высота в холке, см)

$n^*(0) = 588,94$ (среднее число ядер на 1 см длины мышечного волокна)

$R^*(0) = 1,17$ (содержание РНК в "эталонной мышце", г)

$P^*(0) = 600,44$ (содержание белка в "эталонной" мышце, г)

$f(0) = 7,69$ (процентное содержание жира в "пустой" массе тела).

Параметры, численное значение которых оставлено без изменения: $k_n = 0,003$; $N_{oo} = 150$; $k_n^* = 0,000017$; $ado = 0,015$ (базовая транскрипционная активность клеток мышц, г РНК/г ДНК сут); $kad = 0,0075$; $k_r = 0,006$; $ago = 5$ (базовая трансляционная активность, г белка/г РНК сут); $k_{ro} = 0,015$ (относительная скорость тканевой деградации белков мышц у новорожденных животных); $T_{kr} = 40$ (параметр, характеризующий скорость снижения относительной деградации белков мышц с возрастом) и параметры L_i ($i = 1-30$, за исключением L_6 , см. выше); интервал интегрирования – 360-540 дней, шаг-30 дней.

Нижеприведенные данные прогноза соответствуют реализации модели, в которой значения всех параметров были идентичными, за исключением двух параметров: k_{roo} для контрольной и опытной (получавшей кленбутерол) групп 0,01 и 0,008 1/сут; и $L_6 - 65 \cdot 10^{-6}$ и $10 \cdot 10^{-6}$ соответственно. Результаты сопоставления прогноза и фактических данных по откормочным показателям приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения живой массы на начало и конец опытного периода длительностью 90 дней и среднесуточного прироста по периодам длительностью 30 дней (данные измерений и прогноз по модели)

Показатель/группы	Контроль		+ Кленбутерол	
	опыт	прогноз	опыт	прогноз
Исходная живая масса, кг	291±6	291	294±7	291
Конечная живая масса, кг	384±16	382	408±13	409
Среднесуточный прирост за:			1658±86	
1-й месяц	1325±90	1100	1046±55	1420
2-й месяц	963±114	870		1120
3-й месяц	-	840	1086±65	1030
Потребление ОЭ с кормом, МДж/сут	77,26	77,89	77,32	77,0

По данным обваловки туш выход мышечной ткани (мякоти) в контроле составил 151 ± 5 кг, в опытной группе – 180 ± 6 кг, внутренний жир – $9,4 \pm 0,6$ и $7,2 \pm 1,0$ соответственно. В использованной версии модели прогнозируются масса постной мышечной ткани по

накопленному белку мышц (20% от обезжиренной массы мышц), жир туши и общее содержание липидов в теле. Поэтому прогнозные данные по мышечной ткани по абсолютной величине ниже измеренных – 115,6 и 128,8 кг для контрольной и опытной групп, прогнозируемое содержание жира в туше – 8,8 и 7,6 кг соответственно. Обвалочные данные по мякоти включают в себя частично межмышечный жир, связки и сухожилия. Жир туши трудно измерить у крупных животных. Косвенно величины отложения жира и белка проявляются в показателях газообмена.

Показатели отложения белка скелетных мышц хорошо согласуются с данными прогноза, хотя показатели скорости синтеза и распада белков мышц, оцененные по экскреции 3-метилгистидина и креатинина, по абсолютной величине оказались несколько ниже прогнозных (7) (табл. 2).

Таблица 2. Скорость синтеза, распада и отложения белков скелетных мышц у бычков-откормочников (фактические данные, полученные на основе измерений экскреции 3-метилгистидина и креатинина, и прогноз по модели)

Показатели/ группы	Контроль		+ Кленбутерол	
	опыт	прогноз	опыт	прогноз
Синтез, г/сут	250±9	296	262±10	296
Распад, г/сут	180±7	231	171±6	207
Отложение, г/сут	69,8±6,7	65	90,9±4,1	89

Величины теплопродукции и энергии продукции были измерены в 13,5-месячном возрасте в контрольной группе и составили 56,7±3,44 и 11,8±1,25 МДж/сут. Аналогичные значения по модели – 57,2 и 10,95 МДж/сут в контрольной группе и 57,4 и 10,92 МДж/сут в опытной группе соответственно. Дополнительные данные, полученные в институте при испытании другой дозы кленбутерола (5 мг/голову в сутки) с проведением газообменных измерений также свидетельствуют об отсутствии заметных различий по величине теплопродукции между контрольной и опытной группами (8).

Вышеизложенные данные указывают на удовлетворительное совпадение фактических данных по доступным для измерения показателям и модельного прогноза. Это может служить основанием для расширенного прогноза, т.е. для прогнозирования тех показателей, которые трудно или невозможно измерить в прямом эксперименте (табл. 3).

Таблица 3. Динамика живой массы и некоторых показателей, которые трудно измерить в опыте, по данным модельного прогноза для контрольной и опытной групп

Показатели/дни	360	390	420	450	480	510
Живая масса, кг						
контроль	291	330	357	382	407	430
+ кленбутерол	291	341	376	408	438	465
Содержание жира в теле, %						
контроль	7,7	8,3	8,9	9,5	10,2	10,9
+ кленбутерол	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
Содержание жира в теле, кг						
контроль	18,2	22,3	25,9	29,9	34,1	38,7
+ кленбутерол	18,2	21,4	23,8	25,9	27,9	29,8
Содержание белка в теле, кг						
контроль	43,7	49,4	53,2	56,9	60,3	63,5
+ кленбутерол	43,7	51,5	57,0	62,2	67,0	71,5
Теплопродукция, МДж/сут						
контроль		56,1	59,5	63,2	66,6	69,9
+ кленбутерол		56,2	59,8	63,5	66,9	70,0
Потребление ОЭ с кормом, МДж/сут						

контроль	70,6	73,5	77,9	82,0	85,9
+ кленбутерол	71,0	73,3	77,0	80,4	83,6
Потребление ОЭ на ед. прироста, МДж/г					
контроль	64,4	84,5	93,2	103	114
+ кленбутерол	49,9	65,4	75,0	85,4	96,8
Доля энергии белка в энергии прироста					
контроль	0,33	0,28	0,25	0,22	0,20
+ кленбутерол	0,46	0,42	0,40	0,37	0,35
Требуемое потребление азота с кормом, г/сут					
контроль	152	140	142	143	143
+ кленбутерол	182	168	167	167	166

Таким образом, в соответствии с фактическими данными, торможение тканевой деградации белков и снижение скорости образования жира у бычков-откормочников приводит к повышению скорости роста (увеличению живой массы), к более эффективному использованию энергии корма и к повышению доли белка в энергии продукции на фоне идентичной скорости теплопродукции. С другой стороны, данные теоретического моделирования указывают на то, что при воздействии кленбутерола, по-видимому, увеличивается потребность в азоте. Этот вопрос требует уточнения в дальнейших исследованиях.

Заключение

Полученные данные обосновывают возможность применения системной модели роста молодняка крупного рогатого скота для прогнозирования физиологических и зоотехнических последствий изменения процессов, протекающих на уровне клеток и тканей, в данном случае – для прогнозирования эффектов, сопровождающих торможение тканевой деградации белков мышц и процессов липогенеза у бычков-откормочников. Введение в базовую модель соответствующих поправок по двум ключевым параметрам, характеризующим биологические эффекты кленбутерола, оказалось достаточным, в первом приближении, для получения адекватного прогноза по динамике множественных физиологических и зоотехнических показателей на протяжении периода откорма в опытной группе. Таким образом, получено дополнительное обоснование разработанной в институте новой концепции роста и нормирования кормления молодняка скота разных генотипов, основанной на выявлении устойчивых базисных механизмов роста и интеграции этих знаний в форме системной модели с последующей привязкой к конкретным условиям и генотипам с помощью экспрессных измерений.

В предложенной концепции базисные инвариантные биологические факторы и взаимосвязи вводятся в систему *a priori* с учетом данных мировой науки, значения ключевых морфофизиологических параметров определяются по стандарту породы или по данным измерений, а динамика ростовых качеств и размеры физиологических потребностей прогнозируются на модели с учетом конкретных условий внешней среды.

Эта концепция является новой, в мировой литературе аналогичных разработок пока нет. Существенным элементом концепции является учет (описание) процессов тканевого и молекулярно-клеточного уровня в лидирующих точках роста с последующим учетом взаимных корреляций в развитии системы органов и тканей. Эта особенность концепции позволяет в принципе прогнозировать количественные эффекты модификаций на начальных участках системы геном-клетка-ткань-организм. В связи с успехами генноинженерных, эмбриоинженерных и других биотехнологических разработок задача прогнозирования роста и условий оптимальной реализации

биологического потенциала новых типов животных становится весьма актуальной. Разработка общей концептуальной базы и аппарата описания позволяет перенести внимание от эмпирической констатации бесчисленных проявлений ростовых процессов на поиск ключевых точек роста и снятие информации в эксперименте для введения ее в модель.

Биологическое действие кленбутерола, конечно, не ограничивается теми эффектами, которые характеризуются двумя параметрами, по которым была проведена "привязка" базовой модели для данного случая. Такая "минимальная" модель принята исключительно по соображениям экономии исследовательских затрат, поскольку дальнейшее дробление описания не соответствует объему имеющегося фактического материала и уровню точности физиологических и зоотехнических измерений. По мере необходимости описание эффектов кленбутерола (или других генотипов) можно детализировать в соответствии с той или иной задачей. С учетом полученных результатов данная методика может быть использована для более широкого применения с учетом породной принадлежности и для разных видов животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черепанов Г.Г. Системная морфофизиологическая теория роста животных, Боровск, 1994.
2. Черепанов Г.Г., Агафонов В.И., Решетов В.Б. Прогнозирование роста крупного рогатого скота с учетом полового диморфизма на основе модифицированной системной морфофизиологической модели. С.-х. биология, 1993, 2:14-21.
3. Black J.L., Davies G.T., Fleming J.F. Role of computer simulation in the application of knowledge to animal industries. Austr.J.Agr.Res., 1993, 44:541-555.
4. Baldwin R.L., Sainz R.D. Energy partitioning and modeling in animal nutrition. Ann.Rev.Nutr., 1995, 15:191-211.
5. Fox D.G., Sniffen C.J., O Connor J.D. The Cornell net protein and carbohydrate system. I. Predicting cattle requirements. Proc.Cornell Nutr.Conf., 1987:36-41.
6. Калашников А.П. и др. Нормы и рационы кормления животных. М.:Агропромиздат, 1985.
7. Еримбетов К.Т. Метаболизм азотистых веществ и количественные аспекты синтеза и катаболизма белков скелетных мышц у бычков при введении кленбутерола. Дисс. .к.б.н., Боровск, 1997.
8. Отчет о НИР за 1992-1995 гг. ВНИИФБиП.

ОБМЕН МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ У БЫЧКОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

*И.М. Тюпаев, Б.Д. Кальницкий, А. В. Бочаров,
Н.Р. Пьянков, А.И. Григорьев*

Исследована количественная характеристика метаболизма (синтез, деградация, аккреция мышечных белков у крупного рогатого скота в онтогенезе.

Введение

В течение многих лет одной из наиболее актуальных проблем остается проблема белка, имеющая теоретическое и практическое

значение, составляющая основу большинства направлений исследований органического мира.

Закономерности биосинтеза белков настолько многогранны и сложны, что во многих отношениях остаются недостаточно изученными. Например, взаимосвязи между возрастом, интенсивностью выращивания и биосинтезом белка в организме животных, в частности, у крупного рогатого скота. Выяснение этих взаимосвязей является важным для понимания и решения многих проблем интенсификации скотоводства.

Генетический потенциал продуктивности позволяет получать от бычков молочных пород прирост массы до 2 кг в сутки. Растущие с такой скоростью животные используют большую часть энергии и питательных субстратов на рост. Однако до сих пор не идентифицированы факторы и не раскрыты механизмы, ответственные за более быстрое накопление в органах и тканях липидов по сравнению с аккрецией белка по мере созревания животного.

Регулирование метаболизма (синтез и распад) белков в скелетных мышцах является реальным путем оптимизации производства животного белка. Вопрос в том, в какой период постнатального развития, на какой из двух процессов (или на оба одновременно) наиболее целесообразно то или иное воздействие с целью управления ростом животного. Ограниченность знаний в этой области сдерживает разработку методов, средств и технологий, способствующих максимальному проявлению генетического потенциала мясной продуктивности крупного рогатого скота.

Наиболее перспективный путь выяснения закономерностей роста проходит, по-видимому, через изучение и понимание возрастных изменений метаболизма, в частности метаболизма белков скелетных мышц. В науке и практике эта малоисследованная проблема приобрела особо важное значение.

Основной целью исследований была количественная характеристика метаболизма (синтез, деградация, аккреция) белков, прежде всего мышечных белков, у крупного рогатого скота в онтогенезе.

Материал и методы

Исследования проведены на бычках черно-пестрой породы в возрасте от 1 до 18 месяцев в условиях лаборатории радиобиологии, вивария и ОПХ "Ермолино", а также АО "Красное знамя" Новосокольнического района Псковской области. Животных содержали на привязи в индивидуальных станках, оборудованных поилками. Площадь станка – 2,3-3,0 м²; относительная влажность воздуха в помещениях – 80-90%; температура воздуха в помещениях в осенне-зимние периоды – +10С°, в весенне-летние периоды – +15 – +25С°.

В научных и научно-хозяйственных экспериментах исследовали динамику метаболизма мышечных белков у бычков, растущих при уровнях питания, превышающих потребности животных на поддержание в 2,6 раза. В период от рождения до 1 месяца телята получали по 7 кг цельного молока в сутки, после чего животных переводили на дифференцированное кормление. В период от 1- до 3-месячного возраста бычки получали от 6 до 3 кг цельного молока в сутки. С 2-месячного возраста телят приучали к сено-концентратному рациону. Питание подопытных бычков в различные возрастные периоды нормировали по рекомендациям ARC (1).

Взвешивание животных, отбор проб кормов и их остатков проводили ежедекадно. В возрасте 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев бычков анестезировали с последующей обвалкой-препарированием туш (2).

Для биохимической характеристики метаболизма белков в скелетных мышцах измерены параметры синтеза, деградации и накопления различных фракций мышечных белков в течение роста бычков с использованием методов внутривенного одномоментного введения ^3H -лейцина, внутривенной постоянной инфузии или одномоментного введения насыщающей дозы ^{15}N -глицина, а также с определением суточной экскреции 3-метилгистидина и креатинина.

^3H -лейцин использован в опытах на двух бычках месячного возраста с живой массой 60 кг; уровень питания этих животных в 2,6 раза превышал потребности на поддержание. Для определения общего белкового синтеза в скелетных мышцах подопытным бычкам в левую яремную вену одномоментно вводили изотоп в дозе 5,1 МБк/кг ЖМ^{0,75}. Пробы крови брали из правой яремной вены через 2, 5, 10, 1-5, 25, 30, 60, 180 и 240 мин после введения метки. Пробы мышц получали через 20, 60, 180 и 240 мин после инъекции изотопа путем биопсии правой и левой четырехглавых мышц бедра.

При использовании ^{15}N -глицина (обогащение 95%) расчеты скоростей синтеза и деградации белков всего тела или скелетных мышц проводили с помощью моделей (рис. 1), основанных на компартментальном анализе кривых исчезновения ^{15}N -глицина из свободных аминокислот плазмы или скелетных мышц и включения меченого глицина в мышечные белки в период его инфузии или одномоментного введения насыщающей дозы изотопа (3, 4) в левую яремную вену.

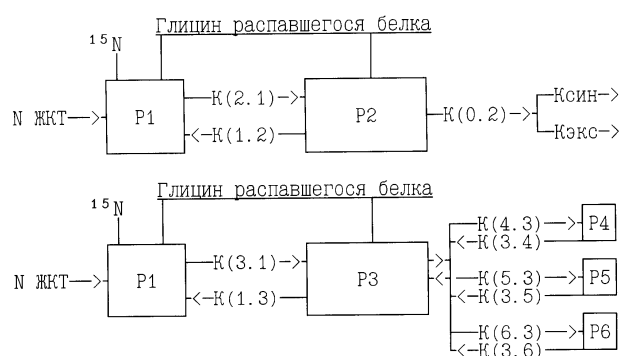


Рис. 1 Модели метаболизма глицина для вычисления скоростей синтеза белка в целом организме и скелетных мышцах бычка

P1, P2, P3– пулы свободного глицина плазмы, всего тела, скелетных мышц. P4, P5, P6 – пулы глицина, связанного с саркоплазматическим, миофибриллярным, стромальным белками соответственно.

При постоянной инфузии изотопа пробы плазмы крови получали через катетер из правой яремной вены, а биоптаты мышц (четырёхглавой бедра, длиннейшей спины, трёхглавой плеча) получали биопсией через 3, 4 и 4,5 часа. При одномоментном введении насыщающей дозы ^{15}N -глицина образцы плазмы получали через 0,03, 0,17, 0,50, 1,00 и 3,00 часа, а биоптаты перечисленных мышц – через 0,17, 0,50, 1,00 и 3,00 часа после введения изотопа.

Таблица 1. Способы и дозы внутривенного введения бычкам ^{15}N -глицина

№ животных	Возраст, мес	Живая масса, кг	Уровень питания	Способ введения	Доза, мг ^{15}N на кг ЖМ ^{0,75}
10	1	51	2,60хП	Одномоментное+инфузия	4,07+8,48мг/час

13	3	120	2,60хП	Одномоментное+инфузия	2,61+6,71мг/час
1	3	94	Компенсаторный рост	Одномоментное	31,1,4
18	6	159	2,10хП	Одномоментное	38,03
14	6	140	1,90хП	Одномоментное	33,24
245	9	273	2,40хП	Одномоментное	42,25
2456	12	210	1,55хП	Одномоментное	38,12
2397	12	385	Компенсаторный рост	Одномоментное	44,87
9	18	520	2,60хП	Одномоментное	48,21

В ходе экспериментов проводили учет потребления корма, зоотехнический анализ кормов, кормовых остатков и кала (5). Теплопродукцию измеряли масочным методом 6), суточный сбор мочи проводили по Rocks (7), анализ состава тела (органические и сухое вещество, в том числе белок, зола, жир) – по АОАС (8).

Креатин в мышцах и креатинин в моче определяли по Ceriotti (9); 3-метилгистидин в мышцах, мышечном белке и моче определяли на автоматическом анализаторе аминокислот ААА – 339 (10) и по Radha and Bessmann (11) в модификации Тюпаева и Пьянкова (12); мочевины – по Coulombe and Fawcett (13);, общий азот в биологическом материале – по Кьельдалю на приборе Сереньева (14). Катетеризацию яремных вен и биопсию мышц осуществляли по Алиеву (15). Для хроматографии аминокислот на бумаге использовали разделительную смесь из n-бутанола, уксусной кислоты и воды (16); ионообменную хроматографию аминокислот – на автоматическом анализаторе ААА 339 (Чехия); солюбилизацию мышечной ткани и мышечных белков – по Mahin and Lofberg (17) в модификации Озриной и др. (18); измерение удельной радиоактивности аминокислот – на жидкостном сцинтилляционном счетчике 1215 RACKBETA 11 (ЛКБ) с использованием сцинтилляционной жидкости Брэя. Препаративное выделение азота аминокислот, мочевины и аммонийных солей мочи проводили по Материкину и Материкиной (19); соотношение атомных масс $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ в азоте аминокислот измеряли на масс-спектрометре (МИ – 1201) с использованием счетчика ионов (СИ-ОЗ); нуклеиновые кислоты в скелетных мышцах и внутренних органах определяли по Shibko et al. (20), Шевченко и Шевченко (21); препаративное выделение саркоплазматических, миофибриллярных и стромальных белков из мышц проводили по Helander (22) в модификациях Тартаковского (23), Murray (24) и Everett et al. (25); гидролиз белков – по Gerritsen and Niederwieser (10); препаративное выделение аминокислот – на автоматическом анализаторе HD-1200 (Чехия) с колонкой 1500х30 мм, синхронизированной с коллектором фракций 301-В (Венгрия).

Потоки азота, скорости синтеза и распада белка в целом организме бычков измеряли с помощью двухпуловой модели (26, 27), а также уравнений:

$$Q=Ed/e \text{ (28) и } Q=E+S+I+B \text{ (29),}$$

где Q – скорость потока азота в организме; E – скорость экскреции азота; d – доза введенного стабильного изотопа азота; e – количество экскретируемого изотопа; S, B – скорости синтеза и распада белка в целом организме; I – скорость поступления азота с кормом.

Константы скоростей синтеза белков в скелетных мышцах рассчитывали по начальной фазе включения меченой аминокислоты в белки при одномоментном внутривенном введении изотопа или по включению предшественника в белки в конце постоянной инфузии меченой аминокислоты (28, 30, 31).

Константы скоростей аккреции белков в скелетных мышцах рассчитывали по Dickson and Nnanielugo (32). Константы скоростей

распада мышечных белков вычисляли по разнице скоростей синтеза и аккреции белка. Общий синтез белка в скелетных мышцах рассчитывали по Nettleton and Hegsted (33).

Скорость деградации миофибрилярного белка измеряли по суточной экскреции 3-метилгистидина (34). Скорость синтеза миофибрилярного белка вычисляли по сумме скоростей распада и аккреции.

Математическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ "Стадия-6" и "G-BSTAT".

Результаты и обсуждение

Белки скелетных мышц, подобно другим белкам, непрерывно разрушаются и ресинтезируются, даже в период голодания животного. Количественное формирование общего фонда белков в скелетных мышцах зависит от изменений в скорости одного или двух этих процессов одновременно. Вероятно, в различные периоды онтогенеза изменения будут хотя и различными, но строго согласованными, то есть, синтез белка, зависящий, как известно, от общего числа рибосом и "активности" последних, должен находиться в соответствии с интенсивностью его деградации.

Контроль скорости синтеза мышечных белков осуществляется через изменение количества рибосом (рис. 2) в мышечных клетках (35).

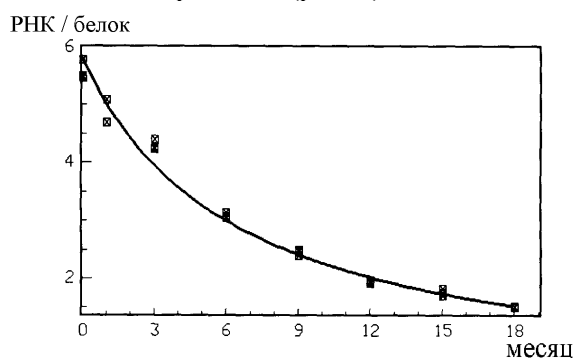


Рис. 2. Изменение величины отношения РНК/суммарный белок ($\text{РНК} \cdot 10^3 / \text{белок}$, г) в скелетных мышцах бычков в онтогенезе.

Поэтому наблюдаемое нами увеличение пула рибонуклеиновых кислот в скелетных мышцах (табл. 2) можно было связать с изменениями синтеза белков в исследуемый период роста животных. Так, количество синтезируемого за сутки миофибрилярного белка (табл. 2) оказалось пропорциональным общему фонду рибонуклеиновых кислот.

Таблица 2. Изменение метаболизма миофибрилярных белков в скелетных мышцах бычков в онтогенезе

Возраст, мес (n=5)	Накопление	Деградация	Синтез	Эффективност ь синтеза (%)
	г/сутки			
Новорожденные	16,27±2,22	33,11±3,78	49,38±5,38	32,90±2,70
1	21,95±2,62	31,27±3,33	53,22±6,01	41,20±3,80
3	24,73±2,58	61,90±5,86	86,63±8,65	28,50±1,90
6	25,93±1,98	75,09±5,14	101,02±7,31	25,70±1,30
9	43,58±4,94	107,88±10,86	151,46±16,21	28,80±2,50
12	40,18±3,53	106,79±8,75	146,97±12,70	27,30±1,40
14	34,55±3,28	129,74±11,95	164,29±15,99	21,00±1,50
17	36,65±3,55	116,07±9,95	152,72±13,86	24,00±1,60

В исследованиях Рауэцкого научно-исследовательского института (Англия, Абердин), выполненных на лабораторных животных по

программам PU 04 и PU 05, показано, что в раннем постнатальном периоде динамика метаболизма миофибриллярных белков отражает динамику обмена суммарных мышечных белков (36).

Сходные результаты получены нами и на бычках. Количество синтезируемого суммарного белка в скелетных мышцах новорожденных телят составляет 111 г в сутки, или 14,25 г белка в сутки на 1 г тотальной РНК (табл. 3, рис. 3).

Если предположить, что у новорожденных телят "активность" РНК скелетных мышц предопределена генетически, то полученная величина отражает потенциал белкового синтеза в скелетных мышцах бычков черно-пестрой породы.

Таблица 3. Метаболизм суммарных белков в скелетных мышцах бычков в онтогенезе (г/сутки)

Возраст, мес (n=2)	Синтез	Распад	Эффективность синтеза (%)
Новорожденные	110,87±10,61	74,40±6,33	32,89±3,30a
1	139,80±12,20	90,88±8,82	34,99±3,93
3	259,97±24,22	200,75±23,50	22,78±2,97
6	331,23±19,50	265,87±18,17	19,73±1,53*
9	525,00±36,80	403,15±50,63	23,20±3,27a
12	586,87±26,16	496,95±49,58	15,32±1,69*
14	646,28±37,52	536,15±43,80	17,04±1,65*a
17	661,96±33,84	569,97±49,04	13,89±1,36*a

a – n=1

* – P<0,05

Во многих исследованиях, проводимых с целью изучения морфологических, физиологических и биохимических реакций организма, используются те или иные резкие воздействия в различные этапы онтогенеза. Чаще используется перевод животного с нормированного питания на голодание и обратно.

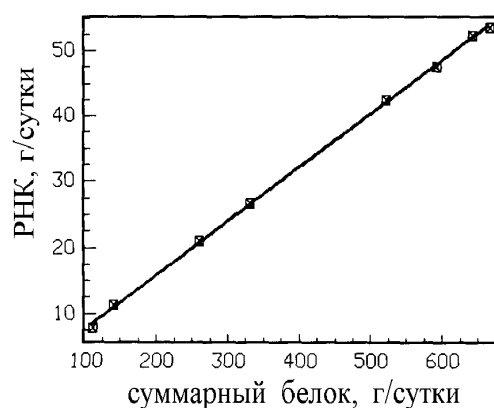


Рис. 3. Зависимость между пулом тотальной РНК и синтезом суммарного белка в скелетных мышцах растущих бычков.

В наших исследованиях с использованием этого подхода компенсаторный рост бычков в раннем онтогенезе сопровождался ускорением оборота миофибриллярных белков. Однако к 12-месячному возрасту, когда имела место максимальная скорость формирования пула белка в скелетных мышцах, происходило снижение скорости оборота и возрастание эффективности синтеза миофибриллярной фракции белка. В противоположность скорости при компенсаторном росте, скорость распада миофибриллярного белка в составе общего белка значительно возрастала в период голодания бычков (рис. 4).

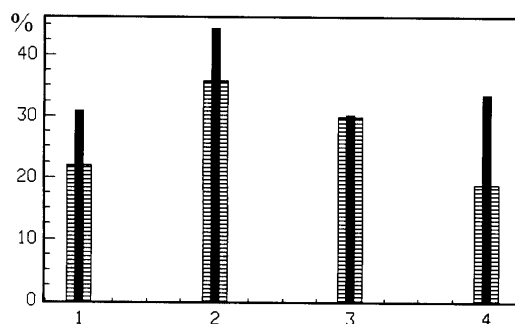


Рис. 4. Вклад миофибриллярных белков в общий протеолиз мышечного белка у 3- (■) и 12-месячных (▨) бычков при нормальном уровне питания (1), голодании (2), поддержании (3) и компенсаторном росте (4)

Вероятно, механизмы регуляции протеолиза разных мышечных белков могут быть независимыми, в частности нелизосомальными и лизосомальными.

Выводы

1. Скорость синтеза суммарного белка в скелетных мышцах у бычков черно-пестрой породы достигает 14,5 г белка в сутки на 1 г тотальной РНК.

2. Общий фонд рибонуклеиновых кислот в скелетных мышцах относительно пула суммарного мышечного белка (РНК/белок) у бычков детерминирован физиологической зрелостью и снижается от 4,9 до 1,6 мг тотальной РНК на 1 г белка от рождения к 18-мес возрасту.

3. Величина синтеза суммарного мышечного белка на единицу общего фонда рибонуклеиновых кислот в скелетных мышцах ("активность" тотальной РНК) у бычков относительно постоянна в течение роста при условии постоянного уровня питания.

4. Контроль распада мио- и немиофибриллярных мышечных белков у растущих бычков осуществляется, по-видимому, разными (метаболически независимыми) путями. Более высокая степень аккреции суммарного мышечного белка в раннем онтогенезе обусловлена более высокой скоростью оборота миофибриллярного белка. Компенсаторный рост у бычков старшего возраста сопровождается снижением скорости распада миофибриллярных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. ARC. The nutrient requirements of ruminant livestock. Technical review by an agricultural research council working party. Printed by Unwin Brothers. The Greham Press, Old Working, Surrey, 1980.
2. Брэй Р., Бриски Э., Кассенс Р., Кауфман Р. Методы изучения качества мяса. Методы научных исследований в животноводстве. Под ред. Я. Л. Глембовского. М.: Колос, 1975:469-578.
3. Berman M., Weiss M.F. Users manual for SAAM (Simulation, analysis and modeling). Bathesda, Maryland, 1978.
4. Nissim I., Yudkoff M., Segal S. A model for determination of total body protein synthesis based upon compartmental analysis of the plasma (^{15}N)-glycine decay curve. Metabolism, 1983, 32:646-653.
5. Петухова Е.А., Бессарабова Р.Ф., Холенева Л.Д., Антонова О. А. Зоотехнический анализ кормов. М.: Колос, 1981: 22-24.
6. Надаляк Е.А., Агафонов В.И., Киселев А.Ф., Заболотнов Л.А., Решетов В. Б. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1986: 31-40.
7. Rocks R.L. Note on the preservation of sheep urine. Lab. Pract., 1977, 20:682.

8. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11-th Ed. W. Horwitz (Ed.). Washington: Ass. off. Anal. Chem., 1970.
9. Ceriotti G. Other non-protein nitrogenous compounds. D. Creatine determination. Clin. Biochem. Princ. Meth., 1974, 2:1138-1140.
10. Gerritsen T., Niederwieser A. Quantitative determination of amino acids by column chromatography. Clin. Biochem. Princ. Meth., 1974, 2: 1087-1102.
11. Radha E., Bessmann S.P. A rapid colorimetric method for 3-methylhistidine in urine. Anal. Biochem., 1982, 121:170-174.
12. Тюпаев И.М., Пьянков Н.Р. Определение 3-метилгистидина в моче животных. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. ж-х, Боровск, 1989, 2 (94):71-74.
13. Coulaombe S.S., Fawcett S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem. 1963, 9: 23.
14. Rieder H.P. Determination of total proteins. Clin. Biochem. Princ. Meth. 1974, 2:1468-1478.
15. Алиев А. А. Биопсия длиннейшего мускула спины. Оперативные методы исследований сельскохозяйственных животных. Л.: Наука, 1974:230.
16. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1964:162-180.
17. Mahin D.T., Lofberg R.T. A simplified method of sample preparation for determination of tritium, carbon-14 or sulfur-35 in blood and other whole tissues. Anal. Biochem. 1966, 16: 500.
18. Озрина Р.Д., Ульянов А.М., Сорвачев К.Ф. Метод приготовления гомогенных образцов тканей и крови для жидкостного сцинтилляционного счета. Биол. науки, 1979, 4:100-103.
19. Материкин А.М., Материкина М.И. Применение прибора Сереньева для препаративного выделения ^{15}N . Бюл. ВНИИФБиП, 1981, 4 (64): 72-75.
20. Shibko S., Kaivistoinen P., Tratniek C. A. et al. A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. Anal. Biochem., 1967, 19: 514-528.
21. Шевченко Н.А., Шевченко В. Г. Выделение, количественное определение и анализ нуклеиновых кислот у сельскохозяйственных животных. Методические указания. ВНИИФБиП с.-х. ж-х, Боровск, 1984:86.
22. Helander E. On quantitative muscle protein determination. Acta Physiol. Scand., 1957, 41 (141):1-99.
23. Тартаковский А.Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечно-полосатых мышц. Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука, 1978: 55-76.
24. Murray C.E., Warnes D.M., Ballard F.J., Tomas F.M. Creatine excretion as an index of myofibrillar protein mass in dystrophic mice. Clin. Sci., 1981, 61: 737-741.
25. Everett A.W., Prior G., Clark H., Zak R. Quantitation of Myosin in muscle. Anal. Biochem., 1983, 130: 102-107.
26. Picou D., Tailor-Roberts A. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary proteins. Clin. Sci., 1969, 36:283.
27. Waterlow J.C. Protein turnover in the whole body. Nature, 1975, 253: 157.
28. Waterlow J.C., Garlick P.J., Millward D.J. Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. Amsterdam: Elsevier-North Holland, 1978:804.
29. Fern E.P., Garlick P.J., McNurlan M. A., Waterlow J.C. The excretion of isotope in urea and ammonia for estimating protein turnover in man with ^{15}N -glycine. Clin. Sci., 1981, 61: 217-228.
30. Symon O. Measurement of tissue protein turnover in animals. Proc. VI Int. Symp. Amino Acids, Warszawa, 1984:196-206.
31. Вовк С.И., Янович В. Г. Исследование синтеза белков в тканях сельскохозяйственных животных (Методические рекомендации). УкрНИИФБиП с.-х. ж-х Львов 1988:20 с.

32. Dickson O., Nnanielugo D. Study in the protein turnover using developmental changes in muscle. Nutr. Rep. Int., 1981, 23:945-962.
33. Nettleton J.A., Hegsted D.M. The effects of protein and calorie restriction on tissue nitrogen content and protein catabolism. Nutr. Metabol., 1974, 17:166-180.
34. Tomas F.M., Murray A.J., Jones L.M. Interactive effect of insulin and corticosterone on myofibrillar protein turnover in rats as determined by N-methylhistidine excretion. Biochem. J., 1984, 220: 469-479.
35. Millward D.G. Protein turnover in skeletal and cardiac muscle during normal growth and hypertrophy. Degradative processes in heart and skeletal muscle. K. Windental (Ed.). Amsterdam, 1980:161-199.
36. Lobley G.E. Control of protein metabolism. Growth promoter actions. The Rowett research institute, 1991: 54-55.

ОБМЕН БЕЛКОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ВСЕГО ТЕЛА У БЫЧКОВ ПРИ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫРАЩИВАНИЯ

И.М. Тюпаев, Н.Р. Пьянков, А. В. Бочаров, А. И. Григорьев

В исследованиях с использованием радиоактивных и стабильных изотопов продемонстрирована детерминирующая роль пула рибонуклеиновых кислот и его "активности" в регулировании метаболических потоков белковых компонентов, лимитирующих эффективность продукционных процессов в организме растущих животных.

Введение

В настоящее время в литературе отсутствуют систематизированные данные по параметрам метаболизма различных фракций белков в скелетных мышцах, по вкладу скелетных мышц в синтез белков всего организма у сельскохозяйственных животных, выращиваемых с различной интенсивностью. Вместе с тем, познание ключевых процессов, определяющих скорость формирования белковых фондов в организме, необходимо для разработки средств и способов, регулирующих перераспределение различных метаболических потоков, с целью управления эффективностью продукционных процессов.

Материал и методы

Исследования проведены на бычках черно-пестрой породы в возрасте от 1 до 18 месяцев в условиях лаборатории радиобиологии, вивария и ОПХ «Ермолино», а также АО «Красное знамя» Новосокольнического района Псковской области.

В научных и научно-хозяйственных экспериментах исследовали динамику метаболизма мышечных белков у бычков, растущих при уровнях питания, превышающих потребности животных на поддержание в 1,5, 2,1, 2,4, 2,6 раза. Питание подопытных бычков в различные возрастные периоды нормировали по рекомендациям ARC (1). Взвешивание животных, отбор проб кормов и их остатков проводили еженедельно. В возрасте 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 месяцев бычков анестезировали с последующей обвалкой-препарированием туш (2).

Для биохимической характеристики метаболизма белков в скелетных мышцах измерены параметры синтеза, деградации и накопления различных фракций мышечных белков в период роста бычков.

³H-2-лейцин использован в опытах на бычках месячного возраста с живой массой 60 кг; уровень питания этих животных в 2,6 раза превышал потребности на поддержание. Для определения общего белкового синтеза в скелетных мышцах подопытным бычкам в левую

яремную вену одномоментно вводили изотоп в дозе 5,1 МБк/кг ЖМ^{0,75}. Пробы крови брали из правой яремной вены через 2, 5, 10, 15, 25, 30, 60, 180 и 240 мин после введения метки. Пробы мышц получали через 20, 60, 180 и 240 мин после инъекции изотопа путем биопсии правой и левой четырехглавых мышц бедра.

При использовании ¹⁵N-глицина (обогащение 95%) расчеты скоростей синтеза и деградации белков всего тела или скелетных мышц проводили с помощью двухпуловой и пятипуловой моделей, основанных на компартментальном анализе кривых исчезновения ¹⁵N-глицина из свободных аминокислот плазмы или скелетных мышц и включения меченого глицина в белковый пул всего организма, а также в общие фонды суммарного, саркоплазматического, миофибриллярного и стромального белков скелетных мышц в период инфузии (3-6 мг ¹⁵N/час/кг ЖМ^{0,75}) или одномоментного введения насыщающей дозы изотопа (31-44 мг ¹⁵N/кг ЖМ^{0,75}) в левую яремную вену (3, 4).

При постоянной инфузии изотопа пробы плазмы крови получали через катетер из правой яремной вены, а биоптаты мышц (четырёхглавой бедра, длиннейшей спины, трёхглавой плеча) получали через 3, 4 и 4,5 часа. При одномоментном введении насыщающей дозы ¹⁵N-глицина образцы плазмы получали через 0,03, 0,17, 0,50, 1 и 3 часа, а биоптаты перечисленных мышц – через 0,17, 0,50, 1 и 3 часа после введения изотопа.

В ходе экспериментов проводили учет потребления кормов, зоотехнический анализ кормов, кормовых остатков и кала (5). Теплопродукцию измеряли масочным методом (6); суточный сбор мочи проводили по Rocks (7); анализ состава тела (органическое и сухое вещество, в том числе белок, зола, жир) – по АОАС (8).

Креатин в мышцах и креатинин в моче определяли по Ceriotti (9, 10); 3-метилгистидин в мышцах, мышечном белке и моче определяли на автоматическом анализаторе аминокислот AAA – 339 (11) и по Radha and Bessmann (12) в нашей модификации (13), мочевины – по Coulombe and Fawrean (14); общий азот в биологическом материале – по Къельдалю на приборе Сереньева (15). Катетеризацию яремных вен и биопсию мышц осуществляли по Алиеву (16). Для хроматографии аминокислот на бумаге использовали разделительную смесь из н-бутанола, уксусной кислоты и воды (17); ионообменную хроматографию аминокислот – на автоматическом анализаторе AAA 339 (Чехия); солюбилизацию мышечной ткани и мышечных белков – по Mahin and Lofberg (18) в модификации Озриной с соавт. (19); измерение удельной радиоактивности аминокислот – на жидкостном сцинтилляционном счетчике 1215 RACKBETA 11 (ЛКБ). Препаративное выделение азота аминокислот, мочевины и аммонийных солей мочи проводили по Материкину и Материкиной (20); соотношение атомных масс ¹⁵N/¹⁴N в азоте аминокислот измеряли на масс-спектрометре (МИ – 1201) с использованием счетчика ионов (СИ-03); нуклеиновые кислоты в скелетных мышцах и внутренних органах определяли по Shibko et al. (21), Шевченко и Шевченко (22), препаративное выделение саркоплазматических, миофибриллярных и стромальных белков из мышц проводили по Helander (23) в модификациях (24, 25, 26). Гидролиз белков – по Gerritsen and Niederwieser (11); препаративное выделение аминокислот – на автоматическом анализаторе HD-1200 (Чехия) с колонкой 1500 x 30 мм, синхронизированной с коллектором фракций 301-B (Венгрия).

Потоки азота, скорости синтеза и распада белка в целом организме бычков измеряли с помощью двухпуловой модели (27, 28), а также уравнений $Q=E \cdot d/e$ (29) и $Q=E+S+I+B$ (30), где Q – скорость потока

азота в организме; E – скорость экскреции азота; d – доза введенного стабильного изотопа азота; e – количество экскретируемого изотопа; S, B – скорости синтеза и распада белка в целом организме; l скорость поступления азота с кормом.

Константы скоростей синтеза белков в скелетных мышцах рассчитывали по начальной фазе включения меченой аминокислоты в белки при одномоментном внутривенном введении изотопа или по включению предшественника в белки в конце постоянной инфузии меченой аминокислоты (29, 31, 32). Константы скоростей аккреции белков в скелетных мышцах рассчитывали по Dickson and Nnanielugo (33). Константы скоростей распада мышечных белков вычисляли по разнице скоростей синтеза и аккреции белка. Общий синтез белка в скелетных мышцах рассчитывали по Nettleton and Hegsted (34).

Скорость деградации миофибриллярного белка измеряли по суточной экскреции 3-метилгистидина (35). Скорость синтеза миофибриллярного белка вычисляли по сумме скоростей распада и аккреции.

Математическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ "Стадия-6" и "G-BSTAT".

Результаты и обсуждение

Обмен миофибриллярных и саркоплазматических белков. Интенсивность выращивания, или уровень питания, оказывает значительное влияние на параметры метаболизма миофибриллярных белков (табл. 1). Снижение уровня питания сопровождается достоверным снижением скорости оборота миофибриллярных белков. Причем, на уровне питания, превышающем потребности в 1,55 раза, снижение скорости оборота миофибриллярных белков у бычков после 12 мес происходит за счет понижения скорости синтеза при постоянной относительной скорости их деградации.

Из результатов исследований с использованием ^{15}N -глицина следует, что относительный вклад саркоплазматических белков в общий оборот мышечных белков не зависит от уровня питания бычков. Основная доля (более 50%) в обороте суммарного мышечного белка принадлежит белкам саркоплазмы, скорость синтеза которых достоверно возрастает при увеличении уровней питания бычков от $1,55 \cdot \text{П}$ до $2,60 \cdot \text{П}$ (табл. 1).

Вклад саркоплазматических, миофибриллярных и стромальных белков в синтез и распад общего мышечного белка у бычков не зависит от скорости их выращивания. Тем не менее, в онтогенезе (вплоть до 17-месячного возраста) вклад саркоплазматических белков в синтез и распад суммарного мышечного белка возрастает, в противоположность таковому миофибриллярных белков. Следовательно, рост скелетных мышц сопровождается перераспределением участия лизо- и нелизосомального механизмов белковой деградации в регуляции аккреции общего мышечного белка.

Таблица 1. Скорости синтеза белков миофибриллярной и саркоплазматической фракций у бычков при разном уровне питания (2/сутки) ($n=5$).

Возраст бычков (мес)	Интенсивность выращивания			
	1,55·П	1,90·П	2,10·П	2,60·П
Белки миофибриллярной фракции				
1	63±4	63±3	68±5a	75±6a
3	52±4	92±5*	100±9a	137±12a
6	45±3*	104±7	125±10б	165±12б
9	61±3*	127±8*	153±10	198±13
12	67±4	123±9*	147±9	196±13

15	52±3*	135±8*	160±11	206±14
18	75±5*	134±8*	166±12	187±13
Белки саркоплазматической фракции				
1	85±9	87±9	94±10a	103±14a
3	83±9*	150±12	163±16a	224±22a
6	90±9*	215±18*	250±24b	329±30b
9	173±14*	302±26*	364±26	470±37
12	176±15*	324±28*	387±30	516±38
15	208±16*	387±30*	459±39	592±42
18	222±19*	409±34	508±40	573±45

a – (n=3); б – (n=4); * – здесь и далее P<0,05.

Обмен суммарного мышечного белка. Если предположить, что механизм пищевого контроля синтеза белка в скелетных мышцах реализуется через изменение количества рибосом, то, аналогично относительной скорости оборота миофибриллярных белков, концентрация рибонуклеиновых кислот в скелетных мышцах могла бы уменьшаться с понижением уровня питания животных. Однако экспериментальные данные не подтвердили это предположение. Величина отношения *тотальная РНК/суммарный белок* («способность» к синтезу) в скелетных мышцах не изменялась с варьированием интенсивности выращивания бычков. Определяющими факторами количества синтезируемого в скелетных мышцах белка (табл. 2) оказались пул *тотальной РНК* и «активность» этого пула (рис. 1).

Таблица 2. Показатели метаболизма общего белка в скелетных мышцах у бычков, выращиваемых с различной интенсивностью (г/сутки; %/сутки) (n=5)

Возраст бычков (мес)	Интенсивность выращивания							
	1,55·П		1,90·П		2,10·П		2,60·П	
Синтез								
1	174±12	5,5	173±12	6,2	187±18	6,2a	207±20	6,2a
3	157±11	3,8*	281±20	5,1	306±30	5,2a	419±41	5,8a
6	157±11	2,6*	370±26	3,5*	431±37	3,7b	567±48	4,2b
9	232±17	2,4*	489±35	2,3*	589±45	3,0	760±54	3,4
12	277±20	1,9*	506±36	2,2	605±43	2,3	806±58	2,6
15	315±22	1,7*	587±42	2,0	696±50	2,1	897±64	2,4
18	331±24	1,5	605±43	1,7	752±54	1,9	848±64	2,0
Распад (в)								
1	83±7	3,4	139±12	5,0	149±18	5,0a	159±19	4,7a
3	107±9	3,3*	236±20	4,3	258±31	4,4a	354±45	4,9a
6	144±12	2,4*	314±27	3,0	370±37	3,2b	497±50	3,7b
9	181±15	1,9*	416±35	2,4	501±43	2,6	662±56	2,9
12	217±8	1,6*	443±38	1,9	537±45	2,1	715±61	2,3
15	254±22	1,4*	519±44	1,8	622±53	1,9	825±70	2,2
18	291±25	1,3	544±46	1,6	663±56	1,6	803±68	1,9

a – (n=3); б – (n=4); в – (синтез-накопление)

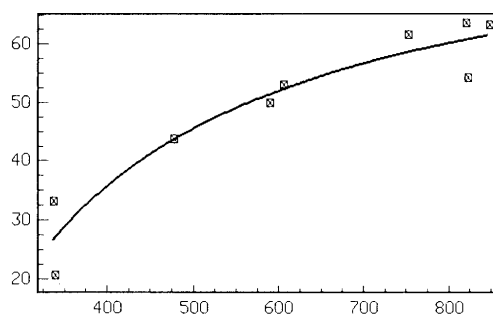


Рис. 1. Зависимость между пулами тотальной РНК (Y , г) и абсолютными скоростями синтеза суммарного белка (X , г/сутки) в скелетных мышцах 18-месячных бычков, выращиваемых при уровнях питания от 1,5·П до 2,6·П

Наши исследования с использованием ^{15}N -глицина показали, что количество суммарного мышечного белка, синтезируемого в единицу времени на 1 г тотальной РНК, зависит от интенсивности выращивания бычков (рис. 2).

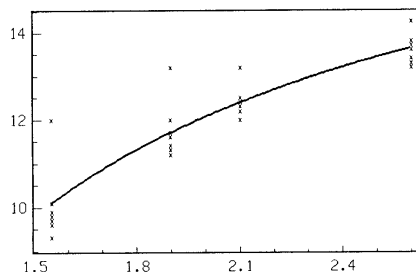


Рис. 2. «Активность» тотальной РНК (Y , г синтезированного в течение суток суммарного белка на 1 г тотальной РНК) в скелетных мышцах у бычков в зависимости от интенсивности выращивания (X , 1,55-2,60-поддержание)

С повышением уровней питания животных от 1,55·П до 1,90·П; 2,10·П; 2,6·П "активность" РНК в скелетных мышцах возрастает от 9,0 до 11,6, 12,2 и 13,5 соответственно. В опытах с использованием ^3H -2-лейцина и ^{15}N -глицина наблюдалось относительное постоянство "активности" тотальной РНК в скелетных мышцах у бычков в онтогенезе при постоянном, адекватно нормируемом, уровне питания (например: в 2,6 раза превышающем потребность животных на поддержание; 12,7 в исследованиях с ^3H -2-лейцином на однемесячных бычках; 12,9, 12,5, 12,9 и 14,2 у животных в возрасте 1, 3, 9 и 18 месяцев – с ^{15}N -глицином).

Фонд общего белка в мышечной клетке прямо пропорционален массе последней, поскольку количество белка в обезжиренной мышечной ткани бычков постоянно и не зависит ни от интенсивности выращивания, ни от возраста животных. В то же время концентрация тотальной РНК в мышечной клетке имеет обратную связь с возрастом бычков и не зависит от уровня питания животных. Полученные зависимости между количеством суммарного белка и пулом тотальной РНК в мышечных клетках указывают на снижение "способности" клеток скелетных мышц к синтезу белка в процессе роста бычков, поскольку величина отношения тотальная РНК/суммарный мышечный белок снижается от $5,5 \cdot 10^{-3}$ до $1,8 \cdot 10^{-3}$ в течение 18-месячного постнатального развития бычков.

Абсолютные скорости синтеза и деградации белка в скелетных мышцах, таким образом, возрастают с увеличением интенсивности выращивания бычков. Скорость формирования фонда общего мышечного белка имеет положительную связь с уровнем питания лишь в период роста до 12-месячного возраста. В дальнейшем высокий уровень питания оказывает отрицательное влияние на скорость аккреции белка в скелетных мышцах бычков.

Обмен белка в целом организме. По результатам измерения количественного белкового синтеза в целом организме и скелетных мышцах у бычков с использованием ^{15}N -глицина можно заключить, что более интенсивное выращивание животных приводит к возрастанию скорости оборота белка в организме (табл. 3) и что вклад скелетных мышц в оборот белка всего тела в течение 18-месячного периода роста составляет в среднем 27%.

Таблица 3. Параметры метаболизма белка в целом организме бычков, выращиваемых при различных уровнях питания (кг/сутки; %/сутки) (n=5)

Возраст бычков (мес)	Уровни питания							
	1,55-П		1,90-П		2,10-П		2,60-П	
Синтез								
1	0,55	7,1	0,71	8,1	0,77	8,1a	0,85	8,0a
3	0,60	7,5	1,16	7,8	1,26	8,2a	1,73	8,9a
6	0,75	4,8*	1,54	5,8	1,80	6,6б	2,36	8,9б
9	0,94	3,8*	2,06	5,2	2,49	6,1	3,21	6,6
12	1,14	3,3*	2,15	4,2	2,57	4,9	3,43	5,6
15	1,31	3,0	2,50	3,8	2,96	4,3	3,82	5,1
18	1,43	2,9	2,57	3,3	3,20	3,8	3,61	4,0
Cv	14,8		15,1		15,5		16,0	
Распад (в)								
1	0,45	5,9	0,63	7,2	0,68	7,2a	0,72	6,8a
3	0,55	5,9*	1,06	7,1	1,16	7,6a	1,58	8,1a
6	0,69	4,4*	1,42	5,4	1,67	6,2б	2,22	6,8б
9	0,83	3,4*	1,92	4,9	2,34	5,7	3,04	6,3
12	1,02	3,0*	2,00	3,9	2,41	4,6	3,27	5,3
15	1,20	2,8*	2,35	3,6	2,80	4,0	3,67	4,9
18	1,35	2,7	2,45	3,1	3,03	3,6	3,44	3,8
Cv	15,0		15,3		15,7		16,2	

a – (n=3); б – (n=4); в – (синтез-накопление)

Скорость синтеза белка в целом организме относительно энергозатрат на поддержание постоянна в период медленного роста бычков (50 г/сутки/МДж). Однако скорость резко возрастает при интенсивном росте животных (120 г/сутки/МДж). Можно считать, что скорость синтеза белка в целом организме относительно скорости основного обмена в период нулевого роста бычков постоянна (25-30 г белка в сутки на 1 мДж метаболизируемой энергии).

Увеличение скорости синтеза общего белка всего организма относительно интенсивности основного обмена связано, вероятно, с тем, что в период быстрого роста бычков происходит значительное увеличение размеров их тела. Но поскольку в организме млекопитающих не существует белкового депо, а быстрое увеличение размера тела требует синтеза новых белков, то последнее может быть достигнуто интенсивным разрушением и использованием уже существующих белков в качестве пластического материала. Синтез 30 г белка в сутки на МДж метаболизируемой энергии, требуемой на поддержание, обеспечивает синтез ферментных белков и гормонов, необходимых для базального энергетического гомеостаза (36). Рост же бычков возможен при синтезе белков, превышающем 30 г/сутки/МДж.

Реутилизация метаболического пула азота. Скорости оборота метаболического пула азота в теле бычков резко возрастают с увеличением интенсивности выращивания. Однако у животных 15- и 18-месячного возраста, выращиваемых при уровне питания 2,6-П, потоки азота имеют одинаковую величину (700 г/сутки), что указывает на достижение генетически детерминированного уровня продуктивности. Иначе говоря, интенсивность выращивания бычков черно-пестрой породы, равная 2,6-П, биологически эффективна только до 15-месячного возраста.

Скорость реутилизации метаболического пула азота (амино-азота свободных аминокислот) в организме бычков относится к наиболее важным характеристикам азотисто-белкового метаболизма. Максимальная скорость реутилизации метаболического фонда азота (91% сутки) у бычков наблюдается в период от 6 до 9 мес при уровне питания 2,6-П. Именно в этот период онтогенеза имеет место наибольшая скорость формирования общих фондов белка как в

скелетных мышцах (98 г/сутки) (рис. 3), так и в целом организме (170 г/сутки) бычков. Однако в период роста животных от 9 до 18 мес скорость реутилизации метаболического пула азота является оптимальной (88%) при уровне питания – 2,1·П.

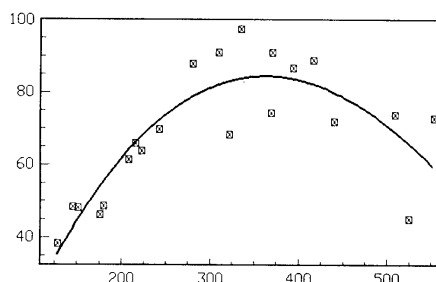


Рис.3. Изменения абсолютных скоростей приростов суммарного белка в скелетных мышцах (Y, г/сутки) и сухого вещества в целом организме (X, г/сутки) бычков, выращиваемых при уровнях питания от 2,1·П до 2,6·П

Таким образом, оптимальная эффективность продуцирования мышечного белка у растущих бычков черно-пестрой породы достигается при уровне питания от 3,0·П до 2,6·П в период от рождения до 9-мес возраста с последующим снижением уровня питания до 2,1·П к 15-мес возрасту. Выращивание бычков в интервале от 9- до 18-месячного возраста на уровне питания выше 2,1·П биологически неэффективно.

Выводы

1. Скорости синтеза саркоплазматических, миофибриллярных и стромальных белков снижаются от 10,4 до 5,0, от 5,8 до 1,2, от 2,1 до 0,7% в сутки соответственно в исследуемый период роста бычков.
2. Основную долю (более 50%) в синтезе суммарного белка скелетных мышц у бычков черно-пестрой породы составляют саркоплазматические белки.
3. Величина синтеза суммарного мышечного белка на единицу общего фонда рибонуклеиновых кислот в скелетных мышцах ("активность" тотальной РНК) у бычков относительно постоянна в течение роста при условии постоянного адекватно нормированного питания и составляет 9,8, 11,4, 12,2, 13,4 г белка в сутки на 1 г тотальной РНК при уровнях питания, превышающих потребности на поддержание в 1,6, 1,9, 2,1, 2,6 раз соответственно.
4. Скорость синтеза белка в целом организме у растущих в течение 18 месяцев бычков черно-пестрой породы возрастает от 0,9 до 3,1 кг в сутки. Скорость аккреции (отложения) общего и мышечного белка у растущих бычков лимитирована степенью деградации белка и реутилизации метаболического пула азота.
5. Вклад скелетных мышц в синтез белка всего тела у растущих бычков черно-пестрой породы не превышает 27%.
6. Наиболее эффективный прирост белковых компонентов мышечной массы наблюдается в период роста бычков от 6- до 9-месячного возраста при уровнях питания от 3·П до 2,6·П.

ЛИТЕРАТУРА

1. ARC. The nutrient requirements of ruminant livestock. Technical review by an agricultural research council working party. Printed by Unwin Brothers. The Greham Press. Old Working. Surrey, 1980.

2. Брэй Р., Бриски Э., Кассенс Р., Кауфман Р. Методы изучения качества мяса. Методы научных исследований в животноводстве. Под ред. Я. Л. Глембовского. М.: Колос, 1975: 469-578.
3. Berman и., Weiss M.F. Users manual for SAAM (Simulation, analysis and modeling). Bathesda. Maryland, 1978.
4. Nissim I., Yudkoff M., Segal S. A model for determination of total body protein synthesis based upon compartmental analysis of the plasma ^{15}N -glycine decay curve. *Metabolism*, 1983, 32: 646-653.
5. Петухова Е.А., Бессарабова Р.Ф., Холенева Л.Д., Антонова О. А. Зоотехнический анализ кормов. М.: Колос, 1981: 22-24.
6. Надальяк Е.А., Агафонов В.И., Киселев А.Ф., Заболотнов Л.А., Решетов В. Б. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1986: 31-40.
7. Pocks R.L. Note on the preservation of sheep urine. *Lab. Pract.*, 1977, 20: 682.
8. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11-th Ed. W. Hortwitz (Ed.). Washington: Ass. Off. Anal. Chem., 1970.
9. Ceriotti G. Other non-protein nitrogenous compounds. D. Creatinine determination. *Clin. Biochem. Princ. Meth.*, 1974-, 2: 1135-1138.
10. Ceriotti G. Other non-protein nitrogenous compounds. D. Creatine determination, *Clin. Biochem. Princ. Meth.*, 1974, 2: 1138-1140.
11. Gerritsen T., Niederwieser A. Quantitative determination of amino acids by column chromatography. *Clin. Biochem. Princ. Meth.*, 1974, 2: 1087-1102.
12. Radha E., Bessman S.P. A rapid colorimetric method for 3-methylhistidine in urine. *Anal. Biochem.*, 1982, 121: 170-174.
13. Тюпаев И.М., Пьянков Н.Р. Определение 3-метилгистидина в моче животных. Бюллетень ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных, 1989, 2 (94): 71-74.
14. Coulombe S.S., Fawcett S. New the semimicro method determination of urea, *Clin. Chem.*, 1963, 9: 23.
15. Rieder H.P. Determination of total protein. *Clin. Biochem. Princ. Meth.*, 1974, 2: 1468-1478.
16. Алиев А. А. Биопсия длиннейшего мускула спины. В кн.: Оперативные методы исследований сельскохозяйственных животных. Л. Наука, 1974: 230.
17. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. В кн. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1964: 162-180.
18. Mahlin D.T., Lofberg R.T. A simplified method of sample preparation for determination of tritium, ^{14}C or ^{35}S in blood and other whole tissues. *Anal. Biochem.*, 1966, 16: 500.
19. Озрина Р.Д., Ульянов А.М., Сорвачев К.Ф. Метод приготовления гомогенных образцов тканей и крови для жидкостного сцинтилляционного счета. *Биол. науки*, 1979, 4: 100-103.
20. Материкин А.М., Материкина М.И. Применение прибора Сереньева для препаративного выделения ^{15}N . Бюл. ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных, 1981, 4 (64): 72-75.
21. Shibko S., Kaivisto P., Tratniek C. A. et al. A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Anal. Biochem.*, 1967, 19: 514-528.
22. Шевченко Н.А., Шевченко В. Г. Выделение, количественное определение и анализ нуклеиновых кислот у сельскохозяйственных животных. Методические указания. ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. Боровск, 1984: 86 с.
23. Helander E. On quantitative muscle protein determination. *Acta Physiol. Scand.*, 1957, 41, 141: 1-99.
24. Тартаковский А.Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечно-полосатых мышц. В кн.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука, 1978: 55-76.

25. Murray C.E., Warnes D.M., Ballard F.J., Tomas F.M. Creatine excretion as an index of myofibrillar protein mass in dystrophic mice. Clin. Sci., 1981, 61: 737-741.
26. Everett A.W., Prior G., Clark H., Zak R. Quantitation of Myosin in muscle. Anal. Biochem., 1983, 130: 102-107.
27. Picou D., Tailor-Roberts A. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. Clin. Sci., 1969, 36: 283.
28. Waterlow J.C. Protein turnover in the whole body. Nature, 1975, 253: 157.
29. Waterlow J.C., Garlick P.J., Millward D.J. Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. Amsterdam: Elsevier-North Holland, 1978: 804p.
30. Fern E.P., Garlick P.J., McNurlan M.A., Waterlow J.C. The excretion of isotope in urea and ammonia for estimating protein turnover in man with ¹⁵N-glycine. Clin. Sci., 1981, 61: 217-228.
31. Symon O. Measurement of tissue protein turnover in animals. Proc. VI Int. Symp. Amino Acids. Warszawa, 1984: 196-206.
32. Вовк С.И., Янович В. Г. Исследование синтеза белков в тканях сельскохозяйственных животных (Методические рекомендации). Украинский НИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. Львов, 1988: 20 с.
33. Dickson O., Nnanielugo D. Study in the protein turnover using developmental changes in muscle. Nutr. Rep. Int., 1981, 23: 945-962.
34. Nettleton J.A., Hegsted D.M. The effects of protein and calorie restriction on tissue nitrogen content and protein catabolism. Nutr. Metabol., 1974, 17: 166-180.
35. Tomas F.M., Murray A.J., Jones L.M. Interactive effect of insulin and corticosterone on myofibrillar protein turnover in rats as determined by N-methylhistidine excretion. Biochem. J., 1984, 220: 469-479.
36. Webster A.J.F. Bioenergetics, bioengineering and growth. Anim. Prod., 1989, 48: 249-269.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ НА УРОВНЕ ПРОДУКТИВНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАСТУЩЕГО СКОТА

Г.Г.Черепанов, В.Б. Решетов, А.Ю. Морозова
Лаборатория энергетического питания

Баланс потоков основных энергетических метаболитов исследовали на модели, предварительно адаптированной в эксперименте по данным общего энергетического обмена у молодняка крупного рогатого скота с живой массой 185 кг. Описаны взаимодействия между потоками ацетата и пропионата и неаддитивность продуктивных эффектов энергетических субстратов.

Введение

В последние годы в ряде стран проводятся исследования по разработке новых подходов к обоснованию рационального питания и управления продуктивностью животных с использованием динамических моделей, учитывающих взаимодействия субстратов на уровне пищеварительного тракта и тканей (13, 14, 16, 17). В русле этого направления ранее были исследованы и апробированы в первом приближении субмодели пищеварения и интермедиарного обмена у коров (3, 4). Целью данной работы было адаптировать имеющиеся версии моделей для растущих животных (бычков и телок черно-пестрой породы), идентифицировать интермедиарные потоки и оценить эффекты взаимодействий между энергетическими субстратами на уровне продуктивной эффективности и отдельных составляющих тканевого обмена, сопоставив, где это возможно, вычислительный прогноз с данными прямых физиологических измерений.

Материалы и методы

Имеющиеся версии модели адаптировали для растущих животных с живой массой 185 кг, получавших рацион, рассчитанный на суточный прирост 550–600 г: 3,2 кг злакового сена, 5,2 кг кукурузного силоса, 1,2 кг кормовой свеклы, 1,7 кг комбикорма (5 кг сухого вещества, 44,9 МДж обменной энергии, 0,62 кг сырого протеина, 1,25 кг сырой клетчатки, 0,62 кг крахмала, 0,21 кг сахаров). По данным лаборатории пищеварения содержание химических компонентов в сухом веществе рациона составляло: растворимые углеводы 0,068, органические кислоты – 0,0164, пектины – 0,0214, молочная кислота – 0,002, липиды – 0,052, крахмал – 0,0686, гемицеллюлоза – 0,19, целлюлоза – 0,233, растворимый протеин – 0,0526, нерастворимый протеин – 0,0924, небелковые азотистые веществ – 0,0219, лигнин – 0,118, растворимая зола – 0,0536, нерастворимая зола – 0,0121, уксусная кислота – 0,00079, масляная кислота – 0,00021.

Для прогнозирования объемов всасывания основных субстратов использовали модифицированный вариант модели (8), в котором используется 17 переменных состояния (химических компонентов и пулов рубцового содержимого) и 35 параметров. Входные данные – относительные доли 16 химических компонентов в сухом веществе рациона, общее потребление сухого вещества. Выходные данные – концентрации, пулы, валовые скорости трансформации компонентов корма, объемы всасывания основных субстратов (3). С учетом того, что животные в возрасте 8-9 мес характеризуются сложившимся типом рубцового пищеварения, основные параметры модели, использованные ранее для коров, включая потребности микроорганизмов в субстратах и энергии, удельные скорости реакций, стехиометрические коэффициенты и др. были оставлены без изменений. Расчеты были проведены в стационарном приближении, т.е. при равномерном поступлении корма.

В качестве модели интермедиарного обмена использовали систему уравнений (9), учитывающих количественно наиболее важные реакции, влияющие на использование в организме ЛЖК, глюкозы, свободных аминокислот, высших жирных кислот с учетом баланса АТФ и потребления кислорода в системе, состоящей из трех групп органов: 1) скелетные мышцы и кости; 2) жировая ткань; 3) внутренние органы (4). Регуляторные влияния со стороны комплекса гормонов на изменения в соотношении между потребностями организма и фактическим поступлением питательных веществ учтены в модели косвенно посредством введения нелинейной зависимости параметров реакций (V_m и K_m) от ключевых субстратов (глюкозы). При возникновении дисбаланса вначале имеет место сдвиг концентрации глюкозы, а в последующем происходит известная компенсация за счет адаптивной перестройки метаболических потоков. Таким образом для любой заданной комбинации численных значений объемов всасывания программа автоматически находит уравновешенные значения всех внутренних потоков и концентраций (при заданных значениях продуктивных параметров).

В процессе адаптации модели для растущих животных были установлены следующие наиболее вероятные значения параметров, помимо массовых и объемных (пространства распределения) показателей: максимальная скорость липогенеза из жирных кислот в жировой ткани ($VV1$) – 4,6 моль НЭЖК/с; то же из ацетата ($VV3$) – 12 моль ацетата/с; максимальная скорость синтеза белков в постной части ($VV5$) – 4,4 моль аминокислот/с; то же во внутренних органах ($VV6$) – 2,6 моль аминокислот/с; максимальная скорость

глюконеогенеза из аминокислот (VV8) – 20 моль глюкозы/с; максимальная скорость образования молочной кислоты в постной части (VV10) – 2,4 моль/с; максимальная скорость гликолиза в жировой ткани (VV11) – 1,5 моль глюкозы/с; максимальная скорость гликолиза во внутренних органах (VV12) – 0,5 моль/с; относительная скорость распада белков в постной части (Const01) – 0,008 1/с; относительная скорость распада белков во внутренних органах (Const02) – 0,03 1/с; константа скорости переноса мочевины в ЖКТ (K14) – 2,0 1/с; константа скорости выведения мочевины с мочой (K15) – 3,4 1/с; значение константы Михаэлиса при окислении глюкозы для референтного значения концентрации (KK06)– 0,04; коэффициент фосфорилирования (P:O)– 1,5 моль АТФ/моль O₂; доля общего потока пропионата в направлении образования глюкозы (f5)– 0,8; расход АТФ на поддержание в постной части – 2,5 моль АТФ/кг^{0,75}; расход АТФ на поддержание в жировой ткани – 1,1 моль АТФ/ кг^{0,75}; расход АТФ на поддержание во внутренних органах – 1,1 моль АТФ/кг^{0,75}. Возможные различия в параметрах, обусловленные половым диморфизмом, в данном возрастном интервале (для животных с массой 185 кг) не учитывали.

Расчеты проводили в два этапа: на первом этапе с помощью субмодели пищеварения прогнозировались потоки всасывания основных субстратов; последние использовались на втором этапе в качестве входных данных для субмодели интермедиарного обмена, с помощью которой прогнозировалась скорость роста и метаболические показатели (концентрации и потоки). Две субмодели связаны между собой в основном через рециркуляцию мочевины. Идентичность этого потока в той и другой субмодели обеспечивалась посредством нескольких итерационных циклов (первые ориентировочные оценки потока – прогон модели пищеварения–прогон модели интермедиарного обмена– оценка уровня мочевины в крови – повторный прогон модели пищеварения и т.д.).

Результаты и обсуждение

При заданных относительных долях химических компонентов рациона и потреблении сухого вещества 5 кг/с прогнозируемые по модели пищеварения потоки всасывания составили (моль/с): ацетат – 12,18; пропионат – 4,27; бутират – 1,83; аммиак – 3,62; глюкоза – 0,98; аминокислоты – 4,93; высшие жирные кислоты – 0,73. Результаты балансового опыта, проведенного на телках, сопоставлены с прогнозными оценками в табл. 1.

Таблица 1. Данные балансового опыта, проведенного на растущих телках, и прогноз по модели

Показатель	Опыт	Прогноз
Принято сухого вещества, кг	5,02	5,0
Валовая энергия, МДж	83,06	84,9
Всего поступило, МДж	83,06	84,9
Обменная энергия, МДж	43,92	41,5
Теплопродукция, МДж	34,18	32,6
Энергия прироста, МДж	9,74	9,44
Баланс азота, г	20,0	23,9

Сопоставление фактических данных и прогнозных оценок по некоторым физиологическим показателям приведено в табл. 2.

Как следует из таблиц 1 и 2, прогнозные оценки физиологических показателей согласуются с данными имеющихся прямых измерений.

Таблица 2. Теплопродукция, дыхательный коэффициент и показатели крови для растущих телок (опыт и прогноз по модели)

Показатели	Опыт	Прогноз
Теплопродукция, МДж/с	31,8	32,6
Дыхательный коэффициент	0,96	0,94
Концентрация в крови:		
Глюкоза, ммоль/л	2,8-3,5	3,19
Ацетат, ммоль/л	0,5-0,6	0,56
Мочевина, ммоль/л	3,5-4,5	4,5
НЭЖК, ммоль/л	0,13-0,14	

Значения метаболических потоков для стационарного состояния при использовании вышеуказанного рациона приведены в табл. 3.

Таблица 3. Стационарные значения метаболических потоков (скорости образования и расхода метаболитов), соответствующие данным условиям кормления при живой массе 185 кг и суточном приросте 600 г/сут (без учета полового диморфизма).

Наименование потока	Значение, моль/с
Образование триглицеридов жировых депо из жирных кислот	0,613
" " " из ацетата	0,111
Образование жирных кислот при липолизе в жировых депо	1,42
Образование ацетата при катаболизме аминокислот	2,04
Образование аминокислот при распаде белков в мышцах	1,12
" " " во внутренних органах	0,988
Образование мочевины при глюконеогенезе из аминокислот	2,10
Синтез белка в мышцах (моль аминок./сут)	2,26
" " во внутренних органах "	1,31
Образование глюкозы из пропионата	1,56
" " из лактата	1,55
" " из глицерола	0,237
" " из аминокислот	1,60
Образование триозофосфатов в жировых депо при гликолизе	4,72
" " " в реакциях ПФ–шунта	0,420
" " во внутренних органах при гликолизе	0,513
Образование лактата в жировых депо из триозо-фосфатов	4,42
" " в мышцах из глюкозы	0,814
Поток лактата во внутренние органы из мышц	0,460
Образование глицерола при липолизе в жировой ткани	0,474
Образование АТФ при окислении лактата в мышцах	3,60
" " " глюкозы "	3,26
" " в реакции триозо–Ф – лактат в жировых депо	8,84
" " при окислении лактата в жировой ткани	18,0
" " " бутирата	41,7
" " " пропионата	7,23
" " " триозо–Ф во внутренних органах	10,3
" " в реакции глицерол– глюкоза	0,947
Образование CO ₂ при окислении лактата в мышцах	0,601
" " " " в жировой ткани	3,00
" " при в реакциях ПФ–шунта "	1,26
" " при окислении триозо–Ф во внутр. органах	1,54
" " " пропионата	2,35
" " " бутирата	6,60
" " " ацетата	20,8
" " " высших жирных кислот	4,95
" " " глюкозы	7,67
Экономия O ₂ за счет генерации НАДФН при окислении изоцитрата	0,617
Образование мочевины из всосавшегося аммиака	1,23
Общее образование CO ₂	48,8
Суммарное потребление кислорода	52,0

Расход жирных кислот на липогенез в жировой ткани	2,67
" триглицеридов при липолизе "	0,474
Расход жирных кислот при окислении до CO ₂	1,12
" кислорода на окисление жирных кислот	7,11
" аминокислот на глюконеогенез	3,40
" ацетата на окисление до CO ₂	10,4
" кислорода на окисление ацетата	20,8
" бутирата на окисление до CO ₂	1,67
Распад белков в мышцах (моль аминокислот/сут)	1,12
" " во внутренних органах "	0,988
Расход аминокислот на синтез белков в мышцах	2,26
" " " во внутренних органах	1,31
Превращение пропионата в глюкозу	3,13
" лактата в глюкозу во внутренних органах	3,09
" глицерола в глюкозу	0,474
Расход глюкозы на образование лактата в мышцах	1,63
" " на гликолиз в жировой ткани	2,36
" " " во внутренних органах	0,257
Потребность в глюкозе на образование НАДФН в жировых депо	0,420
Расход глюкозы на окисление до CO ₂	1,28
Расход кислорода на окисление глюкозы	7,67
Превращение триозо-Ф в лактат в жировой ткани	4,42
Расход триозо-Ф на липогенез из ацетата в жировой ткани	0,111
" " " из жирных кислот "	0,613
" " на окисление во внутренних органах	0,513
" лактата на окисление в жировой ткани	0,999
Поток лактата во внутренние органы из жировых депо	3,42
Расход лактата на окисление в мышцах	0,20
Поток лактата во внутр. органы из мышц	0,614
Окисление пропионата до CO ₂	0,782
Расход АТФ на поддержание в мышцах	75,9
" " на синтез белков в мышцах	11,3
" " на поддержание в жировой ткани	6,49
" " на образование НАДФН в жировой ткани в ПФ-шунте	0,420
" " " триозо-Ф в жировой ткани	4,72
" " на этерификацию жирных кислот в жировой ткани	5,52
" " на превращение ацетата в ТГ в жировой ткани	14,2
" " на поддержание во внутренних органах	10,5
" " на синтез белка "	6,55
" " на образование триозо-Ф из глюкозы "	0,513
" " " глюкозы из лактата "	6,19
" " " глюкозы из пропионата	6,26
" " на всасывание глюкозы	1,0
" " " аминокислот	4,86
Расход кислорода на окисление лактата в мышцах	0,601
" " " " в жировой ткани	3,0
" " " триозо-Ф во внутренних органах	1,54
" " " пропионата	2,74
" " " бутирата	9,21
Поток мочевины в ЖКТ	1,23
Выведение мочевины с мочой	2,09

Общая скорость образования и расходования глюкозы в организме подопытных телок в контрольном периоде согласно данным модели составляла 6 моль/с (1078 г/с; 5,83 г/кг с; 4,05 мг/мин кг), при этом около 20% окисляется до CO₂, третья часть идет на образование молочной кислоты в скелетных мышцах и около 40% используется в жировой ткани, главным образом, на образование лактата, причем 3/4 из этого количества лактата поступает во внутренние органы, где вновь превращается в глюкозу (рис. 1).

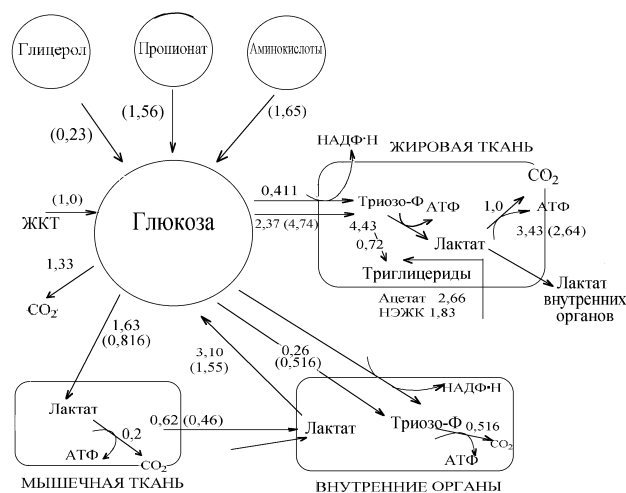


Рис. 1. Схема стационарных потоков, характеризующих обмен глюкозы в организме растущего скота с живой массой 185 кг и приростом живой массы 600 г/сут (состав рациона приведен в тексте)

Цифры в скобках обозначают величину потока в моль/сут, выраженную по отношению к молекулярной массе продукта, цифры без скобок – то же по отношению к молекулярной массе субстрата.

Эти оценки согласуются с имеющимися в литературе данными. Так, у растущих бычков с живой массой 163–200 кг общая скорость образования глюкозы (entry rate), оцененная с применением метки, составляла 911 мг/мин (1200 г/с; 6г/кг с) (20). Окисление глюкозы у жвачных может достигать 30% от общего метаболического потока (7), хотя эта величина может варьировать в широких пределах – до 8% у лактирующих коров (11) и около 20% у нелактирующих коров (10).

Скорость образования ацетата в организме телок (всасывание в ЖКТ + эндогенная продукция) в контрольном периоде по модели составляла 13,16 моль/с (790 г/с; 4,27 г/кг с; 0,178 г/час кг; 3 мг/мин кг), около 80% от этого количества (10,5 м/с) окисляется до CO_2 , 20% имеет эндогенное происхождение (главным образом в ходе глюконеогенеза из аминокислот). По данным радиоизотопных исследований у овец эндогенная продукция ацетата составляет около 25% от общего метаболического потока, увеличение уровня глюкозы в крови снижает образование эндогенного ацетата (6). Окисление ацетата в организме жвачных может варьировать от 70 до 95% от общего потока (5,7). У лактирующих коров продукция ацетата составляет около 7 г/кг с при удое 16 кг (12).

Общий расход аминокислот на синтез белка у подопытных телок в контрольном периоде по данным моделирования составлял 3,7 моль/с (407 г/с; 2,2 г/кг с) при эффективности отложения (отложение/синтез) 47%. Ранее в радиоизотопных исследованиях при экспозиции в несколько часов было показано, что у разных видов животных общая скорость обновления белков всего тела (P , г белка/с) связана с величиной живой массы (W) : $P = 14,7 W^{0,53}$ (15), т.е. общий темп обновления для живой массы 185 кг составляет 2,12 моль аминокислот/с. По модели эта величина составляет 2,35 моль аминокислот/с (сумма скоростей образования аминокислот при распаде белков всего тела). Величина общего метаболического потока (total entry rate) аминокислот у взрослых овец варьирует в пределах от 3 до 6 мг/мин кг (16). По нашим данным, у подопытных телок в контрольном периоде эта величина составляла 3,0 мг/мин кг.

По данным моделирования общая скорость липогенеза в организме подопытных телок в контрольном периоде составляла 0,721

моль триглицеридов/с при скорости липолиза 0,470 моль/с (2,54 ммоль триглицеридов/кг с; 5,29 мкмоль жирных кислот/кг мин) (рис. 2). По данным литературы у растущих овец обоего пола общая скорость липолиза может варьировать в пределах 6 – 8 мкмоль жирных кислот/кг мин (19).

Эффекты взаимодействия субстратов. Удовлетворительная для первого приближения степень адекватности системной модели по физиолого-биохимическим показателям, измеренным в опыте, и по имеющимся данным радиоизотопных исследований позволяет перейти к исследованию на модели эффектов взаимодействия субстратов в широкой области возможных метаболических сдвигов. Для исследования эффектов взаимодействий в серии вычислительных экспериментов, проведенных на модели интермедиарного обмена, варьировали входные данные – потоки всасывания основных субстратов и регистрировали стационарные значения метаболических потоков, баланс энергии, продукцию CO_2 , потребление кислорода. Результаты приведены на рис. 3 – 6.

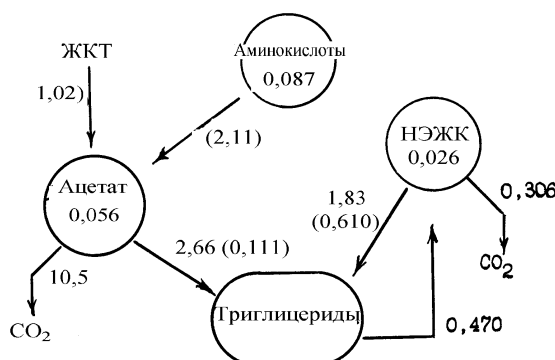


Рис.2. Схема стационарных потоков, характеризующих обмен НЭЖК и триглицеридов в организме растущего скота. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Полученные данные позволяют заключить, что продуктивный эффект при вариации поступления тех или иных субстратов, как правило, складывается не аддитивно и характеризуется существенными взаимодействиями. Например, при нагрузках глюкозой и ацетатом меняется темп окисления НЭЖК до CO_2 , глюконеогенез из аминокислот, скорость мочевинообразования (рис. 6). Эффективность использования ацетата зависит от уровня всасывания пропионата (рис. 3-5). Наличие существенных эффектов взаимодействий и замещений говорит о том, что расчеты потребностей в отдельных субстратах для той или иной функции или синтеза с использованием статических коэффициентов можно проводить лишь в качестве сугубо ориентировочной оценки. С учетом реально существующих сложных метаболических взаимодействий более корректным и обоснованным может быть использование системной модели, которая дает прогноз с учетом этих эффектов при произвольном изменении спектра всасывающихся субстратов.

В числе недостаточно проработанных аспектов в данной версии субмодели интермедиарного обмена следует отметить следующие вопросы:

- размеры образования (и использования) молочной кислоты в жировой ткани при разных физиологических состояниях;
- вклад пропионата и аминокислот в глюконеогенез;
- источники и количественная роль эндогенного ацетата;

● степень сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования (Р/О) на уровне организма и ряд других вопросов.

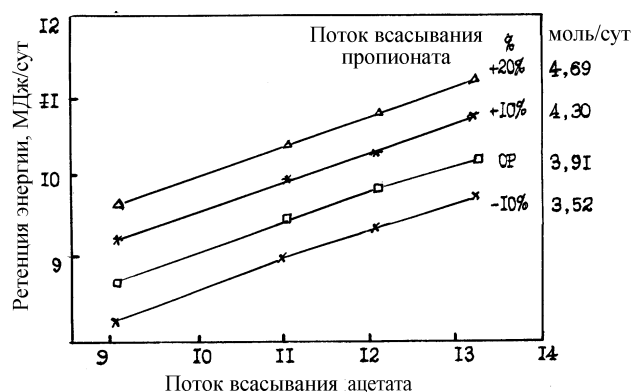


Рис.3. Влияния уровня всасывания ацетата на ретенцию энергии в теле при разном уровне всасывания пропионата

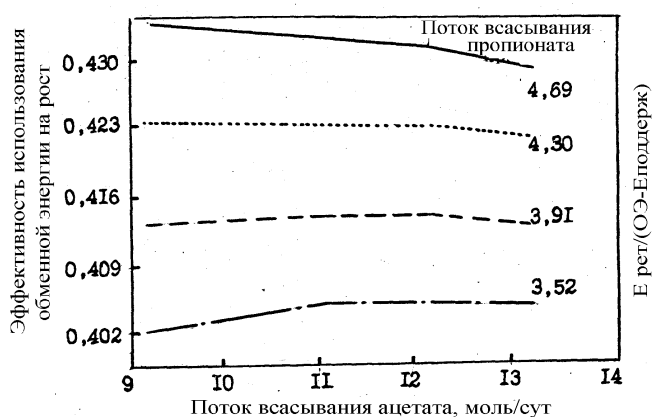
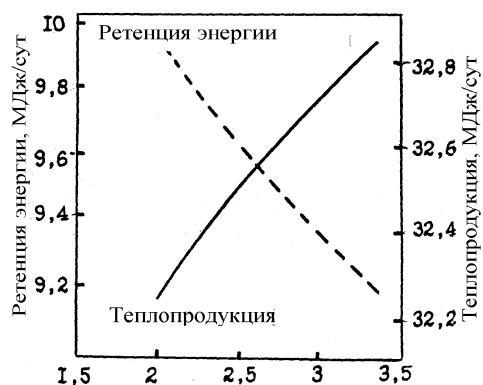


Рис.4. Влияние уровня всасывания ацетата на эффективность использования обменной энергии на рост (рет/(ОЭ-Эподдерж)) при разном уровне всасывания пропионата

Доля пропионата, образующегося в рубце, использованная в направлении глюконеогенеза, в некоторых работах оценивается величиной 0,7-0,9 (Baldwin, 1987), в то время как по данным изотопных экспериментов на овцах эта величина варьирует в пределах 0,3-0,5 (Leng, 1967; Bergman, 1966), причем было отмечено, что до 50% пропионата, образованного в рубце, может превращаться в лактат в эпителии и стенке рубца (Bergman, 1966).



Отношение потоков всасывания ацетат/пропионат при изокалорическом замещении ($E_{\text{ацет}} + E_{\text{проп}} = 15,66$ МДж/сут)

Рис. 5. Зависимость ретенции энергии и теплопродукции от величины отношения потоков всасывания ацетата и пропионата при их изокалорическом замещении ($E_{\text{ацет}} + E_{\text{проп}} = 15,66$ МДж/сут)

Если значительная часть пропионата превращается в глюкозу через лактат, то указанные расхождения можно объяснить, хотя количественно это не согласуется с оценками вклада цикла Кори в общий поток глюкозы — не более 5% у кормленных жвачных (Madsen, 1983). Соотношение двух субстратов глюконеогенеза — пропионата и лактата может иметь определенное значение с точки зрения лимитирования общей скорости процесса, поскольку в случае пропионата имеется дополнительное скоростьлимитирующее звено (ЩУК–ФЭП, фосфоэнолпируваткарбоксикиназа). Таким образом, для ключевого метаболита — глюкозы важно уточнить (оценить кинетические параметры V_m , K_m , K_i) вклад пропионата, аминокислот и лактата, также как и общую скорость образования пропионата и лактата. По данным разных авторов доля глюкозы, образованной из аминокислот, может составлять 10-40%, из лактата 20-40%, из пропионата 33-65%. Если этот размах отражает действительную картину обмена, а не является артефактом измерений, то для привязки модели к конкретным условиям может потребоваться проведение дополнительных метаболических тестов.

Для достижения удовлетворительного прогноза потребления кислорода по балансу АТФ-производящих реакций нам пришлось принять значение коэффициента фосфорилирования (P/O) — 1,5, тогда как теоретически предельное значение в имеющихся руководствах принимается равным 3.

Рис. 6. Эффекты взаимодействия субстратов на уровне продуктивной эффективности и тканевого обмена

Сплошные линии – варьируется поток всасывания глюкозы в пределах 1-4,3 моль/сут при потоке всасывания ацетата 2,63 моль/сут. Пунктир – варьируется поток всасывания ацетата в пределах 11-20 моль/сут при потоке всасывания глюкозы 2,63 моль/сут.

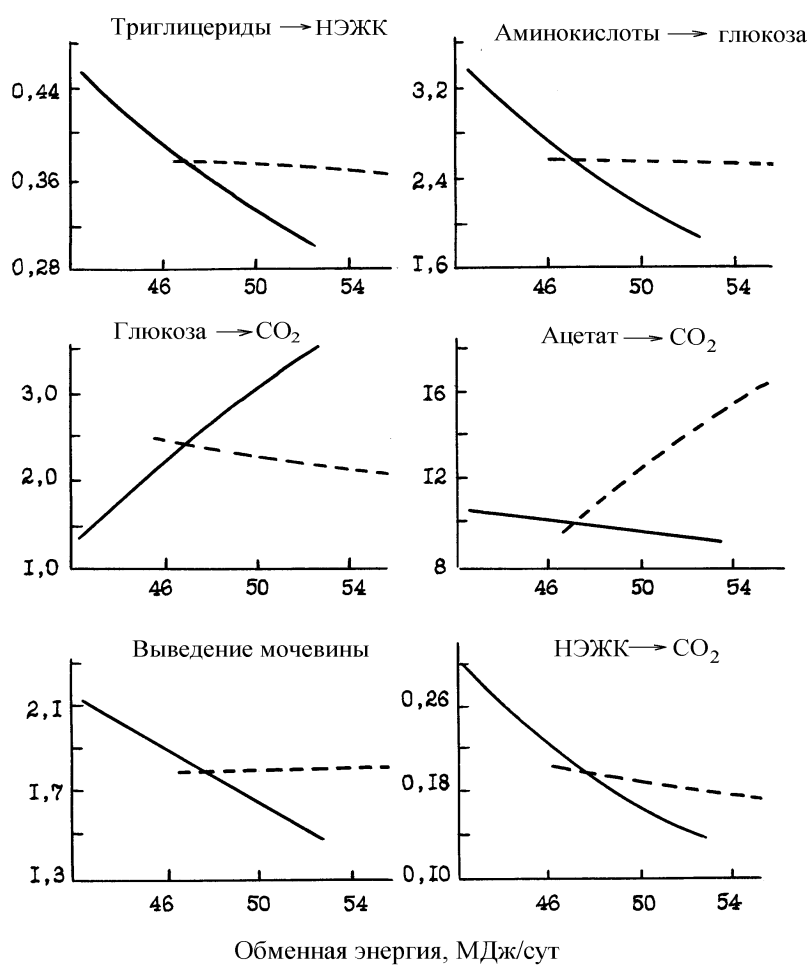
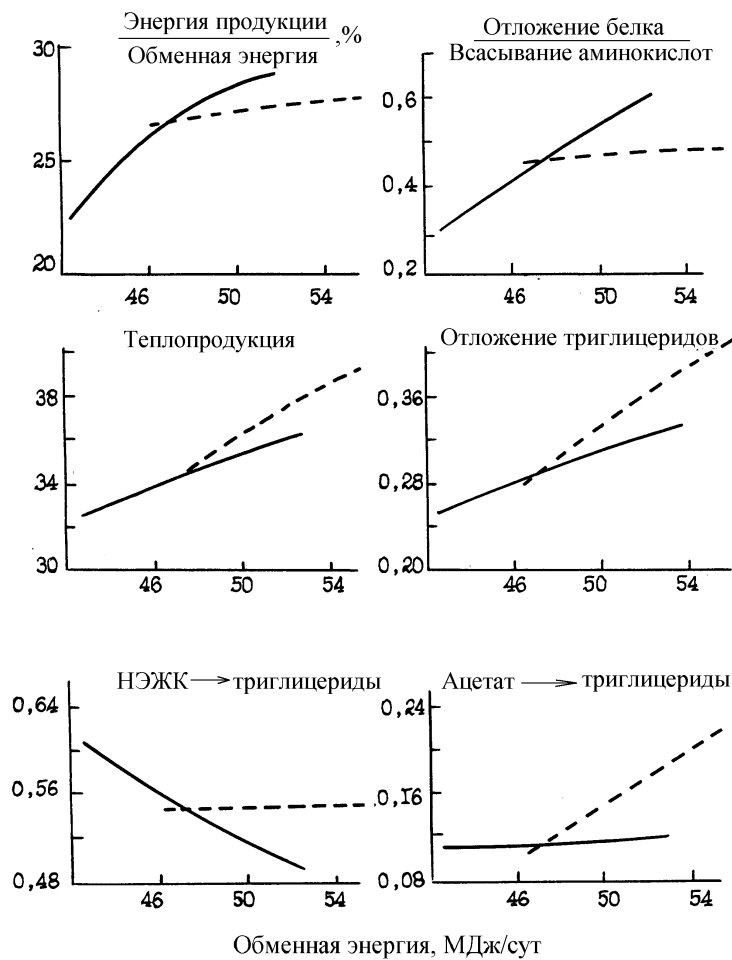


Рис. 6. Эффекты взаимодействия субстратов на уровне продуктивной эффективности и тканевого обмена

Сплошные линии – варьируется поток всасывания глюкозы в пределах 1-4,3 моль/сут при потоке всасывания ацетата 2,63 моль/сут. Пунктир – варьируется поток всасывания ацетата в пределах 11-20 моль/сут при потоке всасывания глюкозы 2,63 моль/сут.



Прогноз эффективности биосинтеза и сдвигов потоков при дифференциальном варьировании всасывания глюкозы (—) или ацетата (-----).

С другой стороны, наши оценки согласуются с проведенными в последние годы уточненными измерениями, которые показывают, что этот теоретический порог на уровне организма не достигается, а фактические значения Р/О могут быть в интервале 1,2-2 (21, 22). Требуют также уточнения и расшифровки в конкретных биохимических терминах оценки расхода АТФ "на поддержание", на биосинтез белка и другие процессы, требующие затрат энергии.

Заключение

Полученные данные позволяют заключить, что имеющиеся версии агрегированной системы моделей пищеварения и интермедиарного обмена, адаптированные для растущих животных, работоспособны и их использование в ходе дальнейших исследований может быть полезно для углубленной оценки продуктивного действия рационов и прогнозирования эффективности биосинтеза компонентов мяса у растущего скота.

Учитывая сложность задачи, на данном этапе задача состоит главным образом в формировании общих подходов и разработке аппарата прогнозирования, поскольку речь идет о переходе от эмпирических констатаций валовых показателей, всегда привязанных к конкретному узкому диапазону условий, к описанию и прогнозированию, основанному на общебиологических принципах и закономерностях. Другой важный аспект состоит в создании базы экспериментальных данных по метаболизму животных, включая характеристики основных метаболических путей, ключевых ферментов, межорганных потоков и т.д., которые понадобятся для других целей, помимо вычислительного прогноза, например, для совершенствования методов клинко-физиологического контроля.

Исследования на модели позволили оценить значимость взаимодействий между основными энергетическими субстратами – глюкозой, ацетатом, свободными аминокислотами и высшими жирными кислотами в процессах тканевого обмена, важных в аспекте формирования продуктивной эффективности. Полученные данные подтверждают мнение исследователей, считающих, что эти эффекты существенны и ими нельзя пренебрегать при оценке тканевых потребностей в субстратах. Эти системные эффекты обусловлены совокупным влиянием замещений, перекрестных регуляций и конкурентных локальных взаимодействий в сложной сети реакций, отраженных в структуре модели. В дальнейших исследованиях необходимо найти разумный компромисс между необходимостью учета большого количества биохимических деталей и ограничениями, обусловленными трудностью работы с большими многопараметрическими системами. Если субстратные потребности нельзя представить в виде постоянных составляющих и коэффициентов (а это скорее всего действительно так, по крайней мере, для рассмотренных здесь метаболитов), то другого пути нет, так как динамические взаимодействия можно описать только в рамках динамической модели.

Процессы тканевого метаболизма исключительно сложны и многообразны, возможности "съема информации" в обычном физиологическом опыте ограничены. Как было показано выше, метод численной параметрической идентификации в принципе позволяет с приемлемой в большинстве случаев точностью оценить размеры множественных метаболических потоков по критерию наилучшего совпадения расчетных и опытных значений доступных для измерения "выходных" переменных. Потенциальные области приложения этого подхода, по-видимому, выходят за рамки теории кормления и могут

включать в себя многие направления, в той или иной мере связанные с исследованием метаболизма и разработкой методов управления продуктивностью животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозова А.Ю. Энергетический обмен у телок при дополнительном введении энергии в виде глюкозы и ацетата. Дисс... к.б.н., Боровск, 1994.
2. Пьянов В.Д., Бутрова Г.А. и др. С.-х. биология. 1980, 15:1.
3. Черепанов Г.Г., Кузина И.Н. С.-х. биология, 1993:4.
4. Черепанов Г.Г., Жиркова И.Н., Решетов В.Б. С.-х. биология. 1994:
5. Annison E.F., Lindsay D.B. Biochem. J., 1961, 78:4.
6. Annison E.F. Production disease in farm animals. L:1973.
7. Baldwin R.L., Smith N.E. Fed. Proc., 1971, 30:4.
8. Baldwin R.L., Thornley J.H., Beever D.E. J. Dairy Res., 1987, 54:1.
9. Baldwin R.L., France J., Gill M. J. Dairy Res., 1987, 54, 1.
10. Bartley J.C., Black R.L. J. Nutr., 1966, 3: 89.
11. Bauman D.E., Currie W.B. J. Dairy. Sci., 1980. 63:1514.
12. Biekerstaffe R., Annison E.F. J. Agric. Sci., 1974, 82, 71.
13. Fox D.G., Sniffen C.J., O'Connor J.D. Proc. Cornell Nutr. Conf., 1987.
14. Mac Rae J.C., Buttery P.J., Beever D.F. Nutrition and lactation in the dairy cow. Butterworths, L.e.a., 1988.
15. Millward D.J., Bates P.C., Rosochacki S. Reprod. Nutr. Develop. 1981, 21(2):265.
16. Reilly P.E., Ford E.J. Br. J. Nutr., 1971, 26:2.
17. Roseler D.K. Proc. Cornell Nutr. Conf., 1991:124.
18. Sniffen C.J., Fox D.G. et.al. Proc. Cornell Nutr. Conf. 1987:42.
19. Waghorn G.C., Walf J.E. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 1984, 44:193.
20. Young J.M., Trott D.R., Smith J.A. Fed. Proc, 1973, 32:3.
21. Hinkle P.C., Yu M.L. J. Biol. Chem., 1979, 254, 7:2450.
22. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М., 1988.

ЭМБРИОГЕНЕЗ МЫШЕЧНОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.И. Манухина

Кабинет морфологических исследований

Проведено морфологическое изучение роста и развития мышечной и жировой ткани у 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-месячных плодов крупного рогатого скота. Установлено, что скелетные мышцы у них состоят из клеточного и симпластического компонентов, которые происходят из единого источника – промиобластов. Появлению зрелых миосателлитов предшествовали структурные преобразования исходных клеток, которые были строго синхронизированы с развитием мышечных волокон. Процесс превращения мышечных трубочек в зрелые мышечные волокна сопровождался их ростом в длину и толщину, увеличением количества миофибрилл, занимающих большую часть волокна. По мере созревания мышечного волокна происходит дифференцировка всех органелл. Отмечено, что в составе популяции мышечные волокна различались по диаметру, соотношению количества миофибрилл и саркоплазмы, гистохимическим признакам, ультраструктуре.

Зачатки жировых депо были выявлены у 4-9-месячных плодов. Они представляли собой тельца, образующиеся за счет пролиферации и дифференцировки клеток мезенхимы, которые давали начало стволовым клеткам жировой ткани – преадипоцитам. Жировые депо различались между собой размерами адипоцитов и соотношением соединительной ткани.

Введение

Существуют многочисленные аспекты исследования мышечной ткани скелетного типа. Среди них изучение роста и развития (миогенеза) является наиболее актуальным. Это связано, прежде всего, с теми сложными структурными и метаболическими преобразованиями, суть которых заключается в развитии из одноядерных клеток сложных симпластических систем, включающих в себя тысячи ядер. Открытие миосателлитов (16) изменило ранее существовавшие представления о структурных и камбиальных свойствах мышечной ткани. Однако, многие вопросы дифференцировки и пролиферации скелетных мышц остаются неизученными, кроме того, полученные данные часто противоречивы.

Важную роль в регуляции клеточной дифференцировки играет митоз, эти вопросы были изучены в исследованиях миогенеза *in vitro* (6, 8, 11). Согласно результатам этих работ, промиобласты (пролиферирующие одноядерные мышечные клетки) выходят из клеточного цикла и приобретают способность синтезировать специфические сократимые белки и сливаться, образуя мышечные трубочки. Квантальный (критический) митоз авторы определили как митоз, дающий дочерние клетки, синтетическая активность которых резко отличается от таковой в родительской клетке. Впоследствии концепция квантального митоза была расширена до концепции квантального клеточного цикла (12). В ходе квантальных циклов доступными для транскрипции в дочерних клетках становятся районы генома, которые были неактивными в материнской клетке, тогда как пролиферативные циклы производят клетки с постоянными свойствами, лишь увеличивая их число.

Многие авторы согласны с тем, что сливаться в мышечные волокна способны только миогенные клетки, находящиеся в фазе G₁ (6, 8), однако нет единого мнения относительно последовательности важных регуляторных событий в ходе миогенеза. Ряд исследователей

(11, 17) считают, что миогенные клетки выходят из клеточного цикла необратимо и могут приобретать признаки терминальной дифференцировки до слияния и независимо от него. Согласно данным других авторов (18, 21), выхода миогенных клеток из цикла до их слияния не происходит и сам процесс слияния зависит от плотности клеточной культуры и наличия кондиционирования среды.

Кенигсберг и его сотрудники (18) приводят данные в пользу того, что миогенные клетки не выходят из клеточного цикла прежде слияния и "решение" слиться принимается не в фазах S или M критического цикла, а в фазе G_1 , из которой клетки, если не сольются, могут снова вступать в фазу синтеза ДНК и затем митоза, при этом единственной особенностью цикла, в ходе которого инициируется терминальная дифференциация, является продленная фаза G_1 .

Классические представления о структурной организации скелетной мышечной ткани были значительно уточнены в связи с открытием особых клеток, которые сопровождают симпласты и названных Мауро (16) миосателлитами. Относительно их происхождения в литературе обсуждается три гипотезы: 1) эти клетки возникают из ядер поврежденной многоядерной мышечной клетки путем сегрегации цитоплазмы и ядра; 2) они представляют собой бездействующие миобласты, которые могут повторять эмбриональное развитие при повреждении мышечного волокна; 3) это блуждающие клетки, которые пенетрируют сарколемму и включаются в состав волокна (1, 9, 10).

Гистогенез скелетной мышечной ткани позвоночных – это процесс преобразования структур от исходной клеточной формы организации до симпластической. Большинство исследователей (17, 21) выделяют следующие стадии миогистогенеза: миобластическая, миосимпластическая, мышечных трубочек (миотуб), молодых и зрелых мышечных волокон. Авторы, изучавшие ранние стадии развития – миобластическую и миосимпластическую, миосателлиты не описывают. Последние наблюдались со стадии миотуб и молодых мышечных волокон, когда формировалась базальная мембрана мышечного волокна (19, 20). Однако имеются данные о том, что миосателлиты выявлялись с момента возникновения первых симпластов (8).

При электронно-микроскопическом исследовании материала закладки скелетных мышц конечностей у птиц и млекопитающих среди большого разнообразия клеточного материала выделяются клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, способностью вступать в контакт друг с другом и формировать путем слияния многоядерные симпласты (18). Такие клетки называются по-разному (стволовые миогенные, миобласты, презумтивные миобласты, промиобласты). Известно, что промиобласты при нормальном развитии рано сливаются, образуя симпласты. Это событие, по-видимому, вызывает экспрессию генов, в результате чего начинаются интенсивный синтез сократительных белков и образование филаментов (15, 17). Слияние миобластов необходимая стадия развития мышечных волокон, однако оно не является обязательным условием развития сократительного аппарата, но если слияния не происходит, то дифференцировка миоцитов происходит нетипично, раньше появляются пучки толстых филаментов, задерживается формирование видимой зет-линии (21).

Процессы накопления жировой ткани как в жировых депо, так и в межмышечных прослойках соединительной ткани являются слабо изученными. Установлено, что жировые клетки представляют собой отдельную линию клеток соединительной ткани (7). Предполагают

(13), что в жировой ткани свиней существует две популяции адипоцитов – крупные и мелкие. В крупных адипоцитах идет интенсивное накопление липидов, тогда как мелкие являются камбиальными при определенных условиях (высококалорийная диета и др.), эти клетки интенсивно делятся митозом. Другие авторы (14) считают, что жировые клетки могут образовываться из фибробластов или перицитов. Исследования последних лет показали, что в нормальных физиологических условиях основным источником развития жировой ткани являются адипоциты (7). Уделяется большое внимание изучению гистохимических свойств жировой ткани и ее метаболической активности. Установлено (13), что активность липопротеиновой липазы в жировой ткани сальных свиней значительно выше, чем у мясных животных.

В связи с вышеизложенным, мы изучали ультраструктурные особенности эмбриогенеза мышечной и жировой ткани у крупного рогатого скота.

Материал и методы

Опыты были проведены на плодах крупного рогатого скота 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-месячного возраста, полученных от коров на Калужском мясокомбинате. Для исследования были взяты образцы длиннейшей мышцы спины, четырехглавой мышцы бедра, трехглавой мышцы плеча, окологлобального жира и сальника. Взятые образцы были зафиксированы в 3%-ном растворе глутаральа, дофиксированы в 1%-ном растворе четырехоксида осмия и залиты в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы были проконтрастированы в уранилацетате с азотнокислым свинцом, просмотрены в электронном микроскопе ЭМ-100К при ускоряющем напряжении 75 КВ.

Для гистохимического изучения сразу же после убоя брали образцы мышц, замораживали в жидком азоте, затем в криостате изготавливали срезы и проводили определение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахласу (3). После проведения реакции на СДГ на препаратах определяли процентное соотношение типов мышечных волокон.

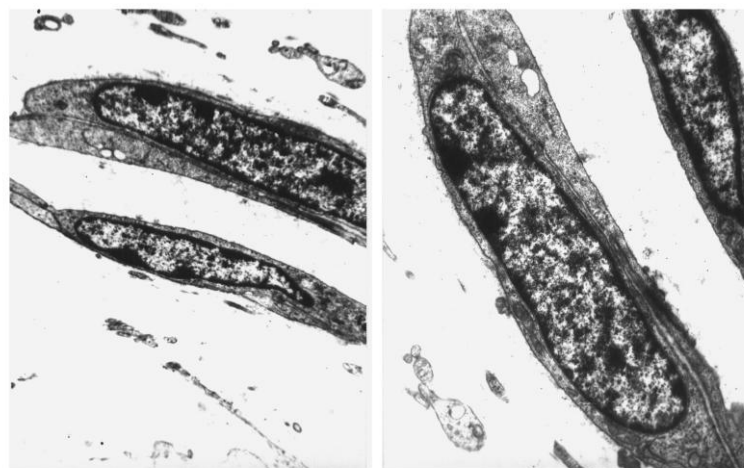


Рис. 1. Промиобласты в закладке скелетных мышц месячного плода. Крупное удлиненное ядро занимает основную часть клетки, цитоплазма бедна органеллами. Электронограмма. Ув. 7000.

Результаты и обсуждение

По нашим данным промиобласты выявляются в закладке скелетных мышц конечности и позвоночника у месячных плодов. Они представляют собой удлиненные одноядерные клетки, имеющие центрально расположенные "эухроматические" ядра с хорошо заметными ядрышками, собранные в розеткообразные или цепочечные полисомы. Короткие каналы гранулярной эндоплазматической сети

редки, комплекс Гольджи хорошо развит, митохондрии небольшие, овальные (рис. 1). В промиобластах отсутствовали миофиламенты, миофибриллы и саркоплазматическая сеть. После ряда митотических делений (рис. 2) промиобласты образовывали многочисленные одноядерные клетки – миобласты, способные сливаться между собой.

Слияние миобластов включало миграцию, распознавание и выстраивание в цепочку клеток, при этом на поверхности отдельных миобластов появлялся белок адгезин, с помощью которого миобласты соединялись за счет образования "мостиковых" контактов. Участки плазматических мембран соединяющихся клеток образовывали контакт, имеющий на электронограммах пятислойную структуру: три электроно-плотных слоя, разделенных двумя светлыми промежутками. Оказалось, что такой пятислойный контакт был способен образовывать многочисленные инвагинации в виде кавеол из одной клетки в другую (рис. 3).

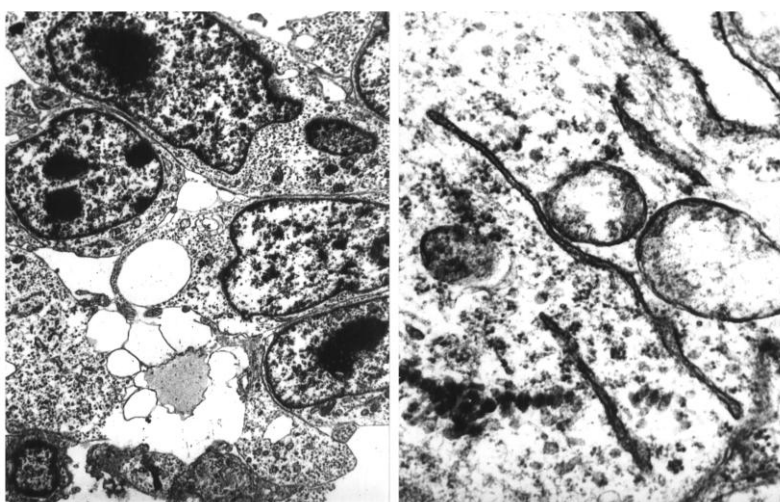


Рис. 4. Формирование симпластов. После слияния миопластов происходило образование цилиндрических трубочек, в центральной части которых располагались многочисленные ядра, в саркоплазме много рибосом. Электронограмма. Ув. 6000 и 23000.

Из кавеол могут формироваться свободные везикулы, которые затем разрушаются. Инвагинирование пятислойной мембраны межклеточного контакта, то есть образование кавеолы, а затем переход кавеолы в везикулу и отрыв последней в цитоплазму – происходил в сторону той миогенной клетки из двух, в которой идет сборка миофибрилярного аппарата и которую можно считать относительно более зрелой. Можно полагать, что обнаруженный процесс инвагинирования и везикуляция контакта клеток является своеобразным межклеточным пиноцитозом, способным приводить к растрате мембранного материала с увеличением его изотропного натяжения и, в конечном итоге, к перфорации мембраны и разрушению ее в области соединения клеток.

Слияние миобластов приводило к образованию симпластов, которые представляли собой длинные цилиндрической формы образования, в центральной части саркоплазмы располагались многочисленные ядра, много рибосом, как свободных, так и связанных с мембранами ГЭС (рис. 4). Развитие мышечных трубочек или миотуб характеризовалось появлением и постепенным увеличением в саркоплазме миофибрилл, которые формировались из беспорядочно лежащих нитей актина и миозина путем полимеризации.

Миозиновые (толстые) филаменты с самого начала своего образования имели длину 1,5-1,6 мкм и толщину 15 нм, их дифференцировка была связана с обилием "миозиновых", нередко

спиралеобразных полисом (рис. 5), в состав которых входило до 50-60 рибосом.

Важную роль в ориентации пучков миофиламентов, наметки границ будущих саркомеров путем закрепления актиновых нитей и в формировании, таким образом, миофибрилл, играли зачатки зет-дисков (рис. 6), возникающие в виде "пятен" плотного материала, связанных между собой белком десмином. Вновь сформированные миофибриллы несовершенны: длина саркомеров неодинакова, зет-полосы расположены на разном уровне. Затем шло постепенное выравнивание саркомеров: появление зет- и М-линий, выстраивание на одном уровне А-, У- и Н-зон. Рост миофибрилл в диаметре и в длину происходил за счет прибавления филаментов с боков и на концах миофибрилл (рис. 7). Одновременно с формированием сократительного аппарата наблюдалось возникновение зачатков системы поперечных трубочек и саркоплазматической сети.

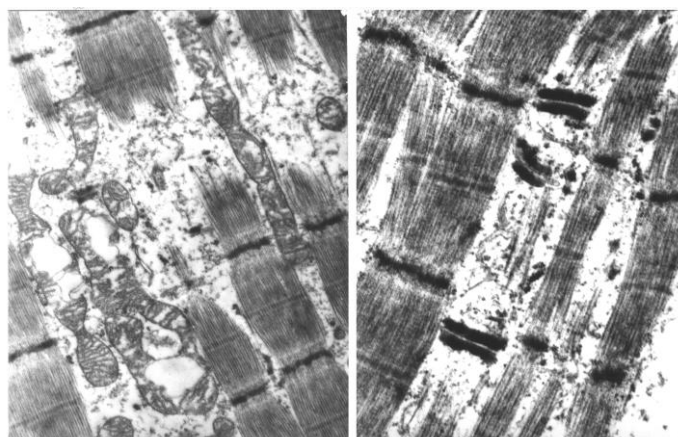


Рис. 7. Рост миофибрилл в диаметре и в длину идет за счет прибавления миофиламентов с боков и на концах миофибрилл. Электронограммы. Ув. 6000 и 23000.

В

миотубах у 4-5-месячных плодов, по сравнению с симпластами, объем саркоплазмы значительно возрастал, ядра занимали центральноосевое положение. Пучки миофибрилл были ориентированы вдоль длинной оси мiotубы. Количество и размер митохондрий увеличивались, они располагались цепочками между пучками миофибрилл. К мiotубам, на всем их протяжении, тесно прилежали одноядерные клетки – миобласты, которые митотически делились и большая их часть сливалась с мiotубами за счет межклеточного пиноцитоза.

В процессе развития происходила морфологическая перестройка

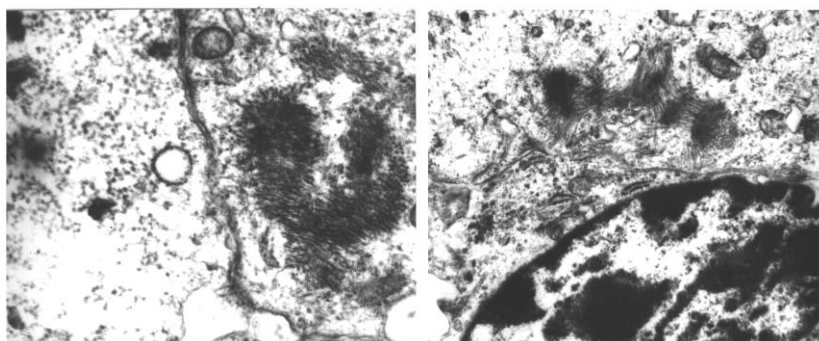


Рис. 5. Спиралеобразные (миозиновые) полисомы в саркоплазме мiotуб. Электронограмма. Ув. 23000.

Рис. 6. Зачатки Z-дисков в виде "пятен" плотного материала, связанных между собой белком десмином, образуют миофибриллы. Электронограмма. Ув. 14000.

миотуб, связанная с распадом некоторых из них. В литературе это явление описано как физиологическая дегенерация (19). Возникающая гибель клеток представляет собой одно из важных событий в гистогенезе тканей. Однако остается неясным, является ли такая гибель элиминацией клеток с генетическими аномалиями или это нормальный,

генетически запрограммированный процесс. Нет также достаточной ясности в вопросе о биологическом значении этого явления. Ряд авторов (19, 20) считают, что гибель миотуб следует рассматривать как составную часть соматического гистогенеза. Полагают, что физиологическая дегенерация мышечных трубочек является результатом нарушения специфических отношений между мышечной и соединительной тканями, изменением нервно-мышечных отношений.

При анализе электронограмм нами установлено, что погибающие миотубы содержали большое количество контрактурно измененных миофибрилл, много гранул гликогена и мелких митохондрий, липидные капли, ядра были подвержены пикнозу. Затем наступал распад и рассасывание некротических масс. Продукты гибели мышечных трубочек, видимо, влияли на соотношение процессов пролиферации и дифференцировки.

Следующим этапом гистогенеза мышечной ткани у 7-8-месячных плодов было формирование зрелых и незрелых мышечных волокон. Анализ электронограмм показал, что из первичных миотуб, которые сформировались на ранних этапах эмбриогенеза, образовались зрелые мышечные волокна, которые служили каркасом для образования новых волокон (вторичных миотуб). Незрелые мышечные волокна возникали из одноядерных миобластов после интенсивного митотического деления и слияния, они формировали на поверхности зрелого мышечного волокна вторичные миотубы. Необходимо отметить, что в отличие от других исследователей (1, 9, 10), которые полностью отрицают все формы деления мышечных ядер, кроме митоза, мы наблюдали интенсивную фрагментацию ядер во вторичных миотубах (рис. 8), однако отнести этот факт к эндомитозу или амитозу было затруднительно.

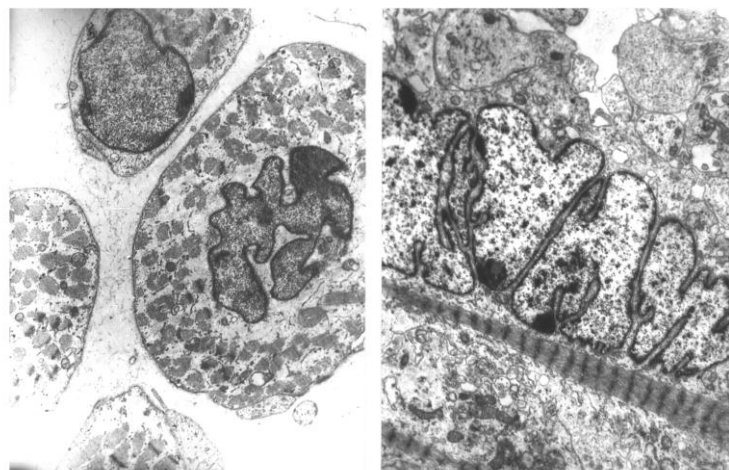


Рис.8. Фрагментация мышечных ядер во вторичных миотубах в закладке мышечной ткани у 7-месячных плодов. Электронограммы. Ув. 6000.

К концу эмбриогенеза (8-9-месячные плоды) в зрелых мышечных волокнах, наряду с мышечными ядрами, лежащими ближе к периферии волокна, встречались одноядерные клетки, отделенные от волокна небольшим пространством и имеющие общую базальную мембрану (рис. 9).

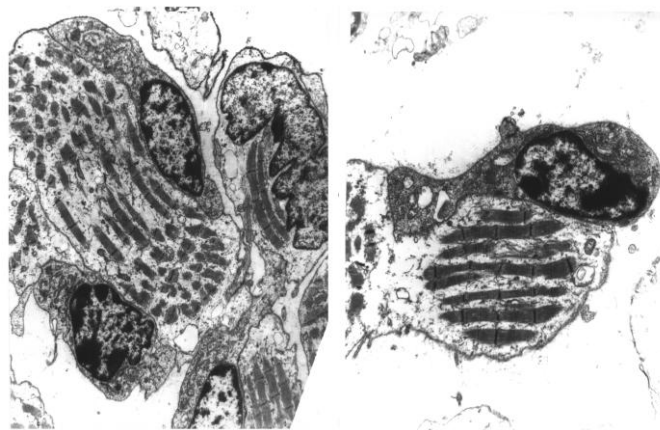


Рис. 9. Миосателлиты (одноядерные клетки, в цитоплазме которых нет миофибрилл) тесно прилегают к мышечным волокнам и имеют общую базальную мембрану. Электронограмма. Ув. 6400.

Судя по многочисленным литературным данным (10, 12, 16), эти клетки следует отнести к миосателлитам. Считают (1, 2, 8), что миосателлиты представляют собой дифференцированные миобласты, которые не слились во время эмбрионального развития, но сохранили способность к репродукции и повторной дифференцировке.

Гистохимические признаки дифференцировки мышечных волокон в процессе эмбрионального развития были выявлены на стадии мышечных трубочек, когда возникал контакт их с подрастающими нервными волокнами (рис. 10).

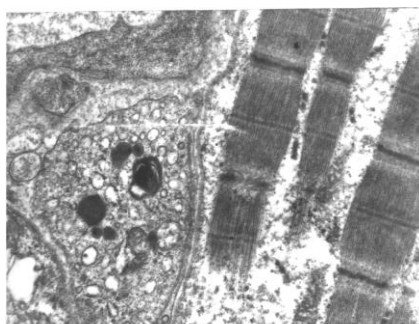


Рис. 10. Нервное волокно в составе мышечной трубочки 6-месячного плода. Электронограмма. Ув. 20000.

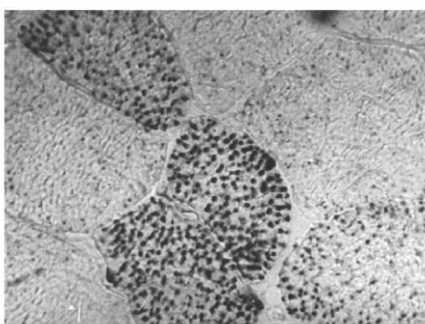


Рис. 11. Красные (темные) и белые (светлые) мышечные волокна в мышце 7-месячного плода. Выявление СДГ по Нахласу. Ув. 400.

Быстрый аксоплазматический ток в аксоне мотонейрона доставлял к мышце вещества, поддерживающие дифференцированное состояние. Подтверждением влияния иннервации на состав мышц служат опыты с перекрестной реиннервацией, в результате которой изменялись метаболизм и гистохимический профиль мускулов (5).

Первые гистохимические различия в мышечной ткани плодов были выявлены на 5-6 месяце внутриутробного развития. При определении СДГ было установлено, что во всех изучаемых мышцах интенсивность реакции в разных мышечных волокнах неодинакова. Встречалось большое количество темно-окрашенных мелких волокон – красные; несколько меньше было светлых волокон, они крупные, активность СДГ низкая – белые и промежуточные формы, имеющие среднюю активность СДГ. У 7-месячных плодов в мышечных волокнах реакция на СДГ усилилась, появились волокна с высокой и умеренной активностью (рис. 11).

При изучении ультраструктуры мышц поздних плодов (8-9 месяцев) было установлено, что красные и белые волокна представляют собой два крайних типа популяции мышечных волокон с присущими им четкими характерными особенностями, в промежуточных волокнах

структурные критерии варьировали в широких пределах. Красным волокнам было присуще большое количество митохондрий разной формы и величины с плотно упакованными кристами и более широкая зет-линия. Митохондрии располагались в различных отделах волокна неравномерно: наибольшие скопления отмечались на периферии под сарколеммой и вблизи ядер (рис. 12).

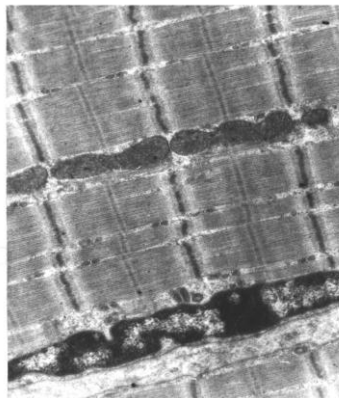


Рис. 12. Ультраструктура оксидативного (красного) мышечного волокна. Крупные митохондрии лежат цепочкой. Ув. 14000.

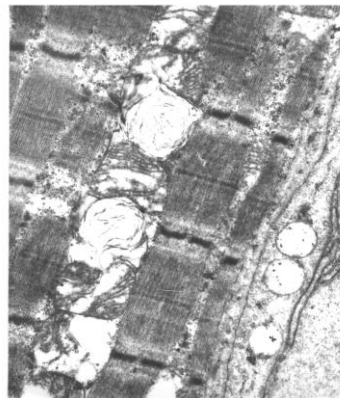


Рис. 13. Ультраструктура гликолитического (белого) мышечного волокна. В саркоплазме большое количество липидных капель и гликогена. Ув. 20000.

Белым волокнам было свойственно небольшое количество преимущественно мелких, с редкими кристами и светлым матриксом митохондрий, которые располагались неравномерно, зет-линия узкая, в саркоплазме выявлено большое количество липидных капель и гранул гликогена (рис. 13).

Суммируя полученные данные следует отметить, что на ранних этапах эмбриогенеза (1-3 месяца) дифференцировке мышечных клеток предшествовало объединение их основной массы вдоль длинной оси зачатков костной ткани. У 3-месячных плодов миобласты интенсивно делились митозом, а затем, сливаясь, формировали симпласты, которые превращались в мышечные трубочки или миотубы. Последние представляли собой удлинённые образования, содержащие множество центрально-расположенных ядер, миофибриллы. Диаметр миотуб достигал 0,3-0,6 мкм. У 4-5-месячных плодов развивающиеся мышцы состояли из миотуб и мышечных волокон. Площади поперечного сечения мышечных волокон в этот период отличались незначительно и составляли в длиннейшей мышце спины, трехглавой мышце плеча и четырехглавой мышце бедра соответственно ($\times 10^{-3}$) 3,0; 4,5; 3,0 мкм². На 6-7 месяце внутриутробного развития наблюдалось дальнейшее увеличение размеров мышечного волокна, они достигали следующих размеров: 35,6 в длиннейшей, 27,6 в четырехглавой и 22,6 мкм² в трехглавой мышце. Быстрое увеличение площади поперечного сечения отмечалось у 8-9-месячных плодов и достигало в длиннейшей, трехглавой и четырехглавой мышцах соответственно 131,5; 147,9; 157,8 мкм². За три последних месяца внутриутробного развития площадь поперечного сечения мышечных волокон увеличивалась в 5 раз.

Жировые депо (околопочечный жир и сальник) у 4-месячных плодов были представлены небольшим количеством мезенхимы, между отростчатыми клетками которой располагались малодифференцированные клетки – преадипоциты. Они были небольшого размера с крупным ядром, имеющим 2 или 3 хорошо развитых ядрышка и малым количеством цитоплазмы, в которой обнаруживались светлые вакуоли, гранулярная эндоплазматическая сеть, мелкие митохондрии, тонофиламенты и комплекс Гольджи (рис. 14). По мере увеличения возраста плода (4-6 месяцев) количество жировой ткани возросло в 1,5 раза. Преадипоциты делились митозом, при этом возникала популяция клеток (адипоцитов),

характерным признаком которых было накопление мелких капелек жира (рис. 15).

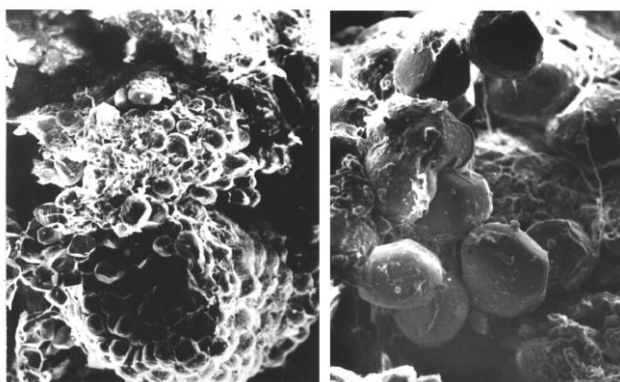


Рис. 16. Дольки околопочечной жировой ткани отделены друг от друга перегородками из тонковолокнистой соединительной ткани, которая оплетает адипоциты. Сканирующая электронная микроскопия. Ув. 3000.

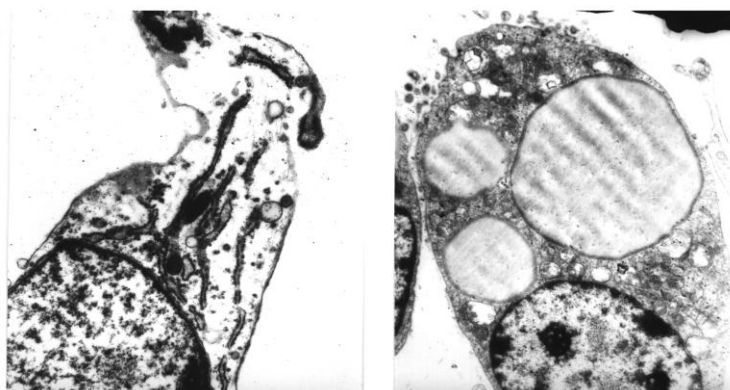


Рис. 14. Преадипоциты в закладке жировой ткани 4-х месячного плода. Крупное ядро занимает основную часть клетки. В цитоплазме лежат мелкие митохондрии, тонофиламенты и комплекс Гольджи. Электронограмма. Ув. 14000.

Рис. 15. Адипоцит в околопочечной жировой ткани 6-месячного плода. В цитоплазме располагаются мелкие капли липидов, покрытых однослойной мембраной. Электронограмма. Ув. 14000.

Постепенно число липидных капель увеличивалось, они сливались между собой, формируя липидные глобулы, которые были покрыты едва различимой мембраной.

С развитием жировой ткани параллельно возникали сосуды – многочисленные капилляры оплетали адипоциты. У 9-месячных плодов жировая ткань была сформирована и состояла из адипоцитов, которые были организованы в дольки, они были отделены друг от друга и поддерживались перегородками из тонковолокнистой соединительной ткани (рис. 16). В строме были расположены многочисленные кровеносные сосуды, нервные волокна, встречались тучные клетки, содержащие гранулы гепарина. Известно, что гепарин активирует липопротеиновую липазу, а высокая активность этого фермента служит результатом наибольшего отложения жира в организме (7). Следует

отметить, что по мере увеличения возраста плода адипоциты различались по диаметру.

Заключение

Проведенное нами исследование развивающихся скелетных мышц свидетельствует о тесной взаимосвязи клеточного и симпластического компонентов, которые происходят дивергентно из единого источника – промиобластов. Появлению зрелых миосателлитов предшествовали структурные преобразования исходных клеток, которые были строго синхронизированы с развитием мышечных волокон. Полученные данные опровергают гипотезы об эмбриональных остатках, дремлющих клетках и клетках иной тканевой природы как об источниках миосателлитов. Процесс преобразования мышечных трубочек в зрелые мышечные волокна сопровождался их ростом в длину и толщину, увеличением количества миофибрилл, формированием саркоплазматической сети и Т-системы. Наряду с усложнением структурной организации мышечных волокон изменялась их гистохимическая дифференцировка, которая являлась следствием нейтрофического влияния и формирования нейромышечных синапсов.

Жировые депо были выявлены у 4-9-месячных плодов. Они представляли собой тельца, образующиеся за счет пролиферации и дифференцировки клеток мезенхимы, которые давали начало стволовым клеткам жировой ткани – преадипоцитам. Жировые депо различались между собой размерами адипоцитов и соотношением соединительной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клишов А.А., Данилов Р.К. Миосателлитоциты. Архив анатомии, 1981, 80, I: 95-107.
2. Манухина А.И., Столярова А.Г., Донченко Н.П. Интенсивность роста и дифференцировка скелетных мышц и жировых депо у телят в онтогенезе. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1986, 1(80):70-74.
3. Пирс Э. Гистохимия. М., 1962, 844 с.
4. Подлубная З.А. Формирование сократительных структур в миогенезе. Проблемы миогенеза. Л.: Наука, 1981:51-74.
5. Рехачева И.О. О классификации мышечных волокон. Архив анатомии. 1981, 81, 10:77-91.
6. Allen R.E., Merkel R.A., Young R.B. Cellular aspects of muscle growth: myogenic cell proliferation J. of Animal Science, 1979, 49,1:115-127.
7. Allen C.Beitz, Cramer D. Biology of fat in meat animal. North Central Regional Publ. Madison Univ. Wisconsin. 1976, 243:315.
8. Bischoff R., H. Holbzer. Mitosis and the process of differentiation of miogenic cells in vitro. J.Cell. Biol., 1969, 4:188.
9. Burleigh I.G. The cellular regulation or growth and development. Biological Reviews, 1974, 49, 3:267-320.
10. Churck J. Satellite cells and myogenesis a study in the fruit-bat wed. J.Anat., 1969, 105, 3:419-438.
11. Interosa N. Differentiation of skeletal muscle in culture. Cell. Struct. Funct. 1982, 7, 2:91-109.
12. Holtzer H. Proliferation and a quantal cell cycle in the differentiation of muscle, cartilage and red blood cells. Gene expression in somatic cells. N.Y.: Acad. Press. 1970:69-88.
13. Hud R., Allen C. Cellularity of bovine adipose tissue. J. Lipid Res., 1973, 14:605.
14. Kirtland J., Guir M. Adipose tissue cellularity. Int. J. Obesity, 1979, 3:15-55.
15. Kelly D.E. Myofibrillogenesis and z-band differentiation. Anat. Rec., 1969, 163:403-426.
16. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibres. J. Biophysicks, Biochemicks, Cytology, 1961,9:493-494.
17. Muscle Development. Molecular and Cellular Control. Ed. M.L. Pearson a H.F. Epsyeyn. Cold Spring, 1983.
18. Konigsberg J. Aspects of cytodifferentiation of skeletal muscle. In: Organogenesis. N. Y. 1965:337p.
19. Seinsch W., Scheweichl J. Physiologic cells necroses during the early

- development of muscle of the back in embryonic mice. Z. Anat. Entwicklungsgesch, 1974, 145, 1:101-112.
20. Strohm R., Hardami E. Cellular endocrinology: hormonal control of embryonic and cellular differentiation. Proc. 1st internat. sympos on cell endocrinol, N.Y., 1986:287.
21. Swatland S. Muscle growth in the fetal and neonatal pig. J. Animal Science, 1973, 37a: 536-545.

МОРФОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

А.И. Манухина

Кабинет морфологических исследований

В обзоре дана морфологическая характеристика основных органов иммунной системы: тимуса, лимфатических узлов, селезенки, кишечнорастворимой лимфоидной ткани. Показано сложное взаимодействие клеток, составляющих паренхиму. Лимфоциты и плазматические клетки проникают в самые поверхностные участки эпителиального покрова и осуществляют здесь свои функции. Существует также кооперация между макрофагами, плазматическими клетками и лимфоцитами, из которых образуются островки. Именно в этих структурах и происходит передача информации, взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе.

Р.В. Петров (8) в 1976 году писал, что иммунная система такая же самостоятельная система, как, например, пищеварительная, нервная и т.д. У нее три особенности: она генерализована по всему телу, ее клетки постоянно циркулируют через кровотоки, она обладает уникальной особенностью вырабатывать сугубо специфические молекулы антител. Иммунная система контролирует качественное постоянство генетически предопределенного клеточного и гуморального состава организма (5).

Структура лимфоидной ткани. Органы иммунной системы построены из лимфоидной ткани, состоящей из ретикулярной основы, которая выполняет функции опоры и микроокружения лимфоидных элементов. Ретикулярные клетки и волокна образуют сложное переплетение в виде сетчатой конструкции (11). В петлях трехмерной сети, образованной ретикулярными волокнами и клетками, располагаются лимфоциты разной степени зрелости: зрелые и незрелые плазматические клетки, находящиеся с ними во взаимодействии активно фагоцитирующие макрофаги и другие клетки. Наиболее многочисленными среди лимфоидных элементов являются малые лимфоциты, имеющие крупное, округлое и интенсивно окрашивающееся ядро, вокруг которого находится узкий ободок базофильной цитоплазмы. Средние лимфоциты крупнее, их ядро окрашено менее интенсивно, чем у малых лимфоцитов. Большие лимфоциты примерно в 2 раза крупнее малых лимфоцитов. Ядро в них расположено эксцентрично, окрашено слабо, цитоплазма слабобазофильная (13, 15).

Плазматические клетки немного крупнее малых лимфоцитов. Ядро в них округлой формы, расположено эксцентрично. В зрелых плазматических клетках глыбки хроматина в ядре имеют характерное расположение, напоминающее рисунок спиц в колеснице. Макрофаги лимфоидных органов принадлежат к группе тканевых макрофагов, важнейшей функцией которых является участие в защитных реакциях организма. Это крупные, различной формы клетки с неровной поверхностью и бобовидным ядром (1, 2, 4). Родоначальником всех видов клеток иммунной системы (лимфоцитов, плазматических клеток) служат полипотентные стволовые клетки костного мозга. Стволовые клет-

ки, поступающие из костного мозга в кровь, уже на 7-8 неделе эмбрионального развития заселяют тимус, где осуществляется дифференцировка Т-лимфоцитов. В-лимфоциты развиваются из стволовых клеток в самом костном мозге. Т- и В-лимфоциты с током крови поступают из тимуса и костного мозга в периферические органы иммунной системы, где они распределяются в различные зоны. Функция каждого В-лимфоцита программируется в лимфоидной ткани костного мозга, а каждого Т-лимфоцита – в корковом веществе тимуса, в результате чего лимфоциты "индивидуально запрограммированы" на взаимодействие с определенными антигенами и в этом смысле являются высокоспециализированными клетками (12, 13).

На основе анализа данных литературы о строении органов иммунной системы, особенностях их развития и преобразования в онтогенезе был выявлен ряд закономерностей. Первая из них состоит в том, что рабочей паренхимой органов иммуногенеза является лимфоидная ткань, вторая – что все органы иммунной системы закладываются в раннем эмбриогенезе. Закладка лимфоидных образований происходит под эпителием соответствующих отделов пищеварительной трубки в виде сгущения и уплотнения мезенхимы, из которой затем дифференцируется ретикулярная ткань. Закладающиеся лимфоидные органы функционируют сначала как ретикулоэпителиальные и ретикулярные, лимфоциты заселяют их не сразу (1, 2). Третья закономерность заключается в том, что к моменту рождения органы иммунной системы достигают достаточной морфологической зрелости. К этому времени они сформированы уже до такой степени, что в состоянии выполнять иммунную защиту организма от генетически чужеродного белка. Во многих периферических иммунных органах у новорожденных поросят уже имеются лимфоидные узелки (табл.), в том числе и с центрами размножения.

Таблица. Количество лимфоидных узелков в кишечнике новорожденных поросят

Орган	Количество	
	мин.-макс.	М±м
Тонкая кишка	194-681	(30±6)·10
Толстая кишка	203-1047	(64±12)·10
Слепая кишка	105-236	(15±2,1)·10

Наличие таких узелков свидетельствует (9) о полной морфологической и функциональной зрелости лимфоидной ткани в органах иммуногенеза, об их участии в иммунных реакциях организма. Лимфоидные узелки с центрами размножения способны к местному воспроизводству клеток лимфоидного ряда (9, 15).

Четвертая закономерность развития и преобразования всех органов иммунной системы в онтогенезе состоит в быстром увеличении их размеров у молодняка и в ускоренной дифференцировке лимфоидной ткани. Животные с первых дней жизни все больше соприкасаются с внешней средой во всем ее разнообразии, и обменные процессы у них протекают с высокой активностью. Пищевые антигены, а вместе с ними и другие чужеродные вещества и патогенные микроорганизмы, воздействуют на слизистую оболочку органов пищеварения. Требуется защита и от появляющихся в самом организме и становящихся чужеродными продуктов его жизнедеятельности. Механизмы защиты от всего чужеродного формируются очень рано, способность продуцировать антитела развивается сразу после рождения. Например, у мышей выраженный иммунный ответ на тимуснезависимый антиген появляется уже на 2-й день, а на

тимусзависимый - на 3-4-й день после рождения. Развитие антителпродуцирующей активности определяется главным образом внутренними факторами. Среди них – развитие тимуса, качественные и количественные изменения окружающих тканей (3, 5, 6).

Тимус. В последние годы строение и функции тимуса привлекают большое внимание исследователей. К настоящему времени выяснено, что именно в тимусе обеспечивается иммунокомпетентность лимфоцитов, осуществляющих иммунный надзор. Участие тимуса выражается в реакциях пролиферации, дифференцировке и миграции клеток, а также секреции активных веществ (6). В тимусе различают корковое и мозговое вещество. При изучении ультраструктуры было установлено, что для корковой зоны характерно "альвеолярное строение". "Альвеола" состоит из капилляра, нескольких макрофагов и тимоцитов. Вся эта структура окружена "капсулой", представленной эндотелиальными клетками и небольшим количеством коллагеновых и эластических волокон. Кроме того, в субкапсулярной и, в меньшей степени, в зонах внутренней и наружной коры встречаются типичные эпителиальные клетки, в цитоплазме которых, наряду с вакуолями и мелкими плотными включениями, имеются один или несколько тимоцитов. В мозговом веществе эпителиальные клетки расположены вокруг шарообразных тимических телец. Многочисленные лимфоциты имеют средние размеры. Здесь эпителиальная сеть, в отличие от таковой в корковом веществе, становится широкоячеистой. Видны гипертрофированные клетки. Для них характерны развитая цитоплазма, содержащая значительное число митохондрий, пучки толстых тонофибрилл и единичные электронно-плотные гранулы. В мозговом веществе обнаружены скопления крупных гранулярных клеток с одним светлым ядром, а также гистаминсодержащих клеток. Последние могут поглощать и продуцировать гистамин. Строма тимуса представлена как соединительнотканная, так и эпителиальными элементами (12-14, 16). Основное вещество соединительной ткани содержит протеогликаны и гликопротеиды. Их наибольшее количество наблюдается в строме на ранних стадиях развития, что совпадает по времени с интенсивным образованием волокон (12). Эпителиальные клетки тимуса являются каркасом той стромальной сети, которая пронизывает внутреннюю среду органа. Именно с эпителиальными клетками (и тимическими тельцами) связывают продукцию многочисленных физиологически активных веществ тимуса (4).

Клеточный состав тимуса представлен преимущественно клетками двух типов: эпителиоретикулярными и лимфоидными. Кроме того, в тимусе постоянно присутствуют плазматические клетки, тканевые базофилы (тучные клетки), нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты. Тимические тельца представляют собой концентрические скопления продолговатых и веретенообразных клеток с большим ядром и слабоацидофильной цитоплазмой. Сердцевина тельца образуется из нескольких первоначально набухших эпителиоретикулоцитов. Внутренняя часть тельца постепенно распадается и заселяется лимфоцитами и эозинофильными лейкоцитами. Многие исследователи считают тимические тельца секреторными образованиями. Имеются данные о том, что эпителий тимических телец играет роль в иммунной функции тимуса. Показано, что эти тельца могут аккумулировать антиген. Вероятно, стимуляция антигенами может увеличить число и размер телец (4, 6, 17). Существует также мнение, что тимические тельца выполняют фагоцитарную функцию, разрушая при помощи различных ферментов и элиминируя лимфоциты, относящиеся к аутоиммунным клонам (14).

Лимфатические узлы. Лимфатические узлы, выполняющие функции биологических фильтров, расположены на путях следования лимфы по лимфатическим сосудам от органов и тканей к лимфатическим протокам и лимфатическим узлам. В них задерживаются любые крупные чужеродные структуры, погибшие клетки, пылевые частицы и микробные тела, которые оказались в притекающей к узлу лимфе, а также опухолевые клетки. В синусах лимфатических узлов все эти структуры задерживаются в петлях сети, образованной ретикулярными волокнами и клетками, распознаются лимфоцитами и уничтожаются, если их могут поглотить и "переварить" макрофаги. Таким образом, пройдя через лимфатические узлы, лимфа очищается от посторонних частиц и вливается в кровь уже без чужеродных веществ. Внутри лимфатического узла, между трабекулами, ретикулярные волокна и клетки формируют трехмерную сеть с петлями различной формы и величины. Соответственно строению и морфофункциональным особенностям лимфоидную паренхиму подразделяют на корковое и мозговое вещество. Корковое вещество находится ближе к капсуле, занимает периферические отделы лимфатического узла, в которых расположены лимфоидные узелки. Их появление в мозговом веществе может наблюдаться у некоторых животных после сильной антигенной стимуляции. В центрах размножения находятся отростчатые ретикулярные (дендритные) клетки, бласты, макрофаги. В узелках происходит первый контакт антигена с иммунокомпетентными клетками (2, 7, 13, 15). Кроме лимфоидных узелков в корковом веществе имеется диффузная лимфоидная ткань, расположенная между узелками (корковое плато) и на границе с мозговым веществом (паракортикальная зона). Эти зоны рассматриваются как тимусзависимые. Мозговое вещество находится ближе к воротам лимфатического узла и занимает центральную его часть. В брыжеечных узлах мозговое вещество раздвигает корковое и узкими участками проникает в периферические отделы узла, вплоть до капсулы. Паренхима мозгового вещества представлена скоплениями лимфоидной ткани, образующими мягкотные тяжи, которые являются зоной скопления В-лимфоцитов. Здесь находятся также плазматические клетки и макрофаги. Объем, занимаемый в лимфатическом узле мягкотными тканями, а также их клеточный состав изменяются при различных воздействиях на организм, особенно при развитии иммунологических реакций. Мякотные тяжи, как и лимфоидные узелки коркового вещества, являются зонами скопления В-лимфоцитов, связанными с выработкой гуморального иммунитета (7, 15).

Селезенку признают одним из органов периферической иммунной системы, являющимся главным источником антител при внутривенном введении антигена. Снаружи селезенка покрыта фиброзной капсулой, от которой внутрь органа отходят трабекулы; между ними находится паренхима, которая носит название – пульпа, в ней различают белую и красную пульпу. Белая пульпа образована селезеночными периартериальными муфтами, лимфоидными узелками и эллипсоидными макрофагально-лимфоидными муфтами. Стромой белой пульпы являются ретикулярные клетки и волокна. В петлях ретикулярной стромы располагаются лимфоциты, плазматические и другие клетки, участвующие в иммунных реакциях. Красная пульпа залегает между венозными синусоидами и состоит также из ретикулярной стромы, в петлях которой находятся эритроциты, лейкоциты и макрофаги (10, 13, 15). В периартериальных лимфоидных муфтах содержатся макрофаги, лимфоциты (в основном средних размеров), клетки крови, моноциты и эозинофилы. В норме клетки этой зоны сходны с клетками мантийной зоны лимфоидных узелков по

своим цитологическим и функциональным параметрам (1, 2). Взаимоотношение лимфоидных клеток в периартериальных лимфоидных муфтах представляет большой интерес, поскольку именно эти клетки ближе других находятся к крови и могут быть "причастными" к формированию иммунного ответа. Считают, что непосредственно возле стенки артерии находятся Т-лимфоциты, а в маргинальной зоне имеются Т- и В-клетки. В-клетки, покидая периферическую зону лимфоидных муфт, мигрируют в лимфоидные узелки, таким образом отделяясь от Т-клеток. Периартериальные лимфоидные муфты являются зоной преимущественно Т-клеток, процентное соотношение которых в органе достигает 20-40. Наличие этих клеток с картинами митоза свидетельствует о том, что здесь имеется пролиферация Т-клеток (4-10).

Периартериальная муфта продолжается в периартериальную зону лимфоидного узелка. Для узелков характерны большие, чем у муфт размеры и большая разница в толщине лимфоидной ткани в разных направлениях по периметру артерии. Лимфоидные узелки селезенки могут содержать центры размножения или же не иметь таковых. Клеточный состав центров размножения весьма разнообразен. Это большие лимфоциты, В- и Т-клетки, а также нелимфоидные клетки – макрофаги. Развитие центра размножения зависит от антигенной стимуляции и Т-клеток. Центр играет важную роль в развитии В-клеток памяти и в продукции предшественников плазматических клеток (6, 10, 13, 15).

Иммунные структуры кишечника. В тонкой кишке происходят основные и завершающие процессы пищеварения, заканчивающиеся всасыванием продуктов переваривания. Здесь отделяются шлаки, которые уплотняются в толстой кишке и в конечном итоге удаляются из организма. В тонкой кишке через эпителий и подлежащие ткани из просвета пищеварительной трубки осуществляется всасывание в кровеносное и лимфатическое русло продуктов расщепления белков, жиров и углеводов. В процессе всасывания все эти вещества, поступающие извне, подвергаются в стенке кишечника иммунному контролю.

Рассматривая строение и функции лимфоидных образований кишечника, следует учитывать находящуюся здесь микрофлору. Наряду с постоянно присутствующими в просвете кишечника микроорганизмами ("нормальная" флора), которых особенно много в просвете толстой кишки, там встречаются и патогенные микроорганизмы. "Нормальная" микрофлора, создающая микробный антагонизм, ведущий к подавлению популяции патогенных микробов, влияет на активность лимфоидного аппарата органов пищеварения.

В стенках тонкой и толстой кишок можно выделить отдельные клетки лимфоидной ткани, в толще эпителиальной выстилки – межэпителиальные лимфоциты, затем диффузную лимфоидную ткань в собственной пластинке слизистой оболочки, лимфоидные узелки и лимфоидные бляшки (9, 15).

Последние представляют собой скопления диффузной лимфоидной ткани и лимфоидных узелков, плотно прилежащих друг к другу и расположенных в слизистой оболочке и подслизистой основе тонкой кишки. При электронной микроскопии на поверхности бляшек обнаружены микроскладчатые клетки (М-клетки). Апикальная часть этих клеток не содержит микроворсинок и гликокаликса. Установлено (2, 7), что М-клетки адаптированы для везикулярного транспорта широкого набора частиц (от холерного токсина до целых бактерий и простейших) из просвета кишечника к лимфоидным клеткам. Захват антигенного материала М-клетками осуществляется путем эндо- или

фагоцитоза. Между М-клетками много лимфоцитов, гранулоцитов, макрофагов. По мнению ряда авторов (1, 2, 4), основная функция бляшек – захват антигена из просвета кишки и перенос его в центры размножения, где происходит активация В-клеток. В переносе участвуют межэпителиальные макрофаги.

Известно (9, 13, 15), что между клетками эпителия имеются В-лимфоциты, Т-хелперы, макрофаги и другие клетки. Непосредственно под эпителием располагаются Т-лимфоциты, обладающие цитотоксической и супрессорной функцией. Интраэпителиальные лимфоциты над лимфоидным узелком преимущественно представлены В-клетками. Субэпителиальную зону рассматривают как зону лимфоидного движения, так как ее лимфоциты способны к миграции и рециркуляции. Через эпителий, покрывающий лимфоидные узелки, транспортируется иммуногенный материал из просвета кишки. Кроме того, эпителий лимфоидной бляшки над лимфоидными узелками способен абсорбировать из просвета тонкой кишки интактные белковые макромолекулы.

Таким образом, современные достижения биологии и медицины, позволившие многое расшифровать в строении и функциях лимфоцитов и других клеток лимфоидного ряда, обеспечивающих надежную защиту организма от всего генетически чужеродного, были бы далеко неполными и односторонними без знания органной структуры лимфоидных (иммунных) образований. Распознавание и обезвреживание генетически чужеродных веществ – процесс сложный и во многом еще не ясный.

Лимфоциты и плазматические клетки участвуют в этих процессах как в "одиночку", проникая в самые поверхностные участки эпителиального покрова, так и в кооперации с такими же клетками лимфоидного ряда и другими клеточными элементами. В периферических органах иммунной системы выявлены цепочки, состоящие из лимфоцитов, которые имеют определенные направления и скопления макрофагов, так называемые макрофагально- и плазматично-лимфоцитарные островки. Это макрофаг или плазматическая клетка, окруженная лимфоцитами. Именно в этих структурах и происходит, по-видимому, передача информации, взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе. Мы полагаем, что исследование структур на микроскопическом и субмикроскопическом уровнях является новым шагом в изучении механизмов формирования иммунного ответа.

На путях возможного внедрения в организм генетически чужеродных веществ, наряду со свободно перемещающимися клетками лимфоидного ряда, находятся «сторожевые посты» – многочисленные скопления лимфоидной ткани (миндалины, лимфоидные узелки, лимфоидные бляшки). Подобные скопления, как выяснилось в последнее время, сосредоточены в слизистой оболочке всех внутренних органов и даже в эпителиальном покрове, который ограничивает и защищает организм от чужеродной внешней среды. Только в самом поверхностном слое тонкой кишки на каждые три эпителиоцита приходится один лимфоцит. Лимфоидные узелки, лимфоидные бляшки, а также свободно лежащие в стенках органов клетки лимфоидного ряда следует рассматривать как первую "линию" иммунной защиты. Эта "линия" осуществляет свои функции непосредственно в собственной пластинке слизистой оболочки и даже в эпителиальном покрове половых органов. Те чужеродные вещества, которые "ускользнули" от иммунного контроля в стенках этих органов или появились, образовались за пределами первого барьера иммунной защиты, попадают в ток лимфы и кровотока. Оказавшись в просвете

лимфатического капилляра, эти чужеродные вещества с током лимфы по лимфатическим сосудам следуют к регионарным для этих органов лимфатическим узлам.

Таким образом, многочисленные скопления лимфоидной ткани, образующие периферические органы иммунной системы (лимфоидные органы) и центральные, где Т- и В-лимфоциты образуются из стволовых клеток костного мозга, несмотря на большое разнообразие строения и топографии, имеют много общих черт, складывающихся в указанные выше закономерности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. Иммунология процессов адаптивного роста, пролифераций и их нарушений. М.: Наука, 1987: 208 с.
2. Бернет Ф. Клеточная иммунология. М: Мир, 1971: 573 с.
3. Волошин Н.А., Яхница А.Г. Состояние вилочковой железы крыс после антинатальной антигенной стимуляции. Арх. анат., 1982, 82, 5: 83-89.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. Сб.: Гиппократ. 1992: 256 с.
5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. Введение в прикладную иммунологию. М.: Наука, 1990: 224 с.
6. Новиков В.Д., Труфакин В.А. Органы тимолимфатической системы. Новосибирск, 1980: 30 с.
7. Новиков В.И., Сидорович И.Г. Коммуникативная и регуляторная функции клеток лимфатических узлов в иммуногенезе. Успехи совр. биологии. 1990, 110, 2(5): 219-230.
8. Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина, 1976: 336 с.
9. Сапин М.Р. Иммунные структуры пищеварительной системы. М.: Медицина, 1987: 224 с.
10. Сапин М.Р., Амбарцумян Е.Ф. Цитоархитектоника белой пульпы селезенки у людей различного возраста. Арх. анат., 1990, 98, 5: 5-10.
11. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981: 312 с.
12. Степанов П.Ф., Забродин В.А. Возрастная характеристика стромально-паренхиматозных отношений тимуса человека. Арх. анат., 1989. 97, 12: 5-51.
13. Хэм А., Кормак Д. Гистология (в 5 томах). М.: Мир, 1983, 2. (Лимфоидная ткань): 191-259.
14. Bach M. Lymphocyte – mediated cytotoxicity. Effects of ageing adult, thymectomy and thymic factor. Immunology, 1977, 119: 641-647.
15. Fioretti A. Die Gaumenmandel: Darstellung der Biologie and Physiopathologie. Stuttgart, 1961: 351 p.
16. Haynes B.F. The Human Thymic microenvironment. Adv. Immunol. Orlando e.a., 1984, 36: 87-142.
17. Stimson W., Crilly P. Effect of steroids on secretion of immunoregulatory factors by thymic epithelial cell culture. Immunology, 1981, 44, 2: 401-408.

РЕГУЛЯЦИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КОРМА У СВИНЕЙ

С.Г. Кузнецов

Лаборатория минерального питания

Обобщены современные данные о механизмах регуляции аппетита, потребления корма, жажды, голода и насыщения у свиней. Отражена роль гипоталамуса в интеграции нервной, метаболической и эндокринной регуляции этих процессов. Обсуждены особенности регуляции аппетита и потребления корма у животных разного возраста. Приведены классификация ароматических и вкусовых добавок и результаты их применения в свиноводстве. Уделено особое внимание использованию органических кислот в кормлении животных

и современным способам подготовки зерна к скармливанию. Показана роль биологически активных веществ в регуляции потребления корма и продуктивности свиней.

Поросята сразу же после рождения способны отыскивать и принимать пищу. Они находят и исследуют корм с помощью обонятельных, вкусовых, тактильных, зрительных и звуковых анализаторов (15, 18).

У свиней ведущую роль в приеме корма играет обонятельная и вкусовая сигнализация. У них по сравнению со жвачными животными сильнее развиты анализаторы, воспринимающие химические раздражения. Рецепторы обонятельного анализатора возбуждаются газообразными веществами, а рецепторы вкусового – при соприкосновении с растворенными веществами. Слабее у свиней развито зрение (4, 15).

Поросята отыскивают соски матери главным образом с помощью обоняния и осязания, и с первых же дней жизни у них формируется стереотип к определенным соскам. Молокоотдача у свиноматок имеет свою специфику из-за отсутствия в вымени молочных цистерн. Весь процесс сосания состоит из трех фаз. Первая фаза (подготовительная) продолжается около одной минуты, когда поросята массируют вымя. Затем наступает вторая фаза, связанная с молокоотдачей. Продолжительность собственно акта сосания длится всего 15-20 с. После прекращения молокоотдачи наступает заключительная фаза массажирующей вымени, которая может длиться около двух минут. Таких циклов сосания бывает около 25 в сутки. Интервалы между сосаниями зависят от молочности маток: малопродуктивных маток поросята сосут через каждые 30-45 мин, а обильномолочных – через 1,5-2 ч. С возрастом частота сосаний уменьшается (18).

Определенную роль в потреблении свиньями корма играет вкусовой анализатор. Рецепторный аппарат этого анализатора находится в полости рта. Благодаря раздражению рецепторов, расположенных во вкусовых сосочках языка, происходит опробование пищи. Кроме того, с рецепторного поля полости рта при участии вкусового анализатора рефлекторно запускается в ход сложный механизм аппарата пищеварения. Этот участок пищеварительной системы у поросят интенсивно развит уже к моменту рождения. У новорожденных поросят язык в 2,5 раза тяжелее желудка, а к 25-суточному возрасту желудок уже превышает массу языка. Это свидетельствует о большой биологической роли ротовой полости в питании поросят на первом молочном этапе их жизни (4, 18).

Свиньи различают четыре основные группы вкусовых веществ, которые вызывают четыре вида первичных ощущений вкуса: сладкого, кислого, соленого и горького. Различные привкусы пищи возникают благодаря наличию на поверхности языка рецепторов, воспринимающих температурные, тактильные и болевые раздражения. Таким образом, одновременно со вкусовыми возникает ряд других ощущений, к которым присоединяются также ощущения запаха (эти обонятельные ощущения – один из компонентов вкуса). В результате сложного комплекса раздражений возникают различные оттенки вкусовых ощущений (4, 18, 28).

Регуляция приема корма – сложный физиологический процесс, обеспечивающий приспособление организма к внешней среде. Главная роль в регулировании приема корма животными принадлежит нервной и гормональной системам. И.П. Павлов под названием "пищевой центр" объединял группу структур (клеток), расположенных в различных участках центральной нервной системы, которые благодаря

координированной деятельности осуществляют процессы приема пищи, а также регуляцию деятельности пищеварительной системы: слюноотделения, эвакуаторной функции желудка, периодической деятельности желудочно-кишечного тракта (1).

Состояние (возбудимость) пищевого центра в значительной мере зависит от содержания в организме (прежде всего в крови и химусе) определенных веществ. Стремление к потреблению корма или аппетит животного возникает при относительно длительных промежутках между кормлениями, когда «голодная» кровь возбуждает пищевой центр. Значительное влияние на его возбуждение оказывают импульсы, поступающие от рецепторов пищеварительного тракта, сигнализирующих о степени его наполнения. На пищевое возбуждение также влияют раздражения, поступающие от вкусовых рецепторов ротовой полости (4, 28).

Потребление корма во многом определяется обеспеченностью организма энергией. По мере роста животных увеличивается потребление корма, так как возрастает масса тканей и повышаются потребности организма на поддержание жизнедеятельности. Потребление корма может лимитировать емкость пищеварительного тракта (например, при включении в рацион медленно перевариваемых кормов). При недостатке многих питательных веществ (незаменимых аминокислот, витаминов, минеральных элементов) падает потребление корма, что сопровождается снижением темпов роста и соответственно уменьшением потребности организма в этих пищевых факторах (1, 24).

В исследованиях на свиньях установлено, что расположенный в промежуточном мозге гипоталамус является высшим отделом регуляции потребления корма, при этом вентромедиальные ядра гипоталамуса можно рассматривать как центры торможения, а латеральные зоны ядер – как центры стимуляции потребления корма. Возбуждение этих центров, регулирующих потребление корма, происходит через нервы, отходящие от рецепторов, расположенных по всему пищеварительному тракту, а также в органах чувств, и гуморальным путем с помощью хеморецепторов, находящихся в системе кровообращения и реагирующих на изменение обмена веществ (18, 28).

Нагревание преоптической зоны гипоталамуса с помощью вживленных термоэлектродов усиливает потребление корма, а охлаждение – понижает. Нагревание или охлаждение спинного мозга не влияет на аппетит животных. У свиней, как и у большинства теплокровных, потребление корма возрастает на холоде и снижается в тепле (15).

В период течки потребление корма у свинок подавляется, но в то же время их общая активность увеличивается. Следует подчеркнуть, что в обменных клетках свиньи меньше потребляют корм и дают значительно меньший прирост по сравнению с животными, содержащимися в станках. Свиньи чаще потребляют большую часть корма в течение дневного времени (6-8 раз), а не ночного (1-3 раза), хотя в очень теплую погоду их ночная активность увеличивается (18, 24, 28).

Опыты показали, что нагрузка желудка молоком или 5%-ной глюкозой подавляет потребление корма у поросят. Гипертонические нагрузки на желудок и кишечник, а также внутрибрюшинное введение гормона холецистокинина вызывают насыщение (18, 24). Этот кишечный гормон вызывает чувство насыщения и тормозит секрецию желудочного сока (1).

Некоторые гормоны, вовлеченные в регуляцию метаболизма питательных веществ, в той или иной мере контролируют потребление

корма. Так, инсулин, глюкагон, соматостатин, соматотропин, тиреоидные гормоны, кальцитонин, кортикостероиды при определенных условиях могут изменять потребление корма. При высокой концентрации в крови эстрогены подавляют потребление корма (например, в период половой охоты, в конце супоросности). Однако при низкой концентрации они стимулируют рост животных. Обнаружена прямая зависимость между уровнем в крови анаболических гормонов и интенсивностью роста животных. Гормональные вещества, которые стимулируют рост и лактацию или регулируют состав тела, могут влиять на потребление корма посредством изменения потребностей организма (16, 24, 28).

В опытах на растущих свиньях установлено, что инъекции им свиного соматотропина способствовали увеличению прироста живой массы на 16-24%. При этом потребление корма уменьшалось на 5-17%, а эффективность его использования повышалась на 15-35%. Выход постного мяса увеличивался, а выход сала снижался на 20-70%. В мышечной ткани этих животных уменьшалось содержание воды и жира (16, 24). Однако в некоторых опытах введение свиньям соматотропина или инсулина стимулировало потребление корма (16).

Ветеринарные препараты, изменяющие распределение метаболических потоков на рост и отложение жира, могут не влиять на потребление корма, если снижение липогенеза сочетается с увеличением потребности в энергии на отложение протеина (13, 24).

Свиньи проявляют очень заметное и, по-видимому, врожденное предпочтение к сладким веществам. В опытах с применением двойной поилки и метода выработки рефлексов, при котором свиньи должны нажимать рычаг в кормушке для получения небольшого количества сладкого раствора, было отмечено предпочтение животных к сахарозе, глюкозе и сахарину, но не к цикlamату натрия. О врожденном характере вкусового предпочтения можно судить по реакции влечения к сахарину новорожденных поросят, еще не вскармливавшихся свиноматкой (18).

Доказано влияние генетических факторов на потребление корма. Коэффициент наследуемости потребления корма составлял 0,23, а среднесуточных приростов – 0,41. Свиньи породы дюрок и помесные поросята поедали на 3% больше корма по сравнению с другими породами (28).

В связи с интенсификацией животноводства в последние годы многие ученые стали все больше уделять внимание ароматическим и вкусовым добавкам, которые применяются для исправления аромата и улучшения вкуса корма, а также придания ему специфических вкусовых свойств. При поступлении в организм животного вместе с кормом ароматические, вкусовые и возбуждающие аппетит вещества вызывают раздражение обонятельных и вкусовых рецепторов, в результате чего наблюдается усиленное отделение пищеварительных соков. Многие из этих веществ, раздражая слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, способствуют лучшему перевариванию корма (14, 33).

Применение вкусовых добавок в свиноводстве имеет существенные преимущества перед другими видами животных в связи с тем, что для поросят характерен высокий потенциал роста, они относятся к всеядным животным и потребляют больше корма. Ароматические и вкусовые вещества часто применяются вместе с антистрессовыми препаратами, что позволяет свести до минимума стрессовые ситуации. Почти все млекопитающие предпочитают сладкое вместо пресного и немного кислое вместо щелочного. Поросята безошибочно отличают раствор сахарозы от обыкновенной

воды. Они предпочитают концентрацию глюкозы ниже 3,5%. Подсвинки хорошо распознают корм, содержащий сульфат меди (18, 22, 33).

В настоящее время имеется довольно большой ассортимент добавок, стимулирующих вкусовые реакции у животных (рис. 1). К ним относятся ароматические масла (анисовое, апельсиновое, коричное, лавровое, лимонное, луковое, мандариновое, мятное, перечное, тминное, укропное, чесночное, шалфейное и другие эфирные масла) и ароматические вещества (ванилин, этилванилин, мята, сенной настой, анисовое семя, отходы какао, некоторых фруктов, овощей и др.) со специфическим запахом, сохраняющимся длительное время. Заслуживают внимания глутамат натрия, глутаминовая кислота, дианатрийинозинат, арабинат калия. Во многих странах используют ароматические и вкусовые добавки под фирменными названиями (пигнектар, фиранор, масловинильный аромат и др.), имитирующие запах и вкус зеленых, сочных кормов, зерна и других продуктов. Они применяются в комбикормах для всех видов животных (14, 26, 28, 33).

В качестве веществ, придающих кормам сладкий вкус, применяют сахарин, сахарин натрия, сахар, сукралозу, сунетт, аспартам, цикламат натрия, мелассу, крахмальную патоку; придающих кислый вкус – лимонную, фумаровую, яблочную, уксусную, молочную, щавелевую, муравьиную, винную, аскорбиновую, сорбиновую, бензойную кислоты; придающих горький вкус – порошок горчицы, полынь, чеснок, лук, хлористый кальций, сульфат магния, сульфат меди и др. (7, 9, 14, 22, 23, 36).

Скармливание дрожжеванных кормов повышает аппетит у свиней, а следовательно, и продуктивность. Это связано с тем, что при дрожжевании корм обогащается этиловым спиртом, молочной кислотой, белком, витаминами группы В. Из указанных веществ наиболее контрастными вкусовыми свойствами обладает этиловый спирт. При использовании его в количестве 2% от массы рациона в виде 5%-ного раствора интенсивность роста откармливаемых свиней повышалась на 10,6%, а расход кормов снижался на 7,8% по сравнению с контролем (19).



Рис. 1. Классификация вкусовых добавок для свиней

Применение этилового спирта в количестве 100 и 200 мл на голову в сутки при откорме свиней от 39 до 120 кг повышало среднесуточный прирост живой массы на 3,9 и 7,5% (18).

При откорме свиней из веществ, придающих корму сладкий вкус (сахарин, сахар, меласса), наиболее эффективным оказался сахар в количестве 2,5%, а из органических кислот (молочная, уксусная, щавелевая) – молочная в количестве 0,4% к сухому веществу корма (19).

Обогащение комбикормов лимонной кислотой в дозе 1% способствовало повышению прироста живой массы молодняка свиней на 9-17%, а двойная доза кислоты уже ингибировала рост животных (36). Фумаровая кислота повышает неспецифическую резистентность, увеличивает энергетические возможности организма и уровень антиоксидантной защиты, ускоряет рост животных, уменьшает заболеваемость и падеж, обладает выраженным адаптогенным действием при стрессе, повышает иммунологическую реактивность организма. Фумаровая кислота не накапливается в организме и не оказывает отрицательного действия на качество свинины.



Экономическая эффективность применения фумаровой кислоты в свиноводстве колеблется от 3 до 50 руб. на 1 руб. затрат (2, 23).

Янтарная кислота повышает переваримость корма и интенсивность роста животных, оказывает антиоксидантное и нейротропное действие, нормализует энергетический обмен, общее физиологическое состояние организма, усиливает процессы биосинтеза, является универсальным антистрессовым препаратом, не вызывает ксенобиотические эффекты (12). При включении в рационы поросят от рождения до 21 сут по 2% и с 22 до 100 сут по 1% лимонной или фумаровой кислот прирост увеличивался на 6-13%, расход корма на единицу прироста снижался на 3%, сохранность животных возрастала на 17-46%. Введение в рацион 0,25% муравьиной кислоты приводило к увеличению приростов на 18%, эффективности использования корма – на 15% и к сокращению падежа молодняка - в 2 раза. Применение лимонной или муравьиной кислот в количестве 2 и 0,25% соответственно обеспечивало увеличение прироста живой массы на 20%, снижение расхода корма на единицу прироста – на 15% и заболеваемости поросят – на 15-28%. Схожие результаты получены при введении в рацион поросят 40-70-сут возраста 0,47% муравьиной кислоты или 1,6% адсорбата этой кислоты, или 1,8% формиата натрия. Применение фумаровой кислоты в дозе 1-1,1% супоросным и лактирующим маткам повышало выход поросят на 1 опорос на 1-3% и темпы их роста – на 8%. Внесение в рацион свиноматок 0,9% лимонной кислоты увеличивало количество поросят в помете на 6%, а добавки

муравьиной кислоты в дозе от 0,9 до 1,3% повышали выход поросят на 1-9% и их прирост – на 7-18% (23).

Считают, что увеличение эффективности использования корма на 5-10% вполне оправдывает дополнительные расходы, связанные с внесением органических кислот в рационы свиней (22, 23, 25, 31). Весьма выгодно добавлять лимонную, фумаровую, молочную и пропионовую кислоты в концентрации до 1,5% в жидкие корма для молодняка свиней (25).

Органические кислоты (пропионовая, муравьиная, фумаровая) и их соли широко используются в кормопроизводстве. В настоящее время в кормлении животных уделяется большое внимание применению натуральных добавок, к числу которых относятся органические кислоты. Они способны снижать pH содержимого желудка (при pH более 4 замедляется расщепление протеина), влиять на состав микрофлоры пищеварительного тракта, улучшать вкусовые качества корма, стимулировать его переваримость и повышать продуктивность животных. Кормовые добавки, состоящие из смеси органических кислот, относят к группе пребиотиков, которые имеют ряд преимуществ перед антибиотиками и пробиотиками (22, 25, 31). Фирма “Кемин” (США) выпускает кормовую добавку асид лак, которая представляет собой смесь оптимальных количеств молочной, фумаровой, пропионовой, лимонной и муравьиной кислот. В ФРГ производят смесь органических кислот под торговой маркой “Фугеко” (31).

Однако отмечено, что при длительном применении вкусовых добавок такой корм приедается животными, поэтому рекомендуют периодическое контрастное изменение вкусовых качеств корма при выращивании и откорме свиней. Рекомендуется следующая схема: поросятам-сосунам на второй неделе жизни следует скармливать поджаренные ячмень или кукурузу, неделю спустя этот рацион дополняется коровьим молоком с добавкой 1% лактозы или глюкозы. К месячному возрасту поросят переводят на ЗЦМ или регенерированное молоко с добавками 3,5-5% сахарозы, а также им скармливают стартер без добавки. Затем на протяжении последующих двух месяцев количество сахара в рационе постепенно сокращают до 0,6%. После достижения поросятами массы 45 кг скармливание сахара прекращают и переходят на кормление полнорационными комбикормами с добавками 1%-ного сульфата меди (14).

Периодическое контрастное изменение вкуса кормовых смесей (сладкое, кислое, горькое и т.д.) поддерживает на высоком уровне аппетит у свиней в течение всего периода откорма, способствует лучшему использованию питательных веществ, вследствие чего прирост живой массы увеличивается на 10-12%, а расход корма на получение 1 кг прироста уменьшается на 9-11%. В качестве вкусовых добавок можно использовать: для придания сладкого вкуса - сахар или муку из высушенной свеклы в количестве 2,5-5% (к сухому веществу рациона или к комбикорму); для придания кислого вкуса – молочную или уксусную кислоту в количестве 0,4%; для придания горького вкуса - порошок горчицы в количестве 0,15% или хлористый кальций – 0,4%; для придания приятного вкуса и запаха жаренного зерна – муку поджаренной сои в дозе 5% и для придания вкуса этанола – гидролизный этиловый спирт в количестве 2%. В зависимости от наличия указанных вкусовых добавок можно применять три из них (например, мука сахарной свеклы, уксусная кислота и хлористый кальций). Периодичность смены добавок должна осуществляться через равные интервалы времени, от 2 до 10 дней (через два дня, неделю или через декаду). При использовании сахара, уксусной кислоты,

хлористого кальция и гидролизного спирта на каждом затраченном рубле экономится 4 рубля, а при использовании муки сахарной свеклы, уксусной кислоты и хлористого кальция – 7-8 рублей (19).

Предложена следующая схема применения ароматических веществ. Ароматизаторы включают в рационы свиноматок за 1 неделю до опороса и в период лактации. Они переходят в молоко, поросята улавливают этот запах и воспринимают как нечто специфически присущее их матери. Одновременно в подсосный период поросятам предлагают комбикорм с этим же ароматическим веществом. Обнаруживая в кормушке запах материнского молока, поросята раньше и охотнее поедают подкормку, находясь под матерью. После отъема в комбикорма продолжают добавлять эти же препараты. Улавливая знакомый запах, поросята с аппетитом поедают корм в возрастающих количествах, следствием этого является снижение послеотъемного стресса и хорошее развитие животных в период выращивания (17, 33).

Поедаемость и переваримость комбикормов, составленных на основе различных видов зерна, а также их вкусовые свойства можно значительно улучшить. Однако в настоящее время в нашей стране около 70% зерна скармливают животным в виде дерти (в некоторых хозяйствах даже в виде немолотого зерна), причем объемы использования зерна в таком виде за последние годы постоянно возрастают. В отдельных областях только 5-10% собственного зернофуража используется в составе комбикормов. Из-за плохого усвоения животными питательных веществ неподготовленного к скармливанию зерна потери его составляют 25-30%, или около 10 млн. т в год. Кроме того, несбалансированное питание ведет к дополнительному перерасходу кормов на единицу животноводческой продукции (6).

Для улучшения вкусовых и питательных свойств зерно следует предварительно обработать одним из следующих способов (рис. 2): измельчение, плющение, варка, поджаривание, экструдирование, гранулирование, осолаживание, проращивание, дрожжевание, микронизация, флакирование, экспандирование, кондиционирование с помощью анаэробной пастеризации (3, 5, 11, 17, 20, 21).

Размол является наиболее старым методом обработки зерна. Свиньи лучше поедают зерно среднего помола (1-3 мм) (17). При откорме свиней наилучшие результаты получены на комбикорме с размером частиц 4 мм при любом его виде (сухой, влажный, гранулированный). Животные, получавшие гранулированный комбикорм, лучше росли и эффективнее использовали питательные вещества корма. Однако у них отмечено на 32% больше случаев желудочно-кишечных заболеваний, чем при даче корма другой консистенции (34). Грубый помол комбикорма (3,5 мм) способствовал увеличению потребления корма и интенсивности роста поросят в период выращивания на 4% по сравнению с тонким помолом (1,5 мм) и не оказал влияния на эти показатели в период откорма. Корм мелкого помола достоверно обусловил появление паракератоза у свиней (17). При включении в рацион пшеницы или кукурузы с размером частиц 0,9, 1,4 и 1,8 мм не обнаружено существенной разницы в продуктивности молодняка свиней, однако в заключительный период откорма животные росли лучше на зерне грубого помола (27).

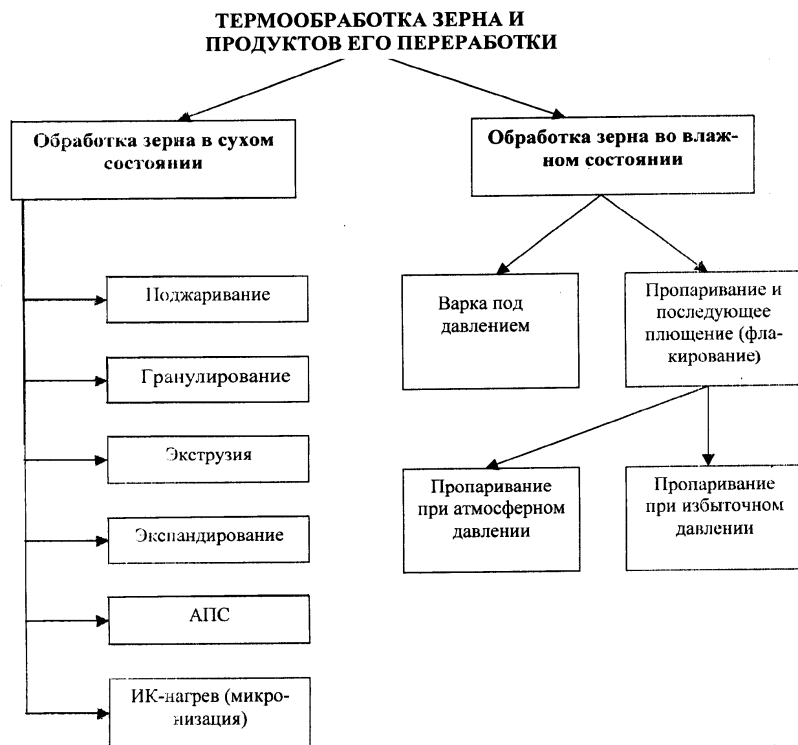


Рис. 2. Классификация способов термической обработки зерна и продуктов его переработки

Зерно овса, ячменя, проса покрыто пленками, которые плохо перевариваются у молодняка, поэтому такое зерно при скармливании пороссятам рекомендуется перед измельчением отшелушить на специальных машинах (17). Пшеница и ячмень в плющенном виде для свиней предпочтительнее, чем зерно в виде дерти или тонкоразмолотое. Более эффективно горячее плющение, при котором белки и крахмал набухают, а зерна превращаются в хлопья. Варка зерна в воде, заваривание и запаривание вызывает его набухание, оно становится мягким, что облегчает его пережевывание и проглатывание, а выделяющиеся при этом в воздух ароматические вещества повышают аппетит у животных (17,20). Однако в некоторых опытах установлено, что тип корма (сухой, влажный) не оказывает существенного влияния на интенсивность роста пороссят в период выращивания (35).

Скармливание пороссятам поджаренного зерна кукурузы, овса, ячменя, гороха, сои способствует увеличению прироста и снижению затрат корма на единицу продукции. При осолаживании кормов, богатых крахмалом, в них увеличивается количество сахара в 8-12 раз, поэтому такой корм охотнее поедается свиньями (17).

Экструдирование измельченного и увлажненного зерна проводится на специальных машинах – экструдерах, осуществляющих сильное сдавливание зерна, разогрев и высвобождение из него свободной и связанной влаги. При этом крахмал разлагается на декстрины и сахара, происходит частичное обеззараживание зерна. Готовый продукт имеет приятный запах печеного хлеба, и поросята охотно поедают его с 5-7-суточного возраста. Однако применение этого способа требует значительных энергетических затрат. Кроме того, возникает опасность быстрого повторного заражения продукта при его хранении и транспортировке микробами, пережившими экструзию (3, 5, 11, 17, 21).

Гранулирование кормов улучшает их физические и вкусовые качества, уменьшает потери, облегчает транспортировку, повышает переваримость питательных веществ на 10-12%, однако существенно увеличивает стоимость корма по сравнению с размолотом и снижает в нем содержание ряда биологически активных веществ (3, 17, 29, 32). Откорм свиней на гранулированном комбикорме повышал зоотехнические показатели на 4-9% по сравнению с дачей рассыпных кормов как при кормлении вволю, так и при нормированном их потреблении. На гранулированном корме отмечено снижение качества свинины (29). Гранулирование кормов с помощью пара имеет существенные преимущества перед сухим гранулированием. Не установлено различий в эффективности использования свиньями кормов с размером гранул от 4 до 8 мм (32).

Недостатки гранулирования и экструдирования кормов устранены новым способом обработки – кондиционирование с помощью анаэробной пастеризации (АПС). Процесс заключается в том, что корм или его компоненты обрабатываются в течение определенного времени газовой смесью, состоящей в основном из водяного пара и двуокиси углерода. Общая температура газа не превышает 83°C. Обработка происходит почти без кислорода, что обеспечивает эффективное уничтожение бактерий и одновременное образование угольной кислоты, которая снижает величину pH. Устройство АПС работает почти без давления и без паровых котлов. После кондиционирования продукт поступает на гранулирование. Преимущества АПС: устранение сальмонелл и колибактерий, сохранение витаминов, улучшение усвояемости крахмала и белка, достижение хорошего качества готового корма, увеличение срока его хранения без образования плесени и микрогидридов, возможность использования более дешевого сырья, так как при этом улучшается его вкус, устраняются ингибиторы и запахи (3).

Одним из наиболее прогрессивных и экономичных способов подготовки зерна к скармливанию является инфракрасное облучение (микронизация). Данный способ тепловой обработки значительно повышает содержание декстринов в зерне, способствует его обеззараживанию, увеличивает переваримость сухого вещества у свиней на 6-10% и протеина – на 15-21%. При использовании зерна, обработанного этим способом, продуктивность животных повышается до 15%, а эффективность использования корма – на 13% (20).

Пропаривание зерна с последующим плющением (флакирование) проводят как при избыточном давлении, так и при давлении, близком к атмосферному. Разновидность данного метода – пропаривание зерна при избыточном давлении с последующим получением хлопьев. Эти способы влаготепловой обработки зерна способствуют улучшению его вкусовых качеств, повышают питательную ценность углеводов и протеина, снижают энергетические затраты организма на переработку корма (17, 20).

Экспансионную обработку зерновых компонентов проводят с помощью специального оборудования – экспандеров. В отличие от существующих способов влаготепловой обработки этот метод расплющивания зерна с одновременной обработкой его паром при избыточном давлении улучшает гигиенические и питательные качества комбикормов. Крахмал при этом гидролизуются, а антипитательные факторы расщепляются. Экспандирование – это более эффективный способ обеззараживания корма от сальмонелл по сравнению с экструдированием (11, 21).

В тех случаях, когда в рецепты комбикормов для поросят включено 3-5% рыбной муки, 2-4% мясокостной муки, 10% сухого

обрата, добавка ароматических веществ не эффективна. Отпадает также необходимость обогащения вкусовыми и ароматическими добавками комбикормов, зерновая часть которых экструдирована или обжарена. Однако необходимо подчеркнуть, что этими добавками не следует пользоваться для облагораживания запаха и вкуса недоброкачественных кормов. Пагубные последствия такого кормления обязательно проявятся (17, 18, 24).

На промышленных комплексах по производству свинины поросята в периоды подсоса и дорастивания часто не потребляют количество корма, предусмотренное технологией. В связи с этим разработана специальная кормовая добавка (% по массе): сухое молоко – 63,9, меласса – 18,0, жир животный стабилизированный – 10,0, фосфатидный концентрат – 5,0, синтетический лизин – 2,4, метионин – 0,69, шоколадная эссенция – 0,01. Введение поросятам в подсосный период смеси, состоящей из 90% комбикорма СК-11 и 10% этой добавки, приводило к лучшему потреблению корма как в период подсоса, так и в период дорастивания, и к увеличению интенсивности роста на 8% (18).

Следует отметить, что недостаток в рационе свиней лизина, метионина, триптофана, кальция, фосфора, натрия, кобальта, меди, цинка, йода, многих витаминов приводит к снижению аппетита и увеличению расхода корма на единицу прироста. Избыток в рационе отдельных питательных и биологически активных веществ также может привести к снижению потребления корма (1, 8, 10, 14, 24).

Некоторые факторы питания оказывают весьма специфическое влияние на регуляцию потребления корма. Так, при дефиците цинка нарушается вкусоощущение, ухудшается аппетит, поражается слизистая оболочка пищеварительного тракта, снижается функция слюнных желез (рис. 3).



Рис. 3. Роль цинка в регуляции потребления корма.

Из слюны выделен цинксодержащий белок густин, который регулирует рост вкусовых сосочков (8, 10). Наиболее ранний признак недостаточности фосфора у свиней – снижение потребления корма (8).

В свою очередь, некоторые компоненты комбикормов и премиксов (минеральные соли, антибиотики, ферментные препараты и

др.) оказывают влияние на потребление корма. При даче поросятам биомидина, витамина РР, ферментного препарата терридина положительное действие их на рост животных было связано с повышением аппетита, а не с улучшением переваримости питательных веществ корма (13, 18). В рационах свиней поваренную соль следует рассматривать не только как источник натрия и хлора, но и как вкусовую добавку. Корма, содержащие свыше 2% мела, плохо поедаются свиньями. Поросята охотнее поедают корма с содержанием трикальцийфосфата, чем с монокальцийфосфатом (9). Ацетат калия снижает запыленность кормов, предотвращает образование в них плесени, повышает аппетит у животных и птицы. Он оказывает положительное влияние на углеводный, энергетический и белковый обмен, ускоряет работу почек и выведение из организма ядов экзогенного и эндогенного происхождения, обладает лизинсберегающим эффектом (9, 13).

Заключение

Таким образом, управляя информацией, поступающей в пищевой центр от интерорецепторов (регулируя промежутки между кормлениями) и от рецепторов ротовой полости (изменяя вкус, запах, температуру, плотность корма путем специальной его подготовки), можно регулировать потребление корма животными. Вкусовые качества корма имеют большее значение для молодняка, чем для взрослых свиней. Знание специфики реакции животных на различные вкусовые раздражители позволяет в определенной мере регулировать потребление корма, а следовательно, интенсивность их роста. Добавление в корм различных веществ, создающих комплекс вкусовых и обонятельных ощущений, специальные способы обработки кормов, особенно зерна, приобретают важное значение в современных условиях производства свинины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А. Обмен веществ у жвачных животных. М., 1997:419 с.
2. Артемов Б.Т., Ракова Т.Н., Бузлама В.С. и др. Фумаровая кислота – стимулятор общей (неспецифической) резистентности свиней. Диагностика и терапия незаразных болезней сельскохозяйственных животных. М., 1986:83-87.
3. Гедике Г. Новое оборудование для гидротермической обработки кормов. - Комбикормовая промышленность, 1996, 2: 21.
4. Георгиевский В.И. Физиология сельскохозяйственных животных. М., 1990:511с.
5. Грохович Ю., Лясковский Я. Микронизация растительного сырья. Комбикормовая промышленность, 1995, 5: 19.
6. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г. Можно ли приспособиться к новым условиям? - Комбикормовая промышленность, 1995, 4: 3-6.
7. Карунский А.И., Крючкова Е.Ф., Никильбурский Н.И. Отходы свеклосахарного производства в кормлении свиней. Зоотехния, 1993, 9:15-18.
8. Кузнецов С.Г. Биохимические критерии обеспеченности животных минеральными веществами. Обзор. С.-х. биология, 1991, 2: 16-33.
9. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность минеральных веществ для животных. Обзорная информация. М., ВНИИТЭИагропром, 1992:52 с.
10. Лапшин С.А., Кальницкий Б.Д., Кокорев В.А., Крисанов А.Ф. Новое в минеральном питании сельскохозяйственных животных. М., 1988:207 с.
11. Мостицкий Л. Экспандеры для комбикормовой промышленности. Комбикормовая промышленность, 1996, 4:21-22.
12. Найденский М. Янтарная кислота как кормовая добавка. Комбикормовая промышленность, 1996, 3: 17.
13. Обогащение комбикормов новыми биологически активными и

минеральными веществами. Методические рекомендации. Сергиев Посад, 1992:39с.

14. Петрухин И.В. Корма и кормовые добавки. Справочник. М., 1989:526 с.
15. Понд У. Дж., Хаупт К.А. Биология свиньи. М., 1983:334 с.
16. Размахнин Ю.Е., Драганов И.Ф. Использование биостимуляторов при откорме сельскохозяйственных животных. Обзорная информация. М., ВНИИТЭИагропром, 1990:50 с.
17. Рекомендации по кормлению молодняка свиней в колхозах и совхозах Калужской области. Калуга, 1988:23 с.
18. Ткачев Е.З. Физиология питания свиней. М., 1981:239 с.
19. Трончук И.С. Влияние смены вкусовых качеств кормов на эффективность откорма свиней. Эффективное использование кормов в свиноводстве. Киев, 1983: 60-67.
20. Тюрев Е.П., Зверев С.В., Цыгулев О.В. Термообработка зерна ИК-излучением. Обзорная информация. М., ЦНИИТЭИ хлебопродуктов, 1993, 28 с.
21. Экспандирование и экструдирование в производстве кормовых смесей. - Комбикормовая промышленность, 1997, 1:15-16.
22. Bolduan G., Jung H., Schneider R., Schnabel E. Hinweise zur Schweineernahrung nach neuen Erkenntnissen uber die mikrobielle Verdaauung. Mh. Veter.Med., 1988, 43, 21:764-766.
23. Bolduan G., Morgenthum R., Jung H., Hitz H. Saureneinsatz bei Ferkeln und Saue. Kraftfutter, 1990, 7: 286-288.
24. Forbes J.M. Endocrine factors important to appetite. Control and regulation of animals growth, 1988: 3-13.
25. Gadd J. How the British find natural manipulation of gut bacteria: Acids improve performans. Pigs, 1990, 6, 5: 49-51.
26. Gatel F., Guion P. Effects of monosodium L-glutamate on diet polatibility and piglet performance during the suckling and weaning periods. Anim. Product., 1990, 50, 2: 365-372.
27. Goihl J. Wheat particle size can influence gain, feed conversion of pigs. Feedstuffs, 1988, 60, 47: 16.
28. Hawton J.D. Factors affecting feed intake. Agri-Pract., 1990, 11, 2:13-16.
29. Hortog L.A., Hutten B. Mehl oder Pellets in der Mastschweinefütterung. Dt. Geflugelwirtsch. Svhwineprod., 1987, 39, 7:193-194.
30. Muirhead S. Physical feed form, swine growth interaction examined. Feedstuffs, 1986, 58, 26:12-13.
31. Schwarting G., Haussermann E. Ferkel lieben Saures. Agrar Praxis, 1989, 2:89-90.
32. Stekar L. Uticaj peletiranja na kvalitet i iskoristavanje stocne hrane kod svinja. Krmiva, 1987, 29, 1-2:27-31.
33. Stoner G. R. Agregandole sabor al rendimiento. Industria Porcina, 1989, 9, 2,:18-19.
34. Szabo P. A keverektekarmany konsisztenciajanak hatasa a serteshizlalasi eredmenyekre. Allattenyesztes, 1988, 37, 1: 39-45.
35. Thaler R.C., Nelssen J.L. Comparison of wet versus dry feeding for starter pigs. Rep. of progress. Kansas. Agr. Experiment station, 1988, 556:31-32.
36. Zednik M. Doplek kyseliny citronov smesich pro casny odstav selat. Zivocisna Vyroba, 1988, 33, 4:353-363.

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА ПОРОСЯТ МИНЕРАЛЬНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ В РАННИЙ ПЕРИОД ОНТОГЕНЕЗА

А.Г. Овчаренко, С.Г. Кузнецов, Т.С. Кузнецова
Лаборатория минерального питания

Изучена динамика содержания 19 минеральных элементов в молозиве и молоке 5 свиноматок в ходе лактации (1, 7, 14, 21, 26 суток после опоросов). Обобщены современные данные о потребности поросят в макро- и микроэлементах и определена степень

обеспеченности их организма 15 элементами за счет материнского молока. Сделаны предложения по срокам включения минеральных добавок в рацион поросят-сосунов. Изучено содержание Ca, P, Mg, Na, K, Fe, Cu, Zn, Mn в организме 1-, 14-, 28-, 40- и 60-суточных поросят. Абсолютное содержание элементов в организме поросят в течение первых двух месяцев жизни неуклонно возрастает, но равномерность их накопления в различные возрастные периоды неодинакова. Наиболее интенсивно депонируются Ca, P, Zn, Cl, Mg, Fe.

Введение

Значение минеральных веществ в питании свиней чрезвычайно велико, хотя они и не имеют энергетической ценности. Объясняется это большой ролью, которую играют минеральные элементы во всех процессах метаболизма. Особое практическое значение имеют кальций, фосфор, натрий, железо, медь, цинк, марганец, кобальт, йод, селен. Недостаток этих элементов в кормах компенсируют вводом в рацион химических соединений и природных источников (3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 14). В задачу данной работы входило: изучить минеральный состав свиного молока и организма поросят в первые два месяца жизни, обобщить данные литературы по потребности поросят в макро- и микроэлементах, установить обеспеченность их в основных элементах за счет естественных кормов.

Материал и методы

Опыт проведен в комплексе с другими лабораториями в виварии института на пяти свиноматках трехпородных гибридов (крупная белая х крупная черная х дюрок). В опыт были взяты свиноматки, имевшие не менее двух опоросов и не менее 9 поросят в предыдущем опоросе. Рацион был составлен по принятой технологии для промышленных свиноводческих комплексов. Молоко от свиноматок отбирали методом ручного выдаивания, без применения гормональных препаратов, на 1, 7, 14 и 28-е сутки после опоросов. Отъем поросят от маток проводили в возрасте 28 суток с последующим групповым содержанием. Кормили поросят по нормам в соответствии с возрастом стандартными комбикормами типа СК-11 и СК-16. Животных взвешивали индивидуально при рождении, в возрасте 14, 28, 40 и 60 суток. В эти же возрастные периоды проводили убой поросят по три головы (новорожденных – 5 голов до приема молозива). Была проведена обвалка 17 поросят, приготовлен гомогенат целого организма (без содержимого желудочно-кишечного тракта). В образцах кормов, молока, целого организма определяли содержание минеральных элементов (2).

Результаты и обсуждение

В начальный период роста молодняка свиней молоко является основным источником питательных и минеральных веществ, поэтому определение молочности маток, содержания минеральных элементов в молоке и потребности сосунов в основных макро- и микроэлементах является важным звеном в технологии кормления поросят-сосунов и отъемышей. Определенная нами молочность свиноматок (по разнице массы помета до и после сосания) в первые дни лактации составляла 2,8-3,0 кг молока в сутки, к концу 2-й и началу 3-й недели достигала максимума (5,2-6 кг/сут), а затем начинала снижаться (2,3-2,8 кг/сут на 28-е сутки лактации).

Данные по минеральному составу молока свиноматок в процессе лактации приведены в табл. 1. В первые 2-3 суток после опороса матка выделяет молозиво, которое отличается высоким содержанием сухого вещества (главным образом за счет белков) и

относительно низким содержанием золы по сравнению с молоком. Концентрация Ca, P, Mg, Na в молозиве существенно ниже, K, S, Fe, Cu, Zn, J выше, чем в молоке, а хлора и марганца почти одинакова. Содержание Ca, P, Mg в молоке достигает максимальной величины через 2 недели после опороса (а натрия – через 3 недели) и далее несколько снижается. Уровень электролитов (Na, K, Cl) и марганца в молоке свиноматок мало изменяется в ходе лактации, а серы и микроэлементов (кроме Mn и Mo) неуклонно падает.

Таблица 1. Минеральный состав свиного молока в процессе лактации (на 1 л)

Элементы	Лактация, суток				
	1	7	14	21	28
Сухое вещество, %	22,7	21,5	20,0	18,4	19,0
Зола, %	0,75	0,82	1,05	0,99	0,95
Кальций, ммоль	37,0	47,2	59,5	58,5	54,5
Фосфор, ммоль	32,6	38,8	43,3	39,4	35,5
Магний, ммоль	5,63	6,00	10,5	9,99	9,37
Натрий, ммоль	15,2	19,1	23,5	26,1	21,7
Калий, ммоль	38	не определяли	27	не определяли	31
Хлор, ммоль	26,5	27,4	24,5	25,1	27,4
Сера, ммоль	50	35	24	20	20
Железо, мкмоль	106	94	88	70	41
Медь, мкмоль	77	58	48	18	15
Цинк, мкмоль	257	240	72	61	44
Марганец, мкмоль	10,9	10,0	11,3	9,8	9,1
Йод, мкмоль	1,50	1,42	1,20	0,37	0,50
Кобальт, мкмоль	не определяли	не определяли	5,1	не определяли	3,1
Селен, мкмоль	не определяли	не определяли	0,63	не определяли	0,25
Хром, мкмоль	не определяли	не определяли	46,2	не определяли	39,6
Никель, мкмоль	не определяли	не определяли	34,0	не определяли	17,0
Молибден, мкмоль	не определяли	не определяли	0,42	не определяли	0,40

Содержание многих минеральных веществ, особенно макроэлементов, относительно постоянно в молоке при разном уровне потребления и может изменяться только при выраженном дефиците, причем снижение продуктивности обычно наступает значительно раньше. Тем не менее у лактирующих животных концентрация йода в молоке – наиболее яркий индикатор обеспеченности организма этим элементом (3, 5, 9, 12, 13, 15). Уровень железа и меди в свином молоке при их дефиците и умеренном избытке в рационе по существу не изменяется, однако при значительном избытке (в 10 раз и выше) концентрация их в молоке достоверно возрастает, но не так значительно и не пропорционально уровню в корме (4, 5, 13). Содержание цинка, марганца, йода, селена, молибдена, свинца, хрома, кобальта в свином молоке зависит от уровня в рационе и значительно возрастает при их избытке (5, 7, 12, 13, 15).

Нами обобщены современные данные литературы по потребности поросят в минеральных элементах (табл. 2).

Таблица 2. Потребность молодняка свиней в минеральных веществах (на 1 кг сухого вещества корма) (1, 4, 7, 8, 10-15).

Элементы	Живая масса поросят, кг		
	до 6	6-12	13-20
Кальций, г	10,7	9,3	8,5
Фосфор, г	7,3	6,5	6,0
Магний, г	0,60	0,62	0,65
Натрий, г	1,0	1,0	1,0
Калий, г	3,0	2,8	2,6
Хлор, г	0,8	0,8	0,8
Сера, г	1,25	1,15	0,9
Железо, мг	100	80	75
Медь, мг	10	8	8
Цинк, мг	40	40	55
Марганец, мг	3,5	3,5	4,0
Кобальт, мг	0,8	0,8	0,8
Йод, мг	0,3	0,3	0,3
Селен, мг	0,25	0,25	0,20
Молибден, мг	0,7	0,6	0,6

На основе данных таблиц 1 и 2 рассчитаны суточное потребление их поросятами 14- и 28-сут. возраста с молоком матери и суточная потребность в 14 элементах (табл. 3). Анализ данных табл. 3 показывает, что двухнедельные поросята с молоком матери получают достаточное количество многих элементов.

Таблица 3. Потребление минеральных элементов с молоком и потребность в них поросят-сосунов (на 1 голову в сутки)

Элементы	14-е сутки лактации			28-е сутки лактации		
	потреблено	потребность	баланс, % *	потреблено	потребность	баланс, раз**
Кальций, г	1,33	1,31	+	0,55	3,4	- 6,2
Фосфор, г	0,75	0,90	-17	0,28	2,4	- 8,6
Магний, г	0,14	0,07	+	0,06	0,24	- 4,0
Натрий, г	0,30	0,12	+	0,13	0,37	- 2,9
Калий, г	0,60	0,37	+	0,30	1,0	- 3,3
Хлор, г	0,49	0,10	+	0,25	0,30	- 1,2
Сера, г	0,43	0,15	+	0,16	0,42	- 2,6
Железо, мг	2,75	12,2	- 77	0,57	30	- 53
Мерь, мг	1,71	1,2	+	0,24	3,0	- 12

Цинк, мг	2,64	5,0	- 47	0,72	15	- 21
Марганец, мг	0,35	0,45	- 22	0,13	1,3	- 10
Кобальт, мкг	170	98	+	45	295	- 7
Йод, мкг	85	37	+	16	110	- 7
Селен, мкг	28	30	+	5	90	- 18

*отношение потребности к фактическому потреблению, %;

**кратность отношения потребности к фактическому потреблению, раз.

Небольшой дефицит наблюдается по фосфору и марганцу, умеренный – по цинку и значительный – по железу, что обнаруживается клинически (железодефицитная анемия). Однако к концу 4-й недели уже за счет одного материнского молока поросят не в состоянии покрыть потребности своего организма в минеральных элементах (кроме, очевидно, хлора). Особенно большой дефицит проявляется по Са, Р и всем микроэлементам, умеренный дисбаланс – в отношении магния, калия, натрия, серы (в 2,5-4 раза меньше нормы). Это означает, что, начиная с третьей недели жизни, поросята должны получать дополнительно к молоку матери специальные подкормки или комбикорма, и к моменту отъема должны потреблять их в необходимом количестве.

Данные по содержанию минеральных элементов в теле поросят разного возраста приведены в табл. 4, 5. В целом организме новорожденных поросят довольно низкая концентрация Са и Р, что связано со степенью минерализации костной ткани. Уже к месячному возрасту концентрация Са и Р в организме в основном стабилизируется. Содержание магния и цинка в организме новорожденных поросят достоверно ниже, чем у 2-недельных, однако в дальнейшем (после двух недель жизни) концентрация этих элементов снижается. Уровень железа, меди и марганца был наиболее высоким в целом организме новорожденных поросят. Концентрация железа и марганца была наименьшей в организме 28-сут поросят (снизилась в 3,3 и 3,7 раза по сравнению с новорожденными), а меди – у двухнедельных животных. В течение второго месяца жизни концентрация Fe, Cu, Mn неуклонно повышалась, что связано, очевидно, с условиями кормления поросят после отъема.

Таблица 4. Концентрация минеральных элементов в гомогенате целого организма поросят (на 1 кг воздушно-сухого обезжиренного вещества)

Элементы	Возраст поросят, сутки				
	новорожденные	14	28	40	60
Кальций, г	9,6±0,9	14,9±0,5	32,3±6,4	32,3±2,9	33,4±2,7
Фосфор, г	7,2±0,5	9,4±0,7	18,5±0,4	22,1±1,0	22,1±1,4
Магний, г	1,3±0,1	2,0±0,2	1,6±0,1	1,4±0,1	1,4±0,2
Натрий, г	11,5±0,8	7,3±0,1	7,1±0,4	7,0±0,2	8,6±0,1
Калий, г	12,3±0,7	8,4±0,2	9,3±0,1	9,9±0,5	11,5±0,3
Железо, мг	438±12	414±60	132±14	232±30	287±14
Медь, мг	8,8±0,2	4,9±1,1	6,9±0,5	6,5±0,4	8,8±0,4
Цинк, мг	91±5,0	118±4,1	107±3,6	53,6±1,0	99±3,9

Марганец, мг 15,3±0,8 8,2±1,3 4,1±0,4 5,3±1,0 6,1±0,4

Абсолютное содержание всех минеральных элементов в организме поросят на протяжении первых двух месяцев жизни неуклонно возрастало (табл. 5), но равномерность их накопления в различные возрастные периоды была неодинакова. Так, в течение первых 4 недель жизни живая масса поросят возрастала в 6,5 раза, а содержание минеральных элементов при этом увеличивалось следующим образом: Ca – в 23 раза, P – 20, Zn – 8,0, Mg – 7,0, Fe – 6,9, K – 5,0, Na – 4,6, Cl – 4,4, Cu – 3,9 и Mn – 3,1 раза. Следовательно, наиболее интенсивно депонировались остеотропные элементы, связанные с развитием костной ткани, и в основном в период с 14 до 28 суток. В это время поросята особенно нуждаются в дополнительных источниках Ca, P, Fe, Zn, Mg.

Таблица 5. Абсолютное содержание минеральных элементов в организме поросят в ранний период онтогенеза

Элементы	Возраст поросят, сутки				
	новорожденные	14	28	40	60
Живая масса, кг	1,1	4,5	7,2	9,3	15,1
Кальций, г	2,84	13,4	65,7	81,7	122
Фосфор, г	2,12	8,4	42,9	61,7	76,4
Магний, г	0,47	1,8	3,3	5,7	7,9
Натрий, г	2,10	6,6	9,6	15,2	24,7
Калий, г	2,80	9,3	14,1	19,8	36,0
Хлор, г	0,91	2,5	4,0	7,1	15,5
Железо, мг	41	170	282	375	579
Медь, мг	1,7	4,4	6,7	11,1	17,9
Цинк, мг	15,8	106	127	169	274
Марганец, мг	2,8	7,4	8,8	10,4	18,4

Во второй месяц жизни поросят живая масса увеличивалась в 2,1 раза, а общее содержание Cl в 3,9 раза, Cu – 2,7, Na и K – 2,6, Mg – 2,4, Zn – 2,2, Fe и Mn – 2,1, Ca – 1,9 и P – в 1,8 раза. Следовательно, наиболее интенсивно возрастал уровень электролитов, меди и магния за счет более быстрого формирования мягких тканей и внеклеточных жидкостей. Содержание остальных элементов, включая Ca и P, увеличивалось пропорционально живой массе. Таким образом, во второй месяц жизни поросят наиболее критическими (лимитирующими) элементами в их рационах следует считать Na, Cl, Cu, Mg, Zn.

В целом за 2 месяца жизни кратность увеличения абсолютного содержания минеральных элементов в организме поросят относительно увеличения их живой массы составила: Ca – 3,1, P – 2,6, Zn – 1,2, Cl – 1,24, Mg – 1,23, Fe – 1,03, K – 0,95, Na – 0,86, Cu – 0,77 и Mn – 0,48 раза (табл. 6).

Таблица 6. Кратность увеличения абсолютного содержания минеральных элементов в организме поросят относительно увеличения живой массы

Элементы	Возрастной период, сутки				
	1-14	14-28	28-40	40-60	1-60
Кальций	1,15	3,06	0,97	0,92	3,14
Фосфор	0,96	3,19	1,12	0,77	2,63

Магний	0,93	1,13	1,34	0,86	1,23
Натрий	0,76	0,94	1,22	1,01	0,86
Калий	0,81	0,94	1,09	1,12	0,95
Хлор	0,66	1,00	1,38	1,35	1,24
Железо	1,03	1,06	1,03	0,95	1,03
Медь	0,63	0,94	1,29	0,99	0,77
Цинк	1,63	0,75	1,03	1,00	1,26
Марганец	0,63	0,75	0,92	1,09	0,48

Выводы

1. Молозиво отличается высоким содержанием сухого вещества и сравнительно низким содержанием золы. Концентрация Ca, P, Mg, Na в молозиве существенно ниже, K, S, Fe, Cu, Zn, J выше, чем в молоке, а хлора и марганца почти одинакова. Содержание Ca, P, Mg в молоке достигает максимальной величины через 2 недели после опороса (а натрия – через 3 недели) и далее несколько снижается. Уровень электролитов (Na, K, Cl) и Mn в молоке свиноматок мало изменяется в ходе лактации, а серы и микроэлементов (кроме Mn и Mo) неуклонно падает.

2. Двухнедельные поросята с молоком матери получают достаточное количество многих минеральных элементов. Небольшой дефицит наблюдается по фосфору и марганцу, умеренный – по цинку и значительный – по железу, что клинически часто выражается в форме железодефицитной анемии. Однако к концу 4-й недели уже за счет одного материнского молока поросят не в состоянии покрыть потребность своего организма в минеральных элементах (кроме, очевидно, хлора). Особенно большой дефицит выявлен по Ca, P и всем микроэлементам, умеренный – по Mg, K, Na, S (в 2,5 раза меньше нормы). Следовательно, с третьей недели жизни поросята должны получать дополнительно к молоку матери специальные подкормки или комбикорма, а добавки железа им нужно давать уже с первых дней жизни.

3. Общее содержание всех минеральных элементов в организме поросят на протяжении двух первых месяцев неуклонно возрастает, но равномерность их накопления в различные возрастные периоды неодинакова. В течение первых 4 недель живая масса поросят возрастает в 6,5 раза, а содержание Ca, P, Zn, Mg и Fe в их организме за это время увеличивается соответственно в 23, 20, 8, 7 и 6,9 раза, что нужно учитывать в кормлении животных.

4. Во второй месяц жизни в организме поросят наиболее интенсивно накапливаются Cl, Cu, Na, K, Mg, Zn в результате более быстрого формирования мягких тканей и внеклеточных жидкостей. В целом за 2 месяца жизни кратность увеличения абсолютного содержания элементов в организме поросят относительно увеличения их живой массы составляет: Ca – 3,1, P – 2,6, Zn – 1,3, Cl и Mg – 1,2, Fe – 1,0, K – 0,95, Na – 0,9, Cu – 0,8 и Mn – 0,5 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурьянов А.М. Оптимизация микроминерального питания растущих свиней. Автореф. дисс. д.б.н. Саранск, 1995:40 с.
2. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у с.-х. животных. Боровск, 1986:103 с.
3. Кокорев В.А. Биологическое обоснование потребности супоросных

свиноматок в макроэлементах. Саранск, 1990:172 с.

4. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность и метаболизм минеральных веществ у молодняка свиней. Автореф. дисс...д.б.н., Боровск, 1989:37 с.
5. Кузнецов С.Г. Биохимические критерии обеспеченности животных минеральными веществами (обзор). С.-х. биология, 1991, 2:16-34.
6. Кузнецов С.Г., Дюкар И.В., Тимофеев Г.В. и др. Сапропели в кормлении птицы. Комбикормовая промышленность, 1996, 5:31-32.
7. Национальный исследовательский совет. Потребность свиней в питательных веществах. Перевод с англ. Киев, 1991:95 с.
8. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Ч.3. Свиньи и птица. Справочное пособие. М., 1993:176 с.
9. Слесарев И.К., Пилюк Н.В. Минеральные источники Беларуси для животноводства. Жодино-Минск, 1995:176 с.
10. Hollden P. Swine trace mineral requirements. Agric. Pract., 1987, 8, 7: 14-16.
11. Japanese feeding standart for swine. CALI, 1995:27 p.
12. Mahan D.C. Mineral nutrition of the sow: a review. J. Anim. Sci., 1990, 68:573-582.
13. Pallauf J. Spurenelemente sind fur das Schwein Lebensnotwendig. Schweinezucht und Schweinemast, 1989, 37, 10: 336-339.
14. Sommer W. Ferkelfutter richtig mineralisiert. Landw. Wochenbl. Westfalen-Lippe, 1988, 145, 7: 48-50.
15. The nutrient requirements of pigs. Commonw. Agric. Bur., Slough, 1981:307 p.

К ОБОСНОВАНИЮ ПИТАНИЯ ПОРОСЯТ В ПЕРИОД ПОДСОСА

В.И. Дудин, С.Н. Аитов, С.Д. Ковальский
Лаборатория витаминного питания

В сравнительном аспекте выявлены особенности обеспечения питательными веществами рациона поросят-помесей (кр.белая х кр.черная х дюрок) в период подсоса при использовании в эксперименте 3-х престартеров, скормливаемых с 10-ти до 28-дневного возраста. Престартеры имели одинаковые характеристики энергопротеинового питания, но были составлены из различных ингредиентов. Установлено, что поедаемость престартеров почти целиком зависит от их ингредиентного состава.

Введение

Использование при производстве свинины межпородных помесей ставит ряд неотложных проблем. Одной из главных является задача обеспечения за счет соответствующего питания высокой энергии роста гетерозисных поросят. Ранее мы установили, что 3-породные помеси требуют более высоких уровней в рационе белка и энергии, и в этой связи мы в первом приближении отработали основные характеристики кормления помесных поросят от отъема до 105-дневного возраста. При этом установили, что питание поросят в этот возрастной период в значительной мере определяет продуктивные качества свиней в конце откорма.

Логично предположить, что еще большее влияние на последующую продуктивность должно оказывать питание поросят в подсосный период. В отечественной науке и практике эта проблема глубоко не прорабатывалась. В этой связи в производственных условиях подкормка в молочный период стартерными комбикормами применялась в целях приучения поросят к их поеданию после отъема. Между тем, речь должна идти о научно-обоснованном питании

поросят-сосунов, как части технологии производства высококачественной свинины.

Представленная работа посвящена начальным этапам исследований, которые на конечном этапе приведут к созданию биологического обоснования для конструирования эффективных престартерных кормосмесей, отличающихся высокой биологической полноценностью для поросят, недорогих и состоящих из доступных ингредиентов.

Материал и методы

Экспериментальная часть выполнена на 2-породных свиноматках (кр. белая х кр. черная), покрытых хряком породы дюрок. В первом опыте участвовало 5 свиноматок, имевших не менее 2-х опоросов и количество поросят в предыдущем опоросе не менее 9-ти. Кормление поросят осуществляли стандартными кормосмесями. Пробы молока брали в день опороса, а затем на 14, 21 и 28 дни лактации. Молочную продуктивность определяли методом взвешивания в указанные возрастные периоды с последующими общепринятыми расчетами.

Во втором опыте на тех же свиноматках испытывали в качестве престартеров-заменителей молока 3 кормосмеси (табл. 1). Кормосмеси предлагали поросятам с 10-ти до 28-дневного возраста одновременно на выбор при точном учете потребления каждого престартера ежедневно. Отдельно в третьем опыте методом групп провели сравнение престартеров А1 и СК-3.

Таблица 1. Рецептура престартеров для подкормки поросят во время подсоса с 10-ти до 28-дневного возраста (%)

Ингредиенты	Престартеры			
	А1	А2	А3	СК-3
Кукуруза	6,8	16,5	16,0	12,0
Ячмень	-	-	-	36,7
Пшеница	-	2,2	-	12,0
Крупа манная	-	-	6,0	-
Крупа рисовая	-	-	6,0	-
Овсяные хлопья	36,0	14,0	14,0	-
Крупа ячневая	-	11,6	-	-
Шрот соевый	11,0	18,5	18,5	-
Шрот п/с	-	7,0	7,0	20,0
Мука рыбная	7,0	7,0	8,0	-
Мука м/к	-	-	-	7,0
Сыворотка сухая	-	-	1,3	-
Обрат сухой	32,0	16,0	16,0	8,0
Жир растительный	5,2	5,0	5,0	3,0
Дикальцийфосфат	0,8	1,0	1,0	-
Соль	0,2	-	-	0,3
Мел	-	0,2	0,2	-
Премикс КС-3	1,0	1,0	1,0	1,0
В 1кг престартера содержится:				
обменной энергии, МДж	13,8	13,77	13,53	12,08
сырого протеина, г	239,0	240,9	244,1	201,7
сырого жира, г	92,8	73,1	72,8	62,0
сырой клетчатки, г	13,0	28,8	27,1	57,0
кальция, г	12,8	12,5	19,3	9,7
фосфора, г	11,40	11,2	14,49	8,6
лизина, г	17,2	15,7	16,1	12,1
метионина+цистина, г	7,3	8,0	8,3	7,3

В молоке свиноматок и в кормах определяли протеин (3), общие липиды (2), лактозу (1). Полученные результаты использовали при расчете обеспеченности поросят питательными веществами и энергией за счет молока и за счет престартеров.

Результаты и обсуждение

Молочная продуктивность и качество молока свиноматок представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Динамика молочной продуктивности свиноматок в период лактации

Периоды лактации	Количество молока, кг	Количество молока на 1 поросенка в сутки, г
1-7суток	33,8±2,10	560,2±21,9
8-14суток	57,0±3,95	904,4±41,6
15-21суток	39,6±3,20	627,7±27,5
22-28суток	34,9±2,40	554,4±22,4

Как видно, того количества материнского молока, которое обычно потребляют поросята для обеспечения высоких приростов живой массы, явно недостаточно. В этой связи, еще раз подчеркивается настоятельная необходимость разработки принципов питания поросят на подсосе для целей конструирования конкурентноспособных престартеров. Это особенно важно для производственных условий при использовании маломолочных пород, отличающихся другими ценными качествами (жизнеспособность помета, высокая энергия роста). При этом, положение усугубляется еще и тем, что к 28-дневному возрасту падает не только молочность свиноматок, но также ухудшается качество молока.

Таблица 3. Динамика концентрации протеина, общих липидов и лактозы в молоке свиноматок в процессе лактации (г%)

Время взятия проб, сутки	Протеин	Общие липиды	Лактоза
1	14,3±1,0	7,1±0,3	6,8±0,5
7	4,3±0,6	7,9±1,0	7,4±1,3
14	4,1±0,5	10,8±0,7	7,6±0,3
21	5,6±1,2	8,8±0,8	6,7±0,3
28	5,1±0,9	7,8±1,0	4,9±1,4

Общее потребление испытуемых престартеров существенно зависит от лактационной кривой и при ее спаде носит линейный характер с весьма заметным подъемом (рис. 1), что свидетельствует о хорошей адекватности выбранных характеристик питательности престартеров.

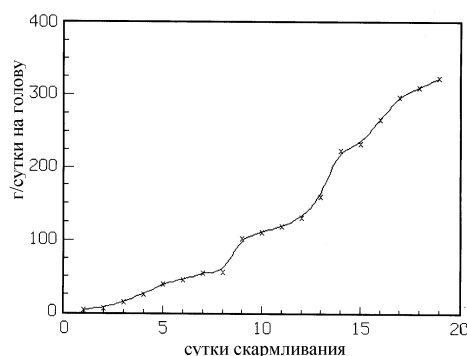


Рис. 1. Общее потребление престартеров подсосными поросятами.

Если рассматривать индивидуально, то по поедаемости поросятами лучшим оказался престартер А1 (рис. 2) и его можно для дальнейшего совершенствования рецептуры считать эталонным.

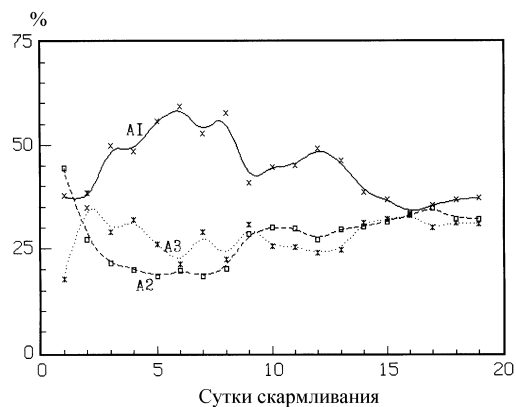


Рис. 2. Потребление престартеров подсосными поросятами, в % от их общего потребления.

Более того, в случае ослабленных пометов, поросята предпочитают потреблять престартер A1 (рис. 3). Это обстоятельство позволяет уже сейчас рекомендовать рецепт престартера A1 для использования в условиях малой молочности или болезни подсосных свиноматок. По сравнению с технологическим заменителем свиного молока (Gi & Gi), предназначенным для сверххранного отъема или снижения падежа и включающим 67% сухого обрата и 19,5% топленого сала, престартер A1 выглядит более предпочтительным и не требует включения эмульгаторов.

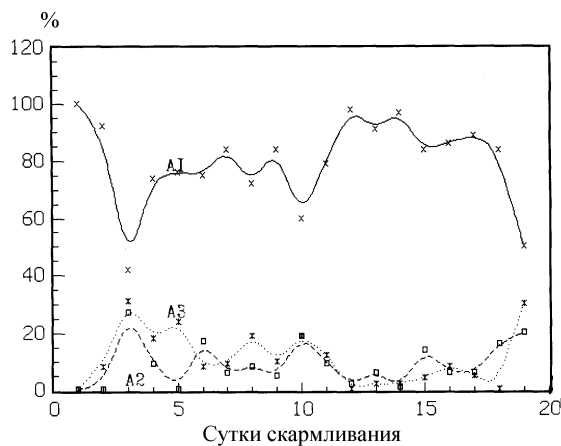


Рис. 3. Потребление престартеров подсосными поросятами ослабленного помета, в % от их общего потребления

Согласно полученным результатам (рис. 4), протеин престартера лишь к 3-ей неделе подсосного периода способен конкурировать по количеству с протеином материнского молока вследствие спада лактации. С усилением потребления престартера, особенно к отъему, протеиновое питание поросят в основном определяется подкормкой.

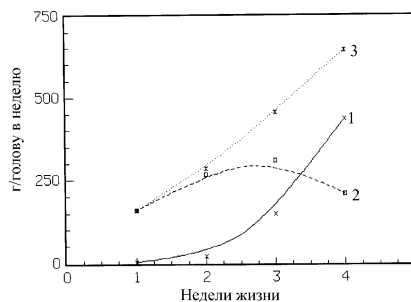


Рис. 4. Потребление протеина престартеров (1), материнского молока (2) и их суммы (3) поросятами в подсосный период

Липидное питание подсосных поросят, по сравнению с протеиновым имеет особенности. Доля кормовых липидов, даже к отъему, не превышает половины липидов, поступающих с материнским молоком (рис. 5). Если липиды рассматривать не только в качестве источников энергии, но и как поставщиков биологически активных веществ липидной природы, в этом смысле престартеры являются более полноценными, чем материнское молоко. В первую очередь это касается линолевой кислоты и жирорастворимых витаминов, уровень которых в престартерах гораздо более высок и легко управляем. Помимо этого, следует учесть также, что престартеры несут с собой значительное количество углеводов и поэтому энергообеспечение метаболизма за счет престартеров имеет гораздо большее значение, чем это представляет картина липидного питания подсосных поросят.

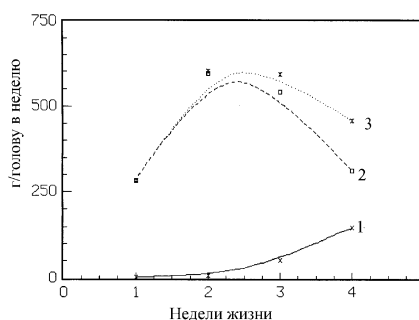


Рис. 5. Потребление липидов престартеров (1), материнского молока (2) и их суммы (3) поросятами в подсосный период.

В настоящее время в производстве в качестве престартера рекомендован комбикорм типа СК-3 (табл.1) с целью предотъемного приучения поросят к поеданию растительных кормов. По характеристикам питательности он явно уступает зарубежным рекомендациям, которым мы придерживались при конструировании экспериментальных престартеров.

В зоотехнических наблюдениях установлено (рис. 6), что поросята, получавшие технологический престартер начинают им интересоваться на 2-3 дня позднее, чем поросята, которым предлагался престартер А1. При этом, реакция на него, наступившая после этого, была явно негативной и выражена она была в последующем снижении потребления комбикорма. Лишь к 25-му дню жизни поросят потребление технологического престартера начинает резко возрастать, но все же не достигает величин, характерных для престартера А1. В это время потребление престартера А1 практически не изменяется, что свидетельствует о достижении некоего максимума потребления. Вполне возможно, что этот максимум соответствует пределу потребления комбикорма поросятами. В этом убеждает также характер кривой потребления престартера А1, не имеющей спада в 21-23 – суточном возрасте, такого, какой имеет потребление технологического престартера. В соответствии с различиями между престартерами по потреблению корма и в связи с тем, что престартер А1 богаче в отношении питательных веществ, поросята еще более резко отличались по потреблению протеина и особенно по потреблению липидов, что явно недопустимо при налаживании экономически эффективного производства высококачественной свинины.

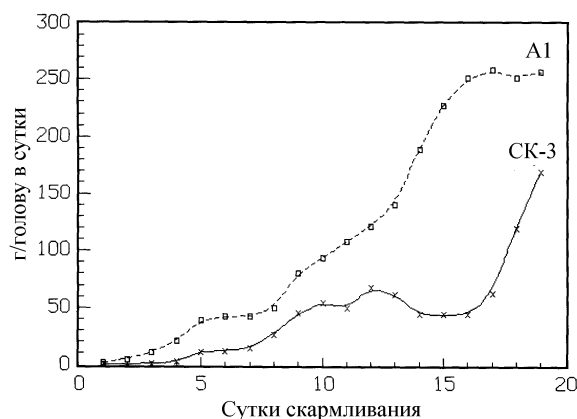


Рис.6. Потребление престартеров A1 и СК-3 подсосными поросятами.

В целом, результаты исследований подчеркивают большую важность при конструировании престартеров-заменителей свиного молока определенного выбора кормов. Это, отнюдь, не означает, что речь идет о дорогостоящих ингредиентах, так как в экспериментах престартер A1 сравнивали с престартерами такой же питательности с не менее дорогостоящими ингредиентами. В этой связи в дальнейшем необходимо вести поиск критериев, характеризующих физиологическую адекватность для подсосных поросят различных видов кормов.

В качестве первого критерия можно предположить субстратное сродство протеина престартеров с ансамблем пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта. Скорее всего протеины молока являются здесь наиболее подходящими субстратами для гидролиза. Вместе с тем, молоко свиней по ряду параметров заметно отличается от молока коровы, тем более, что в престартерах применяется сухое обезжиренное коровье молоко, которое подвергалось экстремальным физическим воздействиям и, как субстрат для пищеварительных систем подсосных поросят оно явно хуже, чем свежее молоко свиноматки.

В качестве критерия, более внимательно следует рассмотреть уровень клетчатки в престартере. Здесь возникает необходимость в разработке способов улучшения проницаемости кормовых масс для пищеварительных ферментов. Возможно, что в чисто молочном питании заметную роль играет плазминовая система молока, способствующая разрушению сгустков, а в результате повышению доступности протеинов для гидролиза. В случае престартеров, образования сгустков можно избежать путем применения жидкого типа кормления. В настоящее время широко распространен сухой тип кормления, поэтому важным является изыскание путей повышения мацеруемости кормовых масс в желудочно-кишечном тракте поросят в период не только подсоса, но и после отъема, где проблема стоит еще острее.

Выводы

1. При конструировании престартеров-заменителей свиного молока для поросят на подсосе превалирующее значение имеет конкретный выбор ингредиентов.
2. Престартер, включающий в качестве основы 36% овсяных хлопьев и 32% сухого обезжиренного молока может быть использован в кормлении поросят на подсосе, особенно при малой молочности свиноматок или больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. F.F.Feitasa Teles. Rapid method determination of lactose. J. Dairy Sci., 1978, 64:506-508.
2. Folch S., Lees M., Sloane Staley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tis sue. J. Biol. Chem., 1957, 226:497-509.
3. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Количественное определение белка по методу Лоури. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975, 75.

ДИНАМИКА РОСТА И РАЗВИТИЯ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА, МЫШЦ И СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ У ПОРОСЯТ В ОНТОГЕНЕЗЕ И В СВЯЗИ С РАЗЛИЧНЫМИ УСЛОВИЯМИ ПИТАНИЯ

Е.В. Пьянкова

Лаборатория витаминного питания

В эксперименте на поросятах от рождения до 105-дневного возраста исследована возрастная динамика аминокислотного состава стенки тонкого кишечника и свободных аминокислот в плазме крови. В работе приведены сведения по первой лимитирующей аминокислоте лизину и разветвленным аминокислотам (валин, лейцин, изолейцин), являющимися факторами стимуляции синтеза белков в мышцах. Обнаружены существенные изменения в содержании аминокислот в стенке тонкого кишечника в онтогенезе и в связи со сроками отъема поросят, в отличие от фонда свободных аминокислот в плазме крови, который при четко выраженной возрастной динамике к 105-дневному возрасту мало зависел от сроков отъема. Обсуждается вопрос о взаимосвязи этих параметров с резкими различиями в массе длиннейшей мышцы спины и четырехглавой мышцы бедра в связи со сроками перехода на безмолочное питание.

Введение

Промышленная технология производства свинины предусматривает применение раннего отъема поросят, но последствия этого технологического приема в деталях до сих пор не выяснены. С точки зрения физиологии этот прием (перевод на грубый корм) может быть оценен как неблагоприятный для процесса пищеварения, вследствие особенностей молочного питания. В то же время большинство раноотнятых поросят компенсирует депрессию роста в последующий период выращивания. Известно, что послеотъемный стресс вызывает повышенный отход поросят, резкое увеличение использования медикаментозных средств для поддержания здоровья животных. В связи с прогнозируемыми нарушениями в системе пищеварения в результате раннего отъема поросят целесообразным является исследование функции стенки тонкого кишечника.

Рост кишечника в послеутробный период имеет ряд особенностей. Особенно высока интенсивность его роста (как по весу, так и по размерам) у поросят до двухмесячного возраста. Темпы удлинения кишечника у поросят за этот период составляют около 20 см в сутки (6), общая длина кишечника увеличивается на 11,5 м, а масса почти в 25 раз. Интенсивность роста кишечника значительно превышает интенсивность роста всего организма поросят. В этой связи можно предполагать, что сроки перевода поросят на безмолочное питание прежде всего скажутся на функциональном состоянии стенки тонкого кишечника. При этом стенка кишечника не может быть рассмотрена как функционально самостоятельная, она находится под регуляцией со

стороны внутренней среды организма. В литературе есть сведения, что жирнокислотный состав стенки корректируется внутренней средой организма за счет обратного транспорта (9). Подобные результаты получены и в отношении обратного транспорта некоторых незаменимых аминокислот, вплоть до их выбросов в просвет кишечника в составе белков (3, 8). На фоне существующего метаболического диалога между внутренней средой организма и стенкой тонкого кишечника значительный интерес представляет взаимосвязь фонда свободных аминокислот плазмы крови, как показателя активности белкового обмена, и аминокислотного состава стенки, как регулятора усвоения белковых компонентов и, возможно, как демпфера, обеспечивающего гомеостаз этих веществ. При этом важнейшим моментом является выяснение последствий наложения изменений в питании на возрастную динамику процессов использования аминокислот в межклеточном обмене. В связи с тем, что большое значение приобретает поиск путей повышения мясности туши, имеет смысл проследить в онтогенезе за формированием фонда разветвленных аминокислот, как стимуляторов белкового синтеза в мышечных тканях (5).

Материал и методы

В условиях вивария института провели опыт на поросятах с момента рождения до 105-дневного возраста. Поросят получали от свиноматок – сестер (крупная белая х ландрас), которых случали с хряком породы ландрас. Кормление, уход и содержание подсосных свиноматок осуществляли по схеме, рецептуре и нормам, рекомендованным для свиноводческих хозяйств промышленного типа. Было сформировано три группы животных: 1-я со сроком отъема в 60 дней, 2-я – 40 дней и 3-я – 30 дней. По возрасту, полу и живой массе поросята разных групп были аналогами. Каждого поросенка взвешивали индивидуально при рождении, в 15, 30, 40, 60 и 105 дней. С 10-дневного возраста поросят всех групп начали подкармливать комбикормом УСК-3-4, а с 61- и до 105-дневного возраста поросята получали комбикорм типа СК-5 (табл. 1).

Таблица 1. Состав комбикормов в период выращивания, %

Ингредиенты	Комбикорм		В 1 кг комбикорма содержится:		
	УСК-3-4	СК-5			
Кукуруза	12,0	27,0	Обменной энергии, Мдж	12,83	12,39
Ячмень	36,7	29,2	«» Ккал	3063,8	2934,8
Пшеница	12,0	15,0	Сырого протеина, г	192,2	167,0
Соевый шрот	15,0	10,0	Сырого жира, г	54,6	47,13
Подсолнечн. шрот	4,0	3,0	Клетчатки, г	36,3	47,18
Рыбная мука	3,0	3,0	Кальций, г	10,46	8,85
Сухой обрат	8,0	2,0	Фосфор, г	8,37	7,87
Дрожжи	-	3,0	Лизин, г	11,12	9,15
Травяная мука	3,0	3,0	Метионин+ цистин, г	6,42	5,77
Жир кормовой	3,0	2,0			
Монокальций фосфат	1,0	1,0			
Соль	0,3	0,3			
Мел	1,0	1,0			
Премикс КС-3	1,0	0,5			

В кормлении поросят использовали премикс КС-3, усовершенствованный лабораториями минерального и витаминного питания ВНИИФБиП с.-х. животных. Содержание и кормление молодняка было групповое. В первую послеотъемную неделю поросят всех групп кормили четыре раза, причем количество задаваемого корма увеличивали ежедневно, во вторую неделю – три раза (но количество корма увеличивали по двухдневкам), в последующем – два раза

(количество корма увеличивали еженедельно). Животные всех групп получали одинаковое количество (по весу) кормов. Убой животных проводили сразу после рождения (до сосания), затем в 15, 30, 40, 60 и 105 дней по 5 животных из каждой группы. После каждого убоя производили обвалку. Делали промеры и взвешивания отдельных органов. В момент убоя брали кровь и отбирали по 10 фрагментов тонкого кишечника от каждого поросенка для исследования на содержание общих аминокислот (с предварительным кислотным гидролизом 6н HCl и последующим разделением на аминокислотном анализаторе), а плазму крови – на содержание свободных аминокислот.

Результаты и обсуждение

Как показали исследования (табл. 2), заметные отличия между группами по живой массе существовали только в 60-дневном возрасте.

Таблица 2. Изменение живой массы поросят в онтогенезе и в связи со сроками отъема

Возраст животных, дни	Живая масса, кг	Прирост массы, кг	Среднесуточный прирост, г
1 группа (отъем в 60 дней)			
1	1,5±0,02		
15	4,7±0,06	3,21±0,34	214,22±7,01
30	6,7±0,30	1,92±0,26	147,43±14,06
40	10,2±0,50	3,52±0,56	292,91±32,26
60	18,1±0,28	7,85±0,31	392,50±15,93
105	39,7±1,17	21,62±0,92	480,4±20,38
2 группа (отъем в 40 дней)			
1	1,5±0,02		
15	4,7±0,06	3,21±0,34	214,22±7,01
30	6,7±0,30	1,92±0,26	147,43±14,06
40	10,2±0,50	3,52±0,56	292,91±32,26
60	15,1±0,62	5,05±0,70	252,50±17,38
105	39,6±1,50	24,59±0,96	546,44±32,49
3 группа (отъем в 30 дней)			
1	1,5±0,02		
15	4,7±0,06	3,21±0,34	214,22±7,01
30	6,7±0,30	1,92±0,26	147,43±14,06
40	9,1±0,43	2,34±0,29	195,00±5,13
60	15,6±0,48	6,49±0,62	324,50±9,24
105	39,3±1,82	23,77±1,35	528,22±21,38

Наибольшей живая масса в этом возрасте была у поросят традиционного срока отъема (1-я группа). В возрасте 40 дней среднесуточный прирост массы у поросят 1-й и 2-й групп превышал таковой у молодняка 3-й группы, отнятого в 30-дневном возрасте, на 33,43%, что объясняется влиянием срока отъема. К 60-дневному возрасту среднесуточный прирост по этой же причине снизился уже у поросят 2-й группы по сравнению с животными 1-й и 3-й групп на 35,7 и 22,2% соответственно. К 105-дневному возрасту этот показатель снизился у поросят 1-й группы по сравнению с животными 2-й и 3-й групп на 12,09 и 9,1% соответственно. Таким образом, независимо от того, в каком возрасте был проведен отъем поросят, сразу после этого поросята испытывали дискомфорт, что особенно заметно по результатам среднесуточных приростов живой массы. В то же время, несмотря на колебания живой массы поросят разных групп в течение опыта, в целом же к 105-дневному возрасту эти различия нивелировались и животные всех трех групп имели практически одинаковую массу.

По результатам контрольных убоев поросят (табл. 3) также можно видеть последствия сроков отъема поросят. Если судить по выходу мяса у поросят 2-й группы, то можно заключить, что отъем в 40-дневном возрасте не является лучшим. Эти показатели у поросят раннего и традиционного отъема были практически равными. Исходя из этого возникло предположение, что неблагоприятные последствия отъема в 40 дневном возрасте каким-то образом связаны с возрастными особенностями в обмене аминокислот, о чем будет упомянуто ниже. По-видимому, отъем в любом возрасте связан с некоторым повышением жиротложения в тушке (табл. 3), возможно, как наиболее раннее следствие нарушения функции стенки тонкого кишечника.

Таблица 3. Результаты контрольных убоев поросят в онтогенезе и в связи со сроками отъема

Гр.	Возраст, дни					
	1	15	30	40	60	105
Вес тушки (кг)						
1	1,15±0,08	3,08±0,34	4,21±0,46	6,62±0,28	9,98±0,61	25,95±0,68
2				6,62±0,28	8,86±1,43	23,47±1,32
3				4,87±0,44	9,44±0,58	25,14±1,24
Мясо (кг)						
1	0,49±0,04	1,44±0,14	2,16±0,29	3,64±0,15	5,76±0,45	13,13±0,36
2				3,64±0,15	4,91±0,78	11,44±0,43
3				2,65±0,25	5,07±0,30	12,93±0,48
Кости (кг)						
1	0,39±0,03	0,74±0,06	0,74±0,04	1,11±0,04	1,90±0,12	3,71±0,10
2				1,11±0,04	1,50±0,23	3,88±0,19
3				1,15±0,17	1,71±0,05	3,98±0,23
Кожа (кг)						
1	0,24±0,02	0,42±0,05	0,50±0,05	0,66±0,02	1,19±0,09	3,32±0,22
2				0,66±0,02	1,07±0,12	2,87±0,20
3				0,61±0,06	1,20±0,12	2,88±0,11
Жир (кг)						
1	0,02±0,00	0,44±0,05	0,80±0,09	1,21±0,06	1,13±0,08	5,79±0,20
2				1,21±0,06	1,37±0,22	5,28±0,30
3				0,47±0,04	1,46±0,09	5,35±0,28

Изменения длины и массы тонкого кишечника поросят (табл. 4) оказались характерными для различных сроков отъема. Ранний отъем поросят ведет к увеличению этих показателей, по сравнению с традиционным отъемом. Отъем в 40-дневном возрасте также усиливал рост тонкого кишечника и здесь не отмечено никаких особенностей, по сравнению с ранним отъемом поросят. Интенсивность роста тонкого кишечника (как по длине, так и по массе) наиболее высокой была в течение первого месяца жизни, особенно во второй его половине (масса увеличивалась практически в 5 раз, длина – на 5,5 м). В следующем периоде интенсивность нарастания массы и длины уменьшалась, затем опять возрастала, однако в разных группах по разному в зависимости от сроков отъема, т.е. на возрастные изменения накладываются изменения, вызванные отъемом поросят. Сразу после отъема в 30 и 40 дней отмечалась тенденция к уменьшению интенсивности нарастания массы (после отъема в 60 дней такого не наблюдалось), а затем – достаточно заметное увеличение (особенно явное в 3-й группе), и в 105 дней масса тонкого кишечника поросят 2-й и 3-й групп была больше массы животных 1-й группы. Что касается длины, то интенсивность ее

нарастания увеличивается сразу после отъема и к 105 дням разница в длине кишечника поросят 1-й и остальных групп составляла около 9%.

Таблица 4. Длина и масса тонкого кишечника в онтогенезе и в связи со сроками отъема поросят

Гр.	Возраст, дни					
	1	15	30	40	60	105
Масса тонкого кишечника (г)						
1	62,52±5,0	122,42±10,37	304,69±45,35	374,04±27,98	492,46±23,35	918,84±32,40
2					458,33±62,81	998,44±51,34
3				368,82±22,50	670,48±46,24	962,8±35,68
Длина тонкого кишечника (см)						
1	449,9±14,43	685,2±52,17	991,2±55,46	1013±12,65	1056,6±40,7	1577,6±46,0
2					1107,0±38,6	1724,8±60,8
3				1049,2±32,81	1297,6±86,3	1713,3±58,8

Видимо, в организме после отъема возникает потребность в более значительном увеличении площади поверхности кишечника и к 105 дням эта проблема остается (кстати, отмечено, что у поросят 2-й группы в период от 60 до 105 дней, а у поросят 3-й группы от 40 до 60 дней масса кишечника увеличивается с большей интенсивностью, чем длина – видимо, в данные возрастные сроки на потребность в увеличении площади поверхности кишечника организм отвечает не столько его удлинением, сколько изменениями в строении (увеличение складок и т.д.).

При сопоставлении данных по росту кишечника с живой массой поросят выявляется, что, несмотря на выравнивание массы тела поросят разных групп к 105 дням, разница в массе и размерах тонкого кишечника остается. Поскольку в послеотъемный период все основные биохимические изменения в конечном итоге начинаются с пищеварительного тракта, где происходят основные процессы расщепления пищевых полимеров, на него и было обращено особое внимание. В послеотъемный период на фоне интенсивного роста кишечника в нем происходят морфологические и биохимические изменения, о которых мало что известно в связи со сроками отъема. Поэтому была сделана попытка проследить содержание аминокислот в кишечной стенке в зависимости от возраста и сроков отъема и сопоставить его с содержанием свободных аминокислот в плазме крови. Процессы превращения и всасывания аминокислот нельзя проследить только по содержанию их в крови, поскольку, как было показано ранее (4, 7) в общий кровоток их поступает только немногим более 20% от общего потока. Отсюда следует, что анализ свободных аминокислот крови лишь незначительно отражает общую картину всасывания этих веществ. Намного информативнее было бы исследовать кровь портальной вены, что предпринималось ранее различными исследователями (1, 2, 7). Для выяснения динамики кругооборота аминокислот между кровью и полостью кишечника использовали методику измерения разницы концентраций в крови большого круга кровообращения и воротной вены. Однако таким образом невозможно определить величину ретенции в кишечной стенке аминокислот, поступающих из просвета кишечника или из артериальной крови.

Как уже упоминалось, особое внимание нами уделено аминокислотам – стимуляторам синтеза мышечных белков – валину, лейцину, изолейцину, а также лизину, который является в питании свиней первой лимитирующей аминокислотой. Ее содержание в стенке тонкого кишечника у поросят в течение первого месяца жизни резко уменьшается (рис. 1а).

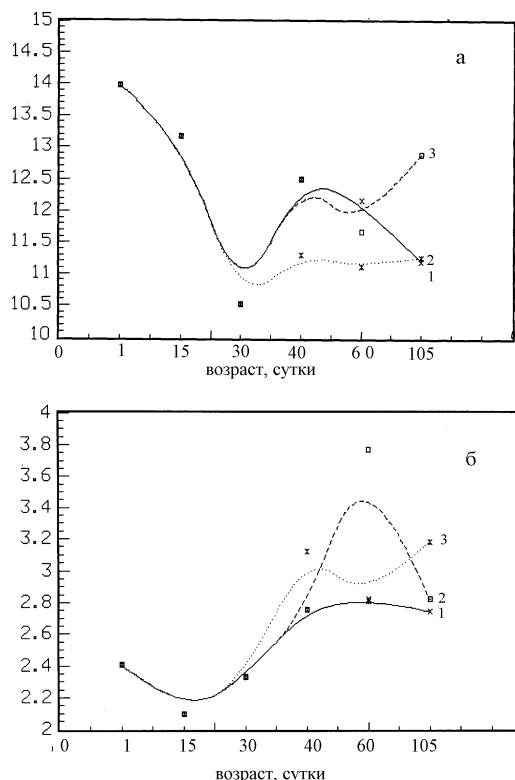


Рис. 1. Содержание общего лизина в стенке тонкого кишечника (а) и свободного лизина в плазме крови (б) у поросят в связи с возрастом и сроками отъема

По оси ординат: а) общий лизин, мг/г сырой ткани; б) свободный лизин, мг%.

1 – 1-я группа (отъем в 60 дней); 2 – 2-я группа (отъем в 40 дней); 3 – 3-я группа (отъем в 30 дней).

При этом традиционный отъем связан с увеличением концентрации лизина в стенке тонкого кишечника к 40-дневному возрасту с последующим спадом. При раннем отъеме такого пика не отмечается, а отъем в 40-дневном возрасте приводит к подъему концентрации лизина в стенке до значений самых высоких в 105-дневном возрасте. Параллельно концентрация свободного лизина в плазме претерпевала несколько иные изменения. Кривая изменений концентрации свободного лизина в плазме (рис. 1б) лишь напоминает кривую содержания в стенке тонкого кишечника, а пик концентрации свободного лизина в плазме наблюдается у поросят, отнятых от матерей раньше других. В целом создается впечатление, что при раннем отъеме лизин из стенки тонкого кишечника либо мобилизуется более интенсивно, чем при традиционном отъеме, либо снижается обратный транспорт аминокислоты в стенку. Во всяком случае, период от 30 до 40-дневного возраста в отношении концентрации лизина является особенным. Возможно, что он связан со спадом лактации у свиноматок, так что в организме поросят наступает критическая ситуация, побуждающая к усиленному потреблению подкормки.

В связи с тем, что мы исследовали возрастные изменения аминокислотного состава стенки тонкого кишечника поросят в период

интенсивного роста, когда в основном реализуются задатки мясных качеств, в данной работе акцент сделан на разветвленных аминокислотах, которые стимулируют белковый синтез в мышцах. Как оказалось (рис. 2), для всех этих аминокислот существует типичная возрастная динамика концентрации в стенке тонкого кишечника и практически однотипная реакция на срок отъема.

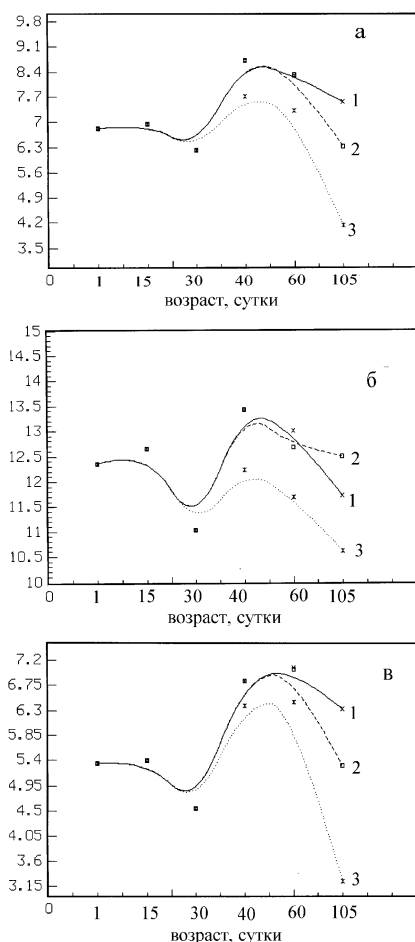


Рис. 2. Содержание общего валина (а), лейцина (б) и изолейцина (в) (мг/г сырой ткани) в стенке тонкого кишечника поросят в связи с возрастом и сроками отъема

1 - 1-я группа (отъем в 60 дней); 2 - 2-я группа (отъем в 40 дней); 3 - 3-я группа (отъем в 30 дней).

Как и для лизина, характерным оказался максимум в 40-60-дневном возрасте. При этом примечательно, что в отличие от тенденций нивелировки последствий отъема по живой массе, стенка тонкого кишечника реагирует очень резко и, пожалуй, эта реакция столь чувствительна, что может оказаться тестовой при оценке физиологической реакции организма на те или иные воздействия. Во всех случаях ранний отъем приводит к резкому уменьшению концентрации разветвленных аминокислот в стенке тонкого кишечника к 105-дневному возрасту. Здесь можно прогнозировать ряд неблагоприятных последствий раннего отъема в отношении функции стенки тонкого кишечника.

В то же время, в какой-то мере обнаруженный факт может объясняться повышенной мобилизацией аминокислот из стенки тонкого кишечника. Однако это объяснение не может быть исчерпывающим в связи с результатами изучения возрастных изменений концентрации свободных аминокислот в плазме крови (рис. 3).

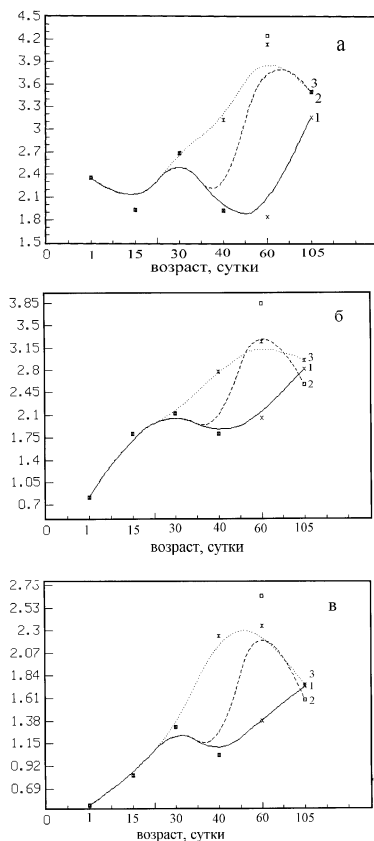


Рис. 3. Концентрация свободного валина (а), лейцина (б) и изолейцина (в) (мг%) в плазме крови поросят в связи с возрастом и сроками отъема

1 - 1-я группа (отъем в 60 дней); 2 - 2-я группа (отъем в 40 дней); 3 - 3-я группа (отъем в 30 дней).

Этот показатель имеет те же особенности, какие отмечены для стенки тонкого кишечника в связи со сроками отъема, а именно – наличие максимума в 40-60-дневном возрасте. При этом обращает на себя внимание отсутствие такого максимума в концентрации свободных аминокислот в плазме у поросят традиционного отъема. В целом же в связи с отъемом поросят изменения в концентрации свободных аминокислот в плазме крови идут впереди изменений их содержания в стенке тонкого кишечника и выражаются в активизации белкового обмена через фонд свободных аминокислот в крови практически сразу же после отъема, но к 105-дневному возрасту различия в концентрации свободных аминокислот в плазме нивелируются, а в стенке тонкого кишечника, наоборот, усиливаются. Без сомнения, несмотря на то, что здесь можно предполагать существование взаимосвязи между активизацией фонда свободных аминокислот и аминокислотным составом стенки тонкого кишечника, применение раннего отъема не может быть расценено как безвредное для функции тонкого кишечника, если иметь в виду отдаленные последствия и более тонкие критерии, чем хозяйственно-полезные признаки. В ряде случаев возможны такие изменения в функции тонкого кишечника, которые ведут к нарушению всасывания питательных веществ. Известны случаи, когда вследствие продолжительного голодания

триацилглицериды проходили стенку тонкого кишечника, не подвергаясь предварительному гидролизу в просвете кишки.

Еще одним фактом, обращающим на себя серьезное внимание, является различная интенсивность роста динамической (четырёхглавая мышца бедра) и статической (длиннейшая мышца спины) мышечной ткани в зависимости от сроков отъема (табл. 5).

Таблица 5. Изменения массы длиннейшей мышцы спины и четырёхглавой мышцы бедра у поросят в онтогенезе и в связи со сроками отъема

Гр.	Возраст, дни					
	1	15	30	40	60	105
Масса длиннейшей мышцы (г)						
1	20,5±2,9	54,4±5,9	119,44±16,13	143,8±13,32	212,6±4,12	831,0±0,03
2					206,67±49,78	581,0±43,08
3				105,4±12,6	229,0±17,6	614,0±44,7
Масса четырёхглавой мышцы (г)						
1	15,7±1,35	62,6±7,3	85,06±22,63	141,4±13,3	175,2±18,8	361,4±32,4
2					153,33±23,33	424,0±13,17
3				109,6±16,14	215,0±16,13	502,0±23,96

В основном эти различия происходят между 60 и 105-дневным возрастными сроками. При традиционном отъеме усиливается рост длиннейшей мышцы спины и уменьшается рост четырёхглавой мышцы. Снижение отъемного возраста ведет к обратному эффекту. В этой связи можно предполагать изменение конституции животных в пользу поросят традиционного отъема, причем эти изменения могут быть обусловлены функцией тонкого кишечника ввиду того, что его аминокислотный состав имел контрастные различия, по сравнению с более ранним отъемом, также проявившиеся между 60 и 105-дневными возрастными сроками. Пока трудно интерпретировать максимум концентрации аминокислот в стенке тонкого кишечника в 40- 60-дневном возрасте, но можно полагать, что 40-60 дней – это срок естественного отъема поросят, обусловленный недостатком материнского молока и, как следствие, переходом от преимущественного использования кетоновых тел молока на углеводный тип энергетического питания.

Выводы

На фоне нивелирования различий у поросят разных сроков отъема по хозяйственным признакам, к 2-месячному возрасту у них остаются существенные отличия в аминокислотном составе стенки тонкого кишечника и в плазме крови, которые выражаются в повышенной концентрации их, с максимумом в 40-60 дней, у поросят естественного отъема, по-видимому, из-за недостатка материнского молока. Этот период нужно учитывать при планировании срока отъема, имея в виду компенсацию более раннего отъема за счет престартеров.

Срок отъема оказывает существенное (статистически достоверное) влияние на соотношение скоростей роста между длиннейшей мышцей спины и четырёхглавой бедра, предположительно обусловленное различиями в содержании разветвленных аминокислот в стенке тонкого кишечника. Ослабление роста длиннейшей мышцы спины при раннем отъеме

говорит о приоритетном синтезе белка в этой мышце по сравнению с икроножной группой мышц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А. и др. Обмен плазменных белков, ^{14}C -глицина и ^{35}S -метионина в стенке кишечника у свиней и овец. В сб. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных, Физиология и биохимия белкового питания с.-х. животных, т. XIII, Боровск, 1974.
2. Алиев А.А. и др. Включение ^{14}C -лейцина в белки и свободные аминокислоты тканей поросят при разном уровне лизина в рационе. Там же.
3. Скородинский З.П., Кисленко Н.Ф., Аксенова Г.В. Участие стенки тонкого отдела кишечника в обмене метионина. Материалы IV Всес. конф. по физиол. и биохим. основам повышения продуктивности с.-х. животных, Боровск, 1966, кн. 2:347-348.
4. Старовойтов А.М., Мирошниченко Н.А. Динамика обмена отдельных незаменимых аминокислот между кровью и желудочно-кишечным трактом. С.-х. биология, 1968, 3: 245-249.
5. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М.: Мир, 1989.
6. Ткачев Е.З. Особенности развития и функциональное состояние пищеварительной системы у поросят различных сроков отъема. Биохимия питания и кормление молодняка с.-х. животных при раннем отъеме. Сб. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1982.
7. Черников М.П., Усачева Н.Т. Сравнительное изучение скорости всасывания аминокислот из кишечника при скармливании крысам казеина и яичного альбумина. Вопросы питания, 1972, 3, 3-8.
8. Zebrowska Teresa, Munchmeyer R., Bergner H., Simon O. Studies on the secretion of amino acids and of urea into the gastrointestinal tract of pigs. 2. Net secretion of leucine into the small and large intestines. Arch. Tierernahr., 1986, 36, 1:17-24.

ПОТРЕБНОСТЬ В ЙОДЕ И ОСОБЕННОСТИ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА У СВИНЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Е.В. Громова, С.Г. Кузнецов

Лаборатория минерального питания

Установлены возрастные изменения в метаболизме и потребностях в йоде у свиней.

Введение

Важное значение в питании животных имеют минеральные вещества, недостаток и избыток которых наносит значительный ущерб животноводству страны, сдерживая рост поголовья, вызывая заболевания и падеж, резко снижая продуктивность и качество продукции. Поэтому макро- и микроэлементы должны поступать в организм в оптимальных количествах и соотношениях в соответствии с потребностью животных.

К жизненно необходимым элементам относится йод. Зоны йодной недостаточности на территории страны встречаются довольно часто, поэтому проблеме йодного питания животных уделяется большое внимание. Положение осложняется еще и тем, что наряду с первичной недостаточностью может быть и вторичная, обусловленная наличием в кормах гойтрогенных веществ, препятствующих использованию йода щитовидной железой. Вместе с тем избыток этого элемента в рационе

приводит к нарушению функциональной активности щитовидной железы (1-7). Кроме того, имеющиеся данные литературы о нормах йодного питания свиней весьма противоречивы и в них отсутствуют сведения о слагаемых расчета потребности животных в этом элементе факториальным методом (5, 8, 9).

Исходя из вышеизложенного, цель нашей работы состояла в изучении особенностей метаболизма йода у свиней в разные возрастные периоды и установлении их потребности в этом элементе.

Материал и методы

Для выполнения поставленных задач нами проведен опыт на свиньях крупной белой породы. По принципу аналогов были отобраны 23 ремонтные свинки и разделены на две группы. Рационы животных 1-й группы (контроль, 16 голов) были сбалансированы по основным питательным, минеральным и биологически активным веществам согласно существующих норм (10). Животные этой группы получали основной рацион (комбикорм с низким содержанием йода – 0,15 мг/кг + йодовидон, синтезированный КНПО "Йодобром", который представляет собой комплексное соединение молекулярного йода с поливинилпирролидоном. Йодовидон добавляли в премикс из расчета 0,15 мг йода/кг сухого вещества корма.

Свиньи 2-й группы (7 голов) получали в период супоросности и лактации эти же рационы, но без добавок йода. Свинки с живой массой не менее 100 кг были покрыты в возрасте 8-9 месяцев. Эксперимент был начат за 2 недели до покрытия животных. Балансовые опыты проведены в конце второго и третьего месяцев супоросности, а также на лактирующих матках в конце подсосного периода (на четвертой неделе).

В контроле был проведен убой свинок (по 3 головы) на 60, 90 дни супоросности, сразу после опороса и в конце четвертой недели лактации (перед отъемом поросят), а в опытной группе – на 90-й день супоросности и перед отъемом поросят. В подсосный период поросятам в возрасте 3-4 суток вводили внутримышечно ферроглюкин в дозе 150 мг железа на голову, а в возрасте 10-12 суток кастрировали хрячков. С этого же времени животных приучали к поеданию опытных кормов. Поросят отнимали от свиноматок в возрасте 28-30 суток. Поросята после отъема были разделены на три группы: 1-я – контрольная, с добавлением йода (от маток 1-й группы), 2-я – опытная, без добавок йода (от маток 2-й группы) и в 3-й группе животные получали полусинтетический рацион для определения эндогенных потерь йода с калом. Рационы молодняка свиней были сбалансированы согласно существующих норм. В полусинтетическом рационе в качестве источника белка использовали казеинат натрия, источником углеводов служил сахарный песок. Из жиров использовали подсолнечное масло. Минеральные добавки и витамины были реактивной чистоты. Балансовые опыты проведены в возрасте 60-65 и 100-105 суток. Убой поросят (по 3 головы) был проведен сразу после рождения и в возрасте 30 суток.

При проведении опыта учитывали состояние здоровья, прирост живой массы, поедаемость кормов. При убое брали все органы и ткани для определения в них концентрации йода роданид – нитратным методом (ГОСТ 28458 – 90). Общее содержание йода в организме свиноматок рассчитывали по сумме его в отдельных органах и тканях. Для определения содержания йода в организме поросят брали гомогенат целого организма плюс содержание йода в щитовидной железе. Концентрацию йода также определяли в желчи, плодных водах, молоке, моче, во всех кормах, питьевой воде и кале.

Потребность свиноматок в йоде определяли факториальным методом. По содержанию йода в организме матери и плода определяли его отложение в теле за отдельные физиологические периоды и за сутки. Устанавливали эндогенные потери с мочой и калом (потребность на поддержание). Суммировали суточное отложение йода в организме матери, плодов и эндогенные потери с калом, мочой и молоком (для лактирующих свиноматок). На основании этого устанавливали истинную суточную потребность. Пользуясь результатами балансовых опытов и с учетом эндогенных потерь в кале, по общепринятой формуле определяли истинную усвояемость йода из рациона, поделив величину которой на процент истинного усвоения получали количество йода, которое должно содержаться в рационе.

В плазме крови определяли концентрацию трийодтиронина (Т₃), тироксина (Т₄) и кортизола с помощью набора реактивов РИО – Т₃ - ПГ, РИО – Т₄ - ПГ и Стероид К¹²⁵ J-M соответственно. В крови определяли активность церулоплазмينا (КФ 1.10.3.2), щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) и общей пероксидазы (КФ 1.11.1.7). В цельной крови определяли количество гемоглобина и величину гематокрита. В митохондриях клеток щитовидной железы определяли активность общей пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и цитохромоксидазы. В митохондриях клеток печени и почек исследовали активность цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) и сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1). Содержание белка в субклеточных фракциях определяли по Лоури. Методы биохимических исследований описаны в методических указаниях по изучению минерального обмена у животных (11). Результаты опытов обработаны методами математической статистики.

Результаты и обсуждение

Нами определено содержание йода в плазме и цельной крови (табл. 1) в зависимости от его уровня в рационе и физиологического состояния животных. Концентрация общего йода в плазме крови свиноматок первой группы, получавших основной рацион (ОР) + иодвудон, составила у холостых маток 312 нмоль/л, к 60-суткам супоросности она увеличилась на 26,3% и на этом уровне сохранялась до 90 сут беременности. После опороса животных наблюдалось снова ее повышение на 8,2% (P<0,050), а после отъема поросят концентрация общего йода уменьшилась на 25,8% (P<0,001). Уменьшение количества йода в рационе свиней 2-й группы вызывало снижение концентрации общего йода в плазме крови на 90-е сутки супоросности на 15% (P<0,025).

Таблица 1. Концентрация йода в крови свиноматок (нмоль/л) при различной обеспеченности этим элементом

Группы	Плазма крови			Цельная кровь общий йод
	Общий йод	СБИ*	Неорганический йод	
Холостые матки				
1	312±6,8	175±9,2	137±13,8	523±7,9
60 сут супоросности				
1	394±7,9	244±9,0	150±16,4	568±16,9
90 сут супоросности				
1	368±7,9	254±7,2	132±7,9	546±6,9
2	328±11,4	196±6,9	132±9,1	512±13,6
Матки после опороса				
1	418±7,9	213±7,9	205±7,9	512±31,8

Матки после отъема поросят				
1	310±11,4	200±5,3	110±7,9	523±6,9
2	247±10,5	145±6,2	102±4,3	416±1,15

*СБИ – белковосвязанный йод

Концентрация СБИ в плазме повышалась с увеличением сроков беременности и составила у холостых животных 175 нмоль/л. К 60-м сут супоросности она увеличивалась на 40% ($P<0,10$), а к 90-м сут беременности наблюдалось дальнейшее повышение концентрации на 4,1% ($P<0,025$).

После опороса свиноматок концентрация СБИ в плазме крови снизилась на 16,4% ($P<0,001$), а после отъема поросят на 6,2% по сравнению с предшествующим периодом. Уменьшение количества йода в рационе свиноматок второй группы способствовало снижению в плазме крови СБИ к 90 суткам супоросности на 22,8% ($P<0,001$), а после отъема поросят соответственно на 27,2% ($P<0,005$).

Относительное содержание неорганического йода в плазме крови до 60 сут беременности увеличилось на 9,0%, затем к концу супоросности снизилось на 12,0%, после опороса вновь возросло на 55,6% ($P < 0,005$) и после отъема поросят снова уменьшилось на 46,16%, составляя 110 нмоль/л. Концентрация йода в цельной крови к 60-м сут беременности увеличилась на 7,6%, к 90-м сут снизилась на 3,8%. После опороса в цельной крови животных происходило уменьшение содержания йода на 6,2%, а после отъема поросят – увеличение на 2,0%.

Содержание йода в цельной крови плодов 60-сут возраста составило 641 нмоль/л, у 90-суточных оно увеличилось на 4,5% ($P < 0,05$). На изучаемых этапах развития в цельной крови плода содержание йода было выше, чем в материнской крови. За это время разница между содержанием йода в материнской крови первой группы и крови плода увеличилась в 1,7 раза. Концентрация йода в цельной крови свиноматок второй группы и в крови их плодов была практически одинаковой.

У беременных животных йод свободно проникает через плаценту и накапливается в тканях и крови плодов. В крови плода концентрация его значительно выше, чем в крови матери. Это объясняется неспособностью плода выделять йод с мочой (5, 12).

По данным исследователей (3, 4, 12, 13, 14), процесс накопления йода в щитовидной железе происходит при участии окислительных ферментов. Более половины всосавшегося йода активно поглощается щитовидной железой, а затем в составе ее гормонов возвращается в кровь.

Масса щитовидной железы у свиноматок 1-й группы колебалась от 11,6 до 17,1 г. Содержание в ней йода составляло от 898 до 1272 мг на 100 г воздушно-сухого вещества (ВСВ) и общее его количество в железе – от 51 до 75 мг. Концентрация йода в щитовидной железе у холостых свиноматок составила 1121 мг на 100 г ВСВ, к 60-ти сут она снизилась на 10% ($P < 0,025$), к 90 сут супоросности увеличилась на 31 % ($P<0,05$). У животных после опороса эта величина снизилась на 9,9% ($P<0,010$) и после отъема поросят вновь увеличилась на 20% ($P<0,05$). Примерно такая же динамика наблюдалась и с общим количеством йода в щитовидной железе. У холостых свиноматок оно составляло 53 мг, к 60 сут беременности уменьшилось на 22% ($P<0,025$), к 90 сут резко увеличилось (в 1,85 раза), после опороса снизилось на 28% ($P<0,05$), а после отъема поросят содержание йода возросло на 35 % ($P<0,05$).

Наши данные показывают, что на содержание йода в щитовидной железе оказывают влияние как физиологическое состояние свиней, так

и уровень его в рационе. Оптимальный уровень йода в корме достоверно способствовал повышению его концентрации в щитовидной железе на 90 сут супоросности и после отъема поросят по сравнению со свиноматками второй группы.

Потребность плода в минеральных веществах, в т. ч. и в йоде, сильно возрастает во вторую половину внутриутробного развития, когда идет интенсивный рост и развитие различных тканей, органов и в целом плода. В связи с этим происходит значительное перераспределение содержания йода не только между органами и тканями материнского организма, но и между органами плода.

Таблица 2. Содержание йода в щитовидной железе (ЩЖ) свиноматок, плодов и поросят при различной обеспеченности этим элементом

Физиологическое состояние животных	Группа	Масса ЩЖ, г	Содержание йода в ЩЖ			Отношение массы ЩЖ к массе тела $\times 100$
			мг/100 г ВСВ	мг	%	
Холостые матки	1	13,7 $\pm$ 1,2	1121 $\pm$ 111	52,7	64	9,0
Матки, 60 сут беременности	1	13,4 $\pm$ 0,7	898 $\pm$ 151	50,7	56	9,2
Матки, 90 сут беременности	1	17,1 $\pm$ 2,8	1176 $\pm$ 100	62,2	61	9,9
	2	13,9 $\pm$ 1,1	778 $\pm$ 86	40,0	54	8,2
Матки после опороса	1	11,6 $\pm$ 0,6	1059 $\pm$ 23	55,4	63	10,3
Матки после отъема	1	15,4 $\pm$ 2,2	1272 $\pm$ 93	74,7	67	10,5
	2	11,3 $\pm$ 1,5	751 $\pm$ 104	51,5	67	9,5
Плоды, 90 сут	1	0,00011	813 $\pm$ 88	0,30	-	17,5
	2	0,00010	622 $\pm$ 13	0,22	-	16,5
Новорожденные	1	0,110	870 $\pm$ 10	0,45	71	7,7
	2	0,163	692 $\pm$ 24	0,38	72	11,8
Поросята, 30 сут	1	0,483	627 $\pm$ 25	1,41	56	8,4
	2	0,720	455 $\pm$ 15	1,07	55	12,8

Содержание йода в организме плодов повышалось с возрастом и в основном за счет увеличения массы их органов и тканей. Щитовидная железа у плодов к 90 сут возрасту достигала массы 0,1 мг и концентрация йода в ней зависела от его уровня в рационе свиноматок. Оптимальное содержание йода в рационе супоросных свиноматок первой группы способствовало увеличению этого элемента в щитовидной железе на 23,5% ($P < 0,05$).

Концентрация йода в щитовидной железе у новорожденных поросят 1-й группы составила 870 мг на 100 г ВСВ, а к 30 сут возрасту снизилась на 28% ($P < 0,025$). У поросят 2-й группы она в течение первого месяца жизни уменьшилась на 34% ($P < 0,05$). Оптимальное содержание йода в рационе животных 1-й группы способствовало увеличению концентрации этого элемента в щитовидной железе новорожденных поросят на 26% ($P < 0,001$), а в месячном возрасте соответственно на 38% ($P < 0,001$).

Концентрация йода в целом организме поросят 1-й группы при рождении составила 59,67 мкг на 100 г ВСВ, а у поросят 2-й группы она была на 17% меньше ($P < 0,05$). В месячном возрасте концентрация йода в целом организме поросят 1-й и 2-й групп составила соответственно 66 и 54 мкг на 100 г ВСВ.

Общее содержание йода в организме поросят 1-й группы при рождении составило 0,62 мг, у 2-й группы оно было на 15% меньше, а в месячном возрасте – уже на 22% ($P < 0,05$). С возрастом поросят содержание йода в организме поросят 1-й и 2-й групп увеличивалось в 4,0 и 3,7 раза.

Содержание йода в щитовидной железе поросят при рождении в 1-й группе составило 0,45 мг, а к месячному возрасту увеличилось в 3,1

раза. Во 2-й группе оно составляло соответственно 0,38 и 1,07 мг. Увеличение содержания йода в щитовидной железе поросят до месячного возраста происходило за счет роста ее массы.

Данные по содержанию гормонов в крови приведены в таблице 3. Концентрация Т₃ в плазме крови холостых свиноматок составила 1,72 нмоль/л, к 60-м суткам беременности увеличилась на 14,5% (P<0,050) и на этом уровне оставалась до 90 суток супоросности. Во время лактации она увеличилась на 39%, а после отъема поросят – на 29 % (P<0,05). Содержание тироксина в плазме крови холостых свиноматок равнялось 155 нмоль/л и на этом уровне оставалось до конца супоросности. Во время лактации оно уменьшалось в 2,4 раза, а после отъема поросят наблюдалось увеличение на 43%.

Оптимальный уровень йода в рационах свиноматок 1-й группы на 90-м дне беременности способствовал увеличению в плазме крови концентрации Т₃ на 35% и Т₄ в 2,5 раза, а после отъема поросят соответственно на 29 % и в 2,1 раза (P<0,05). У холостых свиноматок отношение Т₃:Т₄ оказалось равным 1:90, в состоянии супоросности отношение тиреоидных гормонов было 1:77, во время лактации - 1:23 и после отъема поросят – 1:29. При недостатке йода в рационе (2-я группа) на 90 сутки беременности оно было равным 1:42 и после отъема – 1:18.

Таблица 3. Концентрация гормонов щитовидной железы и кортизола в плазме крови свиноматок и плодов (нмоль/л) при различной обеспеченности йодом

Группы	Концентрация гормонов		
	Трийодтиронин – Т ₃	Тироксин – Т ₄	Кортизол
Холостые матки			
1	1,72±0,33	154,67±24,17	620,00±32,40
60 дней супоросности			
1	1,97±0,22	151,00±18,98	943,33±57,59
90 дней супоросности			
1	1,93±0,46	150,00±7,34	670,00±92,46
2	1,43±0,41	59,00±16,71	496,67±51,15
Матки после опороса			
1	2,68±0,40	63,00±4,11	493,33±109,62
После отъема			
1	3,13±0,08	90,00±12,96	556,67±97,55
2	2,43±0,28	44,00±7,18	383,33±20,11
Плоды, 60 сут			
1	27,33±2,16	1093,33±217,98	33,67±5,30
Плоды, 90 сут			
1	51,00±2,54	1533,33±46,67	500,00±22,07
2	42,67±7,42	1526,67±53,07	205,67±28,77

Концентрация кортизола в плазме крови холостых животных 1-й группы составляла 620 нмоль/л, а к 60 суткам супоросности увеличилась на 52% (P<0,05), затем на 90-е сутки уменьшилась на 29% (P<0,025). Во время лактации происходило дальнейшее снижение уровня гормона на 26% (P<0,05), а после отъема наблюдалось увеличение на 15% (P<0,05). Пониженный уровень йода в рационах свиноматок 2-й группы способствовал уменьшению концентрации кортизола к 90 суткам беременности на 35% и после отъема поросят на 45%.

Концентрация гормонов щитовидной железы и кортизола в плазме крови плодов с их возрастом увеличивалась (табл. 3). Так, если

в плазме крови 60-сут плодов содержалось 27 нмоль/л трийодтиронина, 1093 нмоль/л тироксина и 33,7 нмоль/л кортизола, то к их 90-сут возрасту содержание T_3 увеличилось в 1,2 раза, T_4 – в 1,4 раза и кортизола – в 14,8 раза.

В плазме крови плодов 60-сут возраста содержание T_3 было выше в 14 раз и T_4 в 7,2 раза, а в 90-сут возрасте соответственно в 26 и 10 раз больше, чем в плазме крови их матерей. В то же время уровень кортизола в плазме крови матери был выше, чем в крови плода. В 60 сут эта разница составила 28 раз, в 90 сут – 1,34 раза.

Наши данные согласуются с результатами других исследователей (12), которые отмечают, что, начиная со второй половины беременности, тиреоидная система плода не зависит от материнской тиреоидной системы, поскольку ТТГ, T_4 и T_3 не способны проникать через плацентарный барьер. Повышенный уровень T_4 и T_3 в крови новорожденных сохраняется долго, а потом постепенно снижается до величин, свойственных взрослому организму.

В нашем опыте подкормки йодвидоном способствовали повышению концентрации гормонов в крови супоросных свиноматок (T_3 – в 1,2 раза, кортизола – в 2, 4 раза). На отношение $T_3:T_4$ оказали влияние возраст плода и уровень йода в рационах. В 60-сут возрасте плодов 1-й группы отношение $T_3:T_4$ было равным 1:40, а в 90-сут возрасте оно составляло 1:50 и при недостатке йода в рационе свиноматок – 1:36.

По данным Георгиевского В. И. и др. (5), фонд йода в организме животных разделяется примерно следующим образом: щитовидная железа – 70-80%, мышцы – 10-12%, кожа – 3-4%, скелет – 3%, прочие органы и ткани – 5-10%.

Наши исследования показали, что на концентрацию йода во внутренних органах и тканях животных оказывает влияние как физиологическое состояние свиней, так и уровень этого элемента в рационе животных (табл. 4). В частности, было установлено, что с ходом беременности содержание йода в сердце, печени, почках, селезенке, матке, стенках желудка, тонкого кишечника, мышцах и костях повышается, а в легких, яичниках и коже со щетиной снижается на достоверную величину. По концентрации йода органы и ткани свиноматок располагаются в следующем убывающем порядке: щитовидная железа, плацента, сердце, костная ткань, печень, легкие, почки, мышечная ткань, матка, головной мозг, яичник, поджелудочная железа, пищевод, тонкий кишечник, молочная железа, кожа со щетиной, селезенка, толстый кишечник.

По нашим данным (табл. 5), концентрация йода в желчи свиноматок в течение супоросности увеличивалась, а после опоросов и отъема поросят снижалась. Уменьшение количества йода в рационах свиноматок 2-й группы вызывало снижение концентрации йода в желчи на 90-е сут беременности на 19% ($P<0,025$), а после отъема поросят – на 22% ($P<0,001$). Содержание йода в плодных водах в ходе беременности увеличилось на 3,1%. Концентрация йода в плодных водах свиноматок 2-й группы к 90-м сут супоросности была на 17% меньше ($P<0,05$) по сравнению с животными 1-й группы.

Содержание йода в молозиве свиноматок составило 712-1103, в молоке 349-507 нмоль/л, и оно хорошо отражает статус элемента в организме (8).

Таблица 4. Концентрация йода (мкг/100 г ВСВ) в органах и тканях свиноматок при разном уровне элемента в рационе

Органы	Холостые, 1 группа	60 сут супоросности, 1 группа	90 сут супоросности		После опороса, 1 группа	После отъема	
			1 группа	2 группа		1 группа	2 группа
Сердце	100±3,9	151±10,4	162±0,9	118±10,3	164±7,9	145±7,0	125±3,6
Печень	119±17,8	127±5,9	126±3,2	101±1,2	125±3,5	131±5,9	101±4,5
Почки	79,7±0,8	102±10,7	104±1,1	63,7±12,6	11±15,6	95,7±9,9	91,7±7,8
Легкие	166±4,3	96,7±9,2	101±11,5	78,3±4,9	108±8,5	129±7,4	98,7±7,3
Селезенка	49,7±3,2	36,0±8,5	65,8±3,7	37,6±3,2	65,0±3,7	64,0±4,9	46,0±4,2
Пищевод	79,3±4,9	75,6±10,2	79,3±9,2	110,0±14,5	84,0±6,2	83,6±7,9	69,3±5,0
Желудок	72,7±9,2	70,0±3,7	77,0±10,7	68,0±5,1	67,3±5,9	66,0±2,4	57,7±8,0
Тонкий кишечник	70,3±1,8	77,3±5,4	80,7±5,0	68,7±4,3	72,7±5,4	80,0±2,8	72,7±1,6
Толстый кишечник	52,3±3,2	53,3±1,6	52,7±4,5	42,0±4,2	68,7±5,3	67,7±5,0	56,0±5,6
Поджелудочная железа	97,3±6,3	8703±2,2	84,0±2,8	58,6±2,9	83,7±4,0	73,3±5,1	65,3±3,3
Мозг головной	77,7±4,6	79,76±6,4	81,3±9,3	67,0±5,8	92,0±2,4	100±6,2	70,7±2,2
Яичник	105±3,6	76,7±5,0	56,3±4,2	48,0±3,7	90,0±2,8	96,0±3,7	72,0±5,7
Матка	49,0±4,6	93,3±5,6	141±28,9	94,0±2,8	95,0±5,0	89,7±3,2	74,0±4,7
Плацента	-	131±12,8	191±19,8	126±7,3	-	-	-
Молочная железа	-	-	-	-	64,7±5,0	80,3±3,3	66,3±3,6
Костная ткань	104±2,4	148±12,4	134±3,2	111±11,3	127±7,4	171±3,7	114±11,6
Мышечная ткань	85,7±3,9	99,7±3,74	91,0±4,4	71,7±5,4	89,7±2,9	111±7,1	80,7±2,9
Кожа со щетиной	70,7±8,6	58,0±1,4	60,7±0,8	58,3±2,8	62,3±9,7	64,7±5,7	56,7±2,2

Таблица 5. Концентрация йода в биологических жидкостях свиноматок (нмоль/л) при разном уровне элемента в рационе

Физиологическое состояние маток	Группы	
	1	2
Желчь		
	588±18	-
Холостые матки		
60 сут супоросности	644±13	-
90 сут супоросности	661±9,1	553±45*
1 сут после опороса	569±14	-
30 сут лактации	525±10	410±9,1*
После отъема поросят		
Плодные воды		
60 сут супоросности	517±59	-
90 сут супоросности	533±46	441±24*
Моча		
60 сут супоросности	1465±102	1197±78*
90 сут супоросности	1956±87	1444±62*
30 сут лактации	91645	804±56*

	Молозиво	
1 сутки лактации	1103±24	712±11*
	Молоко	
4-я неделя лактации	507±27	349±10*

* Здесь и далее разница между группами статистически достоверна

Концентрация йода как в молозиве, так и в молоке свиноматок 1-й группы была достоверно выше, чем у животных 2-й группы. Содержание йода в моче у супоросных и лактирующих свиноматок достоверно зависит от его уровня в рационе.

Активность щелочной фосфатазы в плазме крови свиноматок (табл. 6) до осеменения животных составляла 3,27 ед., к 60 суткам беременности этот показатель увеличился на 21% ($P<0,05$), а на 90 сутки – в 1,9 раза. Во время лактации свиноматок активность щелочной фосфатазы снижалась в 2,3 раза, но после отъема поросят она снова увеличилась на 14% ($P<0,05$). Уровень йода в рационе подопытных животных также оказал влияние на этот показатель. К 90 сут супоросности животных активность щелочной фосфатазы в плазме крови свиноматок первой группы была выше на 39% ($P<0,025$), а после отъема поросят – на 22% ($P<0,05$).

Активность церулоплазмينا в плазме крови холостых свиноматок (табл. 6) составляла 41 ед., к 60 сут беременности увеличилась на 16,7% ($P<0,025$) и к 90 сут супоросности уже равнялась 62 ед. Во время лактации животных активность фермента понизилась на 21,8% ($P<0,005$) и на этом уровне оставалась до отъема поросят от свиноматок. При недостатке йода в рационе (2-я группа) активность церулоплазмينا в плазме крови супоросных животных понизилась на 7% ($P<0,05$) по сравнению с 1-й группой, а после отъема поросят – на 4,1 %.

Таблица 6. Динамика ферментов в плазме крови свиноматок и плодов при разной обеспеченности йодом

Физиологическое состояние	Группы	Щелочная фосфатаза, мкМ пнф/ч/мл	Церулоплазмин, мкМ пфд/ч/мл
Холостые матки	1	3,27±0,21	41,27±1,49
60 сут супоросности	1	3,93±0,35	48,20±1,98
	1	7,33±0,47	62,07±1,14
90 сут супоросности	2	5,27±0,42	58,00±2,72
После опороса	1	3,25±0,31	48,93±3,50
	1	3,69±0,19	47,17±2,47
После отъема поросят	2	3,02±0,44	48,93±2,30
Плоды, 60 суток	1	3,20±0,44	0,80±0,14
Плоды, 90 суток	1	4,62±0,24	2,50±0,21
Плоды, 90 суток	2	3,39±0,42	2,46±0,28

Примечание: пнф – п-нитрофенилфосфат натрия; пфд – п-фенилендиамин дигидрохлорид

Активность щелочной фосфатазы в плазме крови 60-сут плодов 1-й группы составила 3,2 ед., а к 90 сут увеличилась в 1,44 раза. Оптимальный уровень йода в рационе животных этой группы способствовал увеличению активности щелочной фосфатазы в 1,4 раза.

Активность церулоплазмينا в плазме крови 60-сут плодов составляла 0,80 ед. и к 90 сут увеличивалась в 3,1 раза. К 60 сут

беременности активность фермента в плазме крови матери была выше в 60 раз и к 90 сут супоросности – в 25 раз, чем у плодов.

Активность ферментов щитовидной железы зависит от физиологического состояния животных, их возраста и уровня йода в рационе подопытных свиноматок (табл. 7). Активность пероксидазы у холостых свиноматок 1-й группы составляла 0,09 ед., к 60 сут беременности она снизилась в 1,4 раза, а концу супоросности повысилась в 2 раза. Во время лактации животных она вновь снизилась в 1,6 раза и после отъема поросят от маток увеличилась в 1,2 раза. Активность этих оксидоредуктаз в митохондриях тироцитов супоросных и лактирующих маток резко падала при дефиците йода.

Таблица 7. Активность ферментов в митохондриях клеток щитовидной железы свиноматок при разном уровне йода в рационе

Физиологическое состояние	Группы	Пероксидаза, ед. оптической плотности/сек	Цитохромоксидаза, мкМ пфд/ мин/мг белка
Холостые	1	0,094±0,002	0,100±0,018
60 сут супоросности	1	0,067±0,004	0,083±0,050
	1	0,137±0,019	0,128±0,019
90 сут супоросности	2	0,069±0,001*	0,080±0,007*
После опороса	1	0,085±0,003	0,180±0,010
	1	0,113±0,000	0,160±0,020
После отъема поросят	2	0,095±0,009*	0,064±0,007*

В нашем опыте установлено (табл. 8), что активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в печени у холостых животных 1-й группы составила 0,73 ед., к 60 сут беременности она понизилась на 23% ($P<0,001$), а к 90 суткам увеличилась на такую же величину. Во время лактации животных активность СДГ оставалась на прежнем уровне и к отъему поросят от свиноматок снова повышалась на 16% ($P<0,01$). Активность СДГ в печени свиноматок 1-й группы была выше на 17% ($P<0,05$) в конце беременности и на 11% ($P<0,50$) – после отъема поросят от свиноматок по сравнению со 2-й группой.

Активность цитохромоксидазы (ЦХО) в печени холостых свиноматок 1-й группы равнялось 0,29 ед. К 60 суткам супоросности она возрастала 10 % ($P<0,05$), к концу беременности снизилась на 16% ($P<0,025$). Во время лактации активность достоверно снижалась еще на 15% и после отъема поросят она повысилась на 35% ($P<0,001$). Оптимальный уровень йода в рационе животных 1-й группы способствовал повышению активности ЦХО в конце беременности свиноматок на 69% и после отъема поросят на 55 % ($P<0,001$) по сравнению со свиноматками 2-й группы.

В митохондриях почек наблюдались более значительные изменения в активности данных ферментов в зависимости от физиологического состояния свиноматок, их возраста и уровня йода в рационе (табл. 8).

Активность СДГ в печени 60-сут плодов 1-й группы составила 0,27 ед. и к 90-сут возрасту она увеличилась в 1,6 раза. Оптимальный уровень йода в рационе свиноматок этой группы способствовал увеличению активности СДГ в 1,1 раза. Активность этого фермента в печени свиноматок к 60-м суткам беременности была выше в 2,1 раза и к 90-м сут - в 1,6 раза, чем в печени плода.

Активность ЦХО в печени плодов равнялась 0,05 ед. и к 90 сут возрасту увеличилась в 3,8 раза. Активность ЦХО в печени плодов 1-й группы была выше в 1,7 раза по сравнению со 2-й группой. К 60-м сут супоросности активность ЦХО в печени матери была выше в 6,4 раза и

в 90 сут беременности соответственно в 1,4 раза по сравнению с активностью фермента в печени плода.

Активность СДГ в митохондриях почек 60-сут плодов первой группы составила 0,34 ед. и к 90 суткам увеличилась в 1,5 раза. Оптимальный уровень йода в рационе свиноматок этой группы способствовал увеличению активности СДГ в почках их плодов в 1,2 раза.

Нами также установлено, что активность СДГ в митохондриях клеток почек свиноматок в 60 сут беременности была выше в 4,8 раза, а в 90 сут соответственно в 3,1 раза, чем в митохондриях почек плода. Активность ЦХО в почках 60-сут плодов составила 0,12 ед., а к 90-м суткам увеличилась в 3,8 раза. Активность ЦХО в почках плодов 1-й группы была в 2,1 раза выше по сравнению с ее активностью в этих органах плодов 2-й группы. Активность ЦХО в почках свиноматок 1-й группы в 60 сут супоросности была выше в 4,2 раза, а в 90 сут соответственно в 1,2 раза, чем в почках их плодов.

Таблица 8. Активность оксидоредуктаз в митохондриях клеток печени и почек свиноматок и плодов при различной обеспеченности йодом

Группы	Печень		Почки	
	СДГ	ЦХО	СДГ	ЦХО
Холостые матки				
1	0,73±0,01	0,29±0,01	1,06±0,03	0,81±0,04
Матки, 60 сут супоросности				
1	0,56±0,02	0,32±0,01	1,61±0,04	0,50±0,01
Плоды, 60 сут				
1	0,27±0,02	0,05±0,01	0,34±0,01	0,12±0,02
Матки, 90 сут супоросности				
1	0,69±0,03	1,27±0,02	1,54±0,03	0,56±0,03
2	0,59±0,02	0,21±0,01	0,84±0,03	0,45±0,05
Плоды, 90 суток				
1	0,44±0,00	0,19±0,01	0,50±0,01	0,46±0,02
2	0,40±0,01	0,11±0,01	0,41±0,03	0,22±0,03
Матки, первые сутки после опороса				
1	0,70±0,02	0,23±0,01	0,83±0,03	0,52±0,02
Матки, первые сутки после отъема поросят				
1	0,81±0,02	0,31±0,01	1,03±0,06	0,60±0,03
2	0,73±0,05	0,20±0,01	0,79±0,04	0,32±0,03

Примечание: СДГ -сукцинатдегидрогеназа, мкМ трифенилтетразолия хлорида /час/мг белка; ЦХО - цитохромоксидаза, мкМ диметилпарафенилендиамин дигидрохлорида /мин/мг белка.

На основании вышеизложенного следует отметить, что содержание йода в организме изменяется в зависимости от физиологического состояния свиноматок. В связи с этим возникает необходимость нормирования поступления этого микроэлемента в организм животных. В то же время анализ литературных данных показывает, что до настоящего времени нет единого мнения о потребности свиноматок в йоде, а существующие рекомендации по нормированию йода для холостых, супоросных и лактирующих свиноматок требуют уточнения.

С учетом этих обстоятельств и на основании данных о содержании этого элемента в органах и тканях матери и плода, размерах отложений, выделений с калом и мочой, степени усвоения из рационов нами определена суточная потребность свиноматок до двухлетнего возраста в йоде в разные периоды беременности и во время лактации

(табл. 9). На процессы обмена веществ у свиней оказывает влияние не только возраст, но и различное содержание йода в рационах. Поэтому, чтобы сделать заключение о росте и развитии подопытных животных, нами изучен ряд характерных зоотехнических показателей (живая масса, среднесуточные приросты, расход кормов).

Таблица 9. Потребность свиноматок в йоде

Показатели	Физиологическое состояние		
	60 суток беременности	90 суток беременности	Подсосные, 4-я неделя лактации
Живая масса, кг	134	157	148
Содержание йода в организме, мг:			
матери	90,92	100,7	111,82
плодов	0,15	1,55	-
в молоке	-	-	0,68
Всего	91,07	102,25	112,5
Отложение йода в организме, мг/сут	0,140	0,373	0,177
Эндогенные потери:			
с калом, мкг/сут	323	368	362
с калом, мкг/кг ж. м. /сут	2,4	2,3	2,5
с мочой, мкг/сут	278	340	242
с мочой, мкг/кг ж. м. /сут	2,1	2,2	1,6
Коэффициент истинного усвоения	0,80	0,93	0,88
Потребность в усвояемом йоде, мг/сут	0,74	1,08	1,46
Потребность в общем йоде, мг/сут	0,93	1,16	1,65
мг/кг сухого вещества корма	0,37	0,40	0,40

Подопытные свиноматки обеих групп отличались достаточно высокой продуктивностью (табл. 10).

Таблица 10. Показатели роста свиноматок и эффективности использования корма при разном уровне йода в рационе

Показатели	1 группа	2 группа
1 период (холостые - 60 сут супоросности)		
Живая масса в начале периода	105,8±9,1	103,2±9,7
Живая масса в конце периода	139,9±12,1	136,5±10,3
Прирост, г/сут	568±152	556±105
Расход кормов за период, кг	180	180
Затраты корма на 1 кг прироста, кг	5,28	5,41
2 период (60 - 90 сут супоросности)		
Живая масса в начале периода	139,9±12,1	136,5±10,3
Живая масса в конце периода	159,2±19,7	155,5±15,4
Прирост, г/сут	643±167	33±144
Расход кормов за период, кг	92	92
Затраты корма на 1 кг прироста, кг	4,77	4,84
Холостые - 90 сут супоросности		
Живая масса в начале периода	105,8±9,1	103,2±19,7
Живая масса в конце периода	159,2±19,7	155,5±15,4
Прирост, г/сут	593±158	581±136
Расход кормов за период, кг	272	272
Затраты корма на 1 кг прироста, кг	2,09	6,20
Холостые – матки после отъема поросят		
Живая масса в начале периода	105,8±9,1	103,2±9,7
Живая масса в конце периода	148,7±4,3	127,3±8,7
Прирост, г/сут	290±33	163±27

Оптимальный уровень йода в рационе животных 1-й группы способствовал достоверному увеличению количества плодов, а также лучшему их росту и развитию в утробный период.

Выводы

1. По концентрации йода органы и ткани свиноматок располагаются в следующем убывающем порядке: щитовидная железа, плацента, сердце, костная ткань, печень, легкие, почки, мышечная ткань, матка, головной мозг, яичник, поджелудочная железа, пищевод, тонкий кишечник, молочная железа, желудок, кожа со щетиной, селезенка, толстый кишечник. Общее содержание йода в организме маток варьирует от 82 до 110 мг. Мышечная ткань содержит 13-31%, костная ткань 11-14, кожа со щетиной 3-4, печень 0,7-1,0% йода всего организма.

2. При длительном умеренном дефиците йода (в течение полугода) концентрация его снижается наиболее значительно в следующих органах и тканях свиноматок (в убывающем порядке): щитовидная железа, селезенка, плацента, матка, костная ткань, почки, головной мозг, мышечная ткань, легкие, поджелудочная железа, печень. Биологические жидкости при этом располагаются в следующем порядке: молозиво, молоко, желчь, моча, плазма крови, плодные воды, цельная кровь.

3. Количество йода в щитовидной железе холостых, супоросных и подсосных маток составляет 64, 58 и 66%, а у новорожденных поросят – 72% от содержания во всем организме. При низком уровне йода в рационе (0,15 мг/кг) масса щитовидной железы маток и плодов по существу не изменяется, однако содержание элемента в ней у супоросных и подсосных маток уменьшается в 1,5 и 1,7 раза, у плодов и новорожденных в 1,3 раза и месячных поросят в 1,4 раза относительно контроля (0,30 мг йода/кг корма). У поросят при дефиците йода абсолютная и относительная масса щитовидной железы возрастает в 1,5 раза, что является признаком развития зоба.

4. Концентрация общего, белковосвязанного (СБИ) и неорганического йода в крови значительно повышается в процессе супоросности, а к концу периода лактации снижается почти до уровня холостых свинок. Содержание общего йода в цельной крови выше, чем в плазме в 1,5 раза. Между этими показателями существует тесная корреляционная связь ($r = +0,73$). СБИ составляет 60% от общего йода, причем эти два показателя слабо коррелируют между собой ($r = +0,34$). Уровень йода в крови плодов существенно выше, чем у их матерей. При дефиците йода содержание общего йода в плазме супоросных и подсосных маток снижается на 20-26%, СБИ – на 30-37%, T_3 – на 30-35%, а T_4 – в 2,1-2,6 раза.

5. Активность церулоплазмينا и щелочной фосфатазы в плазме, пероксидазы в цельной крови была наиболее высокой у маток в последней трети супоросности. При дефиците йода специфическая активность этих металлоэнзимов достоверно снижалась только у беременных животных. У йоддефицитных плодов активность щелочной фосфатазы была в 1,4 раза ниже контроля, а уровень церулоплазмينا не изменялся. У плодов и их матерей активность щелочной фосфатазы в крови примерно одинакова, тогда как активность церулоплазмينا у плодов в 25-60 раз ниже, чем у матерей.

6. Уровень T_3 в плазме крови свиноматок неуклонно возрастал в процессе беременности и лактации, а T_4 был одинаков у холостых и супоросных маток и более чем в 2 раза снижался к концу подсосного

периода. Отношение $T_4 : T_3$ у холостых свинок составляло 90, у беременных 80, у подсосных маток 25-30, у плодов 30-40. Тиреоидные гормоны слабо коррелировали как между собой, так и с уровнем йода в крови. У плодов концентрация T_3 и T_4 в плазме крови была в 14-26 и 7-10 раз выше, чем у матерей и снижалась несущественно при дефиците йода, в то время как уровень этого микроэлемента в крови достоверно падал.

7. Наибольшая удельная активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦХО) в митохондриях клеток печени наблюдалась у подсосных маток. В митохондриях клеток почек наивысшая активность СДГ была у супоросных маток, ЦХО – у холостых свинок.

8. Удельная активность СДГ, ЦХО у свиноматок и плодов в митохондриях клеток почек достоверно выше, чем в печени. Активность этих оксидоредуктаз в печени и почках 60-сут плодов в 2-6 раз ниже, а у 90-суточных – в 1,2-3,5 раза, чем у матерей. Интенсивность окислительно-восстановительных процессов в печени и почках плодов существенно повышается по мере их роста и развития.

9. Спад активности ЦХО в печени и почках при недостатке йода более выражен у подсосных маток, СДГ – у супоросных. При дефиците йода активность ЦХО в печени и почках у плодов изменяется в большей степени, а СДГ, наоборот, значительно меньше, чем у матерей. Удельная активность ЦХО в почках и печени свиноматок и плодов наиболее выражено зависит от обеспеченности животных йодом, что подтверждает его роль в обмене энергии (через тиреоидные гормоны и ферменты).

10. У супоросных маток основное количество йода (56-61%) выделяется с калом, а у подсосных 46 % элемента выделяется с молоком, 37% – с калом и 10% – с мочой. На рационе без добавок йода (0,15 мг/кг) баланс элемента отрицательный, а видимое усвоение составляет 38%. При добавлении к основному рациону свиноматок 0,15 мг йода на 1 кг корма в форме йодвидона, истинное и видимое усвоение его составляет 80 и 45% у маток в первую половину супоросности, 93 и 56 % – во вторую половину беременности, 88 и 65 % у маток в конце первого месяца лактации.

11. Эндогенные потери йода у свиноматок составляют: с калом – 2,3-2,5 мкг, с мочой – 1,6-2,3 мкг/кг живой массы в сутки. В организме маток на 60-е и 90-е сутки беременности откладывается 0,14 и 0,37 мг йода/сут, у подсосных свиней (4-я неделя лактации) – 0,18 мг/сут. Потребность их в усвояемом йоде составляет 0,74; 1,08 и 1,46 мг/сут, а в общем йоде – соответственно 0,37; 0,40 и 0,40 мг/кг сухого вещества корма.

12. При обогащении рациона йодом в течение всего воспроизводительного цикла достоверно увеличивается количество плодов и интенсивность их роста в утробный период.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковальский В. В. Значение геохимической экологии в определении потребности сельскохозяйственных животных в микроэлементах. В сб.: Микроэлементы в животноводстве. М., 1962: 5-22.
2. Кабыш А. А. Эндемическая остеодистрофия крупного рогатого скота на почве недостатка микроэлементов. Челябинск, 1967: 369 с.
3. Георгиевский В. И. Минеральное питание сельскохозяйственной птицы. М.: Колос, 1970: 327с.
4. Георгиевский В. И. Минеральный обмен. Физиология

- сельскохозяйственных животных. Л., 1978: 217-255.
5. Георгиевский В. И., Анненков Б. Н., Самохин В.Т. Минеральное питание животных. М.: Колос, 1979: 471 с.
 6. Кашин В. К. Биогеохимия, физиология и агрохимия йода. Л.: Наука, 1987: 260 с.
 7. Кузнецов С. Г., Батаева А.П., Овчаренко Г. А., Аухатова С.Н. Биологическая доступность йода для молодняка свиней и стабильность его соединений в составе премиксов. С.-х. биология, 1992: 31-39.
 8. Кузнецов С. Г. Биохимические критерии обеспеченности животных минеральными веществами (обзор). С.-х. биология, 1991, 2: 16-33.
 9. Кузнецов С. Г., Батаева А.П., Стеценко И. И. и др. Природные цеолиты в кормлении животных. Зоотехния, 1993, 9: 13-15.
 10. Калашников А.П., Клейменов Н.И., Баканов В.Н. и др. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. М.: Агропромиздат, 1985:352 с.
 11. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С. Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1988: 103 с.
 12. Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина, 1991:496 с.
 13. Самохин В. Т. Влияние физиологического состояния и сезона года на активность щитовидной железы. Доклады ВАСХНИЛ, 4, 1971: 3.
 14. Лебедев Н.И. Использование микродобавок для повышения продуктивности жвачных животных. Л. : Агропромиздат, 1990: 96 с.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДОСТУПНОСТЬ МИНЕРАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ ИЗ ПРИРОДНЫХ ЦЕОЛИТОВ

С.Г. Кузнецов, О.Д. Скурихина

Лаборатория минерального питания

Изучена биологическая доступность элементов для молодняка свиней из природных цеолитов Шивыртуйского (ПЦШ) и Тайжугенского (ПЦТ) месторождений. ПЦШ и ПЦТ, внесенные в корм растущих поросят в количестве 4%, значительно обогащают рационы Mn, Co, Ni, Cr, Pb. Однако биологическая доступность их, кроме никеля из ПЦТ, низкая (менее 100% относительно полусинтетического рациона без добавок цеолитов), поэтому данные минералы в рекомендуемых дозах не являются дополнительным источником Co, Mn, Cu, Zn, Cr, Cd и Pb для животных.

Введение

Определение общего содержания минеральных веществ еще не дает представления о значимости кормов и добавок как источников макро- и микроэлементов, так как только определенная часть их может всасываться и превращаться в организме в метаболически активную форму. В связи с этим введено понятие биологической доступности – БД (1, 2, 5). Под БД подразумевается эффективность всасывания (усвоения) и использования минеральных веществ у животных из различных источников или при разном физиологическом состоянии организма (5).

В ряде исследований обнаружено, что рационы, сбалансированные по валовому содержанию минеральных веществ, без учета их доступности, не дают должного эффекта. Это связано, прежде всего, с

тем, что не все минеральные вещества кормов находятся в одинаково доступной форме (2, 9).

Использование элемента в организме включает в себя процессы транспорта, клеточной ассимиляции и превращения в биологически активную форму или формы (12). Для некоторых минеральных веществ, особенно микроэлементов, использование их в организме является более важным компонентом БД и даже по эффективности использования судят о величине БД (10). Выбор надежного биохимического критерия для изучения БД является весьма важным моментом. Иногда используют один какой-либо параметр, но чаще всего – комплекс показателей. Установив вид элемента в корме, его растворимость *in vitro* и в химусе, можно с определенной долей вероятности предсказать БД (13). Для изучения БД минеральных веществ применяют главным образом методы деплеции-реплеции и профилактики недостаточности (5).

Известно, что природные цеолиты содержат более 40 различных элементов, некоторые из них относятся к вредным и токсичным. БД их для организма животных по существу не изучена, что сдерживает применение цеолитов в животноводстве (4).

В связи с этим перед нами была поставлена задача изучить БД минеральных элементов из природных цеолитов Шивыртуйского (ПЦШ) и Тайжугенского (ПЦТ) месторождений для растущих поросят.

Материал и методы

Опыт был проведен на трех группах животных по 4 головы в каждой (по 2 боровка и 2 свинки). Животные получали полусинтетический рацион, состоящий из 34,6% сухого обезжиренного молока, 19% картофельного крахмала, 4% сахара, 10% пшеничных отрубей, 30% молотого ячменя, 1% трикальцийфосфата, 0,4% хлористого натрия и 1% витаминного премикса. Микроэлементы в рацион не добавляли. Витаминный премикс содержал следующие компоненты: витамины А, D₃, Е, К, В₁, В₂, В₃, В₄, В₅, В₁₂, С, окситетрациклин, фуразолидон и наполнитель (пшеничные отруби). В кормах определяли содержание минеральных элементов (3), в том числе тяжелых металлов (Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Mn). Уровень их был ниже ПДК. Рационы для поросят были сбалансированы по основным питательным, биологически активным веществам и соответствовали существующим рекомендациям.

Все животные получали одинаковое, строго нормируемое количество корма. Схема опыта была следующей: 1-я группа получала основной рацион (ОР) без добавок цеолитов, 2-я – ОР+4% ПЦШ и 3-я группа – ОР+4% ПЦТ. Норму скармливания цеолитов определяли как добавку к ОР в расчете на сухое вещество корма. Перед опытом цеолиты предварительно сушили при 150° С для повышения эффективности их действия. Суточную дозу цеолита вносили в корм, тщательно перемешивали и смесь делили на 2 или 3 части в зависимости от кратности кормления животных. В опыте использовали одни и те же корма.

Опыт продолжался 81 сутки. По окончании эксперимента животные были убиты (в 145-суточном возрасте). В органах и тканях определяли содержание минеральных элементов (Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Mn) методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (3). Для предсказания БД минеральных элементов из природных цеолитов для молодняка свиней были проведены эксперименты *in vitro* по изучению

экстрагируемости металлов из цеолитовых туфов двух месторождений (4).

Результаты и обсуждение

Данные по экстрагируемости минеральных элементов из ПЦ водой и растворами соляной кислоты описаны в другой статье настоящего сборника (6). Опытные группы животных получали дополнительно к основному рациону по 4% природных цеолитов (ПЦ). Из анализа полученных данных следует, что ОР существенно обогащается минеральными элементами за счет добавок в него цеолитов (табл. 1). Расчеты сделаны по валовому содержанию минеральных элементов в ПЦ (по их растворимости в 6 М HCl). Следует отметить, что с ПЦШ в рацион поросят вносится 1246% Fe, 600% Mn, 160% Co, 118% Ni, 83% Cr, 172% Pb от содержания их в ОР. За счет ПЦТ рацион поросят обогащается значительно меньшим количеством элементов, кроме хрома (361% к ОР).

Таблица 1. Содержание минеральных элементов в основном рационе и природных цеолитах (средние данные)

Показатели	Fe	Cu	Zn	Mn	Co	Ni	Cr	Cd	Pb
Содержание в ОР, мг/кг корма	54,9	3,61	19,5	19,3	0,55	1,36	0,30	0,23	1,30
Содержание в 4% ПЦШ: мг/кг	684	0,23	1,64	116,4	0,88	1,60	0,25	0,05	2,24
в % от ОР	1246	6,4	8,3	601	160	118	83	22	172
Содержание в 4 % ПЦТ: мг/кг	198	0,38	0,88	7,96	0,40	1,32	0,36	0,13	1,60
в % от ОР	361	10,5	4,5	41	73	97	120	56	123

Действие ПЦ проявляется в первую очередь в желудочно-кишечном тракте. Оно многогранно и обусловлено в основном их буферными, ионообменными и сорбционными свойствами. Биологические эффекты ПЦ зависят от структуры кристаллической решетки, типа обменных катионов, степени их сорбции. Обладая большой активной поверхностью (несколько сот м²), ПЦ выраженно и селективно сорбируют NH₃, NH₄, H₂S, CH₄, CO₂, меркаптаны, воду, углеводороды, фенолы, некоторые экзо- и эндотоксины, тяжелые металлы, радионуклиды, микроорганизмы. Одной из функций ПЦ является регуляция состава и концентрации электролитов пищеварительного тракта, а через них – минерального обмена и кислотно-щелочного состояния в организме животных (4).

В желудочно-кишечном тракте происходит взаимодействие компонентов рациона с пищеварительным соком, их расщепление и частичное всасывание. Известно, что практически все элементы, содержащиеся в цеолитах, количественно изменяются, взаимодействуя с химусом пищеварительного тракта. При этом Fe, Ca, Mg, Li в основном переходят в химус, тогда как Pb и Cd – сорбируются клиноптилолитом (8).

Эксперимент показал, что в желудке поросят ПЦТ оказались более растворимыми, чем шивыртуин. Химус желудка поросят 2-й группы содержал больше Zn и Co на 18%, Mn – на 28, Cu – на 7, Ni и Cr – на 20,

Cd – на 34 и Pb - на 47% по сравнению с 1-й группой. У животных 3-й группы в химусе содержалось Co на 41%, Mn – на 35, Cu и Zn – на 26, Ni – на 72, Cr – на 63, Cd – на 46 и Pb - на 57% больше, чем в контроле. Внутренние органы и ткани подопытных поросят в неодинаковой степени используют изучаемые металлы из ПЦ (табл. 2-5).

Таблица 2. Содержание металлов в печени и почках поросят, получавших природные цеолиты двух месторождений

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	мг/кг ВСВ	мг/орган	мг/кг ВСВ	мг/орган	мг/кг ВСВ	мг/орган
Печень						
Масса органа, кг	1,16±0,14		1,01±0,07		1,60±0,08	
ВСВ, %	36		35		34	
Кобальт	0,68±0,06	0,28	0,50±0,01*	0,18	0,86±0,03*	0,31
Марганец	8,18±0,18	3,42	8,15±0,09	2,88	8,99±0,21*	3,24
Медь	15,4±0,08	6,44	17,5±0,75*	6,17	17,1±0,26*	6,18
Цинк	92,3±6,01	38,5	100,6±6,67	35,6	108,9±6,67	39,3
Никель	0,35±0,02	0,15	0,25±0,02*	0,08	0,42±0,02*	0,17
Хром	0,37±0,01	0,15	0,38±0,01	0,13	0,40±0,01	0,14
Кадмий	0,18±0,03	0,075	0,17±0,02*	0,06	0,18±0,01	0,06
Свинец	1,47±0,06	0,73	1,48±0,01*	0,52	1,73±0,06	0,62
Почки						
Масса органа, кг	0,19±0,01		0,16±0,003		0,17±0,01	
ВСВ, %	23		35		22	
Кобальт	0,77±0,07	0,034	0,77±0,03	0,031	0,71±0,04	0,027
Марганец	6,90±0,21	0,30	6,42±0,22	0,26	6,28±0,15	0,23
Медь	19,3±0,70	0,84	18,6±0,15*	0,74	18,9±0,10*	0,71
Цинк	76,1±0,56	3,32	77,5±0,14*	3,09	78,5±0,80*	2,94
Никель	0,78±0,06	0,034	1,09±0,04*	0,044	1,23±0,11*	0,05
Хром	2,03±0,13	0,089	2,09±0,15	0,084	2,57±0,11*	0,10
Кадмий	0,42±0,01	0,018	0,34±0,02*	0,014	0,41±0,03	0,015
Свинец	2,05±0,17	0,09	2,51±0,01*	0,10	3,20±0,13*	0,12

Примечание: здесь и далее в последующих таблицах: * – разница статистически достоверна по сравнению с 1-й группой; ВСВ – воздушно-сухое вещество.

В целом же добавки к рационам цеолитовых туфов снижали абсолютное содержание всех изучаемых тяжелых металлов в целом организме (по сумме их в отдельных органах и тканях), только в разной степени (табл. 6). ПЦШ достоверно снижали содержание Mn в целом организме поросят на 19%, Cu – на 15, Zn – на 11, Ni – на 6, Cr – на 17, Cd – на 10 и Pb – на 7% по сравнению с контролем, при этом ПЦТ уменьшали абсолютное содержание Co и Pb – на 13%, Mn, Zn, Cr и Cu – на 16-18, Cd – на 9%. Только количество Ni в целом организме за счет добавок ПЦТ возросло на 3% по сравнению с 1-й группой.

Неодинаковая степень ретенции минеральных элементов в организме поросят при добавлении в рацион ПЦ двух месторождений является, вероятно, одним из следствий их разной биодоступности.

Таблица 3. Содержание минеральных элементов в мозге и щитовидной железе поросят, получавших цеолиты двух месторождений

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	мг/кг ВСВ	мг/орган	мг/кг ВСВ	мг/орган	мг/кг ВСВ	мг/орган
Мозг						
Масса органа, кг	0,09±0,01		0,10±0,01		0,10±0,02	
ВСВ, %	22		22		23	

Кобальт	0,45±0,02	8,91	0,29±0,02*	5,57	0,49±0,04	11,3
Марганец	1,67±0,24	33,1	1,65±0,09	37,4	1,25±0,08	28,8
Медь	14,5±0,36	286,3	13,1±0,43*	296,4	13,9±0,37	320,4
Цинк	35,3±1,30	698,5	35,8±0,87	811,7	34,9±0,67	803,4
Никель	0,54±0,04	10,7	0,47±0,03	10,7	0,39±0,01*	8,97
Хром	0,34±0,01	6,73	0,31±0,01	7,02	0,29±0,03*	6,67
Кадмий	0,17±0,01	3,73	0,22±0,01*	4,99	0,91±0,01	4,37
Свинец	1,36±0,06	26,9	0,80±0,03*	18,1	1,30±0,12	29,9
Щитовидная железа						
Масса органа, г	4,43±0,25		4,67±0,36		4,76±0,70	
ВСВ, %	35		39		30	
Кобальт	0,83±0,04	1,29	0,58±0,04*	1,06	1,12±0,06*	1,60
Марганец	3,59±0,15	5,57	2,92±0,18*	5,32	3,36±0,04	4,80
Медь	2,71±0,08	4,20	2,38±0,08*	4,34	2,83±0,08	4,04
Цинк	37,5±2,58	58,1	22,9±1,94*	41,7	31,4±2,01	44,9
Никель	1,25±0,17	1,94	0,58±0,08*	1,06	1,63±0,22	2,33
Хром	0,24±0,02	0,37	0,25±0,03	0,46	0,20±0,02	0,29
Кадмий	0,22±0,03	0,34	0,30±0,03	0,55	0,37±0,03*	0,53
Свинец	2,92±0,11	4,53	2,50±0,01*	4,55	3,84±0,09	5,48

Таблица 4. Содержание минеральных элементов в гомогенате костной и мышечной ткани поросят при включении в рацион природных цеолитов

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	мг/кг ВСОВ	мг	мг/кг ВСОВ	мг	мг/кг ВСОВ	мг
Костная ткань						
Масса костей, кг	8,13±0,60		7,10±0,47		7,27±0,40	
ВСОВ, %	62		65		62	
Кобальт	6,22±0,05	31,4	6,93±0,08*	32,0	6,06±0,06	27,3
Марганец	2,63±0,02	13,3	2,68±0,02	12,4	2,64±0,03	11,9
Медь	2,31±0,04	11,6	2,24±0,03	10,3	2,13±0,03	9,60
Цинк	39,0±0,43	196,4	43,7±0,54*	201,5	37,0±0,71	166,7
Никель	5,54±0,04	27,9	5,70±0,08	26,3	5,91±0,06*	26,6
Хром	3,10±0,03	15,6	2,99±0,04	13,8	2,88±0,07*	12,9
Кадмий	2,53±0,02	12,7	2,58±0,05	11,9	2,50±0,06*	11,3
Свинец	21,0±0,19	105,8	21,7±0,35	100,1	20,5±0,34	92,6
Мышечная ткань						
Масса ткани, кг	22,0±1,33		23,0±1,87		19,2±0,63	
ВСОВ, %	34		28		29	
Кобальт	0,30±0,01	2,24	0,26±0,01*	1,67	0,31±0,01	1,78
Марганец	0,45±0,02	3,37	0,33±0,01*	2,13	0,37±0,02*	2,06
Медь	1,27±0,01	9,50	1,20±0,10	7,73	1,23±0,07	6,86
Цинк	27,8±1,36	207,9	33,6±0,44*	216,5	33,7±2,00*	188,2
Никель	0,26±0,01	1,94	0,41±0,03*	2,64	0,62±0,08*	3,46
Хром	0,21±0,01	1,58	0,17±0,01*	1,09	0,22±0,03	1,22
Кадмий	0,16±0,02	1,20	0,11±0,01*	0,71	0,21±0,02	1,17
Свинец	0,76±0,06	5,68	0,69±0,05	4,44	0,74±0,04	4,13

Примечание: ВСОВ – воздушно-сухое обезжиренное вещество.

Таблица 5. Содержание минеральных элементов в легких поросят при добавлении в рацион природных цеолитов

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	мг/кг ВСВ	мг	мг/кг ВСВ	мг	мг/кг ВСВ	мг

Масса органа, кг	0,47±0,04		0,35±0,02		0,37±0,01	
ВСВ, %	21		23		23	
Кобальт	0,51±0,04	0,05	0,52±0,02	0,042	0,71±0,02*	0,06
Марганец	1,10±0,09	0,11	1,09±0,05	0,09	0,82±0,04*	0,07
Медь	3,44±0,11	0,34	3,12±0,07*	0,25	3,09±0,08*	0,26
Цинк	57,0±1,67	5,63	60,1±0,08	4,84	54,2±0,83	4,61
Никель	0,83±0,03	0,08	0,81±0,05	0,07	0,97±0,04*	0,082
Хром	0,48±0,01	0,05	0,47±0,02	0,038	0,44±0,01	0,038
Кадмий	0,20±0,01	0,02	0,28±0,01*	0,023	0,19±0,005	0,016
Свинец	1,55±0,12	0,15	1,11±0,01*	0,09	1,30±0,19	0,11

Таблица 6. Концентрация и абсолютное содержание минеральных элементов в целом организме поросят, получавших цеолиты двух месторождений

Показатели	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	мг/кг ВСОВ	мг	мг/кг ВСОВ	мг	мг/кг ВСОВ	мг
Кобальт	1,60±0,07	35,1	1,72±0,05	34,7	1,78±0,04*	30,6
Марганец	3,74±0,043	26,6	2,50±0,05*	21,6	2,25±0,07*	22,0
Медь	3,93±0,09	45,9	3,67±0,17	39,1	3,40±0,12*	37,5
Цинк	58,7±1,62	279,9	63,3±1,46	535,2	61,4±1,85	485,2
Никель	2,59±0,020	36,6	1,97±0,12*	33,9	1,77±0,05*	37,2
Хром	0,76±0,02	20,0	0,86±0,02*	16,5	0,76±0,04	16,8
Кадмий	0,60±0,01	14,5	0,57±0,03	13,1	0,59±0,02	13,1
Свинец	5,08±0,16	116,1	4,66±0,09	108,1	4,46±0,12*	101,8

Для более полной и объективной оценки эффективности и безопасности использования ПЦ в кормлении животных необходимо определять БД минеральных элементов, содержащихся в них. БД минеральных элементов из цеолитов двух месторождений мы определяли методом профилактики недостаточности (3). В качестве критериев БД использовали комплекс показателей – содержание минеральных элементов в печени, почках, легких (т.е. в органах, наиболее интенсивно депонирующих элементы), в гомогенате всех органов и тканей. Далее выводили среднее значение этих показателей (табл. 7).

Таблица 7. Биологическая доступность минеральных элементов из природных цеолитов для поросят 2-5,5-мес возраста, оцененная по отложению элементов за опыт в отдельных органах (в % к полусинтетическому рациону без добавок микроэлементов)

Элементы	Шивыртуйские цеолиты					Тайжузгенские цеолиты				
	Отложено за опыт, %									
	В печени	В почках	В легких	е	опытное Среднее	В печени	В почках	В легких	е	опытное Среднее

Кобальт	47	87	67	99	7	116	7	13	86	1
					5		0	3		0
										1
Марганец	74	79	67	74	7	91	8	33	76	7
					4		0			0
Медь	90	80	64	82	7	90	9	68	77	8
					9		2			2
Цинк	85	89	81	90	8	104	9	76	79	8
					6		1			8
Никель	13	15	68	93	8	125	1	97	103	1
		3			2		6			2
							3			2
Хром	75	93	67	81	7	88	1	67	83	8
					9		0			7
							9			
Кадмий		56	100	89	7	60	6	40	90	6
	60				6		7			4
Свинец	57	12	45	92	7	78	1	64	86	9
		0			9		6			7
							0			

Эффективность использования в организме Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Mn из цеолитовых туфов невелика и составляет в среднем 64-122% относительно полусинтетического рациона без добавок микроэлементов. На основании предварительных расчетов было установлено (табл. 1), что с ПЦШ в основной рацион дополнительно вносится 6% меди и 8% цинка, а с ПЦТ – 10% меди и 4% цинка. Поэтому данные ПЦ в испытанных дозах нельзя рассматривать в качестве дополнительных источников этих элементов для животных, поскольку они вносятся в небольших количествах.

Эффективность использования из ПЦ других тяжелых металлов была неодинакова. Наиболее высокая величина использования оказалась у никеля: из ПЦТ в почках она составляла 163%, в печени – 125, легких – 97 и в целом организме – 103% по отношению к основному рациону. БД никеля из ПЦШ была существенно ниже и составляла 153, 13, 68 и 93% соответственно, несмотря на то, что этого элемента в ПЦШ больше, чем в ПЦТ.

Средняя величина БД кобальта из ПЦТ была равна 101% и практически совпадала с контролем. Из ПЦШ эта величина составляла всего 75%, хотя с шивыртуином в корм поросят было внесено в 2 раза больше кобальта, чем с ПЦТ. Аналогичная картина прослеживалась для свинца и кадмия.

В нашем опыте для Ni, Co, Cd, Pb замечена общая закономерность – чем в большем количестве вносится микроэлемент в

корм за счет добавок ПЦ, тем меньше будет его БД для организма свиней. В экспериментах других исследователей установлено, что при повышении потребления кадмия увеличивается синтез металлотионеина в почках и печени, что способствует связыванию и удалению из организма этого токсичного элемента (11).

Для хрома отмечена прямая зависимость – чем больше элемента вносится с ПЦ в корм, тем выше величина депонирования хрома в отдельных органах и в целом организме. Однако в нашем случае эти величины были все же ниже, чем в контроле. Так, с ПЦШ вносится 83% хрома относительно контроля, а с ПЦТ – 120%. Соответственно БД хрома из первого минерала в среднем равна 83%, а из второго – 87%.

Марганец составил исключение среди изученных металлов. ПЦШ повысили содержание марганца в рационе опытных животных в 6 раз, а ПЦТ – всего на 41%. Однако эффективность использования элемента в организме из двух цеолитов практически совпала (74 и 70% из ПЦШ и ПЦТ). Этим самым подтверждаются известные данные о весьма эффективном механизме выведения марганца из организма (5, 7).

Эффективность использования изучаемых металлов из ПЦ оказалась в основном ниже 100% по сравнению с контролем. Следовательно, они абсорбируются на цеолитах и далее выводятся из организма животных. Шивыртуин выводит из организма в основном Co, Mn, Pb, Ni, Cr, Cd, а ПЦТ – Cd и Mn.

Низкую БД практически всех изученных тяжелых металлов из ПЦШ и некоторых металлов из ПЦТ можно связать с разной растворимостью цеолитов в химусе поросят, различной степенью выхода из них элементов и неодинаковой эффективностью использования их в органах и тканях. Наши данные по экстрагируемости минеральных элементов из ПЦ 0,1 М HCl оказались недостаточно, чтобы на основании этого показателя можно было предсказать величину БД металлов для организма поросят. Содержание минеральных элементов, экстрагируемых из ПЦ 0,1 М HCl, слабо коррелировало с показателями БД, приведенными в табл. 7.

Общее содержание изучаемых минеральных элементов, экстрагируемых из ПЦ 6 М HCl, также не коррелирует с эффективностью их использования в организме подопытных животных. Полученные данные не дают возможности вывести единую закономерность между экстрагируемостью тяжелых металлов из ПЦ 0,1 или 6 М HCl и их БД для растущих поросят. В этом плане исследования следует продолжить.

Выводы

Природные цеолиты Шивыртуйского и Тайжузгенского месторождений, внесенные в корм растущих свиней в количестве 4%, значительно обогащают рационы Mn, Co, Ni, Cr, Pb. Однако биологическая доступность их, кроме никеля из тайжузгенского цеолита, низкая (менее 100% относительно полусинтетического рациона без добавок микроэлементов), поэтому данные минералы в рекомендуемых дозах не являются дополнительным источником Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Mn для животных.

Биодоступность никеля, кобальта и свинца для поросят из тайжузгенских цеолитов значительно выше, чем из шивыртуина (в среднем на 15-30%), а других изученных элементов почти одинакова.

Шивыртуйские цеолиты способны абсорбировать в желудочно-кишечном тракте и выводить из организма поросят Mn, Co, Ni, Cr, Cd, а тайжузгенские – Cd и Mn.

Не обнаружено четкой зависимости между экстрагируемостью минеральных элементов 0.1 М HCl из природных цеолитов и величиной их биологической доступности для молодняка свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барбер С.А. Биологическая доступность питательных веществ в почве. М., Агропромиздат, 1988:376 с.
2. Кальницкий Б.Д. Минеральные вещества в кормлении животных. Л., Агропромиздат, 1985:208 с.
3. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1988:103 с.
4. Кузнецов С.Г. Использование природных цеолитов в животноводстве. Обзорная информация. М., НИИТЭИагропром, 1994:44 с.
5. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность минеральных веществ для животных. Обзорная информация. М., ВНИИТЭИагропром, 1992:52 с.
6. Кузнецов С.Г., Скурихина О.Д., Овчаренко А.Г. Минеральный состав природных цеолитов различных месторождений. (в этом сборнике).
7. Ноздрюхина Л.Р. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. М., Наука, 1977:184 с.
8. Петункин Н.И. Проблемы аналитического контроля при использовании в АПК нетрадиционных видов минерального сырья. Аналитический контроль сельскохозяйственной продукции. Новосибирск, 1990:47-57.
9. Erbersdobler H. Factors influencing on uptake and utilization of macronutrients. Bioavailability 88. Abstr. Norwich, 1988: 105-106.
10. Cromwell G.L., Stahly T.S., Monegue H.J. Effect of source and level of copper stores in pigs. J. Anim. Sci., 1989, 67, 11: 2963-3002.
11. Lee J., Crace N.D., Rounce J.R. Cadmium accumulation in liver and kidneys of sheeps grazing ryegrass/white clover pastures. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 1994, 54: 31-34.
12. O' Dell B.L. Bioavailability of trace elements. Nutr. Rev., 1984, 42:301-308.
13. Van Dokkum W. The significance of specification for predicting mineral bioavailability. Bioavailability 88. Abstr. Norwich, 1988: 1024.

РЕГУЛЯЦИЯ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ В ЭНДОМЕТРИИ СВИНОМАТОК

И.А.Бурков, Т.П.Трубицина

Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

Установлено изменение содержания в эндометрии свиноматок Na, K, Ca, Mg в различные фазы полового цикла, а также в связи с осеменением и супоросностью. Получены данные о влиянии гормонов адаптации (кортизола и кортикотропина) на содержание указанных элементов в эндометрии и количество сперматозоидов в репродуктивных органах осемененных свиноматок. В свете этих данных рассматриваются некоторые стороны воспроизводительной функции свиноматок. В частности, феномен снижения концентрации кальция в эндометрии под влиянием повышенного уровня кортизола и кортикотропина может быть одним из звеньев в механизме негативного влияния стресса на репродуктивную функцию.

Введение

Известно, что система ионного гомеостаза клеток, органов и слизистых оболочек в значительной степени определяется концентрацией в них ионов натрия, калия, кальция и магния. Локальная концентрация этих элементов может сказываться на функциональном состоянии как эпителиальных клеток, так и иммунокомпетентных клеток эндометрия. Меняющийся состав секрета слизистой матки может оказывать влияние на транспорт, депонирование и капацитацию сперматозоидов в период осеменения.

Задача исследования – определить в эндометрии свиноматок содержание Na, K, Ca, Mg в различные фазы полового цикла, а также в связи с осеменением, супоросностью и введением гормонов адаптации (кортизола и кортикотропина) с целью выявления возможных корреляций между уровнем гормонов и содержанием в эндометрии Na, K, Ca и Mg для того, чтобы в свете этих данных рассмотреть некоторые стороны воспроизводительной функции свиноматок.

Материал и методы

Для определения в эндометрии содержания Na, K, Ca, Mg использовали высушенные образцы эндометрия, для чего 100 мг сухого вещества измельчали, заливали 1 мл смеси азотной и хлорной кислот (3:1) и сжигали до прозрачности на песчаной бане при температуре не выше 120°C. После сжигания объем жидкости доводили дистиллированной водой до 10 мл, переносили во флаконы (пробирки и флаконы подвергались предварительно обработке 6N HCl) и анализировали на содержание Ca и Mg методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии, а Na и K – пламенной фотометрией.

Кортизол (гидрокортизон ацетат) вводили внутримышечно, два раза в сутки, в дозе 125 мг на 100 кг массы. Кортикотропин вводили внутримышечно, двукратно – утром и вечером, из расчета 40 ЕД в сутки на 100 кг массы.

Результаты исследований

В стадии проэструса эндометрий свиноматок содержит 233,6 мг% натрия (12). По нашим данным (табл. 1) в другие фазы полового цикла (в частности, в лютеальную и овуляторную) концентрация натрия в эндометрии ниже – от 139 до 184 мг%. Максимальная концентрация натрия и калия в период проэструса выявлена при исследовании шеечно-влагалищной слизи свинок (15). Известно, что максимум содержания эстрогенов у свиней приходится на стадию проэструса (20-й день цикла). Представляет большой интерес и то обстоятельство, что в раннюю фолликулярную фазу – за 3 – 4 суток до начала охоты в крови повышается уровень кортизола, а за 2 суток до начала охоты его уровень вновь снижается (1). Можно полагать, что изменения концентрации кортизола в крови свинок в период полового цикла причастны не только к центральным механизмам регуляции уровня половых гормонов, но и к регуляции ионного гомеостаза половых органов. Представляют интерес данные, свидетельствующие о том, что изменения концентрации натрия, калия, кальция и магния в период полового цикла происходят не только в эндометрии, но и в секретах эндометрия и, благодаря этому, могут сказываться на физиологическом состоянии сперматозоидов при осеменении. Максимальная концентрация натрия, калия, кальция и магния в секрете матки выявлена в фолликулярную фазу полового цикла (9).

Таблица 1. Концентрация Na, K, Ca и Mg в эндометрии свиноматок в различные фазы полового цикла (мг% на сырую ткань)

Фазы цикла	Na	K	Ca	Mg

Центральная лютеальная	184±6	117±5,4	5,2±0,3	7,6±0,5
Овуляторная	139±4	133±9,2	12,7±1,4	10,9±2,5
4-5-й день цикла	160±10	131±9,3	7,0±1,4	11,7±1,1

Отдельные изменения в концентрации исследованных компонентов в эндометрии выявляются и в связи с осеменением и супоросностью (табл. 2). Особый интерес представляют изменения концентрации кальция. Концентрация кальция и цинка в слизистой маточно-влагалищного соединения у птиц влияет на транспорт и капацитацию сперматозоидов, а также на их оплодотворяющую способность (4).

В наших исследованиях изменения концентрации кальция в эндометрии свиноматок наблюдались в связи с осеменением как в период фолликулярной фазы, так и в период овуляторной. Повышение концентрации кальция в эндометрии отмечено на 33-45 дни супоросности.

Данные, полученные при введении кортизола и кортикотропина (табл. 3) позволяют констатировать отсутствие по большинству показателей существенной разницы между животными разных групп. Вместе с тем необходимо отметить, что в группах с введением кортизола к моменту исследования в эндометрии наблюдались достоверные изменения в концентрации кальция. Известно, что глюкокортикоиды снижают концентрацию кальция в крови. В наших исследованиях введение кортизола и кортикотропина обусловило снижение в эндометрии свиноматок концентрации кальция. Можно отметить также некоторое повышение концентрации натрия в эндометрии свинок в группах с более продолжительным введением кортикотропина и в группе с введением кортизола с начала охоты.

Известно, что кортизол вызывает усиление канальцевой реабсорбции натрия в почках. Отмечается, что эмоциональный стресс у овец, вызванный изолированием от стада, нарушает баланс электролитов и воды в организме. Концентрация натрия при этом в крови увеличивалась (13).

Таблица 3. Содержание Na, K, Ca, Mg, сухого вещества и белка в эндометрии свиноматок при введении гормонов (48-й час охоты)

Группы	n	Сухое вещество, %	Белок на сырую ткань, г%	Na	K	Ca	Mg
				на сырую ткань, мг%			
Контрольная	11	13,3±0,3	10,7±0,5	204±6	123±6	9,8±0,4 ^{*3}	7,3±0,4
Кортизол в течение 3-5 сут до охоты и 2 сут охоты	4	13,9±0,6	10,8±0,3	201±8	122±11	5,0±0,5 ^{*4}	7,8±0,6
Кортикотропин в течение 4-6 сут до охоты и 2 сут охоты	6	13,5±0,4	10,7±0,8	216±4 ^{*1}	124±7	5,5±1,5 ^{*5}	7,9±0,4
Кортикотропин в течение 1 сут до охоты и 2 сут охоты	6	12,6±1,7	10,2±0,9	212±8	123±8	6,7±2,1	7,3±0,4
Кортизол в течение 2 сут охоты	4	12,8±0,2	9,9±0,2	218±12	106±7	4,6±0,5 ^{*6}	7,6±0,5
Кортикотропин в течение 2 сут охоты	7	13,5±0,6	12,1±1,1	197±7 ^{*2}	130±9	8,8±1,5	8,0±0,5

Достоверность разницы: 1 со 2: P<0,05; 3 с 4: P<0,001; 3 с 5: P<0,02; 3 с 6: P<0,001

Данные литературы дают основание подчеркнуть две стороны сопряженности в действии гормонов и концентрации кальция. С одной стороны, кальций является медиатором эффекта гормонов и регуляторных пептидов (14, 6) и, следовательно, его концентрация в

тканях репродуктивных органов может оказать влияние на их функциональное состояние. С другой стороны, его концентрация в крови и структурах мозга, причастных к регуляции функции репродуктивных органов, может сказаться на уровне соответствующих гормонов. Получены данные на инкубированных клетках гипофиза телят, свидетельствующие о роли кальция при гонадолиберин-индуцированной секреции лютеинизирующего гормона (10).

Многие процессы, причастные к осуществлению репродуктивной функции, связаны с уровнем кальция в крови и в тканях. Большой интерес представляет зависимость от уровня кальция иммунокомпетентных клеток, функциональная активность которых сказывается на судьбе гамет самца в организме самки. Литическая активность Т-лимфоцитов значительно снижена в отсутствии внеклеточного кальция и восстанавливается при его добавлении (8). В наших исследованиях, отраженных в табл. 4, показано, что уровень кортизола и кортикотропина в организме свиноматок при осеменении сказывается на количестве сперматозоидов в яйцевом и утеротрубном соединении (депо сперматозоидов у свиней).

Таблица 4. Влияние кортизола и кортикотропина на количество сперматозоидов в репродуктивных органах свиноматок

Группы	n	Количество сперматозоидов (тыс)			
		В яйцевом (1-6 см)	В утеротрубно м соединении	В верхней половине рога матки	В теле матки
Контроль	11	4,5±2,3* ¹	148,8±47,9* ⁴	14,2±5,9	1,6±1,4
Кортизол в течение 2 суток охоты	4	1,0±1,0* ²	41,2±15,0* ⁵	12,0±12,0	0,75±0,75
Кортикотропин в течение 2 суток охоты	6	15,6±1,8* ³	394,0±151,0	29,8±12,7	5,0±2,7
Кортикотропин в течение суток до охоты и 2 суток охоты	5	8,4±3,8	115,4±32,9	22,8±11,7	8,2±2,6
Кортикотропин в течение 4-6 суток до охоты и 2 суток охоты	6	10,0±5,0	38,1±11,2* ⁷	4,4±1,8	7,2±2,8

Примечание: исследование проведено на 48-й час охоты, в течение которой свиноматки осеменены дважды - в начале охоты и через 24 часа, т.е. второе осеменение проведено за 24 часа до исследования. Достоверность разницы: 1 с 3: P<0,01; 2 с 3: P<0,001; 4 с 5: P<0,05; 4 с 7: P<0,05; 5 с 6: P<0,02.

В группе с введением кортикотропина в течение двух суток количество сперматозоидов в яйцевом и утеротрубном соединении на 48-й час охоты было больше, чем у свиноматок контрольной группы и группы с введением кортизола в течение двух суток охоты. Из 4-х свиноматок, которым вводили кортизол с начала охоты (в течение двух суток охоты) у 3-х свиноматок в яйцевом сперматозоиды не обнаруживались. В утеротрубном соединении у свиноматок этой группы и у свиноматок с продолжительным введением кортикотропина количество сперматозоидов было минимальным. Более вероятно, что действие гормонов опосредуется через клетки, участвующие в элиминации сперматозоидов. И лимфоциты, и нейтрофилы имеют структуры, рецептирующие кортикостероиды. Есть наблюдения, что глюкокортикоиды меняют рецепторную функцию плазматической мембраны. В присутствии 2×10^{-3} М гидрокортизона меняются адгезивные свойства нейтрофилов (11). Выявлено влияние кортикотропина на миграцию лимфоцитов и степень инфильтрации лимфоцитами репродуктивных органов свиноматок (3). Менее

вероятным представляется влияние на переживаемость сперматозоидов исследованных гормонов через секреты репродуктивных органов свиноматок, хотя на быках имеются данные о быстром поступлении в сперму экзогенного кортизола (7). Как на сперматозоиды, опосредованно через секреты, так и на состояние иммунокомпетентных клеток может оказывать влияние меняющийся под влиянием гормонов ионный гомеостаз тканей репродуктивных органов. Мы провели исследование на осемененных свиноматках. Поступающая же при осеменении сперма, являясь сложным набором антигенов, приводит к образованию в тканях матки комплексов антиген-антитело (2). Стимуляция антигенрецепторного комплекса иммунокомпетентных клеток приводит к быстрому повышению концентрации кальция, активации Т-клеток и генов для интерлейкина 2 (5). Таким образом, обращая внимание на изменение количества сперматозоидов в репродуктивных органах свиноматок при введении им гормонов, мы только делаем предположение о возможных механизмах, причастных к этому. Отмечая довольно слабую изученность механизма элиминации сперматозоидов в репродуктивных органах самки, необходимо констатировать почти полное отсутствие данных, касающихся причастности к этому гормонов и, в частности, глюкокортикоидов.

Выводы

Содержание в эндометрии неорганических компонентов – натрия, калия, кальция и магния меняется в связи с фазами полового цикла, осеменением и супоросностью, что может сказываться на функциональном состоянии как эпителиальных и иммунокомпетентных клеток эндометрия, так и при осеменении на сперматозоидах, а в последующем и на развитии плода. Статистически достоверное снижение содержания кальция в эндометрии под влиянием повышенного уровня кортизола и кортикотропина дает основание для предположения о том, что этот феномен может быть одним из звеньев в механизме влияния стресса на репродуктивную функцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурков И.А., Трубицина Т.П. Функциональная активность надпочечников свинок в связи со стадией полового цикла. Труды ВНИИФБиП с.-х. животны, 1983, 27: 91-98.
2. Бурков И.А. Иммунофизиологические особенности репродуктивной функции свиноматок. Автореф. дисс...дбн, Боровск, 1989.
3. Трубицина Т.П., Бурков И.А. Иммуноморфологическая характеристика репродуктивных органов и крови свинок в период овуляторной фазы под влиянием кортикотропина. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1984, 1(73): 47-54.
4. Bakst M.K., Richards M.P. Concentration of selected cation in turkey serum and oviductal mucosae. Poultry Sci., 1985, 64, 3: 555-563.
5. Bismuth G., Trautmann A., Debre P. Calcium et activation lymphocytaire T. M/S: Med. Sci., 1990, 6, 8: 762-769.
6. Fanestil D.D. The interaction of hormones with biological membranes. Physiology of membrane disorders. New York, 1978: 399-409.
7. Graves C.N., Eiler H. Cortisol content of semen and the effect of exogenous cortisol on the concentration of cortisol and minerals (Ca, Mg, K and Na) in semen and blood plasma of bulls. Biol. Reprod., 1979, 21, 5: 1225-1229.

8. Gray L.S., Gnarr J.R., Engelhard V.H. Demonstration of a calcium influx in cytolytic T lymphocytes in response to target cell binding. J. Immunol., 1987, 138, 1: 63-69.
9. Kather L., Smidt D. Untersuchungen über die Zusammensetzung des Uterussekrete beim Schwein. Berl. N.Munch.Tierarztl. Wschr., 1974, 87, 19: 372-374.
10. Kile J.P., Amoss M.S. The role of Ca^{2+} and Na^{2+} in luteinizing hormone secretion in calf hypophysis. Amer. J. Physiol., 1988, 255, 4: E469-E474.
11. Klempner M.S., Gallin J.I. Inhibition of neutrophil Fc-receptor function by corticosteroids. Clin. Exp. Immunol., 1978, 34: 137-142.
12. Kudilac E., Studencik B. Zmeny, v obsahy susiny a neckterych mineralii v endometriu prasnic behem pohlavniho cyclu. Veter. Med., 1975, 20, 3: 161-168.
13. Niezgoda J., Wronska D., Bobek S. Pierzchala K. Zmiany stezenia elektrolitow oraz osmolainosci osocza kwi u owies izolowanych od stada. Acta Agr. Et Silo. Ser. Zootechn., 1988, 27: 91-100.
14. Rubin R.P. Calcium and the secretory process. New York: Plenum Press, 1974.
15. Sato M., Masaki J., Niwa T. Cyclic changes in sodium, potassium and chloride concentration in cervico-vaginal mucus of gilts during estrous cycle. Tohoku J. Agric. Res., 1981, 32, 1: 34-39.

МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ ПРИРОДНЫХ ЦЕОЛИТОВ РАЗЛИЧНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ

С.Г. Кузнецов, О.Д. Скурихина, А.Г. Овчаренко

Лаборатория минерального питания

Изучен химический состав цеолитсодержащих туфов Хотынецкого (ПЦХ), Шивыртуйского (ПЦШ) и Тайжузгенского (ПЦТ) месторождений. В этих природных цеолитах основной минерал – клиноптилолит. По содержанию полезных минералов ПЦХ существенно отличается от других природных цеолитов, однако по физико-механическим свойствам большой разницы не выявлено. Ca, K, Cu, Mg в цеолитах трех месторождений, а также Zn, Mn, Ni, Pb в ПЦТ и P, Co, S, Pb, Cd в ПЦХ находятся в легкоусвояемой форме. В трех изученных цеолитах Cr и Ni, а также Fe и Zn в ПЦХ и Co в ПЦШ и ПЦТ представлены в труднодоступной форме. В ПЦШ и ПЦТ содержание Ni, Cd, Cr превышает ПДК. ПЦХ можно отнести к экологически чистым природным минералам.

Введение

Природные цеолиты (ПЦ) находят все более широкое применение в разных отраслях промышленности и сельского хозяйства как у нас в стране, так и за рубежом. Интерес ученых и практиков к ПЦ растет благодаря их уникальным сорбционным, ионообменным, каталитическим и молекулярно-ситовым свойствам. Самое большое распространение в природе имеет клиноптилолит, который встречается в виде трех основных катионных форм: калиевой, натриевой и кальциевой (5).

Наряду с цеолитами, содержание которых может колебаться от 10 до 95%, туфы содержат кварц, монтмориллонит, слюду, стекло, плагиоклаз, хлорид, кальцит, гидрослюда железа и другие сопутствующие минералы. Нецеолитовая фаза оказывает существенное влияние на состав и свойства ПЦ (1, 3).

Цеолитовые туфы различных месторождений различаются по цвету, прочности, физико-химическим свойствам. В них содержится

свыше 40 минеральных элементов. Наибольшую удельную массу среди них занимают оксиды Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na, P. Из микроэлементов, имеющих важное значение в кормлении животных, содержатся Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Se, Mo. Уровень токсичных элементов в ПЦ различных месторождений колеблется в широких пределах: свинца – от 2 до 600 мг/кг (ПДК – 50), кадмия – от следов до 2 мг/кг (ПДК – 0.4), мышьяка – от следов до 100 мг/кг (ПДК – 50), ртути – от следов до 20 мг/кг (ПДК – 0.1), фтора – от 200 до 1400 мг/кг (ПДК – 2000). В цеолитах отдельных месторождений содержание токсичных элементов значительно превышает ПДК, но они представлены малорастворимыми формами и их биологическая доступность для животных крайне мала (4, 5).

Следует иметь ввиду суммарный эффект токсичных элементов. В связи с этим проводят паспортизацию ПЦ каждого месторождения и даже отдельных его участков (пластов). Химический состав ПЦ зависит не только от месторождения, но и существенно изменяется в пределах одного месторождения, что осложняет паспортизацию опытных партий. Возможно, этим объясняется противоречивость результатов, полученных в опытах на животных (5).

Углубленное изучение свойств ПЦ открывает новые возможности для перспективного и широкомасштабного использования этого сырья во многих сферах человеческой деятельности. В связи с этим перед нами была поставлена задача изучить химический состав цеолитсодержащих туфов Хотынецкого (Орловская обл.), Шивыртуйского (Читинская обл.) и Тайжузгенского (Восточный Казахстан) месторождений для выяснения возможности их применения в кормлении животных.

Материал и методы

Образцы ПЦХ, ПЦШ, ПЦТ изучали в пяти параллельных пробах. Размер частиц анализируемых проб составлял до 500 мкм. Для предсказания биологической доступности минеральных элементов из ПЦ, проводили их экстрагирование водой, 0,1М и 6М HCl (6). Содержание минеральных элементов в пробах определяли на пламенном фотометре «Flapho» и атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-1N в воздушно-ацетиленовом пламени. Содержание J, Hg, As, S, P анализировали химическими методами (6)

Результаты и обсуждение

Хотынецкий цеолитсодержащий трепел имеет следующий минеральный состав (по данным ВНИИгеолнеруд, г. Казань): кварц – 15 (9-22), монтмориллонит – 9 (5-20), глауконит – 7 (5-10), кальцит – 7 (3-10), полевые шпаты, апатит, энгелит – 1%. ПЦХ имеют следующие физико-механические свойства (по данным АОТ «Орелгеология»): абсорбционные свойства – 3,3-8,0 %, полная влагоемкость – 12,5%, емкость обменных катионов по Са – 26, Mg – 1, К – 36, Al – 7, Na – 29%, термоустойчивость – 81-95%, кислотоустойчивость – 86%, общая пористость – 54%, механическая прочность – 30 кгс/см². По основным физическим и механическим свойствам ПЦХ существенно не отличаются от других ПЦ России.

Содержание клиноптиллолита в ПЦШ, ПЦТ и ПЦХ составляло 68, 60 и 33%, плотность – 2,39, 2,30 и 2,6 г/см³, ионообменная емкость – 1,77, 1,50 и 2,6 мг-экв/г, объемная масса – 1,56, 1,10 и 1,26 г/см³ соответственно.

Как видно из представленных выше цифр, изученные ПЦ представлены минералом клиноптиллолитом. Наименьшее его содержание (33%) обнаружено в ПЦХ. Глинистый минерал в ПЦХ представлен монтмориллонитом (5-20%), который дополняет и усиливает полезный эффект цеолита. Важное значение имеет кальцит (3-10%).

Изученные ПЦ являются типичными алюмосиликатами с нормальным содержанием оксида кремния, пониженным уровнем оксида алюминия и довольно высоким содержанием оксидов кальция, железа, магния (табл. 1).

Таблица 1. Химический состав природных цеолитов

Соединение, %	ПЦШ	ПЦТ	ПЦХ
SiO ₂	68,5	65,9	65,4
Al ₂ O ₃	13,9	13,0	8,45
CaO	3,29	3,09	7,53
MgO	0,14	0,75	1,65
Na ₂ O	1,28	1,30	0,22
K ₂ O	2,69	2,96	1,78
MnO	0,15	0,09	0,02
Fe ₂ O ₃ +FeO	1,95	1,30	3,33
SO ₃	–	–	0,02
TiO ₂	–	–	0,54
Потери после прокаливании	8,4	11,6	10,5

Известно, что доля элементов в кормовой добавке, растворимая в воде и 0,1 М НСl (концентрация кислоты в желудке животных), в основном доступна для всасывания, а та часть элемента, которая не экстрагируется в 0,1 М НСl при 37° С, по существу не усваивается в организме животных (5). Количество элемента, растворимое в 6 М НСl, показывает общее его содержание в минерале.

Результаты экстрагируемости минеральных элементов водой и растворами соляной кислоты из цеолитовых туфов трех месторождений представлены в таблице 2. Из полученных данных следует, что Са, К, Си, Mg в трех цеолитах, а также Zn, Mn, Ni, Pb в ПЦТ и Р, Со, S, Pb, Cd в ПЦХ находятся в легкоусвояемой форме. Железо в ПЦШ представлено более растворимыми формами, чем в двух других цеолитах. Хром и никель в трех цеолитовых туфах, а также цинк и

железо в ПЦХ, кобальт в ПЦТ и ПЦШ находятся в труднодоступной форме.

Валовое содержание токсичных элементов в ПЦХ не превышает предельно допустимых концентраций для минеральных подкормок (2). Только содержание кадмия в ПЦХ находится на уровне ПДК (0,4 мг/кг). В ПЦШ и ПЦТ содержание Ni, Cd, Cr превышает ПДК, но эти элементы, вероятно, находятся в трудноусвояемой форме, так как слабо экстрагируются 0,1 М HCl.

Следует отметить, что концентрация токсичных элементов в ПЦХ относительно других цеолитов довольно низкая. То же самое следует сказать в отношении радионуклидов (уран-236 – 8, торий-232 – 13, радий-226 – 8, калий-40 – 55 Бк/кг, данные АООТ «Орелгеология»).

Таблица 2. Экстрагируемость минеральных элементов из природных цеолитов, мг/кг сухого вещества

Показатели	Растворители								
	Вода	0,1М HCl	6М HCl	Вода	0,1М HCl	6М HCl	Вода	0,1М HCl	6М HCl
	Шивыртуйское месторождение			Тайжузгенское месторождение			Хотынецкое месторождение		
Нерастворимый осадок, %	94,5	93,5	78	98,5	98,0	90,5	91,5	79,8	65,0
Натрий	2750	6600	7750	1751	7328	15050	890	2600	3170
Калий	600	4100	12400	95	1030	1942	3980	5970	13270
Кальций	640	11930	23130	100	3160	6130	189	16480	19970
Магний	130	720	4650	18	630	3580	42,4	774	2852
Железо	970	3670	17100	22	200	4960	13,8	28,9	11147
Медь	3,1	3,8	5,8	2,1	7,9	9,6	0,32	3,11	11,6
Цинк	6,0	16	41	0,0	11	22	0,0	3,33	47,3
Кобальт	0,0	0,0	22	0,0	0,0	20	0,0	1,67	4,42
Марганец	31	296	2910	1,8	121	199	0,23	15,95	80,67
Свинец	0,0	0,0	56	0,0	16	40	0,0	5,50	12,38
Кадмий	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	32	0,0	0,37	0,59
Хром	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	9,0	0,0	0,63	29,1
Никель	0,0	0,0	40	0,0	4,2	33	0,0	3,38	33,85
Йод	—	—	—	—	—	—	0,0	0,0	1,68
Ртуть	—	—	—	—	—	—	0,0	0,0	0,05
Мышьяк	—	—	—	—	—	—	0,0	0,0	2,5
Сера	—	—	—	—	—	—	61,0	140	340
Фосфор	—	—	—	—	—	—	57,6	471	587

Примечание: — элемент не определяли.

Выводы

1. Природные цеолиты Шивыртуйского, Тайжузгенского и Хотынецкого месторождений представлены минералом клиноптилолитом.
2. Хотынецкие цеолитсодержащие трепела по содержанию полезных минералов (клиноптилолит, монтмориллонит, кальцит) существенно отличаются от других природных цеолитов России, однако по основным физико-механическим свойствам разница оказалась незначительной.
3. Са, К, Си, Mg в цеолитах трех месторождений, а также Zn, Pb, Mn, Ni в ПЦТ и Р, Со, S, Pb, Cd в ПЦХ находятся в легкоусвояемой форме. Содержание Cr и Ni в ПЦШ, ПЦТ и ПЦХ, а также Zn, Fe в ПЦХ и кобальта в ПЦШ и ПЦТ представлено трудноусвояемыми формами.
4. В Шивыртуйских и Тайжузгенских цеолитовых туфах общее содержание Ni, Cd, Cr превышает ПДК. Содержание контролируемых токсичных элементов (Hg, Cd, Pb, As, F) и радионуклидов (уран, торий, радий, калий) в ПЦХ ниже установленных ПДК. Хотынецкие цеолиты можно отнести к экологически чистым природным минералам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов В.И., Белицкий И.А. Некоторые проблемы ионообменной способности цеолитсодержащих пород и возможности их практического использования. Использование природных цеолитов в народном хозяйстве. ч.1. Новосибирск, 1991: 82-97
2. Временный максимально допустимый уровень содержания некоторых химических элементов и госсипола в кормах для сельскохозяйственных животных и кормовых добавках. М., 1987.
3. Корец А.Я., Томшин А.Т., Рубайло А.С. и др. Использование основных физико-химических параметров цеолитовых пород Пашенского месторождения Красноярского края. Использование природных цеолитов в народном хозяйстве. ч.1. Новосибирск, 1991:71-75.
4. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность минеральных веществ для животных. М., 1992.
5. Кузнецов С.Г. Использование природных цеолитов в животноводстве. М., 1994.
6. Методические указания по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1988.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРЕМИКСОВ НА ОСНОВЕ САПРОПЕЛЕЙ

В.Д. Евтишенков, С.Г. Кузнецов, В.Д. Омельченко,
А.Г. Овчаренко, Т.Е. Рябых, М.С. Долгова

Лаборатории минерального и витаминного питания

При хранении стандартного премикса (П 5-1, наполнитель отруби) и опытных премиксов (наполнитель высушенный сапропель) в течение 7 месяцев их физико-химические свойства существенно не изменились. Йод, витамины Е, В₃, В₆, каротин в сапропеле довольно устойчивы, а витамин В₁₂ за три месяца хранения сапропеля распадается наполовину. Сапропель снижает устойчивость к разрушению витаминов А, В₁₂, не влияет на сохранность витамина Е и повышает стабильность йода, витаминов В₃ и В₆, добавляемых в премиксы.

Введение

При интенсивном производстве продуктов животноводства наиболее остро стоит проблема обеспечения рационов белком и биологически активными веществами (БАВ), которых недостаточно в основных кормах. Это требует изыскания новых нетрадиционных источников сырья, способных в значительной мере устранить в рационах дефицит минеральных элементов, витаминов и ряда органических соединений. Одним из естественных и мало используемых источников такого сырья является озерный сапропель, который представляет собой ценный природный комплекс органических и минеральных веществ, образованных в результате отмирания растительных и животных организмов. Сапропели содержат макро- и микроэлементы, витамины, аминокислоты, гуминовые соединения, стероиды, углеводы и другие БАВ, многофакторно воздействующие на организм животного. В последние годы предложено использовать сапропели в качестве источника БАВ и наполнителя премиксов (1-3, 5, 7-9). Однако в литературе практически отсутствуют сведения о физико-химических свойствах премиксов на основе сапропелей и сохранности в них БАВ. В связи с этим перед нами была поставлена задача изучить технологические свойства премиксов на основе сапропелей, а также сохранность в них йода и основных витаминов.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи были отобраны образцы сапропеля с глубины 2 м и более озера Неро Ярославской области. Образцы были высушены и измельчены в АО «Сапропель-Неро» в соответствии с техническими условиями ТУ 73-93 (7). Размер частиц был в пределах 0,1-1 мм. В образцах сапропеля определяли содержание питательных веществ, макро- и микроэлементов, аминокислот, витаминов, токсичных и вредных веществ (4). На основании химического анализа сапропелей озера Неро были разработаны рецепты опытных премиксов (табл. 1). В институте были приготовлены стандартный 1%-ный премикс для цыплят-бройлеров П 5-1 на пшеничных отрубях, опытный витаминно-минеральный премикс и витаминная часть опытного премикса (без добавления микроэлементов) на сапропеле. Все премиксы не содержали витамин Н, антиоксиданты и антимикробные препараты. В табл. 1 приведено количество БАВ, введенных в премиксы за счет витаминных препаратов и солей микроэлементов. Стандартный и два опытных премикса, а также сапропель были заложены на хранение в бумажных четырехслойных мешках в складском помещении в течение 7 месяцев. В этих образцах определяли сохранность йода, некоторых витаминов, физико-химические свойства премиксов (4,6). Образцы брали на анализ до помещения премиксов на хранение, через 1, 3 и 7 месяцев после начала хранения.

Результаты и обсуждение

Детальный химический анализ сапропелей озера Неро описан нами ранее (3). В табл.1 приведено содержание витаминов и микроэлементов, содержащихся в высушенном сапропеле. Результаты изучения физико-химических свойств премиксов и сапропелей приведены в табл. 2. При хранении образцов в течение 7 мес в нормальных складских условиях достоверное повышение влажности (на 8,5%) произошло лишь в сапропеле и небольшое увеличение (на 3,9%) отмечено в витаминной части опытного премикса. Следовательно, добавление сапропеля в качестве наполнителя не приводит к существенному изменению гигроскопических свойств премикса. Объемная масса поверхностного слоя премиксов и сапропеля также не претерпела существенных изменений.

Таблица 1. *Рецептура премиксов на основе сапропелей озера Неро*

Компоненты, г на 1 кг премикса	Стандартный премикс П5-1, 1%-ный (партия 1)	Опытный премикс (ОП), 2%-ный (партия 2)	Витаминная часть ОП, 2%-ный (партия 3)	Сап ропель, мг/кг сухого вещества (партия 4)
Витамины:				
А, тыс. МЕ	1000	500	500	—
Д ₃ , тыс. МЕ	150	75	75	340 МЕ
Е	1	0,5	0,5	6,9
В ₁	0,2	0,1	0,1	0,24
В ₂	0,3	0,15	0,15	6,8
В ₃	1	0,5	0,5	4,9

	50	12,5	12,5	не определяли
B ₄				
B ₅	3	1,5	1,5	7,3
B ₆	0,3	0,15	0,15	4,6
B _c	0,05	–	–	40
B ₁₂ , мг	2,5	0,62	0,62	0,222
	0,2	0,1	0,1	не определяли
К				
	5	2,5	2,5	не определяли
С				
Железо	1	–	–	34200
Марганец	5	2	–	353
Медь	0,25	0,06	–	41
Цинк	5	2,5	–	42
Кобальт	0,1	0,025	–	14,7
Йод	0,07	0,028	–	2,44
Селен	0,02	0,01	–	0,1
Отруби пшеничные	до 1 кг	–	–	--
Сапропель	–	до 1 кг	до 1 кг	

Таблица 2. Физико-химические свойства премиксов и сапропелей

Показатели	Номер партии			
	1	2	3	4
Влажность при 65 ⁰ С, %				
в начале опыта	10,9 ± 0,1	7,5 ± 0,4	5,7 ± 0,3	3,6 ± 0,1
через 7 месяцев	10,9 ± 0,2	7,6 ± 0,1	5,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1*
Объемная масса поверхностного слоя, г/л				
в начале опыта	340	850	850	950
через 7 месяцев	345	870	860	970
Величина угла откоса (°),				
в начале опыта	45,5 ± 0,5	35,7 ± 0,3	35,9 ± 0,5	39,5 ± 0,7
через 7 месяцев	42,9 ± 0,2*	37,9 ± 0,2*	38,1 ± 0,2*	39,0 ± 0,3
Распыляемость, %				
в начале опыта	12,0 ± 0,3	22,1 ± 0,6	22,0 ± 0,6	20,6 ± 0,4
через 7 месяцев	14,5 ± 0,1*	20,8 ± 0,9	20,5 ± 0,8	17,1 ± 0,2*

* – Разница статистически достоверна

Величина угла откоса стандартного премикса в процессе длительного хранения уменьшилась на 5,7% ($P > 0,05$), опытных премиксов возросла на 6% ($P > 0,05$), а сапропеля – не изменилась. Распыляемость стандартного премикса возросла на 2,5%, опытных премиксов – несколько снизилась (на 1,3-1,5%), а сапропеля уменьшилась на 3,5% ($P > 0,05$). Эти данные показывают, что сапропель в некоторой степени снижает сыпучесть премиксов за счет поглощения влаги. Как при закладке на хранение, так и через 7 мес продукты обладали слабой сыпучестью. При пропускании их через воронку с диаметром выпускного отверстия 15 мм и углом конуса воронки 60° происходит зависание продуктов из-за сводообразования в выпускном отверстии. Скорость высыпания в таких случаях принимается за нуль.

Сохранность йода и витаминов в процессе хранения опытных образцов показана в табл. 3. За 7 мес хранения в стандартном премиксе распалось 63,6% йода, а в опытном – 56,4%, т.е. на 7% меньше. В витаминной части ОП и в самом сапропеле произошло даже увеличение уровня йода, очевидно, в результате поглощения его из воздуха складского помещения.

Витамин А в стандартном премиксе за 1 мес хранения разрушился на 59%, за 3 и 7 месяцев соответственно на 60 и 66 % от исходного

количества. В опытных премиксах на основе сапропелей этот витамин разрушался очень быстро. За 1 мес хранения витамин А распался на 74-79%. Через 3 мес хранения остались только следы ретинола. В сапропеле витамин А не обнаружен.

Витамин Е в стандартном премиксе за 1 мес хранения разрушился на 58%. Далее темпы распада альфа-токоферола значительно снизились. Через 7 мес хранения сохранилась 1/3 часть витамина Е. Использование сапропеля в качестве наполнителя способствовало повышению сохранности витамина Е, особенно в первый месяц хранения (на 4-8% по сравнению со стандартным премиксом). Через 3 мес хранения сохранность витамина Е во всех премиксах была по существу одинаковой (40-43%), а через 7 мес в опытных премиксах оказалось несколько меньше витамина, чем в стандартном премиксе. Витамин Е, содержащийся в самом премиксе, довольно устойчив (за 7 мес хранения распалось всего 25%). Исключение микроэлементов из опытного премикса не отразилось на сохранности витаминов Е и А.

Таблица 3. Сохранность йода и витаминов при хранении премиксов и сапропелей

Номер партии	В начале опыта	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 7 мес
Йод, мг/кг воздушно-сухого вещества (ВСВ)				
1	70			25,5±0,6
2	28			12,2±0,8
3	2,8±0,4			3,6±0,4
4	2,8±0,4			2,9±0,5
Витамин А, тыс. МЕ/кг ВСВ				
1	1000	414±4,3	371±7,9	310±7,7
2	500	130±11	19±0,4	16±1,1
3	500	103±10	30±1,6	20±2,5
Витамин Е, мг/кг ВСВ				
1	1000	421±9	397±25	340±10
2	500	250±18	214±10	134±10
3	500	230±16	210±15	142±12
4	6,7±0,9	6,1±0,2	5,1±0,1	5,0±0,2
β-каротин, мг/кг ВСВ				
2	1,24	0,75	0,43±0,03	0,39±0,01
3	1,24	0,75	0,45±0,01	0,42±0,01
4	1,24	0,75	0,69±0,01	0,64±0,01
Витамин В₃, мг/кг ВСВ				
1	1000	408±0,3	231±3,0	185±12
2	500	404±0,5	274±4,1	181±14
3	500	407±1,7	276±5,2	181±10
4	4,14±0,04	4,04±0,01	2,78±0,01	1,90±0,03
Витамин В₆, мг/кг ВСВ				
1	300	263±0,3	156 ±1,4	122±4,0
2	150	153±0,9	91± 3,0	61±3,0
3	150	159±0,9	94 ±9,0	58±1,5
4	3,58±0,31	3,79±0,1	1,93± 0,03	1,26±0,02
Витамин В₁₂, мкг/кг ВСВ				
1	2500	2290±20	2130±3	1410±22
2	620	220±10	220±3	95±5,1
3	620	220±15	180±5	68±7,5
4	210±30	140±5,5	100±1,5	28±3,2

Представляло определенный интерес изучить сохранность β -каротина, наиболее активной формы каротиноидов, содержащихся в сапропелях. За 1 месяц хранения во всех образцах распалось 40% β -каротина, за 3 месяца – 64-65% в опытных премиксах и 44% – в сапропеле, за 7 месяцев – 66-69% в ОП и 48% – в сапропеле. Добавление витаминов и микроэлементов ускорило разрушение пигмента в среднем на 20%, но только после трех месяцев хранения премиксов. Вклад микроэлементов в разрушение β -каротина небольшой. Остальные формы каротиноидов в сапропелях еще более устойчивы, так как за 1 месяц хранения их количество не уменьшилось.

За 1 месяц хранения в стандартном премиксе распалось 59% витамина B_3 , за 3 мес- 77 и за 7 мес – 81%. Сапропель повысил устойчивость этого витамина почти в 2 раза (за 1, 3 и 7 месяцев распалось 19, 45 и 64%, причем одинаково в обоих ОП). Витамин B_3 в самом премиксе довольно устойчив. Сходная динамика отмечена в отношении витамина B_6 . В течение 1-го месяца хранения витамин B_6 практически не распадался, особенно в ОП и сапропеле. За 3 месяца хранения в стандартном премиксе распалось 48% витамина, а за 7 мес – 59%. В опытных премиксах за это время распалось соответственно 37-39 и 59-61% витамина B_6 . Следовательно, сапропель повышал устойчивость витаминов B_3 и B_6 в премиксах. Добавление микроэлементов не приводило к ускорению разрушения этих витаминов, а также витамина B_{12} .

В премиксе на пшеничных отрубях витамин B_{12} сохранялся значительно лучше, чем на сапропелевой основе. Так, в стандартном премиксе витамин B_{12} в течение трех месяцев хранения почти не распадался, а в опытных премиксах разрушился на 64-71%. За 7 месяцев в стандартном премиксе он распался на 44%, а в ОП – на 85-89%. В самом сапропеле витамин B_{12} неуклонно разрушался (на 33, 52 и 87% за 1, 3 и 7 мес хранения).

Известно, что содержание витаминов в сапропелях колеблется в больших пределах и заметно снижается при хранении, особенно в незащищенных от солнца и осадков условиях (8, 9). В процессе хранения сырого сапропеля в течение 1 месяца терялось до 20% витаминов группы В. Такие же потери происходили при его сушке и гранулировании (5). Относительно устойчивости йода и витаминов в премиксах на сапропелевой основе сведений в литературе мы не встретили.

Выводы

1. При хранении стандартного премикса П 5-1 (наполнитель пшеничные отруби), опытных премиксов на сапропелевой основе и сапропеля в течение 7 месяцев их физико-химические свойства (гигроскопичность, объемная масса, сыпучесть, распыляемость) существенно не изменяются, хотя распыляемость высушенного сапропеля снижается за счет увеличения влажности продукта.

2. За 7 месяцев хранения в стандартном премиксе распадается 64% йодата калия, а в опытном – на 7% меньше. Йод в сапропеле находится в стабильной форме и связан, очевидно, с органическим веществом. Витамины Е, B_3 , B_6 , β -каротин и общие каротиноиды в сапропеле довольно устойчивы, тогда как витамин B_{12} за 3 месяца хранения сапропелей распадается наполовину, а за 7 мес – почти полностью (на 87%).

3. Включение в премиксы высушенного сапропеля из озера Неро Ярославской области в качестве наполнителя значительно снижает устойчивость к разрушению витаминов А и B_{12} , не изменяет сохранность витамина Е и повышает стабильность добавляемых в

премиксы витаминов В₃ и В₆. Включение в сапропелевые премиксы солей микроэлементов Cu, Zn, Mn, Co, J, Se существенно не изменяет сохранность добавляемых в них витаминов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Использование сапропелей в кормлении животных (рекомендации). Минск, 1990:12с.
2. Карабанов А.М. Биологические основы применения сапропелей в животноводстве. Автореф. докт. дисс. М., 1993:44 с.
3. Кузнецов С.Г., Евтишенков В.Д., Речинская О.В., Юдина Е.В. Химический состав сапропелей различных месторождений. Зоотехния, 1997, 10:19-22.
4. Методы биохимического анализа (справочное пособие). Под ред. Б.Д. Кальницкого. Боровск, 1997:356 с.
5. Пестис В.К. Обоснование использования озерных сапропелей в практике кормления сельскохозяйственных животных и птицы. Автореф. докт. дисс. Жодино, 1997:35 с.
6. Пестов Н.Е. Физико-химические свойства зернистых и порошкообразных химических продуктов. М.-Л., 1947:238 с.
7. Сапропель кормовой (органо-минеральная добавка). Единые технические условия. ТУ 73-93. М., 1993.
8. Слесарев И.К., Пилук Н.В. Минеральные источники Беларуси для животноводства. Жодино, 1995:168-228.
9. Солдатенков П.Ф. Действие сапропеля на физиологические процессы в животном организме. Л., 1976:171 с.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ФУНКЦИИ ЛАКТАЦИИ И ВОСПРОИЗВОДСТВА У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ

К.И. Бахитов, Л.А. Калашиник

В работе представлены результаты двухлетних наблюдений за проявлением воспроизводительной функции у коров с различным потенциалом продуктивности в начале лактации с учетом их обеспеченности в энергетической части рациона. Установлено, что в период интенсивной лактации потери живой массы у высокопродуктивных коров в 2,25 раза больше, чем у малопродуктивных животных. Живая масса низкопродуктивных коров стабилизируется к середине второго месяца лактации, что и создает благоприятные условия для более ранней инволюции репродуктивных органов и возобновления циклической активности в яичниках, сокращая сроки их плодотворного осеменения по сравнению с высокопродуктивными коровами.

Гормональная стимуляция коров, приуроченная к концу второго месяца лактации, позволила сократить интервал от отела до первого осеменения на 11,7 и 12,8 дней и плодотворного – на 14,0 и 35,4 дня соответственно у опытных коров обеих групп по сравнению с контролем. Продолжительность сервис-периода при этом была в пределах 88-90 дней, независимо от продуктивного потенциала коров.

Введение

Одним из критических периодов в репродукционном цикле коровы является начало лактации, особенно первые два месяца после отела. Интенсивная нагрузка на организм коров в этот период обусловлена, с одной стороны, нормализацией общего состояния животного после отела, с другой – увеличением молокопродукции (в первые 3 месяца от коров обычно получают до 40-45% планируемого удоя), а также

восстановлением функции органов воспроизводительной системы. Характерным признаком последнего является возобновление циклических эстральных процессов, которые обычно прекращаются лишь после плодотворного осеменения и наступления стельности.

У коров с высоким потенциалом продуктивности сроки восстановления репродуктивной активности в значительной степени зависят от их физиологического состояния перед отелом, наличия (или отсутствия) послеродовых осложнений, а также интенсивности лактации в течение первых двух месяцев после отела.

В практике животноводства одним из основных критериев успешной подготовки коров к продуктивному периоду является состояние их упитанности перед отелом: считается, что к концу беременности у коров должен быть накоплен достаточный запас питательных веществ для использования их после родов на образование молока (1, 2). Однако по литературным данным мнения о влиянии кондиции коров перед отелом на их последующую продуктивность и репродуктивные качества неоднозначны: ряд исследователей (3, 10) утверждают, что на продуктивность коров значительно меньше влияет их упитанность перед отелом, чем уровень потребления кормов в начале лактации. Более того, есть наблюдения (18, 19) о том, что высокий уровень кормления сухостойных коров перед отелом сопровождается увеличением числа послеотельных нарушений, таких как задержание последа, эндометриты, кисты яичника, случаи "тихой" охоты и удлинения интервалов до осеменения и оплодотворения. В то же время Смит с соавторами (17) считают, что высокий уровень кормления и хорошие кондиции перед отелом не оказывают отрицательного влияния на последующие репродуктивные качества животных.

В первые недели лактации основной проблемой в содержании высокопродуктивных коров является обеспечение их достаточным количеством энергии (13), так как их потребность в чистой энергии на пике лактации превышает размеры ее потребления из корма (8). Увеличение количества потребляемого корма в первые 3-4 недели после отела не соответствует темпам роста молокопродукции, что приводит к отрицательному балансу энергии и увеличивает ее мобилизацию из резервов тела (6). При этом, баланс энергии остается высоконегативным до пика лактации, затем по мере снижения удоев стабилизируется (5).

Использование внутренних резервов организма во время интенсивной лактации у многих коров приводит к заметным потерям в живой массе. Ряд исследователей (4, 20) считают, что при всех уровнях потребления корма потери резервов живой массы, идущие на молокопродукцию, у высокоудойных коров значительно выше, чем у малопродуктивных животных. Объясняется это тем, что молочные коровы, отселекционированные на высокую продуктивность, оказались не в состоянии поддерживать положительный баланс энергии во время пика лактации, что и приводит к мобилизации ее из резервов тела (7). При этом несоответствие количества поступающих в организм коровы питательных веществ их возрастающим потребностям на пике лактации, вызывающее нарушение обменных процессов, прежде всего обусловлено недостатком энергии (14), иногда при одновременном избытке потребляемого с кормом протеина (16).

По данным ряда исследователей (12, 21), наблюдается высокая коррелятивная зависимость репродуктивных способностей коров (периода от отела до первой овуляции, оплодотворяемости по первому осеменению и других показателей воспроизводства) от величины потерь живой массы животных в течение первых 6 недель после их отела. Однако значительной корреляции между показателями воспроизводства и величиной удоев они не обнаружили. Есть мнение о том (15), что

баланс энергии в начале лактации больше влияет на продолжительность интервала от отела до оплодотворения за счет низкой оплодотворяемости у высокоудойных коров (8, 9, 11, 12). Следовательно, отрицательный баланс энергии во время интенсивной лактации, помимо удлинения сроков инволюции матки и начала циклирования деятельности яичников, снижает эффективность первого и последующих осеменений. Предполагается, что у животных с высокой продуктивностью влияние лактации на проявление репродуктивных качеств происходит путем изменения эндокринного профиля в их организме (в частности, секреции ЛГ, ФСГ и прогестерона), ассоциированного с отрицательным балансом энергии.

Исходя из вышеизложенного, в задачи настоящего исследования входило изучение возможной взаимосвязи этих трех факторов: интенсивности лактации, размеров потерь живой массы и показателей воспроизводства в течение первых двух месяцев после отела у коров с различным потенциалом продуктивности.

Материал и методы

Исследования проводили в течение двух лет (1996-1997 гг.) на полновозрастных коровах черно-пестрой породы в ГПЗ "Ворсино" Калужской области. Для опытов были отобраны две группы коров-аналогов по срокам отела и фазе лактации, отличающихся по продуктивности за предыдущие лактации: 1-я – низкопродуктивные (с удоем 4000 кг молока за лактацию), 2-я – высокопродуктивные (с удоем от 6000 кг и более). В каждой опытной группе имели контрольных животных-аналогов по продуктивности и фазе лактации. Коров обеих групп в течение всего периода наблюдений содержали в общем стаде комплекса.

Рационы кормления коров на молочном комплексе ГПЗ "Ворсино" по количеству скармливаемых грубых и сочных кормов соответствовали детализированным нормам, однако количество скармливаемых концентрированных кормов в рационе коров в отдельные месяцы зимне-стойлового периода было на 25-30% ниже потребности животных соответствующего уровня продуктивности и компенсировались за счет других видов кормов.

В ходе эксперимента проводили наблюдение за характером проявления воспроизводительной функции у животных обеих групп. В течение первых двух месяцев после отела у коров обеих групп проводили с двухнедельными интервалами исследование репродуктивных органов, ежемесячно регистрировали интенсивность лактации по среднесуточным удоям и изменения в живой массе путем взвешивания и снятия промеров по общепринятым методикам.

Поскольку в опыте в течение первых двух месяцев после отела изучали возможные взаимосвязи функций лактации и воспроизводства в естественных условиях, то гормональную стимуляцию репродуктивной системы в опытных подгруппах обеих групп начинали не ранее, чем через 7-8 недель после их отела. Стимуляция включала в себя внутримышечную инъекцию 200 мг амола (гестагена пролонгированного действия) в виде 1%-ного масляного раствора с последующим введением 3000-4000 м.е. ГСЖК. Животным, не пришедшим в охоту после основной обработки, через 10 дней вводили I дозу простагландина – эстуфалана. Результаты эксперимента проанализированы с использованием статистических методов.

Результаты и обсуждение

В результате анализа фактического расхода кормов по молочному комплексу ГПЗ "Ворсино" за опытный период было установлено, что дефицит в концентрированных кормах в течение

периода наблюдений составлял для высокопродуктивных коров 3,3-4,0 кг в сутки на голову, для низкопродуктивных животных – 0,3-1,0 кг. Подобная структура рационов на пике лактации привела к заметному дефициту энергетической части потребляемого корма, увеличивая число послеотельных нарушений и осложняя дальнейшее воспроизводство.

Количество случаев послеродовых осложнений в виде задержания плодных оболочек и эндометритов в острой или хронической (чаще скрытой) формах, являющихся следствием нарушения обменных процессов, у высокопродуктивных коров наблюдали примерно в два раза чаще (у 13 из 39), чем в группе малопродуктивных животных (у 6 из 45 коров).

Интенсивность лактации в течение первых трех месяцев после отела значительно различалась по группам: среднесуточный удой по группе высокопродуктивных коров был на 7,5; 6,2 и 4,9 кг больше, чем у животных первой опытной группы, соответственно в 1-й, 2-й и 3-й месяцы лактации (табл. 1).

Таблица 1. Интенсивность лактации и изменения живой массы у коров с различным потенциалом продуктивности

Опытные группы	Количество животных	Среднесуточный удой коров по месяцам лактации, кг			Изменения живой массы коров, кг				
					по месяцам лактации в среднем на 1 гол./неделю			в среднем на 1 гол. за период	
		1	2	3	1	2	3	первые 2 месяца	90 дней
1	25	13,7±0,7	13,2±0,8	13,7±1,1	-3,5	-0,4	+3,8	-15,6	-4,0
2	22	21,2±0,5	19,4±0,9	18,6±0,8	-6,0	-2,8	+2,4	-35,1	-25,4

Примечание: 1-я группа – низкопродуктивные коровы, 2-я группа – высокопродуктивные коровы.

Поскольку опытные группы коров разного потенциала продуктивности формировались из числа животных, отелившихся в период с февраля до начала апреля, последующие учетные месяцы лактации совпали с переводом скота на пастбищное содержание. Естественно, что улучшение условий кормления и содержания в этот период благоприятно сказалось на молокопродукции, причем отдача высокопродуктивных коров была выше, чем малопродуктивных: разница в среднесуточных удоях у коров 1-й и 2-й групп на 4-й и 5-й месяцы лактации составила, соответственно, 7,3 и 7,0 кг в пользу высокоудойных животных.

Как видно из данных таблицы 1, высокая интенсивность лактации в сочетании с некоторым недостатком в энергетической части рациона коров привела к значительному использованию внутренних резервов организма: в группе высокопродуктивных коров размеры потерь в живой массе в течение первых двух месяцев после отела составили, соответственно, 6,0 и 2,8 кг/неделю; у малопродуктивных коров этот показатель оказался значительно ниже (3,5 и 0,4 кг в неделю на 1 голову, соответственно). У отдельных животных с низким потенциалом продуктивности уже в середине 2-го месяца лактации наблюдали заметный прирост живой массы, что свидетельствует о нормализации обменных процессов в их организме и восстановлении положительного баланса энергии. Общие же потери в живой массе по группе высокопродуктивных коров в течение первых 2-х месяцев лактации составили в среднем 35,1 кг/голову, а у малопродуктивных животных – в среднем 15,6 кг/голову.

Подобная нагрузка на организм животных в начале лактации (то есть в период интенсивной молокопродукции) не могла не сказаться на функциональном состоянии репродуктивных органов у коров обеих групп: у большинства животных в этот период наблюдали гипофункциональное состояние яичников и полное отсутствие признаков, свидетельствующих о начале циклических эстральных процессов в них.

У контрольных коров обеих групп первый эструс и первое осеменение зарегистрировано примерно через 70 дней после отела (таблица 2).

Таблица 2. Характер проявления репродуктивных функций у коров разного уровня продуктивности

Опытные группы	Подгруппы	Кол-во коров	Средняя продолжительность периода от отела до осеменения (дней)		Индекс осеменения
			первого	плодотворного	
Низко-продуктивные	Опыт	25	58,1±2,4	88,1±5,3	1,88
	Контроль	20	69,8±4,4	102,1±5,1	2,0
Высоко-продуктивные	Опыт	22	64,0±4,1	89,6±7,1	2,0
	Контроль	17	76,8±1,2	125,0±12,2	2,8

Следует отметить, что оплодотворяемость у высокопродуктивных коров была значительно ниже, чем у животных с низкой продуктивностью, поэтому интервал от отела до оплодотворения у них оказался на 22,9 дней больше.

В результате гормональной стимуляции животных опытных подгрупп сроки первого осеменения у коров обеих групп были сокращены почти на 12 дней по сравнению с контролем. Некоторое удлинение сроков начала циклирования в опытных подгруппах коров, как уже указывалось выше, связано с более поздним началом гормональной стимуляции после отела (через 7-8 недель). Тем не менее, в результате стимуляции сроки плодотворного осеменения коров обеих опытных подгрупп были сокращены в сравнении с контролем на 14,0 дней – в первой группе и на 35,4 дня – во второй. Полученная в результате двухлетних экспериментов разница в показателях первого и плодотворного осеменения между контрольными и опытными подгруппами в большинстве случаев оказалась статистически достоверной ($P<0,02-0,05$).

Выводы

В период интенсивной лактации (в первые два месяца после отела) потери живой массы у высокопродуктивных коров в 2,25 раза больше, чем у коров с низким потенциалом продуктивности; использование значительной части внутренних резервов организма на молокопродукцию, вероятно, является одной из причин задержки сроков инволюции матки и начала циклической деятельности их яичников у высокопродуктивных животных. Живая масса малопродуктивных коров стабилизируется к середине 2-го месяца лактации, что и создает благоприятные условия для циклической деятельности их репродуктивных органов и сокращает сроки плодотворного осеменения по сравнению с высокопродуктивными животными.

Гормональная стимуляция коров с помощью препаратов отечественного производства и по ранее апробированным схемам обработки позволила сократить сроки первого осеменения на 11,7 и 12,8 дней и плодотворного – соответственно на 14,0 и 35,4 дня у опытных коров обеих групп по сравнению с контролем, удержав, тем

самым, продолжительность сервис-периода на приемлемом (в пределах 88,1-89,6 дней) уровне, независимо от их продуктивного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Визнер Э. Кормление и плодovitость сельскохозяйственных животных. М.:1976.
2. Кочанов Н.Е. и др. Эстральный цикл коровы. 1994:9.
3. Bines J. Regulation of food intake in dairy cows in relation to milk production. *Livest. prod. Sci.*, 1976, 3:115-128.
4. Broster W. Liveweight change and fertility in the lactating dairy cow: A review. *Veter. Rec.*, 1973, 93:417-420.
5. Butler W.R. et al. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in post-partum Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 1981, 53:742-748.
6. Butler W.R. a. Smith R., Interrelationships between energy balance and post-partum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 1989, 72:767-783.
7. Coppock O.E. et al. Effect of forageo concentrate ratio in complete feeds fed and libitum on energy intake in relation to requirements by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1974, 57:1371.
8. Ferguson J. a. Chalupa W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1989, 72:746-766.
9. Foust M. et al. Genetics of reproduction in primeporous Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 1989, 72, 1:194-201.
10. Garnsworthy P. a. Topps J. Food intake in dairy cows in relation to body condition at calving and subsequent performance. *Anim. Prod.*, 1981, 32:392 (Abstr.)
11. Jonsen J. The relationship between fertility and production in dairy cattle. *Tidseheft voor Giergenees-kunde*. 1987, 112, 19:1114-1118.
12. King J. The relationship between the conception rate and changes in bodyweight, yield and SNE content of milk in dairy cows. *Veter. Rec.*, 1968, 83:492-494.
13. Lotthammer K. Effect of improving energy intake during earle lactation by corn-silage on metabolism and fertility of dairy cows. *Curr. Topics vet. med. Anim. Sci.*, 1982, 20:409-421.
14. MarKusfeld O. Inactive ovaries in high-yelding dairy cows before service: actiology and effect on conception. *Veter. Rec.*, 1987, 121, 7:149-153.
15. Miettinen P. Metabolic balance and reproductive performance in Finnish dairy cows. *J. Veter. Med.*, A37, 1990:417-424.
16. Randel R.D. Nutritien and post-partum rebreeding in cattle. *J. Anim. Sci.*, 1990, 68, 3:853-862.
17. Smith R.D. et al. Body condition and fatty liver in dairy cows in the relationship with reproductive performance. *Proc. Carnell Nutrit. Conf. for Feed Manufactures*, 1983:20-25.
18. Whitmore H. et al. Effect of early post-partum breeding in dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 1974, 38, 2:339-346.
19. Wildman E. et al. *J. Dairy Sci.*, 1982, 65:495.
20. Wood P.D. et al. Relationships between size live-weight change and milk production characteristic in early lactation in dairy cattle. *Anim. Prod.*, 1980, 31:143-151.
21. Yoshimoki S. et al. Effect of energy and protein intake on ovarian activity in post-partum high-producing Holstein cows. *Japan J. Zootechn. Sci.*, 1986, 57, 7:553-560.

ФОРМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ АНЭСТРУСА У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ В НАЧАЛЕ ЛАКТАЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

К.И. Бахитов, Е.К. Голенкевич, Л.А.Калашиник

При обследовании коров разного уровня продуктивности в ранний послеотельный период в ГПЗ "Ворсино" установлено, что к концу пятой недели после отела у 38,9% низкопродуктивных и у 70% высокопродуктивных коров наблюдается гипофункциональное состояние яичников, у остальных животных в яичниках обнаружены слабофункционирующие желтые тела, реже фолликулярные или лютеиновые кисты, сопровождающиеся прекращением циклических эстральных процессов. Дифференцированный подход к срокам начала стимуляции функции яичников у коров с учетом их продуктивного потенциала позволяет на 18-27 дней сократить дни бесплодия, сохраняя при этом оптимальный период лактации.

Введение

Снижение функциональной активности яичников в ранний послеотельный период, чаще всего наблюдаемое у высокопродуктивных коров, проявляется длительным прекращением циклических эстральных процессов в их организме. Формы и характер проявления анэструса у таких коров в начале лактации весьма разнообразны; клинически они выражаются в виде задержки сроков восстановления нормальных размеров органов репродукции, гипофункционального состояния яичников, либо наличия в них персистентных желтых тел или кистозных образований. При этом проблемы воспроизводства наиболее остро наблюдаются в стадах с высоким генетическим потенциалом продуктивности: увеличение дней бесплодия у высокопродуктивных коров приводит к более значительным потерям молочной продукции, чем в стадах со средним и низким уровнями продуктивности. С другой стороны, высокая молочная продуктивность, особенно в начале лактации, увеличивая напряженность обменных процессов в организме коровы, значительно ослабляет проявление функции воспроизводства.

В литературе есть сообщения о наличии генетического антагонизма между уровнем продуктивности и воспроизводительной способностью коров (2). Эта взаимосвязь выражается в форме отсрочки инволюции матки (1), либо первой овуляции (7), первого эструса и начала циклирования (8).

В последние годы в качестве одной из важнейших причин увеличения сроков ациклии у коров в ранний послеотельный период выдвигается недостаток энергии (11), иногда при одновременном избытке протеина в кормах (13), что вызывает нарушение обменных процессов в их организме во время пика лактации. В результате у высокопродуктивных коров чаще обнаруживают появление кист в яичниках еще до первой овуляции (3), задержку инволюции матки и гипофункциональное состояние яичников (11). Предполагается, что у животных с высокой продуктивностью влияние лактации на проявление репродуктивных качеств происходит путем изменения эндокринного профиля в их организме (секреции ЛГ, ФСГ и прогестерона), ассоциированного с отрицательным балансом энергии.

Таким образом, все указанные выше признаки, включая и послеотельные осложнения (дистонию, задержание последа, эндометриты и др.), в конечном счете приводящие у высокоудойных коров к удлинению сроков возобновления циклики, являются следствием так

называемого "лактационного стресса". Не случайно среди факторов, влияющих на возобновление циклической активности яичников у коров после отела в первую очередь называют уровень молочной продуктивности и условия кормления (4).

Поскольку первая овуляция является своего рода пусковым механизмом репродуктивных циклов у коров, она может служить критерием для оценки их функционального состояния в ранний послеотельный период. По данным разных исследователей средние сроки первой овуляции после отела у коров варьируют от 13-15,5 до 29-31 дней; у высокопродуктивных животных на несколько дней позднее, чем у животных с низкой молочной продуктивностью. Значительное удлинение этого срока наблюдали у животных с послеотельными осложнениями в виде задержания последа, эндометритов и др. (1). Более чем в 70% случаев первая овуляция после отела у коров проходит без внешнего проявления охоты; вторая и третья по счету овуляции после отела, соответственно у 40 и 23% коров, также проходят без признаков эструса (7). Высокая частота случаев "тихой" охоты, характерная для высокопродуктивных коров, является одной из основных причин удлинения интервала до первого осеменения после отела.

Средние сроки первого осеменения у высокопродуктивных коров, по данным разных исследователей, варьируют от 37 до 62 дней. Этот показатель тем важнее, что по мнению ряда исследователей (14), количество зарегистрированных овуляторных циклов в течение первого месяца после отела является одним из индикаторов возобновления циклики и последующей воспроизводительной способности животных.

Оплодотворяемость по первому осеменению у высокопродуктивных коров на 20-26% ниже, чем у животных с низкой продуктивностью даже при спонтанном проявлении эструса (9). Снижение этого показателя приводит к повторным осеменениям, увеличивая межотельный интервал и значительно снижая эффективность воспроизводства. В то же время ряд исследователей (10) не нашли высокой отрицательной корреляции между уровнем продуктивности и воспроизводительной способностью коров. Есть мнение, что антагонизм между уровнем продуктивности и репродукцией выражается в удлинении интервала до первого эструса, а не в ухудшении овариальной цикличности (7).

Предыдущие исследования на коровах, отелившихся в весенне-летний период показали, что первое проявление эструса у высокопродуктивных животных происходит не ранее, чем через два месяца после отела. Позднее начало циклирования в сочетании со снижением оплодотворяемости приводит к значительному удлинению сервис-периода и уменьшению выхода телят по стаду.

Известные способы ранней стимуляции циклической деятельности яичников с помощью различных биологически активных препаратов по отношению к высокоудойным коровам либо малоэффективны, либо неблагоприятно отражаются на их последующей оплодотворяемости. Веоятно, степень влияния фактора "лактационного стресса" в этот период у высокопродуктивных коров более ощутима, чем у животных со средней и низкой продуктивностью, а послеотельные нарушения проявляются в более тяжелой форме. Следовательно, для нормализации эстральной цикличности у высокоудойных коров может потребоваться более длительная и разнообразная гормональная стимуляция.

Исходя из вышеизложенного, в задачи настоящего исследования входило изучение различий в формах проявления анэструса в первые два месяца лактации и эффективности ранней стимуляции воспроизводительной системы у коров разного уровня продуктивности.

Материал и методы

Исследования проводили на полновозрастных коровах чернопестрой породы на молочном комплексе ГПЗ "Ворсино" Калужской области. Для опытов были подобраны по срокам отела две группы коров с учетом их продуктивности за предыдущую лактацию: 1-я – низкопродуктивные с удоем до 4000 кг молока за лактацию; 2-я – высокопродуктивные с удоем более 6000 кг молока за лактацию. За опытными коровами было установлено наблюдение от отела до их плодотворного осеменения с учетом характера проявления репродуктивных функций. В течение первых двух месяцев лактации, начиная с 20-го дня после отела, еженедельно проводили ректальное исследование репродуктивных органов коров. В эти же дни у части животных брали образцы молока для определения в них концентрации прогестерона. Опытные коровы в каждой группе, начиная с 35-го (низкопродуктивные) или 49-го (высокопродуктивные) дня после отела были подвергнуты гормональной стимуляции по следующей схеме:

Схема гормональной стимуляции коровразного уровня продуктивности

Продуктивность коров	Группы	Сроки начала стимуляции после отела	Дни инъекции препаратов			Кол-во животных
			Амол (200 мг)	ГСК (3000м.е)	ПГФ	
Низко-продуктивные	1	35-й	1-й	8-й	-	11
	1а	контроль				7
Высоко-продуктивные	2	49-й	1-й	8-й	20-й	10
	2а	контроль				7

Осеменение проводили замороженным семенем дважды через 12 и 24 часа после выявления охоты.

Результаты и обсуждение

Характеристика продуктивного потенциала коров опытных групп и количество зарегистрированных послеотельных осложнений представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количество послеотельных осложнений у коров разного уровня продуктивности

Группы коров	Продуктивность за предыдущие лактации, кг М+м	Кол-во животных	Количество послеродовых осложнений					
			Задержание послеков		Эндометритов			
			голов	%	Острых		Хронических	
					голов	%	голов	%
1	3760±100,4	18	3	16,7	-	-	4	22,2
2	6240±375,9	17	4	23,5	2	11,8	4	23,5

Как видно из данных таблицы 1, разница в числе зарегистрированных случаев задержания плодных оболочек после родов между группами была незначительной. Однако у 2 из 4 коров 2-й группы после трудных родов и задержания последа наблюдали острое проявление эндометрита в тяжелой форме. Скрытая (или хроническая) форма эндометрита, которая выявляется в основном во время охоты или через день после осеменения, отмечена у коров обеих групп. Незначительная разница в этом показателе у животных разной продуктивности объясняется тем, что по принятой в хозяйстве технологии всем отелившимся коровам в родильном отделении в профилактических целях вводят внутриматочно дважды (на 5-й и 10-й

дни) один из антибиотиков, чаще всего левоэритроциклин (ЛЭЦ). При выявлении скрытой формы эндометрита обработку ЛЭЦ повторяют. Следует отметить, что послеродовые осложнения у высокопродуктивных коров протекают в более тяжелой форме, что иногда приводит к вынужденной преждевременной их выбраковке из стада. Так, несколько коров с высоким потенциалом продуктивности (№ 197, 2662, 3682, 3723, 4368), намеченные ранее для использования их в опыте были выбракованы из стада в первые месяцы лактации вследствие послеродовых осложнений, последующего ухудшения общего состояния их здоровья и резкого снижения удоев.

Периодическое исследование репродуктивных органов показало, что инволюция матки у коров опытных групп, в основном, завершилась в течение первого месяца лактации: к концу 5-й недели, то есть ко времени намеченной стимуляции, несколько увеличенные (по сравнению с нормой) рога матки были обнаружены лишь у 2 из 18 коров 1-й группы и у 5 из 17 коров во 2-й группе (табл. 2).

Таблица 2. Функциональное состояние репродуктивных органов опытных коров к концу 5-й недели после отела

Группы	Количество животных	Из них нециклирующих:			
		с незавершенной инволюцией матки		с неактивными яичниками	
		голов	%	голов	%
1	18	2	11,1	7	38,9
2	17	5	30,0	12	70,0

В то же время почти у 40% малопродуктивных и у 70% высокоудойных коров обнаружены неактивные яичники: плотные, размером с боб или меньше. Нередко при относительно нормальных размерах яичники были плоскими, мягкими, без каких-либо признаков развития (отсутствие растущих фолликулов и желтых тел на поверхности яичников). При повторных исследованиях гипофункциональное состояние таких яичников сохранялось длительное время. У остальных животных обеих групп к этому периоду в яичниках были обнаружены слабо функционирующие желтые тела (характерная бугристость на поверхности), реже фолликулярные или лютеиновые кисты.

Согласно намеченной схеме гормональную стимуляцию опытных коров начинали с 35-го (в 1-й группе) или с 49-го (во 2-й группе) дня после их отела. В эти дни животным после предварительного ректального исследования внутримышечно вводили по 200 мг амола – гестагена пролонгированного действия отечественного производства. На 8-й день от начала обработки коровам инъецировали по 3000 м.е. ГСЖК (сывороточного гонадотропина). Животным 2-й опытной группы, не пришедшим в охоту в ожидаемые сроки после инъекции сывороточного гонадотропина, на 20-й день от начала стимуляции вводили одну дозу простагландина – эстуфалана. При этом предполагалось, что после основной гормональной обработки (амол+ГСЖК) в яичниках у коров происходит овуляция и образуется желтое тело без явного проявления признаков охоты.

Контрольных животных обеих групп продолжали еженедельно исследовать до первого проявления охоты и осеменения. Результаты гормональной стимуляции коров разного уровня продуктивности представлены в таблице 3.

Таблица 3. Эффективность гормональной стимуляции бесплодных коров разного уровня продуктивности

Группы	Количество коров	Средние сроки от отела до осеменения	
		первого	плодотворного
1 Опытная	11	44,7±1,73	76,8±5,6
Контрольная	7	79,7±15,1	95,7±17,6
2 Опытная	10	70,1±11,0	92,4±13,5
Контрольная	7	94,8±19,1	151,0±35,0

Как видно из данных таблицы 3, применение указанной выше схемы стимуляции позволило осеменить опытных животных обеих групп в оптимальные сроки. Первое осеменение опытных коров 1-й группы проведено примерно через 10 дней, а во 2-й группе – через 21 день от начала гормональной обработки. Средние сроки плодотворного осеменения опытных коров оказались в пределах оптимального (76,8 и 92,4 дня соответственно для животных с низкой и высокой продуктивностью). Следует отметить некоторое снижение оплодотворяемости при первом осеменении у животных обеих групп после гормональной стимуляции. Удлинение сроков первого проявления охоты во 2-й опытной группе (по сравнению с 1-й) связано с тем, что у 50% высокопродуктивных животных через неделю после окончания стимуляции была зафиксирована овуляция без явного проявления охоты, что потребовало введения им лютеолитического препарата – эстуфалана.

У контрольных коров обеих групп средние сроки до первого (79,7 и 94,8 дней) и плодотворного (через 95,7 и 151,0 дней от отела) осеменений были значительно продолжительнее, чем у опытных животных. Регулярное исследование репродуктивных органов показало, что у многих из них даже через 3-4 месяца после отела в яичниках не обнаруживали признаков развивающихся фолликулов. Следует отметить, что 2 из 7 высокопродуктивных коров, осемененные после длительного периода ациклии через 2 месяца были признаны нестельными с диагнозом гипофункции яичников и в конце концов были выбракованы из стада как непригодные для дальнейшего воспроизводства.

При этом количество животных в контрольной подгруппе высокопродуктивных коров оказалось вдвое меньше, чем в опытной. Значительный разброс показателей дней бесплодия в этой подгруппе (от 31 до 209 дней) и малое количество животных (5) привели к увеличению средней величины до 151 дня. В предыдущих исследованиях нами был проведен анализ продолжительности бесплодия у 105 коров с аналогичным уровнем продуктивности (более 6000 кг за лактацию). При этом средний интервал от отела до плодотворного осеменения оказался около 20 дней. Таким образом, разница между опытными и контрольными животными в средних показателях дней бесплодия у малопродуктивных коров составила около 18,9 дней, у высокопродуктивных – около 27 дней.

Выводы

1. Исследования показали, что к концу 5-й недели после отела у малопродуктивных коров инволюция матки практически завершается, тогда как у одной трети высокопродуктивных коров репродуктивные органы еще не готовы для стимуляции. Почти у 40% низкопродуктивных и у 70% высокоудойных коров к этому сроку яичники находятся в гипофункциональном состоянии.

2. Дифференцированный подход к срокам начала гормональной стимуляции воспроизводительной функции у коров с учетом их

продуктивного потенциала позволяет на 18-27 дней сократить количество дней бесплодия, сохраняя для коров разного уровня продуктивности оптимальный период лактации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полянцев Н.И. Воспроизводство в промышленном животноводстве. М, 1990:130.
2. Berger P. et al. Genetic aspects of milk yield and reproductive performance. J. Daiey Sci., 1981, 64:114.
3. Britt J. H. et al. Frequency of ovarian follicular cysts, reasons for culling and fertility in Holstein Frisian cows given YRA at two weeks after parturition. Am. J. Vet. Res., 1977, 38:749-751.
4. Bunn D, Phillips C. Factors affecting the fertility of dairy cows. Techn. report., Dairy Research Unit. Univ. Coll. of North Wales, 1986, 1:21.
5. Claus R. et al. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. Brit. veter. J., 1983, 139,1:29-37.
6. Butler W. a Smith R. Intrrelationships between energy balamce and postpartum reproductive function in dairy cattle. J. Dairy Sci., 1989, 72:769-783.
7. Dachir E. et al. Ovarian activity of Holstein and Jersey cows of diverse transmitting abilities for milk. J. Dairy Sci, 1984, 67:1776-1782.
8. Eley D. et al. J. Dairy Sci., 1981, 64:312.
9. Ferguson J. a. Chalupa W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. J. Dairy Sci., 1989, 72:746-766.
10. Hansen L. et al. Yield and fertility relationships in dairy cattle. J. Dairy Sci., 1983, 66:293-305.
11. Markasfeld O. Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: actiology and effect on unception. Veter. Rec., 1987, 121, 7:149-153.
12. Peters A.R. Reproductive activity of the cow in the post-partum period. 1. Factors affecting the length of the post-partum period. Brit. Vet. J., 1984, 140:76-84.
13. Randel R.D. Nutrition and post-partum rebreeding in cattle. J. Anim. Sci., 1990, 68, 3:853-862.
14. Stevenson J. A., Call E. Influence of early estrus, ovulation and inseminations on fertility Holstein cows. Theriogenology, 1983, 19:367.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ КОРМОВ

А.М. Соловьев

Сектор прогрессивных технологий кормопроизводства и животноводства

В последние годы все большее развитие получают способы приготовления силосов с помощью биоконсервантов: микробных культур, ферментных препаратов, фитонцидов и т.д. Биологические технологии заготовки силосов направлены как на ускорение химических процессов, в период созревания корма обеспечивающих снижение потерь питательных веществ, так и на повышение содержания их в конечном продукте (27). Сохранность питательных веществ обеспечивается прежде всего за счет развития в силосуемой массе молочнокислых бактерий (3, 14, 27) и образования молочной кислоты. Стабильный силос первого класса должен содержать не менее 50% молочной кислоты в общем составе органических кислот при отсутствии в массе масляной кислоты (10, 37).

Многолетние исследования ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных показали, что традиционные способы заготовки

силоса и сенажа недостаточно эффективны в тех случаях, когда в процессе созревания силосованных кормов образование молочной кислоты в них было ниже средних величин. Потери питательных веществ в этих условиях были максимальными (35, 36). Для обеспечения жизнедеятельности молочных бактерий необходимы как минимум два условия: достаточная обсемененность консервируемого сырья молочнокислыми бактериями и наличие в нем доступных для сбраживания углеводов. Этим требованиям отвечают технологии совместного силосования традиционных кормовых культур с фитонцидсодержащим растительным сырьем (рапс, борщевика, горчица белая и др.), позволяющие не только получать высококачественные силоса, но и повышать в них содержание протеина и углеводов. Добавка к силосуемой массе ферментных препаратов, преобразующих высокомолекулярные углеводы в легкоусвояемые простые соединения, обеспечивает условия для жизнедеятельности молочной микрофлоры и тем самым – для накопления молочной и уксусной кислот, консервирующих растительную массу. В случае дефицита легкорастворимых углеводов, малой активности эпифитной микрофлоры растений или недостатка в ней молочнокислых бактерий, что имеет место при силосовании бобовых культур, решающую роль могут сыграть микробные культуры, добавка которых в момент закладки кормов на хранение стабилизирует созревание силоса.

При заготовке объемистых кормов на хранение используются различные технологии их консервирования: сушка, сенажирование, силосование. Практика показывает, что при естественном силосовании кормов, из-за использования на эти цели все большего количества слабосилосующихся культур, отходов полеводства, нетрадиционных кормов и т.д., наблюдаются большие потери питательных веществ (до 25-30% от общей массы). Повышение качества кормов и снижение потерь при их заготовке и хранении остается одной из важнейших задач кормопроизводства.

В основу совершенствования способов силосования злаковых и бобовых трав было заложено применение консервантов. По механизму воздействия на сырье консерванты разделяют на вещества, препятствующие брожению – химические консерванты (кислоты, щелочи, минеральные соли и т.д.) и вещества, регулирующие направленность бродильных процессов – биологические консерванты (фитонциды, ферменты, микроорганизмы и т.д.). Однако как те, так и другие призваны обеспечить оптимальное развитие в растительной массе молочнокислой микрофлоры и подавление роста гнилостных, маслянокислых бактерий, плесеней, грибов.

В последние годы все большее развитие получают способы приготовления силосов с помощью биоконсервантов в связи с тем, что они обеспечивают хорошую сохранность кормов, являются безвредными для животных, не переходят в продукцию, получаемую от животных, не нарушают экологических условий окружающей среды, не требуют специальной защиты людей при внесении препаратов в силосуемую массу и они эффективны экономически. Одним из таких способов является фитонцидное консервирование зеленой массы. Оно базируется на исследованиях ряда ученых, которые показали, что многие растения содержат так называемые растительные антибиотики – фитонциды, которые выделяются в воздух и почву (49, 53, 54).

Химическая природа фитонцидов весьма разнообразна. Это комплекс органических соединений, эфирных масел, бальзамов и др. По своему действию на микрофлору кормов фитонциды не уступают химическим консервантам. Исследованиями М.Т. Таранова, М.А.

Веротченко (48) установлено, что добавление к силосуемой массе растений, обладающих фитонцидными свойствами, способствует получению силоса высокого качества из различных кормовых культур. Ими испытан консервирующий эффект подорожника, борщевика Сосновского, лопуха, одуванчика, чистотела, мать-и-мачехи, хвои сосны, лиственницы и др. Сотрудники ВНИИ кормов С.Я. Зафрен (12), А.А. Панов (28) показали, что кормовые культуры семейства крестоцветных (горчица белая, редька масличная, рапс озимый), благодаря наличию в них фитонцидов, также обладают консервирующим эффектом. Фитонциды ингибируют окислительно-восстановительные ферменты (оксидоредуктазы) путем нарушения функциональных свойств их сульфгидридных групп. Особенно активными в этом отношении являются вещества, имеющие в своей структуре двойные связи. К этим веществам относятся и изотиоцианаты, в частности, аллилизотиоцианаты, входящие в группу глюкозинолатов, содержащихся в рапсе и других крестоцветных (12, 13).

В настоящее время в литературе имеются лишь единичные сообщения о консервирующем действии фитонцидоносных растений, в связи с чем фитонцидное консервирование кормов требует всестороннего исследования как в направлении выбора наиболее перспективных культур, так и изучения влияния биоконсервантов на обмен веществ и продуктивность животных. Самым распространенным и доступным производством фитонцидоносным растением является рапс. Для него характерно высокое содержание протеина и углеводов (11, 17, 23). За два укоса эта культура может дать более 800 ц зеленой массы с гектара (55). Рапс используют для приготовления силоса, сенажа, травяной муки, гранул (19, 25, 50, 60).

В наших экспериментах (42, 43) по силосованию однолетних злаков (овес в фазе молочной спелости зерна) и смеси многолетних трав (тимopheевка, овсяница луговая, полевица белая в фазе цветения) биологическим консервантом служил яровой рапс в фазе стеблевания в соотношениях 80:20, 70:30, 60:40 и 50:50 по весу зеленой массы. Исследования показали, что все варианты силосов сохраняли свою структуру, имели желто-зеленый цвет и приятный запах квашеных овощей. Из всех испытанных соотношений лучшим было 30-40% рапса и 60-70% злаковых кормовых культур. Такое соотношение давало возможность получить силос первого класса с рН 4,0-4,3 и соотношением органических кислот, характерным для высококачественных силосованных кормов. Основную массу кислот составляла молочная, процентная доля которой колебалась от 78,9 до 82,5. Масляной кислоты в силосе не обнаружено. Добавление ярового рапса к злаковым травам повышало содержание в силосах общего азота на 20,4-35,2% и белкового от 15,3 до 20,3%, при этом уровень аммиака не поднимался выше 0,16%, что говорит о незначительном гидролизе белков корма. Исследования содержания углеводов в силосах показали, что добавление рапса к злаковым травам способствует сохранению углеводов в кормах и тем самым повышает их питательность. Кроме того доказано, что превращение легкорастворимых углеводов корма в молочную и уксусную кислоты при созревании силоса не является абсолютной потерей углеводов, поскольку эти вещества используются организмом животных в качестве энергетического материала или же служат источником образования жира тела и молока. Энергетическая ценность сахара составляет 677 ккал, молочной кислоты – 659 ккал (27, 38).

Практически богатое фитонцидами растительное сырье – рапс, борщевики Сосновского и Лемана, горчицу белую, редьку масличную и

многие другие целесообразно выращивать в чистом виде и затем по мере скашивания добавлять в определенных количествах к традиционным силосуемым кормовым культурам. Основным недостатком такой технологии является одновременное использование двух комплексов уборочных машин, транспортных средств, работающих на разных полях и обеспечивающих доставку сырья для заполнения силосных хранилищ. В связи с этим в некоторых случаях можно выращивать смеси культур до нужной фазы вегетации и силосовать их с соблюдением всех требований технологии. Так, например, хорошие результаты были получены (59) при возделывании смешанных посевов пелюшки с яровым рапсом (50:50). При этом урожайность зеленой массы составляла 350-380 ц/га, выход сухого вещества 43-44 ц/га, кормовых единиц 45-46 ц/га, переваримого протеина 5,0-5,4 ц/га. Зеленую массу скашивали при достижении компонентами стадии цветения. При высеве смеси, состоящей из ярового рапса, овса и гороха, зеленую массу убирали в фазе плодообразования рапса, молочной спелости зерна овса, созревания зерна гороха. Урожайность составила 287 ц/га. Силос имел желто-зеленый цвет, рН 4,1-4,2, уровень молочной кислоты составил 62,6-68,0%, уксусной – 37,4-32%, масляная кислота отсутствовала. В 1 кг силоса содержалось 0,17-0,16 к.ед., 17,9-18,6 мг каротина и на 1 к.ед. приходилось 114-120 г переваримого протеина (20).

Таким образом, традиционные растительные корма можно консервировать без применения химических консервантов и при этом получать силоса высокого качества, если вместо них использовать фитонцидсодержащие кормовые культуры, то есть по меткому выражению профессора Таранова М.Т.: «Корма консервировать кормами» (49).

К биологическим способам, улучшающим биохимические показатели силоса и вследствие этого его питательность, относится и применение ферментных препаратов, которые добавляют в период закладки зеленой массы в силосохранилище, чем достигается частичное расщепление целлюлозы, гемицеллюлоз, пентозанов, пектиновых веществ и других полисахаридов до простых сахаров, которые при обычном силосовании остаются почти без изменений. На первой стадии созревания силоса ферменты растений в некоторой степени гидролизуют полисахариды и протеин растений, но в дальнейшем по мере нарастания кислотности в массе их деятельность прекращается. Молочнокислые бактерии не способны разрушать полисахариды, а целлюлозоразрушающие бактерии погибают, так как первые являются анаэробами, а вторые – кислотнеустойчивы. Добавка к силосуемой массе кислотоустойчивых ферментов, перестраивающих высокомолекулярные соединения в легкоусвояемые, обеспечивает жизнедеятельность молочнокислых бактерий и накопление молочной и уксусной кислот, консервирующих силосуемую массу (1, 6).

Получение высококачественных силосов за счет биологической конверсии, то есть ферментативного гидролиза структурных полисахаридов до моносахаров, дает возможность понизить «сахарный минимум» для трудносилосуемых растений (3). Силосование клевера и люцерны с применением ферментных препаратов пектаваморина Пх, амилоризина Пх и глюкаваморина в дозе 0,2% или 2 кг на 1 т в производственных условиях обеспечивало снижение в кормах целлюлозы, гемицеллюлоз, пектиновых веществ и способствовало накоплению молочной и уксусной кислот.

В настоящее время использование ферментных препаратов рассматривается как один из эффективных способов создания

оптимальных условий для молочнокислого брожения и получения качественных силосов (3, 18).

Оправдывает себя и применение препаратов при силосовании соломы (ячменной, ржаной, овсяной), в которой на долю целлюлозы, гемицеллюлозы и других полисахаридов приходится более 75% питательных веществ. Практически силосование соломы с применением ферментных препаратов (целловеридина ГЗ, пектаваморина Пх и др.) осуществляется следующим образом: измельченную солому укладывают в траншею, послойно опрыскивают водой с растворенным в ней ферментным препаратом и солью, утрамбовывают тракторами и закрывают пленкой. На 1 т соломы расходуется 1 т воды, 15-20 кг поваренной соли и 3-5 кг фермента. Через 20-30 дней силос готов к использованию. В силосе из ячменной соломы содержание целлюлозы снижается на 17%, гемицеллюлозы – на 20%, из ржаной соломы – на 12 и 17% соответственно (3). Улучшить качество такого силоса из соломы можно добавками к ней молочной сыворотки (150-200 л/т), патоки (20-30 кг/т), концентратов (30-50 кг/т). В этих случаях можно использовать солому повышенной влажности, содержащую зеленую массу сорняков, которую трудно сохранять в скирдах (8, 47, 58).

Недостатком силосования соломы с ферментными препаратами является потребность введения в массу большого количества воды (на 500 т соломы нужно добавить 500 т рабочего раствора), что технически довольно затруднительно. Кроме того, нужна тщательная трамбовка массы и плотное укрытие траншеи, обеспечивающие развитие необходимой температуры в массе (20-40°C), без которой работа ферментов не будет эффективной.

Как уже упоминалось выше, сущностью биологического консервирования зеленых кормов является микробиологический синтез в силосуемой массе молочной кислоты из легкогидролизуемых сахаров растений. Вместе с тем, на первой фазе силосования не количественное накопление молочной кислоты определяет успех консервирования, а концентрация водородных ионов, образующихся при диссоциации молочной кислоты в силосном соке. Однако при силосовании растительных кормов за счет спонтанной микрофлоры возможно развитие в силосной массе гнилостных, маслянокислых бактерий, плесней, грибов. В результате этого качество силоса ухудшается вплоть до полной непригодности его к использованию. В последнее время все большее распространение получают способы силосования кормов, предусматривающие использование бактериальных препаратов, которые представляют собой селекционированные штаммы, в основном, молочнокислых, пропионовокислых, амилолитических бактерий или их смесей. Вместе с тем, одни исследователи (33, 38, 40, 69) считают, что использование бакпрепаратов является эффективным приемом, обеспечивающим интенсивное молочнокислое брожение уже в первые часы созревания силоса, в результате чего происходит быстрое подкисление массы, подавляется жизнедеятельность вредных микроорганизмов, снижаются потери и улучшается качество корма. Другие (2, 22, 26) не считают нужным вводить в силосуемую массу бакпрепараты из-за наличия молочнокислых микроорганизмов в заметном количестве в составе дикой микрофлоры и быстрого их размножения. Профессор С.Я. Зафрен, не высказываясь «за» или «против» применения заквасок при силосовании кормов, утверждает, что молочнокислое брожение начинается с жизнедеятельности молочнокислых стрептококков и заканчивается жизнедеятельностью молочных кислотоустойчивых палочек (12, 27). В то же время Бондарев В.А., Соколов В.М. и др. (4)

утверждают, что силосование с применением заквасок из культур молочнокислых бактерий не дает ощутимых результатов и применяется мало. Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о недостаточной изученности условий эффективного использования микробиологических препаратов для силосования различного растительного сырья.

В последние годы в ведущих странах, производящих в больших объемах животноводческую продукцию, значительно возросло производство микробиологических и ферментных препаратов и использование их при силосовании кормов (27, 56, 64, 66, 68, 70). В Германии биоконсерванты составляют до 30% от всех силосных добавок, во Франции – около 50%, а в США их доля доходит до 82% (62, 63, 65). В Великобритании для силосования трав рекомендовано 26 микробиологических препаратов, причем характерной особенностью является наличие в их составе ферментов (61).

Институт растениеводства и кормопроизводства (Германия) изучал в течение 5 лет влияние 10 культур лактобактерий на процессы силосования злаковых трав и кукурузы, и на качество корма. Было показано, что действие отдельных инокулятов культур молочных бактерий различно и зависит от температуры внешней среды, качества сырья и технологии заготовки корма. Однако все они улучшали качество корма при наличии в силосе достаточного количества сахара, стабилизировали pH в пределах 4,0-4,3 и подавляли развитие вредных микроорганизмов (67).

Полученные в нашей стране данные при испытании в производственных условиях различных отечественных инокулятов для силосования бобово-злаковых смесей показали хорошую силосуемость трав (37, 41). Однако потребление сухого вещества животными и переваримость питательных веществ силосов оставались на уровне контроля, при небольшом увеличении баланса азота в организме у опытных животных (37). Силосуют и чисто бобовые травы (клевер, люцерну, эспарцет) с различными бактериальными культурами. Значительное количество молочнокислых бактерий, внесенное сразу при закладке силоса, обеспечивает более полное использование углеводов корма и последний хорошо силосуется (5, 30, 32, 39).

К настоящему времени с положительным эффектом при силосовании кормов используются как чистые штаммы молочнокислых бактерий, так и смешанные культуры. Изучается влияние отдельных инокулятов молочнокислых бактерий на процессы силосования в зависимости от условий окружающей среды, качества исходного сырья и технологии заготовки кормов. Общее направление исследований состоит в том, чтобы с наименьшими затратами получать высококачественные корма (31, 57).

Активным началом биологических консервантов являются живые клетки молочнокислых бактерий. По характеру сбраживания углеводов молочнокислые бактерии делятся на две основные группы: гомоферментативные и гетероферментативные. В случае применения гомоферментативных микроорганизмов не происходит потерь углеводного субстрата, а только трансформация его в иную форму – в молочную кислоту, которая играет не только важную роль в процессе созревания силоса, но, как установлено, и в обмене веществ животного организма. При использовании гетероферментативных микроорганизмов больше половины ферментируемого субстрата превращается в этиловый спирт, уксусную кислоту и CO₂, то есть часть углеводного субстрата теряется в виде летучих кислот и CO₂. Кроме того, показано, что спирт, попадающий в организм животного с поедаемым силосом, является токсичным. Существенно подчеркнуть,

что сдвиг в сторону образования спирта и летучих кислот резко увеличивается при снижении pH, что и происходит в силосуемой массе (57).

В настоящее время сформулированы основные требования, предъявляемые к культурам микроорганизмов, входящих в состав биологических консервантов (22). Культуры микроорганизмов должны обладать в совокупности рядом свойств:

- принадлежностью к группе гомоферментативных молочнокислых бактерий, обеспечивающих получение в качестве основного продукта брожения молочную кислоту;
- антагонизмом по отношению к гнилостным, маслянокислым бактериям и обеспечивать преимущественное развитие в силосе молочнокислых бактерий;
- устойчивостью к кислотам и способностью к росту в температурных пределах от 10 до 50° С и при этом не оказывать действия на органические кислоты;
- способностью ферментировать широкий набор субстратов, в том числе пентозные сахара, крахмал, декстрины, позволяющие силосовать разнообразные виды сырья;
- способностью к росту в подвяленном растительном сырье с низким содержанием воды.

Кроме того, необходимым условием, определяющим эффективность биологических консервантов и высокое качество силосов с их использованием, является соблюдение следующего требования: количество живых клеток, вносимых в силосуемую массу, должно превышать количество посторонней микрофлоры, то есть оно должно быть не ниже 1000 млн клеток на 1 кг сырья. При этом, чем больше живых клеток вносится на единицу силоса, тем быстрее и эффективнее происходит процесс силосования с максимальным сохранением питательных веществ.

Все биоконсерванты, выпускаемые и разрабатываемые в настоящее время у нас в стране и за рубежом, можно разделить на две группы - содержащие монокультуру молочнокислых бактерий и содержащие композицию культур. Биоконсервантам на основе композиции культур микроорганизмов сейчас уделяется особое внимание. Применение таких препаратов позволяет не только законсервировать и сохранить корма, но и существенно улучшить их питательную ценность за счет микробного синтеза питательных компонентов, особенно аминокислот и витаминов. При этом значительно увеличивается коэффициент метаболического использования кормов. Кроме того, применение таких препаратов позволяет значительно расширить ассортимент силосуемого сырья.

В состав биоконсервантов, включающих ассоциативную композицию микроорганизмов, помимо молочнокислых бактерий, могут вводиться и бактерии, расщепляющие сложные углеводы типа крахмала и клетчатки до сбраживаемых молочнокислыми бактериями сахаров; бактерии, обладающие уреазной активностью, для которых источником азотного питания служит мочевины, при силосовании таких субстратов, как отходы виноградарства и жом сахарной свеклы; нейтрализующие дрожжи, которые служат для создания «защитного барьера» против развития сапрофитных колоний сахаромикетного типа; микроорганизмы, выделенные из микрофлоры пищеварительного тракта животных, особенно жвачных.

В нашей стране в связи с известными трудностями использования в кормопроизводстве химических консервантов (производство, транспортировка, хранение, дозирование и т.д.) все большее внимание уделяется применению отечественных биоконсервантов, таких,

например, как Силамп, КОКС-7, Амилонитробактерин, ВНИИМС-ИНБИ, АМС, ПИБ, СБЗК, Казахсил, Литосил, Биосил и многие другие. Наибольшее распространение получили три последних биоконсерванта (7, 15, 16, 29).

На основании лабораторных и производственных исследований разработаны способы силосования кормов путем обработки измельченной массы трав бактериальными препаратами и ее выдерживания в анаэробных условиях не менее 30 дней. Обоснованы дозы использования различных биопрепаратов и культур микроорганизмов (9, 14, 34). Силосование кормов с использованием бактериальных препаратов предусматривает строгое соблюдение требований ГОСТ к этой технологии: исходная масса должна быть скошена в рекомендуемые сроки с соблюдением параметров влажности, степени измельченности, техники укладки и уплотнения, продолжительности заполнения кормохранилищ и их укрытия.

Проведенными исследованиями установлено, что бактериальные препараты способствуют быстрому снижению pH в силосуемой массе, ускоряют процессы ферментации, улучшают качество силоса и его поедаемость. Использование консервированных биопрепаратами силосов в рационах молочных коров, быков и овец на откорме способствовало увеличению продуктивности животных, улучшению переваримости сухого вещества, протеина и углеводов рациона (22, 44, 45, 46, 51, 52).

В заключение необходимо отметить, что существующие в практике убеждения о том, что с помощью силосования можно получить качественный корм при любых условиях и из всевозможного растительного сырья, не всегда оправданы. Как уже не раз отмечалось, этот процесс в основном базируется на обеспечении жизнедеятельности молочнокислых бактерий, продуцирующих из углеводов корма органические кислоты, которые его же консервируют. Для этого необходимы два важных условия: достаточная обсемененность сырья молочнокислыми бактериями и наличие в нем доступных для сбраживания углеводов. В случаях, когда в определенных условиях в сырье наблюдается дефицит легкорастворимых углеводов или эпифитная (дикая) микрофлора бедна молочнокислыми бактериями, или она малоактивна, особенно при силосовании трудносилосуемых растений, малое количество образованных органических кислот нейтрализуется буферными веществами (белки, минеральные вещества и т.д.), кислотность силоса снижается и корм портится. Здесь вспомогательную роль могут сыграть биологические консерванты. Однако влияние инокулятов бактериальных культур на процессы силосования кормов не стабильно и зависит от вида кормовых культур, температуры окружающей среды, техники заготовки кормов, качества используемого сырья. Важными факторами, определяющими исход консервирования, служат также содержание в сырье сухого вещества, оптимальный уровень которого находится в пределах 25-45%, и добавка к трудносилосуемым растениям углеводсодержащих компонентов (патоки, концентратов и др.). Внесение в такое сырье активных культур молочнокислых бактерий способствует накоплению органических кислот и установлению нужного pH среды, так как многие виды молочнокислых бактерий не способны утилизировать растительные полисахариды. Однако при этом необходимо учитывать, что передозировка биоконсервантов может вызвать полную трансформацию углеводов в органические кислоты, что в свою очередь отрицательно сказывается на усвояемости питательных веществ силоса при скармливании его животным.

В последние годы накоплен значительный исследовательский материал в области консервирования кормов, в основе которого лежат биологические технологии (фитонцидное консервирование, применение ферментов и микробиологических препаратов), благодаря которым получение экологически чистых продуктов животноводства становится реальностью. Обеспечение внедрения этих технологий в производственную практику хозяйств должно стать первоочередной задачей кормопроизводства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов Т.К. Ферментирование корма для молодняка жвачных. Сельское хозяйство за рубежом, 1982, 9: 36-41.
2. Ахмедиев Г.З., Балагутина М. Р., Илялитдинов А.Н. Обсемененность растительного сырья молочнокислой флорой и влияние ее на последующее его консервирование. Новые приемы кормоприготовления в скотоводстве. Сб. Тр. Казах. НИТИ животноводства, Алма-Ата, 1988: 49.
3. Богданов Г.А., Привало О.Е. Сенаж и силос. М: Колос, 1983: 320.
4. Бондарев В.А., Соколов В.М., Строшко С.А., Шариков Н.Д. Решение проблем заготовки кормов. Кормопроизводство, 1997, 1-2: 52-55.
5. Бочарова М.И. Силосование клевера с использованием биологических консервантов. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1987, 4(88): 60-64.
6. Боярский Л.Г., Коршун В.П. и др. Ферментные препараты в кормлении животных. М.: Россельхозиздат, 1985: 31-35.
7. Веселуха П.П. Применение закваски ВНИИМС-ИНБИ при силосовании кукурузы. Кормовые культуры, 1991, 6: 37-39.
8. Виноградова Е.В., Владимирова А.А., Ермакова И.А. и др. Пути увеличения производства кормового белка. ВНИИТЭИСХ, 1981: 119-131.
9. Временное наставление по применению биологического препарата Биосил для силосования различных видов растительного сырья. Утв. Госагропромом СССР и ВАСХНИЛ 18 мая 1987 г.
10. Григорьев Н.Г. и др. Оценка качества основных видов кормов для жвачных животных. М.: Агропромиздат, 1990: 46.
11. Гольцов А.А., Ковальчук А.М., Абрамов В.Ф. Рапс и сурепица. М.: Колос, 1985: 11-15.
12. Зафрен С.Я. Технология приготовления кормов. М.: Колос, 1977: 26-27.
13. Калачнюк Г.И. Физиолого-биохимические и практические аспекты скармливания рапсовых добавок. Вестник сельскохозяйственной науки, 1989, 5: 125-135.
14. Квасников В.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Колос, 1975: 389.
15. Коваленко Н.К. и др. Использование Литосила для силосования высоковлажного растительного сырья. Микроорганизмы в кормопроизводстве. Кишинев, 1990: 49-58.
16. Коваленко О.Н. Влияние сульфитного щелока и бактериальных заквасок Казахсил на потерю питательных веществ при силосовании кукурузы. Новые приемы кормоприготовления в скотоводстве. Алма-Ата, 1989: 25-31.
17. Кошик Ф.А. Кормовая продуктивность озимого рапса и сурепицы в условиях Белгородской области. Сб. научн. тр. Харьковского СХИ, 1982, 287: 90-92.

18. Кузнецов Т.Т., Филатов И.И., Дементьев Т.А. Силосование люцерны с ферментными препаратами. Тез. докл. IV Всес. совещания «Производство и применение ферментных препаратов в сельском хозяйстве», 1977: 94-95.
19. Куликов В.М., Титов Н.А. Корма из рапса в рационах крупного рогатого скота. Зоотехния, 1990, 3: 38-40.
20. Лопатнюк А.А., Манкевич И.И., Шофман Л.И. Повышение протеиновой питательности силоса за счет совместных посевов злаковых и бобовых культур и эффективность их использования. Рациональные технологии заготовки высококачественных кормов и эффективность их использования. Бел. НИИЖ, Жодино, 1988: 145-147.
21. Макарова М.М. Микробиология силоса. М.-Л., 1962: 192.
22. Мак-Дональд П. Биохимия силоса. М.: Агропромиздат, 1985: 159-160.
23. Надальяк Е.А., Булатов А.П. Яровой рапс - источник белка для жвачных. Животноводство, 1987, 4: 32-35.
24. Наставление по применению сухих бактериальных заквасок (СБЗК), 1990. Утв. Гл. Упр. Ветеринарии СССР 8 сент. 1988 г.
25. Новиков Л.В. Использование рапса в кормлении крупного рогатого скота (обзор). М.: ВНИИТЭИСагропром, 1991: 64.
26. Новиков П.С. Бактериальная флора наземных растений. Киев, 1963: 89.
27. Нугматжанов К.С. Микробиологические способы повышения качества кормов. Алма-Ата- Кайнар, 1984: 120.
28. Панов А.А. Динамика и значение тиогликозидов при силосовании кормов. Автореф. дисс...к.с.-х.н., М., 1981:16.
29. Постовалова Л.М. и др. Заготовка кукурузного силоса с биопрепаратом Биосил. Научные основы развития животноводства в Республике Беларусь., 1992, 22: 192-196.
30. Приставкин Н.Я., Чуканов Н.К. Силосование эспарцета с применением бактериальной закваски. Сельское хозяйство Киргизии, 1975, 8: 37-41.
31. Редько Н.В., Ковалева Г.И. и др. Эффективность использования химического консерванта и бакзакваски ВНИИМС-ИНБИ при силосовании зеленой массы клевера лугового. Интенсификация лугового кормопроизводства. Горки, 1986: 16-21.
32. Редько Н.В. и др. Эффективность использования биологических препаратов при силосовании зеленой массы клевера. Основные направления получения экологически чистой продукции животноводства. Горки, 1992: 55-56.
33. Редько Н.В., Ковалева Г.И. Современные проблемы использования биологических консервантов для силосования кормов. Матер. научн.-произв. конф., посвященной 150-летию образования Белорусской СХА. Горки, 1992: 81-83.
34. Рекомендации по применению сухих бактериальных заквасок Казахстана для силосования кормов. Алма-Ата, 1972: 14.
35. Рекомендации по заготовке и хранению кормов для сельскохозяйственных животных. ВНИИФБиП, Боровск, 1982: 35.
36. Рекомендации по заготовке кормов и контролю их качества в ходе заготовок. ВНИИФБиП, Боровск, 1983: 110.
37. Романе И.А. и др. Оценка качества, поедаемости и переваримости травяного силоса, полученного с применением бактериальных заквасок. Микробиология и биотехнология производства кормов, 1990: 72-85.
38. Романенко Г.А., Тютюнников А.И. Корма. М.: 1998, РАСХН: 299-310.

39. Росляков Л.А. и др. Консервирование подвяленной люцерны с использованием молочнокислых бактерий. Изв. АН Каз. ССР, серия Биология, 1976, 3: 79-85.
40. Соколов П.И. Амилолитические бактерии в силосовании кормов. Автореф. дисс... к.б.н., Алма-Ата, 1965:22.
41. Солдатова В.В. и др. Влияние молочнокислых бактерий на микробиологические и биохимические процессы в силосе и его качество. Бюлл. ВНИИ с.-х. микробиологии, 1991, 52: 36-39.
42. Соловьев А.М., Бочарова М.И., Тишенков П.И. Использование вегетативной массы овса и рапса на силос. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1986, 1(80): 68-71.
43. Соловьев А.М., Бочарова М.И., Тишенков П.И. Сравнительное изучение качества силоса из многолетних злаковых трав, рапса и их смесей. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1986, 4(83).
44. Соловьев А.М. и др. Использование силоса, заготовленного с пентозображивающей и молочнокислой закваской в кормлении овец. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1986, 3(82): 46-49.
45. Соловьев А.М. и др. Влияние препарата Биосил на ферментацию клеверо-злаковой смеси. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1989, 2(94): 62-65.
46. Соловьев А.М. и др. Силос с биологическими консервантами. Зоотехния, 1989, 4: 44-46.
47. Справочник по кормопроизводству. М.: ВНИИК, 1994: 195.
48. Таранов М.Т., Веротченко М.А. Использование фитонцидных свойств некоторых растений при силосовании. Докл. ВАСХНИЛ, 1981, 7: 37-38.
49. Таранов М.Т. Химическое консервирование кормов. М.: Колос, 1982: 109-111.
50. Темникова Г. Рапс яровой - ценная кормовая культура для овец. Научно- техн. бюлл. Сиб. отд. ВАСХНИЛ, Новосибирск, 1981, 21: 22.
51. Тишенков П.И. и др. Показатели обмена веществ и продуктивность овец при скармливании силоса с бактериальными заквасками. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1988, 1(89): 59-61.
52. Тишенков П.И. и др. Продуктивность и показатели обмена веществ у коров при скармливании клеверного силоса, приготовленного с биологическим консервантом. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1989, 1(93): 12-15.
53. Федоряка В.П., Таранов М.Т. и др. Фитонцидное консервирование зеленых кормов. Животноводство, 1982, 5: 32-33.
54. Фитонциды. Экспериментальные исследования, вопросы теории и практики. Киев: Наукова Думка, 1975: 324.
55. Ханезов Н.А., Куклик В.А. Урожайность рапса ярового в сравнении с однолетними силосными культурами в центральном Предуралье. Тр. Уральского НИСХИ, 1983, 38: 25-29.
56. Хильмарт Б., Теплы М. Биологический метод силосования. Сельское хозяйство за рубежом, 1970, 8: 51.
57. Чуканов Н.К., Попенко А.К. Микробиология консервирования трудносилосуемых растений. Алма-Ата: Наука, 1986: 5-88.
58. Щеглов В.В., Боярский Л.Г. Корма (справочник). М.: Агропромиздат, 1990: 200-207.
59. Шлапунов В.Н., Лукашевич Т.Н., Чухлай П.И. Продуктивность и качество пелюшко-рапсовых смесей. Рациональные технологии заготовки высококачественных кормов и эффективного его использования. Бел. НИИЖ, Жодино, 1988: 47-49.

60. Шуванева Г.П. Использование рапса для приготовления силосованных кормов. Автореф. дисс... к.с.-х.н., Сиб.НИПТИЖ, 1989:20.
61. Anderson R. et al. Evaluation studies in the development of a commercial bacterial inoculant as an additive for grass silage. *Forage Sci.*, 1989, 44,4: 361-369.
62. Arnould R. Ensilage et conservateurs biologiques. *Cutibar*, 1984, 164: 122-125.
63. Bolsen K. Inoculated evaluated for fermentation effect on silage. *Feedstuffs*, 1988, 60, 33:19-20 and 29-30.
64. Fisher L.I. et al. The effect of additive «Silogen» on the intake and digestibility of grass silage. *Can. J. Anim. Sci.*, 1984, 64, 3: 709-715.
65. Gross F. Ecologie und Umveltschults. *Fortschr. Landwirt.*, 1987, 65, 12: 14-15.
66. Much R.E. Effect of inoculation level on alfalfa silage quality. *Nhfns. ASAE St. Joseph Mich.*, 1989, 32, 4: 1153-1158.
67. Pahlow G., Honig H. Wirkungsweise und Einsatzgrenzen von Silage aus Milchsäurebakterien. *Wirtschaftseigene Futter*, 1986, 32, 1: 20-35.
68. Rust S.R. et al. Effects of microbial inoculant on fermentation characteristics and nutritional value of corn silage. *J. Product. Agr.*, 1989, 2, 3: 235-241.
69. Takahico K., Fucuda N. High quality silage - making with the additives. *Bull. Fukuoka Agr. Res. Center (Anim. Ind.) - Chikushino, Fukuoku*, 1991, 11: 35-38.
70. Weinberg L., Ashbell G. The effect of addition of lactic acid bacteria inoculum to wheat and corn silages. *Agronomia*, 1987: 709-713.