

Российская академия сельскохозяйственных наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных
животных*

В.А. Галочкин

**НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ ПОВЫШЕНИЯ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
И ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ**

ВНИИФБиП
С.-Х. ЖИВОТНЫХ



Боровск, 2001

ББК 45.2 + 28.073
УДК 636.03:612.017.1:615.37

Галочкин В.А.

Новые горизонты повышения неспецифической резистентности и продуктивности животных. Боровск, 2001г.
91 с.

В предлагаемом издании рассматриваются разрабатываемые в лаборатории иммунобиотехнологии, возглавляемой автором, теоретические подходы и практические пути создания принципиально новых способов активизации защитных сил организма животных, повышения продуктивности, улучшения качества продукции и снижения затрат кормов на ее производство.

Брошюра рассчитана на сотрудников научно-исследовательских учреждений сельскохозяйственного профиля и работников животноводства.

Соавторы : Е.М. Колоскова, Е.В. Крапивина, Г.И. Боряев, А.А. Саразов, А.И. Манухина, В.Ф. Сухих, Е.Я. Езерская, О.В. Софронова, Л.И. Триндо, Н.А. Назаров, Э.М. Насибулина

© Галочкин В.А., 2001
© ВНИИФБиП с.-х. животных

В.А. Галочкин

НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ ПОВЫШЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ

Боровск, 2001

Глава 1. СЕЛЕНОПИРАН – НОВЫЙ АНТИОКСИДАНТ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Введение

В настоящее время селену отводится исключительно важная роль в регуляции обмена веществ. Он является составным компонентом более 30 жизненно важных биологически активных соединений организма высших животных. Селен входит в активный центр ферментов системы антиоксидантно-антирадикальной защиты организма, метаболизма нуклеиновых кислот,

аминокислот, липидов, гормонов (глутатионпероксидазы, йодотиронин-дейодиназы, тиоредоксинредуктазы, фосфоселенфосфатазы, фосфолипид-гидропероксид-глутатионпероксидазы, специфических протеинов Р и W и др.). Селен является единственным из микроэлементов, включение которого в белки и другие биологически активные молекулы происходит на генетическом уровне. В молекуле ДНК имеется специальный триплет, кодирующий селеноцистеин.

В основу рабочей гипотезы разработки способов повышения неспецифической резистентности и продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы нами заложена попытка целенаправленного воздействия на интенсивность и направленность метаболических потоков путем поддержания оптимального уровня свободнорадикальных процессов и сбалансированности функционирования иммунной, монооксигеназной и антиоксидантной систем организма.

По современным воззрениям процесс образования и нейтрализации свободных радикалов можно отнести к ведущему процессу, принимающему самое непосредственное и активное участие в регуляции обмена веществ в организме здорового человека и животного. Эта же всеобщность свободнорадикальных процессов может рассматриваться как единый, унифицированный патогенетический механизм, лежащий и у истоков, и в основе развития огромного количества патологических процессов в любой клетке, ткани и органе, безотносительно причин, вызвавших патологию.

Биохимическая правомерность постановки вопроса в данном звучании приобретает более весомую аргументацию при теоретическом рассмотрении интересующих нас процессов в экстремальной метаболической ситуации, каковой можно признать окислительный стресс. По нашему мнению, максимального приближения к пониманию особенностей работы как отдельных клеток, органов, тканей, так и организма в целом, можно достигнуть, поняв характер специфики и закономерности функционирования организма в условиях стресса. Создатель учения о стрессе Ганс Селье вошел в историю мировой науки, прежде всего потому, что первым сформулировал и первым приступил к разработке ответов на вопрос – существует ли, и если да, то в чем заключается единая неспецифическая реакция организма на повреждение любого характера? Неустанный и напряженный поиск не каких-то мелких, хотя и исключительно важных и значимых частных, а пристальный интерес к глобальной проблеме «синдрома ответа на

повреждение как таковое», привел его к созданию учения о стрессе и общем адаптационном синдроме.

Рассматривая стресс как специфическое состояние биологической системы, включающее весь комплекс строго специфичных и неспецифичных изменений, Селье заметил, что широчайший спектр самых разнообразных воздействий, включающий инъекции очень многих чужеродных и природных веществ, холод, тепло, радиацию, кровопотери, мышечные и эмоциональные нагрузки и т.д., всегда вызывает в организме неожиданно поразительные по сходству изменения и ответные реакции: увеличение коркового слоя надпочечников с одновременным снижением в них липидов и холестерина, инволюцию иммунокомпетентных органов и тканей и особенно тимус-лимфатического аппарата, эозинопению и изъязвление желудочно-кишечного тракта. Описав динамику основных метаболических изменений в организме и разделив на три последовательные фазы развитие общего адаптационного синдрома – тревога, резистентность, истощение, Селье сформулировал генерализованную эндокринную теорию стресса.

В соответствии с уровнем развития науки своего времени, Селье считал, что любое раздражение обязательно должно повышать, прежде всего, активность гипофиза – этой вершины в иерархической пирамиде всех желез внутренней секреции. Гипофиз резко увеличивает выброс в кровь адренокортикотропного гормона, под влиянием которого из коркового слоя надпочечников секретируется повышенное количество кортикостероидов. Кортикостероиды не столь различны по своему химическому строению, но многообразны по биологическому действию. В совокупности проявляемой биологической активности кортикостероиды представляют собой главные гормоны адаптации, т.е. ведущие факторы, обеспечивающие наиболее важную для жизнедеятельности организма способность приспосабливаться к конкретным условиям существования.

Все последующее время, с начала тридцатых годов XX столетия, теория Селье дорабатывалась и совершенствовалась с постепенным перенесением акцента в определении роли главных пусковых механизмов защитных реакций организма на симпатoadреналовую систему. Катехоламины, вырабатываемые в мозговом слое надпочечников, стали рассматриваться как главные регуляторы приспособительных реакций, обеспечивающие быстрое, радикальное и адекватное реагирование организма. Эту роль катехоламины в состоянии играть благодаря их способности к мощному воздействию на обменные процессы: а) инициировать распад гликогена и липидов; б) активировать окисление жирных кислот; в) повышать концентрацию в крови глюкозы, неэстерифицированных

жирных кислот, триглицеролов; г) усиливать потребление тканями кислорода; д) изменять просвет сосудов и бронхов; е) увеличивать работоспособность сердца и скелетной мускулатуры; ж) способствовать возбуждению центральной нервной системы.

Именно за катехоламинами признана сейчас основная связующая функция между нервной, иммунной и эндокринной системами организма через релизинг-факторы гипоталамуса, большую группу регуляторных пептидов, общих для трех жизненно важных систем и, продолжая этот перечень - гормонами гипофиза и всех нижележащих гормонсинтезирующих желез и клеток в специфических и неспецифических органах. В самые последние годы, по мере развития наших знаний о природе регуляции функций организма, у катехоламинов была выяснена еще одна, совершенно новая и очень интересная функция - способность выполнять роль метаболитических ловушек свободных радикалов.

По современному варианту классической схемы Селле в *первую фазу общего адаптационного синдрома (срочная адаптация)* уровень общей резистентности организма резко возрастает при одновременном столь же резком снижении концентрации свободных радикалов. *Во второй фазе (тревога)* сопротивление организма существенно понижается, а концентрация свободных радикалов увеличивается. *Третья фаза (долговременная адаптация)* характеризуется вновь стабильным ингибированием свободнорадикальных процессов, что, в первую очередь, обеспечивается высокой способностью перехвата супероксидных радикалов. *В четвертой фазе*, если таковая наступает, идет истощение организма, падение его резистентности, вновь инициируемое, сопровождаемое и направляемое ростом активности свободнорадикальных процессов, вплоть до летального исхода.

Как видим, четко прослеживается строжайшая синхронность между повышением жизненных сил организма (общей неспецифической резистентностью) и снижением интенсивности процессов образования свободных радикалов и столь же выраженная взаимосвязь между снижением сопротивляемости и повышением активности свободнорадикальных процессов. Одновременная утрата способности к нейтрализации образующихся свободных радикалов связывается, прежде всего, с губительным воздействием свободных радикалов на мембраны клеток. Первым окисляется их липидный слой. Нарушение структуры и функции мембраны естественно сопровождается функциональными нарушениями

ми клеток, причем самых различных органов и тканей. И виной всему – избыточная активизация свободнорадикальных процессов.

Именно в силу высказанных причин свободно-радикальные процессы рассматриваются в настоящее время как общий знаменатель, как ведущий унифицированный механизм, лежащий в основе развития патологического состояния как такового. И первопричина пагубного действия свободных радикалов заключается в том, что наряду с другими биологически активными молекулами, разрушаются чисто физически и теряют свою каталитическую активность, в том числе и ферменты антиоксидантно-антирадикальной защиты организма. Организм перестает справляться с нейтрализацией избыточного потока губительно действующих свободных радикалов и активируемых ими процессов перекисного окисления липидов. Нарушается окислительно-восстановительный баланс организма, наступает окислительный стресс. Естественно, в первую очередь страдают клеточные мембраны, прежде всего кровяных, а затем и всех, без исключений, остальных органов и тканей. Происходит это вследствие перекисидации липидного бислоя фосфолипидов цитоплазматических мембран со снижением их микровязкости (текучести) и, сопровождающими эти изменения, нарушениями процессов активного и пассивного трансмембранного переноса веществ самой различной химической природы как из клетки, так и во внутриклеточное пространство.

Одного этого вполне достаточно, чтобы полностью нарушился обмен веществ в клетке, органе и организме в целом. Для предотвращения перекисного окисления фосфолипидов биомембран организм располагает соответствующим защитным механизмом, главным звеном которого является мембрансвязанный фермент фосфолипид-гидропероксид-глутатионпероксидаза. Селен является абсолютно необходимым компонентом для проявления каталитической активности этого фермента.

Ключевая роль липопероксидации в инициации процессов патогенеза в настоящее время общепризнана. В начальной фазе стресса весь настрой метаболизма, определяемый взаимодействием нервной, иммунной и эндокринной систем, направлен на нормализацию процессов липопероксидации. Одним из главнейших компонентов широко разветв-

ленной и глубоко эшелонированной системы антиоксидантно-антирадикальной защиты, стоящей на страже организма от окислительного стресса, по праву считается фермент супероксиддисмутазы (СОД). Назначение фермента состоит в превращении сверхреакционноспособного метаболита кислорода супероксиданиона (в сотни раз более активного, чем молекулярный кислород) в молекулярный кислород и перекись водорода. Оба эти соединения далеко не безобидны для клетки и обладают высокой окислительной активностью. Задача их нейтрализации решается следующими за СОД ферментами. И, опять-таки, главным из них является глутатионпероксидаза (ГПО), которая катализирует реакцию гидролиза перекиси водорода или органических гидроперекисей, сопровождающуюся окислением восстановленного глутатиона.

Именно с открытием ГПО и выяснением ее биологической функции связан значительный прогресс в понимании роли селена в организме. ГПО – одно из 30 селенсодержащих биологически активных веществ. Одна грамм-молекула фермента содержит 4 грамм-атома селена. Селен может находиться в активном центре фермента в двух состояниях: в восстановленной форме типа селенола (E-SeH) и окисленной – типа селениновой кислоты (E-SeOH). Согласно схеме трехэтапного механизма действия ГПО, на первом этапе селенол окисляется перекисью в селениновую кислоту, а на следующих двух этапах окисленный энзим, взаимодействуя поочередно с двумя молекулами восстановленного глутатиона, восстанавливается до исходной формы селенола.

Основная активность ГПО приходится на долю цитозоля. Основными субстратами фермента являются органические гидроперекиси. Главное назначение фермента – защита клеточных структур, в первую очередь биомембран, от окислительной атаки. Говоря о этих двух ферментах, следует особо подчеркнуть, что и СОД, и ГПО являются типичными адаптивными ферментами. Их активность может резко возрастать в условиях активизации окислительных стрессовых реакций, что имеет следствием ограничение и ликвидацию очагов интенсивной липопероксидации в клетке. Поскольку оба фермента работают в связке, то совершенно очевидно, что повышение каталитической активности СОД влечет за собой индуктивное увеличение активности ГПО. Принимая самое непосредственное участие в долговременной регуляции уровня перекисного окисления липидов, оба эти фермента представляют собой важнейшие компоненты антиоксидантно-антирадикальной системы защиты организма.

Эта оценка биологической роли данных ферментов вполне справедлива, несмотря на хорошо известные факты того, что в начальные фазы стресса организм обладает еще

достаточными резервными мощностями для вполне успешной борьбы с перекисными процессами и при довольно низкой активности СОД и ГПО. Осуществляется это преимущественно быстрой и, как правило, кратковременной интенсификацией неферментативного пути перехвата и нейтрализации свободных радикалов. В качестве правила, уже завоевавшего права гражданства в биохимии, можно сформулировать – возрастание тотальной (ферментативной и неферментативной) способности организма противостоять свободным радикалам предшествует увеличению собственно ферментативного пути их нейтрализации.

В свете последних достижений биохимии, совершенно новую трактовку получил общеизвестный факт экстренного выброса в кровь катехоламинов, как первичной реакции организма на любую стрессовую ситуацию. Эти гормоны давно ассоциировались со срочной ответной реакцией организма в связи с их хорошо известной ролью мощных метаболических регуляторов, которая, как считалось, изучена достаточно глубоко и всесторонне. Совершенно новый аспект деятельности соединений этой группы сейчас связывается с их способностью осуществлять функцию «метаболических ловушек» свободных радикалов. Результатом этой деятельности является первичное уменьшение свободных радикалов, снижение перекисного окисления липидов с соответствующим увеличением количества легкоокисляемых липидов и уменьшением содержания холестерина в мембране. В качестве сопутствующей физиологической ответной реакции довольно резко изменяется скорость органного кровотока и, в первую очередь, микроциркуляции мозга. Вместе с тем, хорошо известно, что даже сам факт резкого снижения или повышения скорости кровотока неотъемлемо влечет за собой образование избытка свободных радикалов.

Казалось бы, имеем налицо совершенно парадоксальную ситуацию – соединения, призванные нейтрализовывать свободнорадикальные реакции, фактически их инициируют. Существуют логические объяснения этой ситуации. В начальную фазу стресса организм еще располагает солидным запасом антиоксидантов и, дополнительным выбросом в кровь «ловушек», успешно справляется с ингибированием перекисных процессов. После эффективного начального ингибирования вполне может создаться комплекс условий для активации свободнорадикальных реакций: а) изменение химического состава и липидного бислоя мембран (увеличение относительного содержания легкоокисляемых фосфолипидов и уменьшение доли холестерина), что вызывает заметное снижение устойчивости мембран к пероксидации; б) постепенное истощение пула эндогенных антиоксидантов; в) повышенное

образование радикалов кислорода (известно, что супероксиданион в сотни раз активней молекулярного кислорода); г) быстрое окисление мембранных липидов при избытке свободных радикалов; д) ингибирование продуктами пероксидации активности СОД; е) разрушение компонентов микросомальной монооксигеназной системы утилизации ксенобиотиков – НАДФ-цитохром Р-450-редуктазы, терминального участка пути транспорта электронов – цитохрома Р-450 и цитохром-Р-450-оксидазы, которые, в зависимости от конкретной метаболической ситуации, могут быть одновременно либо факторами нейтрализующими, либо генерирующими перекисные процессы; ж) в результате естественных метаболических превращений катехоламины могут из «ловушек» также превращаться в генераторы свободных радикалов.

Из данного беглого рассмотрения значимости проблем, связанных с антиоксидантно-антирадикальной системой защиты организма, становится совершенно понятен наш акцент на необходимость ее изучения и разработку новых препаратов и способов, обеспечивающих повышение ее функциональной активности.

Предпосылки изучения препаратов селена

Биологическая роль селена и его влияние на организм давно являются предметом пристального внимания ученых. В практике животноводства для повышения продуктивности и профилактики целого ряда заболеваний сельскохозяйственных животных широко применяются неорганические соединения селена в качестве ультрамикродобавок к кормам. Однако, несмотря на эффективность этой меры, на производстве, из-за опасности передозировки при высокой токсичности всех известных соединений селена, их используют с большой опаской.

В свете вышесказанного в последнее десятилетие ведется активный поиск селенсодержащих веществ для использования человеку и животным при введении их в продукты питания или в виде самостоятельной, либо комбинированной пищевой добавки в рационы здоровых и больных людей и животных, либо в виде инъекционных форм в качестве средства, повышающего в организме содержание селена или используемого в качестве профилактического, лечебного, либо корректирующего средства. Наибольшее распространение среди селенсодержащих добавок получили препараты в виде раствора селенита натрия или полученные на его основе. Но

селенит натрия высокотоксичное соединение и свободная доступность его использования может привести к непредсказуемым последствиям. Органические соединения селена – селенометионин и селеноцистеин очень дороги, а их токсичность находится на уровне селенита натрия. В последнее время предложен ряд новых селенсодержащих препаратов:

- «неоселен» – водный раствор селенита натрия (Каталог компании Стана, 1999);
- «биоселен» – селеновая добавка на основе хлебопекарских дрожжей (Давыдова, 1999);
- автолизат обогащенных селеном пекарских дрожжей (Голубкина и др., 1998);
- «селена-вэл» - гидролизат обогащенных селеном пекарских дрожжей с добавлением спирулины (Гигиен. серт. № 72-ЦГС-2685, ТУ № 9284-001-18241879-97, Минздрав РФ);
- финский препарат «Селена» (Голубкина и др., 1996);
- «деполен» – эмульсия селенита бария в вазелиновом масле (Пониткин, 1997);
- «седефиз» – комплексный препарат солей железа, йода и селена (Шешко и др., 1992);
- «селенорутин» - комплексный препарат селенита натрия с витамином Р (Hersborg et al., 1998).

Все перечисленные и многие другие препараты в своем составе или имеют селенит натрия, или, в случаях с дрожжами, получены с добавлением в культуральную среду высоких концентраций селенита натрия при их выращивании. При использовании всех видов обогащенных селеном дрожжей, потребитель имеет дело с недостаточно строго идентифицированным продуктом. Обычно в рекламных проспектах указывается, что селен находится в наиболее приемлемой, физиологически адекватной для организма форме – органической. При этом часто умалчивается соотношение в препарате минеральных и органических форм селена, и в каком виде находится органический селен. В работе Корнева Е.А. (1993) при сравнении действия отечественного препарата "Биоселен" на основе пекарских дрожжей и финского "Селена", обнаружено содержание минерального селена в обоих препаратах до 10%, а селенометионина –60-70%.

Если это обычно рекламируемые автолизаты или гидролизаты дрожжей, то селен, помимо остаточного селенита натрия, должен находиться в них в виде селе-

ноаминокислот и селеноолигопептидов, с включенными в них селеноаминокислотами. Селеноолигопептиды, точно также как и все остальные высокомолекулярные белковые соединения, перед включением в метаболический процесс проходят в организме естественную стадию эндогенного гидролиза до аминокислот. Селеноаминокислоты, появившиеся в свободном виде, а это, прежде всего, селеноцистеин и селенометионин, обладают столь же высокой токсичностью, что и селенит натрия.

В тканях животных на сегодняшний день известен единственный путь метаболизма, который претерпевают все селенсодержащие соединения (и органической, и минеральной природы). Различные формы селена окисляются до селенитов, которые затем восстанавливаются до селенидов, и только в этом виде они либо выводятся из организма, либо активируются специфической селенсодержащей фосфоселенфосфатазой с последующим включением в эндогенные биологически активные формы. Если это единственный, а другой науке неизвестен, или даже допустим, что не единственный, а главный путь, и если в организме существует единственная форма селенидов – селеноаминокислоты (не считая естественного конечного продукта метаболизации селеновых соединений - триметилселенония, или диметилселенида, выделяющегося из организма только при избытке селена в рационе и неспособности его весь перевести в триметилселеноний), то получается, что все потребленные селенопротеины и селенопептиды для ассимиляции должны обязательно пройти стадию эндогенного гидролиза, в продуктах которого будут содержаться, в том числе, и селеноаминокислоты. Далее селеноаминокислоты, точно также как и поступившие в организм селениты и селенаты, должны обязательно пройти описанный выше путь активации селенсодержащим ферментом фосфоселенфосфатазой.

Известно, что селен в животных тканях включается главным образом в цистеин. Эндогенный цистеин образуется из карбонового скелета серина, который после фосфорилирования специфической селензависимой фосфоселенфосфатазой преобразуется в активированный селеноцистеин и после этого включается в различные селенсодержащие пептиды и белки. Следовательно, организму должно быть практически безразлично - в органической или в минеральной формах селен поступил. А отсюда вытекает весьма интересный вывод – селенометионин и селеноцистеин не обладают никакими существенными преимуществами (по скорости и путям метаболизации) перед селенитами – селенатами.

Кроме того, селен – единственный из всех микро- и макроэлементов, включение которого в белки осуществляется на генетическом уровне, т.е. в молекуле ДНК имеется специфический кодон ТГА, кодирующий селеноцистеин. В настоящее время выделены матричные РНК для таких селеносодержащих ферментов как йодотирониндейодиназа, глутатионпероксидаза, фосфолипид гидропероксид-глутатионпероксидаза и все они содержат триплет УГА. Обычно этот триплет служит «стоп-сигналом» трансляции, однако авторы точно установили, что именно в этих м-РНК он кодирует селеноцистеин (Berry, Larsen, 1992). Таким образом, селеноцистеин по праву является нормальным продуктом эндогенного синтеза, а селен в животных тканях, главным образом, связан с цистеином, и только для селеноцистеина обнаружена специфическая транспортная РНК, доставляющая его активированную форму на рибосому, где и идет ее включение в синтезируемые белки (Hartfield et al., 1992).

Своего кодона и соответствующей транспортной РНК для селенометионина пока не обнаружено. Для окончательного доказательства метаболической судьбы экзогенно поступившего селеноцистеина необходимо выяснить количественные соотношения только двух возможных основных путей его превращения. Первый – окислительно-восстановительный с последующими ресинтезом селеноцистеина уже как эндогенного продукта, его активацией и включением в белки. Второй – непосредственное включение экзогенного селеноцистеина в белки.

Этот путь возможен только в том случае, если специфическая транспортная РНК не отличит его от эндогенного селеноцистеина и доставит на рибосому, т.е. место элонгации пептидов. Если второй путь невозможен теоретически, или он может иметь место и протекает наряду с первым путем, то становится совершенно понятным, что у селеноцистеина нет никаких метаболических преимуществ перед селенитом натрия. Все разговоры о предпочтительности потребления с пищей биологически более доступных и адекватных организму селеноаминокислот (из дрожжей, во всевозможных комбинациях с иными биологически активными веществами, в том числе и с, в очередной раз, ставшими очень популярными, микроводорослями - хлореллой, спирулиной и т.д.) лишены биохимической аргументации и,

следовательно, не имеют права на существование без специальных доказательств.

Громадное количество очень противоречивой научной информации о наличии или отсутствии преимуществ селеноаминокислот перед минеральными формами селена – красноречивейшее тому подтверждение. В любом потребляемом нами естественном продукте будь то растительного, либо животного происхождения, в разной пропорции для каждого из них, но обязательно присутствуют и органические, и минеральные формы селена. И какая из этих фракций естественного селена предпочтительнее, на настоящем уровне наших знаний, с определенностью сказать невозможно. Скорее всего, они действительно, довольно близки к равноценности.

По телеологическим соображениям организм не станет понапрасну содержать фосфоселенфосфатазный путь активации органического (аминокислотного) селена. Следовательно, вновь возвращаемся к выводу о том, что минеральные формы селена вполне могут рассматриваться как метаболически адекватные и практически равноценные для организма, наряду с его органическими формами.

Конечным продуктом обмена и органических, и минеральных форм селена в организме, наряду с наличием не идентифицированных до сего времени метаболитов типа различных производных меркаптомочевой кислоты, является триметилселеноний, выводимый с мочой. Он образуется из диметилселенида. В случаях повышенного поступления селена, организм не в состоянии его весь метаболизировать в триметилселеноний и он начинает выводиться через легкие в виде диметилселенида, придавая выдыхаемому воздуху запах чеснока, что может служить качественным критерием избытка селена в рационе.

При использовании селенита натрия, равно как и селеноаминокислот, возникает одна и та же проблема. В силу чрезвычайно высокой токсичности этих соединений, разрыв между физиологически необходимой дозой селена и его токсической дозой слишком мал. Поэтому, несмотря на вполне определенный положительный эффект, их использование обязательно требует тщательного соблюдения всех мер предосторожности и всегда сопряжено с определенным риском. Разумеется, это заключение не относится к очень плохо растворимым минеральным («деполен», представляющий собой селенит бария) и слабо метаболизируемым органическим соединениям селена («эбселен»).

За рубежом на протяжении последних 20 лет продолжает интенсивно изучаться интересный органический препарат селена – эбселен (Safayhi et al., 1985). Препарат обладает самостоятельной глутатионпероксидазной активностью и ис-

ключительно малотоксичен. Но это чрезвычайно ценное качество обусловлено его полной неметаболизируемостью в организме и, следовательно, эбселен совершенно не может служить источником селена.

В Саратовском университете получен органический препарат селена ДАФС (диацетофенилселенид) (Перунова и др., 1987), но он только в восемь раз менее токсичней селенита натрия, и совершенно не обладает антиоксидантной активностью. Использование его людям для ликвидации дефицита селена или коррекции какой-либо другой функции, регулируемой с помощью вводимого селена, также связано с большим риском.

В последнее десятилетие широко исследуется отечественный органический малотоксичный, жирорастворимый препарат селена - селенопиран (СП), являющийся антиоксидантом широкого спектра действия (Галочкин, Боряев и др., 1995, Блинохватов, 1993). Для этого соединения LD-50 per os составляет 725 мг/кг живой массы тела крыс, что приблизительно в 100 раз выше, чем у селенита натрия и селеноаминокислот. В сравнении с широко применяемыми на сегодняшний день, в стране и мире, неорганическими и органическими соединениями селена, селенопиран выгодно отличается от всех существующих селенсодержащих препаратов уникальным сочетанием метаболизируемости, с последующим высвобождением и включением в метаболический пул содержащегося в нем селена, и самостоятельной функциональной активностью, проявляемой собственно молекулой селенопирана. По существу, селенопиран, поступивший в организм будь то оральным, либо парентеральным путями, следует рассматривать как работающую пролонгированную форму селена, как метаболически активно функционирующее депо селена, с самостоятельно проявляемыми в организме специфическими функциями. Эти специфические функции заключаются в способности селенопирана не только активировать каталитическую активность, но и самостоятельно выполнять в организме роль глутатионпероксидазы – главного фермента антиоксидантно-антирадикальной системы защиты организма. Однако, и в этом случае, селенопиран выглядит значительно более предпочтительным. Глутатионпероксидаза нейтрализует токсические продукты перекисного окисления липидов, затра-

чивая для этих целей восстановленный глутатион – один из самых первых внутриклеточных лимитирующих факторов при окислительном стрессе любой этиологии, включая поражение радионуклидами. Причем на обезвреживание одной молекулы свободного радикала затрачивается одна молекула восстановленного глутатиона, тогда как одна молекула селенопирана способна нейтрализовать восемь молекул активных радикалов, выполняя одновременно глутатионсберегающую функцию.

По целому ряду критериев селенопиран не имеет аналогов в мире среди громадного количества селеносодержащих препаратов и очень выгодно отличается от всех известных нам органических соединений селена. Селенопиран, внесенный в жиры и корма, проявляет антиоксидантные свойства, не уступающие традиционно применяемым в ветеринарии и медицине антиоксидантам, таким как витамин Е и ионол (бутилоксилолуол, агидол). Поступая в организм животных и птицы с кормом или в виде инъекций, селенопиран способен выполнять роль мощного метаболического регулятора. Он активизирует ферменты антиоксидантной защиты организма. Снижает образование новых и нейтрализует ранее образовавшиеся активные продукты перекисного окисления липидов, улучшает функционирование клеточных мембран, нормализует обмен веществ, активизирует клеточное, гуморальное и фагоцитарное звенья иммунитета, повышает неспецифическую резистентность и продуктивность животных. Токсичность селенопирана ниже, чем у всех известных органических соединений селена и более чем в 100 раз меньше, чем у селенита натрия.

При использовании селенопирана возрастает сохранность поголовья животных и птицы на 15-40%, продуктивность - на 3-16%, улучшается качество получаемой животноводческой продукции с уменьшением затрат кормов на ее производство на 4-10%. После внесения селенопирана в жиры и корма предотвращается перекисное окисление липидов, улучшаются их потребительские качества, увеличивается срок хранения.

В соответствии с проведенными нами ранее многочисленными экспериментами по внесению селенопирана в корма животных, мы пришли к заключению, что его можно с успехом применять для повышения защит-

ных сил организма животных и птицы в борьбе с неблагоприятными факторами биологической, химической и физической природы, содержащимися в воде, кормах и воздухе, включая радионуклидные, а также как:

1. Профилактический и лечебный препарат при всех случаях дефицита селена в рационе.

2. Антиоксидантный препарат широкого спектра действия (как в кормах, так и в организме животных и птицы).

3. Иммуностимулятор.

4. Адаптогенный, антистрессовый препарат (во всех случаях стрессиндуцированных патологий, где ведущую в патогенезе роль играют свободнорадикальные реакции).

5. Препарат, нормализующий воспроизводительную функцию мужских и женских особей всех видов животных и птицы.

6. Стимулятор продуктивности.

7. Антиканцерогенный, антимуtagenный и антивирусный препарат.

8. Радиопротектор.

9. Препарат, усиливающий действие традиционных терапевтических средств, в том числе и вакцин.

10. Препарат, проявляющий детоксицирующие свойства. Он способен выводить из организма соли тяжелых металлов (свинец, ртуть, кадмий и др.) и целый ряд органических соединений – от этанола до лекарственных средств, гербицидов, пестицидов и т.д.

Ко всем вышеперечисленным выводам мы пришли на основании комплекса физиолого-биохимических и иммунологических критериев, исследовавшихся в предшествующих экспериментах, проведенных при введении селенопирана в корма в сухом виде, или в виде масляного раствора.

Наша научная работа, исходя из сказанного, осуществлялась в следующих основных направлениях:

1) из отечественных реагентов, на отечественном оборудовании нами синтезировано новое органическое соединение селена - селенопиран. Изучены основные физико-химические свойства полученного соединения, проведена его идентификация. Нарботано 50 граммов препарата для проведения серии исследований с целью испытания его *in vitro* и в опытах на сельскохозяйственных животных;

2) антиоксидантные свойства селенопирана изучены *in vitro* на модели термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты и натуральных растительных масел;

3) в производственных условиях проведены испытания на стельных и отелившихся коровах, на новорожденных телятах, на откармливаемых бычках, на супоросных и лактирующих свиноматках и подсосных поросятах, на цыплятах-бройлерах.

Описанные свойства селенопирана требуют серьезной, комплексной проверки его эффективности как отдельно взятого вещества, так и в качестве усиливающего (форсифицирующего) агента при совместном использовании с традиционными терапевтическими средствами и вакцинами.

Ожидается, что любые вакцины, содержащие в качестве одного из компонентов селенопиран, будут вызывать более выраженный антительный ответ на самые разнообразные антигены, чем в его отсутствие и, следовательно, будут обладать более выраженным биологическим эффектом. Вакцины, содержащие в своем составе какой-либо компонент, предназначенный специально для усиления их действия, в иммунологии принято называть форсифицированными вакцинами.

Состояние антиоксидантно-антирадикальной системы крови оценивали по активности основных ферментов антирадикальной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) по методу Мисра и Фридович в модификации Брусова (1976), глутатионпероксидазы по методу Моина (1986). В печени оценивали функциональную активность монооксигеназной системы путем дифференцированного определения количества и каталитической активности основного фермента системы цитохрома Р-450. Относительное количество цитохрома Р-450 в микросомальной фракции печени определяли по методу Омур и Сато (1984), каталитическую активность – по накоплению в системе формальдегида с помощью реактива Наша (1978). Количество ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида) определяли по методу Журавлева и др. (1989). Гемоглобин определяли цианметгемоглобиновым методом (Ронин и др., 1982), общий белок – по Лоури (1971). Состояние иммунной системы оценивали, характеризуя гуморальное и клеточное звенья иммунитета и фагоцитоз (количество В-лимфоцитов, иммуноглобулинов классов G и M, процент фагоцитирующих клеток, фагоцитарный индекс, индекс завершенности фагоцитоза, элиминирующая способность крови, количество лейкоцитов) (Кост, 1975).

***Приготовление инъекционных форм селенопирана
продолженного действия и тестирование его***

антиоксидантных свойств в опытах in vitro

В ряде предшествующих экспериментов мы вносили селенопиран в корм для животных либо в сухом виде, либо в виде масляных растворов. В обоих случаях, вследствие очень маленькой дозы внесения (1г на тонну корма) и отсутствия надлежащих дозаторов, эта процедура в производственных условиях трудновыполнима. Возникла необходимость разработки инъекционных пролонгированных форм, предполагающих однократную инъекцию, создающую в организме длительно действующее депо биологически активного вещества, что, несомненно, является более технологичным. Кроме того, использование селенопирана в пролонгированной форме позволит значительно увеличить разрыв между физиологической и токсической дозами селена, что существенно повышает безопасность данного препарата. Каждое животное адресно получает строго дозированное количество препарата, чем обеспечивается его экономия.

По комплексу критериев приемлемая пролонгированная форма селенопирана была получена путем стабилизации его масляного раствора стеаратом алюминия. Именно эта форма была испытана в экспериментах на животных.

По результатам лабораторных исследований установлено, что селенопиран обладает выраженными и весьма специфическими антиоксидантными свойствами. Детальную оценку антиоксидантной активности (АОА) селенопирана изучали *in vitro* на моделях термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты и натуральных растительных масел. Контролем служило окисление чистого метилолеата. Количество перекисей определяли йодометрическим методом, модифицированным нами для гидрофобных систем. Исследовали ингибирующее влияние разных температурных режимов и различных концентраций СП на образование перекисных радикалов метилолеата и растительного масла при их принудительном окислении. Окисление метилолеата тормозилось при всех выбранных концентрациях СП (0,005 - 0,5 мг/мл). Накопление перекисей происходило обратно пропорционально концентрации селенопирана.

Результаты свидетельствуют о выраженной антиоксидантной способности препарата (табл. 1).

В опыте с использованием модели термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты исследовали влияние 3-х концентраций селенопирана (0,012, 0,063, 0,125 мг/мл метилолеата).

Таблица 1. Антиоксидантные свойства селенопирана

Доза СП, мг/мл	Концентрация перекисей, ммоль/г смеси				
	время, часы				
	0	1,5	3	7	9
Контроль	0	0,01	0,02	0,03	0,08
0,012	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04
0,063	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03
0,125	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02

При всех исследуемых концентрациях селенопирана наблюдали выраженное дозозависимое торможение окисления метилолеата. Так, даже при минимальной, из испытывавшихся концентраций СП - 0,012 мг/мл, количество перекисей спустя 9 часов было почти в 2 раза ниже, чем в контрольном образце. Целью настоящего исследования являлось, кроме того, сравнение АОА селенопирана с некоторыми антиоксидантами, применяемыми в животноводстве и медицине, в частности, агидолом (ионолом) и синтетическим витамином Е.

Концентрации антиоксидантов брали 0,005-0,05%, т.е. близкими к рекомендуемым в пищевой промышленности для замедления окисления жиров (Галочкин и др., 1995).

Таблица 2. Скорость образования перекисей в растительном масле, содержащем 0,01% испытуемых антиоксидантов, при различной температуре

Перекиси	Концентрация перекисей, мкмоль/г масла								
	время, сут								
	0.	3.	5.	10.	24.	32.			
<i>при температуре 20°C</i>									
К	6	7	11	26	27	30			
СП	6	5	4	5	18	22			
И	5	7	7	9	16	21			
Е	6	7	11	11	20	22			
	время, сут								
	0.	1.	2.	3.	4.	7.	9.		
	<i>при температуре 40°C</i>								
К	6	7	7	8	9	19	20		
СП	6	4	3	5	6	16	19		
И	6	5	5	6	6	12	14		
Е	6	6	6	7	6	15	19		
	время, часы								
	0.	1.	3.	6.	9.	11.	13.	18.	26.
	<i>при температуре 80°C</i>								
К	6	9	10	13	22	30	37	48	69
СП	6	4	5	9	16	21	26	38	59
И	6	7	8	13	25	25	33	54	66
Е	6	6	10	17	25	28	37	55	78

Условные обозначения: К – контроль, СП – селенопиран, И – ионол, Е – витамин Е.

Таблица 3. Образование перекисных соединений в растительном масле при разных концентрациях селенопирана и ионола (t=60° C)

Концентрация антиоксидантов	<i>Концентрация перекисей, мкмоль/г</i>									
	время, часы									
	0.	2.	4.	7.	14.	22.	30.	37.	42.	48.
Контроль	7	7	8	8	14	17	20	31	45	50
СП-0,005%	7	5	4	5	10	15	19	27	33	37
СП-0,05%	7	7	3	5	10	14	17	25	30	38
СП-0,5%	7	4	3	6	7	6	7	7	7	8
И-0,005%	7	8	7	8	9	15	22	22	29	37
И-0,05%	7	7	7	7	10	14	18	23	23	30

Как видно из приведенного цифрового материала, процесс автоокисления растительного масла сильно зависит от температурного режима: если концентрация перекисей 20 мкмоль/г при 20° С в контрольном образце достигается за 10 суток, то при 80°С этот процесс занимает всего 9 часов. При температуре 20° С все испытуемые препараты проявили свои антиоксидантные свойства примерно на одинаковом уровне, однако, при повышении температуры до 80°С витамин Е проявил себя в качестве прооксиданта: концентрация перекисей в образце практически на всем протяжении эксперимента превышала таковую у контрольного образца. Ионол при значительном повышении температуры практически утратил свои АО свойства, и лишь селенопиран сохранил антиоксидантную активность. Но при всех испытывавшихся концентрациях антиоксидантов, при всех температурных режимах, только в образцах, содержащих селенопиран, в начале опыта наблюдали значительное (иногда более чем вдвое) уменьшение содержания пере-

кисей по сравнению с исходным их количеством. При испытании достаточно высоких концентраций СП (0,5%), концентрация перекисей, снизившаяся вначале вдвое по сравнению с исходной, к концу опыта практически не превышала фоновую величину, тогда как содержание перекисей в контрольном образце превысило исходный уровень более чем в 7 раз.

Следовательно, селенопиран, в отличие от традиционно применяемых в медицине и ветеринарии антиоксидантов, ионола и витамина Е, не только активно тормозит процесс перекисного окисления липидов, но и обладает совершенно новыми, отсутствующими у них свойствами. Он способен к дозозависимой нейтрализации свободных радикалов при внесении в системы с наличием в них ранее образовавшихся продуктов перекисного окисления липидов.

Завершая обсуждение сопоставительного изучения антиоксидантных свойств различных антиоксидантов в стандартной метилолеатной системе, мы хотели бы еще раз подчеркнуть совершенно уникальное и чрезвычайно важное свойство. Изучение способности ингибировать процесс окисления липидов при температуре 80° С показало, что в этом режиме витамин Е превращается из антиоксиданта в прооксидант и начинает усиливать процесс перекисного окисления липидов. И только селенопиран продолжает сохранять свои антиоксидантные функции.

Высокая электронодонорная способность молекулы селенопирана убедительно подтверждается не только нашими экспериментальными данными по изучению его антиоксидантной активности в жирах и организме сельскохозяйственных и лабораторных животных, но и при непосредственном вольтамперометрическом изучении окисления чистых препаратов селенопирана в ацетонитриле и хлористом метиле. Результаты свидетельствуют, что по величине энергии основного состояния молекулы и ее ионизированной формы, а также по значению первого ионизационного потенциала, электронодонорная активность селенопирана близка к самым мощным донаторам протонов в организме, таким соединениям как восстановленные производные никотиамида и хинона. Это дает неопровержимое доказательство для отнесения селенопирана по механизму функционирования к ряду высокоактивных эндогенных антиоксидантов, вступающих в реакции с окислителями за счет первичного донирования собственного электрона. Механизм антиоксидантного действия селенопирана и вне организма (липиды, продукты питания), и в организме заключается именно в способности его молекулы переносить электрон со своей высшей молекулярной орбитали на низшую молекулярную орбиталь активных окислителей, в том числе перекисей водорода и липоперекисей. Благодаря этой способности молекулы селенопирана, он и проявляет мощную, глубокошелонированную, многофункциональную защиту организма и является активным антиоксидантом в кормах, продуктах питания и жирах, на длительное время сохраняя их качество.

Испытания селенопирана на сельскохозяйственных животных и птице

Эксперименты на телятах. В эксперименте, проведенном в колхозе «Алешинский» Калужской области изучали использование селенопирана в качестве неспецифического препарата, повышающего защитные силы организма новорожденных телят при возникшей в хозяйстве энзоотической бронхопневмонии телят. Испытание проведено на двух группах телят по 40 голов в каждой. Телятам опытной группы в недельном возрасте однократно ввели внутримышечно пролонгированную инъекционную форму селенопирана из расчета содержания в одной дозе 100 мг препарата. Срок наблюдения за животными - 60 дней. За этот период из опытной группы выявлено с клиническими признаками бронхопневмонии 4 теленка, которых стали лечить по традиционной схеме антибиотиковой терапии. Все телята остались живы и выздоровели. За этот же период из 40 контрольных телят заболело 26, из них два теленка пало и 9 были вынужденно забиты с выраженной патологоанатомической картиной бронхопневмонии. Среднесуточный прирост живой массы телят опытной группы был 302 г, а в контрольной группе - 270 г. Разница составила 12%.

В итоге проведенного эксперимента подтвержден мощный профилактический эффект селенопирана, его способность существенно снижать восприимчивость животных к заболеваниям и повышать результативность традиционной терапии.

В опыте, проведенном в СХП «Доброволец» Нижегородской области на 36-ти 3-месячных телятах, разделенных на три группы, пролонгированную форму селенопирана вводили подкожно, двукратно, с интервалом 1 месяц (1 группа). Животным 2-й группы дополнительно инъецировали тривит, 3-я группа была контрольной. Схема кормления телят была рассчитана на получение среднесуточного прироста живой массы 600г.

Через месяц после введения селенопирана большинство показателей, характеризующих общую резистентность (фагоцитарная, бактерицидная, комплементная и лизоцимная активность крови), были выше, чем у животных контрольной группы на 10 – 12 %. На этот же порядок более высоким в крови был также уровень общего белка, иммуноглобулинов, альбумина, каротина, кальция, фосфора, кобальта, йода, цинка. При проведении эксперимента выявлено одно обстоятельство, которому мы пока не в состоянии дать логического объяснения и оно нуждается в дополнительной проверке. Заключается оно в том, что при дополнительной инъекции тривита (2-я группа), изменения перечисленных показателей были менее выражены и математически недостоверны. Однако, у жи-

вотных этой группы прирост живой массы был самым высоким (659 г/сут против 624 г/сут в 1-й группе и 581 в контроле).

Проведенный опыт подтвердил, что селенопиран оказывает многостороннее биологическое воздействие на организм телят в период перехода от молочного типа питания на дефинитивный. Входящие в состав препарата «Тривит» жирорастворимые витамины, проявили синергическое взаимодействие с селенопираном, что и отразилось на более лучшем приросте живой массы телят.

Эксперимент на откармливаемых бычках. Опыт проведен в хозяйственных условиях на двух группах откармливаемых бычков холмогорской породы, по 9 голов в группе. Кормили животных индивидуально в соответствии с нормами РАСХН. Бычкам опытной группы при постановке на откорм в возрасте 12 месяцев ввели подкожно пролонгированную форму селенопирана в дозе 200 мг/голову. Продолжительность опыта – 3 месяца. Взвешивали животных ежемесячно. В качестве критериев иммунологического состояния и неспецифической резистентности организма использовали определение концентрации иммуноглобулинов классов G и M, активность лизоцима, β -лизинов и общую бактерицидную активность. По завершении опыта проводили контрольный убой животных с обвалкой туши и анализом химического состава мяса.

Животные опытной группы имели в сыворотке крови выше общую бактерицидную активность, а также концентрацию иммуноглобулинов классов G и M, что, как мы полагаем, оказалось достаточным для поддержания иммунологического статуса организма на более высоком уровне, чем у контрольных животных. Опыт проведен на хорошем зоотехническом фоне (среднесуточный прирост живой массы в контрольной группе составил 989 г). И даже в этих условиях инъекции СП повлекли повышение привесов на 6%. При снятии с откорма контрольные животные весили 344 кг, а опытные – 358. Использование органического препарата селена не только повысило функциональную активность иммунной системы и интенсивность роста бычков, но и улучшило убойные качества. Масса туши контрольных животных составила 177 кг, а опытных – 181 кг с одновременным увеличением массы мяса на 4%, повышением содержания азота в длиннейшей мышце спины на 2,8% и жира с 3,85 кг до 5,62 кг, т.е. на 46%.

Таблица 4. Показатели, характеризующие

состояние иммунной системы бычков

Группы	Взятие крови (по месяцам опыта в возрасте)			
	12 мес	13 мес	14 мес	15 мес
Общая бактерицидная активность (%)				
Контрольная	40,6±1,6	0,2±3,4	43,7±2,9	46,0±2,4
Опытная	41,6± 3,7	40,8±2,4	50,6±4,1	56,5±3,5
Уровень активности лизоцима (%)				
Контрольная	9,3±1,3	10,0±1,0	11,7±2,0	12,0±1,5
Опытная	9,0±1,1	9,9±0,0	12,5±3,5	14,0±2,3
Концентрация иммуноглобулинов класса М (мг/мл)				
Контрольная	3,8±0,1	3,7±0,1	3,7±0,1	3,9±0,1
Опытная	3,8±0,4	3,8±0,9	3,9±0,2	4,3±0,1
Концентрация иммуноглобулинов класса G (мг/мл)				
Контрольная	11,4±0,2	11,5±0,4	12,5±0,5	13,1±0,4
Опытная	11,5±0,9	11,7±1,6	13,0±0,3	13,7±0,1
Уровень активности β-лизинов (%)				
Контрольная	26,2±1,6	27,3±1,6	33,7±0,6	34,5±0,6
Опытная	26,3±1,9	27,5±2,3	34,3±2,1	35,9±3,1

Таблица 5. Показатели интенсивности роста бычков

Группы	Возраст животных			
	13 мес	14 мес	15 мес	За опыт
Контрольная				
Живая масса, кг	284,3	314,3	344,7	
Абсолютный прирост живой массы, кг	-	30	30,3	60,4
Среднесуточный прирост живой массы, г		1000	979	989
Опытная				
Живая масса, кг	249,0	326,0	358,0	
Абсолютный прирост живой массы, кг	-	32	32	64
% к контролю		106,7	105,3	106,0
Среднесуточный прирост живой массы, г		1066	1032	1049
% к контролю		106,7	105,4	106,1

Таблица 6. Результаты контрольного убоя и обвалки туши

Показатели	Группы		% к конт-

	контроль	опытная	ролю
Живая масса, кг	343	359,5	104,8
Масса туши, кг	176,9	181,0	102,3
Убойный выход туши, %	49,6	49,5	-
Масса мяса:			
кг	128,1	133,2	104,0
%	72,5	73,6	-
Масса костей:			
кг	48,8	47,8	98,0
%	27,6	26,4	-
Масса внутреннего жира, кг	6,9	6,8	98,6
Площадь мышечного глазка, см ²	70,4	75,0	105,6
% мяса (9-11 ребро)	71,1	75,5	106,2

Таблица 7. Состав длинной мышцы спины, %

Группы	Сухое вещество	Азот	Сырой жир	Сырая зола
Контрольная	25,00	3,17	3,85	4,89
Опытная	25,52	3,26	5,62	4,68
% к контролю	102,1	102,8	146,0	95,7

Эксперимент на коровах. Опыт проведен в АОЗТ «Зеленоградский» Московской области. Изучали влияние разработанной пролонгированной формы селенопирана на воспроизводительную функцию коров. Под опытом находилось 4 группы коров черно-пестрой породы, по 15 голов в группе. Все животные находились в сухостойном периоде после завершения второй лактации с продуктивностью 4000 кг молока. За 15 дней до предполагаемого отела коровам однократно ввели подкожно селенопиран в следующих дозах: 1-я группа - 80 мг, 2-я группа - 160 мг, 3-я группа - 240 мг, контрольной группе инъекцировали плацебо. Все подопытные животные отелились в срок. Учитывали следующие показатели: задержание последа, количество эндометритов, продолжительность сервис-периода, оплодотворяемость от первичного осеменения, индекс осеменения. Результаты проведенного эксперимента суммированы в таблице 8.

Как явствует из цифрового материала, представленного в таблице 2, прослеживается четкий дозозависимый эффект влияния селенопирана на все изучавшиеся показатели. Если в контрольной группе у 26,3% коров отмечалось задержание последа, то при минимальной из испытывавшихся доз селенопирана - 80 мг на одно животное, количество задержаний последа снизилось до 15,3%; при дозе 160 мг оно составило уже 13,3%, а при введении 240 мг количество коров с задержанием после-

да составило 6,2%, т.е. снизилось более чем в 4 раза. Выраженное положительное влияние селенопирана проявилось и на количестве коров, заболевших послеродовыми эндометритами (этот показатель снизился почти в два раза), и на продолжительности сервис-периода, которая сократилась на 20 дней, и на величине оплодотворяемости коров после первичного осеменения, возросшей на 27%, и на количестве осеменений коров, потребовавшихся для достижения стельности (индекс осеменения снизился с 2,1 до 1,6, т.е. на 24%).

Таблица 8. Влияние инъекций пролонгированной формы селенопирана на воспроизводительную функцию коров

Показатели	Группы			
	Контроль физраствор	1-я 80мгСП	2-я 160 мг СП	3-я 240 мг СП
Задержание последа (%)	26,3	15,3	13,3	6,2
% к контролю	100	60	51	24
Эндометриты (%)	30,5	30,7	20,0	18,7
% к контролю	100	100	66	61
Сервис-период (дни)	107	98	90	87
% к контролю	100	92	84	81
Оплодотворяемость от первич. осеменения (%)	52	61	63	66
% к контролю	100	117	121	127
Индекс осеменения	2,1	1,7	1,7	1,6
% к контролю	100	81	81	76

Если принять во внимание, что селенопиран не рассматривается нами как специфический препарат, предназначенный для профилактики и лечения самых различных аномалий воспроизводительной системы животных, то полученные положительные результаты следует квалифицировать как исключительно интересные, а работа в этом направлении, безусловно, заслуживает дальнейшего серьезного продолжения.

Эксперименты на цыплятах-бройлерах. Для получения дополнительных, более весомых, доказательств антиоксидантных свойств селенопирана был проведен специальный модельный эксперимент на цыплятах-бройлерах. Цыплятам намеренно скармливали предварительно высокоокисленный жир (концентрация гидроперекисей 0,265 мМ/г жира – 1-я опытная группа), жир, окисленный в присутствии селенопирана (2-я опытная группа) и нормальный жир (контрольная группа). Жир

окисляли при температуре 60° С с постоянной аэрацией в течение 10 суток. Для ускорения процесса окисления в жир вносили 33%-ю перекись водорода в соотношении 300: 1. Для цыплят 2-й опытной группы жир окисляли в присутствии селенопирана (10 мг/кг жира). На 100 кг комбикорма вносили по 3 кг нативного, окисленного или окисленного в присутствии селенопирана жира.

Было сформировано три группы цыплят-бройлеров по 100 голов в каждой. Цыплят кормили в соответствии с рекомендуемыми нормами. В 14-, 28- и 49- суточном возрасте проводили взвешивание и убой цыплят для взятия образцов крови и тканей на биохимические исследования.

Влияние окисленного жира с образовавшимися в нем перекисями жирных кислот на организм цыплят было подтверждено изменением биохимических показателей (активность СОД, ГПО, содержание гемоглобина, количество Т-лимфоцитов, табл.9).

Таблица 9. Биохимические показатели крови цыплят

Показатели	Контрольная группа			Опытные группы цыплят					
				1-я (с окисленным жиром)			2-я (окисл. жир + селенопиран)		
	Возраст цыплят, сутки								
	14	28	49	14	28	49	14	28	49
Активность СОД	8,3 ±2,00	9,0 ±0,56	5,4 ±1,44	7,0 ±0,59	6,1 ±0,69	15,1 ±1,73	17,6 ±2,99	8,3 ±1,00	5,9 ±0,31
%	100	100	100	84	68	278	212	92	109
Активность ГПО	359 ±50	345 ±20	500 ±60	226 ±9	283 ±30	569 ±54	444 ±25	655 ±46	950 ±52
%	100	100	100	63	82	114	124	190	190

Примечание: активность ГПО – мкМоль восстановленного глутатиона/мин/г белка; активность СОД – условн. Ед./г белка

Живая масса цыплят 1-й опытной группы в конце опыта была на 9% ниже, чем в контроле, а во 2-й опытной группе она даже превышала контрольную на 1%. В контрольной и 2-й опытной группах падеж цыплят отсутствовал, в то время как в 1-й опытной группе пало 7% цыплят.

Изменения биохимических показателей подтвердили данные лабораторных испытаний антиоксидантных свойств селенопирана о том, что данный препарат, пред-

варительно внесенный в жир перед началом окисления, тормозит образование продуктов перекисного окисления липидов, которые отрицательно сказываются на метаболических процессах. Поступив в организм с окислявшимся жиром, селенопиран способствовал активации ферментов СОД и ГПО. Каталитическая активность СОД в группе цыплят с селенопираном была значительно выше в 14- и 28-суточном возрастах, чем в группах без него. В 49-суточном возрасте в группе без селенопирана активность фермента снижалась, но оставалась выше, чем у цыплят опытной группы. Активность ГПО была во все возрастные периоды выше, чем в контроле. Снижение активности ферментов в 14-суточном возрасте у цыплят, получавших окисленный жир, свидетельствует о высокой интенсивности протекания в организме свободнорадикальных процессов, инициированных повышенным поступлением продуктов перекисидации липидов с окисленным жиром. Снижение активности СОД и ГПО указывает на истощение эндогенной системы антиоксидантной защиты организма цыплят этой группы. К 28-суточному возрасту снижение активности ферментов продолжалось, но оно было менее выражено, а в возрасте 49 суток отмечено резкое повышение активности. Этот факт подтверждает естественное стремление и адаптивную возможность системы снижать концентрацию продуктов перекисного окисления липидов. По содержанию гемоглобина и Т-лимфоцитов между группами значимых и достоверных отличий выявлено не было.

Таким образом, модельным опытом *in vivo* были подтверждены результаты опытов *in vitro* о том, что селенопиран обладает антиоксидантными свойствами в организме, повышая функциональную активность системы антиоксидантно-антирадикальной защиты организма цыплят.

Для выявления оптимальных доз селенопирана был проведен отдельный опыт на цыплятах-бройлерах. На опыт было поставлено 4 группы цыплят по 100 голов в каждой. Опыт проведен в течение всего производственного цикла – 49 суток. Все группы получали полноценный полнорационный комбикорм в соответствии с нормами кормления. Первая опытная группа получала селенопиран из расчета 0,1 мг селена на 1 кг комбикорма, 2-я группа – 0,2 мг и 3-я – 0,3 мг. Селенопиран вво-

дили в комбикорм в виде масляного раствора. Контрольная группа получала равное количество растительного масла без селенопирана.

Взвешивание и убой цыплят проводили в возрасте 14, 28 и 49 суток. Как и в предыдущем эксперименте, в крови анализировали активность СОД и ГПО. Кроме того, в печени анализировали каталитическую активность цитохрома Р-450 – основного фермента оксигеназной системы метаболизации продуктов перекисного окисления липидов и утилизации ксенобиотиков. Помимо активности цитохрома Р-450, в микросомах печени определяли его относительное содержание методом градиентного электрофореза в полиакриламидном геле. Микросомальную фракцию выделяли методом дифференцированного центрифугирования. После завершения эксперимента живая масса цыплят 3-й опытной группы была на 8% выше, чем в контроле. Биохимические показатели представлены в таблицах 10, 11.

Таблица 10. Активность ферментов антиоксидантной системы и содержание ТБК-активных продуктов в крови цыплят

Группы	ТБК-активные продукты			Активность ферментов					
				СОД			ГПО		
	возраст цыплят, сутки								
14	28	49	14	28	49	14	28	49	
Контроль	4,31 ±0,22	4,82 ±0,84	4,00 ±0,30	13,4 ±0,93	11,3 ±2,09	6,4 ±0,97	228 ±20	437 ±9	263 ±60
Опыт									
1 - я	3,87 ±0,23	4,65 ±0,24	3,89 ±0,32	14,0 ±1,83	16,7 ±2,31	7,0 ±1,8	300 ±80	485 ±35	384 ±30
2 - я	4,05 ±0,28	4,00 ±0,32	3,95 ±0,30	13,7 ±0,77	16,3 ±2,24	7,7 ±0,93	404 ±49	566 ±45	384 ±29
3 - я	3,77 ±0,29	3,46 ±0,47	3,06 ±0,21	15,7 ±1,12	19,4 ±1,67	7,5 ±0,58	341 ±45	575 ±46	422 ±33

Примечание: ТБК-активные продукты – нМ малонового диальдегида/мл крови, активность ГПО – мкМоль восстановленного глутатиона/мин/г белка; активность СОД – условн. Ед./г белка.

Таблица 11. Характеристика монооксигеназной системы цыплят

Цитохром Р-450

Группы	содержание в микросо- мах печени			гидроксиллирующая ак- тивность		
	возраст цыплят, сутки					
	14	28	49	14	28	49
Контроль	0,61 ±0,09	0,57 ±0,07	0,53 ±0,06	8,64 ±0,23	7,50 ±1,36	2,42 ±0,80
Опыт:						
1-я	0,51 ±0,10	0,66 ±0,20	0,52 ±0,14	9,31 ±1,97	7,34 ±0,70	3,57 ±1,60
2-я	0,52 ±0,13	0,74 ±0,09	0,77 ±0,14	9,25 ±0,39	9,21 ±0,57	5,17 ±0,64
3-я	0,63 ±0,06	0,90 ±0,05	1,02 ±0,19	10,00 ±1,02	10,06 ±0,66	5,47 ±0,50

*Примечание: содержание цитохрома P-450 – нМоль/мг микро-
сомального белка, гидроксиллирующая активность – нМоль формальде-
гида/мин.*

Результаты опыта показали, что применение селенопирана повысило активность антиоксидантно-антирадикальной системы организма цыплят и, как следствие этого, показатели интенсивности роста были более высокими. Лучшей дозировкой по влиянию на интенсивность роста и биохимические показатели была 1,2 мг селенопирана на кг комбикорма, что в пересчете на содержание селена составляет 0,3 мг. Если в 1-й и 2-й опытных группах в 14- и 49-суточном возрасте не было отмечено индукции синтеза ферментного белка цитохрома P-450, то гидроксиллирующая активность его была выше, чем у цыплят контрольной группы. В остальных случаях как количество цитохрома P-450, так и активность монооксигеназной системы были выше у цыплят опытных групп (особенно в 3-й). Сохранность поголовья во всех опытных группах была 100%, а в контрольной группе - 94%.

Опыт на супоросных и лактирующих свиноматках и поросятах. Опыт проведен на трех группах свиноматок по 5 голов в каждой и на трех группах поросят по 50 голов (Галочкин и др., 2000). Свиноматки контрольной группы получали основной рацион, сбалансированный по всем питательным и биологически активным веществам (Нормы РАСХН, 1993 г), кроме селена, естественное содержание которого составило 55 мкг/кг корма, что считается как селендефицитный рацион (современные нормы содержания селена в рационе – 100 – 300 мкг/кг корма). Свиноматки 1-й опытной группы в соста-

ве премикса дополнительно получали минеральную форму селена в виде селенита натрия из расчета 0,2 мг селена/кг корма. Свиноматкам 2-й опытной группы дважды инъектировали подкожно разработанную пролонгированную форму селенопирана. Первая инъекция в количестве 280 мг селенопирана осуществлена в момент постановки животных на опыт (первый день супоросности), вторая инъекция – 135 мг селенопирана за 10 суток до опороса. Общее количество, в расчете на селен, животные обеих опытных групп получили одинаково.

Поросятам всех трех групп, соответственно полученных от трех групп свиноматок, с двухнедельного возраста скармливали престартерный комбикорм без добавок селена (в 1 кг комбикорма содержалось 190 г сырого протеина и 13,1 МДж обменной энергии). Поросятам 3-й группы однократно в суточном возрасте ввели по 14 мг селенопирана в составе той же пролонгированной формы. Длительность опыта на поросятах – один месяц, затем был проведен убой поросят.

У свиноматок кровь для анализов брали в конце второго месяца супоросности, в первые сутки после опороса и в конце первого месяца лактации, у поросят – в суточном и месячном возрасте. У супоросных и подсосных свиноматок и поросят изучали активность основных ферментов антирадикально-антиоксидантной защиты организма и показатели, характеризующие неспецифическую резистентность.

В результате проведенного опыта было выяснено, что специфическая активность супероксиддисмутазы крови существенно зависела от обеспеченности организма животных селеном (табл. 12). Препараты селена также повышали активность другого фермента защиты клеток от накопления свободных радикалов – глутатионпероксидазы. Причем, стимулирующее действие добавок селенита натрия на активность глутатионпероксидазы было недостоверным, тогда как влияние селенопирана на этот селеносодержащий фермент проявилось весьма выражено как у свиноматок, так и у их потомства.

Совершенно закономерно оба препарата селена снизили концентрацию в крови свиноматок и поросят основного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. Интересен факт большего

влияния на этот показатель у поросят селенопирана в сравнении с селенитом натрия. Так, содержание малонового диальдегида у новорожденных и месячных поросят 3-й группы снизилось на 47 и 36%, а у животных 2-й группы – на 21 и 14% в сравнении с 1-й группой.

Оба препарата селена не оказали достоверного положительного влияния на многоплодность свиноматок, однако мертворожденных поросят в 1-й группе было 3, а во 2-й и 3-й таковые отсутствовали (табл.12).

Таблица 12. Активность основных ферментов антирадикальной защиты и концентрация малонового диальдегида в крови свиноматок и поросят

Физиологическое состояние	Группы		
	1	2	3
Супероксиддисмутазы (СОД) цельной крови, усл.ед./мл крови			
Свиноматки:			
холостые	0,52±0,008		
56-е сут супоросности	1,89±0,11	1,69±0,15	1,75±0,32
1-е сут после опороса	2,76±0,14	4,27±0,37*	2,88±0,38
28-е сут лактации	2,37±0,23	2,47±0,18	3,60±0,11*
Поросята:			
новорожденные	2,18±0,17	3,20±0,15*	2,45±0,24
28-сут.	1,59±0,20	2,70±0,31*	1,86±0,12
Глутатионпероксидаза (ГПО) эритроцитов, мкмоль/мин/г гемоглобина			
Свиноматки:			
холостые	251±1,9		
56-е сут супоросности	480±19	493±17	647±24*
1-е сут после опороса	107±21	147±18	333±37*
28-е сут лактации	245±19	263±32	335±6,5*
Поросята:			
новорожденные	161±26	161±18	180±16
28-сут.	84±3,6	100±14	129±11*
Малоновый диальдегид (МДА) сыворотки крови, нмоль/л			
Свиноматки:			
холостые	4,81±0,59		
56-е сут супоросности	3,58±0,31	2,43±0,13*	
1-е сут после опороса	3,52±0,19	3,30±0,22	
28-е сут лактации	5,50±0,16	4,65±0,13*	
Поросята:			
новорожденные	5,95±0,39	4,70±0,10*	3,17±0,11*
28-сут.	8,19±0,47	7,06±0,31	5,21±0,72*

Примечание: * - $P < 0,05$ по сравнению с 1-й группой

Добавки селенита натрия способствовали достоверному повышению крупноплодности. Сохранность поросят контрольной группы за подсосный период составила 75,9%, во 2-й и 3-й группах соответственно 84,6 и 85,7%. Добавки селенита на-

трия в корм супоросным и подсосным свиноматкам и особенно инъекции селенопирана оказали достоверное стимулирующее влияние на интенсивность роста поросят в подсосный период. Прирост живой массы поросят второй и третьей групп был выше на 2,7 и 16% в сравнении с первой группой.

Таблица 13. Репродуктивная функция свиноматок и рост поросят

Показатели	Группы		
	1	2	3
Количество свиноматок	5	5	5
Количество поросят при рождении, гол.:			
в т.ч. мертворожденные	54	52	49
Задавлено матками	3	-	-
Пало	5	4	3
Убито на анализ	1	-	-
Осталось в опыте	4	4	4
Многоплодность	41	44	42
Живая масса поросят, кг:			
при рождении	10,8	10,4	9,8
при отъеме в 28 сут.	1,24±0,01	1,38±0,02*	1,20±0,02
Масса гнезда при отъеме, кг	5,58±0,07	5,84±0,08*	6,2±0,08*
Прирост жив.массы поросят за подсосный период:			
г/сут	45,8	51,4	52,4
кг	155±2,2	159±2,5	180±3,1*
Сохранность поросят за подсосный период, %	4,34	4,46	5,04
	75,9	84,6	85,7

Примечание: * - $P < 0,05$ по сравнению с 1-й группой

Эксперимент на ягнятах. В АО «Пригородное» Пензенской области был проведен опыт на ягнятах, отнятых от матерей в 3-месячном возрасте. Животные были разбиты на три аналогичные группы по 30 голов в каждой и получали сбалансированный рацион. Первая группа – контрольная, 2-я – контрольный рацион + селенопиран, 3-я – контрольный рацион + селенит натрия. Оба препарата животные опытных групп получали из расчета на элементарный селен по 0,1 мг/кг живой массы. Продолжительность эксперимента – 65 дней. Через 1, 7, 18 и 28 суток после отъема у ягнят брали кровь для анализов. Результаты подтвердили ранее полученные закономерности на других видах животных. Концентрация гемоглобина практически не отличалась у всех трех групп и колебалась в пределах биологической нормы для данного вида и возраста животных (от 90 до 110 г/л). Гематологическая картина также не указывала на какие-либо отрицательные влияния использования селенопирана и селенита натрия. Величи-

ны показателей, характеризующих неспецифическую резистентность и антиоксидантную активность организма ягнят, находились в пределах физиологической нормы с тенденцией (математически недостоверно) к более высокой функциональной активности у обеих опытных групп. Отсутствие четких различий между группами мы объясняем вполне достаточным исходным уровнем селена в крови животных, находившихся на стандартном рационе. Продуктивность животных опытных групп была на 6% выше, чем в контрольной группе. Концентрация селена в крови подопытных ягнят представлена в таблице 14.

Примечательно, что концентрация селена в крови существенно повысилась во всех трех группах через неделю после отъема, затем она начала довольно резко снижаться в контрольной группе, опустившись через 28 суток на 25 % ниже исходного уровня.

В опытных группах первичная ответная реакция на отъем от матерей, который, несомненно, следует отнести к числу сильнейших стресс-факторов, была сходной по направленности, но на несколько более высоком количественном уровне.

Таблица 14. Содержание селена в крови подопытных ягнят, мкг/литр

Сутки после отъема	Контроль	Опытные группы	
		селенопиран	селенит натрия
1	115,4±8,4	119,5±6,3	116,1±7,7
7	133,0±2,0	160,1±8,1	154,9±6,0
18	97,7±7,1	135,0±7,3	144,8±3,3
28	87,7±5,4	129,5±9,9	126,3±9,1

Затем также наблюдалось последовательное снижение, но концентрация селена сохранялась на уровне, превышающем исходный. Следует также добавить, что даже самая низкая концентрация селена в крови, отмеченная в контрольной группе через 28 дней после отъема (87,7 мкг/л), не может трактоваться как патологическая. В настоящее время считается общепризнанной точка зрения о том, что клинические проявления селенодефицитного состояния животных начинаются при содержании селена в крови ниже 50 мкг/литр.

Таким образом, в данном конкретном эксперименте нами не было зафиксировано характерно яркой ответной реакции организма ягнят. Это вполне логично объясняется отсутствием селеновой недостаточности в рационе овцематок и их потомства. И, тем не менее, факт закономерного снижения концентрации селена в крови животных контрольной группы

до уровня, граничащего с селенодефицитным состоянием, даже на этом благополучном по селену фоне, заставляет насторожиться и подтвердить целесообразность добавок селеновых препаратов.

Заключение

1. На отечественном оборудовании, с использованием отечественных реагентов, в лабораторных условиях синтезировано высокоэффективное, низкотоксичное органическое соединение селена - селенопиран. Препарат использован для испытания как в опытах *in vitro*, так и на сельскохозяйственных животных.

2. При тестировании антиоксидантных свойств селенопирана в лабораторных опытах на метилолеатной системе и на натуральных растительных маслах выявлено, что селенопиран предотвращает принудительное окисление метилолеата и подсолнечного масла с интенсивностью, не уступающей традиционно используемым в медицине и ветеринарии антиоксидантам – витамину Е и ионолу (бутилоксилолу, агидолу). Причем, селенопиран, в отличие от этих традиционных антиоксидантов, способен выполнять функцию «метаболической ловушки» ранее образовавшихся продуктов липопероксидации.

3. На цыплятах-бройлерах, свиньях и крупном рогатом скоте изучен физиолого-биохимический механизм действия селенопирана, заключающийся в том, что этот препарат:

а) активизирует ферментативную антиоксидантную систему организма животных, повышая активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы;

б) активизирует монооксигеназную систему, индуцируя синтез ферментного белка и повышая каталитическую активность цитохрома Р-450;

в) повышает неспецифическую резистентность организма, активизирует клеточное, гуморальное и фагоцитарное звенья иммунитета;

г) ингибирует образование свободных радикалов и тормозит перекисное окисление липидов;

д) нейтрализует ранее образовавшиеся свободные радикалы и ингибирует спонтанный и принудительный процессы перекисного окисления липидов;

е) подобно минеральным солям селена, селенопиран способен отдавать свой селен для включения в состав селеносодержащих ферментов.

4. В опытах на коровах и свиноматках при использовании селенопирана отмечен выраженный положительный эффект на воспроизводительную функцию животных

5. В опытах на бычках и поросятах селенопиран проявил себя как иммуностимулятор, как препарат, повышающий неспецифическую резистентность и интенсивность роста животных, улучшающий качество мясной продукции и снижающий затраты корма на ее производство.

Полученный экспериментальный материал послужит основой для последующего экспериментирования с целью разработки новых высокоэффективных способов нормализации воспроизводительной функции, повышения неспецифической резистентности, продуктивности животных и птицы, улучшения качества животноводческой продукции и снижения затрат кормов и труда на ее производство.

ЛИТЕРАТУРА

Блинохватов А.Ф. 1993. 9-R-Сим-нонагидро-10-окса (халькогена) антрацены и соли 9-R-Сим-октагидро-10-оксония (халькогеноина) антрацена. Автореферат дисс. д.б.н., Саратов.

Брусов О.С. и др. 1976. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина. Булл. эксп. биол. и мед., 33-35

Галочкин В.А., Боряев Г.И., Блинохватов А.Ф. и др. 1995. Способ выращивания цыплят. Патент РФ № 2004158.

Галочкин В.А., Боряев Г.И., Харитонов И.Г. и др. 1995. Способ выращивания поросят. Патент РФ № 2045200.

Галочкин В.А., Кузнецова Т.С. 2000. Антиоксидантный статус организма свиноматок и их потомства при использовании минеральных и органических форм селена. Вестник РАСХН, 2: 51-54.

Голубкина Н.А., Соколов Я.А., Хотимченко С.А. и др. 1996. Селено-обогащенные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae*. Биотехнология. 5: 52-56

Голубкина Н.А., Гмошинский И.В., Зорин С.Н. и др. 1998. Влияние биологически активной добавки автолизата обогащенных селеном пекарских дрожжей на состояние кишечного барьера у крыс при анафилаксии. Вопросы питания, 3: 18-21

Давыдова А.П. 1999. Актуальность, показатели и критерии применения "Биоселена" в лечении гнойно-воспалительных заболеваний носа и околоносовых пазух. В сб.: Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека. Тез. Всеросс. конф. с междунар. участием. Москва, 15 с.

Журавлев А.И. и др. 1989. Методы регистрации свободно-радикального окисления липидов в сыворотке, плазме и мембранах клеток крови. Метод. рекомендации, М.

Каталог компании Стана, Чита, 1999, 4.

Кост Е.А. 1975. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.

Моин В.М. 1986. Простой и специфичный метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. 724-727

Перунова У.В., Трифонов Г.А., Древко Р.И.. 1987. Сравнительная эффективность применения селенистых препаратов при выращивании поросят. Обеспечение стабилизации АПК в условиях рыночных форм хозяйствования. Тез. докл. межрегиональной науч.-практич. конференции молодых ученых и специалистов. ч. II. Воронеж, 69-71

Пониткин Д.М. 1997. Биохимическая оценка эффективности применения деполена при выращивании и откорме быков. Автореф. дисс. к.б.н, Всерос.н.-и.вет.ин-т патологии, фармакологии и терапии. Воронеж.

Ронин В.С. и др. 1982. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. М.

Шешко П.М., Иванов Д.П., Кучинский М.П. и др. 1992. СЕДИФИЗ - препарат для одновременной профилактики и лечения беломышечной болезни, зоба и алиментарной анемии у поросят и телят. Вет.наука - производству. Минск.30: 154-162

Berry M.J., Larsen P.R.. 1992. Cloning of the selenoenzyme type 1 iodthyronin deiodinase. Selenium in Biology and Medicine, 5 Int. Symp., Tennessee USA.

Hartfield D. et al. 1992. Selenocystein t RNA isoacceptors in mammalian cells. Selenium in Biology and Medicine, 5 Int. Symp. Tennessee USA.

Hercberg S, Preziosi P, Briancon S, et al. 1998. Control Clin Trials. 19(4), 336-351, A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population.

Lowry O.H et al. 1971. J. Biol. Chem. 193: 265-275

Nash T. 1978. The colorimetric determination of formaldehyde. Biochem. J. 55: 416-423

Omura T., Sato R. 1984. The carbone monoxide binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239: 2370 – 2378

Safayhi H., Tiegs G., Wendel A., 1985. A novel biologically active seleno-organic compound – V, Inhibition by ebselen (PZ-51) of rat peritoneal neutrophil lipoxygenase, Biochemical Pharmacology. 34, 15: 2691-2694

Глава 2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ – НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ

Введение

Разработка теоретических основ создания принципиально новых, экологически чистых, высокоэффективных иммунобиотехнологических способов направленной и контролируемой регуляции обмена веществ, а, следовательно, и продуктивности сельскохозяйственных животных позволяет развить и углубить концептуальное теоретическое положение о иммунорегуляции обмена веществ и получить новые фундаментальные знания о роли и функциональной взаимосвязи нервной, иммунной и эндокринной систем в регуляции обмена веществ и продуктивности животных.

Индукцируемая аутоиммунонейтрализация регуляторных пептидов – ведущий принцип иммунокоррекции обмена веществ и создания физиологических вакцин нового типа и нового поколения – вакцины аппетита и вакцины биостерилизации

Одной из первых конкретных реализаций полученных знаний должно явиться создание физиологических вакцин нового типа и нового поколения, обеспечивающих повышение количества производимой животноводческой продукции, улучшение качества продукции при снижении затрат кормов и труда на ее производство, а именно – *«вакцины биостерилизации»* и *«вакцины аппетита»*.

Мы предлагаем ввести в научный лексикон новый термин – *«физиологические вакцины»*. Главный принцип их работы остается точно таким же, как и у всех традиционных терапевтических и профилактических вакцин – для успешной борьбы со строго определенным заболеванием или для его профилактики, путем стимулирования иммунной системы организма. Специфический эндогенный антителогенез повышается введением в организм чужеродного, конкретно избранного специфического антигена. Однако, в отличие от привычного понимания термина вакцина как профилактического и лечебного средства, физиологическая вакцина предназначена для введения в организм здорового продуктивного животного с целью повышения его продуктивности.

Принципиальный путь, этапы и практические шаги создания вакцины аппетита

Анализ обширной научной литературы привел нас к выводу о том, что на роль главного действующего начала новой физиологической вакцины – вакцины аппетита, среди очень большого числа претендентов, необходимо избрать пролонгированные формы иммуногенных конъюгатов коротких, биологически активных фрагментов холецистокинина (ХЦК) с природными и синтетическими полимерными носителями.

В качестве главного принципа биологического действия вакцины, из числа нескольких различных потенциальных путей подхода к реализации сформулированной и выдвинутой для разрешения проблемы, было решено остановиться на принципе индуцируемой аутоиммунонейтрализации холецистокинина в организме сельскохозяйственных животных. Дальнейшее теоретическое развитие идеи и разработка способов иммунокоррекции обмена веществ во ВНИИФБиП с.-х. животных продолжаются и имеют целью совершенствование вакцины аппетита и доведение ее до использования в практике животноводства.

Прежде чем приступить к непосредственному рассмотрению, оценке и восприятию логики конкретных практических этапов работы, вновь подчеркнем, что вся программа была направлена на решение фундаментальной научной проблемы и получение отсутствующих знаний о процессах иммунорегуляции обмена веществ в организме животных. На основе полученной новой научной информации реализован генерализованный принцип и проведена первичная экспериментальная апробация регуляции интенсивности и направленности метаболических потоков с помощью приема индуцируемой аутоиммунонейтрализации гормона желудочно-кишечного тракта холецистокинина – панкреозимина.

Итак, как теперь читателю уже стало совершенно ясно, теоретической основой разрабатываемой программы служит, интенсивно развиваемая в мировой науке, концепция функциональной взаимосвязи нервной, иммунной и эндокринной систем организма. Научная плодотворность данной концепции получила новый импульс для своей практической реализации с середины 70-х годов двадцатого столетия, т.е. времени открытия гипоталамических факторов пептидной природы, ответственных за инициацию биосинтеза и секреции гипофизарных гормонов и последующий каскадный запуск синтеза гормонов в эндокринных органах, тканях и клетках, подчиненных регуляторным влияниям гипоталамо-гипофизарной оси.

Эти же годы ознаменованы блестящим открытием серии новых гастроинтестинальных биологически активных пептидов и развитием на этой основе принципиально нового концептуального положения о исключительно важной, ранее неизвестной регуляторной системе организма, получившей название в научной литературе – ось «кишечник – мозг». Этим названием подчеркивается унифицированность регуляторных механизмов в организме высших животных, основанная на функционировании единых регуляторных элементов, синтезируемых параллельно как структурами высших отделов центральной нервной системы и ее периферических окончаний, так и специфическими эндокринными клетками ряда органов и тканей желудочно-кишечного тракта и ретикулоэндотелиальной системы.

Таким образом, круг замкнулся и утвердилась целостная интегрированная картина регуляции сверхсложной системы, каковой является организм высших животных, с пониманием взаимосвязанности, взаимообусловленности, взаимозависимости во времени и пространстве функционирования трех важнейших систем организма – нервной, эндокринной и иммунной. Связующими и регуляторными элементами этих трех систем в настоящее время рассматриваются пептиды и, прежде всего, те из них, которые синтезируются организмом одновременно в каждой из трех названных систем.

Познав глубинные механизмы многообразных, тонких и сложных взаимосвязей, ученые вооружат себя эффективным инструментом воздействия на организм животного, вторгаясь в высшие эшелоны интеграции и регуляции обменных процессов на уровне функционирования регуляторных пептидов.

Наиболее ярким примером, интенсивно развиваемым в последнее время в мировой науке, признается подход, совершенно заслуженно приобретший статус приоритетного, предполагающий активную иммунорегуляцию, иммунокоррекцию обмена веществ. Одним из выдающихся частных примеров этого генерализованного принципа считается прием иммуонейтрализации, а точнее, аутоиммуноингибирования регуляторных пептидов. Этот путь исключительно перспективен, и он, вне сомнения, в самое ближайшее время воплотится в создании целой серии медицинских, ветеринарных, лечебных и профилактических вакцин.

Это направление в иммунохимической инженерии и иммунобиотехнологии знаменует собой наступление новой эры биотехнологизации животноводства – эффективного иммунобиотехнологического конструирования животных с заданной программой обмена веществ, а, следовательно, и продуктивности. Добытые фундаментальные знания положат на-

чало созданию серии принципиально новых способов, которые позволят человеку активно, осмысленно, осторожно и, вместе с тем, высокорезультативно вторгаться в регуляцию интенсивности и направленности метаболических потоков в организме человека и животного.

Современная теория регуляции аппетита у животных еще далека от глубокого понимания этой сложнейшей проблемы и лучше всего она разработана на лабораторных животных.

На этапе планирования работы нами рассматривались следующие, экспериментально точно установленные положения:

- 1) повреждения вентромедиального гипоталамуса резко повышают у животных потребление корма;
- 2) повреждения латерального гипоталамуса, напротив, снижают потребление корма;
- 3) электрическая стимуляция латерального гипоталамуса снижает потребление корма;
- 4) введение норадреналина в медиальный гипоталамус стимулирует аппетит у отдельных видов животных;
- 5) прямая или косвенная активация рецепторов 5-окситриптамина подавляет аппетит;
- 6) панкреозимин-холецистокинин – ингибирует аппетит;
- 7) бомбезин – снижает аппетит;
- 8) динорфин – повышает аппетит;
- 9) панкреатический полипептид – стимулирует аппетит;
- 10) эндорфин – стимулирует аппетит;
- 11) нейропептид Y – повышает аппетит;
- 12) нейропептид YY – повышает аппетит (причем, оба последние пептида, при введении в область латерального вентрикула, действуют в выраженной дозозависимой форме и доминируют над физиологическими сигналами сытости, поступающими с периферии).

Даже этот, далеко неполный, перечень факторов, достоверно идентифицированных к настоящему времени, вовлеченных в столь сложную регуляцию такого физиологического акта, как аппетит, красноречиво подтверждает всю сложность проблемы и несовершенство сегодняшнего знания. Из массы описанных к настоящему времени факторов, так или иначе причастных к потреблению корма и связанных с ведущей ролью регуляторной оси «мозг – кишечник», непосредственно к рассматриваемому в настоящей публикации предмету исследований относятся известные в научной литературе (Ашмарин, 1989, 1992, Pekas, 1990, Корнев, 1993, Silver, 1991, Данилова и др., 1994) ингибиторы аппетита пептидной природы, физиологическая нейтрализация которых должна, по законам

биологической логики, вызывать обратный эффект - стимуляцию аппетита.

С точки зрения современной животноводческой науки, способность животных потреблять питательные вещества корма рассматривается как главный фактор, лимитирующий продуктивность. Самый неэффективный способ расходования кормов – недокорм животных. Причем, это положение считается общепризнанным и справедливым для животных всех видов и всех направлений продуктивности.

По очень многим параметрам свиньи представляют собой совершенно уникальную биологическую модель. Как ни один вид сельскохозяйственных и лабораторных животных, свиньи потенциально способны потреблять в пять раз больше энергии, чем это необходимо для поддержания жизни. Следовательно, лучшим способом повысить количество производимой свинины является способ, побуждающий откармливаемую на мясо свинью потребить больше корма, естественно, надлежащего качества. Вместе с тем, животноводам прекрасно известно, что современные высококонсолидированные породы свиней способны трансформировать повышенное количество потребленных питательных веществ корма в мясную продукцию без повышения затрат кормов на ее производство и без снижения качества получаемой продукции. Речь идет, прежде всего, о специфике пищеварительных и обменных процессов у культурных, отселекционированных пород свиней, даже при избыточном потреблении кормов, не увеличивать процент жира, откладываемого в мясе и туше в целом.

Руководствуясь изложенными исходными соображениями, мы приступили к разработке теоретической основы создания физиологической вакцины нового типа и нового поколения, повышающей продуктивность свиней. Поскольку главными биологически активными компонентами вакцины избраны очень короткие, видонеспецифичные фрагменты пептидных гастроинтестинальных гормонов, то биологическое действие вакцины будет проявляться у всех видов животных.

Современные знания позволили вполне аргументированно сосредоточить усилия на разработке способа иммунонейтрализации (иммуноингибирования, иммуноблокирования) эндогенного холецистокинина после введения в организм синтетических иммуногенных конъюгатов его С-концевых фрагментов - октапептидного или тетрапептидного. Специфика этих коротких пептидов состоит в том, что именно они представляют собой антигенные детерминанты нативной молекулы холецистокинина, то есть ее иммуногенный сайт или эпитоп. Антитела, выработанные только на эти фрагменты, вполне способны распознавать и перекрестно реагировать с

цельной молекулой нативного гормона и, нейтрализуя его физиологическую функцию, снижать аппетит у животных.

Новизна типа вакцины обусловлена принципиально новым, специфическим назначением вакцины выступать в роли физиологического регулятора обмена веществ в организме здоровых животных. Поскольку метаболический процесс, как об этом уже говорилось ранее, регулируется антителами, вырабатываемыми самим же организмом, то и конечное назначение такой вакцины заключается в аутоиммунокоррекции обмена веществ в организме здорового продуктивного животного с направлением его в заданном нами и контролируемым нами русле.

Новизна поколения вакцины определяется главным биологически активным компонентом вакцины, который по своей химической природе представляет собой очень короткий и совершенно неиммуногенный синтетический пептид. По единодушному мнению ученых, полусинтетические и синтетические пептидные вакцины рассматриваются как вакцины XXI века (Петров и др., 1985).

Современные достижения иммунологии, физико-химической и молекулярной биологии открывают возможности успешного решения всего комплекса задач, связанных с созданием подобных вакцин.

Основные методические этапы создания физиологических вакцин мы просматриваем в настоящее время весьма отчетливо. Во-первых, синтезируется иммуногенный конъюгат интересующего нас регуляторного пептида или его синтетического аналога. В соответствующем адъюванте, с подходящим иммуностимулятором, в отработанной дозе и по апробированной схеме конъюгат вводится животному. В результате сам организм начинает вырабатывать антитела, реагирующие не только с введенным конъюгатом, но и с собственным эндогенным пептидом, который уже начинает им восприниматься как чужеродный агент. Поскольку следствием подобного вмешательства явится коррекция концентрации в организме регуляторного пептида, ответственного за осуществление конкретной физиологической функции, то за этим непременно должно последовать изменение метаболической ситуации, изменение скорости и направленности обменных процессов в организме и, следовательно, изменение продуктивности животного.

Технологичной и приемлемой для широкого использования в практике может быть только вакцина, эффективно работающая длительное время после однократной инъекции. Существенно усложняет создание вакцины и вопрос ее будущей стоимости. В настоящее время экономический эффект от реализации дополнительно полученной продукции можно

ожидать только при использовании в качестве главного действующего компонента вакцины очень короткого фрагмента гормона, полученного методом химического синтеза. Широкое использование в производстве препаративно выделенного холецистокинина совершенно исключается вследствие высокой стоимости препарата, получаемого таким способом. Химический способ его синтеза дорог и также невыгоден. Биотехнологический способ промышленного синтеза гормонов, основанный на использовании рекомбинантных микробных штаммов суперпродуцентов, вне всякого сомнения, решит экономический аспект этой проблемы.

За годы работы по программе систематизирована и проанализирована мировая периодическая научная и патентная литература по современному состоянию вопроса о взаимосвязи и роли нервной, иммунной и эндокринной систем в регуляции обмена веществ и продуктивности животных. Осуществлены первые экспериментальные работы (Галочкин и др., 1996).

Синтезировано 2 типа конъюгатов - октафрагмента холецистокинина (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (ХЦК-8) с бычьим сывороточным альбумином (ХЦК-8-БСА - 1) и с синтетическим сополимером поливинилпирролидона с кротоновой кислотой (ХЦК-8-СП - 2). Синтезировано также 2 типа конъюгатов тетрафрагмента холецистокинина (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (ХЦК-4) с бычьим сывороточным альбумином (ХЦК-4-БСА - 3) и с сополимером поливинилпирролидона с кротоновой кислотой (ХЦК-4-СП - 4). Во всех четырех типах синтезированных конъюгатов приблизительная стехиометрия комплекса лиганд : носитель была 15 : 1.

В системе *in vitro* изучена кинетика выхода всех четырех конъюгатов из семи различных синтезированных и испытанных пролонгированных форм на протяжении 30 суток непрерывной инкубации. Наилучшие результаты по равномерности высвобождения и длительности удержания получены с полиэтилцианакрилатными микрокапсулами и альбуминовыми микросферами (Войшвилло и др., 1978, Yapel, 1985).

Впервые была предпринята экспериментальная попытка разработки способов направленного иммунобиотехнологического воздействия на организм животных путем аутоиммунонейтрализации эндогенного холецистокинина. Изучено влияние введения четырех описанных иммуногенных конъюгатов на аппетит, обмен веществ и продуктивность свиней (Галочкин и др., 1996).

Опыты проведены на пяти группах животных: 1-я группа – контрольная, инъекционная плацебо; 2-я группа – введен конъюгат 1 (ХЦК-8-БСА); 3-я группа – введен конъю-

гат 2 (ХЦК-8-СП); 4-я группа – введен конъюгат 3 (ХЦК-4-БСА); 5-я группа – введен конъюгат 4 (ХЦК-4-СП).

Реакцию иммунной системы на вводимые антигены оценивали по титрам антител к окта- и тетрафрагментам ХЦК, для чего использовали разработанный нами метод иммуноферментного анализа. Анализировали также глюкозу, мочевины, общие липиды (по описанным ранее методам) (Галочкин и др., 1996). Концентрацию гормона роста свиней анализировали по разработанному нами методу ИФА. Учет потребления корма осуществляли ежедневно, взвешивали животных ежемесячно.

Для конечной оценки эффективности проведенной иммунокоррекции содержания эндогенного ХЦК учитывали продуктивность свиней и эффективность конверсии питательных веществ корма. В конце опыта проводили контрольный убой животных с определением выхода мяса, костей и жира, а также массы кожи, поджелудочной железы, длины и массы тонкого кишечника. В мышечной ткани анализировали содержание воды, сухого вещества, белка и жира.

В крови иммунизированных свиней выявлены антитела к ХЦК-8 с минимальными титрами в разведениях сывороток 1:32 (2-я группа) и 1:16 (3-я группа) после последней иммунизации. У опытных животных отмечены периоды повышенного потребления корма, совпадающие с периодами специфического антителогенеза. В целом за опыт среднесуточное потребление корма у опытных свиней было выше, чем у контрольных на 17 % (2-я группа) и на 9 % (3-я группа), а среднесуточный прирост живой массы составил, соответственно, по группам 116 и 111 % без изменения эффективности конверсии корма. Конъюгаты окта- и тетрафрагментов холецистокинина с полимерными носителями различной природы дифференцированно влияют на потребление корма, продуктивность свиней и качество продукции. Выраженным аппетитстимулирующим действием обладают конъюгаты ХЦК-8-БСА и ХЦК-8-СП (группы 2 и 3). Они же способствуют и более интенсивному росту животных. Важно отметить, что все испытывавшиеся конъюгаты вызывали усиление аппетита у свиней уже после первой иммунизации. В целом, эффективность иммунизации и влияние ее на аппетит уменьшались в ряду конъюгатов - ХЦК-8-БСА > ХЦК-8-СП > ХЦК-4-БСА > ХЦК-4-СП (2-я, 3-я, 4-я и 5-я группы соответственно), что можно объяснить различной перекрестной активностью антител к эндогенному ХЦК, вырабатываемых на каждый вид антигена. Динамика среднесуточных приростов живой массы свиней опытных групп имела полностью сходный характер с динамикой среднесуточного потребления корма.

В задачу настоящих исследований входило также изучение влияния иммунизаций против ХЦК на обмен веществ у свиней. Однако, к сожалению, в условиях проведенного эксперимента нам не удалось выявить достоверных изменений изучавшихся биохимических показателей. Они колебались в пределах физиологической нормы. Определявшиеся нами биохимические показатели не отразили качественных изменений биохимических процессов, происходивших в организме свиней после иммунизации. В то же время, результаты взвешивания опытных животных, анализа состава туш и химического исследования мышечной ткани неопровержимо свидетельствовали в пользу того, что эти изменения имели место. Опытные свиньи росли с большей интенсивностью. В конце опыта масса туши животных из опытных групп была на 5 – 12 % больше, чем в контроле. Обращают на себя внимание выраженные различия количественного и качественного состава туш подопытных животных, иммунизированных различными конъюгатами. Так, общее содержание мяса в тушах свиней 2-й группы было на 19 %, а 5-й группы - на 9 % выше такового в контрольной группе. Соответственно, в тушах свиней 2-й и 5-й групп содержалось меньше подкожного и внутреннего жира. В тушах свиней 3-й и 4-й групп отмечено повышенное отложение жира. Выход мяса у этих животных был несколько ниже.

У свиней 2-й и 5-й групп, качественный состав туш которых изменился в сторону повышения содержания мышечной ткани, зарегистрирована повышенная концентрация гормона роста, составлявшая в среднем за опыт соответственно $2,6 \pm 0,5$ и $2,6 \pm 0,68$ нг/мл, тогда как в контроле, 3-й и 4-й группах величина этого показателя была равна соответственно $1,7 \pm 0,37$; $1,7 \pm 0,41$ и $1,4 \pm 0,26$ нг/мл.

Как уже отмечалось, результатом иммунизации свиней против ХЦК явились и качественные изменения химического состава мышечной ткани. Во всех опытных группах изменения происходили в сторону снижения содержания жира и повышения белка в мышечной ткани. Эта информация представляет для нас исключительный интерес, так как еще предстоит осмыслить, за счет включения каких метаболических механизмов конъюгаты ХЦК оказали дифференцированное влияние на содержание внутреннего, подкожного жира и жира в мышечной ткани, а также понять и описать метаболические пути, приведшие в опытных группах к снижению содержания жира в мышечной ткани и повышению содержания в ней белка.

Кроме того, конъюгаты ХЦК-8 и ХЦК-4 с полимерными носителями оказывали положительное влияние на химический состав мяса, обуславливая повышение содержания в

нем белка и снижение жира. Важно еще раз подчеркнуть, что все эти изменения происходили без ухудшения оплаты корма.

Несомненно, что представленный практический материал нуждается во всестороннем теоретическом осмыслении и дополнительной экспериментальной проверке. Однако уже сейчас получены первые экспериментальные подтверждения принципиальной возможности, используя прием аутоиммунонейтрализации эндогенного холецистокинина, влиять на аппетит свиней, их продуктивность и качество продукции. Испытанные конъюгаты и способы их применения могут послужить основой для разработки принципиально новых элементов технологии производства животноводческой продукции.

Авторский коллектив имеет все основания полагать, что разрабатываемый способ иммунокоррекции аппетита и обмена веществ у свиней будет превосходить разрабатываемые мировые аналоги. Кроме того, в данной работе уже использованы и продолжают совершенствоваться оригинальные подходы, не имеющие аналогов в стране и за ее рубежами.

В процессе работы по программе разработаны способы синтеза конъюгатов различных фрагментов ХЦК с синтетическим полимером винилпирролидона с кротоновой кислотой. Разработаны способы микрокапсулирования иммуногенных конъюгатов и созданы их пролонгированные формы. Необходимость создания вакцины с длительным сроком действия очевидна. Проблему более медленного высвобождения вводимого конъюгата можно решить его дополнительным инкапсулированием. Введенный в таком виде конъюгат будет равномерно высвобождаться из депо микрокапсул, обеспечивая требуемую нам слабую, но очень длительную стимуляцию ретикулоэндотелиальной системы и, соответственно, длительный специфический антительный ответ. В стадии разработки находится создание новых оригинальных пролонгированных форм конъюгатов с использованием новых отечественных биосовместимых и биodeградируемых полимеров на основе поливинилкапролактама, способных в физиологических условиях к спонтанному гелеобразованию (Солодовник, 1980).

Неотъемлемым этапом работы по созданию и испытанию физиологической вакцины, естественно, является мониторинг силы и длительности специфического антителогенеза. Для этой цели нами разработана тест-система твердофазного, неконкурентного, гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) титра антител к ХЦК-8 и ХЦК-4 (разновидность ELISA). Животных иммунизировали конъюгатом одного из фрагментов холецистокинина с одним носителем (например, бычьим сывороточным альбумином), а для ИФА применяли конъюгат того же фрагмента, но с другим носите-

лем (например, синтетическим полиэлектролитом). Этот прием позволяет определить антитела именно к гаптену, а не к его носителю в конъюгате. Сам анализ заключается в последовательном нанесении на рабочую поверхность лунок микротитровальных планшетов выбранного конъюгата, анализируемых сывороток в различных разведениях, антивидового пероксидазного конъюгата (антитела козы против иммуноглобулинов свиньи). При наличии в сыворотке крови антител к фрагментам холецистокинина, формировались комплексы пептид – антитело, которые фотометрически количественно детектировались по цветным продуктам ферментативной реакции после добавления хромогенных субстратов. В случае первичной иммобилизации конъюгатов с синтетическим полимерным носителем, полистирол планшетов предварительно активировали структурным аналогом поливинилпирролидона. Предложенная пропись иммуноферментного анализа представляет собой воспроизводимую и простую в исполнении тест-систему анализа титра антител к окта- и тетрафрагментам холецистокинина.

Полученные данные подтверждают принципиальную возможность дифференцированной регуляции аппетита и продуктивности свиней путем введения им различных иммуногенных конъюгатов ХЦК-8.

Таким образом, резюмируя вышесказанное, можно подытожить - предпринята первая попытка разработки способов направленного иммунобиотехнологического воздействия на организм животных путем аутоиммунонейтрализации эндогенного холецистокинина. Изучено влияние иммуногенных конъюгатов окта- и тетрафрагментов холецистокинина с природными и синтетическими полимерными носителями на аппетит, обмен веществ и продуктивность свиней. Выявлено дифференцированное действие различных конъюгатов холецистокинина на потребление корма, скорость роста животных и качество свинины. Испытанные конъюгаты и способы их применения могут служить основой для разработки принципиально новых элементов усовершенствованных технологий производства животноводческой продукции.

Данное направление исследований было положительно оценено независимыми экспертами, поддержано и частично финансировалось Российским фондом фундаментальных исследований, грант 94-04-12520 а.

Теоретические подходы к созданию вакцины биостерилизации

Программой работ планировалось также провести исследования по разработке теоретических основ создания

принципиально новых, высокоэффективных, экологически чистых способов регуляции обмена веществ сельскохозяйственных животных, направленных на ингибирование воспроизводительной функции, изменение поведенческих реакций, повышение продуктивности, улучшение качества продукции и снижения затрат кормов и труда на ее производство.

Полученные новые знания и экспериментальные данные планируется в последующем материализовать в создании второй физиологической вакцины нового типа и нового поколения - *вакцины биостерилизации животных*. Действующим началом новой физиологической вакцины биостерилизации мы решили избрать пролонгированные формы иммуногенных конъюгатов отечественного, синтетического аналога гонадолиберина - видонеспецифичного, неиммуногенного декапептида сурфагона с природными и синтетическими полимерными носителями (Кривошеев и др., 1989).

Принцип биологического действия вакцины - индуцируемая аутоиммунейтрализация эндогенного гипоталамического гонадолиберина введением иммуногенных конъюгатов его синтетического аналога. Реализация принципа осуществляется абсолютно по тем же законам, что и в ранее описанной вакцине аппетита, а именно - благодаря выработке антител на введенный синтетический конъюгат сурфагона, способных перекрестно реагировать и нейтрализовать эндогенный гонадолиберин и, как следствие, вызывать снижение биосинтеза и секреции гонадотропинов аденогипофизом и половых стероидов гонадами, что повлечет изменение метаболической ситуации в организме животного, а, следовательно, его продуктивности.

В теоретическом плане этот этап работы также ориентирован на решение фундаментальной научной проблемы и получение новых знаний о функциональной взаимосвязи нервной, иммунной и эндокринной систем организма. Полученную новую научную информацию, как уже говорилось, в последующем планируется материализовать в создании конкретных практических способов регуляции воспроизводительной функции, поведенческих реакций, обмена веществ, а, следовательно, и продуктивности сельскохозяйственных животных.

Предполагается продолжить исследования и расширить подходы к решению конкретной фундаментальной задачи разработки эффективных приемов иммунорегуляции, иммунокоррекции обмена веществ в организме сельскохозяйственных животных. Усилия, также как и в случае с вакциной аппетита, акцентируются на разработке теоретического положения о индуцируемой иммунейтрализации, а точнее, аутоиммуоингибировании регуляторных пептидов.

Вышесказанное позволяет аргументированно заключить о настоятельной необходимости теоретической разработки и последующей практической реализации способа направленной иммунокоррекции обмена веществ и подавления воспроизводительной функции животных. Иными словами, в конечном итоге, предполагается разработка такого приема биостерилизации животных, при котором была бы не просто подавлена у самцов функция сперматогенеза, а у самок фолликулогенеза. Задача значительно шире, глубже и сложнее - необходимо научиться управлять стероидогенезом и поддерживать его на том оптимальном уровне, при котором интенсивность биосинтетических процессов не будет уступать или даже будет превосходить таковую некастрированных животных, а поведенческие реакции и половая мотивация становятся как у животных после хирургической кастрации.

Теоретическое решение поставленной задачи по созданию такого концентрационного градиента половых стероидов в организме высших животных, с целью достижения потенциально наибольшей ответной реакции, может быть осуществлено, по нашему мнению, только вовлекая в направленный регуляторный процесс гонадолиберин. Нативный гонадолиберин является декапептидом, синтезируемым гипоталамусом и находящимся у самых истоков фазы химической регуляции и воспроизводительной функции, и поведенческих реакций у животных как мужских, так и женских особей всех известных видов. Научившись управлять концентрацией этого регуляторного пептида в организме, мы вооружаем себя универсальным инструментом как для частичного и полного, так и для обратимого и необратимого подавления воспроизводительной функции и регуляции, связанных с ней, поведенческих реакций и продуктивности животных.

В настоящее время все развитые страны мира ведут интенсивный поиск в этом направлении. Две крупнейшие иммунологические школы мира - французская и израильская (Carelli et al., 1982) опубликовали результаты первого эксперимента по успешной кастрации самцов крыс, используя конъюгат гонадолиберина с мурамилдипептидами. Полученный очень хороший биологический эффект не мог служить основой для создания вакцины стерилизации из-за ее дороговизны. В 1990 году группа индийских ученых (Talvar, 1990) сообщила о начале работ по созданию вакцины против карциномы простаты человека на основе конъюгата гонадолиберина. В 1992 году в рекламном проспекте сотрудниками университета Adelaida и Австралийского Национального Зоотехнического Центра сообщалось о начале разработки, с целью предстоящего промышленного выпуска, вакцины кастрации

животных. В связи с коммерческой тайной детали создания вакцины не описывались.

В имеющейся патентной и научной периодической литературе нами не встречены попытки разработки подобных вакцин на основе сурфагона. Кроме того, все ранее предложенные способы предполагают многократную иммунизацию животных в связи с отсутствием в мире надежных пролонгированных форм пептидных конъюгатов.

Вышесказанное определило следующую логически последовательную цепь экспериментальных работ.

Практические шаги по разработке вакцины биостерилизации

Синтезированы новые типы конъюгатов отечественного синтетического аналога гонадолиберина - сурфагона с природным и синтетическими полимерными носителями:

- а) конъюгат с сывороточным альбумином;
- б) конъюгат с разветвленным полилизинном;
- в) конъюгат с сополимером винилпирролидона с кротовой кислотой.

Изучена в опытах *in vivo* на лабораторных животных возможность трёх типов конъюгатов инициировать синтез антител, способных перекрестно реагировать с нативным гипоталамическим гонадолиберином. Лучший антительный ответ из трех, описанных ранее, испытанных конъюгатов достигнут в наших экспериментах на конъюгат сурфагона с гетерологичным сывороточным альбумином. Созданы и протестированы в опытах *in vitro* и *in vivo* семь типов пролонгированных форм для каждого из трех конъюгатов. Из семи синтезированных и протестированных нами иммуногенных конъюгатов сурфагона лучшей зарекомендовала себя форма на основе полиалкилцианакрилатных микрокапсул. Разработана тест-система РИА титра антител к нативному гонадолиберину. Изучена и экспериментально доказана принципиальная возможность использования конъюгатов сурфагона для ингибирования биологической функции эндогенного гонадолиберина в организме откармливаемых бычков.

Проведено сопоставительное изучение основных физиолого-биохимических показателей, характеризующих состояние обмена веществ, морфология ткани семенников, поведенческие реакции, продуктивность и качество мяса у бычков контрольной и опытных групп при использовании протестированных конъюгатов сурфагона и их пролонгированных форм, показавших наилучшие результаты в предварительных экспериментах (Галочкин и др., 1994). К обсуждению этих вопросов мы еще вернемся несколько позднее.

***Поиск и экспериментальная проверка веществ,
способных форсифицировать эффект действия
физиологических вакцин***

Серьезное внимание было уделено поискам новых высокоэффективных агентов, способных не только самостоятельно повышать продуктивность животных, усиливать их неспецифическую резистентность, улучшать качество продукции и снижать затраты кормов на ее производство, но и, одновременно, которые были бы в состоянии активизировать и усиливать (форсифицировать) действие разрабатываемых физиологических вакцин. Такой агент нами был найден, проведено его всестороннее изучение. Он представляет собой новое отечественное органическое соединение селена – селенопиран. Мы полагаем, что селенопиран, по комплексу уникальных свойств, отсутствующих у всех известных нам органических и минеральных препаратов, содержащих селен, является реальным и перспективным соединением на выполнение роли форсифицирующего агента. В иммунологии вакцины с добавлением к ним веществ, способных заметно повышать антителогенез и, таким образом, повышать результативность их работы, принято называть форсифицированными вакцинами. Таким образом, поиск в этом направлении был ориентирован, помимо выяснения самостоятельной значимости селенопирана, в том числе и на подготовку к предстоящей разработке физиологических вакцин, форсифицированных селенопираном. Этой проблематики мы здесь касаться не будем, поскольку ей в настоящей брошюре посвящена отдельная статья.

***Разработка теоретических основ создания новых
способов энзимологической стерилизации***

В рамках реализации описанной программы самостоятельный этап был посвящен разработке теоретических основ создания новых, отличающихся от рассмотренного ранее, способов биологической стерилизации с целью повышения продуктивности и регуляции поведенческих реакций животных.

Кастрация выращиваемых на мясо животных применяется с самых древних времен. Тем не менее, дискуссии в науке об эффективности этого приема продолжают. Ряд авторов утверждает, что некастрированные особи откармливаются лучше (Wilds, 1990, Панько, 1982.); другие придерживаются взглядов о преимуществах откорма обеспложенных сам-

цов (Островский и др., 1978, Мосин, 1971, Robertson et al., 1992, 1994), утверждая, что для откорма на привязи целесообразнее оставлять некастрированных бычков мясных пород, подлежащих убою к концу года после рождения, а при беспривязном содержании и на выпасе бычков всех пород необходимо кастрировать.

Кастрация оказывает значительное влияние на качество туши. Мясо некастрированных животных содержит меньше полноценных белков и жира, чем мясо кастратов, в котором почти вдвое меньше неполноценных соединительнотканых белков, таких как коллаген и эластин. Таким образом, при общем большем выходе мяса, мясо некастрированных животных более постное и более грубое. Поэтому в ряде стран мясо некастрированных животных ценится в 1,5 – 2 раза дешевле, чем мясо кастратов (Захаров, 1984, Klastrup et al., 1984, Лукьяновский, 1993).

Половая активность и агрессивность некастрированных животных, максимально проявляющиеся на 6 – 10 месяцах технологического цикла откорма, существенно затрудняют работу обслуживающего персонала и являются основной причиной травматизма и преждевременной выбраковки при крупногрупповом беспривязном содержании бычков (Васильев, 1982, Воронин и др., 1991, Маминов и др., 1991, Klemm et al., 1993). Это делает прием кастрации целесообразным.

В настоящее время существует большое разнообразие способов кастрации бычков: многочисленные разновидности хирургических, иммунологических и химических методов (Klemm et al., 1993, Анашина, 1990, Ложин, 1991). Считается, что чем позже проведена кастрация, тем менее выражены изменения в организме, приводящие к задержке роста животных, вследствие исключения анаболического действия тестостерона. Целесообразна и экономически оправдана кастрация в возрасте 5 – 8 месяцев. Однако обеспложивание в таком возрасте хирургическим путем трудноосуществимо и нередко приводит к осложнениям. Большинство альтернативных методов кастрации рассчитано на применение этой процедуры в раннем возрасте. Все вещества, используемые для химических методов, токсичны и крайне болезненны для животного (кристаллический йод, йодид калия, хлорид кобальта, органические кислоты и т.д.).

Именно в силу высказанного комплекса причин в одну из задач работы по данному этапу входило создание эффективного, наиболее физиологичного, *энзимологического способа стерилизации животных*.

Исходной посылкой для постановки проблемы разработки новых способов биологической стерилизации животных служит наша убежденность в том, что использование тради-

ционных хирургических и множества предлагаемых химических методов кастрации ведет к недополучению мясной продукции. По нашему мнению, более перспективными с точки зрения получения большего количества мясной продукции лучшего качества, при существенном облегчении обслуживания животных, т.е. получения откармливаемых на мясо животных с пониженной агрессивностью и заингибированными половыми рефлексам, можно рассматривать три основных пути решения этих задач. Первый путь предполагает использование иммуногенных конъюгатов для аутоиммунонейтрализации эндогенного гонадолиберина (этот путь нами вкратце уже рассмотрен), второй – создание в организме животного депо синтетических аналогов гонадолиберина однократным введением их в пролонгированной форме и третий, принципиально отличающийся от первых двух способов, - прием энзимологической кастрации путем инъектирования непосредственно в семенники определенного набора гидролитических ферментов.

Принцип энзимологического способа стерилизации состоит в том, что животным инъектируется в семенники тщательно подобранная композиция протеолитических ферментов. Следствием инъекции ферментов должен явиться щадящий физиологический гидролиз паренхиматозных тканей семенника. Текущая задача заключается в отработке оптимальных доз и наборов протеолитических ферментов для достижения совершенно безболезненного для животных и, вместе с тем, достаточно полного разрушения структур семенника, ответственных за выработку различных компонентов спермы и стероидных гормонов. Конечную цель способа мы видим в подборе вводимых ферментов и их доз для достижения частичного гидролиза структур, синтезирующих стероидные гормоны. Причем, в идеале, было бы желательно достигнуть такого строго дозируемого разрушения гормонпроизводящих клеток семенника, когда синтез половых стероидов еще сохраняется на уровне, при котором обеспечивается анаболическая функция стероидных гормонов (интенсивность роста животных не снижается в сравнении с некастрированными животными) и, при этом, должна максимально полно подавляться андрогенная функция стероидных гормонов (снижается агрессивность животных и угнетаются половые рефлексы). Принимая во внимание высокую интенсивность регенеративных процессов в ткани семенника, вводимая доза, субстратная специфичность ферментов и достигаемая степень гидролиза должны исключить регенерацию ткани в течение всего периода откорма.

Если при хирургических и химических способах кастрации такое дифференцированное ингибирование стероидо-

генеза невозможно, то разработка энзимологического способа теоретически сохраняет такую возможность, при всей сложности достижения поставленной задачи. Кроме того, разрабатываемый энзимологический способ кастрации можно рассматривать не только как прием, позволяющий ингибировать половую функцию и управлять поведенческими реакциями животных, но и как способ эндогенной стимуляции продуктивности животных продуктами частичного гидролиза собственных тканей семенников.

Исходя из сказанного, работа по данному этапу осуществлялась в следующих основных направлениях:

1) из отечественных реагентов, на отечественном оборудовании, в условиях ВНИИФБиП с.-х. животных, синтезированы требуемые конъюгаты, препаративно выделены и частично очищены из ткани поджелудочной железы и слизистой тонкого отдела кишечника требуемые протеолитические ферменты для проведения серии исследований в опытах *in vitro* и *in vivo* на сельскохозяйственных животных;

2) продолжена разработка и испытание в условиях лаборатории инъекционных пролонгированных форм конъюгатов с целью выяснения кинетики высвобождения их из инъекционных форм, иммобилизованных на полимерных носителях; по результатам лабораторных экспериментов отобрана лучшая форма иммуногенного конъюгата сурфагона и проведено его испытание на откармливаемых бычках;

3) из ряда синтезированных пролонгированных инъекционных форм иммуногенных конъюгатов сурфагона по комплексу критериев отобрана наиболее подходящая для введения в создаваемую физиологическую вакцину нового типа и нового поколения – вакцину биостерилизации;

4) в предварительных исследованиях на бычках и хрячках подобраны композиции и дозы введения ферментов (по протеолитической активности) для достижения оптимальной величины гидролиза паренхиматозных тканей семенников, лучшие из которых апробированы в научно-хозяйственном опыте на бычках.

Нами были созданы и проверены в опытах *in vitro* 7 типов пролонгированных форм конъюгатов сурфагона на основе: а) полиакриламидных микрогранул;

б) полиэтилцианакрилатных микрокапсул; в) полилактид-полигликолидных микрокапсул; г) альбуминовых микросфер; д) поливинилпирролидоновых микрогранул; е) капролактамовых микрогранул; ж) декстрановых микрогранул.

Были синтезированы и проверены различные носители для усиления пролонгирующего эффекта описанных семи форм: а) гидрогель алюминия; б) стеарат алюминия - расти-

тельные масла; в) стеарат алюминия - минеральные масла; г) воск - ланолин - растительные масла; д) гидротермогели на основе сополимеров капролактама. Лучшая из перечисленных пролонгированных форм, по результатам изучения *in vitro*, по оптимальным кинетическим характеристикам выделения иммуногенного конъюгата сурфагона, по стоимости и трудоемкости изготовления, по простоте применения в производственных условиях, испытана на молодняке крупного рогатого скота, откармливаемом на мясо.

Под опытом находилось пять групп откармливаемых на мясо бычков по пять голов в каждой: 1-я группа – хирургически кастрированные животные; 2-я группа - некастрированные животные; 3-я группа – иммунологически кастрированные животные с однократным подкожным введением пролонгированной формы иммуногенного конъюгата сурфагона; 4-я группа - энзимологически кастрированные животные однократным введением в семенники коммерческого раствора папаина; 5-я группа – энзимологически кастрированные бычки однократным инъектированием приготовленного нами ферментного препарата из ткани поджелудочной железы и слизистой кишечника. Начало опыта - в 5-месячном возрасте животных. Продолжительность эксперимента 5 месяцев. В опыте учитывался комплекс биохимических показателей (концентрация глюкозы, неэстерифицированные жирные кислоты, азот мочевины (Маминов и др., 1991) и зоотехнические показатели.

Динамика живой массы подопытных животных на протяжении пяти месяцев эксперимента, по результатам наших исследований, представлена в таблице 1. Как видно из цифрового материала, некастрированные животные росли на 13 % интенсивнее хирургических кастратов, среднесуточный прирост живой массы которых за 5 месяцев опытного периода составил 820 г. Наибольшая интенсивность роста отмечена в 3-й группе – иммунологические кастраты (122 % к контролю). Особо примечателен тот факт, что эта группа животных давала даже больший прирост живой массы, чем группа некастрированных животных. Это обстоятельство мы не можем отнести к числу недостоверных или случайных. Аналогичная закономерность нами отмечалась ранее в научном эксперименте, где в группах также было по 5 животных и в производственном опыте с числом бычков в группах по 23 головы (Маминов и др., 1991). Единственное отличие заключалось в том, что в предыдущих опытах была использована непролонгированная форма иммуногенного конъюгата сурфагона и его инъекция осуществлялась трижды.

Таблица 1. Динамика живой массы откармливаемых подопытных бычков, кг

Группы бычков	Возраст животных, мес.						Прирост за опыт, кг
	5	6	7	8	9	10	
1	117±3,5	138±4,9	162±4,0	186±3,8	213±7,3	240±5,5	123
% к контролю	100	100	100	100	100	100	100
% к исходному уровню	100	117	138	158	182	205	
2	122±5,0	144±5,7	171±8,0	197±7,5	227±10,1	262±11,3	140
% к контролю	104	105	105	105	106	109	113
% к исходному уровню	100	118	140	161	186	214	
3	119±4,0	140±5,4	166±7,3	192±8,4	230±11,1	270±12,2	151
% к контролю	102	102	102	103	107	112	122
% к исходному уровню	100	117	139	161	193	226	
4	120±5,5	141±6,3	165±7,9	190±9,5	220±10,9	250±12,1	130
% к контролю	102	102	101	102	103	104	105
% к исходному уровню	100	117	137	158	183	208	
5	119±4,5	141±4,8	165±7,1	191±8,2	224±12,1	262±13,0	143
% к контролю	102	102	101	102	105	109	116
% к исходному уровню	100	118	138	160	186	220	

В настоящем эксперименте животным однократно в 5-месячном возрасте вводился пролонгированный вариант этого же конъюгата. Фактические данные этого и ранее проведенных экспериментов убедительно свидетельствуют, что иммунологический способ биостерилизации откармливаемых на мясо бычков весьма эффективен. Пролонгированная форма иммуногенного конъюгата сурфагона и есть не что иное, как вакцина биостерилизации животных, с помощью которой достигается иммунокоррекция обмена веществ в организме экспериментальных животных.

Четвертая группа бычков была подвергнута энзимокастрации использованием коммерческого препарата папаина. Как видно из таблицы 1, эта группа росла на 5 % лучше хирургически кастрированных животных, но уступала как некастрированным бычкам, так и иммунокастраатам и энзимокастратам 5-й группы. Животным 5-й группы в семенники был введен разработанный нами препарат гидролитических ферментов. Животные этой группы по интенсивности роста уступали только иммунологически стерилизованным животным и превосходили остальные три группы, включая некастрированных бычков. Это пока первый и единственный эксперимент по разработке энзимологического способа стерилизации

животных, но он указывает на перспективность продолжения поиска в этом направлении.

Как указывалось, кровь у подопытных животных брали ежемесячно. Анализировали в крови концентрацию глюкозы, азот мочевины и неэстерифицированные жирные кислоты (Маминов, Грищенко, 1991). Динамика концентрации глюкозы представлена в таблице 2. В обмене веществ жвачных животных наибольшей спецификой и выраженными отличиями от моногастричных характеризуется метаболизм углеводов. Гипогликемия для жвачных - физиологическая норма. Столь же естественен и физиологически исключительно стабилен уровень концентрации этого ключевого метаболита в крови.

Таблица 2. Концентрация глюкозы в крови откармливаемых бычков, мг%

Группы	Возраст животных, мес					
	5	6	7	8	9	10
1	49,1±2,5	55,0±2,2	51,3±3,3	48,6±2,7	46,6±2,4	49,0±3,1
2	45,6±1,9	48,1±2,0	47,4±1,5	44,8±2,2	45,4±2,7	52,2±3,5
3	55,8±3,0	58,7±3,3	52,6±2,5	49,9±1,8	56,5±2,8	53,3±2,6
4	42,9±2,6	44,7±2,2	49,8±2,9	50,0±3,3	52,3±3,2	49,6±2,7
5	51,3±2,2	57,2±3,1	54,3±2,6	48,7±1,9	46,6±1,9	47,8±1,9

Цифровой материал таблицы 2 подтверждает эту биологическую закономерность на протяжении 5 месяцев эксперимента у животных всех групп. Ни один из примененных нами способов воздействия не оказал существенного и закономерного влияния на концентрацию глюкозы в крови. Все наблюдавшиеся числовые значения этого показателя вполне укладывались в рамки естественных физиологических колебаний.

Неэстерифицированные жирные кислоты традиционно трактуются как высококомобильный, интегрированный показатель, оперативно характеризующий динамическое соотношение процессов липолиза и липогенеза. Это в полной степени проявилось и в нашем эксперименте. Концентрация НЭЖК в крови хирургически кастрированных животных оставалась постоянной в течение всего эксперимента. Эта завидная и редкая в биологии стабильность убедительно подтверждала сложившийся динамический баланс процессов синтеза и окисления липидов. У некастрированных бычков, при сходном стартовом уровне, четко и закономерно на протяжении всего эксперимента прослеживалась тенденция повышения величины этого показателя. В 10- месячном возрасте концентрация НЭЖК была на 33 % выше, чем в первой группе. У животных, подвергнутых иммуностерилизации, динамика этого показателя была совершенно иной. Через два месяца

после иммунизации пролонгированной формой иммуногенно-го конъюгата сурфагона свободные жирные кислоты в крови стали снижаться и к концу эксперимента это снижение достигло практически двукратной величины. Динамика этого показателя у 2-й и 3-й опытных групп имела диаметрально противоположную направленность – во 2-й группе шел рост, в 3-й – снижение. Это является убедительным доказательством преобладания процессов липолиза над липогенезом во 2-й группе и преобладанием накопления липидов перед их окислением в 3-й. Данные вполне закономерны, так как факт более постного мяса у бычков и большего отложения жира у кастратов общепризнан. Мы пока не в состоянии интерпретировать интереснейший феномен. Первая группа животных была кастрирована хирургически. Почему же у иммунокастратов, в отличие от них, шло более интенсивное снижение концентрации НЭЖК? Этот любопытнейший факт еще предстоит объяснить.

У животных, подвергнутых процедуре энзимокастрации (4 и 5 группы), также был отмечен несколько более пониженный уровень этого метаболита в крови. В довольно строгом соответствии с величиной среднесуточных приростов живой массы по группам, величина снижения была значительней в группах животных с большей интенсивностью роста. Однако разница в динамике снижения была очевидной – у животных этих двух групп снижение начиналось значительно раньше и проявилось уже через месяц после начала эксперимента.

Что касается концентрации азота мочевины в крови, то этот показатель традиционно трактуется как имеющий отрицательную корреляцию с активностью соматотропиновой системы, скоростью роста и интенсивностью процессов протеосинтеза. В нашем эксперименте эта зависимость полностью подтвердилась на всех пяти группах животных, хотя величины изменений были менее рельефны, чем в случае с НЭЖК (см. таблицы 3 и 4).

Таблица 3. Концентрация неэстерифицированных жирных кислот в крови бычков, ммоль/л

Группы	Возраст животных, мес					
	5	6	7	8	9	10
1	32,1±2,9	32,0±3,3	33,4±2,7	34,5±3,0	32,8±3,2	33,6±3,5
2	34,3±4,2	34,0±2,8	35,9±4,0	38,7±4,2	41,2±5,1	45,1±5,2
3	35,0±3,7	32,2±4,1	25,6±3,6	19,7±2,5	18,0±1,9	17,5±2,0

4	37,2±4,5	25,7±3,0	31,2±3,9	28,3±2,9	24,1±2,5	26,5±3,1
5	33,5±2,0	21,6±2,9	22,7±3,0	26,9±2,9	20,5±1,8	19,4±1,8

Таблица 4. Концентрация мочевины в крови подопытных бычков, ммоль/л

Группы	Возраст животных, мес					
	5	6	7	8	9	10
1	4,5±0,3	4,8±0,5	4,9±0,4	5,1±0,6	4,5±0,3	5,3±0,5
2	5,2±0,5	5,0±0,2	3,6±0,3	4,1±0,4	3,9±0,2	3,7±0,4
3	5,4±0,6	4,3±0,5	3,9±0,4	4,0±0,3	4,3±0,4	4,0±0,4
4	6,0±0,7	5,1±0,4	4,9±0,5	4,7±0,5	5,0±0,6	5,2±0,5
5	5,1±0,4	5,0±0,6	3,8±0,3	4,3±0,5	3,7±0,2	4,1±0,3

Морфологическая характеристика гонад бычков. Морфологические исследования гонад, подвергнутых различным способам биостерилизации, представляют в нашем исследовании самостоятельный интерес. В результате морфологического изучения структуры ткани семенников вырисовывается исключительно интересная картина. Было обнаружено, что в эпителии семенных канальцев всех биостерилизованных животных в разной степени, в зависимости от конкретного типа воздействия, (опытные группы 3, 4, 5) возникли существенные нарушения процесса спермогенеза, которые в дальнейшем даже заканчивались атрофией семенных канальцев. При микроскопическом исследовании семенных канальцев на препаратах семенников бычков опытных групп установлено их опустошение, деструкция паренхимы семенника, нарушение дольчатой структуры, образование многоядерных сперматозоидов и сперматид, фиброз собственной оболочки семенных канальцев и разная степень деструкции специфических структур органа. Семенные канальцы были спавшимися или сохранившими форму круга. Ядра части клеток Сертоли были сморщены. Количество интерстициальной ткани увеличено за счет увеличения коллагеновых волокон и отека стромы.

Картина, просматриваемая при микроскопии ткани семенников интактных животных, показывала здоровую ткань без всяких патологических изменений. Семенные канальцы были выстланы сперматогенным эпителием. Клетки Сертоли крупные, их цитоплазма содержала большое количество оргanelл. Ядро крупное рыхлохроматиновое. В просвете некоторых канальцев видны многочисленные сперматозоиды. Межуточная ткань хорошо васкуляризирована, имеются островки из клеток Лейдига, которые содержат большое количество

липидных капель, что свидетельствует о высоком уровне стероидогенеза. Ясно видна структура с ярко выраженной интерстициальной тканью, поперечные срезы семенных канальцев правильной формы, заполненные в просветах канала половыми клетками на разной стадии созревания. Слой клеток, продуцирующий сперматозоиды, ярко выражен. На срезах видны четыре-пять генераций половых клеток. Четко просматривалась базальная ядродержащая часть клеток Сертоли, тогда как их многочисленные цитоплазматические отростки маскировались половыми клетками. Также отчетливо были заметны разветвления семенных канальцев, их поперечные срезы. Интерстициальная ткань хорошо выражена. Снаружи семенной каналец окружен соединительнотканной оболочкой, глубже лежит базальная мембрана, на которой прослеживается слой сперматогенного эпителия, несущий также клетки Сертоли. На поперечном срезе заметны также 1-2 ряда сперматоцитов. У самого просвета семенных канальцев находились клетки на разных стадиях созревания и сформированные спермии, хвосты которых наблюдались в просветах семенных канальцев. Промежутки между семенными канальцами были заполнены рыхлой соединительной тканью. Как известно, в состав этой ткани входят крупные интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига), обычно залегающие группами (рис. 1).

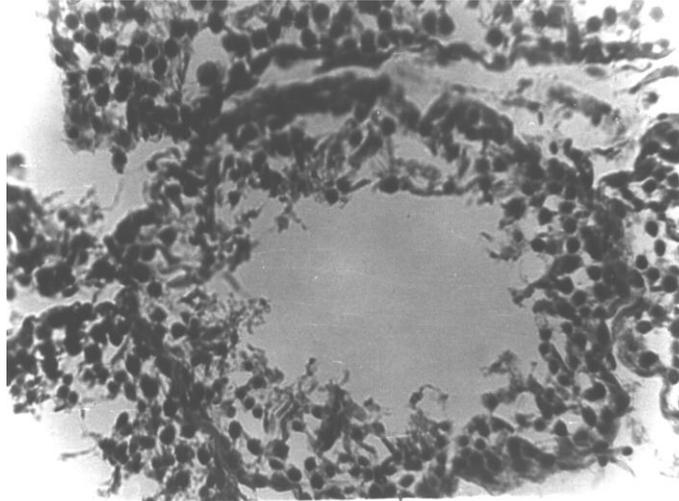


Рис.1. Микроструктура гонад бычка контрольной группы (гр. 1)

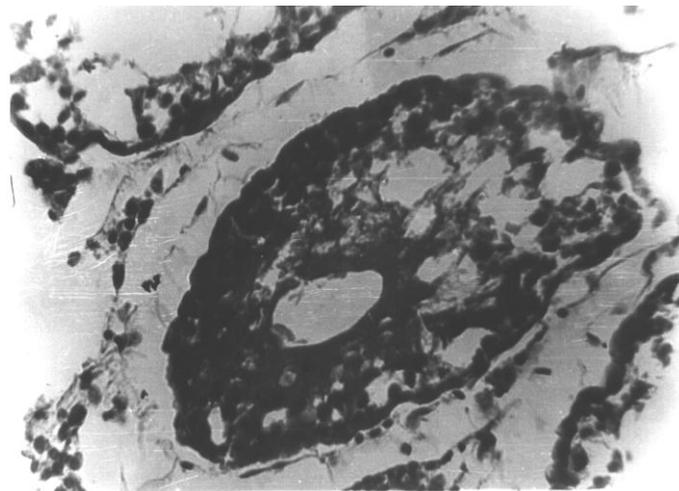


Рис. 2. Микроструктура семенников бычка, подвергнутого иммуностерилизации (гр. 3)

Глубокие изменения в ткани семенника вследствие угасания спермогенеза наблюдались в препаратах животных 3-й группы (иммуностерилизация) (рис. 2). Большая часть цитоплазмы фолликулярных клеток, находящихся в контакте с дегенерирующими клетками, отторгается в просвет каналь-

цев. Наблюдается дегенерация семенных канальцев. Слой клеток, продуцирующих сперматозоиды, развит слабо, заметна его деструкция. Сперматогенный эпителий состоит лишь из клеток фолликулярного эпителия, прилегающих к базальной мембране. Семенные канальцы спавшиеся, промежутки между ними заполнены плотной соединительной тканью. Эндокриноциты, залегающие группами, не просматриваются. Кроме того, отмечается фиброз собственной оболочки семенных канальцев, а также наблюдается образование многоядерных сперматоцитов и сперматид.

Описанный характер морфологических изменений по третьей группе подопытных животных позволяет нам заключить, что под влиянием однократной инъекции пролонгированной формы испытывавшегося иммуногенного конъюгата синтетического аналога гонадолиберина, нарушается взаимосвязь гипоталамуса-гипофиза с гонадами. Обнаружены существенные морфологические изменения, которые свидетельствуют о серьезных функциональных нарушениях в изученных органах. Причем, выраженные структурные изменения происходят как в гормонсекретирующих клетках Лейдига, так и в спермопродуцирующих клетках Сертоли, что, естественно, приводит к нарушению как стероидогенеза, так и спермогенеза. Выявленные в этой опытной группе морфологические изменения, по-видимому, носят необратимый характер.

У подопытных животных 4-й и 5-й групп (энзимокастрация) наблюдались существенные и довольно однотипные изменения, но разной степени выраженности. Процессы про-

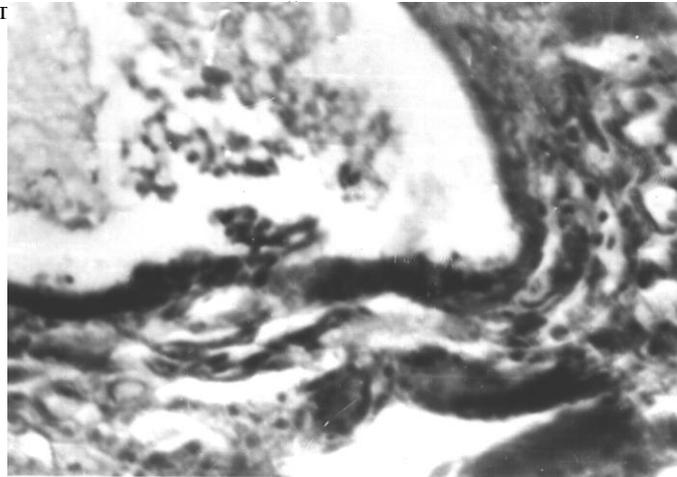


Рис. 3. Микроструктура семенников бычка, подвергнутого энзимостерилизации (гр. 4)

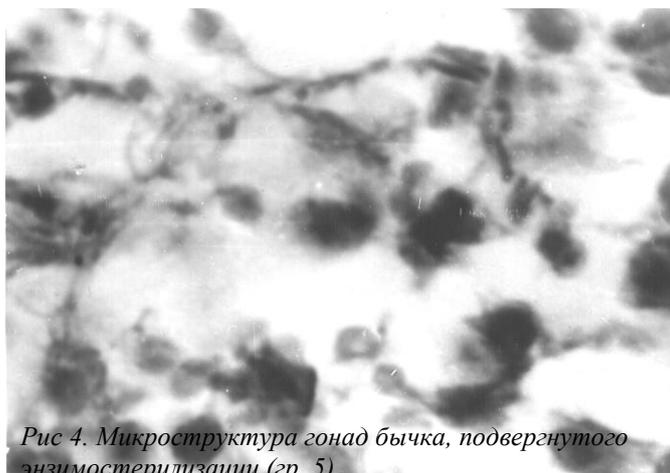


Рис 4. Микроструктура гонад бычка, подвергнутого энзимостерилизации (гр. 5)

тер зависел от места введения ферментного препарата и его типа. В участке введения наблюдался гиалиноз крупных сосудов и обширные кровоизлияния (рис. 3, группа 4). В этом месте паренхима и строма семенника полностью были лизированы, наблюдался фиброзный некроз, видны остатки коллагеновых волокон, семенные каналцы полностью лизированы. Вблизи участка кровоизлияния видны только профили семенных каналцев, внутри которых обнаруживается клеточный детрит. По мере удаления от места введения препарата картина несколько меняется. В очень удаленных участках имелось несколько семенных каналцев, эпителий которых интенсивно делится митозом, т.е. наблюдается явление гиперплазии, однако, вновь образованные клетки, быстро разрушаются и слущиваются в просвет.

В препаратах животных пятой группы (рис. 4) иногда можно видеть несколько зрелых сперматозоидов в просвете каналцев. Следует отметить, что нарушается кровоснабжение как стромы, так и паренхимы семенника, поэтому наблюдаются обширные инфаркты, которые затем заселяются полиморфно-ядерными лейкоцитами и с их помощью лизируются.

Полученная информация при изучении микроструктуры ткани семенников очень демонстративно свидетельствует о радикальном характере воздействия на гонады примененных приемов иммуно- и энзимостерилизации, подтверждая, дополняя и, в известной степени, расшифровывая первопричину всего комплекса выявленных нами физиологических, биохимических и зоотехнических изменений.

Заключение

1. Для использования в качестве основных компонентов разрабатываемой вакцины аппетита нами синтезировано 4 типа конъюгатов окта- и тетрафрагментов холецистокинина с природным и синтетическим полимерными носителями;
2. Создана тест-система иммуноферментного анализа количественного определения титра антител дифференцированно к окта- и тетрафрагментам холецистокинина;
3. В опытах на лабораторных животных доказана иммуногенность синтезированных конъюгатов;
4. В опыте на свиньях доказано положительное влияние испытывавшихся четырех типов иммуногенных конъюгатов (в различной степени для каждого из них) на обмен ве-

ществ, потребление корма, продуктивность животных и качество получаемой продукции.

5. Доказана верность теоретической предпосылки и исходной рабочей гипотезы о том, что иммуногенные конъюгаты холецистокинина могут служить главным составляющим компонентом разрабатываемой вакцины аппетита;
6. Первые полученные практические результаты показывают, что при инъекциях иммуногенных конъюгатов холецистокинина растущим, откармливаемым свиньям повышается потребление корма на 17 % без увеличения затрат корма на производство продукции, увеличиваются среднесуточные приросты живой массы тела на 16 %, содержание мяса в туше увеличивается на 19 %, в сухом веществе мышечной ткани количество белка возрастает на 10 %, а количество жира снижается на 30 %.
7. Полученный фактический материал, при его дальнейшем теоретическом развитии и экспериментальной разработке, может служить основой для создания новых, высокоэффективных, экологически чистых способов регуляции аппетита, обмена веществ, продуктивности животных и качества получаемой животноводческой продукции;
8. Для использования в качестве основного компонента, разрабатываемой вакцины биостерилизации, синтезировано 3 типа конъюгатов отечественного синтетического аналога гонадолиберина – сурфагона с природным и синтетическим полимерными носителями;
9. Разработана тест – система радиоиммунного анализа содержания гонадолиберина в периферической крови животных;
10. Синтезировано семь типов пролонгированных форм конъюгатов сурфагона, доказана их иммуногенность и потенциальная пригодность для разработки принципиально нового иммуобиотехнологического способа регуляции обмена веществ, продуктивности и половых рефлексов у откармливаемого крупного рогатого скота, что должно лечь в основу создаваемой вакцины биостерилизации животных;
11. Разработанный метод синтеза иммуногенных конъюгатов сурфагона и их пролонгированных форм позволил получить необходимые количества препаратов для его испытания в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.
12. Применение конъюгатов в пролонгированной форме позволило сделать использование физиологических вакцин значительно более простым и технологичным, т.е. для достижения ожидаемого эффекта достаточно однократной инъекции.

13. Сравнительный зоотехнический, биохимический и морфологический анализ эффективности различных примененных методов биостерилизации позволяет со всей определенностью говорить о преимуществах приема иммунологической стерилизации животных. По этой группе животных за 5 месяцев опытного периода на каждой голове получено 28 кг дополнительного веса в сравнении с хирургическими кастратами и 11 кг в сравнении с некастрированными бычками.
14. Применение различных ферментных препаратов для стерилизации животных подтвердило преимущества разработанной нами ферментной композиции относительно коммерческого препарата папаина (разница составила 13 кг).
15. О экономической эффективности примененных способов биостерилизации животных говорить пока преждевременно. В относительных выражениях можно дать ориентировочный сопоставительный анализ. Одна доза для энзимокастрации по нашему способу стоит приблизительно в 10 раз дешевле дозы коммерческого папаина и дозы иммуностерилизации по нашему способу.
16. Синтезирован и протестирован в опытах *in vitro* и на животных новый органический препарат селена – селенопирран, проявивший антиоксидантно-антирадикальную активность, превышающую таковую у ионола и витамина Е, показавший способность самостоятельно повышать функциональную активность иммунной и антиоксидантной систем, неспецифическую резистентность и продуктивность молодняка КРС и свиней, нормализовать воспроизводительную функцию свиноматок и коров;
17. По комплексу изученных критериев, селенопирран представляет собой исключительно интересный и перспективный препарат как для самостоятельного использования, так и для включения его в качестве форсифицирующего агента в разрабатываемые в институте вакцины нового типа и нового поколения – вакцину аппетита и вакцину биостерилизации животных.
18. Полученный экспериментальный материал подтвердил правильность наших исходных теоретических предположений и рабочих гипотез как по энзимостерилизации, так и по иммуностерилизации животных. При дальнейшем их развитии и широкой практической апробации они явятся основой для разработки принципиально новых, высокоэффективных, экологически чистых иммунобиотехнологических и энзимологических способов управления поведенческими реакциями животных, повышения, продуктивности, улучшения качества животноводческой про-

дукции и снижения затрат кормов и труда на ее производство.

ЛИТЕРАТУРА

Анашина Ю.Т. 1990. Нехирургические методы кастрации. М.: Колос.

Ашмарин И.П., Фрейдлин И.С. 1989. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 25, 2: 176-181

Ашмарин И.П. 1992. Пути пролонгации действия нейропептидов. Вестник РАМН. 8: 7-10

Васильев Р.А. 1982. Исследование полового поведения крупного рогатого скота в условиях промышленной технологии. М.: Колос.

Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В. 1978. В кн: Иммунизированные клетки микроорганизмов (п/ред. Кощеенко К.А.). Пушино, 36-48

Воронин И.И., Магда И.И., Пономаренко Е.М. 1991. Проблемы современной ветеринарной андрологии. 3: 711-721

Галочкин В.А., Эрнст Л.К., Триндо Л.И. и др. 1994. Иммунобиотехнологический подход к регуляции репродуктивной функции, обмена веществ и продуктивности животных. С.-х. биология. 2: 3-19

Данилова Р.А., Ашмарин И.М. 1994. Инверсная иммунорегуляция поведения и проблема существования регуляторных антител. Успехи физиол. наук. 25, 1: 3-23

Галочкин В.А., Эрнст Л.К., Назаров Н.А. и др. 1996. Иммунонейтрализация холецистокинина как способ регуляции аппетита, обмена веществ и продуктивности свиней. С.-х. биология, 4: 48-58

Захаров В.И. 1984. Качество мяса перкутантно кастрированных бычков. Ветеринария. 12: 97-103

Корнев Е.А. 1993. Иммунофизиология. СПб.:Наука, 684 с

Кривошеев О.Н., Черных В.Я., Виноградов В.А. 1989. Применение сурфагона, синтетического аналога люлиберина, при фолликулярных кистах яичников в эксперименте. Проблемы эндокринологии. 6: 54

Ложин Л.Б. 1991. Эффективность кастрации бычков новым способом. Проблемы хирургической патологии с.-х. животных. 3: 113-117

Лукьяновский В.С. 1993. Кастрация быков, хряков и баранов. Ветеринария. 5: 29-37

Маминов Л.С., Гриценко Б.П. 1991. Половой травматизм в условиях промышленного комплекса по откорму крупного рогатого скота. М.: Колос.

- Мосин В.В. 1971. Рациональные способы кастрации продуктивных животных. М.: Колос
- Островский Н.С., Морозов Ю.А. 1978. О кастрации бычков в откормочных комплексах. Ветеринария. 9: 151-155
- Панько И.С. 1982. Эффективность некоторых способов кастрации бычков. Животноводство. 5: 57-64
- Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М. 1985. Искусственные антигены и вакцины.
- Солодовник В.Д. 1980. Микрокапсулирование. М.: Химия.
- Carelli G. et al. 1982. Immunological castration of male mice by a totally synthetic vaccine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79: 5392-5395
- Silver A.J. & Morley J.E. 1991. Role of CCK in regulation of food intake. Progress in neurobiology. 36: 23-34
- Klastrup S., Gross H.R. 1984. Journal of Animal Science. 58:1.
- Klemm W.R., Sherry C.J. 1993. Applied Anim. Ethol. 11, 2
- Pekas J.C. & Trout W.E. 1990. Stimulation of food intake and growth of swine by CCK-immunization. Growth Development and Aging. 54: 51-56.
- Robertson J.S., Fraser A.M. 1992. Veterinary Records. 4, 5: 121-130
- Robertson J.S., Kent J.E. 1994. Research in Veterinary Science. 56: 8-17
- Talvar G.P. 1990. Immunotherapy and fertility – immunisation against GnRH. Opinion Immunol., 2: 733-735
- Yapel A.F. 1985. Albumin microspheres: heat and chemical stabilization. In: Methods in Enzymology. 112: 3
- Wilds S., Randel D.R. 1990. Intern. Journ. Anim. Sci., 5, 1: 113-117

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. СЕЛЕНОПИРАН – НОВЫЙ АНТИОКСИДАНТ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ	
Введение.....	3
Предпосылки изучения препаратов селена.....	11
Приготовление инъекционных форм селенопирана пролонгированного действия и тестирование его антиоксидантных свойств в опытах <i>in vitro</i>	22
Испытание селенопирана на сельскохозяйственных животных и птице.....	28
Заключение.....	44
Литература.....	46
Глава 2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ – НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ	
Введение.....	49
Принципиальный путь, этапы и практические шаги создания вакцины аппетита.....	50
Теоретические подходы к созданию вакцины биостерилизации.....	63
Практические шаги по разработке вакцины биостерилизации.....	67
Поиск и экспериментальная проверка веществ, способных форсировать эффект действия физиологических вакцин.....	68
Разработка теоретических основ создания новых способов энзимологической стерилизации.....	69
Заключение.....	84
Литература.....	88

Новые горизонты повышения неспецифической
резистентности и продуктивности животных

В.А. Галочкин

Редактор издания В.Д. Кальницкая
Компьютерная верстка Л.Л. Полякова
Полиграфическое исполнение А.В. Бочаров

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных
Лицензия № ИД 03641

249013 Калужская обл., г.Боровск, ВНИИФБиП с.-х.животных
тел. 546-34-15