

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

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

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

Том XLII

ВНИИФБиП с.-х. животных



Боровск, 2003

УДК 636.084:577.1:579.6

ББК 45/46+28.9

Т 78

Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных. Сборник экспериментальных статей.
Боровск, 2003, т.42, 293 с.

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

Адрес: 249013 Боровск, Калужской области, ВНИИФБиП

Телефон: (095) 546-34-15

Факс: (08438) 4-20-88

ISBN 5-901656-07-5

© Коллектив авторов

© ВНИИФБиП с.-х. животных

СОДЕРЖАНИЕ

Шмидт Т.Ю., Езерский В.А., Корохов Т.Н., Шевченко В.Г. Изучение полиморфизма молекулярно-генетических маркеров 9 хромосомы крупного рогатого скота	6
Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Получение плазмиды, содержащей структурный ген тауматина растения <i>Thaumatococcus daniellii</i>	19
Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Комкова Н.М., Полякова Л.Л. Исследование хронической токсичности микроциногенного штамма <i>Escherichia coli</i> S5/98 для кроликов	28
Манухина А.И., Брускова О.Б., Тараканов Б.В., Николичева Т.А. Морфологическая характеристика органов иммунной системы кроликов при применении микроциногенного штамма <i>E. coli</i> B. 214/99	37
Харитонов Е.Л., Харитонов Л.В., Сироткина Ю.В. Нормирование аминокислотного питания молочного скота	46
Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П., Волобуева Р.А., Лазаренко В.П. Эффективность использования обменной энергии у лактирующих коров в зависимости от субстратной характеристики рационов	56
Решетов В.Б., Агафонов В.И. Энергетические затраты при биосинтезе компонентов молока и анализ возможной зависимости энергетической эффективности молокообразования от спектра предшественников.....	67
Макар З.Н., Черепанов Г.Г., Бояршинов И.А., Матющенко П.В., Корнеева Р.И., Токарев Т.Ю., Решетов В.Б. Динамика артерио-венозного баланса метаболитов крови и их транспорта в клетки молочной железы у коров при кратковременных сдвигах в уровне питания	80
Макар З.Н., Бояршинов И.А., Корнеева Р.И., Матющенко П.В., Сапунов М.И. Динамика кровоснабжения вымени, молокообразования и содержания основных предшественников молока в крови у коров при кратковременных сдвигах уровня питания	94
Токарев Т.Ю. Динамика использования субстратов в организме лактирующих коров (исследования на модели и в эксперименте)	105
Долгов И.А., Долгова С. И. Влияние различного уровня картофельного крахмала в рационах коров на микрофлору, биосинтез витаминов В3, В6, В12 в рубце и поступление их в кровь и молоко	111
Долгов И.А., Долгова С.И. Биосинтез и метаболизм пиридоксина у лактирующих коров при различных условиях питания	118
Коровяцкий А.М., Галочкина В.П., Матвеев В.А., Дворецкая Т.Н. Влияние кормов с пониженной расщепляемостью крахмала в рубце на уровень гормонов, связанных с метаболизмом глюкозы, и мясную продуктивность выращиваемых на мясо бычков	126
М.В. Сорокин, В.П. Лазаренко Обмен энергии у растущих бычков при разной распадаемости протеина в рационе	134

Еримбетов К.Т. Параметры обмена мышечных белков у растущих бычков при скармливании кормов с пониженной распадаемостью протеина в рубце	140
Михайлов В.В. Влияние добавки кормового гидролизного сахара на использование питательных веществ рациона и биоэнергетические показатели крови у бычков-кастратов	150
Ниязов Н.С.-А., Аитов С.Н. Влияние разных уровней энергии в рационе на интенсивность роста свиней	161
Ниязов Н.С.-А., Панюшкин Д.Е., Лысов А.В. Использование полнорационных комбикормов с различными уровнями протеина и аминокислот у растущих свиней	168
Еримбетов К.Т., Ниязов Н.С.-А., Шариева Д.И., Обвинцева О.В., Пьянкова Е.В. Влияние уровня протеина и аминокислот в рационе на характер азотистого метаболизма и накопление мышечной ткани у молодняка свиней	177
Лазаренко В.П., Гулюшин С.Ю. Использование энергии корма помесным молодняком свиней в зависимости от условий аминокислотного питания	186
Матвеев В.А., Дворецкая Т.Н., Коровяцкий А.М., Пахмутова Г.Н. Особенности минерального обмена и интенсивность роста помесных свиней в зависимости от уровня аминокислотного питания	193
Рябых Т.Е., Ниязов Н.С., Соловьев А.М. Влияние разных уровней жира и обменной энергии в рационе на А и Е - витаминную обеспеченность поросят в период выращивания и откорма	203
Брускова О.Б. Структурная организация гипофиза и щитовидной железы у поросят при введении свиноматкам различных соединений селена	211
Дудин В.И. Система метаболитов α -токоферилхинона и ее возможная роль в регуляции согласования дыхания, гликолиза и глюконеогенеза в печени (гипотеза)	222
Дудин В.И. Теоретические аспекты взаимодействия α -токоферола с активными формами кислорода (обзор)	250
Брусков М.В. Спектрофотометрическое детектирование водорастворимых витаминов в процессе ВЭЖХ	260
Гулюшин С.Ю., Барашкова Е.В. Влияние танинов на активность пищеварительных ферментов и способы снижения их негативного влияния: исследования in vitro	265
Морозов Д.Н., Гулюшин С.Ю. Влияние температурных и санитарных условий предынкубационного хранения на факторы неспецифической резистентности яйца и цыпленка	280

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ 9 ХРОМОСОМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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

ПРОВЕДЕНО ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ BM7209, BMS2819, BMS2295, BMS1967 ДЕВЯТОЙ ХРОМОСОМЫ. ИЗУЧЕНО РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ИССЛЕДОВАННЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ У ПОТОМСТВА ДВУХ БЫКОВ СТАДА ГУП ПНО «ПОЙМА». ОЦЕНЕН УРОВЕНЬ ПОЛИМОРФИЗМА И СТЕПЕНЬ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ТЕСТИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ И ДАНА ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДАЛЬНЕЙШИХ АНАЛИЗАХ СЦЕПЛЕНИЯ С ЛОКУСАМИ ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫХ ПРИЗНАКОВ. УСТАНОВЛЕНО, ЧТО ИССЛЕДОВАННЫЕ МИКРОСАТЕЛЛИТЫ МОГУТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАНЫ В СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКЕ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ДЛЯ РАБОТЫ С ЛИНИЯМИ, ПОПУЛЯЦИЯМИ, ПОРОДАМИ, ВЕРИФИКАЦИИ РОДОСЛОВНЫХ И РЕТРОСПЕКТИВНОГО АНАЛИЗА ГЕНОТИПА РОДИТЕЛЕЙ.

Введение

Изучение структурно-функциональной организации генома сельскохозяйственных животных является одним из необходимых условий решения проблемы повышения эффективности селекционного процесса. Разработка этой проблемы предусматривает установление ассоциативных связей локусов генома с хозяйственно-полезными признаками. Хромосомную локализацию отдельных локусов, определяющих эти признаки, можно установить, используя их генетическое сцепление с маркерами. Основой для сцепленного картирования высокого разрешения являются насыщенные маркерами генетические карты. Наличие детализированных генетических карт и открытие новых методов определения полиморфизма на уровне ДНК обусловили возможность поиска сцепления между ДНК-маркерами и локусами количественных признаков (QTL).

Ускорению темпов селекции крупного рогатого скота будет способствовать выявление генов, определяющих формирование хозяйственно-полезных признаков, и установление механизмов реализации их информации. В обозримой перспективе генетический анализ признаков, кодируемых определенными локусами хромосом, будет, вероятно, базироваться на знании полной последовательности нуклеотидов соответствующих локусов или их аллелей. На современном этапе исследование отдельных областей генома или отдельных локусов возможно при наличии сцепленных с этим локусом полиморфных маркеров.

Среди существующих генетических маркеров недавно открытые микросателлитные последовательности заняли ведущее положение. Микросателлиты относятся к классу tandemных повторов, которые составляют значительную часть эукариотического генома, и, в частности, 23% генома крупного рогатого скота (Perret et al., 1990). Микросателлитные блоки относительно равномерно распространены по всему хроматину, присутствуют в составе транскрибируемых и нетранскрибируемых последовательностей ДНК (Soller, 1990). Характерной чертой организации этих последовательностей является вариабельность в количестве повторенных единиц (от 2 до 200), что составляет основу их высокого полиморфизма. Важным преимуществом микросателлитных маркеров является также то, что они могут легко детектироваться с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Weber, May, 1989). Микросателлитные маркеры могут быть использованы для выявления внутри- и межпородного полиморфизма, определения характера генетических различий, связанных с породообразованием и племенными качествами животных. Особый интерес представляет изучение сцепления микросателлитных маркеров с локусами количественных признаков сельскохозяйственных животных.

Наиболее масштабное исследование такого рода было предпринято Georges с соавторами в 1995 году. Эта работа стала основополагающей для генетического картирования локусов, влияющих на молочную продуктивность крупного рогатого скота. В результате генотипирования 1518 быков, оцененных по качеству потомства на основании данных о молочной продуктивности более чем 150000 дочерей, по 159 микросателлитам было показано на пяти хромосомах (1, 6, 9, 10 и 20) с высокой достоверностью ($Lod\ score > 3$) наличие QTL, контролирующих молочную продуктивность (Georges et al., 1995). Исследования финских ученых Villki et al. по генотипированию потомков 453 быков, принадлежащих к 11 полусибсовым линиям айрширской породы, по шести микросателлитам, расположенным на 9 хромосоме, подтвердили существование локуса, который влияет на величину удоя и количество молочного белка (Vilkki et al., 1997). Однако точная локализация этого локуса не указана. Вместе с тем, в случае генетики количественных признаков, полученные результаты правомочны только для конкретно изученных объектов (пород) и не допускают однозначного переноса на другие породы или виды, в том числе, и на отечественные.

Вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения работ по отбору микросателлитных маркеров 9 хромосомы и изучению их полиморфизма у отечественных пород крупного рогатого скота, в частности, у одной из самых распространенных – черно-пестрой породы. При отборе из ранее созданной базы данных маркеров для последующего анализа сцепления с локусами хозяйственно-полезных признаков учитывались следующие показатели: степень полиморфизма, уровень гетерозиготности не менее 70% и предельная генетическая дистанция между маркерами, на которой достоверно определяется сцепление (около 10 cM).

В результате анализа литературных данных для исследований были выбраны 4 микросателлитных маркера, расположенных на

теломерном конце 9 хромосомы и имеющих следующую маркировку и хромосомную локализацию: BM7209 - 75,3сМ.; BMS2819 - 84,4сМ; BMS2295 - 91,5сМ и BMS1967 -102,5сМ.

В свете вышеизложенного, целью исследований явилось изучение четырех вышеуказанных микросателлитных маркеров девятой хромосомы, а именно уровня полиморфизма, степени гетерозиготности, частот встречаемости аллельных вариантов полиморфов в популяции коров черно-пестрой породы.

Материалы и методы

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

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

Основные характеристики популяции, такие как частоты генотипов, частоты аллелей, их ошибки рассчитывали по стандартным методикам (Животовский, 1991, 1998). Уровень гетерозиготности и расчет PIC изучаемых маркеров проводили по методикам, предложенным J.L.Weber, исходя из частот аллелей в популяции (Weber, 1990). Для оценки разности средних использовали критерий Стьюдента-Фишера (Лакин, 1990).

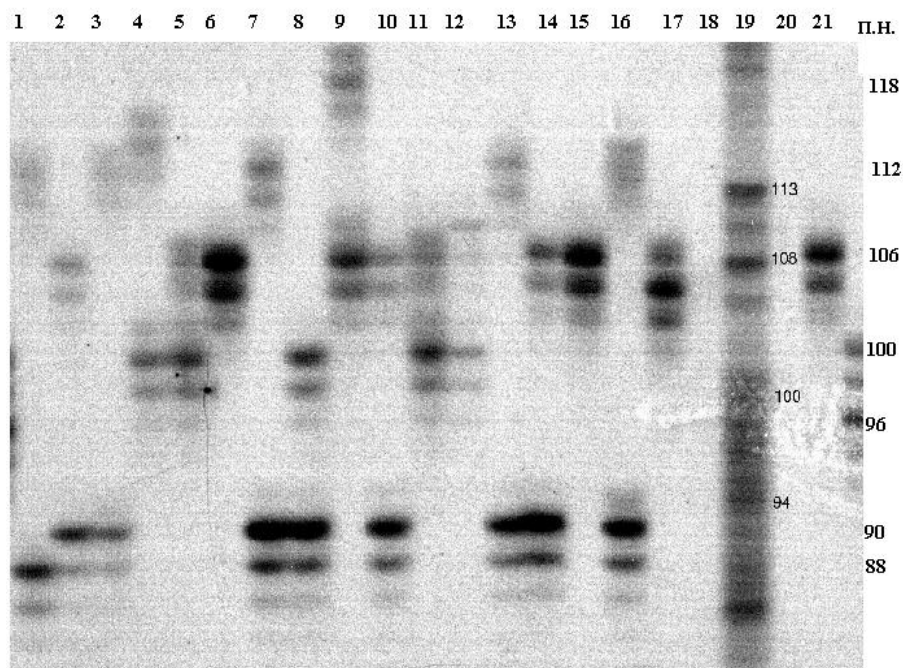


Рис. 1. Анализ продуктов амплификации с использованием праймеров к локусу BMS2819 в 5% денатурирующем ПААГе: (1-17 и 21)-ДНК коров черно-пестрой породы, (18 и 20)-отрицательный контроль, (19)-маркер длины (п.н.).

Результаты и обсуждение

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

1. Полиморфизм локуса VM7209.

В результате амплификационного анализа ДНК коров черно-пестрой породы по локусу VM7209 и последующего разделения полученных ампликонов в денатурирующем ПААГе у дочерей Погожего 4131 было обнаружено – 7 аллелей длиной от 117 до 129 п.н., отличающихся друг от друга на 2 п.н., а у дочерей Иона 103 – 4 аллельных варианта (119, 123, 127 и 129 п.н.) (Табл. 1.).

Таблица 1. Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BM7209

Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
У коров принадлежащих линиям Погожего 4131					
117	0,002±0,002	1	125	0,019±0,007	8
119	0,072±0,013	31	127	0,304±0,022	131
121	0,016±0,006	7	129	0,188±0,019	81
123	0,398±0,024	171			
У коров принадлежащих линии Иона 103					
119	0,1±0,025	14	127	0,331±0,039	47
123	0,141±0,029	20	129	0,430±0,041	61

В базе данных для этого микросателлитного локуса приведено 9 аллелей с минимальным и максимальным размером 111 и 129 п.н. (Stone et al., 1995). Среди обнаруженных аллелей BM7209 у дочерей быка Погожего 4131 наиболее часто встречались аллели 123 (0,398) и 127 (0,304), а у дочерей Иона103 – 127 (0,331) и 129 (0,430) п.н.

Таблица 2. Частота встречаемости генотипов коров по локусу BM 7209

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона 103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего 4131	N
1	123\117	-	-	0,005	1
2	123\119	-	-	0,079	17
3	123\121	-	-	0,019	4
4	123\123	-	-	0,144	31
5	127\119	0,099	7	0,065	14
6	127\121	-	-	0,014	3
7	127\123	0,099	7	0,186	40
8	127\125	-	-	0,037	8
9	127\127	0,07	5	0,074	16
10	129\119	0,099	7	-	-
11	129\123	0,183	13	0,219	47
12	129\127	0,324	23	0,158	34
13	129\129	0,127	9	-	-

Комбинации аллелей в генотипы у изучаемых животных представлены в таблице 2. Среди наблюдаемых вариантов генотипов у животных, принадлежащих линии Погожего 4131 наибольшее распространение имели следующие комбинации аллелей: 123\123 – 0,144; 127\123 – 0,186; 129\123 – 0,219; 129\127 – 0,158. У коров линии Иона103 преобладали следующие генотипы: 129\127 – 0,324; 129\123 – 0,183; 129\129 – 0,127.

Степень гетерозиготности для этого маркера по результатам генотипирования дочерей Погожего 4131 составила 78,3% , а для дочерей Иона 103 – 85,4% , что достаточно близко к величине, приведенной в базе данных (75,3%).

2. Полиморфизм локуса BMS 2819.

При амплификационном анализе ДНК коров изучаемой популяции было выявлено 13 аллелей локуса BMS2819 с минимальным размером 88 п.н. и максимальным -120 п.н. у дочерей Погожего 4131. У дочерей Иона 103 было обнаружено 11 аллелей (88-108 и 112-120 п.н.), в то время как в базах данных зарегистрировано 13 аллелей с колебанием размеров от 88 до 118 п.н. (Stone et al., 1995) (табл. 3.).

Ни в одной группе животных не был обнаружен аллельный вариант размером 110 п.н.

Таблица 3. Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BMS 2819

Аллель	Частота	N	Аллель	Частота	N
У коров принадлежащих линии Погожего4131					
88	0,023±0,007	10	108	0,007±0,004	3
90	0,135±0,016	58	112	0,007±0,004	3
96	0,126±0,015	54	114	0,014±0,006	6
100	0,295±0,022	127	116	0,005±0,003	2
102	0,002±0,002	1	118	0,042±0,01	18
104	0,016±0,006	7	120	0,005±0,003	2
106	0,323±0,023	139			
У коров принадлежащих линии Иона103					
88	0,014±0,001	2	108	0,007±0,007	1
90	0,127±0,028	18	112	0,261±0,037	37
98	0,099±0,025	14	114	0,014±0,001	2
100	0,028±0,014	4	118	0,07±0,022	10
104	0,028±0,014	4	120	0,014±0,01	2
106	0,338±0,04	48			

Наиболее часто встречаемыми в группе дочерей быка Погожего 4131 были аллельные варианты 106 (0,323) и 100 (0,295), в то время как у коров, принадлежащих линии Иона103, самыми распространенными были аллели 112 (0,261) и 106 (0,338).

Распределение генотипов коров изучаемых линий по локусу BMS 2819 представлено в таблице 4. Среди коров, принадлежащих линии Иона 103, наиболее часто встречались животные следующих генотипов: 106\96 – 0,127; 106\106 – 0,113; 112\90 – 0,155.

Таблица 4. Распределение генотипов по локусу BMS2819 среди исследованных животных

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона 103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего 4131	N
1	100\88	-	-	0,023	5
2	100\90	-	-	0,144	31
3	100\96	-	-	0,163	35
4	100\100	-	-	0,019	4
5	104\100	-	-	0,023	5
6	106\88	0,014	1	0,023	5
7	106\90	0,099	7	0,126	27
8	106\96	0,127	9	0,088	19
9	106\100	0,042	3	0,107	23
10	106\102	-	-	0,005	1

11	106\104	0,014	1	0,009	2
12	106\106	0,113	8	0,112	24
13	108\100	-	-	0,014	3
14	108\106	0,014	1	-	-
15	112\88	0,014	1	-	-
16	112\90	0,155	11	-	-
17	112\96	0,070	5	-	-
18	112\100	0,014	1	0,005	1
19	112\104	0,04	3	-	-
20	112\106	0,07	5	0,009	2
21	112\112	0,014	1	-	-
22	114\100	-	-	0,009	2
23	114\106	0,014	1	0,019	4
24	114\112	0,014	1	-	-
25	118\102	-	-	0,009	2
26	118\100	-	-	0,051	11
27	118\106	0,04	3	0,032	7
28	118\112	0,099	7	-	-
29	120\106	0,014	1	-	-
30	120\112	0,014	1	-	-
31	122\100	-	-	0,005	1
32	122\106	-	-	0,005	1

У дочерей быка Погожего 4131 наиболее распространенными были генотипы: 100\90 – 0,144, 100\96 – 0,163; 106\90 – 0,126.

Степень гетерозиготности, приведенная в базе данных по этому локусу, составила 79%, а для коров, принадлежащих к линии Погожего 4131 и Иона 103 – 87,4 и 87,5% соответственно.

3. Полиморфизм локуса BMS2295.

При исследовании полиморфизма локуса BMS2295 было установлено 7 аллельных вариантов этого локуса у дочерей Погожего 4131 с размером от 108 до 128 п.н. и только 5 – у коров линии Иона 103, т.к. у дочерей Иона 103 отсутствовали аллели 108 и 116 п.н. (табл. 5.).

В базе данных зарегистрировано 10 аллелей этого локуса с размерами от 100 до 128 п.н. (Stone et al., 1995).

Таблица 5. Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BMS 2295

Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
У коров принадлежащих линии Погожего 4131					
108	0,005±0,003	2	116	0,0023±0,0023	1
110	0,072±0,013	33	122	0,347±0,023	149
112	0,440±0,024	189	128	0,04±0,009	17
114	0,09±0,014	39			
У коров принадлежащих линии Иона 103					
110	0,092±0,024	13	122	0,113±0,027	16
112	0,303±0,039	43	128	0,042±0,017	6
114	0,451±0,042	64			

По результатам генотипирования было установлено, что в группе дочерей Погожего 4131 наибольшее распространение имели аллельные варианты 112 и 122 с частотами 0,440 и 0,347

соответственно. У коров линии Иона103 – 112 и 114 с частотами встречаемости: 0,303 и 0,451 (табл. 5.).

В исследованной популяции нами были обнаружены комбинации аллелей микросателлитного локуса BMS 2295 в генотипах, которые представлены в таблице 6.

Таблица 6. Распределение генотипов по локусу BMS 2295 среди исследованных животных

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего4131	N
1	112\108	-	-	0,009	2
2	112\110	0,070	5	0,065	14
3	112\112	0,155	11	0,205	44
4	114\110	0,113	8	-	-
5	114\112	0,099	7	0,079	17
6	114\114	0,254	18	-	-
7	122\110	-	-	0,088	19
8	122\112	0,127	9	0,270	58
9	122\114	0,099	7	0,103	22
10	122\116	-	-	0,005	1
11	122\122	-	-	0,098	21
12	128\112	-	-	0,047	10
13	128\114	0,085	6	-	-
14	128\122	-	-	0,033	7

Как видно из таблицы, наиболее распространенными среди дочерей Иона103 оказались животные с генотипами: 112\112 – 0,155; 114\110 – 0,133; 114\114 – 0,254 и 122\112 – 0,127. У коров линии Погожего преобладали следующие генотипы: 112\112 – 0,205; 122\112 – 0,270; 122\114 – 0,103.

Уровень гетерозиготности локуса BMS2295 у коров, принадлежащих к линии Погожего 4131 и Иона 103, составил 66,9 и 62,5%, против 72%, приведенных в базе данных.

4. Полиморфизм локуса BMS1967.

В результате анализа ДНК коров изучаемой популяции у дочерей обоих быков было обнаружено по 9 аллелей локуса BMS1967 из 12 зарегистрированных в базе данных, с минимальным размером – 81 и максимальным -103 п. н.

Таблица 7. Частота встречаемости аллельных вариантов локуса BMS 1967

Аллели	Частота	N	Аллели	Частота	N
У коров принадлежащих линии Погожего4131					
81	0,005±0,003	2	95	0,056±0,011	24
83	0,109±0,015	47	97	0,002±0,002	1
85	0,035±0,009	15	99	0,326±0,023	140
87	0,061±0,012	26	101	0,044±0,01	19
91	0,274±0,022	118	103	0,065±0,012	28
93	0,023±0,007	10			
У коров принадлежащих линии Иона103					
81	0,007±0,007	1	95	0,049±0,018	7
83	0,119±0,018	17	97	0,007±0,007	1
85	0,049±0,018	7	99	0,035±0,015	5
87	0,345±0,04	49	101	0,035±0,015	5

91	0,007±0,007	1	103	0,331±0,039	47
93	0,014±0,001	2			

Однако размеры полиморфов отличались у животных, принадлежащих разным линиям. Так у дочерей Погожего 4131 были обнаружены преимущественно аллели с размерами 83-95 и 99-103 п.н., а у дочерей Иона 103 – 81-87 и 95-103 (табл. 7.). Наиболее распространенными аллелями у дочерей быка Погожего 4131 были: 91 (0,274) и 99 (0,326), а у коров линии Иона 103 наиболее часто встречались аллели 87 (0,354) и 103 (0,331).

По локусу BMS 1967 у животных обеих линий было обнаружено 34 комбинации аллелей в генотипах (табл. 8.). Так у коров линии Иона 103 наиболее часто встречались следующие сочетания аллелей: 87\83 (0,127), 103\83 (0,113) и 103\87 (0,211). У дочерей Погожего 4131 самой распространенной оказалась комбинация 99\83 (0,134).

Таблица 8. Распределение генотипов по локусу BMS 1967 среди исследованных животных

№	Генотипы	Частота встречаемости у дочерей Иона 103	N	Частота встречаемости у дочерей Погожего 4131	N
1	87\81	0,014	1	-	-
2	87\83	0,127	9	-	-
3	87\85	0,042	3	-	-
4	87\87	0,085	6	-	-
5	91\83	-	-	0,079	17
6	91\85	-	-	0,051	11
7	91\87	-	-	0,056	12
8	91\91	-	-	0,037	8
9	91\103	-	-	0,009	2
10	93\91	-	-	0,019	4
11	95\87	0,056	4	-	-
12	95\91	-	-	0,051	11
13	97\87	0,014	1	-	-
14	99\81	-	-	0,009	2
15	99\83	-	-	0,134	29
16	99\85	-	-	0,019	4
17	99\87	0,028	2	0,065	14
18	99\91	-	-	0,098	21
19	99\93	-	-	0,028	6
20	99\95	-	-	0,060	13
21	99\97	-	-	0,005	1
22	99\99	-	-	0,070	15
23	101\87	0,028	2	-	-
24	101\91	-	-	0,037	8
25	101\99	-	-	0,05	11
26	103\83	0,113	8	0,005	1
27	103\85	0,056	4	-	-
28	103\87	0,211	15	-	-
29	103\91	0,014	1	0,074	16
30	103\93	0,028	2	-	-
31	103\95	0,042	3	-	-
32	103\99	0,004	3	0,042	9
33	103\101	0,004	3	-	-
34	103\103	0,056	4	-	-

Величина индекса гетерозиготности, занесенная в базу данных, для данного локуса составляла 79%, для дочерей Погожего 4131 – 89% и Иона 103 – 85,4%.

5. Уровень гетерозиготности изученных маркеров.

В вопросах динамики генетического состава популяций важным параметром является гетерозиготность. Мутационный процесс, различные типы отбора, дрейф генов, неслучайное скрещивание и другие факторы популяционной динамики нередко влияют на гетерозиготность популяций (Левонтин, 1978; Ли, 1988). Поэтому ее оценка в настоящее время необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях.

Гетерозиготность служит мерой генетической изменчивости популяции, она определяется как средняя частота особей гетерозиготных по определенным локусам (Айала, Кайгер, 1988). Это надежная мера изменчивости, поскольку она служит оценкой вероятности того, что два аллеля данного локуса, взятые наугад из генофонда популяции, окажутся различными. Высокая гетерозиготность обеспечивает большое количество информативных мейозов (случаев рекомбинации), что повышает эффективность тестов сцепления.

Таблица 9. Уровень полиморфизма изучаемых локусов

Локусы	Значение базы данных	Дочери Иона			Дочери Погожего		
		Гетерозиготность		PIC	Гетерозиготность		PIC
		фактическая	ожидаемая		фактическая	ожидаемая	
BMS 2819	79	87,3	81,8	0,79	87	80,8	0,76
BM7209	76	80,3	70,6	0,65	78,1	74,9	0,70
BMS 2295	72	59,2	70,5	0,65	69,8	68,7	0,63
BMS 1967	79	85,9	77,1	0,74	89,3	81,9	0,79

Как следует из анализа результатов данных, представленных в таблице 9, уровень гетерозиготности всех изучаемых микросателлитных последовательностей у коров, принадлежащих линии Иона 103 и Погожего 4131, превысил 50%. Это дает возможность использовать протестированные микросателлитные маркеры девятой хромосомы в дальнейших исследованиях сцепления с локусами хозяйственно-полезных признаков, а именно, с молочной продуктивностью.

Средняя гетерозиготность по четырем изученным микросателлитным маркерам у коров, принадлежащих линии Иона103, составила 78,2%, а у дочерей быка Погожего 4131 –81%. Гетерозиготность всей изучаемой популяции по маркерам девятой хромосомы равнялась 79,6%. Такая высокая гетерозиготность популяции подтверждает высокий полиморфизм изучаемых микросателлитных маркеров, а также может объясняться тем, что предыдущий план племенной работы закреплял для племобъединения

стадо ПНО «Пойма» в качестве полигона по испытанию молодых быков-производителей. Вместе с этим, одновременно и в смежные годы к стаду подбирались производители голштинских линий разных эколого-географических групп, происходящих из США, Канады, Германии, Англии, Японии и России (Попов и др., 1999), что обеспечило высокую изменчивость популяции.

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

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

Наряду с уровнем гетерозиготности для оценки информативной ценности полиморфизма вводится величина PIC, рассчитываемая по специальной формуле из частот аллелей. Чем больше величина PIC для данного локуса, тем информативнее он оказывается в качестве маркера. Для очень полиморфных систем значение PIC приближается к 1. Принято следующее разделение величин PIC: при $PIC > 0,5$ локус очень информативен, при $0,5 > PIC > 0,25$ достаточно информативен и при $PIC < 0,25$ слегка информативен (Свердлов, 1995). В проведенных исследованиях было установлено, что у коров, принадлежащих как линии Иона103, так и линии Погожего4131, все изученные микросателлитные последовательности девятой хромосомы имели $PIC > 0,5$. Следовательно, эти маркеры могут быть с успехом использованы в дальнейшем поиске ассоциации с локусами хозяйственно-полезных признаков.

Заключение

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

Как следует из амплификационного анализа ДНК коров наблюдаемой популяции, по всем исследованным микросателлитным маркерам уровень их полиморфизма колеблется в пределах от 4-х до 13 аллелей в зависимости от маркера. Эти величины лежат достаточно близко к уровню полиморфизма, зарегистрированному в международной базе данных, где суммированы сведения о различных

породах скота. Необходимо отметить, что по этому показателю дочери Погожего⁴¹³¹ во всех случаях превосходили коров, принадлежащих линии Иона¹⁰³.

Изучение меры генетической изменчивости популяции по показателю гетерозиготности свидетельствует, что средний уровень гетерозиготности всей изучаемой популяции по исследованным маркерам девятой хромосомы составил около 79%, подтверждая тем самым высокий полиморфизм тестируемых маркеров. А оценка информативной ценности полиморфизма по величине PIC > 0,5 предполагает отнесение изученных локусов к очень информативным.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Perret, Y-C. Scia, R. Fries et al. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. *Genomics*, 1990, 6: 482-490.
2. Soller M. Genetic mapping of the Bovine Genome Using Deoxyribonucleic Acid-Level Markers to Identify Loci Affecting Quantitative Traits of Economic Importance. *J. Dairy Sci.*, 1990, 73: 2682-2646.
3. Weber J.L. and P.E. May. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. 1989 *Am. J. Human Genetics*, 44: 388.
4. Georges M.D., Nielsen M., Mackinnon M. et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 1995, 139: 907-920.
5. Vilkkil H.J., Koning D.J., Elo K. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci of Finnish dairy cattle by regression. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 1: 198-204.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984: 479с.
7. Williams J., Usha A.P., Urquhart B.G., Kirloy M. Verification of identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *Vet. Rec.* 1997, 140: 446-449.
8. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991: 271с.
9. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях. *Итоги науки и техники. Общая генетика*. М.: ВИНТИ, 1998, 8: 76-104.
10. Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dc-dt)_n polymorphism. *Genomics*. 1990, 7: 524-530.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990: 352с.
12. Stone R.T. et al., A small – insert bovine genomic library highly enriched in microsatellite repeat sequences. *Mamm. Genome*, 1995, 6: 714-724.
13. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978: 351с.
14. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978: 526с.
15. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988, 3: 335с.
16. Попов Н.А. и др. План племенной работы с крупным рогатым скотом черно-пестрой породы ГУП ПНО «Пойма» Луховицкого района Московской области на 2000-2007 гг.
17. Сverdlov E.D. Очерки современной молекулярной генетики. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1995, 2:3-15.

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ СТРУКТУРНЫЙ ГЕН ТАУМАТИНА РАСТЕНИЯ *Thaumatococcus daniellii*

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

*Сконструирована рекомбинантная плазмида, содержащая ген тауматин под контролем регуляторных областей гена α S1-казеина быка. Достоверность клонирования подтверждена рестриктивным картированием, а также секвенированием полученной рекомбинантной плазмиды. Созданная плазмида обозначена **pas1Tau** и может быть использована в разработке технологий по получению трансгенных сельскохозяйственных животных, продуцирующих «сладкий» белок тауматин.*

Введение

К настоящему времени накоплен обширный материал, свидетельствующий о возможности тканеспецифической экспрессии генов биологически активных веществ в молочной железе трансгенных животных. Принципиальная возможность получения с молоком этих веществ обусловлена тканеспецифической экспрессией, определяемой регуляторными последовательностями генов казеиновых белков (Mead et al., 1990).

В последние годы соединения пептидно-белковой природы привлекают повышенное внимание в связи с проблемой получения веществ, обладающих ценными свойствами и хорошими вкусовыми качествами. Естественно, что главные из них – это заменители сахара. В настоящее время биотехнологические методы позволяют получать сахар (сахарозу, глюкозу, фруктозу) на основе ферментативной обработки крахмала и даже целлюлозы. Тем не менее постоянно ведется поиск «сладких» веществ и среди других типов соединений – более дешевых и пригодных к использованию в связи с проблемой диабета.

К белкам, обладающим интенсивно сладким вкусом, наряду с другими соединениями относится и тауматин, выделенный из плодов некоторых африканских растений (*Thaumatococcus daniellii*) и превосходящий сахар по сладкости до 3 тысяч раз (при одинаковой молярной концентрации). Тауматин является основным белком с молекулярной массой около 22000 дальтон и содержит 207 аминокислотных остатков (Овчинников, 1987).

Плодовые растения, содержащие тауматин, не плодоносят вне своего природного ареала, поэтому предпринимаются попытки получать «сладкие белки» для широкого практического использования с помощью методов генной инженерии (Wilcox, Studnicka, 1988). Так, например, был получен высокий уровень экспрессии тауматина в дрожжевых клетках (Lee et al., 1988), однако биологически активный белок отмечался в отдельных случаях (Faus, 2000). Экспрессия синтетического гена тауматина была обнаружена в клетках *E. coli*. Иммуноблотинг показал, что рекомбинантный белок имеет

молекулярный вес, равный молекулярному весу протеина из естественного источника растения - *Thaumatococcus danieli* (Faus et al., 1996).

Несмотря на возможность получения «сладкого» белка с помощью прокариот, его наработка, выделение и очистка удорожают такой способ получения его как коммерчески конкурентного продукта. В этой связи предпринимаются попытки использования трансгенных животных-продуцентов «сладкого» белка с молоком. В случае успеха, молоко и продукты его переработки могли бы быть сразу использованы в диетическом питании больных диабетом. Первым этапом такой технологии является создание соответствующей векторной кассеты.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы являлось конструирование векторной кассеты, включающей ген тауматина с регуляторными последовательностями гена α 1-казеина быка.

Материалы и методы

Гидролиз ДНК рестриктазами и лигирование проводили стандартными методами (Sambrook et al., 1989). Для проведения рестрикции брали 0,2-1,0 мкг плазмидной ДНК. Добавляли к раствору ДНК соответствующий буфер 10-кратной концентрации и рестриктазу из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК. Доводили объем раствора до 30 мкл и инкубировали пробы 2 часа при 37°C. В зависимости от того, какие концы имели фрагменты ДНК, реакцию лигирования проводили в различных условиях. Молярное отношение вектора и вставки при лигировании по "липким" концам составляло 1:2, концентрация ДНК - 20 мкг/мкл. Лигазу добавляли из расчета 0,5 ед. на 1 мл. Для отбора необходимых рекомбинантных молекул лигазную смесь брали на трансформацию клеток *E.coli*, которую проводили по методу Кушнера (Kushner, 1978) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия.

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E.coli* щелочным методом (Кузнецов, 1990). Выделенную плазмидную ДНК растворяли в буфере TE и центрифугировали в градиенте хлористого цезия. После центрифугирования отбирали фракцию, содержащую суперскрученную форму плазмидной ДНК. Освобождались от бромистого этидия, переосаждали ДНК этанолом и растворяли в буфере TE.

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

Результаты и обсуждение

Нуклеотидная последовательность гена тауматина (*Tau*) была получена путем двойного гидролиза рестриктазами *EcoRI*/*HindIII* плазмиды pUR528, любезно предоставленной Долговым С.В. (ФИБХ).

Из данной плазмиды был выделен фрагмент ДНК размером около 1000 н.п., включающий последовательность гена *Tau*. После электрофоретического разделения в 1% агарозном геле и элюции с использованием 5М перхлората натрия фрагмент был клонирован в плазмиду pUC21 со сходными EcoRI-HindIII «липкими концами». Полученная плазмида была обозначена **pTau** и при дальнейших манипуляциях служила вектором для последующего клонирования.

Следующим этапом в работе по получению рекомбинантной плазмиды, содержащей ген тауматина под контролем регуляторных областей гена *as1*-казеина быка, было конструирование плазмиды, состоящей из гена тауматина и промоторной области гена *as1*-казеина быка. Схема основных этапов конструирования рекомбинантной ДНК, включающей в свой состав последовательности гена *as1*-казеина быка и структурный ген тауматина, представлена на рис. 1.

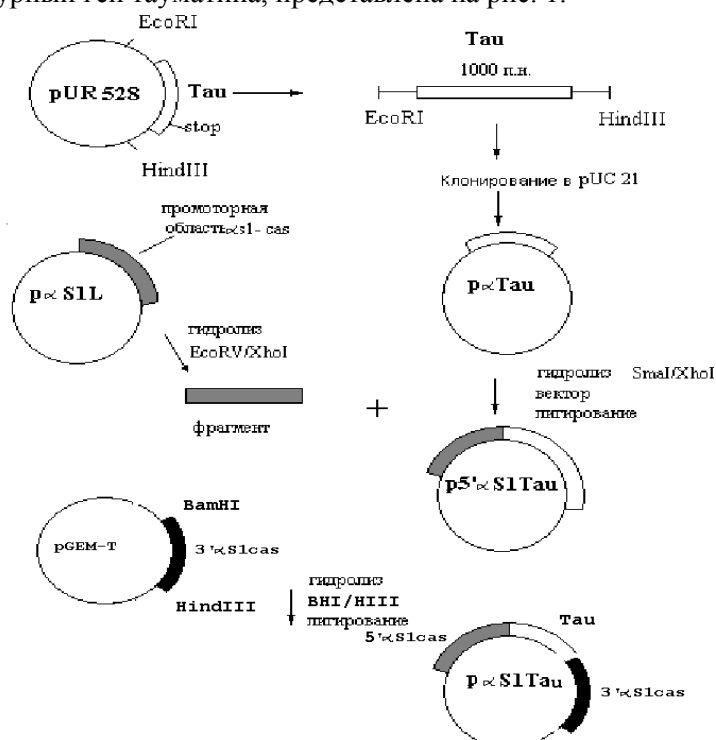


Рис.1. Основные этапы клонирования регуляторных районов гена *as1*-казеина быка в плазмиде, содержащей последовательности гена *Tau*.

Для выделения промоторной области гена *as1*-казеина быка была использована ранее созданная нами плазмида **p5'as1L** (Отчет..., 1996-2000). Полученная плазмида имеет 5'-фланкирующий район, протяженностью около 2100 н.п., который, предположительно, кроме функциональных элементов старта транскрипции и начала трансляции содержал дополнительные участки ДНК, определяющие более эффективный характер экспрессии генов в клетках молочной железы трансгенных животных. Из сконструированной плазмиды **p5'as1L**, используя соответствующие рестриктазы EcoRV и XhoI, был вырезан фрагмент ДНК размером около 2100 н.п., который имел нуклеотидную последовательность удлинённой промоторной области гена *as1*-казеина быка. Так была подготовлена вставка для первого клонирования.

Лигирование вектора **pTau** с подготовленным фрагментом проводили по рекомендации фирмы – производителя лигазы ДНК фага T4. Трансформацию клеток *E.coli* штамма Jm109 ставили по стандартной методике. После инкубирования чашек с колониями на твердой среде, были отобраны 24 клон для анализа плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом. Анализ плазмидной ДНК клонов проводили, применяя ПЦР с праймерами, соответствующими данному фрагменту. Рестрикционное картирование рекомбинантной ДНК проводили, используя рестриктазы BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRV. Из 24 клонов – 15 оказались трансформантами и содержали соответствующий фрагмент, размером около 2100 н.п.

В результате выполнения последовательных этапов работы была получена плазида, содержащая в своем составе промоторную последовательность гена *αs1*-казеина быка, обеспечивающую тканеспецифичную экспрессию в клетках молочной железы коров, и структурный ген белка тауматина, имеющий собственный stop-кодон, позволяющий завершать транскрипцию мРНК. Данная плазида обозначена p5'αs1Tau и может быть использована в технологии трансгенеза.

Однако, с целью более полной имитации функционирования чужеродного гена в организме трансгенного животного, в генную конструкцию следовало ввести нуклеотидную последовательность 3' – фланкирующего района гена *αs1*-казеина быка, обуславливающего возможность процессинга, транспорта и трансляции транскрипта, что и было предпринято в дальнейшем. Для этого было необходимо выделить последовательность, содержащую сигналы сплайсинга и полиаденилирования гена *αs1*-казеина быка и клонировать полученный фрагмент ДНК в рекомбинантную плазмиду **p5'αs1Tau**.

Наиболее удобным и быстрым для выделения достаточного количества искомого фрагмента ДНК оказался метод ПЦР. В качестве матрицы использовалась хромосомная ДНК быка (*Bos taurus*). Согласно опубликованной полной последовательности нуклеотидов гена *αs1*-казеина крупного рогатого скота, были подобраны синтетические олигонуклеотиды - 1S3 и 2S3. При этом в состав праймеров вводились дополнительные последовательности, соответствующие сайтам рестриктаз HindIII и BamHI. Характеристики подобранных праймеров, их структура, локализация, а также размер амплифицированного фрагмента представлены в таблице 1.

Амплификацию проводили в течение 30 циклов в следующем температурно-временном режиме:

Денатурация ДНК - 94°C (1 мин)

Отжиг праймеров - 56°C (1 мин)

Синтез ДНК- 72°C (1 мин), затем элонгация ДНК - 72°C (3 мин).

Используя данную программу, в достаточном количестве был синтезирован фрагмент, содержащий 3'-фланкирующую область гена *αs1*-казеина быка, очищен на миниколонке (фирмы «Promega») и подготовлен для следующего клонирования.

*Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых для амплификации 3'-области гена *as1*-казеина быка*

Праймер	Структура	Локализация	Ориентация	Амплифицируемый фрагмент
1S3	5'- GCG AAG CTT ACT CCA CAG TTA TGG TCT TTG -3'	18444 н.п.	dir	1520 н.п.
2S3	5'- ATA GGA TCC GTC CCA AGA AGT CCT GCC AAA -3'	19964 н.п.	rev	

Предварительно плаزمида **p5'as1Tau**, служащая вектором, и вставка были проверены на наличие сайтов рестрикции для ферментов HindIII и BamHI, которые оказались наиболее удобными для клонирования. Полученные данные свидетельствовали о присутствии уникальных сайтов рестрикции данных ферментов в рекомбинантной плазмиде **p5'as1Tau**. Выделенный амплификат, содержащий часть последовательности 3'-фланкирующей области гена *as1*-казеина быка, не имеет таких сайтов, за исключением искусственно введенных.

Промежуточное клонирование проводили в векторе pGEM-T фирмы "Promega". Отсутствие собственных HindIII и BamHI сайтов в промежуточном векторе позволило выделить фрагмент с «липкими концами», используя полный гидролиз по BamHI и HindIII. Отбор клонов проводили на селективной среде, содержащей X-gal. Клон-трансформант рассеивали для препаративного выделения рекомбинантной плазмиды, и после очистки была проведена рестрикция плазмидной ДНК. Затем проводили элюцию BamHI/HindIII-фрагмента после разделения в агарозном геле.

Лигирование выделенного фрагмента с вектором **p5'as1Tau**, также имеющего BamHI/HindIII, проводили согласно рекомендациям фирмы «Fermentas». Трансформацию E.coli лигазной смесью проводили в стандартных условиях. Плазмидная ДНК выросших клонов анализировалась на наличие искомого фрагмента. Скрининг трансформантов осуществляли с использованием PCR и рестрикции. После проведенных исследований отобран клон, содержащий рекомбинантную плазмиду, которая была обозначена **pas1Tau**.

Достоверность выполненного клонирования контролировали как проведением рестрикционного анализа, так и определением первичной нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК плазмиды **pas1Tau**.

Рестрикционное картирование плазмидной ДНК осуществляли путем полного расщепления рестриктазами BamHI, HindIII, XhoI, EcoRI, EcoRV, SmaI (рис. 2). При двойном гидролизе плазмиды **pas1Tau** ферментами EcoRI и HindIII выщеплялось четыре фрагмента следующей длины: 0,3; 1; 1,6 и 3,0 kb, что полностью соответствовало предполагаемому расположению сайтов рестрикции полученной плазмиды.

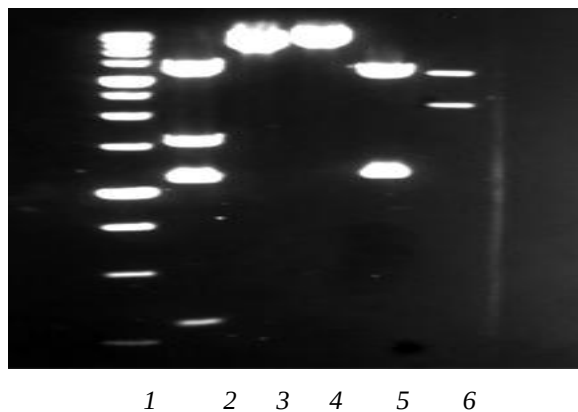


Рис. 2. Анализ продуктов гидролиза в 1,5% агарозном геле: 1- маркер длин ДНК; 2 - *pas1Tau/ EcoRI+ HindIII*; 3 - *pas1Tau/ BamHI*; 4 - *pas1Tau/ HindIII*; 5 - *pTau/ HindIII+ SmaI*; 6 - *p5'as1L/ XhoI+EcoRI*

На основании экспериментальных данных была построена рестриктивная карта плазмиды (рис 3.).

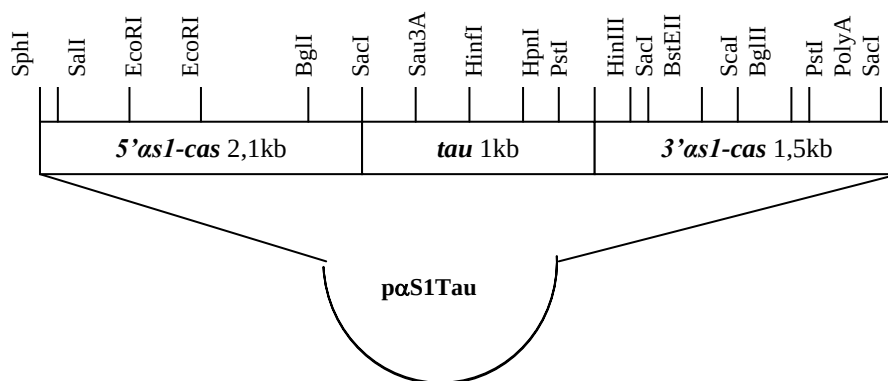


Рис.3. Карта-схема расположения сайтов рестрикции на созданной плазмиде *pas1Tau* (указаны величины клонированных фрагментов).

Тем не менее, выяснение последовательности расположения нуклеотидов дает максимально точную информацию о клонированных фрагментах ДНК. В связи с этим, нами была предпринята попытка секвенирования рекомбинантной ДНК. Секвенирование двухцепочечной ДНК проводили с использованием терминаторов полимеразной реакции. Данный метод позволяет определить нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК размером 300-500 п.н.

Для секвенирования использовали набор Fmol DNA Cycle Sequencing System («Promega», USA). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Анализ полученных данных по первичной структуре клонированных фрагментов показал, что последовательность нуклеотидов, прочитанная нами (рис. 4), соответствует опубликованной

структуре регуляторного района гена *αs1*-казеина быка (Kozan et al., 1991).

```
actcca cagttatggt ctttggttaag ttggaaactg cttgtctaata cattgatcct
cttttcatat gagagctcag tacaaaagta caacgtgtag actataaagt
tgttttgctg gtcctctagt ctagctatat ttaaacacat tacacttaga
taatatcaat aattaaattg gcttcaacat tttttgtatt atagtaatat
caaatttaag tagcaataaa actagctaata ttttaattaat ataatttatt
atattgaaat ttttatacaa gtataggagt gtgggtgtta ctaattctgg
tgaccccaac agtggaaatcc tattctttat gatcactgaa atagaaatac
ttaatacgtc acatagttaa atcaagtgtt tgtctattaa gaagaaaaca
aattttaaag tccatagatg tgttttgagt acttcaattt actatatagg
agcttgtagt tgtgtgtgta tgtgtatgtt ccctttctag tgggtgaaac
ttcccttataacagatcaaa agatggaaaa taaaagtctg acgtacttga
agtttttact ttgaattatt ttgccatatt ttctgttact gcaaaagaaa
gtgcaaccta gtcataaatt gcctgtaaaa gttaaaaatc aggagcagt
ggtatgtgtt agtaacagga gacacatata actttgtgaa cttcatctta
agatgaagag aaaatgacta ttaaagtgtt tcttatcata acagtacctt
ctcccttcaa aacatgcagc ataactaacc acatatttct tttttggtt
acagatgggt ctgaaaattc catgctctac atgtcttttc atctatcatg
tcaaaccatt ctatccaaag gcttcaactg ctgtttttaga atagggcaat
ctcaaattga aggcactctt tcttcttgag ttctctactg tatttttagat
agtgtaacat ccttaagtga aattgtccta acagcttggt acctaaattc
cagtagtatc atgctgggtat aaaggccact gagtcaaagg gaattaaagt
cttcattaaa tttctgtatg gaaaatgttt taaaagcctt tgaatcactt
ctcctgtaag tgccatcata tcaaaataatt gtgtgcatta actgagattt
tgtcttttct cttttcaata aattgcattt taaggcacta ttctattttt
ttgtcattat tcattggaa ggaattttaca caacctgtg agtttggtg
tatataacat tttgttttca ctaaattttt atgacatttt caaccacatt
ttaatgaaaa aattcaaagt ttcaacttcta gctgatcctg gtagattata
aactgagtct aagatctttc atttgaagtc aactgtttat agaataattt
ccatgtgaac atggacgtg ctgcagagag aacagcagt tagtagttgt
gggtgcactg gcaatttgaa caacctggtt atactgttta atttggcagg
acttcttgga gctc
```

Рис.4. Нуклеотидная последовательность 3'-фланкирующей области протяженностью около 1500 н.п. гена *αs1*-казеина быка, установленная нами в ходе секвенирования рекомбинантной плазмиды **pas1Tau**

Таким образом, проведенные исследования позволили сконструировать плазмиду **pas1Tau**. Плазида содержит в своем составе структурный ген *tau* (протяженностью около 1000 н.п.), кодирующий белок тауматин. Ассоциированные с геном *tau* функциональные участки гена *αs1*-казеина быка (промоторная область протяженностью 2100 н.п. и 3'-фланкирующая область протяженностью 1500 н.п.) позволяют обеспечивать тканеспецифическую экспрессию этого гена в тканях молочной железы трансформированных животных.

Закключение

Сконструирована рекомбинантная плазида **pas1Tau**, содержащая нуклеотидную последовательность гена тауматина под контролем регуляторных элементов гена *αs1*-казеина быка. Полученная рекомбинантная ДНК включает необходимые регуляторные последовательности для тканеспецифичной экспрессии трансгена в клетках молочной железы животных.

Сконструированная плазмида может найти применение не только при проведении исследований в области трансгеноза, но и в дальнейших молекулярно-генетических работах по клонированию с целью создания новых векторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mead H., Gates L., Lacy E. et al. Bovine alpha s1- casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Biotechnol.*, 1990. 8: 443-446.
2. Овчинников Ю.А. Биорганическая химия, М.: Просвещение, 1987, 292 с.
3. Wilcox G., Studnicka G.M., Expression of foreign proteins in microorganisms, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1988, 10(6): 500-509
4. Lee J.H. et al. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast, *Biochemistry*, 1988, 27(14): 5101-5107
5. Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 53(2): 145-151.
6. Faus I. et al. Expression of synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 229(1): 121-127
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
8. Kushner S.R. An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids. *Genetic engineering.* - Amsterdam ets: Elsier., 1978: 17-23.
9. Кузнецов К.Д. Методы молекулярной генетики и геной инженерии, М.: Наука, 1990: 61-65.
10. *Отчет о научно-исследовательской работе лаборатории молекулярной биологии за 1996-2000 гг., г. Боровск, ВНИИФБиП с.-х. животных, 2001*
11. Kozan D., Hobon G., Scifert H.M. Genomic organization of the bovine α -S1-casein gene. *Nucleic Acids Res.*, 1991: 5591-5596

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ МИКРОЦИНОГЕННОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* S5/98 ДЛЯ КРОЛИКОВ

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

В опытах на кроликах изучена хроническая токсичность микроциногенного штамма *E. coli* S5/98. Показано, что его ежедневное применение в дозах $1,5-3,0 \times 10^8 - 10^{10}$ клеток/животное в течение 6 мес не сопровождалось какими-либо неблагоприятными отклонениями в функционировании органов и систем у кроликов. Однако, после 6-месячной дачи препарата животным кишечная палочка из крови и органов не выделялась, что объясняется естественной их санацией за счет стимуляции иммунной системы. Применение препарата не повышало продуктивности животных, но увеличивало в мясе содержание жира. Патологических поражений органов и тканей не наблюдалось, что свидетельствует о безвредности штамма *E. coli* S5/98 для кроликов.

Введение

В настоящее время пробиотики находят все большее применение в ветеринарной практике с целью сохранения здоровья и высокой продуктивности животных. Особенно эффективно их использование при выращивании молодняка и поэтому активно ведется поиск новых микроорганизмов, продуцирующих антагонистические вещества широкого спектра действия. Сравнительно недавно было установлено, что бактерии рода *Escherichia* кроме бактериоцинов способны синтезировать низкомолекулярные вторичные метаболиты, получившие название микроцинов, которые подавляют рост эшерихий, сальмонелл, шигелл, клебсиелл, протей и других родов кишечных бактерий. На основе штамма *E. coli* M17(p74), продуцирующего микроцин C51, создан пробиотик ромакол, который оказался эффективным лечебно-профилактическим препаратом при кишечных инфекциях молодняка (Соколова и др., 1991; Каврук и др., 1997, 1999). Однако этот пробиотик с микроциногенной активностью пока единственный и дальнейшие поиски штаммов, продуцирующих микроцины и пригодных для приготовления пробиотических препаратов, остаются актуальными. Нами выделены штаммы эшерихий, синтезирующие микроцины типа В, и поскольку они представляются перспективными для создания высокоэффективных пробиотиков, то в соответствии с ветеринарно-санитарными требованиями должны пройти тщательную проверку на безвредность (Инструкция..., 1988; Доклад ВОЗ, 1994). Ранее нами для штамма *EcS* 5/98 была определена LD_{50} , изучено его токсическое, токсигенное, аллергенное и местное токсическое действие на организм лабораторных животных и по совокупности полученных данных он отнесен к четвертому классу опасности, т.е. является малоопасным для человека и животных (Тараканов и др., 2002). Однако для окончательного заключения о безвредности изучаемого штамма необходимо определение его хронической токсичности.

Исходя из вышеизложенного, задачей исследований было изучить хроническую токсичность микроциногенного штамма *E. coli* S 5/98 для кроликов.

Материал и методы

Для проведения опыта из 2-месячных кроликов пород калифорнийская и советская шиншилла было сформировано 4 группы по 12 голов в каждой. Кролики содержались в сетчатых клетках по 2 головы и получали сбалансированный основной рацион (ОР), который в зимний период состоял из 200 г сена или овсяной соломы и 200 г ячменя или пшеницы. В летний период вместо сена давали зеленую массу из разнотравья. Рацион содержал (г): сухого вещества – 280, кормовых единиц – 200, обменной энергии – 1,9 МДж, сырого протеина – 33, переваримого протеина – 21, сырой клетчатки – 70, кальция – 1,4 и фосфора – 0,7.

Первая группа служила контролем. Животные 2-й группы дополнительно к ОР в смеси с зерном ежедневно получали 1 мл культуры *EcS* 5/98 с титром живых бактериальных клеток в пределах

1,5-3,0x10⁸/мл, а для скармливания животным 3-й и 4-й групп доза живых бактерий в 1 мл увеличивалась до 1,5-3,0x10⁹ и 1,5-3,0x10¹⁰ (т.е. 10- и 100-кратно) соответственно. Бактериальный препарат готовили в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП. Наблюдения за кроликами вели ежедневно. Учитывали общее состояние, поедаемость кормов, заболеваемость и падеж животных в каждой группе.

Для объективной оценки воздействия культуры EcS5/98 на организм кроликов после 3- и 6-месячного ее скармливания убивали по 3 животных из каждой группы и отбирали кровь и мочу для исследований. В крови определяли количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу (Карпуть, 1986), фагоцитоз по Кост и Стенко и СОЭ по методу Панченкова (Кондрахин и др., 1985), гематокрит в гематокритной центрифуге, гемоглобин в гемометре Сали, бактерицидную активность сыворотки крови по Смирновой и Кузьминой (1966), лизоцимную активность по Емельяненко (1980). Функцию почек оценивали по физико-химическим показателям мочи, в которой определяли: pH на иономере ЭВ-74; цвет, прозрачность и консистенцию визуально; белок с помощью сульфосалициловой кислоты; сахар по Гайнесу; кетоновые тела по реакции с нитропруссидом натрия, желчные пигменты по Розину (Кондрахин и др., 1985).

На убойном материале устанавливали массу сердца, легких, печени, почек, селезенки, надпочечников и тимуса, определяли в тушках соотношение мышечной ткани, костей и жира и провели патологоанатомические исследования.

Способность штамма EcS 5/98 диссеминировать во внутренние органы кроликов определяли микробиологическими методами. С этой целью на селективную среду Эндо делали высевы из печени, почек, легких, крови из сердца, лимфатических узлов и длиннейшей мышцы спины. Бактериологические исследования выполнены в соответствии с требованиями общей схемы исследования мяса и мясных продуктов (Ветеринарная лабораторная практика, 1963).

Результаты и обсуждение

Общее состояние животных, параметры крови и мочи. Наблюдения за подопытными животными, проведенные на протяжении 6 месяцев, не выявили каких-либо отклонений в функционировании у кроликов сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной и мочеполовой систем. Пали два кролика – один из контрольной группы (гастроэнтерит), второй из группы, получавшей E. coli S5/98 в дозе 1,5-3,0x10⁸ клеток/гол (острый гепатит).

Гематологические исследования показали, что основные параметры крови животных контрольных и опытных групп в обоих случаях (через 3 и 6 месяцев после начала скармливания препарата) находились в пределах физиологической нормы, но они не оставались неизменными на протяжении опытов (табл.1). Так, показатели СОЭ, гемоглобина и эритроцитов у кроликов после 3-месячного скармливания E. coli S5/98 между группами существенно не различались, но численность лейкоцитов у животных, получавших

микробный препарат, значительно возростала ($P < 0,05$), а после 6-месячного применения препарата у кроликов 3-й и 4-й групп уменьшилось количество эритроцитов.

Таблица 1. Динамика морфологических и биохимических показателей крови кроликов

Показатели	Группы животных			
	1	2	3	4
3-месячное скормливание препарата				
Гемоглобин, г/л	105±0,82	107±1,1	104±0,61	105±1,2
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	1,0	1,3	1,3	1,0
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	7,5±0,23	8,1±0,25	9,7±0,17 ^б	8,6±0,32
Количество эритроцитов, млн/мкл	5,8±0,16	6,0±0,07	5,6±0,15	5,9±0,08
6-месячное скормливание препарата				
Гемоглобин, г/л	97±0,9	102±1,2	103±0,4	98±1,8
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	1,5	1,0	1,0	1,0
Гематокрит, %	37,3	36,7	41,8	36,0
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	7,75±0,34	10,2±0,31 ^а	9,0±0,28	10,6±0,75 ^а
Количество эритроцитов, млн/мкл	7,3±0,14	6,75±0,03	6,2±0,13 ^а	5,48±0,01 ^б

Примечание: здесь и далее достоверность разницы показана в сравнении с контролем: а - $P < 0,05$; б - $P < 0,02$; в - $P < 0,01$; г - $P < 0,001$.

Что касается лейкоцитарной формулы (табл. 2), то во всех группах она соответствовала лейкограмме здоровых животных, но у животных после 3-месячного скормливания повышенных доз препарата (3 и 4 группы) наблюдалось некоторое увеличение количества лимфоцитов за счет уменьшения сегментоядерных псевдоэозинофилов. Значительные изменения произошли в показателях неспецифической резистентности крови, которые достоверно повышались с увеличением дозы препарата. Так, после 3 месяцев скормливания *E.coli* S5/98 во 2-й, 3-й и 4-й группах бактерицидная активность сыворотки крови увеличилась до 79-81%, против 64,6% в контроле, а уровень лизоцима возрос с 107,9 мкг/мл в контроле до 124,5-152,6 мкг/мл у опытных кроликов. Захват одним нейтрофилом бактериальных клеток с 1,68 в контроле достигал 3,1; 3,7 и 4,1 микробных клеток во 2-й, 3-й и 4-й группах соответственно. Такая же картина наблюдалась при исследовании крови и после 6-месячного применения живых микроорганизмов. Фагоцитарная, бактерицидная и лизоцимная активность крови у кроликов, получавших препарат, существенно ($P < 0,01-0,001$) возрастала, что характеризует штамм *EcS* 5/98 как активный стимулятор иммунной системы животных.

Исследования мочи показали, что она имела соломенно-желтый цвет и характерный для грызунов запах, была прозрачной, с pH в пределах 7,0-9,0. В моче не было обнаружено примесей крови, желчных пигментов, сахара, нитратов и кетоновых тел, что свидетельствует о

Таблица 2. Лейкоцитарная формула и показатели неспецифической резистентности крови кроликов, получавших *E.coli* S5/98

Показатели	Продолжительность скармливания и группы животных							
	3-месячное				6-месячное			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Лейкоцитарная формула								
Псевдоэозинофилы:								
палочкоядерные	2	3	3	3	2	3	2	2
сегментоядерные	15	14	10	12	15	18	18	16
Базофилы	2	3	2	2	2	2	2	2
Эозинофилы	3	2	3	2	4	2	2	3
Лимфоциты	76	76	81	80	75	72	74	75
Моноциты	2	2	1	1	2	3	2	2
Показатели неспецифической резистентности								
Фагоцитарный индекс	1,68±0,03	3,1±0,15 ^г	3,7±0,02 ^г	4,1±0,06 ^г	1,6±0,02	4,6±0,26 ^г	3,8±0,1 ^г	5,9±0,03 ^г
Фагоцитарная активность, %	21,6±0,56	24,0±0,67 ^а	26,6±0,51 ^в	28,3±1,0 ^г	20,0±0,0	37,2±0,79 ^г	43,0±0,4 ^г	42,2±0,77 ^г
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	64,6±0,6	79,4±0,14 ^г	81,0±0,0 ^г	79,0±0,0 ^г	21,8±0,26	27,2±0,51 ^г	52,6±3,07 ^г	70,6±1,3 ^г
Лизоцим сыворотки крови, мкг/мл	107,9±0,3	124,5±0,2 ^г	152,6±0,2 ^г	149,6±0,21 ^г	79,0±0,2	82,6±0,4 ^в	94,2±0,54 ^г	96,3±0,73 ^в

нормальной функции мочевой системы как у контрольных, так и у получавших микробную культуру животных.

Продуктивность и качество мяса кроликов. На протяжении всего опыта кролики контрольной и опытных групп были клинически здоровыми, имели хороший аппетит, нормально росли и развивались. Существенной разницы в потреблении кормов между группами не было и ежедневно животные полностью поедали задаваемые корма: летом по 0,7-0,9 кг зеленой массы разнотравья, а весной, осенью и зимой по 130-140 г сена. Зерновые корма кролики съедали без остатков.

Взвешивание животных показало, что в первые два месяца применения препарата наблюдалось выраженное стимулирующее влияние на рост кроликов, которое ослаблялось на протяжении третьего месяца опыта. Тем не менее, прирост живой массы молодняка 2-й, 3-й и 4-й групп за первые 3 месяца наблюдений превосходил контроль на 6,5; 7,5 и 13,6% соответственно (табл.3). Однако при последующей даче штамма EcS 5/98 еще в течение 3 месяцев разница в приросте животных

Таблица 3. Прирост живой массы тела кроликов при скармливании штамм EcS 5/98.

Группы животных	Живая масса, г			%
	в начале опыта	в конце опыта	прирост за опыт	
Через три месяца скармливания препарата				
1	1170±13,3	2160±58,5	990±21,5	100,0
2	1165±31,8	2220±87,3	1055±54,5	106,5
3	1185±18,5	2250±61,6	1065±50,5	107,5
4	1180±16,4	2305±75,0	1125±61,6	113,6
Через шесть месяцев скармливания препарата				
1	1425±41,1	3080±49,3	1655±63,1	100,0
2	1400±41,0	3080±76,0	1680±66,0	101,5
3	1425±35,9	3080±50,3	1655±60,0	100,0
4	1480±46,2	3200±87,0	1720±59,1	103,9

разных групп нивелировалась и в конце опыта они имели практически одинаковую живую массу. По убойному выходу тушек существенных различий между группами не было и он варьировал в пределах 52,3-53,2% и 54,4-55,3% после 3- и 6-месячного применения препарата соответственно. Все тушки соответствовали I категории требований МРТУ – 18/104-65. Мышцы тушек были хорошо развиты, отложения жира отмечены на холке и паховой области в виде отдельных полос, остистые отростки не выступали. Мясо на срезе было упругим, светлым, слегка влажным. Почки и внутренние органы окружены жиром белого цвета. Задние окорочка хорошо развиты. Грудь, спина и поясничная части широкие с развитой мышечной тканью. Мясо не

имело никаких посторонних запахов. Обвалка тушек показала, что после 3-месячного применения штамма EcS 5/98 достоверных различий в выходе мышечной ткани и костей не было, но у кроликов опытных групп увеличивалось содержание жира в тушке и мясе задних окорочков (табл. 4). Эта тенденция сохранялась до конца опыта.

Таблица 4. Соотношение в тушках кроликов мышц, костей, жира и химический состав мяса задних окорочков

Показатели	Группы животных			
	1	2	3	4
После 3-месячного скармливания препарата				
Масса, г:				
тушки	<u>1030±8,1</u>	<u>1145±22,0</u>	<u>1235±5,0</u>	<u>1270±9,2</u>
	100	100	100	100
мышц	<u>810±18,0</u>	<u>890±20</u>	<u>950±2,0</u>	<u>970±41,0</u>
	78,6	77,7	77,0	76,4
костей	<u>190±2,0</u>	<u>195±5,0</u>	<u>210±0,0^г</u>	<u>190±2,1</u>
	18,5	17,0	17,0	15,0
жира	<u>30±2,0</u>	<u>60±5,0^б</u>	<u>75±2,6^г</u>	<u>110±2,3^г</u>
	2,9	5,3	6,0	8,6
Химический состав мяса, %:				
влага	74,2±0,12	74,3±0,15	74,0±0,13	74,7±0,13
сухое вещество	25,8±0,19	25,7±0,12	26,0±0,13	25,3±0,13
жир	6,1±0,13	7,0±0,20 ^б	8,0±0,55 ^а	6,47±0,5
зола	7,0±0,06	7,1±0,09	7,1±0,23	7,3±0,16
После 6-месячного скармливания препарата				
Масса, г:				
тушки	<u>1560±40,0</u>	<u>1590 ±47,2</u>	<u>1605±5,1</u>	<u>1610±22,6</u>
	100	100	100	100
мышц	<u>1200±11,3</u>	<u>1180±32,8</u>	<u>1255±17,1</u>	<u>1220±22,6</u>
	76,9	74,2	78,2	75,8
костей	<u>240±5,1</u>	<u>275±5,1^в</u>	<u>205±4,0^в</u>	<u>265±5,1^в</u>
	15,5	17,3	12,8	16,4
жира	<u>120±5,0</u>	<u>135±2,2^в</u>	<u>145±3,0^в</u>	<u>125±5,1</u>
	7,6	8,5	9,0	7,8
Химический состав мяса, %:				
влага	72,2±0,14	74,0±0,02	73,8±0,07	73,6±0,15
сухое вещество	27,8±0,15	26,0±0,02	26,2±0,07	26,4±0,15
жир	8,2±0,02	8,8±0,12 ^а	8,6±0,18	8,4±0,07
зола	4,8±0,07	5,26±0,04	5,3±0,04	5,3±0,08

Примечание: числитель – масса, г; знаменатель – процент от массы тушки.

Оценка способности штамма EcS 5/98 диссеминировать во внутренние органы и ткани показала, что после 3-месячного применения препарата в крови из сердца животных 1-й, 2-й и 3-й групп кишечная палочка не обнаруживалась, тогда как при посеве крови от кроликов 4-й группы она вырастала. Высеваемость эшерихий

из внутренних органов (печени, легких, почек) наблюдалась от животных как контрольной, так и опытных групп, у которых количество колоний кишечной палочки возрастало с увеличением дозы препарата. Однако в исследованиях, проведенных после 6-месячного применения штамма EcS 5/98, кишечная палочка из крови и паренхиматозных органов не выделялась, что, вероятно, объясняется интенсивной стимуляцией факторов неспецифической резистентности иммунной системы (табл. 2), предотвращающих диссеминацию эшерихий в органы и ткани.

Таким образом, мясо кроликов, получавших штамм EcS 5/98, отвечало требованиям, предъявляемым к свежему доброкачественному мясу, и практически не отличалось от мяса кроликов контрольной группы.

Патологоанатомические исследования. При послеубойном осмотре тушек и внутренних органов кроликов в них не было обнаружено видимых патологических изменений. Паренхиматозные органы и эндокринные железы были в основном обычных размеров, но несколько отличались по массе у кроликов, получавших микробный препарат (табл. 5). Так, у животных 2-й, 3-й и 4-й групп, которым задавали штамм EcS 5/98 в течение трех месяцев, наблюдалось увеличение массы надпочечников ($P<0,001$) и тимуса. При дальнейшей даче препарата еще в течение 3 месяцев надпочечники оставались увеличенными, возросла масса селезенки, но уменьшился вес печени ($P<0,001$) и тимуса ($P<0,01$).

Таблица 5. Масса внутренних органов у кроликов, получавших культуру EcS 5/98, г

Органы	Группы животных			
	1	2	3	4
После 3-месячного скормливания препарата				
Сердце	5,6±0,23	5,4±0,24	5,2±0,04	5,12±0,09
Легкие	9,43±0,27	9,6±0,40	12,1±0,30	11,8±0,13
Печень	63,9±1,90	63,2±4,52	58,8±0,53	72,9±1,8 ^a
Почки	11,8±0,20	12,3±0,50	12,6±0,31	12,5±0,32
Надпочечники	0,31±0,0	0,52±0,0 ^г	0,54±0,0 ^г	0,50±0,03 ^г
Селезенка	0,77±0,01	0,80±0,02	0,86±0,03	0,87±0,04
Тимус	3,70±0,44	4,63±0,34	5,31±0,13	5,03±0,42
После 6-месячного скормливания препарата				
Сердце	6,5±0,17	6,9±0,13	6,46±0,09	6,95±0,42
Легкие	12,3±0,17	12,1±0,38	14,0±0,59	14,6±0,02 ^г
Печень	94,3±2,5	67,7±2,3 ^г	70,85±1,0 ^г	68,7±3,1 ^г
Почки	14,9±0,8	12,85±0,06	15,0±0,05	15,4±0,06
Надпочечники	0,43±0,01	0,40±0,02	0,61±0,05 ^a	0,92±0,05 ^г
Селезенка	0,99±0,0	1,27±0,0 ^г	0,95±0,1	1,68±0,0 ^г
Тимус	7,7±0,12	7,21±0,5	5,5±0,21 ^b	5,39±0,17 ^b

Лимфоузлы грудной и брюшной полостей не были увеличены, на разрезе сероватого цвета без кровоизлияний. Серозные оболочки были гладкими и блестящими.

Легкие – упругие, трахея и бронхи – чистые, отека, абсцессов и кровоизлияний не было. Сердце не увеличено, перикард, эпикард и эндокард без инфильтратов и кровоизлияний.

Печень и селезенка имели острые края, паренхиму вишневого цвета, очагов некроза и абсцессов не было. Желчный пузырь был в норме. Почки обычных размеров без признаков воспаления и кровоизлияний.

Серозные оболочки желудка, тонкого и толстого отделов кишечника были гладкими и блестящими. Слизистые оболочки серовато-розовые, без геморрагий и очагов воспаления.

Заключение

Исследование хронической токсичности микроиногенного штамма *E. coli* S 5/98 (EcS 5/98) для кроликов показало, что его ежедневное применение в дозах $1,5-3,0 \times 10^8-10^{10}$ клеток/животное в течение 6 месяцев не сопровождалось какими-либо неблагоприятными отклонениями в функционировании у кроликов органов и систем. Основные морфологические параметры крови не выходили за пределы физиологической нормы, а показатели неспецифической резистентности существенно возрастали, что характеризует штамм EcS 5/98 как активный стимулятор иммунной системы животных. Установлено, что в первые 3 месяца применения бактерии штамма EcS 5/98 транслоцировались через слизистую оболочку кишечника и диссеминовали в паренхиматозные органы. Однако, после 6-месячной дачи препарата животным кишечная палочка из крови и органов не выделялась, что можно объяснить естественной санацией тканей и органов за счет интенсивной стимуляции иммунной системы. Применение препарата не повышало продуктивности животных, но увеличивало в мясе содержание жира. Патологических поражений органов и тканей не наблюдалось, что свидетельствует о безвредности штамма *E. coli* S5/98 для кроликов.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Калужской области (проект № 01-04-96027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова Н.А., Хмель И.А., Шегидевич Э.А., Евглевская Н.И., Горская Е.М., Курепина Н.Е. Профилактика колибактериоза телят штаммом-продуцентом микроина. Ветеринария, 1991, 1: 24-25.

2. Каврук Л.С., Кононенко А.Б., Бритова С.В. Направленное регулирование микробиоценоза в репродукторных помещениях свиноводческих ферм и неспецифическая профилактика бактериальных кишечных инфекций поросят. Экологич. проблемы патологии, фармакологии и терапии жив. Материалы Межд. координационного совещания, 19-23 мая 1997. Воронеж. 1997: 315-316.
3. Каврук Л.С., Светоч Э.А. Возможности и пути конструирования пробиотиков пролангированного действия для профилактики кишечных инфекций молодняка животных. Тез. докладов Всероссийской конф. с международным участием «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека». М. 1999: 61-62.
4. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения. В кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат. 1988: 230-239.
5. Доклад ВОЗ: Стратегия оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии. Женева. 1994.
6. Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Комкова Н.М., Полякова Л.Л. Исследование безвредности микроциногенного штамма *Escherichia coli* S 5/98 для лабораторных животных. Труды ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. Боровск, 2002, 41: 4-13.
7. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Минск.: Ураджай. 1986.
8. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г. и др. Клиническая и лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание. М.: Агропромиздат. 1985: 66-67.
9. Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии. ЖМЭИ. 1966, 4: 8-11
10. Емельяненко П.А. Методические указания по тестированию естественной резистентности телят. М.: 1980, 29с.
11. Ветеринарная лабораторная практика. М.: Изд-во «Сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов» 1963, 1: 529с.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МИКРОЦИНОГЕННОГО ШТАММА E. COLI B. 214/99

А.И. Манухина, О.Б. Брускова, Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева
Кабинет морфологических исследований, лаборатория биотехнологии
микроорганизмов пищеварительного тракта

Ежедневное скармливание 1 мл культуры E. coli B.214/99 с титром в пределах $1,5-3,0 \times 10^8$ и $1,5-3,0 \times 10^9$ мл в течение 3-х месяцев вызывает гипертрофию лимфатических органов, оказывает стимулирующее влияние на лимфатические узлы, паракортикальную зону, а также клеточные реакции (бласттрансформацию, повышение количества микроорганизмов и плазматических клеток разной степени дифференциации). Стократное увеличение дозы препарата приводит к нарушению иммунной системы, резкому снижению числа антигенпредставляющих клеток в лимфоидных органах, нарушению микроциркуляции в кишечнике, печени и почках.

Введение

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые используются в животноводстве для стимуляции роста и повышения устойчивости к стрессам. Нормально функционирующая резидентная микрофлора контролирует продукцию токсинов в кишечнике, предупреждая их избыточную выработку и попадание в кровоток (Бондаренко, Петровская, 1997; Бухарин, Вальшев, 1997).

В лаборатории биотехнологии микроорганизмов были выделены микроциногенные штаммы эшерихий, испытание которых на антогонизм показало, что они подавляют 69-100% эшерихий и 42,6-80,0% сальмонелл дикого типа, обитающих в кишечнике крупного рогатого скота, свиней, цыплят и кошек. Из этих данных следует, что выделенные штаммы являются перспективными для создания новых высокоэффективных пробиотиков и поэтому должны пройти испытания на безвредность.

Поэтому целью настоящей работы было изучить влияние микроциногенного штамма E. coli B.214/99 на иммунную систему кроликов. Изучение хронической токсичности штамма E.coli B.214/99 было проведено с целью выявления степени его повреждающего действия при длительном введении в организм возрастающих доз препарата на чувствительные органы и системы.

Материал и методы

Для проведения опыта из 2-месячных кроликов пород калифорнийская и советская шиншилла было сформировано четыре группы по 12 голов в каждой. Кроликов содержали в сетчатых клетках по 2 головы и они получали сбалансированный основной рацион (ОР), который в зимний период состоял из 200 г сена или овсяной соломы и 200 г ячменя или пшеницы. В летний период вместо сена давали зеленую массу из разнотравья. Рацион содержал (г): сухого вещества - 280, кормовых единиц - 200, обменной энергии - 19 МДж, сырого протеина - 33, переваримого протеина - 21, сырой клетчатки - 70, кальция - 14 и фосфора - 0,7.

Первая группа служила контролем. Животные 2-й группы дополнительно к ОР в смеси с зерном ежедневно получали 1 мл культуры *E. coli* B.214/99 с титром живых бактериальных клеток в количестве $1,5-3,0 \times 10^8$ /мл, а для скармливания животным 3-й и 4-й групп доза живых бактерий в 1 мл была увеличена до $1,5-3,0 \times 10^9$ /мл и $1,5-3,0 \times 10^{10}$ /мл, (т.е. 10- и 100-кратно) соответственно. Бактериальный препарат готовили в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП. Наблюдения за кроликами вели ежедневно. Учитывали общее состояние, поедаемость кормов, заболеваемость и падеж животных в каждой группе.

Для объективной оценки воздействия культуры *E. coli* B.214/99 на организм кроликов после 3-месячного его скармливания убивали по 3 животных из каждой группы.

Для морфологических исследований брали кусочки дна желудка, 12-перстной и слепой кишок, лимфоузлы, тимус, поджелудочную железу, кусочки печени, почек и селезенки. Отобранный материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, жидкости Карнуа и заливали в парафин. С помощью микротомы готовили срезы, окрашивали их по Акимченкову и гематоксин-эозином. Гистохимические показатели на гликозамингликаны, гликоген и белок определяли по Лилли и оценивали визуально по интенсивности окраски.

Результаты и обсуждение

Гистологические исследования показали, что в стенке 12-перстной кишки контрольных кроликов находились лимфоциты, их больше всего было в основании ворсинок (281 ± 15 на площади 880 мм^2) и несколько меньше возле крипт (191 ± 12). В эпителиальном слое тонкой кишки располагались малые лимфоциты. Здесь же встречались

бластны, число которых у основания ворсинок достигло 10-12%, а на их вершинах имелись единичные клетки. В слизистой оболочке и подслизистой основе тонкой кишки были расположены лимфоидные бляшки, которые представляют собой скопление диффузной лимфоидной ткани. Эпителий лимфоидной бляшки над лимфоидными узелками способен абсорбировать из просвета тонкой кишки интактные белковые молекулы (Панин и др. 1998).

В слепой кишке находилось большое число скученных лимфоидных узелков, окружающих со всех сторон просвет кишки. Эпителий был инфильтрирован лейкоцитами, состоящими в основном из средних лимфоцитов.

У подопытных кроликов 2-й и 3-ей групп отмечена заметная активация лимфоидного аппарата тонкой и толстой кишок. Так, в лимфоидных узелках на 35-40% было увеличено число плазматических клеток, главным образом за счет незрелых форм клеток, и на 40-50% было больше средних и больших лимфоцитов, а также митотически делящихся клеток. В узелках наблюдалась макрофагальная реакция (рис. 1).

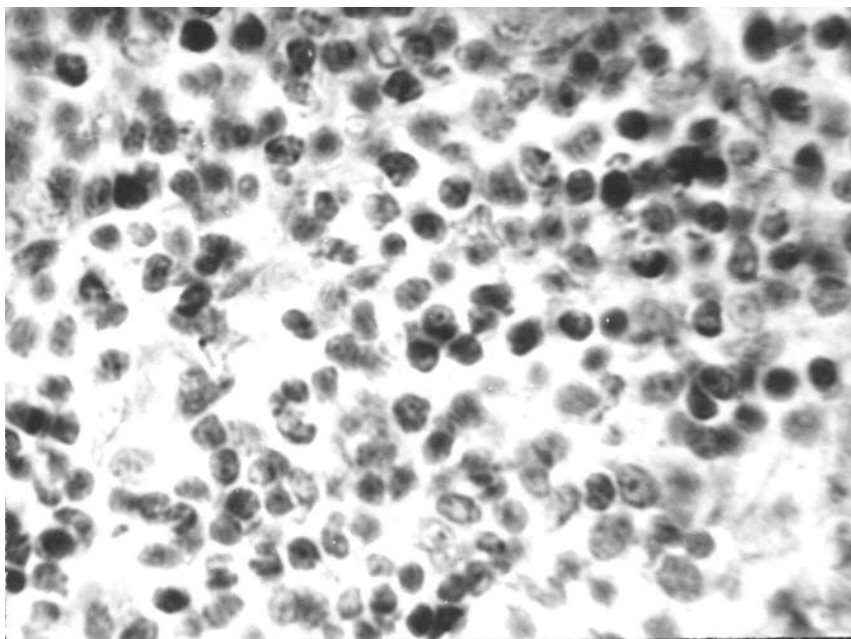


Рис. 1. Слепая кишка кролика 2-й группы. Увеличивается число средних и больших лимфоцитов, которые образуют цепочки клеток. Окраска азур-эозином. х400.

Наши данные согласуются с результатами, полученными Сорокуловой и др. (1977), которые обнаружили повышение розеткообразующих свойств лимфоцитов органа в ответ на введение кроликам антигенов в просвет кишечника. Введенный антиген разрушался в центрах размножения и в куполе лимфоидных узелков находящимися там макрофагами. Существует мнение (Петровская, Марко, 1976; Новиков и др., 1980; Хаитов, 1987; Стефани, Вельтишев, 1996), что возрастание содержания бластных форм и делящихся лимфоцитов свидетельствует о стимуляции иммунитета.

При использовании 100-кратной дозы препарата наблюдали уменьшение количества и величины центров размножения, иногда происходила атрофия лимфоидных узелков, но диффузная лимфоидная ткань сохранялась (рис 2).

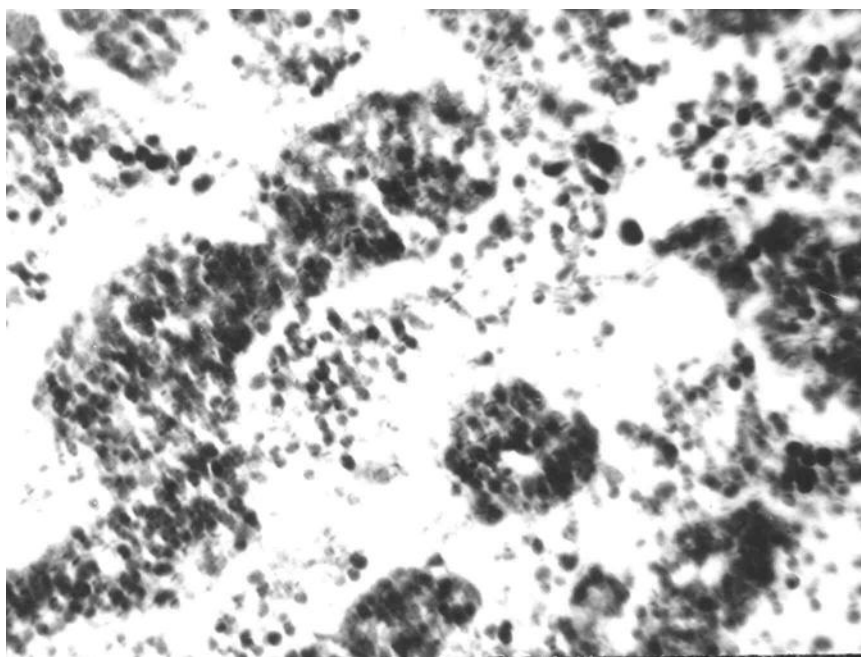


Рис. 2. Слепая кишка кролика 4-й группы. Атрофия лимфоидных узелков, имеется только небольшое число клеток диффузной лимфоидной ткани. Окраска азур-эозином. х400.

Характерной особенностью изменений в печени кроликов 2-й и 3-й групп являлось наличие большого числа гипертрофированных гепатоцитов с полиплоидными ядрами, большая насыщенность цитоплазмы органеллами, выраженность гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети, что указывает на повышенную способность

печени к синтезу белка. Большинство гепатоцитов содержали по 2 или 3 ядра с хорошо развитыми ядрышками, которые имели нуклеолонемный характер, свойственный для незрелых (бластных) форм клеток.

У кроликов контрольной группы внешнесекреторная часть поджелудочной железы состояла из крупных ацинозных клеток, в зимогенной зоне которых просматривались гранулы секрета. Количество панкреатических островков было несколько ниже, чем у животных подопытных групп.

Кролики, получавшие препарат в дозе $1,5-3,0 \times 10^8$ и $1,5-3,0 \times 10^9$ /мл превосходили молодняк контрольной и 4-й групп по количеству В-клеток в островной ткани, васкуляризации железы, размеру островков и их количеству, что свидетельствует о повышенной инсулярной активности железы. Внешнесекреторная часть поджелудочной железы у этих животных состояла из хорошо просматриваемых крупных ацинусов, которые отделялись прослойками соединительной ткани. В ацинозных клетках с гранулами секрета имелись крупные ядра с 1-2 ядрышками.

Клеточный состав тимуса подопытных кроликов отличался от контрольных. Наибольшие изменения касались клеток лимфоидного ряда. Содержание малых лимфоцитов было достоверно увеличено на протяжении всего срока наблюдения в коре и в мозговом веществе. Доля средних лимфоцитов менялась незначительно, число лимфобластов было увеличено у кроликов 2-й и 3-ей групп. Подобные изменения были отмечены и в содержании ретикулоэпителиальных клеток. Их количество составляло от $15,8 \pm 0,4$ до $20,6 \pm 0,5$ во 2-й и до $24,2 \pm 0,7$ % в 3-й группе. Число митозов было несколько выше у подопытных кроликов, получавших пробиотики в рекомендуемой и 10-кратной дозах. Доля дегенерированных клеток менялась незначительно. Характерной особенностью тимуса кроликов 2-й и 3-ей групп было увеличение числа кластеров, в которых лимфоциты образуют клоны клеток.

В мозговом слое тимуса кроликов контрольной группы были расположены многочисленные тельца Гассалья, которые представляют собой скопления продолговатых и веретенообразных клеток с крупным ядром и слабоацидофильной цитоплазмой. Сердцевина тельца была образована из нескольких первоначально набухших эпителиоретикулоцитов. Наблюдался постепенный распад внутренней части тельца и заселение лимфоцитами и эозинофильными лейкоцитами (рис 3). У кроликов 2-й и 3-ей групп число телец Гассалья было несколько выше, по сравнению с контрольными животными, что указывает на стимуляцию пробиотиком фагоцитарной функции тимических телец.

Многие исследователи склонны считать тимические тельца секреторными образованиями. Имеются данные о том, что эпителий тимических телец играет роль в иммунной функции тимуса. Показано, что эти тельца могут аккумулировать антиген. Вероятно, стимуляция антигенами может увеличивать число и размер телец. Существует также мнение, что тимические тельца выполняют фагоцитарную функцию, разрушая при помощи различных ферментов и элиминируя лимфоциты, относящиеся к аутоиммунным клонам (Новиков, Труфакин, 1980; Придыбайло, 1991; Карпуть, 1993).

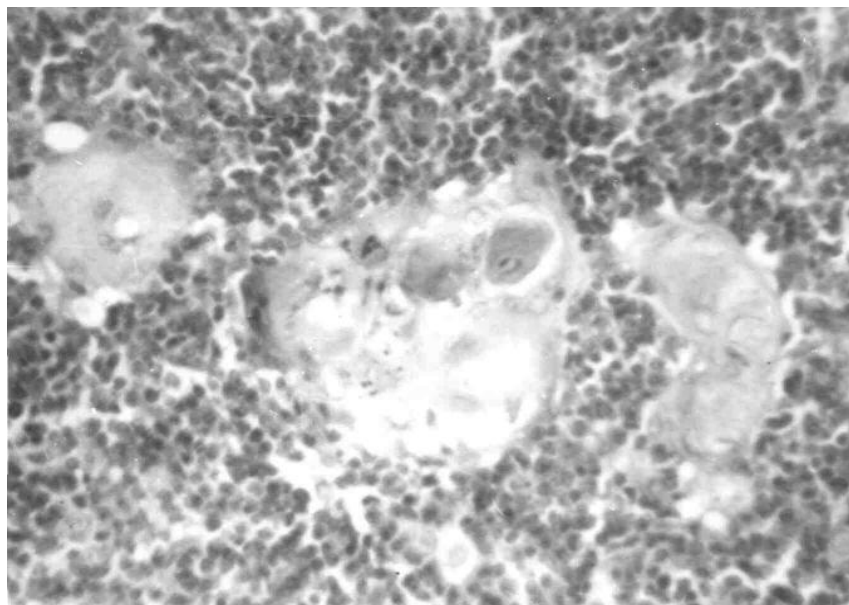


Рис. 3. Тимус кролика 3-ей группы. Тельца Гассалья состоят из продолговатых клеток с крупным ядром и слабо ацидофильной цитоплазмой. Окраска по Акимченкову. x400.

При добавлении в корм микроцинпродуцирующих штаммов бактерий в брыжеечных лимфоузлах кроликов 2 и 3-й групп выявлен комплекс морфологических изменений, свидетельствующих об усилении их иммунопозитивной функции, что подтверждается увеличением площади коркового вещества и количества лимфоидных узелков с герминативными центрами. Во всех структурах лимфатических узлов отмечена тенденция к увеличению числа молодых форм лимфоцитов и клеток с фигурами митозов.

При использовании пробиотика в рекомендуемой и 10-кратной дозах в лимфатических узлах кроликов увеличение площади В-зависимых зон происходило как за счет лимфоидных фолликулов, так и

за счет мозговых тяжей. Одновременно значительно возрастало относительное число лимфоидных фолликулов со светлыми центрами. Интенсивность пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов была значительно выше у 2-й и 3-ей групп животных. Увеличение площади структурно-функциональных зон лимфатических узлов под влиянием пробиотика сопровождалось функциональной напряженностью ультраструктур лимфоидных клеток.

В малодифференцированных клетках плазмацитопоза (плазмобласты и плазмциты) наблюдалось интенсивное развитие органелл, набухание митохондрий, просветление их матрикса, свидетельствующее о функциональной напряженности иммуноцитов. Практически во всех зонах выявлялось значительное количество плазматических клеток с сильно развитой эндоплазматической сетью и комплексом Гольджи. Увеличивалось число межклеточных коопераций макрофагов с лимфоцитами и плазматическими клетками (рис 4). Изложенное свидетельствует, что добавки микроциногенного штамма *E. coli* обусловили существенные иммуноморфологические перестройки всех структурно-функциональных зон лимфатических узлов.

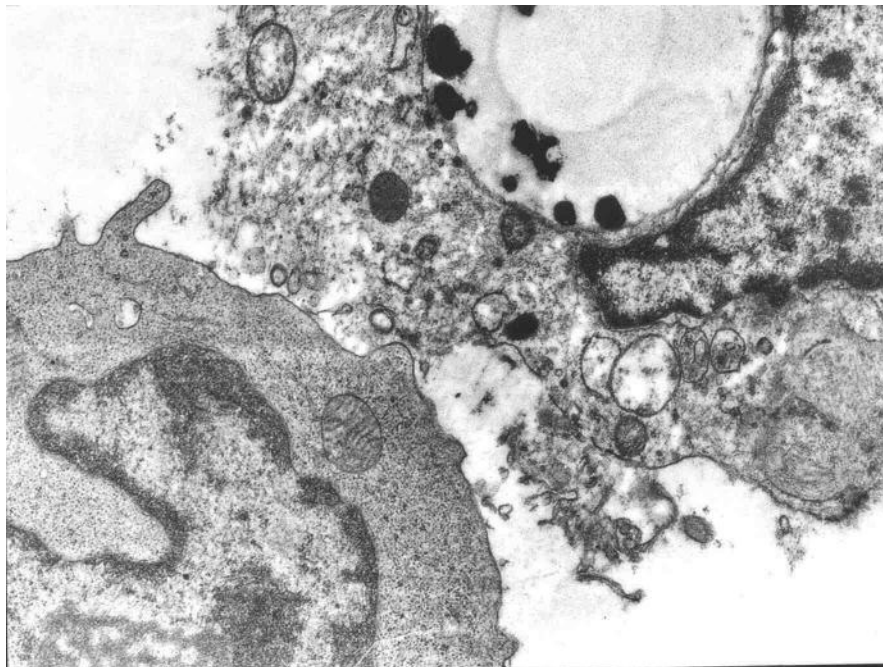


Рис. 4. Ультраструктура лимфатического узла кролика 3-ей группы. Межклеточная кооперация макрофага и плазмобласта. x15000.

Применение микроциногенного штамма вызывало перестройку в кооперации клеток во всех исследованных зонах селезенки. Было несколько увеличено общее число клеток, приходящихся на единицу площади в центре лимфоидных узелков, главным образом за счет увеличения доли средних лимфоцитов. Их доля была увеличена в 2 раза по сравнению с контролем, а число больших лимфоцитов на единицу площади в центре узелка в 9 раз, что следует рассматривать как повышение иммунной реактивности селезенки у подопытных кроликов, получавших рекомендуемую и 10-кратную дозы.

У кроликов, получавших 100-кратную дозу препарата было отмечено полнокровие красной пульпы селезенки и мозгового вещества тимуса, склеивание эритроцитов, размытость границ фолликулов, коркового и мозгового вещества вилочковой железы, что указывает на угнетение процессов лимфопоэза и нарушение иммунных реакций под влиянием высоких доз пробиотика

В селезенке было установлено выраженное уменьшение клеточности стромы, развитие «фиброадении» фолликулов с одновременной атрофией специфической паренхимы. Значительные изменения сосудистого русла и клеточного состава тимуса и селезенки сопровождались делимфатизацией Т – зависимых зон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В опытах на кроликах изучено влияние различных доз микроцинпродуцирующего штамма *E. coli* B.214/99 на организм животных. Установлено, что длительное использование пробиотика в дозе $1,5-3,0 \times 10^8-10^9$ /мл не оказывает отрицательного влияния на паренхиматозные органы и иммунную систему. Отмечено, что использование препарата в указанных дозах усиливает интенсивность пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов в лимфоидных органах, увеличивает число межклеточных коопераций макрофагов с лимфоцитами и плазматическими клетками.

Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием пробиотика активизируются практически все клетки иммунной системы. Активация антигенпредставляющих клеток приводит к усилению секреции цитокинов, что в свою очередь обеспечивает увеличение числа полиплоидных клеток в печени и островков Лангерганса в поджелудочной железе.

При использовании 100-кратной дозы препарата наблюдали уменьшение количества и величины центров размножения в лимфоидных узелках кишечника и брыжеечных лимфоузлах; в селезенке было установлено развитие «фиброадении» фолликулов с одновременной атрофией специфической паренхимы. В

паренхиматозных органах отмечено нарушение микроциркуляции. Указанные изменения свидетельствуют о нарушении иммунных процессов в организме кроликов, которые могут привести к заболеванию.

литература

1. Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры. *Вестн. АМН*, 1997, 3: 7-10.
2. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Факторы персистенции кишечной микрофлоры при дисбиозе. *Вестн. АМН*, 1997, 3: 19-22.
3. Карпуть И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка. Минск. Ураджай, 1993.
4. Новиков В.Д., Труфакин В.А. Органы тимо-лимфатической системы. Новосибир. Гос. Мед. и-т, 1980, 29с.
5. Панин А.Н., Малик Н.И., Малик Е.В. Иммунобиология и кишечная микрофлора. М. «Аграрная наука» ИК «Родник», 1998, 46 с.
6. Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. М. «Медицина», 1976.
7. Придыбайло Н.Д. Иммунодефициты у с.-х. животных и птиц, профилактика и лечение их иммуномодуляторами. М. «Урожай», 1991.
8. Сорокулова И.В., Белявская В.А., Вальшев А.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии. *Вестн. АМН*, 1997, 3: 46-49.
9. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е. Клиническая иммунология и иммунопатология детского возраста. М. «Медицина», 1996.
10. Хаитов Р.М. В-клеточная регуляция иммунной системы. *Иммунология*, 1987, 3: 10-13.

НОРМИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПИТАНИЯ МОЛОЧНОГО СКОТА

Е.Л. Харитонов, Л.В. Харитонов, Ю.В. Сироткина
Лаборатории пищеварения и белково-аминокислотного питания
Нижегородская сельхозакадемия

Представлены данные об основных этапах метаболизма аминокислот для использования их при расчете потребности и обеспеченности молочных коров в аминокислотах. Разработаны методические подходы к установлению доступности аминокислот различных кормов для всасывания из пищеварительного тракта. Показана практическая возможность и целесообразность нормирования

аминокислотного питания молочных коров на примере использования для этих целей коммерческого препарата защищенного метионина.

Введение

Разработки последних двух десятилетий в области создания новых систем питания высокопродуктивных коров были сосредоточены на проблемах протеинового питания. Для высокопродуктивных коров особую значимость имеют вопросы аминокислотного питания. При одинаковом содержании в рационе сырого и распадаемого протеина, молочная продуктивность и эффективность использования доступного белка будут зависеть от степени сбалансированности аминокислотного состава смеси, поступающей в кровь. Несбалансированность рационов по обменным незаменимым аминокислотам для высокопродуктивных молочных коров в настоящий момент является сдерживающим фактором в повышении молочной продуктивности и снижении себестоимости продукции. Постановка новой задачи по разработке систем питания, основанных на новых принципах оценки кормов и нормирования рационов для молочных коров по обеспеченности их субстратами и метаболитами, потребовала дополнительных данных о потребности в аминокислотах и расчете их количества, поступающего из кормов рациона.

Материал и методы

Исследования выполнены на коровах с канюлями рубца, 12-перстной кишки, канюлями на воротной вене, с выведенной сонной артерией в лодочку и датчиками кровотока на воротной вене и срамной артерии. Коров содержали на различных типовых рационах. Исследовали основные этапы превращения аминокислот в организме молочных коров: всасывание, поступление в кровь с эритроцитарной массой и в свободном виде, межклеточный обмен и использование в синтезе белков молока с целью оценки обеспеченности животных лимитирующими аминокислотами. Распадаемость протеина отдельных кормов в рубце определяли методом *in sacco* (Rulquin et al., 2000). Переваримость нераспавшегося протеина и освобождение отдельных аминокислот при гидролизе изучали методом мобильных мешочков (Voigt et al., 1985). Аминокислотный состав фракций белка определяли на аминокислотном анализаторе после предварительного гидролиза.

Результаты и обсуждение

Подходы к установлению потребности коров в незаменимых аминокислотах на основные функции. Попытки перенести подход к балансированию рационов по аминокислотам с моногастричных животных на жвачных не могут быть успешными из-за ряда превращений аминокислот в рубце (разная скорость распада, дезаминирование отдельных аминокислот до кетокислот и аммиака). Как видно из табл.3, скорость распада отдельных аминокислот на примере подсолнечного шрота может различаться в 3 раза (аргинин-2,0%/час и лизин 6,2%/час). В то же время при скорости распада метионина 3,5%/час дезаминирование аргинина происходит на 32,7% быстрее, чем метионина.

Потребность жвачных в протеине рассматривается как потребность в необходимом количестве и соотношении доступных для усвоения аминокислот. В связи с этим был проведен анализ распределения и эффективности использования каждой незаменимой аминокислоты на отложение в приросте, плоде, матке с околоплодными водами, на производство молока и теплопродукцию.

Анализ аминокислотного состава молока, полученного от коров разной продуктивности и в разные фазы лактации (раздой, середина и конец лактации) и различных пород (холмогорская и черно-пестрая) показал, что различия в составе носят недостоверный характер, и что при расчете потребностей следует пользоваться средними данными их аминокислотного состава (табл.1). Аминокислотный состав прироста также у коров в разные фазы лактации довольно постоянен.

Таблица 1. Аминокислотный состав белков тела и молока у коров, г/1000г

Аминокислоты	Прирост	Поддержание (масса ^{0,75})	Молоко
Лизин	10,8	0,21	2,6
Гистидин	3,7	0,08	1
Аргинин	9,6	0,15	1,3
Триптофан	1,5	0,02	0,5
Треонин	7,3	0,11	1,6
Цистин	1,9	0,03	0,5
Валин	7,6	0,12	2,2
Метионин	3,1	0,05	0,9
Изолейцин	6	0,09	2,5
Лейцин	10,6	0,16	3,5
Фенилаланин	5,8	0,09	2,2

Исследование аминокислотного состава плода и матки с оболочками и околоплодными водами у коров разных сроков

стельности показало, что с возрастом плода его аминокислотный состав меняется и, в связи с этим, потребности животного в отдельных аминокислотах в зависимости от стадии стельности могут изменяться. В результате обобщения данных, полученных в ранее проведенных исследованиях, и данных мировой литературы определены параметры отложения незаменимых аминокислот в плоде в связи со сроками стельности. Потребность коров в незаменимых аминокислотах должна устанавливаться с учетом молочной продуктивности, содержания белка в молоке, прироста в теле и стадии стельности.

Довольно просто установить чистую потребность в аминокислотах на молоко. Однако, положение значительно усложняется при определении потребности в доступных аминокислотах. Анализ поглощения аминокислот молочной железой на основе данных скорости кровотока и артерио-венозной разницы показывает, что только часть аминокислот поглощается в соответствующих количествах к выделяемому с молоком. Если принять обычный прием расчета эффективности использования как отношение выделенного к поглощенному, то для ряда аминокислот такой показатель будет значительно превышать 100%. Так, аспартат, глутамат и серин всегда поглощаются в значительно меньших количествах, чем выделяются в составе молока. В то же время глицин и аргинин, при всех кормовых ситуациях, поглощаются молочной железой в 2-3 раза больше, чем выделяются. Для ряда аминокислот установлена значительная вариабельность поглощения (57-300%) в зависимости от состава метаболитов крови. Наименьшая вариабельность (80-120%) установлена для фенилаланина, метионина и тирозина.

Ввиду того, что метаболизм аминокислот начинается в пищеварительном тракте и процессы распада протеина и микробного синтеза в рубце значительно изменяют количество и состав аминокислот, контроль за обеспеченностью ими следует начинать с учета их поступления из преджелудков или в кровь воротной вены и сопоставлять с выходом аминокислот с молоком.

Нами установлено, что основная часть свободных аминокислот поступает из кишечника с плазмой крови, а на долю эритроцитов и других клеток крови приходится от 3 до 6,1 г/час аминокислот или 8,3 и 21 % от суммы свободных аминокислот крови. По сравнению с аминокислотным составом химуса в крови воротной вены был более низкий процент аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, которые активно участвуют в превращениях в стенке кишечника (табл.2).

Таблица 2. Метаболизм аминокислот в стенке желудочно-кишечного тракта

<i>Аминокислоты</i>	<i>% от сумм во всасывающей смеси</i>	<i>% от сумм в поступившей ей смеси</i>	<i>% от сумм в метаболизированной смеси</i>	<i>Метаболизировалось в стенке в % от всосавшегося</i>
<i>Аспартам</i>	9,17	7,8	20,7	23,5
<i>Треонин</i>	6,6	6,7	5,6	8,9
<i>Серин</i>	5,7	6,2	1,3	2,3
<i>Глутамат</i>	15,4	12,7	39	26,3
<i>Пролин</i>	6,1	6,4	3,9	6,57
<i>Глицин</i>	12,4	13,6	2,7	2,2
<i>Аланин</i>	4,5	4,9	1,2	2,8
<i>Валин</i>	4,5	4,8	1,5	3,4
<i>Метионин</i>	2,4	2,6	0,8	3,6
<i>Изолейцин</i>	2,9	3,1	1,3	4,6
<i>Лейцин</i>	5,6	5,8	3,2	6,1

<i>Тирозин</i>	3,6	3,6	3,5	10,3
<i>Фенилаланин</i>	4,8	5,1	1,7	3,7
<i>Лизин</i>	6,7	6,8	5,9	9,2
<i>Гистидин</i>	3,4	3,5	2,7	8,4
<i>Аргинин</i>	5,7	5,9	4,5	8,2

Из отдельных аминокислот наиболее активно задерживались стенкой аспартат и глутамат, менее активно использовались аргинин, гистидин, лизин, тирозин, в результате чего в крови воротной вены отмечено снижение процентного их содержания. Для остальных аминокислот содержание во всасываемой смеси соответствовало концентрации в воротной вене.

Расчет обеспеченности аминокислотами из кормов рациона проводили на основе данных об их поступлении в кишечник и степени освобождения каждой аминокислоты из фракций протеина, поступающего в кишечник (бактериальный, протозойный и нераспавшийся кормовой протеин). Поступление аминокислот корма в кишечник рассчитывали на основе данных по аминокислотному составу фракций протеина кормов, скорости распада отдельных аминокислот из нерастворимой распадаемой фракции и скорости эвакуации кормовых частиц из преджелудков. Для расчета всасывания кормовых аминокислот определили зависимость их переваривания в тонком кишечнике от степени предварительного распада в преджелудках. Ранее нами такая зависимость (параболическая) установлена для протеина (Харитонов и др., 2000). Аналогичная зависимость наблюдается и для отдельных аминокислот (рис.1).

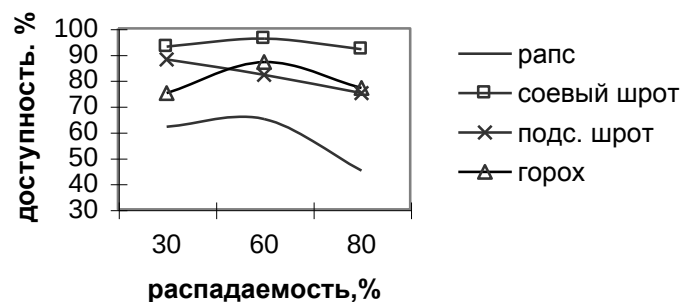


Рис. 1. Доступность валина для всасывания в кишечнике в зависимости от распадаемости.

Получены данные о фракционном составе протеина основных кормов, об аминокислотном составе основных фракций протеина ряда кормов и скорости распада каждой аминокислоты на примере подсолнечного шрота (табл.3). Применение такого подхода продиктовано тем, что предлагавшиеся до этого системы расчета поступления кормовых аминокислот в кишечник (Харитонов и др., 1999) исходили из данных о постоянстве состава нераспавшейся части протеина корма. Наши данные показали, что состав этой фракции может иметь значительные вариации в зависимости от сроков инкубации в рубце. При изменениях распадаемости протеина данного корма, связанных с влиянием рубцовой среды, будут наблюдаться вариации не только в валовом поступлении, но и в соотношении аминокислот (табл.4).

Таблица 3. Аминокислотный состав фракций белка подсолнечного шрота

Аминокислоты	Растворимый протеин			Нерастворимый распадаемый протеин				Недоступный протеин		
	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	Скорость расп. %/ч	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Аспарат	1,19	9,3	39,7	1,7	11,0	57,1	3,2	0,1	9,8	3,5
Треонин	0,57	4,4	41,3	0,75	4,8	53,6	3,1	0,07	3,9	5,6
Серин	0,85	6,6	47,2	0,9	5,7	50,0	2,5	0,05	5,5	3,1

Амино-кислоты	Растворимый протеин			Нерастворимый распадаемый протеин				Недоступный протеин		
	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	Скорость расп. %/ч	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва
Глутамат	3,26	25,5	50,1	3,11	9,9	47,7	2,4	0,15	14,7	2,3
Глицин	0,71	5,5	40,9	0,97	6,2	55,8	3,0	0,06	6,2	3,6
Аланин	0,96	7,5	48,8	0,97	6,2	49,0	2,4	0,05	4,9	2,6
Цистин	0,42	3,3	64,0	0,25	1,6	7,3	1,3	0,00	0,0	0,0
Валин	0,22	1,7	21,2	0,78	5,0	73,5	5,6	0,06	6,2	5,9
Метионин	0,21	1,6	33,4	0,34	2,1	54,3	3,5	0,07	7,6	12,4
Изолейцин	0,28	2,2	31,2	0,56	3,6	63,0	4,4	0,05	3,9	5,8
Лейцин	0,59	4,6	30,7	1,28	8,2	65,7	4,4	0,08	7,6	4,0
Тирозин	0,53	4,1	47,7	0,54	3,4	50,0	2,4	0,04	3,9	3,6
Фен.алан.	0,32	2,5	26,5	0,86	5,5	70,0	4,9	0,05	4,9	4,3
Лизин	0,23	1,8	20,5	0,80	5,1	71,4	6,1	0,09	8,8	8,6
Гистидин	0,40	3,1	42,8	0,50	3,2	52,6	2,8	0,05	4,9	5,7
Аргинин	1,97	15,4	59,0	1,30	8,3	40,0	2,0	0,06	6,5	2,5
Зам.ам-ты	7,97	–	47,2	8,46	–	50,2	2,5	0,46	–	2,7
Нез.ам-ты	4,79	–	37,9	7,17	–	56,8	4,0	0,65	–	5,1
Сумма	12,8	–	43,3	15,6	–	53,0	3,0	1,11	–	3,8
Амин. инд.	0,6			0,84				1,42		

В кишечнике незаменимые и заменимые аминокислоты перевариваются с одинаковой интенсивностью, но по мере возрастания степени их предварительного распада в рубце, переваримость незаменимых аминокислот снижается более выражено (из-за высокого содержания незаменимых аминокислот в недоступной части протеина). Эти данные могут быть использованы для расчета всасывания отдельных аминокислот из кишечника. Данных о переваривании протеина и среднем их аминокислотном составе недостаточно для этого, так как спектр переваренных аминокислот может значительно варьировать. Для основных белковых кормов требуется учитывать данные по аминокислотному составу его фракций, скорости распада отдельных аминокислот и зависимость переваривания их в кишечнике от степени распада в преджелудках. Зависимости представлены в виде функциональных уравнений и включены в компьютерную программу для оперативного расчета количества обменных аминокислот. В табл. 4 продемонстрировано применение зависимости переваримости от распадаемости при расчетах поступления протеина и аминокислот, всасывающихся из кишечника. На рационах, обуславливающих более низкую распадаемость СП в рубце, доступность протеина и аминокислот для всасывания в кишечнике увеличивается в 2 – 3 раза. В то же время видно, что горох и рапс даже при низкой распадаемости в

них протеина не служат существенными источниками в обеспечении протеином и аминокислотами организма жвачного животного. Если в данных условиях только 15% их СП может всосаться в кишечнике, то из соевого шрота более 50%. Таким образом, выявленная зависимость переваримости СП и аминокислот кормов от их распадаемости в преджелудках позволяет направленно оптимизировать рационы с учетом эффективного использования их протеиновой части и обоснованно проводить мероприятия по защите кормовых белков. Для более эффективного использования протеиновой части кормов рациона следует подбирать корма, которые на данном рационе будут обладать наивысшей переваримостью в кишечнике и обеспечивать максимальное поступление из пищеварительного тракта аминокислот, а не переваримого протеина, который состоит из аминокислот и аммиака в неопределенной пропорции.

Таблица 4. Доступность протеина и аминокислот (в %) для всасывания в кишечнике на рационах, обеспечивающих их низкую и высокую распадаемость

Доступность	Горох		Подс. шрот		Соевый шрот		Рапс	
	Распадаемость, %							
	выс.	низк.	выс.	низк.	выс.	низк.	выс.	низк.
	95	79	80	74	68	44	82	67
Незам. амин.	3,5	17,2	10,9	22,3	31,4	56,5	4,3	13,4
Замен. амин.	3,7	11,7	10,1	21,5	31,9	55,9	3,6	12,6
Сумма амин.	3,6	14,3	10,5	21,8	31,6	56,2	3,9	12,9
Протеин	3,1	16,2	13,1	17,7	29,6	51,4	3,1	15,0

Недостаточная проработка вопросов установления потребности в отдельных аминокислотах и расчетов удовлетворения этих потребностей кормами рациона часто приводят к неоднозначным результатам при их нормировании. Появление на рынке препаратов защищенных аминокислот, при недостаточно разработанных схемах расчета потребности в них и обеспеченности ими, не дают возможности оптимального их применения. Необходим точный расчет содержания доступных аминокислот в рационе и количества их в данном препарате. Применение разработанного нами способа расчета потребности и обеспечения этих потребностей кормами рациона, позволяет обоснованно подходить к подбору дополнительных количеств аминокислот. В то же время требуются объективные данные о доступности аминокислоты из данного препарата. Определение биодоступности ряда коммерческих препаратов защищенного метионина (Rulquin et al., 2000) показало, что у 6 препаратов

доступность составляла 75, 65, 0, 16, 0 и 30%, и только для 2 из них соответствовала регламенту производителей.

В настоящее время существуют два подхода к определению биодоступности аминокислот – по исчезновению аминокислоты из пищеварительного тракта (*in vivo*, *in sacco*) или по ее появлению в крови. Мы провели сравнение этих двух подходов. В первом случае доступность определяли на основе инкубации образцов препарата в рубце в нейлоновых мешочках и определения в дальнейшем переваримости в кишечнике методом мобильных мешочков. При этом доступность рассчитывали по формуле:

Доступность = $\frac{\text{послерубцовое переваривание} \cdot (100 - \text{рубцовое переваривание})}{100}$.

Во втором случае применяли метод, основанный на изменении концентрации в крови изучаемой аминокислоты при скармливании препарата и расчете поступления по калибровочной кривой концентрации аминокислоты при инфузии различных ее доз в тонкий кишечник. Исследования проведены на лактирующих коровах во второй фазе лактации при суточном удое 15-17 кг молока, содержащихся на сено-силосно-концентратных рационах.

Калибровочная кривая была линейна в диапазоне доз от 0 до 30 г метионина. (Поступившее количество Мет.) = $29,74(\pm 4,61) \cdot \text{Конц. Мет. (мг\%)} - 7,35(\pm 3,94)$; $R=0,988$

Расчет доступности в первом случае показал значение 79,2% (при 3% распадаемости в рубце и 81,7% переваримости в кишечнике), а во втором – 79,7%.

Практическое использование вышеописанных подходов определения потребности и удовлетворения этих потребностей рационом нами было апробировано в научно-хозяйственном опыте в условиях молочной фермы. Было сформировано 2 группы животных по 10-15 голов в группе в начале лактации методом парных аналогов. Рацион кормления коров в группах был сено-силосно-концентратный. Продолжительность опыта 110 дней. На основе расчетов потребности в метионине и его поступлении с кормами рациона и доступности из препарата были рассчитаны нормы ввода препарата в рацион дойных коров.

За 100 дней лактации (с 40-го по 140-й) молочная продуктивность в опытной группе коров с удоем 8 тыс. кг молока возросла на 6,1%, содержание белка в молоке на 4,1, а выход молочного белка на 10,5% (табл.5).

**Таблица 5. Молочная продуктивность коров за 100 дней лактации
(стадо с продуктивностью 8 тыс. кг молока)**

Показатели	Контроль	Опыт
Среднесуточный удой, кг	27,6±0,69	29,3±0,86*
Содержание жира, %	3,65±0,07	3,65±0,077
Содержание белка, %	3,13±0,05	3,26±0,042*
Суточная продукция молочного жира, г	1007±29,89	1071±60,59
Суточная продукция молочного белка, г	863,3±11,68	954,5±20,40*

Примечание: различия достоверны при значении $p < 0,05$ по методу парных сравнений

У коров с продуктивностью 6 тыс. кг молока продуктивность возросла в опытной группе на 5,2%, а содержание жира в молоке на 4,4% , при увеличении валового выхода жира на 9,8% (табл.6).

**Таблица 6. Молочная продуктивность коров за 100 дней лактации
(стадо с продуктивностью 6 тыс. кг молока)**

Показатели	Контроль	Опыт
Исходный удой, кг	25,2±0,93	25,0±0,84
Среднесуточный удой, кг	21,2±0,72	22,3±0,55**
Содержание жира, %	3,4±0,04	3,55±0,05
Суточная продукция молочного жира, г	720,8±6,68	791,6±5,84*

** - $P < 0,1$

При этом концентрация свободного метионина в крови коров опытной группы возросла на 34,3% после 60 дней скармливания препарата (табл.7).

Таблица 7. Концентрация свободных аминокислот крови (мг%)

Аминокислоты	Контроль	Опыт
1	2	3
Таурин	0,931±0,103	0,792±0,051
Аспартат	1,111±0,027	1,197±0,031
Треонин	0,381±0,025	0,304±0,025
Серин	0,216±0,036	0,176±0,02
Глутам. к-та	0,451±0,055	0,3925±0,046
Глутамин	0,407±0,114	0,47±0,084
Продолжение таблицы 7		
1	2	3
Глицин	0,678±0,114	0,557±0,113
Аланин	0,626±0,033	0,73±0,005
Цитруллин	0,237±0,024	0,244±0,001
Валин	0,706±0,033	0,717±0,007

Цистин	0,078±0,007	0,058±0,003
Метионин	0,192±0,022	0,258±0,034
Изолейцин	0,552±0,027	0,517±0,03
Лейцин	0,48±0,049	0,447±0,027
Тирозин	0,486±0,035	0,422±0,044
Фенилаланин	0,542±0,065	0,521±0,053
Орнитин	0,362±0,033	0,351±0,037
Лизин	0,385±0,006	0,417±0,013
Гистидин	0,714±0,085	0,636±0,057
Аргинин	0,54±0,06	0,579±0,07

Заключение.

Таким образом, на основе выполненных нами исследований разработан способ расчета потребности в незаменимых аминокислотах и обеспечения ими молочных коров кормами рациона. Показана практическая возможность оптимизации аминокислотного питания молочных коров на основе расчета потребности в обменных аминокислотах и балансирования их рационов с учетом доступности к всасыванию в пищеварительном тракте кормовых и синтетических аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аитова М.Д. Аминокислотная питательность кормов для жвачных животных и методы ее определения. Протеиновое питание и продуктивность жвачных животных. Сб.научн.тр. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1989, 36: 110-118.
2. Rulquin H., Kowalczyck J. A blood procedure to determine bioavailability of rumen-protected Met for ruminants. Joint annual meeting. Abstracts. July 24-28, Baltimore, 2000: 268.
3. Изучение пищеварения у жвачных животных. Методические указания. Боровск, 1987: 27с.
4. Voigt J., Piatkowsky B., Engelmann M., et. al. Measurement of the postruminal digestibility of crude protein by the bag technique in cows. Arch.fur Tierernahr., 1985, 35, 8: 555-562.
5. Харитонов Е.Л., Материкин А.М., Мысник Н.Д. Подходы к определению поступления аминокислот из пищеварительного тракта жвачных. Сб.научн. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2000, 39: 235-245.
6. Харитонов Е.Л., Материкин А.М., Мысник Н.Д. Переваривание протеина в кишечнике жвачных животных. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сб.научн. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1999, 38: 330-343.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОБМЕННОЙ ЭНЕРГИИ У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЦИОНОВ

*В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, В.П. Волобуев, Р.А. Волобуева,
В.П. Лазаренко*

Лаборатория энергетического питания

В исследованиях на лактирующих коровах проведено сопоставление двух подходов к оценке нормирования их питания по детализированным нормам и при дополнительной оценке питательности рационов по количеству и соотношению субстратов, доступных для усвоения. На основе нового подхода можно определить распределение субстратов на энергетические цели и биосинтез компонентов продукции.

Введение

Еще Денисовым Н.И. (1960) было отмечено, что самые разнообразные по структуре и по составу сырых питательных веществ рационы для лактирующих коров могут в конечном счете оказывать одинаковый продуктивный эффект. Это положение широко используется в практике кормления молочного скота, что гарантирует более полное и эффективное использование кормовых ресурсов.

Согласно современным представлениям, нормирование питательных веществ в рационах для лактирующих коров следует проводить по 24 показателям их потребности в энергии, питательных, минеральных веществах и витаминах. Однако для высокопродуктивных лактирующих коров необходимо при нормировании учитывать качественные характеристики кормов (концентрацию обменной энергии; содержание переваримого протеина на 1 ЭКЕ, г; сахаро-протеиновое отношение и др.), то есть чтобы прогнозировать получение потенциально возможной молочной продуктивности необходимо балансировать рационы по всему комплексу показателей.

К недостаткам детализированных норм кормления можно отнести ориентирование на максимальные нормы сырой клетчатки в рационах и минимальные нормы крахмала, что ограничивает выбор вариантов рационов, обеспечивающих плановую продуктивность. Кроме того, в детализированных нормах не предусматривается нормирование основных структурных углеводов: целлюлозы, гемицеллюлоз и пектинов.

Целью исследований являлось сопоставление двух способов нормирования кормления коров – непосредственно по детализированным нормам и на основе детализированных норм, но с учетом субстратной характеристики рационов.

В задачу исследований входила оценка питательности рационов по детализированным нормам и по количеству доступных для усвоения субстратов; определение энергетических затрат, продуктивного действия корма и эффективности использования обменной энергии при изменении соотношения доступных для усвоения субстратов.

Материал и методы

Для выполнения указанной задачи мы провели исследования на лактирующих коровах в период 55-125 дней лактации. Опыт проведен методом периодов. Основной рацион для коров состоял из сена, силоса и комбикорма. В I периоде (контроль) комбикорм был приготовлен на ячменной основе. Во II периоде в составе комбикорма 80 % ячменя было заменено кукурузой с той целью, чтобы снизить распадаемость крахмала в преджелудках. В III периоде в состав комбикорма на ячменной основе вводили кормовой жир в количестве 38 г на 1 кг комбикорма для того, чтобы повысить концентрацию обменной энергии в рационе. В IV периоде был использован низкоконцентратный, а в V – высококонцентратный типы рационов (табл. 1). Состав комбикорма а IV и V периодах был одинаковым с контролем. Кормление коров – трехкратное, равными долями. Рационы балансировали по детализированным нормам, однако крахмал и сахар нормировали суммарно.

Таблица 1. Состав комбикормов, % по массе

Ингредиенты	Периоды		
	I и IV	III	II
Ячмень	42,5	39,0	10,0
Кукуруза	-	-	32,5
Пшеница, отруби пшеничные	29,0	29,0	29,0
Шрот подсолнечный	25,0	25,0	25,0
Трикальцийфосфат	1,5	1,5	1,5
Жир кормовой	-	3,5	-
Соль поваренная	1,0	1,0	1,0
Премикс ПКК-60-1	1,0	1,0	1,0

Исследовали легочный газообмен и проводили балансовые опыты по методам, разработанным в лаборатории (Надальяк и др., 1986). Рассчитывали теплопродукцию тканевого метаболизма и количество субстратов, использованных в энергетическом обмене. В

балансовом опыте определяли показатели потребления валовой энергии корма, энергию переваримых питательных веществ, суммарную энергию в субстратах, доступных для усвоения, энергию продукции, теплопродукцию и обменную энергию.

Результаты и обсуждение

При замене в составе комбикорма ячменя кукурузой отмечена тенденция повышения потребления сухого вещества корма, а при использовании низкоконцентратного рациона – снижения на 2 % по сравнению с I периодом (контролем).

Уровень потребления сырого протеина коровами в I период составил 2053 г, в том числе распадаемого в рубце – 69,1 %; нераспадаемого – 30,9 %. При замене ячменя кукурузой уровень потребления сырого протеина снизился до 1870 г/сутки (на 8,9 %) при некотором повышении нераспадаемой фракции сырого протеина (на 2,8 %).

По уровню потребления сырой клетчатки коровами в I, II и III периодах опыта различий не было. При использовании низкоконцентратного рациона потребление сырой клетчатки коровами повысилось на 14,0 %, а при использовании концентратного рациона было ниже на 18,6 % по сравнению с I периодом. Аналогичные результаты установлены относительно потребления коровами целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина (табл. 2).

Таблица 2. Фактическое потребление коровами питательных веществ по периодам опыта

Корма, показатели питательности	Ед. измер.	Периоды опыта				
		I	II	III	IV	V
Сено зл.-боб.мн.тр	кг	5.8	5.8	5.8	7.2	4.4
Силос зл.мн.трав	кг	15.3	16.2	15.3	19.0	12.0
Комбикорм	кг	7.3	7.3	7.3	4.6	8.0
Итого	кг	28.4	29.3	28.4	30.8	24.4
* В рационах содержится:						
Обменная энергия	МДж	104.0	114.8	115.5	94.5	106.7
Сухое вещество	кг	15.9	16.2	15.9	15.6	14.4
Сырой протеин	г	2053	1870	2013	1787	2007
Распад.протеин	г	1418	1217	1417	1173	1403
Нераспад.протеин	г	635	653	596	614	604
Сырая клетчатка	г	4143	4165	4120	4723	3374
Целлюлоза	г	3423	3423	3402	3878	2802
Гемицеллюлозы	г	2916	3231	2893	3239	2425
Лигнин	г	1125	1167	1115	1229	946
Крахмал	г	2700	3000	2700	1650	2950

Сахар	г	470	480	470	480	430
Сырой жир	г	512	636	740	499	466
Сырая зола	г	1183	1165	1170	1173	1064

Примечание: минеральные и биологически активные вещества – до нормы

Потребление коровами крахмала было различным в I и II периодах опыта. Введение в состав комбикорма кукурузы повысило содержание крахмала в рационе и его потребление коровами на 11,11 %. В IV периоде его потребление было самым низким – 61,11 % по сравнению с I периодом. В V периоде его потребление было выше на 9,26 % по сравнению с первым.

Потребление сахара коровами по всем периодам опыта было примерно одинаковым, а потребление сырого жира возросло у коров во II и III периодах опыта по сравнению с первым на 12,42 % и на 44,53 %, соответственно.

При подсчете хозяйственной эффективности использования обменной энергии на молоко установлены стабильные результаты на фоне значительных различий в биохимической эффективности синтеза молока (табл.3).

Таблица 3. *Использование обменной энергии на молоко у коров*

Периоды опыта	Энергия суточного удоя, МДж/сут	Обменная энергия рациона, МДж/сут	Эффективность использования ОЭ на молоко	
			биохимическая, %	хозяйственная, % от ОЭ
I	41.5±0.1	104.0±1.5	64.8	39.9
II	46.0±1.8	114.8±2.4	62.3	40.1
III	46.6±1.7	115.5±1.4	62.6	40.4
IV	39.4±3.4	94.5±2.8	68.5	41.7
V	43.5±1.6	106.7±1.5	64.3	40.8

Как уже указывалось выше, исследования на коровах проводили с 55 по 125 дни лактации, когда уже закончился период, связанный с мобилизацией резервированной энергии на образование молока, а возможность отложения энергии в приросте была незначительной. В этот период у лактирующих коров обеспечиваются в основном две функции: поддержание физиологических функций и образование компонентов молока, а обменная энергия представлена двумя показателями: теплопродукцией и энергией суточного удоя (табл.4). Хотя приведенный баланс относится к другой группе коров, но рацион соответствовал по уровню кормления, по составу и продуктивному действию. Обменная энергия на 98 % представлена

теплопродукцией и энергией в удое. Эффективность использования обменной энергии на молоко составляла 41,9 %. Аналогичная эффективность отмечена в IV периоде опыта.

Таблица 4. Баланс энергии у коров, МДж/сутки

Показатели	Значения баланса
Валовая энергия корма	241,7±0,1
Содержание энергии в кале	99,1±4,5
Энергия переваримых питат. веществ	142,6±4,5
Энергия метана и теплота ферментации	28,9±4,5
Энергия субстратов, доступных для усвоения	113,8±3,9
Содержание энергии в моче	8,0±0,1
Обменная энергия	105,8±3,8
Энергия удоя	44,3±0,6
Теплопродукция	59,4±0,9
Энергия в приросте	+2,1

На примере балансового опыта, проведенного в указанный период лактации, можно сделать вывод о возможности использования расчетного способа определения величин обменной энергии у коров как суммы теплопродукции и энергии суточного удоя, что и было сделано во всех пяти периодах проведенного опыта.

Принципиальной характеристикой качества молока является содержание энергии в единице продукции (табл.5).

Таблица 5. Влияние балансирования рационов на калорийность 1 кг молока

Периоды опыта	Суточный удой, кг	Калорийность суточного удоя, МДж	% от первого периода	Калорийность 1 кг молока, МДж	% от первого периода
I	15,0±0,1	41,5±0,1	100,00	2,767	100,00
II	16,1±0,4	46,0±1,8	110,84	2,857	103,25
III	16,1±0,2	46,6±1,7	112,29	2,894	104,59
IV	13,7±1,4	39,4±3,4	94,94	2,876	103,94
V	15.80.5	43.51.6	104,82	2,753	99,49

Наиболее существенные изменения в калорийности молока наблюдали при замене в составе комбикорма ячменя кукурузой и при введении в состав основного комбикорма кормового жира. В обоих случаях отмечено одновременное повышение уровня молочной продуктивности. В IV периоде калорийность 1 кг молока повысилась на фоне снижения общего уровня молочной продуктивности у коров. В V периоде при увеличении доли комбикорма (на ячменной основе) и

снижении количества сена и силоса в рационе наблюдалась тенденция снижения калорийности 1 кг молока на фоне незначительного повышения молочной продуктивности по сравнению с I периодом, принятым в качестве контроля (табл.5). В существующих детализированных нормах кормления молочных коров для достижения планируемой продуктивности рекомендуется один (оптимальный) вариант по содержанию энергии и питательных веществ в рационе. В наших исследованиях апробированы пять вариантов рационов для коров, где сопоставляли четыре одинаковых уровня кормления по обменной энергии, сырому протеину, минеральным и биологически активным веществам, но при изменении качества крахмала в составе комбикорма (II период); количества сырого жира (III период); структуры рационов (V период). В IV периоде был понижен уровень энергетического и протеинового питания и повышен уровень структурных углеводов за счет изменения структуры рациона (табл. 2).

При кормлении коров во второй фазе лактации возможным является поддержание уровня молочной продуктивности. Поэтому увеличение в рационе коров (в четвертом периоде) доли сена и силоса на 24 %, при одновременном снижении доли зерновых концентратов на 37 % оказалось преждевременным и привело к снижению уровня молочной продуктивности на 9 % по сравнению с исходным уровнем. Перевод коров в последующем V периоде на концентратный тип рациона лишь частично компенсировал уровень молочной продуктивности по сравнению с максимально достигнутым во II и III периодах опыта. Эти изменения качества крахмала, количества жира, структуры (по сравнению с вариантом по детализированным нормам) указывают на имеющиеся возможности оптимизации рационов.

Затраты обменной энергии на 1 кг молока в I периоде опыта составляли 4,267 МДж, в том числе содержалось в молоке 2,767 МДж, а затраты на синтез молока – 1500 МДж. При повышении уровня молочной продуктивности (II и III периоды опыта) возрастали и затраты на синтез молока (табл.6). Следовательно, возможности дальнейшего

Таблица 6. Использование обменной энергии на молокообразование

Периоды опыта	Содержало энергии в 1 кг молока, МДж	Затраты на синтез 1 кг молока		Потребность в ОЭ на 1 кг молока	
		МДж	% к контролю	МДж	% к контролю
I	2.767	1.500	100.0	4.267	100.0

II	2.857	1.727	115.1	4.584	107.4
III	2.894	1.681	112.1	4.575	107.2
IV	2.876	1.321	88.1	4.197	98.4
V	2.753	1.532	102.1	4.285	100.4

повышения молочной продуктивности за счет снижения затрат на синтез компонентов молока не существует, ввиду высокой сопряженности этих процессов.

В результате ранее проведенных исследований было установлено, что наиболее объективными показателями при оценке питательности рационов являются доступные для усвоения субстраты, которые образуются из питательных веществ корма в процессе пищеварения в сложном желудке и в кишечнике (Агафонов, 1995; 1998; 1999; 2000). На первом этапе определения питательности проводится количественная оценка образования ЛЖК в преджелудках и определение соотношения в основном ацетата, пропионата и бутирата. Кроме того, количественно определяются субстраты, усвоенные в тонком кишечнике, а именно сумма аминокислот, сумма высших жирных кислот и глюкоза (табл.7).

Таблица 7. Субстратная характеристика рационов

Субстраты	I период		II период		III период		IV период		V период	
	г	%	г	%	г	%	г	%	г	%
Ацетат	3141	100	2849	90.7	3076	97.9	3061	97.5	3013	95.9
Пропионат	648	100	726	112.0	748	115.4	880	135.8	801	123.6
Бутират	563	100	609	108.2	548	97.3	416	73.9	480	85.3
Сумма аминокислот	1238	100	1138	91.9	1210	97.7	1087	87.8	1209	97.7
Сумма высших жирных к-т	400	100	496	124.0	577	144.3	389	97.3	365	91.3
Глюкоза	178	100	524	294.4	283	159.0	238	133.7	240	134.8

Основной рацион характеризовался высоким уровнем образования ацетата и бутирата, высоким содержанием доступных для усвоения аминокислот, низким уровнем образования пропионата в рубце, глюкозы в тонком кишечнике, и низким уровнем доступных для усвоения высших жирных кислот. В целом, рацион соответствовал по сырым питательным веществам детализированным нормам. Однако, анализ его субстратного состава указывает на несбалансированность по легкоусвояемым углеводам, из которых преимущественно образуются пропионат и глюкоза (табл.7).

При замене ячменя на кукурузу в составе комбикорма увеличилось образование пропионата на 12,0 % и глюкозы – в 2,94 раза по сравнению с основным рационом, что сопровождалось

повышением молочной продуктивности у коров при одновременном увеличении калорийности 1 кг молока (табл. 6 и 7).

Рацион коров в III периоде опыта содержал больше высших жирных кислот, доступных для усвоения (на 44,3 %) по сравнению с рационом I периода; образование пропионата в преджелудках было также выше на 15,4 % (табл.7).

Низкоконцентратный рацион характеризовался более низким выходом аминокислот (на 12,2 %) по сравнению с I периодом опыта. Кроме того, в преджелудках меньше образовывалось пропионата (на 10,5 %) и бутирата (на 26,1 %). Это количество субстратов не обеспечивало ранее достигнутого уровня молочной продуктивности у коров (табл.5 и 7).

В V периоде опыта была изменена структура рациона за счет снижения доли сена и силоса и повышения доли комбикорма при сохранении общего уровня кормления по обменной энергии. Однако, уровень доступных для усвоения аминокислот был выше, чем в IV периоде (на 11,2 %), а по образованию пропионата – на 38,1 % и по сравнению с I периодом – на 36,1 %. При таком соотношении доступных для усвоения субстратов молочная продуктивность коров возросла на 4,8 % по сравнению с первым периодом и на 10,4 % по сравнению с IV периодом (табл.7).

Таким образом, на фоне общего повышения уровня кормления на 10,7 и 11,7 МДж обменной энергии за счет крахмала или кормового жира, при одинаковом уровне аминокислотного питания (II и III периоды по сравнению с I периодом опыта), повышение уровня молочной продуктивности составляло 10,8 % и 12,3 % по сравнению с I периодом опыта. При одинаковом уровне обменной энергии в рационах (V период) повышение уровня молочной продуктивности связано с более высоким содержанием доступных для усвоения аминокислот и пропионата, как основного предшественника глюкозы у жвачных. В IV периоде рацион коров не обеспечивал в оптимальном количестве аминокислотами и источниками глюкозы, хотя обеспеченность энергетическими субстратами была такой же, как в V и I периодах (табл.7).

Обеспеченность субстратами энергетического обмена зависит от многих факторов, из которых наибольший интерес представляет структура первичного фонда субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте из питательных веществ корма. Выше были описаны пять вариантов рационов, различающихся по уровню энергетического, протеинового, углеводного и липидного питания, обуславливающих различия в количестве и соотношении пластических и энергетических субстратов (табл.2, 7). Можно предположить, что использование субстратов в энергетическом обмене будет зависеть от состава фонда субстратов, образующихся из питательных веществ корма.

Достоверные сведения по использованию субстратов в энергетическом обмене в наших исследованиях были получены методами анализа теплопродукции тканевого метаболизма у коров. По дыхательному коэффициенту (отношение объемов выделенной углекислоты к потребленному кислороду) можно определить основные группы субстратов, вовлеченных в энергетический обмен: при окислении глюкозы и ацетата дыхательный коэффициент равен 1,0; при окислении высших жирных кислот – 0,7; при окислении аминокислот – 0,85. Используя данную шкалу, можно определить процент вклада и количество основных субстратов, использованных в энергетическом обмене (табл. 8).

Таблица 8. Использование субстратов в энергетическом обмене у коров

Теплопро- дукция (ТП), МДж	Дыхательный коэффициент	Ацетат и глюкоза		ВЖК и кетонные тела		Азотсодержа- щие в-ва	
		г	% от ТП	г	% от ТП	г	% от ТП
Основной рацион (комбикорм на ячменной основе)							
62.0±1.1	0.906±0.002	2423	58	416	26	575	16
Основной рацион (комбикорм на кукурузной основе)							
68.8±2.9	0.890±0.011	2593	56	565	32	490	12
Основной рацион (комбикорм на ячменной основе+жир кормовой)							
68.9±1.2	0.827±0.021	1917	42	794	45	550	13
Низкоконцентратный рацион (комбикорм на ячменной основе)							
55.1±2.6	0.921±0.006	2349	64	316	22	470	14
Высококонцентратный рацион (комбикорм на ячменной основе)							
63.2±1.5	0.859±0.010	1946	46	632	39	560	15

Установлены значительные колебания дыхательного коэффициента у коров в связи с изменением уровня кормления, состава комбикорма, концентрации обменной энергии в рационах. При замене в составе комбикорма ячменной дерти на кукурузную дыхательный коэффициент у коров снизился с 0,906±0,002 до 0,890±0,011, что указывает на тенденцию повышения использования высших жирных кислот в энергетическом обмене (с 416 г в I периоде до 565 г/сутки – во втором периоде). Еще более значительное и достоверное ($P<0,05$) снижение дыхательного коэффициента отмечено у коров в III периоде, при введении в состав комбикорма кормового жира в количестве 177 г на голову в сутки (до 0,827±0,021).

Низкий уровень кормления при избытке сена и силоса в рационе приводил к достоверному повышению дыхательного коэффициента у коров (до 0,921) по сравнению с использованием высококонцентратного рациона ($P<0,05$). Эти показатели

соответствуют различиям в соотношении энергетических и пластических субстратов в рационах различной структуры (табл.7)

Азотсодержащие вещества используются в энергетическом обмене у лактирующих коров в значительных количествах. Возможность снижения включения их в энергетический обмен наблюдалась при введении кормового жира в состав комбикорма и при замене в составе комбикорма ячменной дерти на кукурузную (табл. 8).

Заключение

В проведенных исследованиях апробированы различные варианты оптимизации рационов для коров на основе количества и соотношения субстратов, доступных для усвоения и необходимых для обеспечения энергетических процессов и для биосинтеза компонентов продукции. Такой подход превосходит существующие методы оценки питательности рационов на основе химического состава кормов и расчета питательных веществ и энергии в рационе. Аналогичные разработки проводятся в США, Норвегии, Дании, Швеции и других странах (ARC, 1988; Ludden, 1997; Matthi et al., 2000).

Использование субстратов в энергетическом обмене сопровождается альтернативным лимитированием биосинтеза компонентов молока и прироста массы. Прямое использование в энергетическом обмене ацетата, а в некоторых случаях поступающих из рациона высших жирных кислот, сопровождается повышением эффективности использования обменной энергии на прирост (Агафонов, 1995-2001).

По сравнению с использованием стандартного рациона, в котором комбикорм был приготовлен на ячменной основе, практическое значение имеют три испытанных варианта повышения продуктивного эффекта: увеличение в рационе количества концентратов; снижение деградируемости крахмала в преджелудках; увеличение концентрации обменной энергии путем введения в состав комбикорма кормового жира или зерновых компонентов с более высокой концентрацией обменной энергии, чем в ячмене.

Эффективность высокого уровня кормления изучена достаточно подробно. Здесь данный прием рассматривается с точки зрения уменьшения деградируемости углеводов рациона в преджелудках за счет повышения скорости прохождения частиц корма из преджелудков в сычуг и тонкий отдел кишечника, где часть крахмала может непосредственно перевариваться до моносахаридов в доступные для усвоения субстраты, чем повышается на 25 % эффективность трансформации крахмала по сравнению с рубцовым пищеварением, где конечными продуктами являются ЛЖК (Ерсков, 1985; Курилов и др., 1971; Медведев, 1983, 1995; Надаляк и др., 1986; Овчаренко, 1991;

Решетов, 1987). При этом увеличивается поступление глюкозы в кровь, повышается обеспеченность синтеза лактозы и энергетического обмена у коров.

Теоретическая часть исследований связана с обоснованием зависимости эффективности использования обменной энергии от энергетического вклада основных субстратов, ее составляющих. В исследованиях последних лет подтверждается возможность повышения эффективности использования обменной энергии на синтез молока при дополнительном, сверх рациона, поступлении в тонкий кишечник смеси высших жирных кислот. Однако, скармливание кормового жира в составе рациона хотя и повышает молочную продуктивность, но одновременно приводит к повышению теплопродукции, в результате чего эффективность использования обменной энергии на молоко снижается. Аналогичные механизмы повышения молочной продуктивности у коров были отмечены при включении в состав комбикорма кукурузы и при использовании высококонцентратных рационов.

При дополнительном к рациону введении в рубец ацетата происходит значительное увеличение доли ацетата и в теплопродукции. Противоположная направленность в энергетическом обмене установлена при введении в рацион кормового жира. Отмечается преимущественное (до 45 %) использование на энергетические цели высших жирных кислот и ограничение (до 31 %) вклада ацетата в теплопродукцию, что можно отнести к субстратной регуляции энергетического обмена у жвачных (Агафонов, 1997-2001).

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В.И. Нормирование энергии у жвачных животных по принципу субстратной обеспеченности метаболизма. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Докл. 2-й Межд.конф. 5-8 сент.1995 г., Боровск, 1995: 36-44.
2. Агафонов В.И. Изучение обеспеченности животных энергией. В сб.: Методы исследований питания с.-х. жив. Боровск, 1998: 337-341.
3. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Обеспеченность субстратами энергетических процессов у коров при различных уровнях кормления и продуктивности. Сб.научн.тр. ВНИИФБиП, Боровск, 1999, 38: 375-384.
4. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Особенности использования энергии корма у коров в начальный период лактации. Сб.научн.тр.ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 2000, 39: 123-134.
5. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Совершенствование системы энергетического питания молочного скота. Сб.научн.тр. ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 2001, 40:

6. Ерсков Э.Р. Протеиновое питание жвачных животных, М.:Агропромиздат, 1985: 183 с.
7. Курилов Н.В., Кроткова А.П. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М.:Колос, 1971: 430 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия . М.:Высшая школа, 1980: 293 с.
9. Ленинджер А. Биохимия. М.:Мир, 1974: 546 с.
10. Медведев И.К. Физиологические предпосылки рационального кормления высокопродуктивных коров. Вестник с.-х. науки, 1983, 1: 78-85
11. Медведев И.К. Проблемы формирования высокой продуктивности животных. Зоотехния, 1995, 4: 25-30.
12. Надаляк Е.А., Агафонов В.И., Решетов В.Б. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Методические указания, Боровск, 1986: 58 с.
13. Овчаренко Э.В. Физиологические основы питания и молокообразования у коров в ранний период лактации в связи с уровнем и качеством энергии и протеина в рационе. Автореф.дис... д.б.н, Боровск, 1991: 48 с.
14. Решетов В.Б. Потребность молочных коров в энергии. Сб.научн.тр.ВНИИФБиП с.-х. животных, 1987, 34: 9-17.
15. ARC. Energy allowances and feeding system for ruminants. Reference Book 433. –London, 1988: 78 p.
16. Ludden P.A. and Kerley M.S. Amino Acid and Energy Interrelationships in Growing Beef Steers. 1. The Effect of Level of Feed Intake on Ruminant Characteristics and Intestinal Amino Acid Flows. J.Anim.Sci. 1997. 75:2550-2560.
17. Matthi A., Libzien P., Flachowsky E. Zur Bedeutung von Bypass-Starke für die Glykoseversorgung von hochleistenden Milchkuhen. Übersichten zur Tierernährung, 2000.-28 Jg -1.-S.1-64.

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЗАТРАТЫ ПРИ БИОСИНТЕЗЕ
КОМПОНЕНТОВ МОЛОКА И АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ
ЗАВИСИМОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
МОЛОКООБРАЗОВАНИЯ ОТ СПЕКТРА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ**

В.Б. Решетов, В.И. Агафонов
Лаборатория энергетического питания

На основе стехиометрии и термохимических характеристик реакций биосинтеза вычислены затраты энергии на конечных этапах биосинтеза важнейших компонентов молока (лактозы, белка и жира). Показано, что затраты энергии при биосинтезе жирных кислот триглицеридов молока зависят от спектра использованных предшественников. Высказано предположение, что снижение энергетической эффективности синтеза компонентов молока с ростом молочной продуктивности объясняется аналогичными механизмами.

Возможно, при этом возрастают и энергетические затраты на поддержание гомеостаза.

Введение

Для совершенствования систем питания и разработки способов влияния на процессы биосинтеза в организме лактирующих коров необходимо расширение знаний о метаболических потоках на уровне всего организма и важнейших органов и тканей, особенно молочной железы. В частности, это касается субстратного и энергетического обеспечения процессов биосинтеза и механизмов распределения и использования субстратов в организме.

Вероятно, что для повышения эффективности использования корма, особенно при высокой продуктивности животного, целесообразно обеспечивать организм веществами, требующими меньших затрат на их трансформацию в процессе использования. Соответственно, при этом возможно снижение затрат энергии – доминирующего по дефицитности компонента при кормлении высокопродуктивных коров. Одновременно имеет значение и снижение затрат на поддержание гомеостаза. Учитывая большой объем использования коровами питательных веществ, эти затраты могут быть весьма существенными.

В описываемых исследованиях ставилась цель определить величину затрат энергии в молочной железе на конечных этапах биосинтеза продукции на фоне общих затрат энергии в организме. Для этого на основе стехиометрии реакций биосинтеза важнейших по массе и содержанию энергии веществ молока – жира, белка и лактозы – нужно было провести теоретически предполагаемое расчетное определение потребности в АТФ для биосинтеза конкретного количества продукции и теплообразования при синтезе АТФ и ее использовании. Итоговая величина, очевидно, будет несколько ниже фактических общих затрат энергии в молочной железе (теплообразования), так как расчет затрат АТФ касается лишь конечных стадий биосинтеза веществ продукции.

С использованием этой исходной теоретической базы, на примере ацетата прослежена судьба конкретного метаболита от всасывания из пищеварительного тракта до поглощения молочной железой из крови и использования для синтеза жирных кислот жира молока и генерации АТФ и тепла в клетках молочной железы. Последний аспект работы выполнен с использованием результатов расчета образования и расхода основных (по массе и валовому содержанию энергии) субстратов на энергетические нужды всего организма. Методика этого расчета разработана В. И. Агафоновым и достаточно подробно изложена в отчетах лаборатории энергетического

питания ВНИИФБиП с.-х. животных и работах аспирантов лаборатории (В.П. Лазаренко и А.Б. Чугреев).

Материал и методы

Опыты проведены совместно с лабораториями физиологии и биохимии лактации, пищеварения, межуточного обмена, белкового и аминокислотного питания и отделом анализа и планирования на трех коровах-первотелках на 2-3-м месяцах лактации. Живая масса коров в среднем равнялась 360 кг. Животные имели фистулы рубца и двенадцатиперстной кишки и выведенную под кожу на “лодочку” сонную артерию. Измерение объемного кровотока через половину молочной железы выполнено сотрудниками лаборатории физиологии и биохимии лактации с помощью ультразвукового флоуметра, датчик которого был наложен на одну из наружных срамных артерий. Общий кровоток через молочную железу принимали равным удвоенной величине кровотока через половину вымени.

Содержание животных было привязным, без прогулок. Поение – из автопоилок. Доеение – двукратным. Удои учитывали ежедневно, пробы молока для анализа отбирали по плану. Удой оперированных коров во время опыта составлял 9-17 кг.

В предварительном и контрольном периодах животные получали только основной рацион (табл. 1), в который входили сено, злаково-бобовый силос и комбикорм, состоявший из 45% ячменя, 20 – пшеницы, 12 – овса, 20 – подсолнечникового шрота, 1 – поваренной соли, 1 – трикальцийфосфата и 1 – премикса (табл.1). Кормление было трехкратным равными долями в 8, 13 и 20 часов. Учет остатков корма проводили ежедневно.

Таблица 1. Основной рацион для лактирующих коров-первотелок

Корма и показатели питательности	Ед. измерения	Количество
Сено злаковое	кг	3,8
Силос из злаково-бобовых многолетних трав	кг	20,0
Комбикорм	кг	6,0
В рационе содержится		
Сухое вещество	кг	13,9
Обменная энергия	МДж	121
Сырой протеин:	г	1806
в том числе распадающийся	г	1250
нераспадающийся	г	556
Целлюлоза	г	2171
Гемицеллюлоза	г	2742
Лигнин	г	913
Крахмал	г	2540
Сахар	г	450

Сырой жир	г	387
Фонд доступных субстратов (материалы В. И. Агафонова)		
Ацетат	г	3135
Пропионат	г	1090
Бутират	г	570
Сумма аминокислот	г	1090
Сумма ВЖК	г	325
Глюкоза	г	682
Молочная кислота	г	320

В пять опытных периодов, кроме дачи основного рациона, коровам ежесуточно дополнительно инфузировали через фистулы в пищеварительный тракт растворы питательных веществ (субстратов) в следующих вариантах: 1) смесь 250 г ацетата калия и 365 г ацетата натрия тригидрата – в рубец; 2) 300 г пропионата в смеси с буферным раствором – в рубец; 3) 370 г глюкозы – в двенадцатиперстную кишку; 4) 250 г казеината натрия – в двенадцатиперстную кишку; 5) 250 г казеината натрия и 200 г пропионата одновременно. Инфузию проводили в течение пяти дней подряд ежедневно равномерно с 8-00 до 20-00. За час вводили 1 литр раствора. Вводимые за сутки субстраты в каждом варианте содержали около 4,5 МДж валовой энергии.

В последний день каждого периода в 7, 11 и 16 ч методом пункции брали пробы крови из сонной артерии и молочной вены.

Использование энергии и питательных веществ основного рациона определяли в обменном опыте в контрольном периоде, который был по порядку третьим после периодов с введением ацетата и пропионата. Общий расход энергии в организме коров измеряли методом непрямой калориметрии традиционным масочным методом (Надальяк и др., 1986), химический анализ образцов газа проводили с помощью аппарата Холдена. Калориметрию образцов материалов обменного опыта (корма, молоко, кал, моча) проводили с помощью адиабатического калориметра.

Результаты и обсуждение

Потребление коровами обменной энергии с кормом колебалось от 90 до 120 МДж/сут. Использование коровами энергии корма в расчете на голову представлено в таблице 2.

Таблица 2. Обмен энергии у коров-первотелок при потреблении основного рациона

Показатели	Мдж/сут
Энергия мочи	7,3±0,9
Теплопродукция	52,4±1,0
Энергия удоя	40,8±5,9

Данные об образовании за счет переваренных веществ основного рациона важнейших субстратов представлены в таблице 1. Определение фонда субстратов проводилось В.И. Агафоновым на основе данных о составе рациона, переваривании питательных веществ в сложном желудке и кишечнике, соотношении образовавшихся в рубце ЛЖК с использованием также показателей газоэнергетического обмена и обмена азота. Как видно из материалов таблицы, доминирующим по массе субстратом являлся ацетат.

В таблице 3 представлены результаты расчетного определения использования отдельных субстратов в энергетическом обмене.

Таблица 3.Использование субстратов в энергетическом обмене коров, г/сут (материалы В.И. Агафонова)

Период опыта	Азотсодержащие вещества	Ацетат	Глюкоза	ВЖК и кетоновые тела
Контрольный	427	1546	327	113
Инфузия ацетата	376	1420	278	565
Инфузия пропионата	278	1461	310	500
Инфузия глюкозы	350	1509	366	663
Инфузия казеина	444	1811	304	371
Инфузия казеина и пропионата	448	1790	354	458

При инфузии субстратов в пищеварительный тракт наиболее существенным было уменьшение по сравнению с контролем выделения азота с мочой при введении “чисто” энергетических субстратов (ацетат, пропионат, глюкоза). Вероятно, что причиной этого было уменьшение использования аминокислот на энергетические цели. При дополнительном поступлении азота с казеином выделение азота с мочой, напротив, увеличивалось.

Для калькуляции расхода энергии в молочной железе при синтезе лактозы, белка и жира молока и, следовательно, единицы молока любого состава, были проанализированы на стехиометрической основе конечные реакции биосинтеза важнейших

компонентов молока с учетом затрат макроэргов АТФ. Далее приводится обоснование разработанного метода калькуляции. Отдельно анализируются подходы к определению затрат энергии при синтезе лактозы, белка и жира.

Синтез лактозы. Молекулярная масса лактозы равна 342 дальтон. При синтезе из двух молекул глюкозы молекулы лактозы расходуются 2 молекулы АТФ. Отсюда следует, что на синтез 1 г лактозы расходуется 2 (моль АТФ): $342 = 0,006$ моль АТФ.

Образование и расходование АТФ при синтезе 1 г лактозы будет сопровождаться выделением тепла, количество которого определяется следующим расчетами: $25 \text{ ккал} \cdot 2 : 342 = 0,15 \text{ ккал} = 0,61 \text{ кДж}$. Обоснованием такого расчета теплообразования при образовании и использовании АТФ являются следующие моменты. Средняя энергия макроэргической связи моля АТФ равна 10 ккал (предполагаемый размах 8-12 ккал). Эффективность образования связи за счет энергии окисления близка к 40% (Иванов, 1990). Следовательно, суммарное теплообразование при образовании и расходовании моля АТФ близко к $10 : 40 \cdot 100 = 25 \text{ ккал} = 104,6 \text{ кДж}$. Эта величина теплообразования при синтезе и расходовании 1 моля АТФ будет использована в расчетах и далее.

Синтез белка. При расчете энергетических затрат на синтез белка исходили из следующего: 1) на синтез пептидной связи расходуется, по меньшей мере, 3 молекулы АТФ, 2) основной белок молока – казеин имеет молекулярную массу порядка 23000 дальтон (Сапунов и др, 2002), а средняя масса аминокислотного остатка белковой цепи близка к 120 дальтон (Ленинджер, 1976).

Определяем, какое количество пептидных связей необходимо образовать при синтезе молекулы казеина и каковы затраты АТФ при этом: 23000 (молекулярная масса казеина) : $120 - 1 = 191$ связь. Далее рассчитываем количество АТФ, необходимое для синтеза 191 пептидной связи: 3 (молекулы АТФ) $\cdot 191 = 573$ молекулы АТФ. Затраты АТФ на образование одного грамма казеина, соответственно, равны $573 : 23000 = 0,025$ моль АТФ. При образовании и использовании такого количества АТФ образуется тепла: $25 \cdot 0,025 = 0,62 \text{ ккал} = 2,62 \text{ кДж}$.

Синтез жира молока. Этот фрагмент расчетов является наиболее сложным и трудоемким, вследствие многокомпонентности и вариабельности системы.

В качестве исходных параметров и допущений было взято следующее. Молочный жир на 97-98% представлен триглицеридами, поэтому при составлении модели субстратных потоков достаточно в первом приближении учитывать предшественники лишь этой группы веществ. Почти 100% общей массы жирных кислот в триглицеридах составляют кислоты: $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$,

$C_{18:2}$ и $C_{18:3}$. Соотношение этих кислот в условиях традиционного нормированного кормления сравнительно постоянно (Christie, 1983; Алиев, 1997). Около 50% жирных кислот жира молока синтезируется в молочной железе, вторая половина поглощается из плазмы крови. Основными предшественниками достаточно определенных групп жирных кислот являются бета-гидроксibuтират, ацетат, жирные кислоты триглицеридов и НЭЖК плазмы крови. Длинноцепочные жирные кислоты (C_{18}) считаются используемыми непосредственно в неизмененном виде. Предшественниками короткоцепочных кислот C_4 - C_{12} являются ацетат и бета-гидроксibuтират. Кислоты C_{12} - C_{16} могут иметь двойное происхождение – синтезироваться в железе и поступать из плазмы крови. Потребность в предшественниках может быть рассчитана стехиометрически по количеству жирных кислот, из них образующихся. Дополнительным и контрольным моментом являются фактические данные о соотношении поглощаемых из крови молочной железой веществ-предшественников жирных кислот. При использовании разработанного метода не было необходимости в идентификации кислот, предшественниками которых были ацетат и бета-гидроксibuтират. Достаточно было знать, что последний дает около 8-10% массы жирных кислот. Эта величина, судя по величинам артерио-венозной разницы по молочной железе для триглицеридов и бета-гидроксibuтирата, приведенным в отчете лаборатории межучастного обмена, близка к имевшей место в описываемых исследованиях.

Глицерин, необходимый для синтеза триглицеридов молока, частично происходит из поглощенных триглицеридов плазмы. Это количество поддается расчетному определению, исходя из величины артерио-венозной разницы триглицеридов и объемного кровотока. Данные о поглощении и использовании молочной железой свободного глицерина из плазмы крови очень скудны. Как показывают расчеты, основная масса глицерина должна быть образована из глюкозы. В связи с очень высокой (около 97%) энергетической эффективностью процесса образования глицерина из глюкозы этими затратами можно пренебречь.

При синтезе жирных кислот из бета-гидроксibuтирата и ацетата путем удлинения углеродной цепи требуется на одно присоединяемое звено 1 молекула АТФ и водород двух молекул НАДФ•Н₂. При расчетах принято, что молекула бета-гидроксibuтирата используется целиком. Необходимый при синтезе НАДФ•Н₂ образуется, в основном, при окислении глюкозы в пентозофосфатном шунте. При этом за счет одной полностью окисленной молекулы глюкозы образуется 12 молекул НАДФ•Н₂ (Малер и Кордес, 1970).

Синтез молекулы триглицерида из глицерина и 3-х молекул жирных кислот требует расхода 7 молекул АТФ.

Таким образом, суммарные затраты на синтез жира молока состоят из затрат на синтез части жирных кислот из ацетата и бета-гидроксибутирата и затрат на синтез триглицеридов из глицерина и жирных кислот.

Для получения ориентировочных количественных характеристик затрат энергии на конечном этапе синтеза молочного жира был разработан методический подход для проведения соответствующих расчетов. В результате установлено, что при синтезе жирных кислот из ацетата и бета-гидроксибутирата (в основном с короткой цепью и часть кислот с C_{16}) на 1 г продукта расходуется около 0,024 моль АТФ. Расход АТФ в расчете на 1 г синтезированных триглицеридов молока (фактически жира молока) близок 0,020 моль, т.е. меньше, так как половина (по массе) жирных кислот (в основном группа C_{18}) поглощается из плазмы в готовом виде. Соответственно и расход НАДФ•Н₂ в расчете на 1 г триглицеридов в два раза меньше, чем на синтез 1 г короткоцепочных жирных кислот.

Сравнение затрат энергии на конечном этапе синтеза лактозы, казеина и (жира) триглицеридов молока проведено в таблицах 4 и 5. По содержащимся в них данным видно, что наименьший абсолютный и относительный расход энергии на единицу массы продукта имеет место при синтезе лактозы, промежуточный – при синтезе жирных кислот и триглицеридов, максимальный – при синтезе казеина.

Таблица 4. Затраты энергии на конечном этапе синтеза компонентов молока (в расчете на 1 г)

Компонент	Расход АТФ, моль	Расход НАДФ•Н ₂ , моль	Теплообразование при синтезе и использовании АТФ, кДж
Лактоза	0,006	-	0,61
Белок (казеин)	0,025	-	2,62
Жир молока (триглицериды в среднем)	0,020	0,023*	2,09
Синтезированные из ацетата и бета-гидроксибутирата жирные кислоты	0,024	0,046*	2,51

* Потери энергии в виде тепла при функционировании ПФШ невелики

(порядка 5,6%; Мушкамбаров, 1988) и в расчет не принимались.

Далее рассматриваются материалы по затратам энергии и использованию ацетата молочной железой коров в проведенной серии опытов. Анализ материалов проводился по описанной выше методике.

В таблице 5 приведены материалы по величине суточного удоя и содержанию в нем основных компонентов молока.

Таблица 5. Молочная продуктивность коров при инфузии отдельных субстратов в пищеварительный тракт

Удои, кг/сут	Продукция компонентов молока, г/сут		
	молочный жир*	белок*	лактоза**
	Контроль (без инфузии)		
13,4±1,4	478±38	380±27	562
	Инфузия ацетата		
13,8±2,2	562±39	386±54	580
	Инфузия пропионата		
13,4±2,1	472±51	390±42	563
	Инфузия глюкозы		
11,2±1,4	399±18	343±18	470
	Инфузия казеина		
13,1±1,4	434±24	414±48	550
	Инфузия казеина и пропионата		
13,7±1,5	471±19	444±35	575

* – Содержание жира и белка определено в лаборатории физиологии и биохимии лактации; ** – Содержание лактозы принято равным 4,2%.

Инфузия ацетата обусловила увеличение объема синтеза молочного жира по сравнению с контролем в среднем на 94 г/сут. Инфузия только казеина и особенно казеина в сочетании с пропионатом увеличила массу синтезированного молочного белка, по-видимому, вследствие улучшения обеспечения процессов биосинтеза как аминокислотами, так и энергией, причем в “мягком” режиме. Примечательно, что при инфузии казеина + пропионата величина кровотока через молочную железу была максимальной из всех вариантов. Инфузия только глюкозы, напротив, негативно сказалась как на величине удоя, так и объеме синтеза молочного жира и белка. Предположительно, что это является следствием гомеостатических сдвигов как кровотока, так и вклада отдельных тканей в использование субстратов. Можно ожидать, что в этих изменениях ведущую роль играют гормоны.

В таблице 6 представлены материалы по затратам энергии на конечный этап синтеза компонентов молока. Суммарные затраты на образование веществ молока были максимальными при инфузии ацетата и минимальными – при инфузии глюкозы.

Таблица 6. Затраты энергии на конечный этап синтеза компонентов молока (теплообразование), кДж/сут

Молочный жир	Белок	Лактоза	Удой в целом
	Фон без инфузии		
999	996	343	2338
	Инфузия ацетата		
1174	1011	354	2539
	Инфузия пропионата		
986	1-22	344	2352
	Инфузия глюкозы		
834	899	287	2020
	Инфузия казеина		
907	1085	336	2328
	Инфузия казеина и пропионата		
984	1163	351	2498

* – Содержание жира и белка определено в лаборатории физиологии и биохимии лактации; содержание лактозы принято равным 4,2%.

Полученные материалы по содержанию ацетата в артериальной крови и крови молочной вены в сочетании с данными о кровотоке позволили определить массу ацетата, поглощаемого молочной железой из крови (табл.7). Максимальный уровень ацетата в крови ($1,55 \pm 0,03$) имел место при введении дополнительного количества ацетата в рубец.

В дополнение к описанным выше периодам опыта произвели на один день снижение уровня кормления коров путем исключения из рациона концентратов. При этом масса поглощаемого молочной железой ацетата снизилась вдвое, преимущественно за счет снижения кровотока. Артерио-венозная разница в это время была минимальной из всех случаев, но снижение ее было не столь существенным.

Таблица 7. Извлечение ацетата из крови молочной железой лактирующих коров

Объект анализа	Содержание ацетата, ммоль/л	Кровоток, л/мин	Извлечение, г/сут
	Фон (без инфузии)		
Артериальная кровь	$1,49 \pm 0,02$		
Кровь из молочной вены	$0,69 \pm 0,03$		
Поглощение	$0,80 = 0,048$ г/л	5,98	413
	Инфузия ацетата		
Артериальная кровь	$1,55 \pm 0,03$		
Кровь из молочной вены	$0,73 \pm 0,02$		
Поглощение	$0,82 = 0,049$ г/л	6,06	428
	Инфузия пропионата		
Артериальная кровь	$1,38 \pm 0,03$		
Кровь из молочной вены	$0,62 \pm 0,03$		

Поглощение	0,76 = 0,046 г/л	6,86	454
	Инфузия глюкозы		
Артериальная кровь	1,39±0,02		
Кровь из молочной вены	0,58±0,03		
Поглощение	0,81 = 0,049 г/л	6,32	446
	Инфузия казеина		
Артериальная кровь	1,30±0,01		
Кровь из молочной вены	0,54±0,02		
Поглощение	0,76 = 0,046 г/л	6,62	438
	Инфузия казеина и пропионата		
Артериальная кровь	1,32±0,01		
Кровь из молочной вены	0,55±0,01		
Поглощение	0,77 = 0,046 г/л	7,26	481
	Исходный уровень до снижения уровня кормления		
	-	5,10	-
	В день исключения из рациона концентратов		
Артериальная кровь	1,33±0,02		
Кровь из молочной вены	0,62±0,03		
Поглощение	0,71 = 0,043 г/л	3,62	224
	Следующий день вслед за днем с исключением концентратов		
Артериальная кровь	1,38±0,02		
Кровь из молочной вены	0,56±0,02		
Поглощение	0,82 = 0,049 г/л	3,62	255

При статистической обработке всего массива данных о поглощении ацетата молочной железой выявлена достоверная положительная корреляция между концентрацией ацетата в артериальной крови и величиной артерио-венозной разницы ацетата, что свидетельствует о доминировании пассивного механизма транспорта ацетата из крови в ткани молочной железы.

Материалы об использовании ацетата молочной железой приведены в таблице 8 для пересчета от общей массы молочного жира в массу ацетата, использованного для синтеза жирных кислот молока (такие кислоты составляют около 41,2% от их общей массы). Использовали коэффициент 0,72. Доля ацетата, от поглощенного из крови количества, которая пошла на синтез жирных кислот липидов молока, колебалась от 64 до 95%. Соответственно разницу между 100% и этими величинами считали использованной на окисление.

Таблица 8. Использование ацетата в молочной железе лактирующих коров

Поступление ацетата в кровь за счет корма, г/сут	Поглощение ацетата молочной железой, г/сут	Расход на синтез жира в железе, г/сут; доля от поглощения, %	Расход на окисление в железе, г/сут
	Фон (без инфузии)		
2988	413	344 (83,3)	69
	Инфузия ацетата		

3415 (включая инфузию)	428	405 (95,0)	23
	Инфузия пропионата		
2988	454	340 (74,9)	114
	Инфузия глюкозы		
2988	446	287 (64,3)	159
	Инфузия казеина		
2988	438	312 (71,9)	126
	Инфузия казеина и пропионата		
2988	481	339 (70,4)	142

* Поступление ацетата рассчитано по результатам обменного опыта на основном рационе (см. табл. 1, 2 и 3).

Вышеизложенные материалы проиллюстрировали вариабельность энергетической эффективности синтеза компонентов молока в зависимости от спектра использованных субстратов.

Лабораторией энергетического питания за ряд лет был также получен большой массив экспериментальных данных по энергетическому обмену у коров разного уровня продуктивности. Путем статистического анализа материала более 80 обменных опытов оказалось возможным получить численную характеристику прироста затрат энергии (соответствует приросту общей теплопродукции организма) на единицу прироста энергии молока (В.Б. Решетов, 1998). Эти затраты включают в себя как теплоту, образовавшуюся при окислении органических веществ до этапа образования макроэргических связей (первичная теплота), так и теплоту, образовавшуюся после использования энергии макроэргических связей АТФ (вторичная теплота), для осуществления требующего затрат энергии биосинтеза и других процессов.

Очевидно, что общий прирост затрат энергии происходит во всем организме, особенно в органах, обеспечивающих снабжение молочной железы предшественниками веществ молока (желудочнокишечный тракт, печень, сердечно-сосудистая система). Важно отметить, что величина прироста затрат энергии ниже при низкой молочной продуктивности и возрастает по мере ее роста. Это явление продемонстрировано в таблице 9.

По сравнению с содержанием энергии в самом приросте удоя, затраты на его образование составляют при невысокой продуктивности около 30%, возрастая в изученном диапазоне до 58%. Можно предполагать, что это связано с изменением спектра субстратов, использованных для синтеза веществ молока, и с возрастающими энергозатратами на сохранение гомеостаза организма. Примечательно, что отношение (общая теплопродукция в тканях) / (энергия удоя) с ростом удоя постепенно уменьшается в

связи с тем, что доля затрат энергии на поддержание в общей теплопродукции становится все меньше.

Таблица 9. Увеличение затрат энергии в тканях всего организма на теплообразование в расчете на единицу прироста энергии удоа

Энергия удоа, МДж/сут	Разность (P ₁) между классами	Теплопродукция в тканях, МДж/сут	Разность (P ₂) между классами	Соотношение P ₂ / P ₁
–	–	54,8	–	–
37,7		80,4		
46,0	8,3	82,9	2,5	0,30
54,4	8,4	85,8	2,9	0,34
62,8	8,4	88,7	2,9	0,34
71,1	8,3	91,2	2,5	0,30
79,5	8,4	92,9	1,7	0,20
87,9	8,4	95,8	3,1	0,37
96,2	8,3	100,0	4,2	0,51
104,6	8,4	105,5	5,5	0,58

Заключение

В результате проведенной работы были проанализированы на стехиометрической основе конечные этапы энергетического обеспечения биосинтеза основных компонентов молока. При этом установлено, что синтез в клетках секреторного эпителия молочной железы жирных кислот из ацетата и бета-гидроксипутирата путем удлинения углеродной цепи требует значительного расхода энергии в расчете на единицу массы продукта. Эти затраты приближаются к затратам при синтезе пептидных цепей, являющемся наиболее энергоемким.

Для калькуляции затрат макроэргических связей АТФ в процессах биосинтеза компонентов молока и теплообразования при ее генерации и использовании были разработаны соответствующие алгоритмы. В комплексе они позволяют прогнозировать базисные затраты энергии при биосинтезе молока любого состава. Однако, фактические затраты энергии в молочной железе выше расчетных, которые не учитывают необходимость обеспечения ряда физиологических процессов, особенно поддержания ионных градиентов. Для большего приближения результатов прогноза к фактическим величинам в дальнейших исследованиях целесообразно использование дополнительных более специфичных показателей, в частности поглощения молочной железой кислорода. Это позволит оценить объем окисления органических веществ в тканях железы.

В исследованиях была также дана количественная оценка генерации доминирующего энергетического метаболита у жвачных –

ацетата за счет питательных веществ корма, прослежено его поглощение молочной железой из крови при варьировании условий питания и на основе проведенных разработок оценена доля ацетата, использованная для синтеза жирных кислот молока. Дополнительное введение ацетата обеспечило увеличение синтеза молочного жира.

Установленные различия в затрате энергии при синтезе веществ молока из разных предшественников позволяют предположить значение этого факта в механизме роста затрат энергии при синтезе дополнительного количества молока и при росте уровня кормления.

В целом проведенные исследования являются частью работы по созданию более совершенной научной системы питания жвачных животных, базирующейся на учете обеспеченности организма важнейшими субстратами. Работы в этом направлении постоянно ведутся в скандинавских странах и США. Без сомнения, это направление можно считать прогрессивным и многообещающим в плане повышения эффективности использования кормов, сохранения здоровья коров и продления сроков их хозяйственного использования за счет оптимизации кормления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А., Димов В. Обмен липидов. В кн.: Обмен веществ у жвачных. М.: Инженер, 1997: 161-231.
2. Досон Р. и др. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.
3. Дэгли С., Николсон Д. Метаболические пути. М.: Мир, 1973.
4. Ершов Ю.А., Мушкамбаров Н.Н. Кинетика и термодинамика биохимических и физиологических процессов. М.: Медицина, 1990.
5. Иванов К.П. Основы энергетики организма. Т. 1 и 2. Л.: Наука, 1990.
6. Котык А., Ямачек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980.
7. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976.
8. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. М.: Мир, 1970.
9. Мушкамбаров Н.Н. Метаболизм: структурно-химический и термодинамический анализ. Т. 1, 2 и 3. М.: Химия, 1988.
10. Решетов В.Б. Энергетический обмен у коров в связи с физиологическим состоянием и условиями питания. Дисс.... д.б.н., Боровск, 1998.
11. Надаляк Е.А., Агафонов В.И., Решетов В.Б. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Методические указания, Боровск, 1986: 58 с.
12. Сапунов М.И., Черепанов Г.Г. Параметры, характеризующие развитие молочной железы и ее функциональную активность. В кн.: Сельскохозяйственные животные. Физиологические и биохимические параметры организма. Боровск, 2002: 170-182.
13. Трошин А.С. Распределение веществ между клеткой и средой. Л.: Наука, 1985.

14. Bauman D.E. et al. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. Arch. of biochem. and biophys. 1970, 140: 237-244.
15. Christie W.W. The biosynthesis of milk lipids. Food Science and Technology. Present status and future direction. 1983, 5: 261-272.
16. Scott R.A. et al. Cellular gluconeogenesis by lactating bovine mammary tissue. J. Dairy Sci. 1976, 59: 50-56.

ДИНАМИКА АРТЕРИО-ВЕНОЗНОГО БАЛАНСА МЕТАБОЛИТОВ КРОВИ И ИХ ТРАНСПОРТА В КЛЕТКИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОРОВ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ СДВИГАХ В УРОВНЕ ПИТАНИЯ

*З.Н. Макаp, Г.Г. Черепанов, И.А. Бояришинов, П.В. Матющенко,
Р.И. Корнеева, Т.Ю. Токарев, В.Б. Решетов*
Лаборатория физиологии и биохимии лактации

По данным измерений артерио-венозного баланса в молочной железе у лактирующих коров определены количественные параметры транспорта метаболитов в секреторные клетки в период лишения в течение 24 ч концентратной части рациона и при последующем возобновлении кормления в полном объеме. Выявлены изменения параметров транспорта аминокислот (по альфа-аминному азоту) и свободных жирных кислот в секреторные клетки на фоне отсутствия адаптивных изменений активности транспорта глюкозы при вариации уровня питания.

Введение

Известно, что уровень кровоснабжения и число клеток альвеолярного эпителия молочной железы имеют критическое значение для объема секреции молока, но влияние этих факторов модифицируется вариацией функциональной активности секреторных клеток, сопровождающейся сдвигами в величине потока поступающих из крови субстратов (Cherepanov et al., 2000; Davis, Collier, 1985). Механизмы координации органного кровоснабжения, капиллярного массопереноса и клеточного метаболизма остаются во многом невыясненными, что объясняется трудностями исследования этих процессов *in vivo*. Биохимические характеристики отдельных звеньев изучались в течение длительного времени (главным образом *in vitro*), но количественная их роль в лимитировании молокообразования неизвестна, непонятна логика ответной реакции всей системы на различные экспериментальные воздействия. Результаты опытов с

инфузиями субстратов очень вариабельны; некоторые субстраты, в том числе ацетат и высшие жирные кислоты, снижают кровоток, другие (аминокислоты) его повышают (Черепанов и др., 2001); величина эффекта зависит от длительности инфузии, дозы, фона кормления и других условий эксперимента (Cant, 2002). При попытках повысить продукцию молочного белка за счет дополнительного введения аминокислот иногда наблюдается положительный эффект, но в целом результаты мало воспроизводимы, зависимость молокообразования от поступления субстратов плохо прогнозируется на современном этапе (Mackle, 1998; Черепанов и др., 2001; Davis, Collier, 1985).

В литературе последних лет приведены косвенные данные, свидетельствующие о возможном пуринергическом механизме сопряжения органного кровотока и метаболизма, функционирующем по критерию поддержания энергетического баланса клетки за счет вазодилатационных эффектов аденозина (Cant, 1995; Cherepanov et al., 2000). Хотя предложенные кинетические модели, учитывающие этот механизм, объясняют происхождение некоторых системных эффектов, он, безусловно, не является единственным и в реальных ситуациях возможно наложение и суммация различных регуляторных воздействий – как гормональных, так и субстратных. Дальнейший прогресс в понимании сопряженной регуляции органной гемодинамики и биосинтеза компонентов молока видится на пути уточнения основных количественных взаимосвязей и зависимостей параметров системы (констант скоростей, аффиностей, максимальных значений потоков) от конкретных условий опыта.

В настоящей работе ставилась цель изучить в динамике взаимосвязи между уровнем кровоснабжения, транспортом субстратов в секреторные клетки молочной железы и их использованием на молокообразование в условиях переходного процесса при кратковременных изменениях уровня питания.

Материалы и методы

Для изучения взаимосвязи уровня кровоснабжения, использования субстратов органом и молокообразования был проведен опыт с регистрацией переходного процесса при вызванном отклонении от стационарного состояния. На 4 лактирующих коровах-первотелках изучали влияние кратковременного (в течение 24 ч) лишения концентратной части рациона (50% по обменной энергии) с последующим возобновлением кормления в полном объеме. Трем животным предварительно имплантировали датчики объемной скорости кровотока (Transonic, USA) на наружную срамную артерию и проводили непрерывную регистрацию объемной скорости кровотока через молочную железу, как описано ранее (Макар, 2003). На

протяжении исходного, основного и заключительного периодов опыта длительностью 1, 1 и 2 суток соответственно регистрировали гемодинамику вымени и периодически отбирали пробы крови из сонной артерии и молочной вены для определения глюкозы (глюкозооксидазный метод), альфа-аминного азота (Mitsukawa, 1971), НЭЖК (Duncombe, 1962), ЛЖК (метод паровой дистилляции на аппарате Маркгама), триацилглицеролов (энзиматический метод, Витал Диагностик, Спб) и β -оксимасляной кислоты (Холод, 1988); в молоке определяли содержание жира на анализаторе молока (Milko-tester, Дания) и белка колориметрическим методом (Постхумус, 1965). Используемая в работе кинетическая модель транспорта низкомолекулярных водорастворимых метаболитов описана ранее (Черепанов, в печати). Новым элементом здесь является косвенное определение параметра активности транспорта метаболита в клетку (T , ед. объема/ед. времени) по показателям артерио-венозного баланса. Параметр T характеризует функциональные свойства системы транспортеров в расчете на орган; т.е. это величина, которая, в отличие от скорости потока, не зависит от концентрации, характеризует не субстратную компоненту потока, а «мембранную» и, таким образом, отражает состояние первого клеточного звена в цепочке метаболических превращений (функциональную мощность (activity) системы транспорта).

Результаты и обсуждение

На протяжении суток после отмены концентратной части рациона у подопытных коров не было отмечено существенных отклонений в уровне глюкозы в крови, наблюдалась тенденция к снижению уровня α -аминного азота, снизилось содержание ЛЖК и повысилось содержание в крови НЭЖК (табл. 1). В динамике показателей артерио-

Таблица 1. Показатели артерио-венозного баланса и транспорта метаболитов в клетки молочной железы в динамике по периодам опыта ($M \pm m$)†

Показатели	Периоды опыта, часы взятия проб крови								
	Предварительный			Лишение концентратов			Возобновление дачи концентратов		
	11 ⁰⁰	16 ⁰⁰	7 ⁰⁰	11 ⁰⁰	16 ⁰⁰	7 ⁰⁰	11 ⁰⁰	16 ⁰⁰	7 ⁰⁰
α -аминный азот А, мг%	5,57±0,36	5,63±0,20	5,65±0,33	5,53±0,21	5,26±0,09	5,37±0,19	5,75±0,29	6,27±0,16	5,85±0,31
АВР, мг%	1,19±0,11	1,23±0,08	1,17±0,09	1,23±0,05	1,28±0,09	1,3±0,11	1,16±0,11	1,22±0,15	1,15±0,1
Р, мг/мин	34,26±8,29	37,79±7,22	34,85±7,87	32,87±5,83	40,49±5,2	28,08±0,92	33,66±2,57	50,42±6,9	49,68±8,86
Е, %	21,22±0,64	21,78±0,76	20,71±0,76	22,34±0,8	24,35±1,22	24,02±1,17	20,01±1,12	19,42±2,06	19,62±1,2
Т, дл/мин	7,81±1,21	8,58±1,2	7,78±0,69	7,75±1,38	6,93±0,95	4,68±0,1*	3,47±0,26*	6,79±0,77	7,19±0,82
Глюкоза А, мМ	3,03±0,27	2,75±0,1	2,74±0,13	2,93±0,11	2,74±0,26	2,7±0,34	2,7±0,28	3,37±0,12	2,91±0,15
Р, мМ	0,84±0,09	0,82±0,09	0,77±0,15	0,84±0,14	0,9±0,12	1,07±0,18	0,88±0,18	0,77±0,11	0,76±0,11
Р, ммоль/мин	3,6±0,75	3,83±0,88	3,74±1,02	3,42±0,91	3,19±0,28	2,37±0,59	3,23±0,15	3,11±0,35	3,88±0,44
Е, %	28±3,21	30,04±3,83	28,52±6,59	29,16±5,25	33,15±4,45	40,45±7,3	33,23±7,29	22,7±2,9	26,31±4,1
Т, л/мин	1,12±0,72	1,35±0,45	1,29±0,6	1,12±0,42	1,18±0,27	0,99±0,17	1,21±0,24	0,81±0,13	1,23±0,2
β -оксимасляная к-та А, мг%	7,29±0,19	6,57±0,63	6,25±0,57	6,98±0,21	6,5±0,64	6,9±0,56	7,72±0,35	7,32±0,51	6,92±0,15
АВР, мг%	1,96±0,1	1,82±0,24	1,67±0,24	1,95±0,05	2,02±0,25	2,49±0,28	2,75±0,23	2,37±0,17	2,02±0,05
Р, мг/мин	58,21±5,64	64,26±13,82	57,12±7,28	52,09±7,68	49,5±6,52	41,48±2,92	60,5±4,3	74,0±4,4	61,1±7,7
Е, %	27±1,9	27,5±1,36	26,3±1,8	27,9±0,55	30,9±0,96	35,8±1,24**	35,5±1,51	32,5±2,05	29,2±0,88
Т, дл/мин	10,92±0,53	13,53±0,22	12,44±0,57	10,34±0,54	11,05±0,56*	9,38±0,53*	12,2±0,42	14,9±0,41	12,5±0,43
ЛЖК А, мМ	1,43±0,03	1,54±0,02	1,5±0,01	1,38±0,01	1,33±0,02**	1,28±0,01***	1,32±0,01	1,41±0,02	1,43±0,03
АВР, мМ	0,69±0,03	0,81±0,01	0,88±0,01	0,65±0,01	0,7±0,03*	0,78±0,02**	0,8±0,01	0,82±0,01	0,84±0,02
Р, ммоль/мин	3,14±0,14	3,98±0,04	3,99±0,04	2,55±0,02*	2,3±0,08***	1,78±0,03***	2,51±0,03	3,72±0,02	3,69±0,08
Е, %	51,16±1,39	47,27±0,49	41,13±0,98	52,7±0,9	47,2±2,6	39,63±1,4	39,4±0,35	42±1,73	40,93±4,23
Т, л/мин	4,3±0,21	5,46±0,1	6,48±0,11	3,5±0,06*	3,67±0,17**	3,51±0,09***	4,82±0,04	6,29±0,22	6,24±0,5
НЭЖК А, мг%	7,76±0,72	7,20±0,80	8,14±0,81	10,05±1,03	13,06±1,30*	16,53±0,8***	8,16±0,53	7,28±0,46	8,68±0,30
Р, мг/мин	7,41±1,17	7,14±1,82	12,78±0,88	14,82±3,43	22,24±2,86**	43,25±2,0***	18,1±2,1	10,4±1,13	17,7±3,0
Триацилглицеролы А, мг%	5,94±0,16	6,20±0,09	6,09±0,11	6,21±0,05	6,66±0,10*	6,42±0,08	6,58±0,36	6,52±0,37	6,47±0,21
Р, мг/мин	97,92±17	106,1±11,5	97,24±12,92	101,32±15,0	88,4±15,64	65,48±1,84*	82,5±5,0	115,9±8,4	107,2±8,8
Сумма НЭЖК + ТГ Р, мг/мин	105,4±18,4	112,9±13,6	110,2±13,6	116,3±18,4	110,8±18,4	108,8±3,8	100,6±6,8	126,3±9,5	124,9±11,5

Обозначения: А – концентрация в артериальной крови; АВР – артерио-венозная разница; Е = АВР/А – коэффициент извлечения из крови; Р – поглощение органом; Е – активность транспорта в клетки молочной железы; † для А, АВР и Е n = 4; для Р и Т n = 3; * - достоверно отличается от соответствующего момента взятия крови в предварительном периоде при P < 0,05; ** то же при P < 0,01; *** при P < 0,001

венозного баланса по глюкозе, α -аминному азоту и β -оксимасляной кислоте в конце периода депривации отмечены однотипные сдвиги: увеличение АВР и процентного извлечения из крови на фоне снижения венозной концентрации и потребления субстрата органом (рис. 1, табл. 1). Такая картина сдвигов показателей артерио-венозного баланса прогнозируется теоретически для водорастворимых метаболитов при спаде объемной скорости кровотока (Черепанов, в печати). К концу периода депривации снизились значения активности транспорта по α -аминному азоту с 7,8 до 4,7 дл/мин ($P < 0,05$), по β -оксимасляной кислоте с 12,4 до 9,38 дл/мин ($P < 0,05$) и по ЛЖК с 6,48 до 3,51 ($P < 0,01$), тогда как активность транспорта глюкозы существенно не изменилась (табл.1).

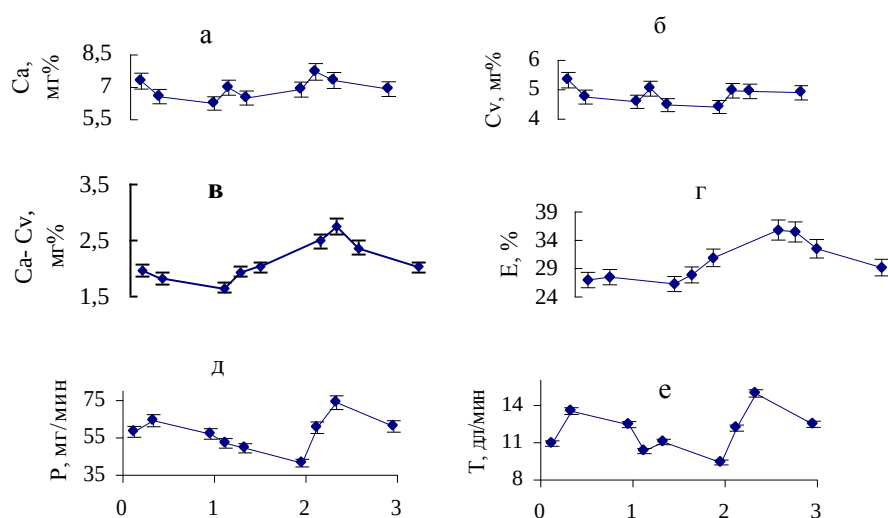


Рис. 1. Динамика показателей артерио-венозного баланса β -оксимасляной кислоты на протяжении опыта. По оси абсцисс – время, сутки по периодам: предварительный период (0 – 1), период лишения концентратов (1 – 2), период восстановления кормления в полном объеме (2 – 3).

Ca – артериальная концентрация, мг/дл; Cv – венозная концентрация, мг/дл; Ca - Cv – артерио-венозная разница, мг/дл; E – коэффициент извлечения из крови, %; P – поглощение в органе, мг /мин; T – активность транспорта в клетки в расчете на орган, дл/мин.

Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. Приведены средние значения $\pm$ усредненная по трем периодам стандартная ошибка среднего (a – г: n = 4; д, е: n = 3).

При использовании сводных данных по трем периодам опыта были выявлены линейные зависимости показателей артерио-венозного баланса для α -аминного азота, β -оксимасляной кислоты, ЛЖК и глюкозы, несмещенные относительно начала координат, как это предсказывается по описанной ранее модели для водорастворимых метаболитов (рис. 2 – 5) (Черепанов, в печати). Поскольку величина АВР, как это следует из теории и подтверждено данными, приведенными в табл. 1, зависит от величины кровотока (от

соотношения плазмотока Q к активности транспорта T), то сдвиги скорости кровотока могут приводить к систематическому смещению опытных точек на графике АВР - Ca , «размывая» корреляционный эллипс. Это особенно заметно в случае глюкозы, уровень которой в артериальной крови варьировал незначительно, а кровоток в период отмены концентратов заметно снизился, вызывая увеличение АВР (группа точек в левой части корреляционного эллипса). Если значения АВР чувствительны к сдвигам кровотока, а последняя величина варьирует в более широкой области, по сравнению с концентрацией, то зависимость АВР от Ca не проявится (рис. 5а), хотя это вовсе не говорит об отсутствии концентрационной зависимости. Зависимость АВР от второй переменной, $1/(1+Q/T)$ для глюкозы выявляется четко, при этом наклон линии тренда равен средней концентрации глюкозы в артериальной крови (рис. 5б). Полученные эмпирические зависимости соответствуют теоретической модели, в которой значение АВР равно произведению Ca и указанной второй переменной, а $Cv = Ca/(1+T/Q)$ (Черепанов и др., в печати).

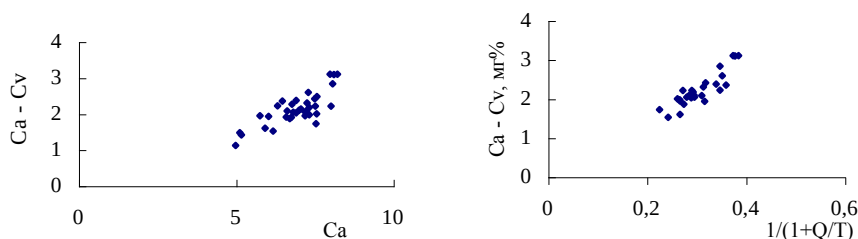


Рис. 2. Сводные зависимости артерио-венозной разницы концентраций β -оксимасляной кислоты ($Ca - Cv$) от первой переменной - артериальной концентрации (Ca) ($r = 0,69$; $P < 0,001$) и от второй переменной - $1/(1+Q/T)$ ($r = 0,68$; $P < 0,001$).

(Q , л/мин – скорость плазмотока через молочную железу; T , л/мин – активность транспорта в секреторные клетки). Величина АВР равна произведению этих переменных (Cant, 2002).

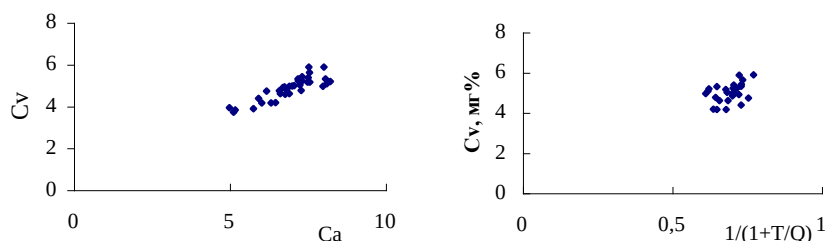


Рис. 3. Сводные зависимости содержания β -оксимасляной кислоты в венозной крови (C_v) от первой переменной - артериальной концентрации (Ca) ($r = 0,75$; $P < 0,001$) и от второй переменной - $1/(1+T/Q)$ ($r = 0,41$, $P < 0,05$).

(Q , л/мин - скорость плазмотока через молочную железу; T , л/мин - активность транспорта в секреторные клетки). Величина ABP равна произведению этих переменных (Черепанов, в печати).

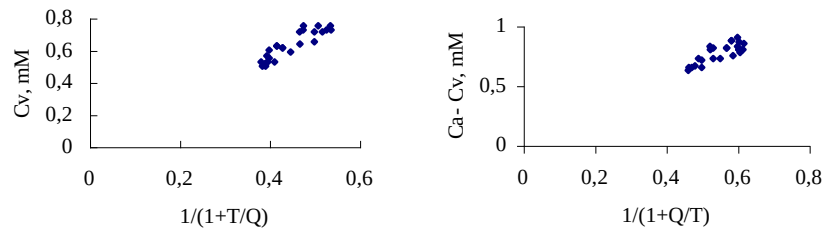


Рис. 4. Сводные зависимости содержания ЛЖК в венозной крови (C_v , мг%) от переменной $1/(1+T/Q)$ ($r = 0,81$; $P < 0,001$) и артерио-венозной разницы по ЛЖК ($Ca - C_v$, мг%) от переменной $1/(1+Q/T)$ ($r = 0,80$; $P < 0,001$).

(Q , л/мин - скорость плазмотока через молочную железу; T , л/мин - активность транспорта в секреторные клетки).

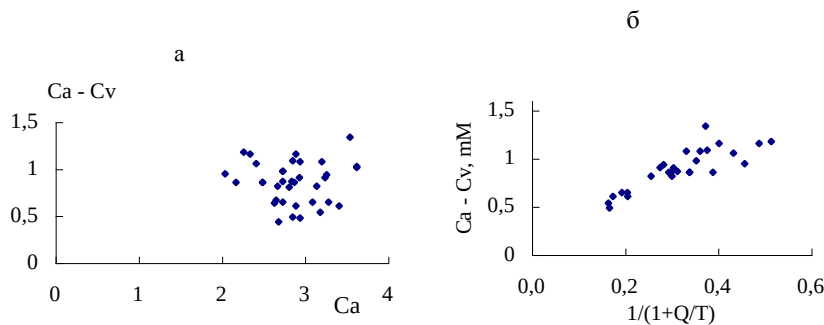


Рис. 5. Сводные зависимости артерио-венозной разницы концентраций глюкозы ($Ca - C_v$, mM) от первой переменной - артериальной концентрации глюкозы (Ca , mM) (а) и от второй переменной - $1/(1+Q/T)$ (б) ($r = 0,85$, $P < 0,001$).

(Q , л/мин - скорость плазмотока через молочную железу; T , л/мин - активность транспорта глюкозы в секреторные клетки). Величина ABP равна произведению этих переменных (Черепанов, в печати).

(а) $n = 36$; (б) $n = 27$.

При анализе артерио-венозного баланса по липидным компонентам крови необходимо принять в расчет два пути поступления свободных жирных кислот из крови в клетку: из НЭЖК плазмы крови и в форме свободных кислот, появляющихся в результате действия липопроотеидлипазы (ЛПЛ 3.1.1.34), локализованной в стенке капилляров, на триацилглицеролы (ТАГ) крови. Гидрофобные жирные кислоты транспортируются в клетку, по-видимому, посредством векторного механизма, без реабсорбции в

венозных капиллярах. Определенная доля НЭЖК артериальной крови поступает транзитом в венозную кровь, в которой смешивается с продуктами действия ЛПЛ на ТАГ.

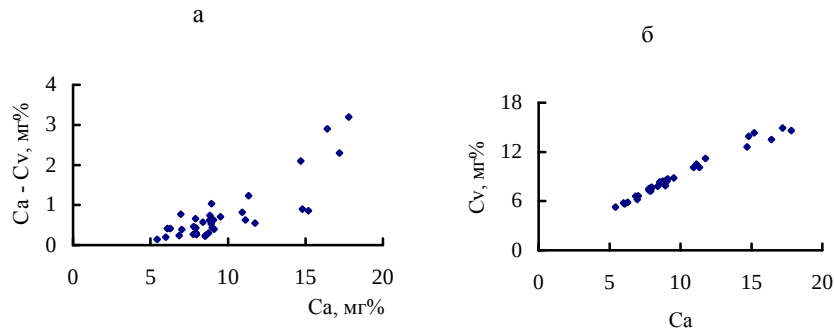


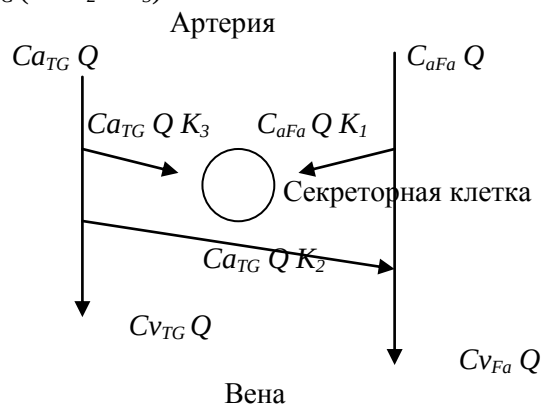
Рис. 6. Сводные зависимости артерио-венозной разницы (а) и венозной концентрации (б) НЭЖК от их концентрации в артериальной крови.

Каждая точка означает измерение на одном животном; измерения проведены 9 раз на четырех коровах на протяжении 3-х дней (периодов) опыта ($n = 36$).

На графиках, приведенных на рис. 6, хорошо различимы две области, соответствующие норме (исходное состояние, уровень НЭЖК до 12 мг%) и период лишения концентратов (выше 12 мг%). Для венозной концентрации НЭЖК первой области соответствует уравнение регрессии $Cv_{Fa} = 0,5 + 0,91 Ca_{Fa}$, второй области: $Cv_{Fa} = 4 + 0,6 Ca_{Fa}$. Для расчета составляющих потоков согласно приведенной схеме имеем следующие балансовые соотношения для венозной эвакуации НЭЖК и ТГ (общий множитель Q для правой и левой сторон в этих равенствах опущен):

$$Cv_{Fa} = Ca_{TG} K_2 + Ca_{Fa} (1 - K_1) \quad (1)$$

$$Cv_{TG} = Ca_{TG} (1 - K_2 - K_3) \quad (2)$$



Обозначения: Ca_{Fa} и Ca_{TG} - концентрация НЭЖК и ТАГ в плазме артериальной крови соответственно; Cv_{Fa} и Cv_{TG} - концентрация НЭЖК и ТАГ в плазме венозной крови соответственно; Q - объемная скорость плазмотока; K_i - коэффициенты (константы переноса, доли общего потока).

Если концентрации НЭЖК и ТАГ выражены в весовых единицах, эти коэффициенты безразмерны. Поступающий с артериальной кровью поток $C_{aFa} Q$ разделяется на составляющие: поток из крови в секреторную клетку $C_{aFa} Q K_1$ и оставшаяся часть потока, переходящая в венозную кровь $C_{aFa} Q (1 - K_1)$. Для ТАГ аналогичный баланс составлен из 3-х компонент потока, где $C_{aTG} Q K_3$ - поток НЭЖК, образующихся при гидролизе ТАГ под воздействием ЛПЛ и проникающих в секреторную клетку, $C_{aTG} Q K_2$ - поток НЭЖК, образующихся при гидролизе ТАГ под воздействием ЛПЛ и переходящих в венозную кровь; $C_{aTG} Q (1 - K_2 - K_3)$ - поток ТАГ, переходящих в венозную кровь транзитом, минуя ЛПЛ. Оба коэффициента - K_3 и K_2 функционально связаны с действием липопроотеидлипазы, но значение K_3 , кроме того, отражает и активность транспорта образующихся при этом свободных жирных кислот.

Для расчета используем усредненные значения объемной скорости плазмотока через молочную железу, концентрации НЭЖК и ТАГ в крови коров при нормальном кормлении (контроль) и в период лишения концентратной части рациона (табл. 2).

Процедуру вычислений проиллюстрируем на численном примере для первой области, т.е. для нормального уровня кормления. Используя выражение для наклона в соотношении (1) и эмпирически найденное его значение, получаем равенство: $1 - K_1 = 0,91$, откуда $K_1 = 0,09$, $C_{aFa} Q K_1 = 80 \times 3,13 \times 0,09 = 22,5$ мг/мин. Используя выражение для свободного члена в соотношении (1) и эмпирически найденное его значение, получаем равенство: $62 K_2 = 5$, откуда $K_2 = 0,081$, поэтому $C_{aTG} Q K_2 = 62 \times 3,13 \times 0,081 = 15,7$ мг/мин. Используя средние значения C_{aTG} и C_{vTG} , находим, что численное значение коэффициента пропорциональности в выражении (2) равно 0,45, поэтому по соотношению $1 - K_2 - K_3 = 0,45$ с учетом ранее найденного значения K_2 находим $K_3 = 0,469$ и $C_{aTG} Q K_3 = 62 \times 3,13 \times 0,469 = 91$ мг/мин.

Таблица 2. Усредненные значения скорости плазмотока и концентрации НЭЖК и ТАГ в плазме артериальной крови у коров, использованные для расчета потоков НЭЖК в молочной железе по уравнениям регрессии (1) и (2)

	Обозначение	Контроль	Период лишения концентратов
Скорость плазмотока, л/мин	Q	3,13	1,91
Концентрация НЭЖК в артериальной крови, мг/л	C_{aFa}	80	160
Концентрация ТАГ в артериальной крови, мг/л	C_{aTG}	62	64
Концентрация ТАГ в венозной крови, мг/л	C_{vTG}	28	22

Данные расчетов для двух периодов опыта приведены в таблице 3.

Таблица 3. Значения потоков НЭЖК и констант переноса, полученные по формулам (1) и (2) с использованием сводных эмпирических графиков (рис. 3) и средней концентрации НЭЖК и триацилглицеролов в плазме крови при нормальном кормлении (контроль) и в период лишения концентратной части рациона.

	Обозначение	Контроль	Лишение концентратов
Поток НЭЖК от НЭЖК крови в клетки, мг/мин	$C_{aFa} Q K_1$	22,5	122,2
Константа переноса	K_1	0,09	0,40
Поток НЭЖК от ТАГ крови в клетки, мг/мин	$Ca_{TG} Q K_3$	91,0	4,3
Константа переноса	K_3	0,469	0,035
Суммарный поток НЭЖК в клетки, мг/мин		113,5	126,5
Переход НЭЖК от ТАГ артериальной крови в венозную кровь, мг/мин	$Ca_{TG} Q K_2$	15,7	76,4
Константа переноса	K_2	0,081	0,625

Результаты расчета показали, что поток НЭЖК от ТАГ, «загрязняющий» НЭЖК венозной крови, при обычном уровне кормления составлял примерно 70% от фактического поступления НЭЖК из артериальной крови в клетки, а в период лишения концентратов – 63%. В период сниженного уровня питания увеличилась не только концентрация в крови НЭЖК, но и активность переноса их из крови в клетки; при этом, хотя поток свободных жирных кислот от ТГ в клетки резко снизился, тем не менее общий поток жирных кислот в клетки даже несколько превысил исходный уровень; данное увеличение потока предшественника молочного жира в этот период было компенсировано снижением поступления ацетата и β -оксибутирата в клетки (табл. 1). Общее образование НЭЖК из ТАГ крови, характеризующее активность ЛПЛ, снизилось незначительно (106,7 - 80,7 мг/мин) на фоне 20-кратного спада поступления образующихся продуктов в клетку. При оценке артерио-венозного баланса свободных жирных кислот по сумме НЭЖК + ТГ с использованием данных индивидуальных измерений концентраций и скорости кровотока (табл. 1) в предварительном и опытным периодах были получены аналогичные значения (110 – 115 мг/мин), а в период восстановления дачи концентратов наблюдалась тенденция к увеличению этого баланса (125 мг/мин). Правильность проведенных расчетов подтверждается тем, что выход молочного жира (в отличие от продукции белка) в период пониженного уровня питания поддерживался на исходном уровне, несмотря на снижение кровотока, за счет увеличения концентрации его в молоке (Макар, 2003).

Снижение активности транспорта ряда метаболитов в секреторные клетки в период отмены концентратов, вероятно, было вызвано вариацией содержания в крови эндокринных факторов, в частности, инсулина и регуляторных пептидов. В литературе имеются данные о существенном снижении инсулина в крови у коров в

промежутках между периодами приема корма при двукратном кормлении. Если верно предположение о том, что активность транспорта аминокислот в клетки модифицируется инсулином, то оно может объяснить причину значительного увеличения выхода молочного белка в опытах с непрерывным введением инсулина при одновременном поддержании нормального уровня глюкозы (Sutton, 1988). Хотя в литературе нет прямых данных о вариации количественных параметров транспорта в этих условиях, однако отмеченное авторами одновременное увеличение объемной скорости кровотока и процентного извлечения аминокислот из крови указывает на то, что активность транспорта аминокислот в этих экспериментах увеличена в сравнении с контролем. Согласно кинетической модели, апробированной в наших опытах (Cant, 1995), коэффициент извлечения из крови не зависит от концентрации метаболита и определяется величиной $1/(1+Q/T)$, которая при повышенной скорости плазмотока Q может иметь более высокое значение только при условии одновременного, еще более существенного увеличения активности транспорта T . Отсутствие адаптивных изменений в активности транспорта глюкозы в наших опытах согласуется с данными литературы, свидетельствующими о том, что в клетках молочной железы перенос глюкозы через плазматическую мембрану осуществляется инсулиннезависимым транспортером (по-видимому, GLUT1).

В условиях непрерывной регистрации гемодинамики устойчивые изменения скорости кровотока выявлялись в опыте уже через 3 ч после сдвигов в уровне кормления (лишение концентратов или возобновление их дачи) (Макар, 2003). Наиболее ранние статистически достоверные признаки снижения уровня ЛЖК и повышения НЭЖК в артериальной крови отмечены через 8 ч от момента первого безконцентратного кормления; в период между 8 и 23 ч происходило адаптивное изменение активности транспорта изученных метаболитов (кроме глюкозы). Таким образом, в начальной фазе адаптации главную роль играли факторы, имеющие не субстратную, а сигнальную функцию. С другой стороны, после того, как изменились параметры системы и концентрации субстратов в крови, можно было ожидать, что скорость органного кровотока будет вновь определяться балансом субстратных потоков в клетке, как в предварительном периоде. В какой степени новое (сниженное) значение кровотока было обусловлено сдвигами в уровне субстратов и в какой – сдвигами в значениях параметров транспорта, можно выяснить с использованием системной модели (Cherempanov, 2000) после проведения дополнительных исследований. Предварительный анализ показал, что снижение величины двух внутренних параметров - активности транспорта и скорости синтеза молочного белка - действительно может приводить (на модели) к спаду уровня кровоснабжения, уменьшению удоя и выхода белка с молоком, как это и наблюдалось в опыте.

В плане развития теории молокообразования с позиций динамической биохимии, полученные данные, с учетом ранее проведенных исследований, можно резюмировать в следующем. В рамках краткосрочной регуляции синтеза компонентов молока баланс метаболических потоков в секреторных клетках молочной железы, по-видимому, обеспечивается за счет оперативных вариаций кровотока и создания равновесных концентрационных соотношений на фоне постоянства внутренних параметров (аффинностей, максимальных скоростей, эффекторных констант). Совокупность значений этих внутренних параметров теоретически может быть специфической для разных точек гомеостатической траектории, отражая сдвиги лактационной доминанты и инволюцию молочной железы. Для количественного прогноза этой траектории требуется специальная научная модель, учитывающая действие гормональных факторов и кинетику клеточных популяций. В ходе лактации и в процессе адаптации к изменившимся условиям питания происходит перенастройка значений внутренних параметров и в этом новом состоянии продуктивный отклик при одном и том же «нормальном» метаболическом профиле крови будет иным, хотя структура взаимодействий в системе остается прежней, меняются лишь значения коэффициентов. Поэтому для понимания регуляции субстратных потоков необходимо знание этих инвариантных структур (т.е. построение модели субстратного гомеостаза) и значений ключевых параметров с учетом стадии лактации, особенностей генотипа и условий питания.

Заключение

В целом полученные данные с учетом результатов проведенного теоретического анализа (Черепанов, в печати) позволили уточнить некоторые аспекты, существенные для понимания закономерностей использования субстратов в молочной железе, в частности, формирования их артерио-венозного баланса. Всегда, когда изменяется величина поступления данного метаболита внутрь клеток, параллельно этому меняется величина АВР и процентного извлечения его из крови (Е), но обратное не верно, поэтому эти показатели в этой обратной ситуации мало информативны. Когда кровоток уменьшается, венозная концентрация снижается, соответственно увеличивается величина АВР (и Е). Для характеристики функциональной активности клеток важна информация по изменениям венозной концентрации метаболита, т.к. для низкомолекулярных водорастворимых метаболитов она отражает концентрацию субстрата в межклеточной жидкости, контактирующей с плазматической мембраной клеток. По величине общего потока поглощения метаболита органом с учетом венозной концентрации можно оценить параметр активности транспорта субстрата через плазматическую мембрану секреторных клеток, который непосредственно отражает состояние (мощность) систем трансмембранного транспорта и, как

показали наши исследования, может варьировать в зависимости от уровня питания. Механизмы лимитирования молокообразования имеют количественную природу. Трудно рассчитывать на прогресс в понимании этих механизмов, если ограничиться эмпирическим изучением валовых показателей без учета составляющих компонент, действующих в противоположных направлениях и с разной амплитудой в разных условиях опыта. В данном случае эти компоненты представлены содержанием субстратов в крови, скоростью кровотока и активностью транспорта, а на разных стадиях лактации имеет значение и масса функционально активной секреторной ткани.

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании определенных звеньев в процессах органного кровоснабжения и транспорта субстратов в клетки молочной железы, которые служат объектом настройки со стороны управляющих систем в ходе адаптации к изменившимся условиям питания. Реакции органного кровоснабжения в начальной фазе этой адаптации могут опережать сдвиги в уровне метаболитов крови. Адаптивные изменения параметров транспорта метаболитов проявляются на последующей стадии, вероятно, с участием индукции (или депрессии) синтеза специфических белков – переносчиков. С учетом данных литературы последних лет, полученные результаты указывают на то, что основным звеном, лимитирующим потенциал повышения продукции молочного белка у высокопродуктивных коров, является активность системы транспорта аминокислот в секреторные клетки молочной железы.

Дальнейший прогресс в выяснении факторов, лимитирующих биосинтез компонентов молока, связан с уточнением количественных взаимосвязей и зависимостей транспортных и биосинтетических процессов от конкретных условий опыта. Взятые в совокупности, полученные результаты и данные литературы свидетельствуют о перспективности исследования этой проблемы не только в теоретическом плане, но и в плане поиска путей интенсификации биосинтеза компонентов молока.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Калужской области (грант № 02-04-96018).

ЛИТЕРАТУРА

1. Макар З.Н. Динамика кровоснабжения молочной железы и молокообразования при кратковременных сдвигах в уровне питания у коров. Сб. трудов ВНИИФБиП, 2003.
2. Постхумус Г. Массовые исследования содержания белка в молоке колориметрическим методом. В кн.: Методы определения белка в молоке. М. Колос, 1965.
3. Холод В.М., Ермолаев Г.Ф. Справочник по ветеринарной биохимии. Минск, 1988.
4. Черепанов Г.Г., Макар З.Н., Решетов В.Б., Токарев Т.Ю. Исследование сопряженной регуляции органной гемодинамики, биосинтеза и секреции компонентов молока в лактирующей молочной железе. Труды

регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Вып. 2. Калуга: 2001: 507-519.

5. Черепанов Г. Г., Токарев Т. Ю., Макаp З. Н. Косвенная оценка активности транспорта метаболитов в клетку *in vivo* по данным измерения их артерио-венозного баланса. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова (в печати).
6. Cant J.P., McBride B.W. Mathematical analysis of the relationship between blood flow and uptake of nutrients in the mammary glands of a lactating cow. J. Dairy Res. 1995, 62: 405-422.
7. Cant J.P., Trout D.R., Purdie N.G. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. J. Dairy Sci. 2002, 85: 494-503.
8. Cherepanov G.G., Danfaer A., Cant J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. J. Dairy Res. 2000, 67: 171-188.
9. Davis S.R., Collier R.J. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. J. Dairy Sci. 1985, 68: 1041-1058.
10. Duncombe, W.G., Nishi, H. The colorimetric determination of long chain fatty acids in the 0.05-0.5 μ mole range. Biochem. J. 1962, 83: 6P (230).
11. Griinari, J.M., McGuire, M.A., Dwyer, D.A., et al. The role of insulin in the regulation of milk protein synthesis in dairy cows. J. Dairy Sci. 1997, 80: 2361-2371.
12. Mackle T.R., Bauman D.E. Recent developments in the regulation of milk protein production. Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY: 1998: 104-113.
13. Mackle T.R., Dwyer D.A., Ingvarsten K.L., Chouinard P.Y., Ross D.A., Bauman D.E. Effects of insulin and postruminal supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis. J. Dairy. Sci. 2000, 83 (1): 93-105.
14. Mitsukawa H., Shimizu O., Nishi, H. Colorimetric determination of α -amino nitrogen in urine and plasma with ninhydrin reaction. Agric. Biol. Chem. 1971, 35: 272-274.
15. Nielsen M.O., Madsen T.G., Hedeboe A.M. Regulation of mammary glucose uptake in goats: role of mammary gland supply, insulin, IGF-1 and synthetic capacity. J. Dairy Res., 2001, 68: 337-349.
16. Sutton J.D. Hart I.C. Morant S.V., Schuller E., Simmonds A.D. Feeding frequency for lactating cows: diurnal patterns of hormones and metabolites in peripheral blood in relation to milk fat concentration. Br. J. Nutr. 1988, 60: 265-274.

**ДИНАМИКА КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ВЫМЕНИ,
МОЛОКООБРАЗОВАНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ
ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ МОЛОКА В КРОВИ У КОРОВ ПРИ
КРАТКОВРЕМЕННЫХ СДВИГАХ УРОВНЯ ПИТАНИЯ**

З.Н. Макаp, И.А. Бояршинов, Р.И. Корнеева, П.В. Матющенко, М.И. Сапунов
Лаборатория физиологии и биохимии лактации

На лактирующих коровах в условиях 24-часового лишения концентратной части рациона, с последующим возобновлением кормления в полном объеме, показано, что в ранней фазе адаптации к

изменению уровня питания сдвиги в интенсивности кровоснабжения вымени предшествуют изменениям в уровне метаболитов крови и показателей молокообразования, т.е. механизм влияния уровня питания в этой фазе имеет не субстратную, а сигнальную природу.

Введение

К настоящему времени все еще крайне мало известно о природе механизма, посредством которого количество и качество корма влияет на функциональную активность секреторных клеток молочной железы. В то же время познание этого механизма, несомненно, будет способствовать разработке эффективных способов управления процессом молокообразования.

Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о существенном влиянии факторов питания на распределение питательных веществ у жвачных. Так, установлено, что в условиях кратковременного лишения корма уменьшается доля сердечного выброса, поступающего к молочной железе: у коз на 50%, а у коров - на 40% (Chaiyabutr et al., 1980; Davis, Collier, 1985). Ранее нами получены данные, которые позволили заключить, что существует механизм регуляции кровоснабжения вымени, который зависит от поступления корма в организм коровы (Макар, 1992). Недавно получен экспериментальный материал, свидетельствующий, что при голодании снижается непосредственно капиллярный кровоток в молочной железе (Farr et al., 2000). Однако на вопрос, в чем состоит этот механизм, все еще предстоит дать ответ. Тот факт, что после удаления корма кровоснабжение в интактных и денервированных молочных железах снижалось в одинаковой степени (Linzell, 1974) свидетельствует о том, что в данном случае регуляция носит не нейрогенный, а гуморальный характер. В этой связи важно выяснить, какова при этом роль метаболического профиля крови. Известно, что в условиях пониженного в течение продолжительного периода времени уровня питания, содержание основных субстратов в крови лактирующих жвачных изменяется не существенно (Davis et al., 1985), что может быть обусловлено адаптивными изменениями в их организме. Следовательно, важно исследовать взаимосвязь между гемодинамикой вымени и содержанием основных субстратов в крови непосредственно в ходе изменения уровня питания.

В связи с вышеизложенным, а также для более детальной характеристики взаимосвязи между гемодинамикой вымени и процессом молокообразования, целью настоящей работы явилось комплексное исследование суточной гемодинамики, метаболического профиля крови и продукции основных компонентов молока при кратковременных сдвигах в уровне питания.

Материал и методы

Эксперименты проведены в виварии института на четырех коровах-первотелках. Трём животным перед началом опыта на наружную срамную артерию одной из половин вымени оперативным путем имплантировали датчик объемной скорости кровотока ультразвукового флоуметра T201 (Transonic Systems Inc., USA). Опыт состоял из трех периодов: исходного (24 ч), основного (24 ч) и заключительного (48 ч). В исходном и заключительном периодах эксперимента коровы получали рацион с содержанием концентрированных кормов на уровне 50% по обменной энергии. В основном периоде опыта животные были лишены концентратной части рациона с последующим возобновлением кормления в полном объеме в заключительном периоде. Коров кормили и доили два раза в сутки, соответственно в 8, 20 и 6, 18 ч. В течение всего эксперимента проводили ежедневный учет поедаемости корма. На протяжении всех трех периодов опыта регистрировали гемодинамику вымени в круглосуточном режиме и периодически (7, 11 и 16 ч) отбирали пробы крови из сонной артерии. Содержание глюкозы в крови определяли с помощью глюкозооксидазного метода. В плазме крови определяли содержание α -аминоазота (Mitsukawa et al., 1971), НЭЖК (Duncombe, 1962), β -оксибутирата (Холод и др., 1988) и триацилглицеролов посредством энзиматического колориметрического метода с помощью набора реагентов фирмы «Витал Диагностика СПб». В молоке определяли содержание жира на анализаторе молока Milko-tester F3140 (Foss Electric, Дания) и белка колориметрическим методом (Постхумус, 1965).

Достоверность различий сравниваемых величин оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, лишение подопытных коров концентратной части рациона вызвало значительные изменения в динамике суточного кровоснабжения вымени. Уже через 2,5 ч после прекращения дачи концентратов объемная скорость кровотока через вымя заметно снизилась. В течение последующих часов основного периода опыта кровоснабжение вымени продолжало неуклонно снижаться. Так, через 8 ч после удаления концентратов оно упало до 66,7% ($P < 0,05$), а через 23 ч – до 50,8% ($P < 0,01$) от исходного уровня (табл.1). Возобновление кормления в полном объеме привело к быстрому восстановлению кровоснабжения молочной железы. Через 10 ч после дачи животным концентратов объемная скорость кровотока вернулась к исходным значениям (рис. 2). В течение последующих суток заключительного периода гемодинамика вымени практически не отличалась от контрольных значений. В этом периоде опыта, как и в исходном через 3

часа после кормления животных (8 ч и 20 ч), наблюдалось усиление кровоснабжения вымени (рис.3).



Рис.1. Динамика кровоснабжения вымени коров при удалении концентратной части рациона. * Точки на графике представляют средние значения по трем животным.

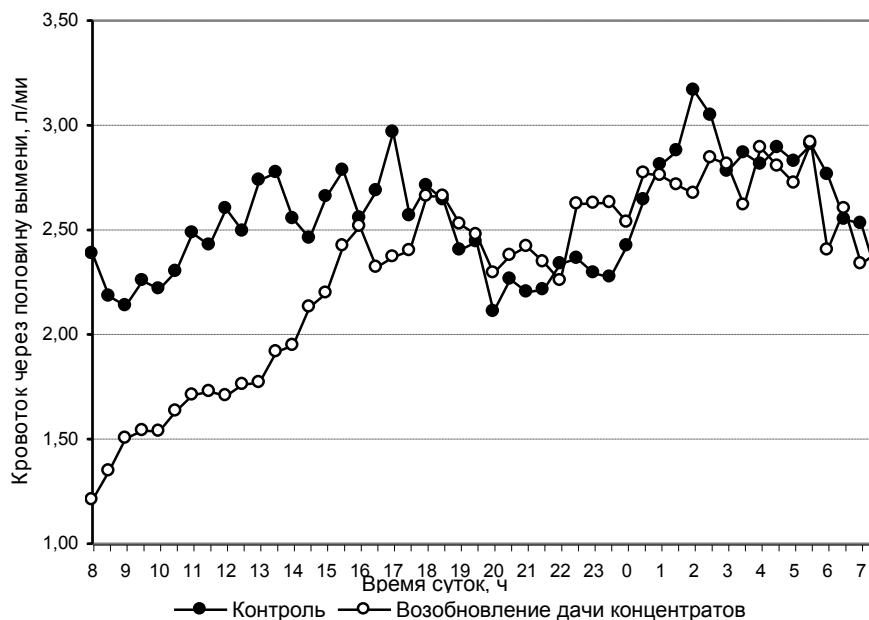


Рис. 2. Динамика кровоснабжения вымени коров при возобновлении дачи концентратов в течение первых суток. * Обозначения те же, что и на рис.1.



Рис. 3. Динамика кровоснабжения вымени коров при возобновлении дачи концентратов в течение вторых суток. * Время кормления – 8 и 20 ч.

Как видно из таблиц 1 и 2, кратковременное лишение концентратной части рациона вызвало выраженное снижение удоя подопытных коров. После возобновления дачи концентратов через полтора суток удой вернулся к исходному уровню. В условиях пониженного уровня питания содержание жира в молоке за первую половину суток повысилось на 13,5%, а за вторую – на 31,3% ($P < 0,05$). Концентрация этого компонента молока оставалась повышенной и в течение заключительного периода опыта.

Таблица 1. Влияние суточной депривации концентратов на молочную продуктивность и состав молока за первую половину суток

Показатели	Периоды опыта			
	исходный (нормальный уровень кормления)	основной (лишение концентра тов)	заключительный	
			возобновление дачи концентратов (первые сутки)	возобновление дачи концентратов (вторые сутки)
Удой, кг	5,4±0,97	4,9±0,75	4,4±0,32	5,4±1,00
в % от исходного	100,0	91,4	82,1	99,4
Жир, %	3,01±0,29	3,41±0,43	3,96±0,28	3,49±0,41
в % от исходного	100,0	113,5	131,7	116,1
Продукция жира, г	160,0±25,9	163,8±17,09	173,9±5,19	182,5±25,8
в % от исходного	100,0	102,3	108,7	114,0
Белок, %	2,96±0,14	3,14±0,09	2,88±0,07	2,96±0,16
в % от исходного	100,0	105,8	97,3	99,9
Продукция белка, г	158,3±23,3	154,9±19,5	128,0±10,9	155,0±21,0
в % от исходного	100,0	97,9	80,9	98,0

Таблица 2. Влияние суточной депривации концентратов на молочную продуктивность и состав молока за вторую половину суток

Показатели	Периоды опыта			
	исходный (нормальный уровень кормления)	основной (лишение концентра тов)	заклучительный	
			возобновлен ие дачи концентратов (первые сутки)	возобновление дачи концентратов (вторые сутки)
Удой, кг	7,1±1,19	5,0±0,54	6,7±1,03	7,6±0,98
в % от исходного	100,0	71,2	95,3	107,1
Жир, %	3,11±0,15	4,09±0,24*	3,44±0,23	3,33±0,20
в % от исходного	100,0	131,3	110,6	107,0
Продукция жира, г	216,5±28,4	205,2±23,9	229,6±21,5	243,7±18,2
в % от исходного	100,0	94,8	106,1	112,6
Белок, %	3,05±0,09	3,02±0,10	2,83±0,12	3,00±0,13
в % от исходного	100,0	98,9	92,7	98,4
Продукция белка, г	216,9±39,4	152,8±20,3	192,9±30,8	221,7±23,7
в % от исходного	100,0	70,5	88,9	102,2

*p<0.05 по сравнению с исходным периодом

Содержание белка в молоке в основном периоде эксперимента за первую половину суток повысилось на 5,8%, однако за вторую половину суток снизилось на 1,1%. В заключительном периоде опыта уровень белка в молоке вернулся к исходному значению в первой половине вторых суток (табл.2).

Производство жира молока за первую половину суток в условиях депривации концентратов не претерпела существенных изменений, а за вторую половину - незначительно снизилась и составила 94,8% от исходного уровня. Напротив, производство белка молока понизилось уже в течение первой половины основного периода опыта (табл.1), а во второй – упала до 70,5% от исходного уровня. Возобновление дачи концентратов привело к быстрому восстановлению производства белка молока (табл.2).

Полученный экспериментальный материал свидетельствует, что в условиях лишения животных концентратной части рациона и последующего возобновления кормления в полном объеме, изменения в гемодинамике вымени были более выражены и наступали раньше, чем изменения в удое и производстве белка и жира молока. Так, если в течение первого 12-часового интервала после удаления концентратов объемная скорость кровотока снизилась до 82,8% от исходного уровня, то удой и производство белка молока понизились соответственно только до 91,4 и 97,9%, а уровень производства молочного жира практически не изменился (рис.4). Во время второго 12-часового интервала основного периода опыта объемная скорость кровотока составила 61,3% ($P < 0,05$) от исходного уровня, а удой, производство молочного белка и жира соответственно 71,2, 70,5 и 94,8% (рис.4). После возобновления дачи концентратов в течение второй половины суток объемная скорость кровотока повысилась на 38,8%, в то время как удой и производство белка молока выросли соответственно только на 24,1 и 18,4% (рис.4). Эти данные свидетельствуют о том, что в ранней фазе адаптации к изменению уровня питания не функциональная активность секреторного эпителия молочной железы определяет ее гемодинамику, а напротив, сдвиги в кровоснабжении вымени детерминируют процесс молокообразования.

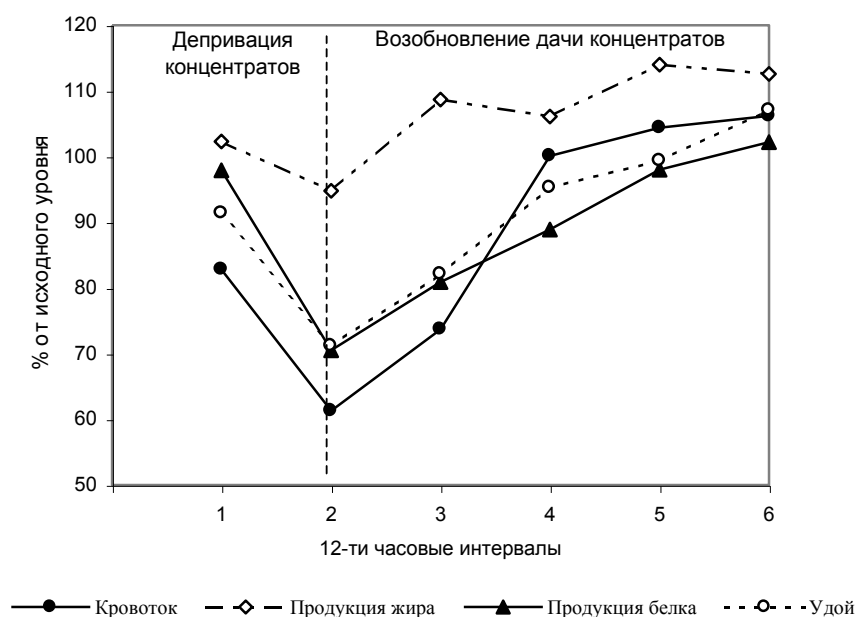


Рис.4. Динамика кровотока вымени, удоя и продукции основных компонентов молока в условиях удаления концентратов и последующего возобновления кормления в полном объеме.

В таблице 3 представлены данные об отношении кровотока вымени к удою, которое характеризует количество крови, прошедшей через молочную железу за период образования 1 кг молока. Если в условиях нормального кормления отношение объемной скорости кровотока к удою за 1-ю половину суток было равно 579 (100,0%), то уже за первую половину суток в условиях депривации концентратов оно снизилось до 90,5%, а за вторую половину суток – до 83,7%. Возобновление дачи концентратов сопровождалось увеличением отношения кровотока/удой (табл.3). Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях снижения уровня питания повышается эффективность утилизации секреторным эпителием предшественников молока и, напротив, при повышении уровня питания эффективность их использования падает.

Таблица 3. Влияние лишения концентратов в течение суток на отношение кровотока/удой

Показатели	исходны й	основной (лишение концентрато в)	Периоды опыта	
			заключительный	
			возобновлен ие дачи концентрато в (первые сутки)	возобновление дач концентратов (вторые сутки)
Кровоток/Удой за 1-ю половину суток	579±42,4	524±34,9	520±38,7	611±57,5
Разность [†]		55,3±7,36***	59,7±8,84**	-31,0±16,19
Кровоток/Удой за 2-ю половину суток	560±91,8	468±51,4	585±95,8	544±72,1
Разность		91,3±30,46*	-25,3±5,78**	15,7±28,42
Кровоток/Удой за сутки	565±70,7	495±43,8	555±69,9	569±66,0
Разность		70,3±17,03*	10,7±5,33	-4,0±10,58

[†] Разность значений, полученных до и после изменения уровня питания;

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

После кратковременного прекращения скармливания концентратов содержание в артериальной крови аминокислот, глюкозы, триацилглицеролов и β-оксибутирата, в отличие от кровоснабжения вымени, существенно не понизилось, а концентрация НЭЖК – возросла (рис.4,5). После возобновления дачи концентратов содержание в артериальной крови триацилглицеролов, β-оксибутирата и НЭЖК не отличалось от исходного уровня, а изменения в концентрации аминокислот и глюкозы не были синхронны с изменениями кровотока (рис.4, 5).

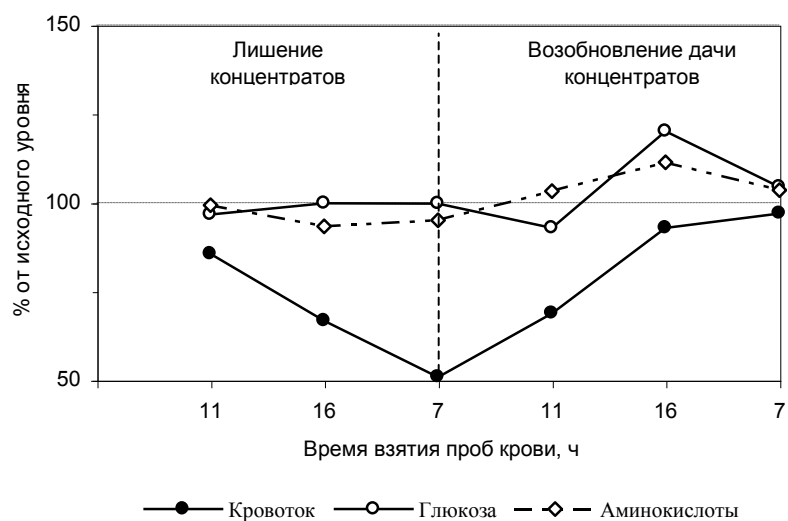


Рис.5. Кровоснабжение вымени и содержание в артериальной крови аминокислот и глюкозы в условиях лишения животных концентратной части рациона и последующего возобновления кормления в полном объеме.

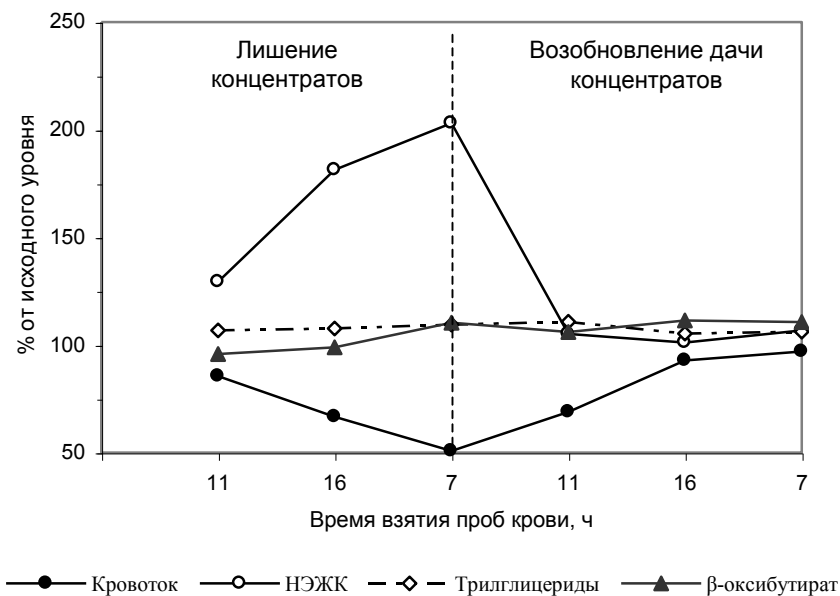


Рис.6. Содержание в артериальной крови НЭЖК, триацилглицеролов и β-оксибутирата в условиях лишения животных концентратной части рациона и последующего возобновления кормления в полном объеме

Заключение

Полученный экспериментальный материал выявляет новый, ранее не исследованный аспект в механизме влияния уровня питания на функциональную активность секреторного эпителия молочной железы, состоящий в том, что в ранней фазе адаптации к изменению уровня питания не сдвиги в уровне основных субстратов крови определяют интенсивность биосинтеза компонентов молока и кровоснабжение вымени, а изменения кровотока детерминируют процесс молокообразования и способствуют поддержанию субстратного баланса в организме. Поскольку эта реакция имеет не субстратную, а сигнальную природу, полученные данные позволяют высказать предположение о существовании медиаторных факторов, регулирующих сосудистое сопротивление вымени в зависимости от состояния питания. Идентификация этих факторов, несомненно, будет способствовать разработке способов оптимизации биосинтеза компонентов молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макар З.Н. Влияние кратковременного голодания на кровоснабжение вымени коровы. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных. 1992, 2-3 (103-104): 74-78.
2. Постхумус Г. Массовые исследования содержания белка в молоке колориметрическим методом. В кн.: Методы определения белка в молоке. М. Колос. 1965, 110 с.
3. Холод В.М., Ермолаев Г.Ф. Справочник по ветеринарной биохимии. Минск. 1988, 167 с.
4. Chaibabutr N., Faulkner A. and Peaker M. Effect of starvation on the cardiovascular system, water balance and milk secretion in lactating goats. Res. Vet. Sci. 1980, 28, 3: 291-295.
5. Farr V.C., Prosser C.G., and Davis S.R. Effects of mammary engorgement and feed withdrawal on microvascular function in lactating goat mammary glands. Am. J. Physiol. Heart and Circ. Physiol. 2000, 279, 4: 1813-1818.
6. Davis S.R. and Collier R.J. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. J. Dairy Sci. 1985, 68, 4: 1041-1058.
7. Duncombe W.G. The colorimetric determination of long chain fatty acids in the 0.05-0.5 μ mole range. The Biochemical Journal. 1962, 83, 1: 6 P (230).
8. Linzell J.L. Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk. In: Lactation. 1974, 1:143-225. B.L. Larson, V.R. Smith, ed. Academic Press, New York, NY.
9. Mitsukawa H., Shimizu O. and Nishi H. Colorimetric Determination of α -Amino Nitrogen in Urine and Plasma with Ninhydrin Reaction. Agr. Biol. Chem. 1971, 35, 2: 272-274.

ДИНАМИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУБСТРАТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

(исследования на модели и в эксперименте)

Т.Ю.Токарев

Данные вычислительного эксперимента, проведенного с использованием двух версий модели интермедиарного обмена, сопоставлены с данными измерений, проведенных на коровах в условиях нагрузки разными субстратами. Изменения продуктивных показателей в широкой области концентраций субстратов в крови лучше прогнозируются при использовании модифицированной модели, учитывающей механизм ауторегуляции кровотока в молочной железе.

Введение

Системное моделирование биологических процессов в настоящее время широко применяется в мире, в том числе в области количественной динамической биохимии продуктивных животных. Одной из задач, решаемых в рамках данного направления, является прогнозирование продуктивности животных с учётом баланса метаболитов в организме. Особенно актуальны эти исследования в связи с разработкой теории питания сельскохозяйственных животных, адекватного физиологическим потребностям разных генотипов, требующей количественного описания баланса энергетических и субстратных потоков в организме. Решение данной проблемы позволит лучше понимать процессы, протекающие на уровне организма и отдельных тканей, и перейти в дальнейшем к реализации практически полезных систем, предназначенных для мониторинга продуктивных функций.

Первые попытки провести моделирование метаболических систем оказались недостаточно эффективными из-за большого числа уравнений, описывающих биологические процессы (Гарфинкель, 1967). Первая отечественная версия имитационной модели метаболизма у лактирующих коров была разработана в 1993 году (Черепанов и др., 1994) в плане развития агрегативного (компарментного) подхода (Baldwin, Smith, 1971; Baldwin et al. 1980, 1995; Cherepanov, 2001). Параметры модели были оценены по имеющимся в литературе данным радиоизотопного анализа, активности ферментов, данным измерений, проведённых *in vitro* на кусочках тканей и культурах клеток, по результатам измерений концентраций метаболитов, изменений массы тканей и баланса энергии у коров. В этой модели в явном виде описаны три системы органов: постная часть туши (поперечно-полосатые мышцы, скелет, кожа и другие второстепенные органы), жировая ткань и внутренние органы (ЖКТ, печень, сердце и др.). Для лактирующей коровы с «пустой» массой 500 кг (живая масса 600 кг)

масса внутренних органов оценивается в 75 кг, жировой ткани – 75 кг (60 кг – триацилглицеролы, 15 кг – структурные и цитоплазматические элементы). Описание обменных процессов проведено в рамках теории компартментного анализа, т.е. в понятиях гомогенных пулов и потоков (модели локализованного обмена по Берману, 1967). Входом для данной версии модели являлись потоки всасывания субстратов, которые определяются в субмодели рубцового пищеварения, исходя из химического состава рациона. Однако модель неадекватно предсказывала изменение удоя при инфузии ацетата, не учитывала изменение скорости поглощения субстратов в молочной железе при изменении скорости кровотока, давала адекватный прогноз только в небольшом интервале физиологических концентраций.

Исходя из вышеизложенного, нами была предпринята попытка разработать модифицированную модель интермедиарного обмена. При этом в качестве субмодели молочной железы использовалась имитационная модель биосинтеза компонентов молока в молочной железе коров, с уточнёнными параметрами, учитывающими сопряжённую ауторегуляцию кровотока и метаболизма (Cherepanov et al., 2000).

Материал и методы

Материалом для разработки уточнённой модели интермедиарного обмена послужили данные комплексных опытов, проведённых лабораториями института на лактирующих коровах с имплантированными периваскулярными датчиками объёмной скорости кровотока (Transonic[®], USA), наложенными на артерию, питающую молочную железу, и с канюлями рубца и двенадцатиперстной кишки (отчеты ВНИИФБиП 1995-2001 гг.).

Основой для оценки потоков субстратов, используемых в энергетическом обмене, послужили данные респирационных и обменных опытов, а также теоретические разработки на основе анализа стехиометрии реакций биосинтеза молочного жира, белка и лактозы. Новым элементом в этом анализе является уточнение количества ацетата используемого для биосинтеза жирных кислот молочного жира и для образования макроэргических соединений в секреторных клетках молочной железы.

Результаты и обсуждение

По данным исследований 2000 и 2001 гг., при инфузии физиологических доз отдельных субстратов в желудочно-кишечный тракт наблюдались небольшие отклонения жирности молока и белкомолочности. Так, при инфузии ацетата возрастала жирность молока, при инфузии глюкозы – она снижалась, при инфузии аминокислот – повышался уровень белка в молоке. В целом

аналогичные показатели были получены и во время вычислительного эксперимента.

Из таблицы 1 видно, что прогнозируемые значения суточного удоя и состава молока находятся в пределах физиологической нормы для коров чёрно-пёстрой породы. Увеличение концентрации ацетата в артериальной крови в прогнозных оценках сопровождается повышением содержания жира, свободных аминокислот - содержания белка в молоке и его суточной продукции, глюкозы – повышением суточного удоя и снижением содержания белка в молоке. Это согласуется с данными, полученными разными авторами в опытах на животных (Дудин, 2001; Rulquin, Delaby, 1997; Hurtaud, 1998). Оба варианта модели при заданном уровне субстратов в крови давали в общем аналогичные значения этих показателей при базовых уровнях и в условиях, имитирующих небольшое повышение концентраций субстратов в крови (табл.1).

Таблица 1. Показатели состава молока и прогноз изменений суточного состава молока при изменении концентрации субстратов в крови, полученные с использованием первоначального варианта модели интермедиарного обмена и модифицированного варианта, учитывающего механизм ауторегуляции кровотока.

Инфузия*	Содержание в молоке	Контроль	Опыт	Модель 1		Модель 2	
				база	прогноз	база	прогноз
Ацетат	Белок	2,73±0,03	2,65±0,1	2.89	2.89	2.88	2.89
	Жир	3,14±0,1	3,2±0,05	3.11	3.15	3.13	3.16
Глюкоза	Белок	2,74±0,03	2,82±0,08	2.89	2.82	2.88	2.78
	Жир	3,23±0,12	3,18±0,1	3.11	3.09	3.13	3.00
Сумма аминокислот	Белок	2,66±0,02	2,73±0,04	2.89	2.92	2.88	2.99
	Жир	3,45±0,23	3,52±0,1	3.11	2.96	3.13	3.09

* - Базовые уровни субстратов крови для модельных расчетов (мМ): глюкоза - 2,7; аминокислоты - 2,1; ацетат - 1,9; НЭЖК - 0,35. Прогнозные значения получены при увеличении уровня субстратов на 10%.

Как видно из таблицы 2, различия между данными опыта с инфузией ацетата и данными, полученными в ходе вычислительного эксперимента на базовом варианте модели, составили 8,3% для белка и 1,6% для жира.

При инфузии глюкозы различия между данными, полученными опытным путём на животных и в вычислительном эксперименте, составили соответственно 2,8% и 2,9%.

При сравнении содержания белка и жира в молоке при увеличении концентрации в крови аминокислот, различия между данными, полученными в ходе опытов на животных, и в вычислительном эксперименте на базовом варианте модели интермедиарного обмена, составили 6,5% и 14% соответственно.

Различия по содержанию белка и жира в молоке между экспериментальными данными и данными, полученными с использованием модифицированного варианта модели, при инфузии

ацетата составили 8,3% и 1,27%, глюкозы – 1,4% и 6%, аминокислот – 8,7% и 13,9% соответственно.

В серии вычислительных экспериментов, имитирующих нагрузки субстратами в повышающейся концентрации, также не выявлено существенных различий между двумя вариантами модели по составу молока (табл.2, 3, 4). Так, при изменении концентрации глюкозы в крови от 1,5 до 5,5 мМ разница по удою колебалась в пределах от 0,31 до 9,1%, содержанию белка – от 0 до 20,63%, содержанию жира – от 8 до 35%.

Таблица 2. Динамика изменения молочной продуктивности коров в зависимости от концентрации глюкозы в артериальной крови (прогноз по модели)

Глюкоза, мМ	Модель 1*			Модель 2*		
	удой, л	белок, %	жир, %	удой, л	белок, %	жир, %
0,0015	15,47	3,61	3,41	15,4	4,46	3,96
0,0027	19,37	2,89	3,11	19,31	3,13	2,88
0,0035	20,86	2,68	3,02	20,39	2,68	2,53
0,0045	22,15	2,52	2,93	22,46	2,27	2,17
0,0055	23,05	2,42	2,88	25,35	2,00	1,91

* - Модель 1 – базовая модель, модель 2 – модифицированная модель.

Таблица 3. Динамика изменения молочной продуктивности коров в зависимости от концентрации ацетата в артериальной крови (прогноз по модели)

Ацетат, мМ	Модель 1*			Модель 2*		
	удой, л	белок, %	жир, %	удой, л	белок, %	жир, %
0,0001	19,37	2,89	2,45	19	2,97	2,47
0,001	19,37	2,89	2,91	20	2,98	2,98
0,0019	19,37	2,89	3,11	19,31	2,88	3,13
0,003	19,37	2,89	3,25	19,71	2,88	3,22

* - Модель 1 – базовая модель, модель 2 – модифицированная модель.

При изменении концентрации ацетата с 0,1 до 3 мМ разница составила 0,3-5,4%, 0,4-3%, 0,6-2,4% соответственно. При изменении концентрации аминокислот с 1,5 до 5,5 мМ отличия по удою колебались от 0,3 до 22,3%, по содержанию белка – от 0,35 до 12,08%, по содержанию жира – от 0,64 до 20,68%.

Таблица 4. Динамика изменения молочной продуктивности коров в зависимости от концентрации аминокислот в артериальной крови (прогноз по модели)

Сумма аминокислот, мМ	Модель 1*			Модель 2*		
	удой, л	белок, %	жир, %	удой, л	белок, %	жир, %
0,0015	16,68	2,79	3,62	17,91	2,61	3,27
0,0021	19,37	2,89	3,11	19,31	2,88	3,13
0,0035	23,1	3,02	2,61	20,71	3,27	3
0,0045	24,68	3,09	2,44	21,01	3,44	2,97

0,0055	25,81	3,13	2,34	21,09	3,56	2,95
--------	-------	------	------	-------	------	------

* - Модель 1 – базовая модель, модель 2 – модифицированная модель.

Таким образом, в небольших пределах отклонений от базового уровня концентраций субстратов в крови, исследованные варианты модели являются сопоставимыми на данном этапе, но в более широкой области изменений концентраций различия в прогнозе удоя и состава молока между двумя исследованными вариантами модели проявляются в большей степени. Для окончательного обоснования области применения того или иного варианта необходимо дальнейшее накопление экспериментального материала.

В ходе проведения вычислительных экспериментов было установлено, что оба варианта модели интермедиарного обмена удовлетворительно предсказывают динамику молочной продуктивности при изменении концентрации основных метаболитов в крови, и различия между ними при физиологических концентрациях субстратов в крови являются незначительными. Исходя из этого, можно констатировать, что введение в модель интермедиарного обмена субмодели молочной железы, основанной на концепции энергетической ауторегуляции кровотока, не привело к значительному улучшению предсказательной способности модели. Тем не менее, модифицированная модель учитывает большее число показателей, влияющих на продуктивность животных, лучше предсказывает удои при значительных изменениях концентрации субстратов в крови и адекватно оценивает направление основных биохимических процессов в организме животных.

Заключение

Прогноз изменения удоя, содержания жира и белка в молоке под влиянием изменения концентрации в крови основных метаболитов, полученный с использованием двух версий имитационной модели, подтверждается на качественном уровне данными опытов на животных. Это свидетельствует о правильности общей концепции и структуры теоретической модели.

Модифицированная модель интермедиарного обмена точнее предсказывает изменение удоя при инфузии ацетата и учитывает изменение скорости поглощения субстратов в молочной железе при изменении скорости кровотока.

Так как различия между двумя вариантами модели интермедиарного обмена являются незначительными в области физиологических концентраций, то необходимо дальнейшее накопление экспериментального материала и создание базы данных для обоснования применения того или иного варианта.

Полученные в ходе исследований данные позволяют оценить направленность метаболических процессов, определяющих продуктивность лактирующих коров, что даёт основу для перехода в

дальнейшем к реализации практически полезных систем, предназначенных для мониторинга продуктивных функций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берман М. Модели локализованного обмена в кинетике. В кн.: Вычислительные устройства в биологии и медицине, М., Мир, 1967: 373 – 408.
2. Гарфинкель Д. Моделирование биохимических систем. В кн.: Вычислительные устройства в биологии и медицине, М., Мир, 1967: 346 – 373.
3. Дудин П.В. Влияние дицетата натрия на обмен липидов, жиромолочность и удой коров. Авт. дисс... д.б.н., Боровск, 2001: 25с.
4. Черепанов Г.Г., Жиркова И.Н., Решетов В.Б. Количественный анализ процессов интермедиарного обмена у коров (эскизная модель). С.-х. Биология, 1994, 4: 123-134.
5. Baldwin R.L., Smith N.E., Taylor J., Sharp M. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion // J. Anim. Sci., 1980, 51: 1416.
6. Baldwin R.L. Modeling ruminant digestion and metabolism. Chapman & Hall. New York, 1995.
7. Cherepanov G.G., Danfaer A., Cant J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. J. Dairy Res., 2000, 67: 171-188.
8. Cherepanov G.G. A morphophysiological conception and model of animal growth. J. Anim. Food Sci., 2001, 10: 385-397.
9. Hurtaud C., Rulquin H., Verite R. Effects of level and type of energy source (volatile fatty acids or glucose) on milk yield, composition and coagulating properties in dairy cows : Reprod. Nutr. Dev. 1998 May-Jun; 38(3): 315-330
10. Hurtaud C., Rulquin H., Verite R. Effects of graded duodenal infusions of glucose on yield and composition of milk from dairy cows. 1. Diets based on corn silage. : J Dairy Sci., 1998, Dec; 81(12): 3239-3247.
11. Rulquin H, Delaby L. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. J. Dairy Sci., 1997, Oct; 80(10): 2513-2522.

Влияние различного уровня картофельного крахмала в рационах коров на микрофлору, биосинтез витаминов В₃, В₆, В₁₂ в рубце и поступление их в кровь и молоко

И.А. Долгов, С. И. Долгова
Лаборатория пищеварения

Показано, что при увеличении доли картофельного крахмала в рационе коров с 11,7 до 18% происходит изменение соотношений между видами микроорганизмов в сторону увеличения процентного содержания лактобактерий (ауксогетеротрофов), уменьшения биосинтеза пантотеновой

кислоты, пиридоксина, цианкобаламина в рубце и поступления их в кровь и молоко.

Введение

Одной из важнейших функций микроорганизмов рубца жвачных животных является расщепление крахмала, которым особенно богаты зерновые корма. Крахмал легко ферментируется в рубце с образованием летучих и нелетучих жирных кислот и служит доступным источником энергии как для животного, так и для многих видов микроорганизмов. Образующиеся при распаде крахмала декстрины и олигосахариды используются неамилолитическими бактериями. Анаэробное расщепление промежуточных продуктов крахмала микроорганизмами является продолжением его гидролиза, в результате которого образуются такие же конечные метаболиты, как и при ферментации других углеводов. Считают, что микрофлора преджелудков неоднозначно реагирует на различные уровни и источники энергии в рационе. В литературе имеются данные, что в содержимом рубца, взятом через сутки после дачи коровам 10 кг ячменя (4,8 кг крахмала) лактобациллы составляли 60-65% всех бактерий. При этом рН содержимого рубца снижался и составлял 4,5, а концентрация молочной кислоты возрастала до 912 мг/100 мл (Mann, 1970). Автор считает, что наблюдавшееся увеличение численности лактобактерий связано с использованием промежуточных продуктов ферментации крахмала. В то же время при добавлении в кормовой рацион ячменя, в состав которого входит крахмал, не наблюдалось увеличения числа *Str. bovis*, обладающего амилалитическими свойствами (Hungate, 1957). В опытах на коровах показано, что увеличение в энергетической части рациона доли крахмала при постоянном уровне клетчатки сопровождается повышением в рубце численности йодофильных, амилалитических, лактатферментирующих бактерий и селеномонад (Коленько и соавт., 1970). Отмечено также, что с увеличением потребления коровами зерна кукурузы численность целлюлозолитических бактерий *Butyrivibrio fibrisolvens* и *Ruminococcus flavefaciens* возрастает (Van der Linden, 1984). Это свидетельствует о том, что снижение переваримости клетчатки с увеличением уровня зерна в рационе не связано с уменьшением численности целлюлозолитических бактерий в рубце.

Одной из важнейших видов деятельности микрофлоры рубца является синтез витаминов комплекса В. По данным Satton, Elliot (1972), Elliot (1973) при высокозерновом рационе достоверно снижался синтез истинного витамина В₁₂ в преджелудках высокопродуктивных коров. При содержании в рационе 60% концентратов в основном синтезировались его аналоги. При этом концентрация цианкобаламина в печени и молоке была более низкой по сравнению с контрольными животными, получавшими сено без ограничения, хотя в рацион опытных животных кобальт был введен в избытке. Можно

предположить, что наблюдавшаяся в этих случаях кетонурия была вызвана нарушением превращения пропионовой кислоты в глюкозу, при снижении содержания в печени витамина В₁₂. Вместе с тем, высоконцентрированный тип кормления высокопродуктивных коров неизбежен. Крахмал является главным компонентом, определяющим энергетическую ценность концентратов и ключевым фактором, влияющим на жизнедеятельность микроорганизмов рубца. В связи с этим придается особое значение исследованиям, направленным на изучение его влияния на рубцовый метаболизм, так как практически отсутствуют сведения о влиянии различного содержания картофельного крахмала в рационе жвачных животных на микрофлору (ауксотрофов), биосинтез водорастворимых витаминов в рубце, поступление их в кровь и молоко. Наличие вышеуказанной информации необходимо для понимания механизмов регуляции биосинтеза и эффективного использования витаминов комплекса В у лактирующих коров при различных условиях кормления. Некоторые из полученных результатов по данному вопросу приводятся ниже.

Материал и методы

Опыт проведен в условиях вивария института на коровах-первотелках холмогорской породы, в первой и второй половине лактации, методом периодов. В первом периоде опыта в рацион коров включали: сено злаково-разнотравное, силос разнотравный, свеклу кормовую, комбикорм, состоявший из соевого шрота – 48,6%, дерти ячменной – 20,4%, картофельного крахмала – 27,8%, соли и трикальцийфосфата – 1,6%. Крахмал в сухом веществе рациона составлял 18%. Рацион коров во втором периоде опыта отличался составом комбикорма, включающего соевый шрот – 56,4%, дерть ячменную – 24,3%, картофельный крахмал – 16,1%, соль и трикальцийфосфат в тех же соотношениях. Крахмал в сухом веществе рациона составлял 11,7%.

Животные были прооперированы путем наложения ангиостомической канюли на воротную вену, по методу разработанному Л.А. Заболотновым. Кроме того, они имели лодочку на наружной сонной артерии для взятия проб артериальной крови.

Во время проведения исследований у животных отбирали пробы крови до кормления и через 2 и 5 ч после него для определения среднесуточной величины транспорта витаминов в артериальной и портальной крови. В конце каждого периода отбирали пробы молока и содержимого рубца для микробиологических и биохимических исследований.

Материалом для микробиологических исследований служило содержимое рубца, которое брали через 3 ч после утреннего кормления. В исследуемом материале определяли общее количество микроорганизмов по Бриду, количество селеномонад в счетной камере Горяева. Учет численности амилолитических, молочнокислых, лактатферментирующих и бифидобактерий проводили на

соответствующих селективных питательных средах. Витамины В₃, В₆ и В₁₂ в исследуемом материале определяли микробиологическими пробирочными методами с использованием в качестве тест-культур *Saccharomyces Ludwiggii*, *Saccharomyces Carlsbergensis* и *E. coli* - 113-3 соответственно.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что при содержании в сухом веществе рациона 18% картофельного крахмала интенсивно развивались молочнокислые бактерии, которые составляли 50% от общего числа выросших на средах различных физиологических групп бактерий (табл.1).

Таблица 1. Количество микроорганизмов в содержимом рубца коров

Показатели	Периоды опыта	
	I	II
Общее количество микробов, млрд/мл	11,80±0,96	8,35±0,89
Количество микроорганизмов различных групп, млн/мл:		
амилолитических	5,27±0,46	3,34±0,54
бифидобактерий	3,24±0,27	2,68±0,35
лактатферментирующих	4,84±0,38	3,54±0,53
молочнокислых	6,69±0,89	2,38±0,41
селеномонад	21,22±2,98	18,08±1,98

Уменьшение в рационе коров концентрации крахмала до 11,7% сопровождалось снижением общего количества микроорганизмов, численности бактерий отдельных групп и изменением соотношений между ними. Количество лактобактерий составило 25% от суммарного числа амилолитических, лактатферментирующих и бифидобактерий. При этом биосинтез витаминов В₆ и В₁₂ достоверно повышался (табл.2).

Таблица 2. Концентрация витаминов В₃, В₆ и В₁₂ в содержимом рубца коров

Концентрация витаминов	Периоды опыта	
	I	II
В ₃ , мкг/г	9,21±0,90	9,98±0,53
В ₆ , мкг/г	2,07±0,06	2,78±0,19 ^x
В ₁₂ , мкг/100 г	43,87±1,11	52,21±1,71 ^{xx}

Примечание: x – P < 0,05; xx – P < 0,01

Более низкое содержание витаминов в рубце в первом периоде опыта при высоком уровне (18%) картофельного крахмала в рационе коров, по-видимому, можно частично объяснить более интенсивным развитием молочнокислых бактерий и использованием ими витаминов, синтезируемых в рубце аукоотрофами. Так, известно, что большинство

представителей молочнокислых бактерий для роста и развития нуждаются в экзогенном поступлении витаминов группы В. Abou-Enlago, Kandler (1966), изучая потребности в пиридоксине, тиамине, рибофлавине, витамине В₁₂, никотиновой и аминокислотах у 207 штаммов всех известных в настоящее время видов рода *Lactobacillus* установили, что большинство из них нуждаются во всех перечисленных витаминах комплекса В. Ford et al. (1958) определили потребности в витаминах группы В у 170 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из рубца, и представляющих четыре вида лактобактерий и четыре вида стрептококков. Авторы установили, что изолированным из рубца *L. casei*, *L. Plantarum*, *L. acidophilus* необходимы те же витамины, что и нерубцовым видам. Большинство рубцовых культур *L. fermenti*, кроме тех витаминов, которые необходимы для нерубцовых штаммов (тиамин, никотиновая и пантотеновая кислоты) нуждались в витамине В₆ и рибофлавине. Gibbons, Doetsch (1959) описали потребности в витаминах еще одного вида молочнокислых бактерий. Они выделили из рубца крупного рогатого скота расщепляющий мочевины облигатный анаэроб и отнесли его к уреолитическому типу вида *L. fermenti*. В опытах указанных авторов наблюдался слабый рост микроорганизмов в отсутствии ниацина, тиамина, биотина и парааминобензойной кислоты. В последующих опытах было установлено, что парааминобензойная кислота только стимулирует жизнедеятельность *L. fermenti*, а никотиновая кислота, тиамин и биотин необходимы для его роста.

Витамины комплекса В используются и другими видами рубцовых микроорганизмов, в частности, целлюлозолитическими (Hall et al., 1953, Mc.Leod et al., 1956, Долгов и соавт., 2001; 2002).

Следует иметь в виду и то, что высокий уровень легкоферментируемых углеводов, в частности, крахмала в рационе, по-видимому, только до определенного предела стимулирует биосинтез витаминов. При этом увеличение численности микроорганизмов не всегда сопровождается усилением их витаминсинтезирующей активности, что подтверждается опытами *in vitro* с чистыми культурами стрептококков. Исследования показали, что с увеличением количества крахмала в среде с 0,1 до 0,7% интенсивность синтеза изучаемых витаминов возрастает (табл.3). Дальнейшее добавление субстрата в среду не способствовало стимуляции синтеза витаминов, хотя количество бактериальной массы при повышении концентрации крахмала возрастало.

Таблица 3. Влияние концентрации крахмала в среде на интенсивность роста и биосинтеза витаминов В₃, В₆ и В₁₂ *Str. bovis* штамм 16

Концентрация крахмала в среде, %	Витамины, мкг/ 100 мл			Биомасса, мг/мл	Конечное значение pH
	В ₃	В ₆	В ₁₂		
0,1	1,94±0,32	2,75±0,21	1,22±0,07	0,83	5,8
0,3	3,27±0,20	4,58±0,21	1,98±0,08	1,61	5,6

0,5	7,51±0,42	8,98±0,37	2,35±0,12	2,56	5,5
0,7	7,38±0,24	8,28±0,14	2,28±0,27	3,33	5,4
0,9	4,95±0,31	4,26±0,24	2,10±0,12	3,71	5,3
1,0	1,24±0,07	2,54±0,19	1,14±0,08	3,69	5,4

Такая же направленность изменений получена и в опытах, проведенных на овцах (Sutton, Elliot, 1972). При высокозерновом рационе биосинтез витамина В₁₂ достоверно снижался.

Артерио-венозная разность по пантотеновой кислоте, пиридоксину (P<0,01) и цианкобаламину в эти периоды исследований была отрицательной, что свидетельствует о поступлении их из пищеварительного тракта в портальную систему и значительном использовании в организме (табл.4).

Таблица 4. Поступление витаминов В₃, В₆ и В₁₂ в портальную кровь у коров

Периоды опыта	Содержание в крови, мкг/мл		АВР, мкг/мл	Коэфф. поглощения
	сонная артерия	воротная вена		
Пантотеновая кислота				
1	0,417±0,01	0,521±0,02	0,104±0,02	0,20
2	0,458±0,07	0,615±0,011 ^{xx}	0,151±0,07	0,28
Пиридоксин				
1	0,072±0,008	0,089±0,003	0,017±0,002	0,19
2	0,081±0,002	0,102±0,001 ^{xx}	0,021±0,001	0,29
Цианкобаламин				
1	0,521±0,025	0,620±0,039	0,099±0,008	0,16
2	0,547±0,048	0,682±0,032	0,135±0,032	0,20

Известно, что изучаемые витамины принимают активное участие в регуляции разнообразных биохимических процессов, в том числе метаболизме летучих жирных кислот. При этом следует отметить, что у жвачных роль КоА, являющегося производным пантотеновой кислоты, особенно важна в метаболизме ЛЖК. Следует также отметить, что метаболизм пропионовой кислоты в значительной мере зависит от интенсивности синтеза витамина В₁₂ в преджелудках. По данным Лысова и др.(2000) при уменьшении доли крахмала в рационе с 18 до 11,7% происходило увеличение поглощения ЛЖК в воротной вене. Так, концентрация уксусной кислоты в воротной вене во втором периоде исследований возросла на 8,5%, а содержание пропионовой и валериановой кислот – на 39,3 и 41,3% соответственно. Наши исследования показали, что при уменьшении концентрации крахмала в рационе коров с 18 до 11,7% поглощение пантотеновой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина в воротной вене возрастало на 18, 14,6 и 10% соответственно. Таким образом, комплексные исследования позволили выявить наличие определенной взаимосвязи между поступлением витаминов и ЛЖК в воротную вену.

Как следует из данных таблицы 5, концентрация пантотеновой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина в молоке коров во втором периоде опыта увеличивалась соответственно на 14, 10 и 9%.

Таблица 5. Концентрация витаминов В₃, В₆ и В₁₂ в молоке у коров

Витамины	Периоды опыта	
	I	II
В ₃ , мг/л	3,69±0,04	4,21±0,38
В ₆ , мг/л	0,31±0,02	0,34±0,02
В ₁₂ , мкг/л	4,11±0,54	4,48±0,02

Вместе с тем, суточная экскреция витаминов с молоком оставалась на прежнем уровне, что преимущественно связано со спадом лактации (табл.6).

Таблица 6. Суточная элиминация витаминов В₃, В₆ и В₁₂ с молоком

Витамины	Периоды опыта	
	I	II
Пантотеновая кислота, мг	81,11±8,22	80,41±5,81
Пиридоксин, мг	6,81±0,91	6,72±0,66
Цианкобаламин, мкг	90,34±7,69	88,57±8,31

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что при увеличении доли картофельного крахмала в рационе коров с 11,7 до 18% происходит изменение соотношений между видами микроорганизмов в сторону увеличения процентного содержания лактобактерий (ауксого-теротрофов), уменьшения биосинтеза пантотеновой кислоты, пиридоксина, цианнобаламина в рубце и адекватного поступления их в кровь и молоко. Следовательно, управляя метаболизмом микрофлоры в пищеварительном тракте кормовыми факторами, можно направленно усилить биосинтез витаминов комплекса В и этим, в ряде случаев, решить проблему их наиболее эффективного использования в организме жвачных. Полученные данные могут быть использованы при разработке системы витаминного питания жвачных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгов И.А., Харитонов Е.Л., Долгова С.И. Влияние никотиновой кислоты на микрофлору рубца коров. Сб.научн.труд ВНИИФБиП с.-х. ж-х, 2001,40:195-202.
2. Долгов И.А., Долгова С.И. Влияние инфузии ЛЖК на микрофлору и биосинтез витаминов комплекса В в рубце коров. Труды ВНИИФБиП с.-х. ж-х, 2002,41:20-26.

3. .Коленько Е.И., Тараканов Б.В., Кучинский Э.Г. и др. Влияние различных грубых кормов и уровня крахмала в рационе на микрофлору рубца коров. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. ж-х, 1970, 4(18):46-49.
4. Лысов А.В., Панюшкин В.М., Мартюшов В.М. и др. Влияние различного уровня кормления лактирующих коров на поступление углеводно-липидных метаболитов в кровь портальной вены. Сб. науч. трудов ВНИИФБиП с.-х. ж-х, 2000,39:145-161.
5. Abou – Enlado I., Kandler O. Die lactobacillen flora der Rohmilch und des stables. LBl. Bacteriol Parasitenkunde, Infectionsraukh und Hug. 1966, 53: 472.
6. Elliot Y. Vitamin B₁₂ Synthesis in the rumen. N.J. Food life Sci. Q. 1973, 6, 3: 10-12
7. Ford I., Perri K., Briggs C. Nutritional of lactic acid bacteria isolated from rumen. J. Gen. Microbiol., 1958, 18: 1.
8. Gibbons R., Doetsch R. Phisiological stady of on obligataly anaerobic ureahydrolising bacterium. J. Bact., 1959, 4: 417.
9. Hall J., Cheng E., Burrough W. B-Vitamins and other factors stimulatory to cellulose digestion by Washed suspensions of rumen of sheep. J.Anim. Sci., 1953, 12: 918.
10. Hungate R. Microorganisms in the rumen of cattle feed a constant ration. Canad. J. Microbiol., 1957, 3: 289.
11. Maun S. Some effect on the rumen microorganisms of overfeeding a high barley ration. J. Appl. Bacteriol., 1970, 33: 403-409.
12. Mc Geod R., Murrey J. Some factors effecting cellulose digestion by rumen microorganisms in vitro. Nutrition, 1956, 60: 245.
13. Sutton A., Elliot J. Effect of ratio of roughage to concentrate and level of feed intake of ovine ruminal vitamin B₁₂ production. J. Nutrit., 1972, 102, 10: 1341-1346.
14. Van der Linden J., Van Gylswyk N., Schwarz H. Influence of fibrolytic Bacteria in the rumen of sheep and their relation to the intake and digestion of fiber. J. Anim. Sci., 1984, 59, 3: 772-783.

БИОСИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ ПИРИДОКСИНА У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ПИТАНИЯ

И.А. Долгов, С.И. Долгова
Лаборатория пищеварения

Повышение уровня крахмала в рационе коров с 13 до 16% за счет зерна кукурузы, на фоне кормов с умеренной деградируемостью протеина, сопровождалось увеличением биосинтеза пиридоксина в рубце. Использование его молочной железой в расчете на 1 л молока у коров опытной группы составило 0,88 против 0,36 мг в контрольной. Суточная элиминация с молоком, мочой и калом превышала его поступление с кормом в 1,6 раза, что свидетельствует о высоком уровне синтеза витамина микрофлорой пищеварительного тракта. Количество экскретируемого витамина В₆ с мочой в 3 раза больше, чем с молоком. Выделение пиридоксина осуществляется в основном через почки.

Введение

Накопленные наукой факты и практические наблюдения свидетельствуют о том, что витамины являются необходимыми компонентами сбалансированного питания сельскохозяйственных животных. Наряду с оптимальным количеством белков, жиров, углеводов и минеральных веществ животным необходимы еще витамины для обеспечения важнейших процессов обмена в их организме и для лучшего использования питательных веществ кормов. Витамин В₆ входит в состав ферментов, принимающих участие в белковом и жировом обмене, улучшает использование организмом ненасыщенных жирных кислот, повышает активность защитных факторов макроорганизма, способствует сохранению гликогена в печени и мышцах.

Исследованиями ученых установлено, что в рубце жвачных происходит синтез всех витаминов комплекса В, в том числе В₆. Однако вопросы биосинтеза и метаболизма пиридоксина у мелких коров изучены недостаточно, что и стало предметом нашего исследования у лактирующих коров при разных условиях кормления.

Материал и методы

Опыт проведен методом групп и периодов на 8 лактирующих коровах холмогорской породы средней живой массой 460 кг. Животные были оперированы с целью получения артериальной крови путем выведения сонной артерии под кожу. Коровы контрольной группы получали рацион согласно существующих норм (Калашников и др., 1994), а опытной – с учетом разработок института по новой системе протеинового и энергетического питания животных. Уровень крахмала в сухом веществе рациона у коров контрольной и опытной групп соответственно составлял 13 и 16%. Рацион животных обеих групп состоял из сена злаково-разнотравного, силоса разнотравного, свеклы кормовой и комбикорма, состав которого представлен в таблице 1. Кормили животных 3 раза в сутки равными порциями, поили из автопоилок вволю. Корректировку рационов проводили каждые 30 дней. Доеение коров 3-разовое с ежедневным индивидуальным измерением величины удоя. Массу тела определяли взвешиванием животных до утреннего кормления в начале опыта и затем ежемесячно. Кровь из молочной вены и сонной артерии брали 2 раза в сутки – утром до кормления и затем через 3 ч после него с целью определения артерио-венозной разности витамина В₆ в молочной железе.

Таблица 1. Состав комбикорма для коров контрольной и опытной групп, %

Корма	Контроль	Опыт
Кукуруза	5	30
Зерносмесь (овес+ячмень)	51	38
Шрот соевый	7	23
Шрот подсолнечный	33	5
Трикальцийфосфат	1,5	1,5
Соль поваренная	1,5	1,5
Премикс	1,0	1,0

В конце каждого периода проводили балансовые опыты по общепринятой схеме с отбором проб молока, мочи, кала, а также содержимого рубца для исследований. Для определения скорости потока химуса в пищеварительном тракте использовали окись хрома. Выделение фракций бактерий и инфузорий из содержимого рубца проводили методом дифференциального центрифугирования. Пиридоксин в исследуемом материале определяли с использованием в качестве тест-культуры *Saccharomyces Carlsbergensis*.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что содержимое рубца значительно богаче витамином В₆, чем заданный корм. Так, при содержании в корме у коров контрольной и опытной групп 1,65 и 1,6 мкг/г пиридоксина, последний в сухом веществе рубцового содержимого обнаруживался в количестве 3,47 и 4,08 мкг/г соответственно. В среднем у коров контрольной и опытной групп концентрация пиридоксина в рубце превышала его поступление с кормом в 2,1 и 2,5 раза соответственно, что свидетельствует об интенсивном синтезе витамина в преджелудках.

Количество пиридоксина в содержимом рубца в зависимости от времени взятия образцов значительно варьировало, однако эти колебания имели закономерный характер (табл.2). Так, самая высокая концентрация витамина В₆ в рубце отмечена до утреннего кормления, затем через 3 ч она резко снижалась, а через 5 ч после кормления возрастала. Суммарное содержание пиридоксина в сухом веществе рубцовой жидкости у коров опытной группы было на 9,7% выше, чем в контроле.

Таблица 2. Концентрация пиридоксина в содержимом рубца в зависимости от времени взятия проб

Группа коров	Время взятия проб	Пиридоксин, мкг/г	%
Контрольная	До кормления	3,24 ± 0,36	100
Опытная		3,59 ± 0,41	111
Контрольная	Через 3 ч после кормления	1,99 ± 0,27	100
Опытная		2,22 ± 0,21	112
Контрольная	Через 5 ч после кормления	2,78 ± 0,22	100
Опытная		2,97 ± 0,23	107

Количество пиридоксина в биомассе бактерий, выделенной из содержимого рубца коров контрольной группы, в 1 г сухого вещества составляло 7,39 мкг, а опытной – 8,67 мкг или на 17,3% больше (табл.3). В микробных клетках, содержащихся в 100 мл рубцовой жидкости у коров опытной группы, количество пиридоксина было выше на 11%. Это объясняется тем, что витамин В₆ в основном синтезируется стрептококками, которых было значительно больше в рубце коров опытной группы. При этом большая часть витамина накапливалась внутри клетки.

Таблица 3. Содержание пиридоксина в биомассе бактерий и инфузорий, выделенных из рубцовой жидкости коров

Группа коров	Количество витамина В ₆			
	мкг/г сухого вещества	%	мкг/100 мл	%
Бактерии				
Контрольная	7,39 ± 0,98	100	2,73 ± 0,71	100
Опытная	8,67 ± 0,90	117	3,00 ± 0,75	110
Инфузории				
Контрольная	2,36 ± 0,19	100	1,17 ± 0,09	100
Опытная	2,59 ± 0,48	110	1,58 ± 0,24	135

Микроорганизмы, продуцирующие пиридоксин в рубце коров были представлены *Str. bovis*, *Clostridium butyricum*, *Bif. globosum*, *Bif. ruminale*. Среди неидентифицированных рубцовых бактерий, которые синтезировали витамин В₆, особого внимания заслуживают грамположительные кокки. В отличие от *Str. bovis*, микроорганизмы этой группы, образуя пиридоксин, в основном накапливают его внутри клетки и эта величина составила около 75% от его общего количества.

Концентрация витамина в инфузориях содержимого рубца коров опытной группы была на 9,7% выше, чем в контроле. В биомассе, содержащейся в 100 мл рубцовой жидкости, количество витамина возросло на 35%. Увеличение содержания пиридоксина в биомассе инфузорий в рубце коров опытной группы было обусловлено, главным образом, более интенсивным развитием популяции простейших и бактерий, являющихся активными продуцентами этого витамина. Таким образом, протозойная фауна является не только важным источником высокоценного белка, но и принимает непосредственное участие в обеспечении животных необходимыми витаминами. Скорость переваривания бактерий у разных видов инфузорий значительно варьирует. Следовательно, доступность для инфузорий и животного-хозяина внутриклеточных витаминов будет различной.

Ранее было показано, что количество и видовой состав бактерий и инфузорий в значительной степени зависят от состава рациона. Так, повышение уровня энергии в рационах сопровождается интенсификацией ферментативных и синтетических процессов в преджелудках (Коленько и соав.,1973). Полученные нами данные

свидетельствуют о том, что уровень энергии может являться фактором, регулирующим не только интенсивность роста микробов, но и биосинтез ими витаминов комплекса В, и в частности, витамина В₆. Так, при суточном потреблении коровами контрольной и опытной групп кормов, содержащих 24,5 и 25,8 мг пиридоксина, в 12-перстную кишку его поступало 39,52 и 48,15 мг, соответственно. Среднесуточный поток витамина в тонкий отдел кишечника превышал дневное поступление с кормом у коров контрольной и опытной групп в 1,6 и 1,9 раза, соответственно. Следовательно, в рубце коров контрольной группы синтезировалось 15,02 мг, в опытной -22,35 мг, т.е. бактериальный синтез витамина в рубце у коров в опытной группе был выше в 1,5 раз а, в сравнении с контрольной группой (P< 0,05).

Представление о всасывании пиридоксина основывается главным образом на косвенных показателях – на поступлении его в организм и на выделении с молоком, мочой, на концентрации в коферментах. Всасывание пиридоксина в пищеварительном тракте осуществляется преимущественно в тощей кишке по механизму пассивной диффузии (Snell, Haskell, 1971). Повышенное содержание витамина В₆ в крови людей с фистулами кишечника, после парентерального или перорального его применения, свидетельствует о всасывании его в толстом кишечнике (Sorrell et al., 1971). Обнаружение в гомогенате кишечника фосфорилированных форм витамина привело к предположению, что свободный пиридоксин после всасывания фосфорилируется. В тканях животных и человека подавляющая часть витамина присутствует в составе коферментов. Анализ литературных данных показывает, что в норме содержание нефосфорилированного витамина В₆ в органах весьма незначительно, в то время как концентрация пиридоксалевого кофермента в большинстве органов и тканей, в частности, в печени, крайне высокая (Букин, 1975, 1976). В циркулирующей крови свободный пиридоксин быстро проникает в ткани и превращается в пиридоксальные коферменты, которые составляют основную фракцию витамина В₆ в клетке (Lyon, Bain, 1962).

В нашем эксперименте средняя концентрация пиридоксина в артериальной крови и крови молочной вены у коров опытной группы как до кормления, так и через 3 ч после него была выше на 11,2 и 11,7%, соответственно (табл.4). Средняя артерио-венозная разность у коров опытной группы составила 3,0 мкг/л, а у коров контрольной – 2,6 мкг/л.

Таблица 4. Содержание в крови и показатели использования пиридоксина в молочной железе у подопытных коров, мкг/100 мл

Группа коров	Время взятия проб	Содержание витамина		АВР	% использования
		сонная артерия	молочная вена		
Контрольная	До кормления	6,45±0,11	6,21±0,16	0,24±0,01	3,72±0,25
	Через 3 ч после кормления	7,47±0,11	7,19±0,08	0,28±0,03	3,75±0,34

Опытная	До кормления	7,05±0,13 ^x	6,79±0,13	0,26±0,01	3,75±0,34
	Через 3 ч после кормления	8,43±0,50	8,09±0,12 ^{xx}	0,34±0,02	4,03±0,32

Согласно данным, приведенным в таблице 5, более высокая концентрация пиридоксина в моче и кале была у коров опытной группы.

Таблица 5. Содержание пиридоксина в молоке, моче и кале у подопытных коров

Группа коров	Молоко, мг/л	Моча, мкг/мл	Кал, мкг/г
Контрольная	0,36±0,01	1,79±0,08	0,68±0,02
Опытная	0,38±0,01	1,83±0,09	0,71±0,02

Балансовые опыты показали, что экскреция пиридоксина с молоком, мочой и калом превышала его поступление с кормом в 1,6 раза, что также свидетельствует о высоком уровне синтеза витамина В₆ микрофлорой пищеварительного тракта. Элиминация витамина с молоком у коров контрольной группы составляла 6,83 мг в сутки, против 8,01 у коров опытной группы или на 17,3% меньше (табл.6). Процентное содержание выделившегося витамина с молоком у коров контрольной и опытной групп составило соответственно 17,2 и 16,6% от принятого с кормом и синтезированного в преджелудках. Поскольку животные существенно не различались по концентрации витамина в молоке, то большая суточная экскреция его с молоком у коров опытной группы была связана в основном с более высоким суточным удоем (18,97 у коров контрольной группы против 21,07 кг опытной).

Известно, что биологическая ценность молока выражается не только в удовлетворении пищевых потребностей людей и молодняка сельскохозяйственных животных за счет белка и молочного жира, но оно обладает специфической активностью в регуляции жизненных процессов за счет имеющихся в нем витаминов. Исходя из имеющихся норм и данных, полученных нами в процессе эксперимента, следует отметить, что суточная потребность взрослого человека в витамине В₆ при потреблении 0,5 л молока от коров контрольной и опытной групп может быть удовлетворена на 9,0 и 9,5% соответственно.

Таблица 6. Суточное потребление и выделение пиридоксина с молоком, мочой и калом, мг

Показатели	Группа коров	
	контрольная	опытная
Потреблено с кормом	24,47±1,47	23,30±1,78
Выделено с молоком	6,83±0,18	8,01±0,68
с мочой	27,55±1,51	27,45±1,23
с калом	3,72±0,14	4,10±0,12
Всего	38,10	39,6

Наличие интенсивного всасывания синтезированного в преджелудках и принятого с кормом пиридоксина доказывают данные, полученные по экскреции витамина с мочой. Так, при поступлении в тонкий отдел кишечника 39,52 и 48,15 мг витамина В₆, у коров контрольной и опытной групп с мочой выделилось 27,55 и 27,45 мг и только 3,72 и 4,1 с калом. Следовательно, если учесть то обстоятельство, что основная часть пиридоксина в пищеварительном тракте синтезируется микроорганизмами, то результаты нашего опыта можно объяснить тем, что количество видов, продуцирующих витамин в толстом отделе кишечника и их активность, существенно ограничены.

Выделение витамина с мочой у коров контрольной и опытной групп составило 69,7 и 57,0% соответственно от поступившего в 12-перстную кишку. Пиридоксин всасывается по типу диффузии, поэтому количество всосавшегося витамина пропорционально уровню его в кишечнике. Судя по скорости выделения с молоком и мочой, пиридоксин сравнительно хорошо всасывается в кишечнике. Количество экскретируемого витамина В₆ с мочой в 3-4 раза больше, чем с молоком. Процент элиминации витамина с молоком, мочой и калом у коров контрольной и опытной групп соответственно составил 96,4 и 82,3% от принятого с кормом и синтезированного в рубце.

Депонирование пиридоксина в тканях и органах в значительной мере определяется двумя параметрами: скоростью фосфорилирования в тканях и объемом внутриклеточного пула белков, которые обратимо связывают пиридоксальные коферменты и защищают их от расщепления неспецифическими фосфатазами. Основное количество пиридоксина в печени содержится в форме пиридоксала и пиридоксамина (Букин, 1975, 1976). Проведенные нами расчеты показали, что суточное депонирование витамина В₆ в органах и тканях у коров контрольной группы составило 1,42 мг, а опытной – 8,52 мг или 3,6 и 17,7% от принятого с кормом и синтезированного в рубце.

Баланс потребления, биосинтеза в преджелудках и выделения пиридоксина с молоком, мочой и калом у лактирующих коров ранее не проводился. Данные, полученные в нашем эксперименте, свидетельствуют о том, что при повышении уровня энергии в рационе коров с 13 до 16% за счет зерна кукурузы происходит более интенсивный биосинтез пиридоксина микрофлорой преджелудков, всасывание в кишечнике, поступление в кровь и молоко.

Заключение

В настоящее время считается доказанным, что потребность жвачных в пиридоксине удовлетворяется за счет микробного синтеза. Однако эти сведения довольно противоречивы. Имеются данные, свидетельствующие о том, что скормливание стельным коровам в период сухостоя и откормочным животным пиридоксина в дозе 0,1 г на голову в сутки способствует повышению массы тела телят и увеличению интенсивности роста откормочного молодняка (Костюк и др., 1989). Использование пиридоксинового монопремикса в кормлении

молодняка повышает интенсивность обмена веществ и энергии, что обеспечивает увеличение массы тела на 8-10% (Семак,1990).

Следует учесть, что смена рациона отрицательно влияет на жизнедеятельность микроорганизмов преджелудков, в том числе и на активных продуцентов пиридоксина. Таким образом, нормальная жизнедеятельность микрофлоры желудочно-кишечного тракта является необходимым условием для обеспечения животных пиридоксином. На основании полученных нами данных более полную информацию о насыщенности организма витамином В₆ дает определение содержания пиридоксина в крови, молоке и моче с учетом поступления его с кормом и синтеза в преджелудках.

Определять потребность жвачных в витаминах комплекса В довольно сложно, так как она связана с биосинтезом этих витаминов микроорганизмами, которые, в свою очередь, зависят от состава и структуры рациона. Таким образом, установление оптимальной потребности в витаминах жвачных животных — сложная и многогранная задача, которую предстоит еще решать в дальнейших исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин Ю.В. Биосинтез коферментных форм витамина В₆ и фолиевой кислоты, его регуляция и физиологическое значение. Автореф. дисс. д.б.н. М. 1975.
2. Букин Ю.В. Биохимия. М.: 1976:41,81.
3. Калашников А.П., Клейменов Н.И., Щеглов В.В. Нормы кормления с-х животных. 1994.
4. Коленько Е. И. Долгов И.А., Гущин Н.Н. и др. Микрофлора и микрофауна преджелудков овец, содержащихся на различных рационах. Труды ВНИИ ФБиП с-х животных. 1973,12: 243-249.
5. Костюк С.С., Стояновский С.В., Цимбала В.И. Влияние скармливания пиридоксина на газоэнергетический обмен у крупного рогатого скота в различные возрастные периоды. Научно-технический бюллетень с-х животных. 1989,11: 26-30.
6. Семанюк В.И. Влияние пиридоксина на показатели энергетического и липидного обмена у крупного рогатого скота в онтогенезе. Автореф. дисс. к.б.н., Львов, 1990.
7. Lyon J.B., Bain I.A., Williams H.A. J. Biol. Chem. 1962,237:1959. цит. Ю.В.Букину, 1979. Пиридоксин "Экспериментальная витаминология" (под ред. Ю.М. Островского). М.: 385.
8. Snell E.E., Haskell B.E. Comprehensive Biochemistry. Amsterdam-London-New-Iork, 1971:47.
9. Sorrell M.F., Frank O., Thompson H.D. et al. Absorption of vitamins from the large intestine in vivo. Nutr. Rep. Int. , 1971, 3, 3: 143-148.

**ВЛИЯНИЕ КОРМОВ С ПОНИЖЕННОЙ РАСЩЕПЛЯЕМОСТЬЮ
КРАХМАЛА В РУБЦЕ НА УРОВЕНЬ ГОРМОНОВ, СВЯЗАННЫХ С
МЕТАБОЛИЗМОМ ГЛЮКОЗЫ, И МЯСНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ
ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА МЯСО БЫЧКОВ.**

А.М. Коровяцкий, В.П. Галочкина., В.А. Матвеев, Т.Н. Дворецкая
Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности

В опытах на бычках черно-пестрой породы установлено, что повышение уровня глюкозы в крови и метаболическом пуле за счет введения в рацион кормов с пониженной расщепляемостью крахмала в рубце, например кукурузы, повышает поступление ее из кишечника в кровь и увеличивает концентрацию в сыворотке крови гормонов, связанных с метаболизмом глюкозы (инсулина, кортизола, тироксина). Направленное воздействие на процессы пищеварения положительно сказывается на функциональной активности эндокринных желез, что в свою очередь повышает продуктивные и мясные качества бычков при выращивании на мясо. По итогам опыта от бычков опытной группы получено на 3,8 кг больше мякоти на голову. В туше этих же бычков содержалось меньше внутреннего жира и было более высокое соотношение мякоти и внутреннего жира.

Введение

Наши исследования последних лет показали возможность управления процессами ферментации питательных веществ корма в рубце путем введения в рацион источников углеводов (кукурузы) и протеина (кукурузного глютенa) с пониженной распадаемостью в рубце. Данный прием повышает поступление протеина и крахмала в кишечник, расщепление их до аминокислот и глюкозы и большее поступление данных метаболитов в кровяное русло. Использование кукурузного глютенa в качестве источника протеина с пониженной расщепляемостью в рубце, одновременно с кукурузой – источником углеводов, также с пониженной расщепляемостью в рубце, в рационе выращиваемых на мясо бычков, обеспечило повышение интенсивности их роста, отложения мышечного белка и наращивание мышечной массы. При замене кукурузы ячменем, крахмал которого легко расщепляется микрофлорой рубца, эффект был ниже (Матвеев и др., 2001, 2002). Степень расщепляемости крахмала микрофлорой рубца зависит от строения его молекулы, от его кристалличности и от комплекса химически связанных с углеводами веществ. Например, амилопектин картофельного крахмала содержит фосфатные группы, а фосфорная кислота ковалентно связывает полисахаридные цепи. Картофельный, кукурузный и рисовый крахмал представляют собой комплекс химически связанных углеводов и белков (Степаненко, 1976). В задачу исследований входило изучение функциональной активности инсулярного аппарата поджелудочной железы, коры надпочечников и щитовидной железы у растущих бычков при разном обеспечении процессов метаболизма глюкозой за счет включения в рацион кормов с

пониженной ржапааемостью в рубце, и влияние этих процессов на мясные качества растущих бычков и оплату корма.

Материал и методы

Для решения поставленных задач проведена экспериментальная работа на молодняке крупного рогатого скота в периоды доращивания и интенсивного откорма. Исследования проведены в виварии института на 10 бычках черно-пестрой породы с живой массой 179 кг (по группе) при постановке на опыт. По принципу парных аналогов бычки были распределены на две группы, по 5 голов в каждой. В предварительном периоде (45 дней) животные находились на одинаковом кормлении. В опытном периоде (101 день) – дифференцированное кормление по периодам опыта различалось по составу комбикорма. В комбикорме бычков опытной группы 30 % ячменя было заменено кукурузой в качестве источника крахмала с пониженной расщепляемостью его в рубце. По питательности комбикорма были уравнены. По энергетической ценности были уравнены за счет введения в комбикорм для бычков контрольной группы смеси животного жира и растительного масла. Животный жир предпочтительнее для животных, но так как компоненты комбикорма содержали растительный жир, то 50% животного жира было заменено растительным маслом. Бычки получали комбикорм 3 раза в день равными дозами. Содержание бычков привязное, кормление 3-х разовое индивидуальное. Рацион состоял из сена разнотравного, силоса и комбикорма и соответствовал детализированным нормам кормления, разработанным для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков (Нормы и рационы..., 1985). Рецепты комбикорма и премикса соответствовали таковым, разработанным для выращивания и откорма молодняке крупного рогатого скота в промышленном комплексе "Вороново" (Наставление...,1971). Рацион кормления бычков и доля обменной энергии концентратов в обменной энергии рациона по периодам опыта, которая была приблизительно равной, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Рационы кормления бычков по периодам опыта

Компоненты	Предваритель- ный	Периоды	
		контрольная	опытная
Сено, кг	2,4	3,05	3,05
Силос, кг	6	8,4	8,4
Трава (разнотравье)кг	-	-	-
Комбикорм, кг	3	4,03	4,03
Сухое вещество, кг	6,51	8,71	8,77
Обменная энергия, МДж	54,3	75,2	74,72
Сырой протеин, г	770	1039	1015
Сырая клетчатка, г	1093	1454	1433
Сырой жир, г	248	319	315
Крахмал, г	1052	1417	1534
Сахар, г	165	217	237

Кальций, г	52	69	68
Фосфор, г	25	33	32
Доля обменной энергии концентратов в обменной энергии рациона, %	53,04	55,09	54,81

В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма. Интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешивания. Животных взвешивали до утреннего кормления ежемесячно в течение двух дней подряд и брали среднюю величину между ними. В конце опыта животных убили и провели оценку состава туши.

В 9,5- (до дифференцированного кормления), 12- и 13-месячном возрасте провели взятие крови пункцией яремной вены до приема корма в утреннее кормление животных и через 1 и 3 часа после него. В пробах цельной крови определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом (Радченков и др., 1986). В образцах сыворотки крови исследовали содержание гормонов, связанных с метаболизмом, транспортом и использованием глюкозы (инсулина, тироксина и кортизола) стандартными методами (Радченков и др., 1985). Математическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (Асатиани, 1965).

Результаты и обсуждение

Опыт проведен на соответствующем зоотехническом фоне. Условия питания обеспечили высокую интенсивность роста бычков. В среднем за весь опытный период среднесуточный прирост живой массы составил 1226 ± 40 и 1275 ± 93 г, соответственно в контрольной и опытной группах.

Включение в комбикорм 30 % кукурузы, содержащей в своем составе крахмал со сниженным расщеплением в рубце, повысило интенсивность роста на 4% по отношению к бычкам контрольной группы (табл. 2), несмотря на то, что 50% жира, вводимого в комбикорм для бычков контрольной группы, было заменено более усвояемым животным жиром.

Таблица 2. *Интенсивность роста бычков*

Показатели	Группы, периоды, возраст		% к контролю	Р <
	контрольная	опытная		
Предварительный период, 9,5 месяцев				
Живая масса, кг	179	179	100,0	
Опытный период, 11 месяцев				
Среднесуточный прирост, г	1097±43	1114±59	101,6	0,82
12 месяцев				
Среднесуточный прирост, г	1342±83	1407±30	104,8	0,85
13 месяцев				
Среднесуточный прирост, г	1251±54	1320±92	105,5	0,54
За опыт				
Валовый прирост, кг	124	129	104,0	
Среднесуточный прирост, г	1226±40	1275±93	104,0	0,48

В отличие от результатов, полученных в предыдущих опытах по изучению влияния кормов с пониженной расщепляемостью в рубце крахмала и протеина, у бычков опытной группы по сравнению с интактными бычками не было отмечено снижение потребления корма, но наблюдалось некоторое снижение затрат обменной энергии (99,62%) и сырого протеина (96,31%) на килограмм среднесуточного прироста живой массы тела (табл. 3).

Таблица 3. Суточное потребление корма и затраты питательных веществ на 1 кг продукции

Группы, корма	Количество корма, кг	ОЭ, МДж	Сырой протеин, г	Сухое вещество, кг	Затраты корма кг/прироста
<i>Суточное потребление корма и питательных веществ</i>					
Контрольная					
Сено	1,322	7,985	74,03	1,299	1,057
Силос	8,456	15,48	253,68	2,502	6,759
Комбикорм	4,08	41,94	620,16	2,502	3,261
Всего		65,41	947,87	7,463	
Опытная					
Сено	1,876	11,33	105,06	1,710	1,421
Силос	8,056	14,74	241,68	2,406	6,103
Комбикорм	4,2	42,67	617,4	3,760	3,182
Всего		68,74	964,14	7,876	
% к контролю		105,09	101,72	105,53	
Затраты питательных веществ и концентратов на 1 кг прироста живой массы тела					
Контрольная		5,23	758	5,97	3,261*
Опытная		5,21	730	5,97	3,182*
% к контролю		99,62	96,31	100,00	97,58*

* – затраты концентратов на 1 кг прироста.

Введение в рацион кукурузы, как источника крахмала с пониженной расщепляемостью в рубце, обеспечило различное поступление глюкозы в оттекающую от кишечника кровь и, как следствие этого, изменило функциональную активность эндокринных желез. Данный факт подтверждается изменениями концентрации инсулина, кортизола и тироксина в сыворотке крови до приема корма, через 1 и 3 часа после него. Это, в свою очередь, сказалось на повышении интенсивности роста и наращивания мышечной массы бычков. Аналогичные результаты были получены при использовании стрептофагина на фоне высококонцентратного кормления (Софронова и др., 2000; Сорокин и др., 2000).

При взятии крови через 2 месяца после начала скармливания кукурузы в крови бычков опытной группы было обнаружено повышение концентрации глюкозы на 6,5% до приема корма и на 11,4 и 9,4% соответственно через 1 и 3 часа после его приема, по сравнению с таковыми показателями у бычков контрольной группы. В 13-месячном возрасте тенденция сохранилась (табл. 4).

Таблица 4. Концентрация глюкозы в крови, мг%

Группы	Возраст, время взятия проб до кормления, час.		
	0	1	3
9,5 месяцев (предварительный период)			
Контрольная	66,66±1,76	65,99±1,90	72,30±2,22
Опытная	69,55±2,64	74,94±3,39	78,36±3,11
% к контролю	104,6	113,6	108,4
P	0,39	0,05	0,15
12 месяцев (опытный период)			
Контрольная	74,06±2,90	69,46±2,19	75,81±2,24
Опытная	78,91±3,12	77,37±4,73	83,11±3,11
% к контролю	106,5	111,4	109,4
P	0,29	0,17	0,09
13 месяцев (опытный период)			
Контрольная	61,19±1,32	66,03±2,51	66,67±1,88
Опытная	67,58±2,28	67,64±1,98	66,14±1,99
% к контролю	110,4	102,4	99,2
P	0,04	0,63	0,85

Во все периоды взятия крови, отмечено повышение концентрации инсулина в сыворотке крови у бычков подопытной группы по отношению к бычкам контрольной группы. Наибольшее повышение отмечено через 1 и 3 часа после приема корма (табл. 5).

Таблица 5. Концентрация инсулина в сыворотке крови, мкед/мл

Группы	Возраст, время взятия проб до кормления, час		
	0	1	3
9,5 месяцев (предварительный период)			
Контрольная	6,11±0,34	7,56±0,90	6,81±0,74
Опытная	6,99±0,90	9,13±3,48	9,35±2,02
% к контролю	114,5	120,9	137,2
P	0,38	0,67	0,27
12 месяцев (опытный период)			
Контрольная	9,10±2,47	8,24±0,95	8,58±0,73
Опытная	10,23±1,41	11,23±1,26	16,38±1,16
% к контролю	112,4	136,4	190,8
P	0,70	0,09	0,00
13 месяцев (опытный период)			
Контрольная	9,08±0,80	10,89±1,88	10,35±1,34
Опытная	12,36±1,70	15,75±1,55	13,29±0,84
% к контролю	136,1	144,5	128,4
P	0,12	0,08	0,1

Несмотря на более высокую концентрацию кортизола в предварительный период и повышение ее в 12-месячном возрасте у подопытных бычков, в контрольной группе отмечено большее повышение его концентрации в опытный период, особенно через 3 часа после приема корма. Эти изменения наиболее четко выражены в 12-месячном возрасте (табл. 6), что указывает на меньшее поступление глюкозы из кишечника в кровь при использовании ячменя в сравнении с кукурузой.

Таблица 6. Концентрация кортизола в сыворотке крови, нмоль/л

Группы	Возраст, время взятия проб до кормления, час		
	0	1	3
9,5 месяцев (предварительный период)			
Контрольная	45,15±16,02	9,81±2,98	20,10±11,44
Опытная	57,09±15,37	27,22±14,04	23,44±4,85
% к контролю	126,4	277,6	116,6
P	0,61	0,26	0,80
12 месяцев (опытный период)			
Контрольная	61,51±15,65	34,19±4,31	55,05±8,71
Опытная	68,93±11,05	38,54±8,47	49,10±17,24
% к контролю	112,1	112,7	89,2
P	0,71	0,66	0,77
13 месяцев (опытный период)			
Контрольная	39,06±7,05	19,46±5,08	51,28±10,45
Опытная	60,23±22,56	29,47±9,80	44,24±11,63
% к контролю	155,2	151,4	86,3
P	0,39	0,39	0,66

Вероятно, по этой причине бычки контрольной группы были вынуждены через 3 часа после утреннего приема корма поддерживать необходимую концентрацию глюкозы в крови за счет глюконеогенеза из аминокислот. К утреннему же кормлению у них происходило истощение резерва надпочечников, и наблюдаемый уровень кортизола в этот период был недостаточен для стимуляции глюконеогенеза из аминокислот, поэтому концентрация глюкозы до приема корма у бычков контрольной группы была ниже, чем в опытной группе. Например, в 12-месячном возрасте, когда концентрация кортизола до приема корма была наивысшей, обеспечивая высокий синтез глюкозы, среднесуточный прирост живой массы был самым высоким. В этот же период наблюдалась достоверная положительная корреляция концентрации кортизола до приема корма со среднесуточным приростом живой массы тела ($r = 0,70$, $P < 0,03$). Более раннее подключение процесса обеспечения организма глюкозой за счет аминокислот способствовало меньшему приросту массы тела и наращиванию мышечной массы.

За весь опытный период прирост живой массы у бычков контрольной группы был ниже, чем у подопытной. Четкой корреляции между среднесуточным приростом живой массы бычков и концентрацией глюкозы в крови, инсулина и кортизола в сыворотке

крови, соответственно до приема корма и через 1 и 3 часа после него, не выявлено. В 12-месячном возрасте имела достоверная зависимость концентрации инсулина до приема корма с интенсивностью роста бычков ($r=0,69$, $P<0,03$). Повышенная концентрация тироксина у бычков опытной группы способствовала созданию метаболической ситуации для обеспечения у них большей интенсивности роста (табл. 7).

Таблица 7. Концентрация тироксина в сыворотке крови, нмоль/л

Группы	Возраст, время взятия проб до кормления, час		
	0	1	3
9,5 месяцев (предварительный период)			
Контрольная	84,67±7,19	86,09±8,91	79,38±5,45
Опытная	77,68±8,53	79,04±5,16	81,52±7,17
% к контролю	91,7	91,8	102,7
P	0,55	0,51	0,82
12 месяцев (опытный период)			
Контрольная	64,01±7,64	52,81±5,77	59,00±5,78
Опытная	63,39±2,69	64,49±7,61	59,11±3,19
% к контролю	99,0	122,1	100,2
P	0,94	0,26	0,99
13 месяцев (опытный период)			
Контрольная	48,42±4,49	47,09±4,81	58,12±9,39
Опытная	51,36±6,52	53,23±0,55	98,88±11,43
% к контролю	106,1	113,0	170,1
P<	0,72	0,24	0,02

Заключение

Результаты проведенных опытов позволяют заключить, что скармливание выращиваемым на мясо бычкам кормов с пониженной расщепляемостью углеводов в рубце, повышает поступление глюкозы из желудочно-кишечного тракта в метаболический пул, а так же способствует подключению процесса глюконеогенеза из аминокислот на более поздней стадии после приема корма, что обеспечивает экономное расходование аминокислот, повышение интенсивности роста и большее наращивание мышечной массы. Аналогичные результаты были получены при использовании пробиотика стрептофагина (Софронова и др., 2000; Сорокин и др., 2000). Однако, этот эффект был значительно ниже, чем полученный при совместном использовании кормовых источников со слабой расщепляемостью в рубце протеина и углеводов (крахмала и кукурузного глютенa) или же только со слабой расщепляемостью протеина (кукурузного глютенa).

Таким образом, использование в составе кормов кукурузы с низкой расщепляемостью в рубце протеина повышает использование питательных веществ корма и соответственно продуктивность животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Матвеев В.А., Галочкина В.П., Еримбетов К.Т. и др. Использование кукурузного глютенa в комбикормах молодняка крупного рогатого скота в период откорма. Новое в приготовлении и использовании комбикормов и балансирующих добавок. Мат. науч.-практ. конф. Дубровицы, 2001: 66-68.
2. Матвеев В.А., Галочкина В.П., Баранова И.А. и др. Влияние протеина с низкой распадаемостью в рубце на функциональную активность некоторых желез внутренней секреции и продуктивность откармливаемых бычков. Сб. тр. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 2002, 41: 97-105.
3. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов (полисахариды). М.: Высш. школа. 1976: 225 с.
4. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос. 1971: 30 с.
5. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. /Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др. М.: Агропромиздат. 1985: 352 с.
6. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. Методические указания. Боровск, 1986: 9 с.
7. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. Методические указания. Боровск, 1985: 74 с.
8. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука. 1965: 522 с.
9. Софронова О.В., Галочкин В.А., Сухих В.Ф. Показатели гуморального иммунитета у откармливаемых бычков при скормливании стрептофагина. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Мат. III Межд. Конф. 6-8 сентября 2000 г, Боровск, 2000: 348-350.
10. Сорокин М.В., Агафонов В.И., Лазаренко В.П. Энергетический обмен у бычков при использовании с кормом стрептофагина. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Мат. III Межд. конф. 6-8 сентября 2000 г, Боровск, 2000: 347-348.

ОБМЕН ЭНЕРГИИ У РАСТУЩИХ БЫЧКОВ ПРИ РАЗНОЙ РАСПАДАЕМОСТИ ПРОТЕИНА В РАЦИОНЕ

М.В. Сорокин, В.П. Лазаренко

Лаборатория энергетического питания

В опыте на 10 бычках холмогорской породы в условиях вивария института методом групп определено влияние рационов, включающих протеин с различной распадаемостью в

преджелудках, на потребление валовой энергии корма, теплопродукцию и баланс энергии в организме. Разная распадаемость протеина рационов достигалась за счет изменения количества подсолнечного шрота и глютен. Среднесуточный привес был выше у группы, получавшей глютен. Меньшая распадаемость протеина глютен привела к достоверному снижению потребления валовой энергии корма при одновременном увеличении энергии продукции, что свидетельствует о более эффективном использовании питательных веществ рациона.

Введение

Производство говядины в большинстве стран с развитым скотоводством базируется на интенсивном выращивании и откорме животных. Для обеспечения интенсивного роста бычков необходимо применять рационы с высокой концентрацией обменной энергии. Это достигается за счет использования в кормлении жвачных животных достаточно высокого уровня зерновых концентратов при относительно низком содержании сырой клетчатки. При интенсивном выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота оптимальным считается уровень зерновых 50-55 % от обменной энергии рационов. В этих условиях в рубце интенсивно протекают микробиологические процессы, являющиеся важным источником аминокислот для обеспечения метаболизма в организме жвачных животных.

Наряду с микробным протеином в кишечник жвачных может поступать протеин корма, не подвергшийся перевариванию в рубце. В принятых в нашей стране детализированных нормах не предусматривается оптимизация условий питания выращиваемого на мясо молодняка крупного рогатого скота с учетом распадаемости протеина в рубце. Однако, опыт как зарубежных, так и отечественных исследований по применению в рационах жвачных трудно распадающегося в рубце протеина свидетельствует о существенном увеличении поступления из кишечника в метаболический пул аминокислот, что способствует увеличению продуктивности животных (Курилов Н.В. и др., 1983; Овчаренко и др., 1983; Oldham, 1981).

Целью данного исследования являлось изучение возможности оптимизации энергетического обмена и

определение количества отдельных субстратов, расходуемых на энергетические цели в организме бычков, при использовании рационов с разной распадаемостью протеина в рубце.

Материалы и методы

Исследования провели на 10 бычках с начальной живой массой 160-170 кг при выращивании до 400 кг, согласно промышленной схеме, в условиях вивария методом групп (2 группы по 5 голов). Содержание животных было привязным, кормление – индивидуальным, трехразовым, с ежедневным учетом количества заданных кормов и их остатков. Для оценки интенсивности роста животных ежемесячно взвешивали.

В предварительном периоде были сформированы две группы бычков по принципу аналогов. В течение 1,5 месяцев все бычки получали один и тот же рацион, рассчитанный на среднесуточный прирост 900-1000 г.

Опытный период длился 90 дней, в течение которого животные получали рацион, различающийся по составу комбикорма. Количество сена, силоса и комбикорма в рационах было одинаковым. В комбикорм для бычков 1 группы (контрольной) входил подсолнечный шрот. Протеин этого комбикорма имел большую распадаемость в рубце, чем протеин комбикорма для 2-й группы (опытной), в который вместо шрота ввели глютен и большее количество ячменя по изоэнергетическому и изопротеиновому принципу (табл.1).

Распадаемость протеина в рубце из рациона контрольной группы равнялась 73-75 %, а протеина рациона опытной группы – 60-62 %. Предполагалось, что в результате из тонкого кишечника в кровь бычков контрольной группы за сутки будет поступать около 429 г доступного для обмена протеина, а в кровь бычков опытной группы – 556 г. Следовательно, обеспеченность обменных процессов аминокислотами у бычков опытной группы будет выше.

В конце предварительного – начале опытного периода на бычках были проведены респирационные исследования для получения исходных данных и контроля объективности формирования групп.

В конце опытного периода на всей группе бычков был проведен балансовый опыт в сочетании с респирационными исследованиями масочным методом для оценки потребления,

переваривания и использования энергии рациона на образование продукции и на энергетические нужды (Надальяк и др., 1986).

Таблица 1. **Рецепты комбикормов опытного периода**

<i>Компоненты, %</i>	<i>Группы</i>	
	<i>контрольная</i>	<i>опытная</i>
<i>Ячмень</i>	50	58
<i>Пшеница</i>	19	19
<i>Отруби пшеничные</i>	10	10
<i>Жмых подсолнечный</i>	18	-
<i>Глютен</i>	-	10
<i>Мел</i>	1,2	1,2
<i>Соль</i>	0,8	0,8
<i>Премикс</i>	1,0	1,0
<i>В 1 кг корма содержится:</i>		
<i>Сухое вещество, г</i>	903	907
<i>Кормовые единицы</i>	1,04	1,03
<i>Обменная энергия, МДж</i>	9,8	9,8
<i>Сырой протеин, г</i>	136	136
<i>Сырая клетчатка, г</i>	54	36
<i>Сырой жир, г</i>	38,3	24,9
<i>Сырая зола, г</i>	54,3	45,8
<i>Крахмал, г</i>	342	376
<i>Сахар, г</i>	8,0	7,2
<i>Кальций, г</i>	4,96	5,94
<i>Фосфор, г</i>	3,60	4,17
<i>Магний, г</i>	2,40	1,74
<i>Сера, г</i>	3,17	2,37
<i>Железо, мг</i>	144	156
<i>Медь, мг</i>	94,3	84,6
<i>Цинк, мг</i>	144	156
<i>Марганец, мг</i>	91	156
<i>Кобальт, мг</i>	20,9	18,6
<i>Йод, мг</i>	1,62	1,53
<i>Витамин А, тыс.МЕ</i>	15,9	10,1
<i>Витамин Д, тыс.МЕ</i>	2	2

В заключение был проведен убой бычков для оценки морфологического и химического состава туш и содержания в них энергии.

Результаты и обсуждение

Анализ материалов респирационных исследований, проведенных в конце предварительного периода, выявил, что по вентиляции легких, поглощению кислорода из воздуха, выделению углекислоты и величине дыхательного коэффициента (ДК) достоверных различий между группами в возрасте 12 месяцев не было (табл.2). Таким образом, перед опытным периодом, начинавшемся с 12-месячного возраста, группы бычков были аналогами не только по живой массе и среднесуточному приросту, но и по показателям газоэнергетического обмена, что подтверждает достаточно удачный подбор животных.

Анализируя показатели газообмена у бычков 14-месячного возраста можно отметить, что интенсивность вентиляции легких в контрольной группе по сравнению с предварительным периодом существенно не изменилась, тогда как у опытной группы, получавшей рацион с меньшей распадаемостью протеина, этот показатель значительно уменьшился (на 34,5 %). Величина дыхательного коэффициента у бычков обеих групп с возрастом увеличилась. Этот сдвиг можно объяснить увеличением процессов жиροобразования, обусловленных изменениями обмена веществ в организме в процессе роста.

Таблица 2. Газообмен у бычков

Возраст, месяцы	Вентиляция легких за сутки, л/кг массы тела	Потребление кислорода, %	Выделение углекислого газа, %	Дыхательный коэффициент
<i>Контрольная группа</i>				
12	301±37,6	3,16±0,17	2,35±0,12	0,74±0,01
14	306±31,0	2,75±0,09	2,58±0,11	0,93±0,03
<i>Опытная группа</i>				
12	303 ± 36,5	3,43 ± 0,18	2,86 ± 0,13	0,83 ± 0,03
14	226 ± 16,2	2,86± 0,08	2,78± 0,09	0,98 ± 0,04

Анализ среднесуточного прироста живой массы показал, что меньшая распадаемость сырого протеина рациона способствовала увеличению прироста у бычков опытной группы. Наибольшая разница (в 15,9 %) была в 15-месячном возрасте. За весь опытный период разница между группами в приросте составила 6,5 % (табл.3).

Увеличение доли труднорастворимых белков в рационе бычков могло способствовать повышению фонда свободных аминокислот, всосавшихся в тонком кишечнике и, как следствие, привести к активации синтеза мышечных белков. Сходные результаты были получены в опытах Вовк (1989) при использовании в рационе труднодеградируемых белков, в результате чего среднесуточный прирост у бычков увеличился на 7,9 %.

Таблица 3. Живая масса и среднесуточный прирост бычков

Группы	Предва рит.пер иод	Опытный период			
	12 мес	13 мес	14 мес	15 мес	16 мес
Живая масса, кг					
Контроль	227± 7,4	270± 7,0	313± 8,6	361±1 1,0	
Опыт	228±14, 8	276±1 5,4	31414 ,0	372±1 2,2	
Прирост, г/сут					
Контроль	929±46, 4	1458± 45,2	1533± 74,2	1221± 66,6	1379± 47
Опыт	940±27, 4	1542± 109	1593± 92,6	1415± 87,0	1469± 79

Анализ материалов балансового опыта у 15-месячных бычков выявил, что в потреблении и использовании энергии питательных веществ корма между группами имелись определенные различия (табл.4). У животных опытной группы потребление валовой энергии корма было ниже на 6,4 % ($P<0,05$), потери энергии с калом меньше на 14,3 % ($P<0,01$), потери энергии с мочой – меньше на 19,4 %, отложение энергии в теле выше на 25,6 %. Потери энергии с теплопродукцией были выше на 17,6 % у бычков контрольной группы.

Вероятно, использование в рационе бычков опытной группы протеина с низкой распадаемостью привело к оптимизации обменных процессов в организме бычков и, как следствие этого, к снижению непроизводительных затрат энергии.

Таблица 4. Обмен энергии у бычков, МДж/сутки

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Валовая энергия корма	163,93±1,83	153,45±3,72
Энергия кала	58,91±1,20	50,48±2,02
Энергия перевар.питат.веществ	105,02±1,61	102,97±2,58
Потери энергии в пищеварит.тракте	17,85±0,26	17,50±0,44
Энергия мочи	4,68±0,71	3,82±0,81
Обменная энергия	82,49±1,54	81,65±2,73
Теплопродукция	54,12±3,1	46,00±3,6
Энергия прироста	28,37±3,79	35,65±5,86

Рационы, включающие протеин с различной распадаемостью, по разному повлияли на обеспечение организма бычков субстратами (табл.5). Более высокая теплопродукция у бычков контрольной группы была обусловлена большим расходом на энергетические нужды ацетата, глюкозы, высших жирных кислот и кетоновых тел.

Таблица 5. Количество субстратов, использованных в энергетическом обмене

Субстраты	Контрольная группа		Опытная группа	
	г	%	г	%
Белок и другие азотсодерж. в-ва	385	100	385	100,00
Ацетат	2188	100	2155	98,49
Глюкоза	335	100	280	83,58
Высшие жирные к-ты и кетоновые тела	257	100	98	38,13

Анализ материалов контрольного убоя бычков показал, что при незначительной разнице между группами по предубойной массе животных и убойному выходу, у бычков опытной группы выход костей был на 11,4 % меньше, а выход мякоти на 6,4 % больше. Разница по этим показателям достоверна. Кроме того, у бычков опытной группы было меньшим содержание внутреннего и околопочечного жира - на 7,6 и 27,1 %, соответственно.

Заключение

Использование рациона с пониженной распадаемостью протеина в рубце, вследствие изопротеиновой и изоэнергетической замены (по сравнению с рационом контрольной группы) подсолнечного шрота на глютен и ячмень, способствовало заметному увеличению

среднесуточного прироста массы тела бычков опытной группы. При обвалке туш установлено, что у бычков опытной группы, получавших рацион с пониженной распадаемостью протеина, в туше была меньше доля костей и внутреннего жира, но больше доля мякоти.

По материалам изучения энергетического обмена у бычков можно сделать заключение, что при использовании рациона с пониженной распадаемостью протеина животные более эффективно расходовали энергию питательных веществ корма. При достоверно меньшем потреблении валовой энергии корма у животных опытной группы были ниже потери энергии с калом, мочой и в виде тепла, что обеспечило более высокое отложение энергии в теле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курилов Н.В., Коршунов В.Н. и др. Физиолого-биохимические основы повышения эффективности использования протеина жвачных животных. Научн.тр.ВНИИФБиП, Боровск, 1983, 26: 3-10.
2. Овчаренко Э.В., Медведев И.К. и др. Научн.тр.ВНИИФБиП, т. 1983, 26: 24-37.
3. Надаляк Е.А., Агафонов В.И. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у с.-х. животных. Метод.ук., Боровск, 1986: 58 с.
4. Вовк С.И. Влияние качества протеина на рост и синтез мышечных белков и молодняка крупного рогатого скота. Оценка и нормирование протеинового питания жвачных животных. Боровск, 1989: 48.
5. Oldham J. Recent Development in Ruminant Nutrition. V.22, №3, 1981, s. 49-81.

ПАРАМЕТРЫ ОБМЕНА МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ У РАСТУЩИХ БЫЧКОВ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ КОРМОВ С ПОНИЖЕННОЙ РАСПАДАЕМОСТЬЮ ПРОТЕИНА В РУБЦЕ

К.Т. Еримбетов

Лаборатория белково-аминокислотного питания

Дополнительное поступление аминокислот в метаболический пул организма растущих бычков, за счет введения в их рацион протеина с пониженной распадаемостью в рубце (кукурузный глютен), повышает эффективность синтеза мышечных белков и увеличивает накопление мышечной массы, что в конечном итоге улучшает показатели мясной продуктивности. Количественные показатели формирования мышечной ткани при интенсивном выращивании и откорме молодняка крупного рогатого скота подтвердили необходимость оптимизации протеинового питания жвачных и прогнозирования потока аминокислот из кишечника в метаболический пул организма путем учета качества протеина в кормах.

Введение

На протяжении ряда лет в институте проводятся исследования, направленные на разработку способов оптимизации биосинтеза белков и липидов в организме бычков, и на повышение эффективности производства говядины. Несомненно, что путь к решению этой проблемы у молодняка крупного рогатого скота лежит через повышение эффективности биоконверсии питательных веществ корма в продукцию, за счет совершенствования условий питания. Исследования, проведенные в Корнельском университете (Beermann et al., 1997), показали, что с увеличением количества казеина, инфузируемого в сычуг бычков, пропорционально увеличивается ретенция азота. При введении в сычуг бычков 90 г казеина в сутки ретенция азота достигала величины 64,6 г. Эти и другие данные свидетельствуют, что у растущих жвачных животных одним из факторов, лимитирующих интенсивность процессов биосинтеза белков, является количество аминокислот, поступающее из желудочно-кишечного тракта в метаболический пул (Campbell et al., 1997; Dhiman and Satter, 1997; Bethard et al., 1997; Ludden and Kerley, 1997; Orskov et al., 1999). Следовательно, потенциальные возможности белоксинтезирующего аппарата у растущего молодняка крупного рогатого скота в значительной мере не реализуются и не являются фактором, лимитирующим проявление генетического потенциала продуктивности.

Система питания, разрабатываемая в Корнельском университете (США), учитывает качество протеина и углеводов в кормах, что позволяет более эффективно оптимизировать протеиновое питание жвачных животных и прогнозировать поток аминокислот из кишечника в метаболический пул организма. Ранее проведенные исследования в нашем институте на оперированных бычках также свидетельствуют о возможности увеличения потока аминокислот, поступающих из кишечника в кровь, за счет включения в рацион животных кормов с низкой рападаемостью протеина в рубце (Погосян, 1992).

С учетом изложенного, а также в связи с разработкой способа повышения биоконверсии питательных веществ корма у бычков в компоненты мяса, были изучены особенности азотистого обмена и количественные характеристики синтеза и распада мышечных белков при разной обеспеченности процессов метаболизма аминокислотами.

Материал и методы

Эксперимент проведен в виварии института на 10 бычках холмогорской породы в периоды дорастивания и интенсивного откорма, с живой массой 213 – 217 кг (при постановке на опыт), методом групп. По принципу парных аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста были сформированы две группы бычков по 5 голов в каждой. В предварительный период (72 дня) животных

кормили одинаково, в опытный период (98 дней) – дифференцированно. Разница в кормлении заключалась в различном составе комбикормов. Комбикорм для бычков контрольной группы включал ячмень – 50%, пшеницу – 19%, отруби пшеничные – 10% и шрот подсолнечный – 18%. В комбикорм бычков опытной группы вместо подсолнечного шрота было включено 10% кукурузного глютенa и дополнительно 8% ячменя. В остальном комбикорма не отличались. Рацион для всех бычков был одинаковым и включал сено злаковое, силос разнотравный и комбикорм. Концентраты составляли 52% обменной энергии рациона. Содержание бычков привязное, кормление 3-разовое индивидуальное по детализированным нормам, разработанным для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков (Наставление..., 1971, Нормы и рационы..., 1994). В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма, а интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешивания до утреннего кормления в течение 2 дней подряд и брали среднюю величину между ними.

Перед началом опытного периода (в возрасте 12 месяцев) провели 2-суточный отбор мочи для определения экскреции с мочой 3-метилгистидина и креатинина, а также брали методом биопсии пробы длиннейшей мышцы спины (в области 1-3 поясничных позвонков) с целью характеристики исходных параметров обмена мышечных белков. В 12- (до дифференцированного кормления), 14- и 15-месячном возрасте были взяты пробы крови пункцией яремной вены до утреннего кормления животных и через 3 часа после него. В ходе эксперимента провели балансовый опыт (в 14-месячном возрасте) с целью определения переваримости и усвоения азотистых веществ корма. В конце опыта провели убой животных для оценки состава туш и мясной продуктивности бычков и взяли пробы органов и тканей для биохимических исследований.

Для характеристики метаболизма азотистых веществ определяли: концентрацию мочевины в плазме крови по Coulambe, Fawteon (1963); концентрацию свободных аминокислот в плазме крови на аминкислотном анализаторе ААА-Т-339; активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в длиннейшей мышце спины по Reitman, Frankel (1967); содержание общего азота в кормах, кале, моче по Къельдалю. Химический анализ мышечной ткани (сухое вещество, азот, липиды) проводили по общепринятым методам (Лебедев, Усович, 1976). В пробах длиннейшей мышцы спины определяли также белковые фракции (саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные белки) по Helander (1957). Для оценки качества мяса были выбраны следующие показатели: рН мяса в динамике его созревания, влагоудерживающая способность, окраска, нежность и белково-качественный показатель мяса (Гуменюк, Черкасская, 1977).

В качестве интегральных показателей, характеризующих интенсивность и направленность метаболических процессов, были избраны скорости отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани.

Для их расчета в 12- 14- и 15-месячном возрасте у животных определяли суточную экскрецию с мочой креатинина, содержание которого пропорционально количеству мышечной ткани в организме бычков. На основании этих данных рассчитывали количество мышечной ткани и среднесуточную скорость ее накопления. В образцах мышечной ткани, взятой путем биопсии, определяли концентрацию белков и по ней, с учетом количества мышечной ткани, рассчитывали скорость отложения мышечных белков. Определение суточной экскреции 3-метилгистидина с мочой в эти периоды позволило определить скорость распада мышечных белков с использованием коэффициентов, предлагаемых Goppinath et al. (1984), Nishisawa et al. (1979) и нашей лабораторией. Концентрацию 3-метилгистидина определяли на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339, содержание креатинина химическим методом (Лемперт, 1968). Математическую обработку данных проводили стандартными методами (Овсянников, 1976).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что улучшение обеспеченности процессов метаболизма аминокислотами, за счет использования в кормлении бычков рационов с низкой распадаемостью в рубце протеина, позволило на 6,5% увеличить среднесуточный прирост живой массы животных (у бычков опытной группы он составил 1469 ± 79 , у контрольных 1379 ± 47 г). При этом у бычков опытной группы повышалась не только интенсивность роста, но и снижалось потребление корма и питательных веществ по сравнению с контролем: сена на 1,36, силоса – на 6,65, комбикорма – на 0,22, сухого вещества – на 4,07, сырого протеина – на 6,57 и обменной энергии на 2,61 %. Следовательно, опытные животные меньше затратили концентратов (на 6,54%), кормовых единиц (на 8,58 %), сухого вещества (на 8,90 %), сырого протеина (на 11,27 %) и обменной энергии (на 8,37%) на единицу получаемой продукции.

Результаты балансовых опытов показали, что у животных, получавших рацион с низкой распадаемостью в рубце протеина, потребление азота корма было ниже контроля на 3,6 % (табл.1). В то же время при меньшем количестве переваренного сырого протеина в опытной группе, отложение азота было больше за счет меньшего выделения его с мочой, что свидетельствует о более высокой эффективности использования у них азота в обменных процессах.

Таблица 1. Показатели усвоения азота корма, г/сутки

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
1	2	3
14-месячный возраст – опытный период		
Принято азота с кормом	$202,96 \pm 1,47$	$195,76 \pm 5,89$

Выделено:		
с калом	70,89 ± 2,42	66,77 ± 2,48
с мочой	81,09 ± 2,98	75,86 ± 2,40
Переварено, г	132,07 ± 2,98	128,99 ± 3,67
%	65,07 ± 1,34	65,91 ± 0,47
Усвоено, г	50,98 ± 4,14	53,13 ± 4,55
% от принятого	25,12 ± 1,98	27,14 ± 1,74
% от переваренного	38,40 ± 2,65	41,19 ± 2,76

По-видимому, более низкая распадаемость сырого протеина глютена, как основного белкового корма в рационе, обусловила меньшее образование аммиака в рубце бычков опытной группы. Соответственно, в течение всего опыта у них, по сравнению с контролем, уровень мочевины – конечного продукта азотистого обмена в плазме крови до кормления и через 3 часа после приема корма был достоверно ниже на 8,6-9,0 и 18,6-19,1 % (табл.2). Эти данные отчасти раскрывают механизм повышения эффективности использования азота при оптимизации протеинового питания жвачных животных.

Таблица 2. Концентрация мочевины в плазме крови бычков, ммоль/л

Возраст животного	Контроль		Опыт	
	до кормления	через 3 часа после кормления	до кормления	через 3 часа после кормления
12 мес. (исходные данные)	2,83 ± 0,22	3,65 ± 0,25	2,85 ± 0,22	3,73 ± 0,22
14 мес. (опытный период)	3,59 ± 0,26	4,51 ± 0,39	3,28 ± 0,28	3,65 ± 0,18
15 мес. (опытный период)	4,13 ± 0,32	5,06 ± 0,38*	3,76 ± 0,12	4,12 ± 0,10*

*Здесь и далее: *p < 0.05; ** p < 0.02; p < 0.01 ****

Об усилении потока аминокислот из кишечника в кровь под влиянием кукурузного глютена, как источника протеина с пониженной распадаемостью в рубце, говорят и данные по концентрации свободных аминокислот в плазме крови бычков. Как видно из таблицы 3, у бычков опытной группы уровень свободных аминокислот в плазме крови через 3 часа после кормления был на 6,0 – 6,4% выше, чем у контрольных животных. При этом наиболее выраженное увеличение отмечалось по незаменимым аминокислотам (на 7,5-7,6%). Следовательно, оптимизация протеинового питания растущих бычков путем использования кормов с пониженной распадаемостью протеина

улучшила обеспеченность процессов метаболизма аминокислотами, что, в свою очередь, способствовало изменению характера обмена белков в скелетных мышцах. Так, бычки опытной группы по уровню и интенсивности накопления мышечной ткани и по отложению белка в мышцах превосходили животных контрольной группы (табл.4,5). Например, среднесуточный прирост мышечной ткани у них был выше контроля на 9,85%, отложение белка в скелетных мышцах при этом повысилось на 9,35% (табл.5).

Таблица 4. Отношение экскреотируемого с мочой креатинина к живой массе бычков, мг/кг

	12-месячный возраст – исходные данные	15-месячный возраст - опытный период
Контрольная	21,82 ± 0,87	22,93 ± 0,25
Опытная	22,64 ± 0,36	23,84 ± 0,49
% к контролю	103,8	104,0

Таблица 5. Параметры отложения мышечных белков и прироста мышечной ткани у бычков

Показатели	Группы		% к контролю
	контроль	опыт	
12-месячный возраст – исходные данные			
Количество мышечной ткани, кг	80,35 ± 4,80	83,53 ± 4,46	104,0
Количество белка в мышечной ткани, кг	16,10 ± 0,96	16,61 ± 0,90	103,17
15-месячный возраст – опытный период			
Количество мышечной ткани, кг	133,65 ± 3,13	142,10 ± 5,84	107,95
Количество белка в мышечной ткани, кг	26,87 ± 0,50	28,42 ± 0,50	105,77
Среднесуточный прирост мышечной ткани, г/сут	528 ± 25,4	580 ± 23,64	109,85
Среднесуточный прирост белка в мышечной ткани, г/сут	107 ± 5,4	117 ± 4,4	109,35

Величина отложения мышечных белков и прирост мышечной ткани зависят от соотношения интенсивности двух противоположных процессов – синтеза и распада белков. Данные опыта свидетельствуют, что более высокое накопление мышечных белков у бычков опытной группы обусловлено как повышением скорости их синтеза, так и деградации, но интенсивность синтеза белков превалировала над распадом и была выше на 7,65%. Соответственно выше была и скорость их отложения (табл.6). В исследованиях других авторов (Wessels et al., 1997) было также показано увеличение скорости и эффективности синтеза белков всего тела бычков при инфузии в кровь в течение 14 дней смеси лимитирующих аминокислот (лизина, метионина, треонина, триптофана, гистидина и аргинина). Также

следует отметить, что у бычков опытной группы, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы,

Таблица 3. Концентрация свободных аминокислот в плазме крови бычков, мг%

Аминокислоты	Через 3 часа после кормления					
	12-месячный возраст		14-месячный возраст		15-месячный возраст	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Аспарагиновая кислота	0,29±0,03	0,25±0,03	0,46±0,06	0,38±0,05	0,36±0,02	0,35±0,03
Треонин	0,44±0,06	0,43±0,09	0,90±0,05	0,97±0,07	0,88±0,09	0,94±0,06
Серин	0,52±0,09	0,51±0,05	0,69±0,03	0,67±0,04	0,72±0,02	0,71±0,03
Глутаминовая кислота	1,74±0,11	1,45±0,15	1,49±0,11	1,58±0,09	1,56±0,11	1,67±0,08
Глицин	2,18±0,10	2,10±0,14	1,98±0,11*	2,42±0,13*	2,07±0,11	2,20±0,08
Аланин	1,62±0,08	1,83±0,09	1,54±0,10	1,50±0,06	1,61±0,05	1,70±0,05
Валин	1,92±0,09	2,02±0,12	1,73±0,09	1,85±0,11	1,88±0,10	2,00±0,06
Цистин	0,24±0,04	0,21±0,02	0,36±0,03	0,41±0,04	0,40±0,01	0,44±0,02
Метионин	0,29±0,03	0,33±0,06	0,29±0,02	0,38±0,04	0,36±0,05	0,41±0,03
Изолейцин	1,19±0,10	1,32±0,08	1,20±0,06	1,28±0,05	1,30±0,04	1,36±0,03
Лейцин	0,83±0,08	0,91±0,09	1,20±0,15**	1,79±0,14**	1,23±0,13*	1,66±0,12*
Тирозин	0,84±0,05	0,82±0,09	1,05±0,06	0,91±0,09	0,86±0,04	0,87±0,06
Фенилаланин	0,47±0,06	0,54±0,07	0,69±0,07	0,77±0,04	0,70±0,03*	0,79±0,02*
Лизин	0,89±0,04	0,85±0,09	1,24±0,09	1,20±0,10	1,31±0,04	1,30±0,08
Гистидин	0,66±0,07	0,72±0,08	1,30±0,08	1,43±0,09	1,28±0,08	1,40±0,05
Аргинин	1,90±0,09	1,55±0,17	1,76±0,16	1,41±0,15	1,69±0,09	1,58±0,12
Сумма аминокислот	16,02±0,39	15,84±0,48	17,88±0,71	18,95±0,78	18,21±0,71	19,38±0,82
незаменимые	8,59±0,18	8,67±0,45	10,31±0,38	11,08±0,45	10,63±0,55	11,44±0,61
заменимые	7,43±0,40	7,17±0,26	7,57±0,39	7,87±0,40	7,58±0,34	7,94±0,30

имело место и повышенное отложение липидов в длиннейшей мышце спины по сравнению с контролем (табл. 7).

Таблица 6. Параметры обмена белков в мышечной ткани 15-месячных бычков

Показатели	Группы		% к контролю
	контроль	опыт	
Скорость синтеза белков, г/сут	583,6 ± 14,5	597,9 ± 15,1	102,45
Скорость распада белков, г/сут	476,98 ± 14,6	480,94 ± 16,8	100,83
Скорость отложения белков, г/сут	107 ± 5,4	117 ± 4,4	109,35
Эффективность синтеза, %	18,3 ± 1,0	19,7 ± 0,8	107,65
Отношение синтез/распад	1,22 ± 0,02	1,25 ± 0,01	102,46
Относительная деградация мышечных белков, %/сутки	1,78 ± 0,06	1,71 ± 0,08	96,07

Таблица 7. Концентрация белка и липидов в длиннейшей мышце спины, г%

Возраст	Контроль		Опыт	
	белок	липиды	белок	липиды
12-месяцев – исходные данные	20,04±0,07	1,12±0,06***	19,88±0,15	1,41±0,05***
15-месяцев – опытный период	20,12±0,19	1,84±0,11*	20,00±0,14	2,19±0,06*

Концентрация общих липидов была более высокой у животных опытной группы и в гомогенате мышц, полученных после убоя животных (табл. 8).

Таблица 8. Химический состав мышц бычков 15 - месячного возраста

Показатели	Группы	Длиннейшая мышца спины	Гомогенат средней пробы мышц
Сухое вещество	контроль	24,46±0,25	26,29±0,63
	опыт	24,68±0,20	26,77±0,23
Белок	контроль	20,12±0,19	19,00±0,16
	опыт	20,00±0,14	18,84±0,31
Общие липиды	контроль	1,84±0,11*	4,88±0,10
	опыт	2,19±0,05*	5,00±0,09

Приведенные данные свидетельствуют, что увеличение интенсивности синтеза белков и липидов за счет оптимизации условий питания бычков происходит на фоне одновременного повышения скорости их деградации, то есть наблюдается усиление обмена белков и липидов.

Различия в уровне распадаемости протеина в рубце, и связанные с этим изменения в пищеварении и обмене азотистых веществ у бычков

разных групп, нашли отражение в убойных показателях и качестве мяса (табл.9). В туше бычков опытной группы по сравнению с контролем было больше мякоти (на 6,4%), отношение количества мякоти к выходу костей также оказалось на 18,0% выше, чем у контрольных животных ($P<0,02$). Это свидетельствует о лучшей омускуленности туш у бычков опытной группы.

Таблица 9. Показатели мясной продуктивности 15-месячных бычков

Показатели	Группы		% к контролю
	контроль	опыт	
Живая масса перед убоем, кг	360±9,5	368±10,7	102,2
Масса туши, кг	182,6±5,37	187,0±7,14	102,4
Убойный выход туши, %	50,72±0,63	50,85±0,91	100,3
Масса мякоти, кг	138,6±3,26	147,5±6,12	106,4
Мякоти на 100 кг живой массы, %	38,51±0,41	40,09±0,84	104,1
Отношение мякоти к костям	3,16±0,08	3,73±0,10	118,0**
Жира на 100 кг живой массы, %	2,80±0,30	2,54±0,24	90,71
Отношение мякоти к жиру	13,86±0,08	15,88±0,10	114,57**

Необходимо отметить, что обеспеченность метаболизма подопытных животных аминокислотами отразилась как на количестве, так и на качестве мяса. Мясо животных опытной группы отличалось более высокими значениями физико-химических показателей, а также большим содержанием полноценных белков по сравнению с контролем (табл. 10).

Таблица 10. Физико-химические и качественные показатели мяса 15-месячных бычков

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
pH через 3 часа после убоя	6,46 ± 0,05	6,53 ± 0,07
pH через 24 часа после убоя	5,87 ± 0,04	5,93 ± 0,08
Интенсивность окраски, ед. (экстинция×1000)	270 ± 12	298 ± 10
Нежность мяса, см ² / г	1086 ± 25*	1179 ± 20*
Влагоудерживающая способность, %	79,6 ± 5,2	95,3 ± 4,5
Качественный показатель белков, ед. (отношение саркоплазм. + миофибр. к стромальной фракции мышечных белков)	5,10 ± 0,28	5,89 ± 0,22

Заключение

Исследования показали, что скормливание бычкам в период доращивания и откорма рационов с более низкой распадаемостью в

рубце протеина положительно сказалось на повышении эффективности использования азотистых веществ корма в биосинтетических процессах, что, в свою очередь, способствовало повышению эффективности синтеза белка в скелетных мышцах и увеличению накопления мышечной ткани. Таким образом, используя в кормлении бычков рационы с низкой распадаемостью протеина в рубце можно улучшить обеспеченность аминокислотами процессов синтеза основного компонента мяса – мышечной ткани и при этом значительно повысить конверсию питательных веществ корма в производство говядины.

В то же время, по данным наших исследований 2000 года, одновременное использование протеина и крахмала с пониженной распадаемостью в рубце в кормлении бычков (по сравнению с использованием одного протеина) позволило добиться наибольшего эффекта в обеспечении процессов биосинтеза белков аминокислотами. Можно полагать, что у животных, получавших комбикорм с низкой распадаемостью протеина и крахмала в рубце, меньше аминокислот было использовано на образование глюкозы, что подтверждают данные о меньшем выделении у них азота с мочой. В дальнейшем при проведении исследований целесообразно учитывать обеспеченность метаболизма лимитирующими аминокислотами и глюкозой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beermann D.H., Robinson T.F., Knaus W.F. and Fox D.G. Formulation of protein supplements to provide ideal amounts of absorbed amino acids in growing cattle. Proceedings 1997 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Cornell University, Ithaca, NY, 1997. 172-180.
2. Campbell C.G., Titgemeyer E.C. and St-Jean G. Sulfur Amino Acid Utilization by Growing Steers. J. Anim. Sci., 1997, 75:230-238.
3. Dhiman T.R. and Satter L.D. Effect of Ruminally Degraded Protein on Protein Available at the Intestine Assessed Using Blood Amino Acid Concentrations. J. Anim. Sci., 1997, 75:1674-1680.
4. Bethard G.L., James R.E. and McGilliard M.L. Effect of Rumen-Undegradable Protein and Energy on Growth and Feed Efficiency of Growing Holstein Heifers. J. Dairy Sci., 1997, 80: 2149-2155.
5. Ludden P.A. and Kerley M.S. Amino Acid and Energy Interrelationships in Growing Beef Steers: 1. The Effect of Level of Feed Intake on Ruminal Characteristics and Intestinal Amino Acid Flows. J. Anim. Sci., 1997, 75: 2550-2560.
6. Orskov E.R. et al. Effect of supply on fasting nitrogen excretion and effect of level and type of volatile fatty acid infusion on response to protein infusion in cattle. Brit. J. Nutr., 1999, 81: 389-393.

7. Погосян Д.Г. 1992. Переваримость нерасщепляемого в рубце протеина различных кормов в кишечнике растущих бычков. Автореф. канд. дисс., Боровск, 24 с.
8. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971.- 30с.
9. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. Часть I. Крупный рогатый скот. Под ред. акад. РАСХН А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова проф. В.В.Щеглова. М.: Знание, 1994. 400 с.
10. Coulambe S.S., Favreon S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem. 1963, 1, 9 : 23.
11. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the transaminases. Am. J. Clin. Path., 1957, 1: 28.
12. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976, 389.
13. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasm and myofibrile protein content of normal and atrophy skeletal muscle. Acta physiological Scand., 1957, 41: 141.
14. Гуменюк Г.А., Черкасская Н.В. Методические рекомендации по исследованию кормов и продуктов животноводства. Киев, 1977, 256.
15. Goppinath R., Kitts W.D. Growth, N-methylhistidine excretion and muscle protein degradation in growing beef steers. J. Anim. Sci., 1984, 59: 1262-1269.
16. Nishizawa N., Joyoda Y., Noguchi T. et al. N-methylhistidine content of organs and tissues of cattle and an attempt to estimate fractional catabolic and synthesis rates of myofibrillar proteins of skeletal muscle during growth by measuring urinary output of N-methylhistidine. Brit. J. Nutr., 1979, 42: 247.
17. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968. 18-20.
18. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве М.: Колос, 1976, 210.
19. Wessels R.H., Titgemeyer E.C. and Jean G. St. Effect of Amino Acid Supplementation on Whole-Body Protein Turnover in Holstein Steers. J. Anim. Sci. 1997, 75 : 3066-3073.

**ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ КОРМОВОГО ГИДРОЛИЗНОГО САХАРА
НА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ РАЦИОНА
И БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ
У БЫЧКОВ-КАСТРАТОВ**

В.В. Михайлов

Лаборатория энергетического питания

При добавке кормового гидролизного сахара к основному рациону (контроль), состоящему из сена, силоса и комбикорма, достигли повышения в опытном рационе бычков-кастратов сахаро-

протеинового отношения с 0,2 : 1 до 1 : 1. При использовании опытного рациона установлено повышение переваримости сухого вещества на 4,7, органического вещества – на 4,6, сырой клетчатки – на 2,4, БЭВ – на 6,8 и сахаров – на 10,3%. Добавка гидролизного сахара в опытный рацион обусловила повышение содержания в крови бычков молочной кислоты как до, так и после кормления на 2,06-2,67мг% по сравнению с контролем. В сыворотке крови также повысилась в равной степени активность двух гликолитических ферментов (фруктозобисфосфатальдозазы и лактатдегидрогеназы) и цитоплазматической малатдегидрогеназы. Концентрация АТФ, АДФ и АМФ в крови на контрольном и опытном рационах различалась незначительно. Добавка кормового гидролизного сахара обеспечила увеличение среднесуточного прироста живой массы бычков в среднем на 94 г.

Введение

Важным условием повышения эффективности использования питательных веществ кормов крупным рогатым скотом, наряду с другими факторами, является обеспечение соответствующего сахаро-протеинового отношения рациона. Во многих хозяйствах при кормлении жвачных животных, особенно высокопродуктивных, наблюдается дефицит сахаров, который наиболее остро проявляется в стойловый период, когда в рационах используется значительное количество силоса и недостаточно скармливается сена, сенажа и корнеплодов. При понижении сахаро-протеинового отношения до 0,2–0,4 снижается интенсивность жизнедеятельности микрофлоры в рубце, что отрицательно влияет на использование азота, переваримость клетчатки, усвояемость каротина, следствием чего является недополучение продукции.

Наиболее распространенными источниками восполнения дефицита легкопереваримых углеводов являются свекла и кормовая патока, но кроме них в рационах крупного рогатого скота может быть использован кормовой гидролизный сахар, производимый из отходов древесины. В нем содержится около 23% сухого вещества и 14% сахаров, и он охотно поедается скотом.

Хотя проведено достаточно исследований по выяснению влияния кормового гидролизного сахара на поедаемость кормов, процессы пищеварения, переваримость и использование питательных веществ, в которых установлено положительное влияние его на привесы при откорме животных и удой у коров (Мысник и др., 1982; Тесленко, 1983; Косова и др., 1984; Радченко, 1984; Кирилов и др., 1986; Сорокин, 1986), однако в современной отечественной и иностранной зарубежной литературе отсутствуют данные о влиянии кормового гидролизного сахара на многие биохимические показатели, в том числе

комплекс показателей, характеризующих состояние биоэнергетики организма жвачных.

В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния добавок гидролизного сахара в рацион бычков-кастратов черно-пестрой породы на биоэнергетические показатели крови, которые позволяют судить о состоянии энергетического обмена всего организма.

Материал и методы

Опыт был проведен в комплексе с сотрудниками ВИЖа в условиях вивария методом периодов на трех бычках-кастратах черно-пестрой породы с начальной живой массой 370 кг в возрасте 13 месяцев. Продолжительность периодов (1 – контрольного и 2 – опытного) равнялась 30 дням. Содержание животных было привязным. Кормление трехкратным – в 8, 13 и 18 часов. В 1-м периоде животные получали основной рацион (ОР), который состоял из 2 кг разнотравного сена, 20 кг кукурузного силоса и 3 кг комбикорма, приготовленного по рецепту, приведенному в таблице 1. Во 2-м периоде бычкам, кроме основного рациона, давали по 4 кг кормового гидролизного сахара. Сахаро-протеиновое отношение в контрольном рационе равнялось 0,2 : 1, а в опытном – 1 : 1.

Таблица 1. *Рецепт комбикорма*

Компоненты	%
Ячмень	47
Кукуруза	20
Отруби пшеничные	30
Трикальцийфосфат	1
Соль поваренная	1
Премикс П-60-1	1

С целью изучения суточной динамики биоэнергетических показателей крови у всех бычков в конце каждого периода из яремной вены брали пробы крови за 1 час до утреннего кормления и через 2 и 4 часа после его начала. В цельной крови модифицированными Тарановым и Михайловым (1978) методами определяли концентрации АТФ, АДФ, АМФ и лактата, а в сыворотке крови активность лактатдегидрогеназы – ЛДГ (К.Ф.1.1.1.27), малатдегидрогеназы – МДГ (К.Ф.1.1.1.37) и фруктозобисфосфат-альдозазы – ФБА (К.Ф.4.1.2.13).

Кроме вышеперечисленных показателей, в цельной крови определяли концентрацию суммы ЛЖК методом паровой дистилляции в аппарате Маркгама и расчетным путем – величину энергетического заряда по формуле:

$$\frac{1}{2} \times \frac{[\text{АДФ}] + 2[\text{АТФ}]}{[\text{АМФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АТФ}]} \quad (\text{Ленинджер, 1974})$$

Энергетический заряд клетки отражает её энергетический запас. Высокий энергетический заряд свидетельствует о том, что все содержащиеся в клетке аденозинфосфаты находятся в форме АТФ или АДФ, а при низких его значениях в клетке присутствуют только АДФ и АМФ. Низкий уровень энергетического заряда инициирует повышение скорости распада глюкозы в мышечных клетках. Скорость катаболизма глюкозы обратно пропорциональна энергетическому заряду клетки, вследствие противоположного влияния МДФ + АМФ и АТФ на регуляторные ферменты гликолиза. Аллостерическая модификация ферментов является основным способом регуляции метаболических путей.

Результаты и обсуждение

В контрольном периоде среднесуточные привесы у бычков-кастратов составили 844 ± 18 г, а во 2-м (опытном периоде), когда в рацион ввели гидролизный сахар – 938 ± 98 г. Разница между 1-м и 2-м периодами опыта по этому показателю составила 11%.

Предстояло выяснить, за счёт каких питательных веществ рациона был обеспечен больший прирост массы тела у бычков, получавших в дополнение к основному рациону гидролизный сахар, и как отражалась разница в кормлении на биоэнергетическом статусе крови.

Известно, что в создании необходимых условий для развития в преджелудках микроорганизмов, которые играют важную роль в процессах утилизации аммиака, аминокислот, амидов и других азотсодержащих веществ, поступающих с кормом и образующихся в рубце, большое значение имеет достаточное количество углеводов в рационе. Введение в рацион кормов, богатых крахмалом или сахарами, по данным некоторых авторов, снижало уровень аммиака в рубце и увеличивало синтез бактериального белка (Солун, 1971; Шманенков, 1975; и др.). В связи с этим мы изучили показатели азотистого обмена и использование азота корма при потреблении гидролизного сахара в дополнение к основному рациону. Для этого животные были до начала опытов оперированы по комплексной методике Синещева, что позволило проследить переваривание протеина и других питательных веществ в желудке и кишечнике отдельно.

Результаты исследований по использованию азота рациона приведены в таблице 2. Потребление азота с кормом в оба периода было практически одинаковым, однако в процессах пищеварения в сложном желудке бычков между периодами опыта была значительная разница. В 1-м периоде в желудке наблюдалось некоторое преобладание всасывания над поступлением азота. Во 2-м периоде, при добавке гидролизного сахара, поступление азота превышало всасывание, и в кишечник поступало азота на 9,8% больше ($P < 0,05$), чем было потреблено с кормом. В контрольном периоде в кишечнике бычков азота всасывалось меньше, чем в опытном периоде, когда в рацион добавляли гидролизный сахар. Это составляло соответственно 64 и 74% от потребленного с кормом количества. Разница, однако, была статистически недостоверной. Общая переваримость протеина (во всем желудочно-кишечном тракте) в контрольном периоде была несколько выше, чем в опытном (67,7 и 64,2% соответственно), но статистически недостоверна. Количество всосавшегося и отложенного в теле азота было незначительно больше в опытном периоде. По-видимому, более высокий суточный прирост живой массы у бычков во втором периоде опыта был обусловлен большим количеством энергии в рационе.

Таблица 2. Потребление и использование азота корма бычками

Показатели	Рационы			
	основной (ОР)		опытный (ОР + гидролизный сахар)	
	г	%	г	%
Потреблено с кормом	163,2±4,6	100,0	173,7±3,1	100,0
Изменилось в желудке	-6,0±5,1	-3,7	+17,0±8,9	+9,8
Поступило в кишечник с химусом	157,2±4,0	96,3	190,7±9,3	109,8
Переварено в кишечнике	104,5±3,1	64,0	128,6±11,7	74,0
Выделено с калом	52,7±2,3	32,3	62,1±2,4	35,8
Переварено всего	110,5±3,6	67,7	111,6±0,9	64,2
Выделено с мочой	86,6±8,2		87,4±6,1	
Отложено в теле:	23,9±4,8		24,2±5,6	
от принятого с кормом		14,8		13,9
от переваренного		21,6		21,7

Степень переваривания питательных веществ в желудочно-кишечном тракте и использование их организмом бычков иллюстрирует таблица 3.

*Таблица 3. Потребление и переваривание питательных веществ
основного и опытного (с добавлением гидролизного сахара) рационов*

Показатели	Рационы			
	основной (ОР)		опытный (ОР + гидролизный сахар)	
	г	%	г	%
1	2	3	4	5
<i>Сухое вещество</i>				
<i>Принято с кормом</i>	7332±142	100,0	8431±98	100,0
<i>Переварено в желудке</i>	2712±151	37,0	2969±350	35,2
Поступило в кишечник с химусом	4620±30	63,0	5462±258	64,8
Переварено в кишечнике	1759±43	24,0	2571±306	30,5
Выделено с калом	2861±39	39,0	2891±117	34,3
Переварено всего	4471±151	61,0	5540±123	65,7
<i>Продолжение таблицы 3</i>				
1	2	3	4	5
<i>Органическое вещество</i>				
<i>Принято с кормом</i>	6578±54	100,0	7627±69	100,0
<i>Переварено в желудке</i>	2947±217	44,8	3307±261	43,4
Поступило в кишечник с химусом	3630±217	55,2	4320±382	56,6
Переварено в кишечнике	1251±42	19,0	1905±253	25,0
Выделено с калом	2379±40	36,2	2415±103	31,6
Переварено всего	4199±82	63,8	5212±39	68,4
<i>Сырой жир</i>				
<i>Принято с кормом</i>	209±20	100,0	214±20	100,0
<i>Переварено в желудке</i>	+89±23	42,3	+147±61	68,8
Поступило в кишечник с химусом	298±12	142,3	362±53	168,8
Переварено в кишечнике	207±18	99,0	272±49	126,9
Выделено с калом	91±6	43,3	90±10	41,9
Разница (жир корма – жир кала)	119±24	56,7	125±30	58,1
<i>Сырая клетчатка</i>				

<i>Принято с кормом</i>	<i>1754±37</i>	<i>100,0</i>	<i>1788±22</i>	<i>100,0</i>
Выделено с калом	<i>704±22</i>	<i>40,2</i>	<i>663±56</i>	<i>37,1</i>
Переварено всего	<i>1050±34</i>	<i>59,8</i>	<i>1125±37</i>	<i>62,9</i>
<i>БЭВ</i>				
<i>Принято с кормом</i>	<i>3595±17</i>	<i>100,0</i>	<i>4539±38</i>	<i>100,0</i>
<i>Переварено в желудке</i>	<i>1839±50</i>	<i>51,1</i>	<i>2494±129</i>	<i>53,5</i>
Поступило в кишечник с химусом	<i>1756±42</i>	<i>48,9</i>	<i>2110±145</i>	<i>46,5</i>
Переварено в кишечнике	<i>502±33</i>	<i>14,0</i>	<i>835±100</i>	<i>18,4</i>
Выделено с калом	<i>1255±33</i>	<i>34,9</i>	<i>1257±61</i>	<i>28,1</i>
Переварено всего	<i>2340±49</i>	<i>65,1</i>	<i>3264±31</i>	<i>71,9</i>
<i>Крахмал</i>				
<i>Принято с кормом</i>	<i>1010±9</i>	<i>100,0</i>	<i>1016±14</i>	<i>100,0</i>
<i>Переварено в желудке</i>	<i>913±12</i>	<i>90,4</i>	<i>825±34</i>	<i>81,2</i>
Поступило в кишечник с химусом	<i>97±19</i>	<i>9,6</i>	<i>190±21</i>	<i>18,8</i>
Переварено в кишечнике	<i>50±16</i>	<i>4,9</i>	<i>141±22</i>	<i>13,9</i>
Выделено с калом	<i>47±5</i>	<i>4,7</i>	<i>49±3</i>	<i>4,9</i>
Переварено всего	<i>963±4</i>	<i>95,3</i>	<i>966±13</i>	<i>95,1</i>
<i>Сахара</i>				
<i>Принято с кормом</i>	<i>140±6</i>	<i>100,0</i>	<i>685±7</i>	<i>100,0</i>
<i>Переварено в желудке</i>	<i>109±9</i>	<i>78,2</i>	<i>648±11</i>	<i>94,6</i>
Поступило в кишечник с химусом	<i>30±3</i>	<i>21,8</i>	<i>37±4</i>	<i>5,4</i>
Переварено в кишечнике	<i>12±1</i>	<i>8,4</i>	<i>16±5</i>	<i>2,3</i>
Выделено с калом	<i>19±4</i>	<i>13,4</i>	<i>21±8</i>	<i>3,1</i>
Переварено всего	<i>121±10</i>	<i>86,6</i>	<i>664±15</i>	<i>96,9</i>

Как видно из материалов таблицы 3, при включении в рацион гидролизного сахара животные потребляли с кормом на 15% больше сухого вещества. Повышение потребления сухого вещества имело место не только в абсолютном выражении (с 7,3 до 8,4 кг), но и на единицу живой массы. Различие между периодами в потреблении сухого вещества было достоверным ($P < 0,01$).

При сравнении переваривания сухого вещества в желудке в контрольном и опытном периодах выявляется небольшое повышение переваривания в опытном периоде (2,7 и 3,0 кг соответственно). На рационе 2-го периода в кишечнике бычков переваривалось значительно

больше сухого вещества, чем на контрольном рационе. Разница была очень близка к статистически достоверной ($n_1 + n_2 - 2 = 4$; $t = 2,63$). Общее количество переваренного во всем желудочно-кишечном тракте сухого вещества было на опытном рационе достоверно больше, чем на контрольном (соответственно 5,54 против 4,47 кг: $P < 0,05$) при переваримости соответственно равной 65,7 и 61,0%.

Потребление органического вещества в опытном периоде было больше, чем в контрольном на 15,9% ($P < 0,01$). Соотношение переваривания органического вещества в желудке и кишечнике по периодам и общая переваримость были аналогичны таковым для сухого вещества ($P < 0,01$). Всего переварилось органического вещества на опытном рационе достоверно больше ($P < 0,01$), чем на контрольном рационе: соответственно 5212 г против 4199 г при переваримости 68,4 против 63,8 %.

Количество жира, потребленного с кормом, в оба периода было практически одинаковым. В сложном желудке, благодаря синтезу и поступлению с пищеварительными соками, в 1-м периоде количество жира увеличилось по сравнению с поступающим с кормом на 42,3%, а во 2-м периоде на 68,8%. Соответственно в 1-м периоде в кишечнике всосалось, по сравнению с потребленным с кормом количеством жира, 99%, а во 2-м – 126,9%.

Потребление сырой клетчатки в оба периода опыта было практически одинаковым (1754 и 1788 г). Переваримость клетчатки была недостоверно более высокой у животных, получавших опытный рацион (69,9 против 59,8% у животных на основном рационе).

Потребление БЭВ, в связи с дополнительным включением гидролизного сахара в рацион опытного периода, было больше во 2-м периоде. Соответственно, статистически достоверно больше БЭВ переварилось в сложном желудке на опытном рационе 2-го периода – 2429 г против 1839 в 1-м периоде. В кишечнике также на рационе опытного периода переваривалось статистически достоверно больше БЭВ, чем на рационе 1-го периода – 835 г против 502 г. Всего на рационе опытного периода бычками было переварено на 924 г БЭВ больше. Разница статистически достоверна ($P < 0,01$).

Потребление крахмала с кормом в оба периода было одинаковым, однако частные характеристики переваривания в желудочно-кишечном тракте существенно различались. Значительная часть крахмала переваривалась в желудке. В 1-м периоде в желудке у бычков переваривалось крахмала больше, чем во 2-м периоде, а в кишечнике наоборот, достоверно меньше (50 г против 141 на опытном рационе; $P < 0,05$). Общее количество переваренного крахмала и переваримость его в 1-м и 2-м периодах практически не отличались (969 и 966 г и 95,3 и 95,1%).

Данные изучения переваримости сахаров показывают, что бычки, которым скармливали основной рацион, потребляли с кормом очень мало сахаров (140 г), при этом сахаро-протеиновое отношение было 0,2:1. При добавлении в опытный рацион кормового гидролизного сахара его количество увеличилось до 686 г, а сахаро-протеиновое отношение увеличилось до 1:1. При добавлении в рацион кормового сахара в желудке переварилось намного больше сахаров, чем на основном рационе (648 г против 109) , а переваримость сахаров была достоверно выше – 94,6% против 78,2 ($P < 0,01$). В кишечнике во 2-м периоде сахаров переваривалось также больше, чем в 1-м (16 г против 12). Соответственно на опытном рационе было достоверно больше сахаров, переварившихся во всем желудочно-кишечном тракте. При этом переваримость гидролизного сахара была выше переваримости сахаров натуральных кормов на 10,0% (96,6% против 86,6).

Результаты изучения биоэнергетического статуса крови у бычков по периодам опыта представлены в таблице 4.

Анализ результатов изучения биоэнергетического статуса крови у бычков, получавших основной и опытный рационы с добавкой кормового гидролизного сахара, показывает, что в оба периода уровень АТФ, АДФ и АМФ в крови животных был практически одинаковым как до кормления, так и после него. Это свидетельствует о том, что в организме бычков, получавших как основной, так и опытный рационы, процессы, связанные с генерацией и использованием энергии, протекали на несущественно различающихся уровнях.

Центральную роль в этих процессах выполняет АТФ — важнейшее макроэргическое соединение организма. В форме макроэргических связей АТФ происходит накопление энергии, высвобождающейся при катаболизме питательных веществ в клетках. Энергия макроэргических связей АТФ (а иногда, при остром дефиците энергии, и АДФ) используется в ходе эндергонических реакций синтеза белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и других процессов, требующих затрат энергии, например, активного транспорта метаболитов. АТФ часто рассматривается как энергетическая валюта. При этом нужно понимать, что АТФ — не вид энергии, а форма запасаения энергии, получаемой при деградации сложных молекул, поступающих в организм с кормом.

Энергетический заряд, отражающий энергетический запас в крови, у бычков на рационах 1-го и 2-го периодов также был относительно постоянным во все три срока взятия крови (0,86 – 0,87).

Уровень ЛЖК в крови бычков, получавших опытный рацион с гидролизным сахаром, превосходил таковой у животных, получавших основной рацион, в среднем на 0,74 ммоль/л. Это объясняется более интенсивным образованием их в пищеварительном тракте, вследствие

потребления с кормом большего количества легкоферментируемых углеводов.

Таблица 4. Биоэнергетические показатели крови у бычков

Показатели		Время взятия*	Рационы	
			основной (ОР)	опытный (ОР + гидролизный сахар)
Цельная кровь				
АТФ, мг%		0	33,30±2,95	30,00±2,10
		2	28,33±0,43	31,47±1,44
		4	29,90±1,15	27,43±1,80
		В среднем	30,51±1,18	29,63±1,07
АДФ, мг%		0	4,08±0,65	2,80±0,81
		2	2,80±0,35	2,68±0,76
		4	2,22±0,31	2,33±0,23
		В среднем	3,03±0,36	2,60±0,33
АМФ, мг%		0	3,47±0,50	3,45±0,42
		2	2,96±0,21	3,60±0,62
		4	3,46±0,31	3,10±0,38
		В среднем	3,30±0,20	3,40±0,25
Энергетический заряд		0	0,87±0,004	0,86±0,004
		2	0,87±0,0001	0,87±0,004
		4	0,87±0,0001	0,87±0,007
		В среднем	0,87±0,002	0,87±0,003
Молочная кислота, мг%		0	5,27±1,36	7,33±1,73
		2	7,53±0,98	10,20±1,08
		4	7,37±0,89	9,57±0,17
		В среднем	6,72±0,66	9,03±0,73
Сыворотка крови				
Активность фруктозобисфосфатальдозазы (ФБА), Е/л		0	7,20±1,20	8,40±2,08
		2	9,00±0,92	9,60±3,08
		4	7,20±1,51	6,60±1,04
		В среднем	7,80±0,68	8,20±1,20
Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), Е/л		0	634,7±45,3	574,3±54,3
		2	574,3±54,3	619,7±54,8
		4	574,3±30,4	604,3±109,0
		В среднем	594,4±24,4	599,4±39,1
Активность малатдегидрогеназы (МДГ), Е/л		0	820,0±85,2	1013,3±33,7
		2	1310,0±330,0	1408,3±428,4
		4	1276,7±248,2	1246,7±176,2
		В среднем	1135,5±145,2	1222,8±145,7

* Примечание: 0 – за час до кормления; 2 – через 2 ч после кормления; 4 – 4 ч после кормления

Концентрация лактата была выше у бычков, получавших опытный рацион с добавкой гидролизного сахара, по сравнению с бычками на основном рационе с низким сахаро-протеиновым отношением. При этом динамика уровня лактата в крови бычков имела

тенденцию к повышению после кормления. Особенно это было заметно спустя 2 часа после дачи корма (7,53 мг% в 1-м периоде и 10,20 – во 2-м). Если сравнить средний уровень лактата по всем трем срокам взятия крови у животных, получавших как основной, так и опытный рационы, то он оказался достоверно выше у животных, получавших опытный рацион ($P < 0,05$).

Анализ динамики активности ферментов в сыворотке крови бычков показал следующее. Была исследована активность двух гликолитических ферментов: фруктозобисфосфат-альдозазы (ФБА) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также активность цитоплазматической малатдегидрогеназы (МДГ). Как известно, ФБА участвует в расщеплении молекулы шестиуглеродного соединения D-фруктозо-1,6-бисфосфата на две трехуглеродных молекулы: D-дигидрооксиацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат – и тем самым катализирует 4-ю реакцию гликолиза в цитозоле клеток. ЛДГ катализирует превращение лактата в пируват с образованием восстановительного кофермента НАДН, участвуя в 11-й реакции анаэробного распада глюкозы. Цитоплазматическая МДГ катализирует превращение малата в оксалоацетат с образованием НАДН. При этом следует отметить, что все три фермента катализируют как прямые, так и обратные реакции.

Из материалов таблицы 4 видно, что динамика активности ФБА, ЛДГ и МДГ в сыворотке крови бычков как в 1-м, так и во 2-м периодах совпадала с динамикой уровня лактата в крови во все три срока ее взятия. Это свидетельствует о том, что активности ФБА, ЛДГ и МДГ взаимосвязаны с метаболизмом лактата. При достаточно большом количестве сахаров в рационе, особенно у бычков, получавших рацион с добавкой кормового гидролизного сахара, в организм поступает большое количество предшественников глюкозы, а образовавшаяся глюкоза подвергается анаэробному катаболизму, в итоге которого образуется много лактата. О большем объеме распада глюкозы свидетельствует повышенная активность ФБА и ЛДГ.

Что касается динамики активности цитоплазматической МДГ в сыворотке крови бычков, получавших основной и опытный рационы, то она полностью повторяла динамику концентрации лактата по всем трем срокам взятия крови. Этот факт объясняется следующим образом. Как известно, кроме лактата из глюкозы может синтезироваться оксалоацетат, который при участии цитоплазматической МДГ превращается в малат с образованием окисленной формы кофермента НАД⁺. В связи с этим динамика активности цитоплазматической МДГ полностью совпадала с таковой уровня лактата и активностью гликолитических ферментов ФБА и ЛДГ по всем трем срокам взятия крови у бычков на обоих рационах.

Заключение

При изучении влияния добавки кормового гидролизного сахара на эффективность переваривания и использования питательных веществ бычками-кастратами было установлено, что добавка гидролизного сахара к основному рациону создает благоприятные условия для протекания процессов пищеварения и повышает усвоение всех питательных веществ. Отмечено достоверное повышение переваримости сухого вещества, органического вещества, БЭВ и сахаров. Введение в опытный рацион кормового гидролизного сахара обеспечило по сравнению с контрольным рационом увеличение среднесуточных привесов на 94 г. Добавка гидролизного сахара оказала влияние на ряд биохимических показателей крови, свидетельствующих о повышении интенсивности гликолиза. Это проявилось в достоверном увеличении концентрации лактата и повышенной активности двух гликолитических ферментов (фруктозобисфосфат-альдозазы, лактатдегидрогеназы). Выше была также активность цитоплазматической малатдегидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мысник Н.Д., Муртазаев М.М. Рубцовое пищеварение и продуктивность бычков при использовании в рационе гидролизного сахара и углеводно-минеральной добавки. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1982, 3: 14-17.
2. Тесленко В.Т. Использование кормового гидролизного сахара из древесины в кормлении молочных коров. В сб.: Кормление и обмен веществ жвачных животных. М.: ТСХА, 1983.
3. Косова О.И., Устинова С.Г., Толстова Г.М. Улучшение переваримости молочными коровами лигнино-углеводного комплекса в рационах с гидролизным сахаром. В сб.: Нетрадиционные корма и добавки. Л., 1984: 39-42.
4. Радченко И.Г. Показатели углеводного обмена в крови крупного рогатого скота при включении в их рационы гидролизных сахаров. В сб.: Нетрадиционные корма и дооавки. Л., 1984: 39-42.
5. Кирилов М.П., Бузик Р.Б., Илюхина Л.А. Гидролизный сахар в рационе молочных коров. Бюллетень научных работ ВИЖа. Дубровицы, 1986, 84: 18-21.
6. Сорокин В.П. Всасывание аминокислот в пищеварительном тракте жвачных животных при введении в рацион гидролизного сахара из древесины. В сб. научных трудов ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 33: 82-91.

7. Таранов М.Т., Михайлов В. В. Методические рекомендации по определению биоэнергетических показателей в тканях животных с использованием специфических реагентов высокой чистоты. ВИЖ, Дубровицы, 1978: 1-39.
8. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. Перевод с англ. М.: Мир, 1974: 480-481.
9. Солун А.С. Влияние крахмала и сахаров кормовых средств в составе силосных рационов на продуктивность, переваримость и физиологическое состояние коров. Труды МВА, М., 1971, 57: 11-17.
10. Шманенков Н.А. Физиолого-биохимические основы рационального использования кормового протеина. В сб.: Проблемы белка в сельском хозяйстве. М.: Колос, 1975: 344-351.

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ ЭНЕРГИИ В РАЦИОНЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА СВИНЕЙ

Н.С.-А Ниязов, С.Н. Аитов

Лаборатория биологически активных веществ

Повышение уровня обменной энергии в комбикормах для растущих свиней в период выращивания до 13,5 МДж/кг и на откорме до 12,7 МДж/кг, по сравнению с комбикормами, содержащими 12,9 и 12,1 МДж/кг обменной энергии соответственно, способствует увеличению живой массы на 8,5%, снижению расхода корма на единицу продукции на 10%, сырого протеина на 5,4 и обменной энергии на 5,56%.

Введение

Нормы энергетического питания свиней, разработанные в нашей стране применительно к животным мясосального типа и при среднем уровне их продуктивности достаточно полно отражают потребности свиней в энергии. Однако при интенсивном выращивании молодняка свиней возникает необходимость регулирования уровня энергии в рационе в соответствии с продуктивными возможностями животных. Исследования, проведенные в стране и за рубежом (Махаев, 1972; Крохина и др., 1974; Leibbrandt, 1975; Аитов и др., 1984), показывают, что уровень концентрации обменной энергии в рационах по-разному влияет на продуктивность свиней в зависимости от их породы, генетического потенциала и технологии кормления и содержания.

Целью наших исследований было изучить влияние разных уровней энергии в рационе на интенсивность роста, конверсию корма

на единицу продукции и некоторые показатели обмена веществ в организме растущих свиней.

Материал и методы

Опыт проводили на помесных поросятах (крупная белая×ландрас) 63-65-дневного возраста. По принципу аналогов было сформировано 3 группы, по 12 голов в каждой со средней живой массой 20-21 кг. Опыт охватывал два периода: выращивание до достижения живой массы 40 кг и откорм -100-110 кг.

Животные подопытных групп получали полнорационные комбикорма типа СК с содержанием обменной энергии в период выращивания 12,9 МДж/кг и 12,1 МДж/кг в период откорма. В отличие от 1-й (контрольной группы), свиньи 2-й (опытной) получали корма с повышенным на 5% содержанием обменной энергии по отношению к полнорационному комбикорму СК, а 3-й (опытной) на – 10%. Уровень энергии в комбикормах увеличивали за счет изменения соотношения компонентов корма и введением кормового жира животного происхождения (табл. 1).

Таблица 1. Состав и питательность комбикормов, %

Компоненты	Выращивание			Откорм		
	группы			группы		
	1 контр.	2 опыт	3 опыт	1 контр.	2 опыт	3 опыт
Кукуруза	12,0	24,2	35,0	10,0	15,0	20,0
Пшеница	10,5	11,1	11,0	10,0	10,0	10,0
Ячмень	38,2	23,2	10,2	50,0	43,3	36,5
Шрот соевый	15,0	15,0	15,5	8,0	8,2	8,5
Шрот подсолнечниковый	4,0	5,0	5,5	5,0	5,0	5,0
Мука рыбная	5,0	5,1	5,5	2,0	2,0	2,0
Молоко	7,0	7,0	7,0	–	–	–
регенерированное						
Отруби пшеничные	3,0	3,0	2,8	12,0	12,0	12,0
Жир кормовой	2,5	3,6	4,7	–	1,5	3,0
Трикальцийфосфат	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Мел кормовой	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
Соль кормовая	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
Премикс КС – 3	0,5	0,5	0,5	–	–	–
Премикс КС – 4	–	–	–	1,0	1,0	1,0
В одном кг комбикорма содержится:						
Кормовые единицы	1,17	1,22	1,28	1,11	1,17	1,22
Сухое вещество, г	914	914	915	900	903	905
Обменная энергия, МДж	12,9	13,5	14,2	12,1	12,7	13,3
Сырой протеин, г	179,4	178,3	179,2	152,7	150,9	154,6
Сырая клетчатка, г	34,3	32,3	29,5	47,0	45,7	44,8
Сырой жир, г	43,4	54,5	64,9	32,4	41,1	58,3

Кальций, г	12,1	12,3	12,0	8,0	8,0	7,99
Фосфор, г	7,3	7,1	7,2	7,1	7,1	7,26
Лизин, г	9,3	9,1	9,0	6,51	6,41	6,39
Метионин+цистин, г	6,5	6,4	6,3	5,1	5,06	5,03
Сахар, г	24,1	27,5	31,0	20,0	21,5	23,0

При этом уровни сырого протеина, кальция, фосфора, лизина и метионина+цистина в комбикормах для подопытных свиней были практически одинаковыми. Содержание поросят было групповым в клетках по 3 – 4 головы в каждой. Корма раздавали дважды, а учет остатков один раз в сутки. Поение – вволю из автопоилок. Животные всех групп получали в сутки одинаковое количество комбикорма в сухом виде, согласно программы кормления растущих поросят, разработанной в институте. Взвешивали поросят в начале опыта и по достижении животными 107 и 204-дневного возраста. Убой поросят проводили в конце каждого периода опыта по 4 головы из каждой группы с последующей обвалкой полутуш и взятием образцов ткани и органов для физиолого-биохимического анализа.

Зоотехнический анализ кормов проводили по общепринятым методикам (Петухова и др., 1989). Концентрацию общих липидов в плазме крови, мышцах и печени определяли по Фолчу (1957), холестерина в плазме крови и мышцах – по Ильку (1962), неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в плазме крови – по Дункомбе (1963); активность ферментов липидного обмена: гормончувствительной липазы (ГЧЛ) – по Вэйгену (1964), липопроотеидлипазы (ЛРЛ) – по Боррону (1979) и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6ФДГ) по Клоку (1953).

Результаты и обсуждение

Анализ данных опыта показал (табл. 2), что использование в кормлении растущих свиней разных уровней обменной энергии в рационе не адекватно влияло на приросты живой массы тела и затраты корма на единицу прироста в периоды выращивания и откорма.

В период выращивания повышение уровня энергии у животных опытных групп на 5 и 10% способствовало увеличению живой массы на 7,5 и 2,8%, а среднесуточный прирост составил 512 и 489 г, соответственно. Затраты корма на 1 кг прироста были на 7,1 и 2,8% ниже по сравнению с контролем. Эта тенденция сохранялась и по расходу кормовых единиц и сырого протеина. Однако при увеличении уровня энергии на 10% снижалась эффективность использования поросятами обменной энергии корма.

В период откорма общий прирост живой массы составил в 1-й (контрольной) группе 61,1 кг, во 2-й 68,8 кг (больше на 12,5%) и в 3-й – 57,7 кг (меньше на 5,7%), чем у животных контрольной группы.

За время откорма расход на 1 кг прироста составил у поросят 1-й (контрольной) группы – 4,94; 2-й группы – 4,63 и 3-й – 5,76 кормовых единиц. Такая же тенденция отмечена и по показателям расхода сырого протеина и обменной энергии на прирост 1 кг живой массы. Показатели интенсивности роста свиней в заключительный период эксперимента свидетельствуют о том, что при одинаковом потреблении кормов поросята 3-й группы, несмотря на увеличение содержания энергии в их рационе на 10%, уступали контрольным животным по величине среднесуточного прироста и затратам питательных веществ, тогда как свиньи 2-й группы, получавшие комбикорма с повышенным на 5% содержанием энергии, превосходили последних по этим показателям.

Таблица 2. Динамика прироста живой массы и затраты корма у подопытных свиней

Показатели	Группы		
	1 (контроль)	2 (опыт) +5% ОЭ	3 (опыт) +10% ОЭ
Период выращивания			
Живая масса, кг: в начале опыта	20,99±0,72	20,56±0,93	20,62±1,04
в конце опыта	40,38±1,47	42,06±2,38	41,18±1,32
Прирост живой массы, кг	19,99	21,50	20,56
Среднесуточный прирост, г	476±25,9	512±46,0	489±30,0
Затрачено корма на 1 кг прироста, кг	2,598	2,416	2,526
кормовых единиц	3,04	2,95	3,23
сырого протеина, г	466	431	452
обменной энергии, МДж	33,51	32,61	35,87
Период откорма			
Живая масса, кг: в начале опыта	41,02±1,87	41,9±3,41	41,1±2,35
в конце опыта	102,14±4,33	110,66±5,39	98,75±5,34
Прирост живой массы, кг	61,12	68,76	57,65
Среднесуточный прирост, г	630±38	708±27	594±30
Затрачено корма на 1 кг прироста, кг	4,45	3,95	4,72
кормовых единиц	4,94	4,63	5,76
сырого протеина, г	679,8	597,0	729,6
обменной энергии, МДж	53,86	50,24	62,77
За весь период опыта			
Живая масса, кг: в начале опыта	20,99±0,72	20,56±0,93	20,62±1,04
в конце опыта	102,14±4,33	110,66±5,39	98,75±5,34
Прирост живой массы, кг	81,15	90,10	78,13
Среднесуточный прирост, г	584	648	562
Затрачено корма на 1 кг прироста, кг	3,99	3,59	4,14
кормовых единиц	4,47	4,23	5,10
сырого протеина, г	626,8	558,0	657,5
обменной энергии, МДж	48,82	46,12	55,7

На фоне повышенной обеспеченности энергией у поросят 2-й и 3-й групп, по сравнению с контрольной (табл. 3), выявлены более

высокие показатели активности липопротеидлипазы (ЛПЛ) и НАДФ•Н-генерирующего ферментов, в частности Г-6-ФДГ-азы, что свидетельствует о большей интенсивности процессов липогенеза, особенно у молодняка 3-й группы, на рационах с повышенным уровнем обменной энергии. Следствием этого явилось большее содержание липидов в мышечной ткани поросят 3-й группы – 1,66 г % (у молодняка 1-й группы – 1,40 г %), а также концентрации холестерина – 98,23 – 110,33 мг % против 90,73 у поросят 1-й группы. Следует также отметить, что активность гормончувствительной липазы (ГЧЛ) в жировой ткани поросят 2-й группы была практически на одном уровне с животными первой группы – 84,16 и 82,49 мЕ/г, однако активность ГЧЛ была существенно увеличена у поросят 3-й группы и составляла – 93,18 мЕ/г.

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ПОТРЕБЛЕНИИ КОМБИКОРМОВ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЭНЕРГИИ

ПОКАЗАТЕЛИ	1 ГРУПП А	2 ГРУПП А	3 ГРУППА
КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБЩИХ ЛИПИДОВ			
В ПЛАЗМЕ КРОВИ, МГ %	181,68±9,68	195,65±10,39	250,47±17,7
			3
В ДЛИННЕЙШЕЙ МЫШЦЕ СПИНЫ, Г %	1,40±0,24	1,47±0,12	1,66±0,085
В ПЕЧЕНИ, Г %	1,65±0,26	2,03±0,17	2,25±0,09
КОНЦЕНТРАЦИЯ НЭЖК			
В ПЛАЗМЕ КРОВИ, МКГ/ЭКВ/Л	211,87±10,93	271,50±29,14	265,87±34,2
			4

КОНЦЕНТРАЦИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

В ПЛАЗМЕ КРОВИ, МГ %	10,73±6,10	98,32±2,84	110,33±2,04
В ДЛИННЕЙШЕЙ МЫШЦЕ СПИНЫ, Г %	75,96±2,42	74,40±3,23	86,36±3,83
АКТИВНОСТЬ ЛПЛ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ, МЕ/Г	116,11±13,11	257,78±15,06	266,95±16,47
АКТИВНОСТЬ ГЧЛ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ, МЕ/Г	32,49±6,85	84,16±8,23	93,18±8,33
АКТИВНОСТЬ Г-6-ФДГ, МЕ/Г	371,45±48,04	394,30±31,33	395,60±43,20

Повышенный уровень НЭЖК в крови у поросят 2-й и 3-й групп (271,5 и 265,87 мкг/экв/л против 211,87 у поросят контрольной группы) явился результатом не только более интенсивного использования их в качестве субстратов в процессе депонирования жира, но и в энергетических процессах. Липидный обмен у поросят контрольной группы, получавших комбикорм с меньшим уровнем обменной энергии, характеризовался меньшей концентрацией НЭЖК в крови. Активность Г-6-ФДГ-азы в жировой ткани этих поросят была несколько ниже, чем у животных 2-й и 3-й групп. Следовательно можно предположить, что пониженная активность Г-6-ФДГ у поросят контрольной группы была обусловлена дефицитом энергии.

При сравнительном анализе результатов биохимических исследований выявились особенности липидного обмена у поросят на рационах с повышенным уровнем энергии, характеризующиеся более высоким фоном НЭЖК в крови, и очевидно большей интенсивностью липогенеза, так как у поросят при этом фиксировалась значительно большая активность ЛПД и концентрация общих липидов и холестерина в тканях.

У свиней контрольной группы, получавших комбикорм с содержанием обменной энергии 12,9МДж/кг корма, липидный обмен

характеризовался пониженным фоном НЭЖК в крови, значительно меньшей активностью ЛПЛ и ГЧЛ в жировой ткани и концентрацией липидов и холестерина в тканях, что свидетельствует о пониженной активности липогенеза у поросят в этих условиях питания.

Результаты нашего опыта согласуются с результатами других исследователей. По сообщениям (Аитова и др., 1989; Качура, 1989) увеличение в изопротеиновых комбикормах для поросят содержания

ОЭ за счет добавок кормового жира на 7,5–7,7% в возрасте 43–60 дней способствовало увеличению приростов живой массы, переваримости и усвоению протеина и энергии рационов, снижению затрат кормов. В экспериментах Гавлинского и др. (1980), Leibbrandt et al. (1975) добавки жира в корма повышали прирост и использование кормов у растущих свиней, однако увеличение жира в них до 10% вызывало депрессию роста поросят.

Для определения влияния уровня энергетического питания на качество мясо-сальной продукции был проведен контрольный убой свиней по 3 головы из каждой группы животных (табл. 4).

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КОНТРОЛЬНОГО УБОЯ СВИНЕЙ

ПОКАЗАТЕЛИ		1 группа	2 группа	3 группа
ЖИВАЯ	МАССА,	103,5±4,4	112,5±9,7	100,0±10,44
КГ				
ВЕС	ТУШИ, КГ	65,02±4,39	75,22±8,51	62,12±6,75
УБОЙНЫЙ		62,82±1,38	66,86±1,94	62,12±0,34
ВЫХОД, %				
ВЕС	ПОЛУТУШИ,	31,71±2,11	36,62±4,02	29,08±3,41
КГ				
В ПОЛУТУШЕ СОДЕРЖИТСЯ, КГ				
МЯСА		19,87±1,28	22,50±2,91	16,26±2,2

САЛА	7,76±0,94	9,57±1,87	8,87±1,11
КОСТЕЙ	4,08±0,12	4,55±0,70	3,95±0,24
СООТНОШЕНИЕ В ПОЛУТУШЕ, %			
МЯСА	62,68±1,70*	61,44±3,88	55,92±1,0
9			
САЛО	24,47±1,94	26,14±2,67	30,50±0,82*
КОСТЕЙ	12,85±0,48	12,42±0,65	13,58±0,71

* – P < 0,05

Анализ таблицы 4 показывает, что повышение уровня обменной энергии в комбикорме до 12,7 МДж/кг способствовало некоторому увеличению убойного выхода у свиней. Установлено, что при завышенных уровнях кормления свиньи больше осаливаются, от них получают туши с большим содержанием сала. Процентное соотношение основных частей туши показало, что в тушах поросят 2-й группы сала было больше на 1,67%, а в 3-й группе – на 6,03% (P<0,05). Аналогичные данные получены и по содержанию внутреннего жира. Так, если выход его у контрольных животных в среднем составил 1,31±0,17 кг, то у поросят 2-й группы – 1,47±0,4 кг и 3-й группы – 2,23±0,31 кг (P<0,05). Аналогичные результаты были получены и другими исследователями (Гамко, 1986; Махаев, 1972).

Таким образом, полученные данные дают основание утверждать, что увеличение обменной энергии в рационе в период выращивания до 13,5 МДж/кг и на откорме до 12,7 МДж/кг по сравнению с уровнем обменной энергии 12,9 МДж/кг в период выращивания и 12,1 МДж/кг в период откорма способствует повышению живой массы, среднесуточных приростов и снижению расхода корма на единицу прироста. Повышение уровня обменной энергии до 14,2 МДж/кг в период выращивания и на откорме до 13,3 МДж/кг является не эффективным и приводит к осаливанию туш.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Материалы, полученные в эксперименте, показывают, что различные уровни обменной энергии в рационе оказывают неоднозначное действие на энергетическую обеспеченность и рост

свиней в разные периоды их выращивания. По комплексу показателей: уровню обменной энергии, состоянию липидного обмена, эффективности использования питательных веществ корма, убойным качествам туш и росту свиней – наилучшие условия энергетического питания были у поросят 2-й опытной группы. Использование комбикорма с содержанием обменной энергии 13,5 МДж/кг в период выращивания и 12,7 МДж/кг в период откорма, по сравнению с комбикормами, содержащими обменной энергии 12,9 и 12,1 МДж/кг соответственно, способствовало увеличению живой массы на 8,5% и среднесуточных приростов на 10,9%, при снижении затрат корма на 1 кг прироста на 10%, сырого протеина на 5,4% и обменной энергии на 5,6%.

Повышение уровня обменной энергии до 14,2 МДж/кг в период выращивания и до 13,3 МДж/кг в период откорма отрицательно сказывалось на приросте живой массы и затратах питательных веществ корма. К тому же у животных повышался выход сала и внутреннего жира.

При кормлении свиней комбикормом, содержащим 13,5 МДж/кг обменной энергии в период выращивания, липидный обмен у них характеризовался высоким фоном НЭЖК в крови, повышенной активностью ЛПЛ-азы и повышенным содержанием липидов и холестерина в тканях.

Литература

1. Аитов С.Н., Шайхаев Г.О., Газдаров В.М. Использование питательных веществ и продуктивность поросят раннего отъема при разном уровне энергии в рационе. Бюлл. ВНИИИФБиП. Боровск, 1984, 2 (74): 27–30.
2. Аитов С.Н., Газдаров В.М. Эффективность выращивания поросят раннего отъема на комбикормах с различным уровнем энергии. Бюлл. ВНИИИФБиП. Боровск, 1989, 4 (96): 39–43.
3. Гавлинский С.И. Некоторые особенности обмена веществ и продуктивность откармливаемых свиней при дополнении кормосмесей животным жиром. В сб.: Физиолого-биохимические основы высокой продуктивности с.-х. животных. Боровск, 1980: 66–67.
4. Гамко Л.Н. Энергетический обмен у свиней на откорме в зависимости от уровня кормления. Бюлл. ВНИИИФБиП. Боровск, 1986, 2 (81): 34–36.

5. Качура С.А. Влияние каротина и уровня энергии в рационе на продуктивность поросят раннего отъема. Бюлл. ВНИИИФБиП. Боровск, 1989, 4 (96): 39–43.
6. Крохина В.А., Кирилов М.П., Антонова А.А. Обмен веществ и продуктивность свиней под влиянием добавки в комбикорма кормового животного жира. В кн.: Минеральный обмен у с.-х. животных. Боровск, 1974: 261–274.
7. Махаев Е.А. Продуктивность и использование энергии корма. Свиноводство. М.: Колос, 1972: 2, 36 с.
8. Петухова Е.А. Бессарабова Р.Ф. Халенова Л.Д. Зоотехнический анализ кормов. М.: Агропромиздат, 1989: 239 с.
9. Borron D.C. et al. Comparison of lipoprotein lipase activity in chickens and turkeys. Brit. Poultry Sci., 1979, 58: 659 – 662
10. Clock J.E., J. Biol. Chem., 1953, 55: 400 – 408
11. Duncombe N.I. The colorimetric microdetermination of long fatty acids. J. Biol. Chem., 1963, 88, 1: 7 – 10
12. Foloh L.M. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 226: 497 – 509
13. Leibrandt V.D. et al. Effect of fat on performance of baly growing pigs. J. Anim. Sci., 1975, 40, 6: 1081–1085
14. Ilca L, Ges. inn med. 1962, 17: 83
15. Vayghan M.I. et al. Hormone sensitive lipase and monoglyceride lipase actives in adipose tissues. J. Biol. Chem., 1964, 239, 2: 401 – 409

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛНОРАЦИОННЫХ КОМБИКОРМОВ С РАЗЛИЧНЫМИ УРОВНЯМИ ПРОТЕИНА И АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ РАСТУЩИХ СВИНЕЙ

Н.С.-А. Ниязов, Д.Е. Панюшкин, А.В.Лысов

Лаборатории биологически активных веществ и межклеточного обмена

Использование комбикормов с содержанием сырого протеина 19,4%; 15,8%; 15,2%, лизина – 0,92%; 0,80%; 0,65% и метионина+цистина – 0,64%; 0,52%; 0,49%, соответственно в период выращивания и в первый и второй периоды откорма, способствует лучшему (на 15,0% и 7,0%, в первый и второй периоды откорма) росту свиней, повышению эффективности использования корма на единицу продукции (на 4,2% и 6,9%) и переваримости питательных веществ корма. Использование опытных комбикормов оказало положительное влияние на качество жировых отложений у свиней.

Введение

Аминокислоты корма являются основными структурными источниками для биосинтеза белков в организме животного. При недостатке в рационе даже одной незаменимой аминокислоты ухудшается использование всех питательных веществ корма. Следовательно, очень важно добиться оптимального баланса незаменимых аминокислот в рационе для увеличения интенсивности роста животных. Однако в существующих нормах слабо отражены возрастные особенности кормления растущего молодняка свиней, в связи с чем возникает необходимость более детального нормирования их аминокислотного питания в процессе увеличения живой массы. При этом важное значение в кормлении растущих свиней также имеет сочетание питательных веществ в кормосмесях, которое определяет не только динамику роста животных, но и улучшает качество мяса и жировых отложений (Крохина, 1973; Проваторов и др., 1982; Thaler et.al., 1986).

Разработка полнорационных кормосмесей с оптимальным содержанием протеина, энергии, незаменимых аминокислот и биологически активных веществ, позволяющих получать высокие среднесуточные приросты за счет повышения биоконверсии корма, является актуальной проблемой в свиноводстве.

Задачей настоящей работы являлось изучение влияния разного уровня протеина и незаменимых аминокислот в рационе на интенсивность роста, развитие, использование питательных веществ корма и параметры липидного обмена у помесных свиней.

Материалы и методы

Научно-хозяйственный опыт проведен на помесных поросятах 35-дневного возраста в условиях ЗАО «Кузнецовский комбинат» Московской области. По принципу аналогов с учетом живой массы были сформированы две группы животных по 530 голов в каждой. Опыт был поделен на три периода: выращивание (35-108 дней), первый (109-165 дней) и второй (166-239 дней) периоды откорма. Каждому периоду соответствовали разные по составу и питательности комбикорма (табл. 1, 2).

Животные контрольной группы получали типовые комбикорма, изготовленные на Раменском комбикормовом заводе Московской области, а опытной – на Ардымском комбикормовом заводе Пензенской области. Опытные комбикорма содержали повышенное количество сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина и метионина+цистина) (табл. 2). Витаминный и минеральный состав комбикормов соответствовал нормам потребности животных.

Таблица 1. Программа кормления свиней на откорме

Возраст, дней	Количество кормов на голову, кг/дн.	Возраст, дней	Количество кормов на голову, кг/дн.
109-116	1,57	145-151	2,23
117-123	1,64	152-158	2,40
124-130	1,79	159-165	2,53
131-137	1,94	166-172	2,76
138-144	2,08	173-239	2,76

Содержание подопытных животных было групповое с соблюдением зоотехнических и ветеринарных требований, предъявляемых в комплексе. Кормление свиней в период выращивания не лимитировалось, а в период откорма производилось в виде жидких мешанок (1:3), согласно программы кормления.

Таблица 2. Состав и питательность комбикормов

Компоненты	Выращивание		I период откорма		II период откорма	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Пшеница	30,0	41,1	24,5	39,4	15,0	22,9
Ячмень лущеный	-	23,105	-	-	-	-
Ячмень	39,0	-	34,3	35,936	38,8	46,442
Овес	-	-	10,0	-	10,0	-
Отруби пшеничные	10,0	7,0	12,0	4,12	17,0	14,9
Мука травяная	-	-	-	2,0	-	-
Мука рыбная	2,0	2,75	1,5	-	1,7	-
ЗЦМ	-	1,0	-	-	-	-
Шрот подсолнечниковый	8,0	7,0	12,0	5,9	15,0	10,0
Шрот соевый	8,0	13,1	3,0	9,4	-	-
Дрожи кормовые	-	-	-	-	-	2,5
Известняк	0,5	1,0	0,5	1,0	-	1,4
Монокальций фосфат	1,7	0,59	0,8	0,8	1,0	0,4
Жир кормовой	-	1,9	-	-	-	-
Соль	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4
Лизин	-	0,155	-	0,044	-	0,058
Премикс	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В 1 кг комбикорма содержится						
Кормовых единиц	1,19	1,22	1,12	1,14	1,02	1,04
ОЭ, МДж	13,01	13,49	12,51	12,89	12,43	12,56
Сухого вещества, г	885,3	896,1	897,0	905,0	903,0	911,6
Сырого протеина, г	181,3	194,6	153,8	157,9	149,3	152,0
Перевар. протеина, г	136,1	145,9	115,3	117,7	107,2	109,4
Лизина, г	8,0	9,25	6,4	8,0	5,8	6,5
Метионина+цистина, г	5,4	6,4	4,2	5,2	4,0	4,9
Сырой клетчатки, г	40,2	39,6	49,8	48,3	52,3	51,7

Сырого жира, г	24,0	43,7	28,8	29,6	21,3	22,8
Кальция, г	8,7	9,2	7,0	7,2	6,8	7,0
Фосфора, г	6,4	6,9	6,0	6,0	5,7	5,8

Для определения динамики роста молодняк свиней взвешивали в начале и конце каждого возрастного периода. В 109-114 - дневном возрасте на 4-х боровках из каждой группы проводили балансовый опыт в целях изучения переваримости питательных веществ и усвоения азота. В конце опыта убивали по 3 головы свиней из каждой группы, с последующей обвалкой туш и взятием образцов органов и тканей для биохимических анализов.

В ходе опыта проводили анализ кормов, кала и мочи на содержание сухого вещества, азота, жира, клетчатки, валовой энергии и золы по методикам зоотехнического анализа (Лебедев, Усович, 1969).

В плазме крови, мышцах, образцах печени и свиного жира анализировали показатели липидного обмена путем экстракции общих липидов из всех субстратов по общеизвестной методике Folch (1957). Высокомолекулярные жирные кислоты (ВМЖК) определяли методом газожидкостной хроматографии на приборе CHROM-5 (Laboratorní Pístroje Praha).

Результаты и обсуждение

Показатели эффективности роста поросят, при содержании их на рационах с разными уровнями протеина и незаменимых аминокислот, свидетельствуют о том, что изменение количественного и качественного аминокислотного состава комбикормов оказало положительное влияние на рост, развитие и конверсию корма у животных. Так, скармливание комбикорма животным опытной группы (таблица 3) в период выращивания способствовало увеличению среднесуточных приростов у молодняка свиней на 15,0% ($P < 0,05$). При этом средняя масса тела животных в контрольной группе составляла 34,56 кг, а в опытной 38,53 кг, при снижении на 4,0% расхода корма на 1 кг прироста живой массы. Следует отметить, что свиньи опытной группы съедали на 8 кг больше комбикорма. По-видимому, по вкусовым качествам и питательной ценности этот комбикорм более соответствовал потребностям животных.

Скармливание свиньям опытного комбикорма в I период откорма также оказало положительное влияние на увеличение прироста массы тела (на 9,4%), на снижение затрат корма на 1 кг прироста (на 8,3%), сырого протеина (на 5,9%) и обменной энергии (на 5,5%). Такая же тенденция получена и во II период откорма. За весь период откорма

среднесуточный прирост у животных опытной группы был выше на 7,0%, при этом снизились затраты корма на единицу продукции (на 6,4%), кормовых единиц (на 4,7%), сырого протеина (на 4,5%) и обменной энергии (на 5,0%). Из вышеизложенного следует, что использование в кормлении растущих свиней полнорационных комбикормов с содержанием сырого протеина – 19,4%; 15,8%; 15,2%, лизина – 0,92%; 0,80%; 0,65%, и метионина+цистина – 0,64%; 0,52%; 0,49%, соответственно в период выращивания, первый и второй периоды откорма, способствует лучшему росту животных и более эффективному использованию питательных веществ корма.

Таблица 3. Живая масса, среднесуточный прирост и затраты корма у свиней в опыте и контроле

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
Период выращивания		
Живая масса в начале, кг	9,55±0,12	9,73±0,14
Живая масса в конце, кг	34,56±0,35	38,53±0,42*
Среднесуточный прирост, г	338±23	389±26*
Потреблено корма на 1 голову, кг	79,92	88,06
Затрачено на 1 кг прироста:		
корма, кг	3,19	3,06
кормовых единиц	3,80	3,75
сырого протеина, г	579,3	595,0
обменной энергии, МДж	41,6	41,2
I период откорма		
Живая масса в начале, кг	34,56±0,35	38,53±0,42
Живая масса в конце, кг	60,8±1,05	67,2±1,08*
Среднесуточный прирост, г	468±31	512±37*
Потреблено корма на 1 голову, кг	113,3	113,3
Затрачено на 1 кг прироста:		
корма, кг	4,31	3,95
кормовых единиц	4,83	4,50
сырого протеина, г	662,8	623,7
обменной энергии, МДж	53,9	50,9
II период откорма		
Живая масса в начале, кг	60,±1,05	67,2±1,08
Живая масса в конце, кг	110,3±2,25	119,6±1,45*
Среднесуточный прирост, г	669±5	708±58*
Потреблено корма на 1 голову, кг	204,2	204,2
Затрачено на 1 кг прироста:		
корма, кг	4,12	3,89
кормовых единиц	4,21	4,05
сырого протеина, г	615,9	592,3
обменной энергии, МДж	51,3	48,9
За весь период откорма		
Живая масса в начале, кг	34,56±0,35	38,53±0,42
Живая масса в конце, кг	110,3±1,25	119,6±1,45*
Среднесуточный прирост, г	582±43	623±48*
Потреблено корма на 1 голову, кг	317,5	317,5

Затрачено на 1 кг прироста:		
корма, кг	4,19	3,92
кормовых единиц	4,42	4,21
сырого протеина, г	632,6	603,5
обменной энергии, МДж	52,2	49,6
Здесь и далее $P < 0,05$		

Использование различных по питательности комбикормов заметно повлияло на их переваримость. Исходя из представленных в таблице 4 данных, следует отметить довольно высокую переваримость питательных веществ животными всех подопытных групп. Однако, животные опытной группы лучше переваривали органическое вещество на 4,1%, сырой протеин на 1,92%, сырой жир на 8,26% и сырую клетчатку на 10%. Баланс азота у подопытных свиней был положительным. Животные опытной группы лучше использовали азот корма как в расчете от принятого (на 3,8%), так и в расчете от переваренного (на 3,66%), по сравнению с животными контрольной группы.

Таблица 4. Коэффициенты переваримости питательных веществ и баланс азота у свиней

Показатели	Группы	
	контрольная	опытная
Сухое вещество, %	81,3±1,04	85,0±3,41
Органическое вещество, %	82,7±1,10	86,8±3,50
Протеин, %	76,62±0,85	78,54±0,95
Жир, %	72,37±1,13	80,63±4,15
Клетчатка, %	28,03±2,95	38,18±4,67
БЭВ, %	88,41±1,96	90,10±2,30
Принято азота с кормом, г	43,84±0,32	50,37±0,00
Выделено азота: с калом, г	10,25±0,42	12,07±0,88
с мочой, г	17,37±1,24	19,01±1,73
Переварено азота, г	33,59±0,81	39,56±1,41
Усвоено азота, г	16,22±1,43	20,55±1,26
% от принятого	37,00±1,01	40,8±1,12
% от переваренного	48,29±1,21	51,95±1,27

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии сбалансированных по сырому протеину и незаменимым аминокислотам комбикормов на процессы переваривания и использования питательных веществ корма, что подтверждают показатели интенсивности роста и оплаты корма.

Изучение состава туш свидетельствует о тенденции к более высокому содержанию мышечной (на 3,4%) и пониженному количеству жировой ткани (на 4,2%) у свиней

опытной группы, по сравнению с контрольной. Причем это преимущество проявлялось как в абсолютных, так и в относительных показателях состава туш.

При изучении химического состава длиннейшей мышцы спины установлено, что у животных контрольной группы была повышенной влажность мышц (74,6% против 73,59%) и низкое содержание общих липидов (2,13% против 2,43%) по сравнению с опытной группой.

В результате контрольного убоя животных было выявлено повышение концентрации общих липидов в длиннейшей мышце спины на 12,3% (табл. 5), но тем не менее этот показатель липидного обмена находился в физиологических пределах и свидетельствовал об улучшении качества мяса.

Таблица 5. Содержание общих липидов в органах свиней

Группы	Липиды, г%			
	плазма крови	мышцы	печень	свиной жир
Контроль	0,270±0,005	2,128±0,038	5,885±0,373	90,394±1,282
Опыт	0,209±0,023*	2,428±0,145	5,187±0,085	96,459±0,886*

Следует отметить, что в ходе эксперимента обнаружено недостоверное снижение концентрации липидных компонентов в печени свиней (на 13,4%). Несмотря на то, что это изменение может являться случайным, косвенно можно сделать заключение о повышении интенсивности обмена веществ и снижении жировой инфильтрации печеночной ткани в опытной группе животных, по сравнению с контролем. Также наблюдалось повышение концентрации липидных метаболитов в свином жире (на 6,3%). Этот факт имеет особое значение в связи с некоторым снижением выхода сала и достоверным повышением выхода мяса в опытной группе животных. Увеличение концентрации липидов в сале обычно способствует повышению его вкусовых качеств, прежде всего за счет снижения содержания соединительной ткани.

При анализе жирнокислотного состава липидов плазмы крови (табл. 6) выявлено снижение уровня короткоцепочных и длинноцепочных жирных кислот, таких как пальмитиновая (на 24,8%), стеариновая и олеиновая кислоты на 22,12% и 24,71%, соответственно. Отмечалось снижение концентрации и незаменимых жирных кислот, однако у моногастричных незаменимые жирные кислоты не являются таким жестким лимитирующим фактором, как у жвачных животных, и поэтому их колебания в пределах физиологической нормы не нарушают обмена веществ, и в том числе липидов.

В тоже время следует отметить увеличение содержания незаменимых жирных кислот в составе липидов мышц. Так концентрация линолевой кислоты увеличилась на 18,9%, линоленовой кислоты на 19,1% и арахидоновой на 16,7% соответственно. Наблюдалось увеличение концентрации и остальных жирных кислот.

Жирнокислотный состав печени также претерпел изменения в сторону снижения содержания жирных кислот, что можно объяснить уменьшением жировой инфильтрации ткани печени и большей интенсивностью обмена веществ.

Таблица 6. Основные жирные кислоты общих липидов органов и тканей свиней

Группы	Жирные кислоты										
	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:4}
Плазма крови свиней, мг%											
Контроль	1,58	2,16	4,05	9,37	34,30	1,02	36,74	61,03	24,12	6,35	2,94
	±0,04	±0,10	±0,19	±0,36	±1,28	±0,03	±0,71	±2,21	±0,52	±0,12	±0,06
Опыт	1,24	1,60	3,01	7,51	25,80	0,80	28,61	45,95	18,92	4,94	2,28
	±0,13	±0,18	±0,33	±0,83	±2,85	±0,09	±3,16	±5,09	±2,09	±0,55	±0,25
Мышцы свиней, г%											
Контроль	0,006	0,009	0,029	0,063	0,266	0,008	0,420	0,480	0,253	0,068	0,018
	±0,0003	±0,0003	±0,0006	±0,0012	±0,0164	±0,0003	±0,0353	±0,0084	±0,0047	±0,0012	±0,0003
Опыт	0,007	0,010	0,035	0,076	0,300	0,009	0,463	0,570	0,301	0,081	0,021
	±0,0001	±0,0003	±0,0012	±0,0022	±0,0085	±0,0003	±0,0131	±0,0164	±0,0085	±0,0025	±0,0006
Печень свиней, г%											
Контроль	0,02	0,03	0,06	0,09	0,88	0,04	0,74	1,52	0,84	0,23	0,05
	±0,001	±0,001	±0,001	±0,001	±0,06	±0,001	±0,05	±0,10	±0,05	±0,02	±0,001
Опыт	0,02	0,03	0,05	0,08	0,77	0,03	0,65	1,34	0,74	0,21	0,05
	±0,001	±0,001	±0,001	±0,001	±0,01	±0,001	±0,01	±0,02	±0,01	±0,00	±0,001
Свиной жир, г%											
Контроль	0,21	0,74	1,16	2,65	19,43	0,17	12,77	37,83	5,92	1,51	0,54
	±0,001	±0,01	±0,02	±0,04	±0,28	±0,001	±0,18	±0,54	±0,08	±0,02	±0,01
Опыт	0,22	0,79	1,24	2,83	20,73	0,18	13,63	40,37	6,32	1,61	0,58
	±0,001	±0,01	±0,01	±0,03	±0,19	±0,001	±0,13	±0,37	±0,06	±0,02	±0,001

Содержание жирных кислот в свином жире у животных опытной группы превосходило показатели контрольной группы. Причем данная тенденция сохранялась для всех жирных кислот и имела приблизительно одинаковые величины. Если для короткоцепочных и среднецепочных жирных кислот прирост составил в среднем 6,12%, то для длинноцепочных, таких как пальмитиновая, стеариновая, пальмитолеиновая и олеиновая, он был равен 6,71%. Уровень незаменимых жирных кислот в свином жире возрос на 6,78%.

Таким образом, скормливание комбикормов, отличающихся повышенным содержанием сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина и метионина+цистина), оказало положительное влияние на концентрацию жиров в органах свиней опытной группы. Отмечено увеличение содержания этих веществ в жировой ткани, а также в длиннейшей мышце спины. Напротив уменьшение их концентрации в печени и крови животных свидетельствует о более интенсивном обмене липидов в опытной группе, по сравнению с контролем.

Заключение

Скормливание полнорационных комбикормов с содержанием сырого протеина – 19,4%; 15,8%; 15,2%, лизина – 0,92%; 0,80%; 0,65%, и метионина+цистина – 0,64%; 0,52%; 0,49%, соответственно в период выращивания, I и II периоды откорма, позволяет увеличить среднесуточный прирост живой массы животных на 15,0% и на 7,0% в период откорма, при снижении затрат корма в период выращивания на 4,0% и в период откорма на 6,4%. Это связано с улучшением переваримости органического вещества рациона (на 4,1%), сырого протеина (на 1,92%), сырого жира (на 8,2%), сырой клетчатки (на 10,1%) и азота корма (на 3,8% и 3,6% от принятого и переваренного соответственно). Использование опытных комбикормов в рационах растущих свиней способствует увеличению содержания незаменимых жирных кислот в составе липидов мышц и свиного жира. Скормливание сбалансированного по протеиновой питательности комбикорма оказывает достоверное положительное влияние на концентрацию липидов в жировых отложениях свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крохина В.Н. Добавка синтетического L-лизина в комбикорма с разным уровнем протеина для откармливаемых свиней. В сб.: Комбикорма в животноводстве. Под ред. Денисова Н.И. М.: Колос, 1973: 192-196.

2. Проваторов Г.В., Аитова М.Д., Кордюкова А.П. Эффективность балансирования энергетического и протеинового питания в комбикормах для поросят раннего отъема. Научные труды ВНИИФБиП, 1982: 62-69.
3. Thaler R.C., Libal V.W., Wahistrom R.C. Effect of lysine levels in pig starter diets on performance to 20 kg and subsequent performance and characteristics. J. Anim. Sci., 1986, 63, 1: 139-144.
4. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. М.: Колос, 1969: 475 с.

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПРОТЕИНА И АМИНОКИСЛОТ В РАЦИОНЕ НА ХАРАКТЕР АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ

*К.Т. Еримбетов, Н.С.-А Ниязов, Д.И. Шариева, О.В. Обвинцева,
Е.В. Пьянкова*

Лаборатория белково-аминокислотного питания

В комплексных исследованиях по изучению физиолого-биохимических основ формирования мясной продуктивности свиней при различных условиях питания изучали характер азотистого метаболизма и накопления мышечной ткани с целью уточнения уровней протеина и аминокислот и оценки адекватности их потребностям организма молодняка свиней. Установили, что дополнительное поступление аминокислот в метаболический пул организма помесных свиней, за счет оптимизации уровней протеина и аминокислот в их рационе, повышает эффективность использования азотистых веществ корма в биосинтетических процессах, накопление мышечной массы и качества мяса, что в конечном итоге увеличивает приросты массы тела и снижает затраты корма на единицу прироста в период выращивания и откорма в условиях промышленного содержания. Исследования интенсивности и направленности метаболизма азотистых веществ и формирования мышечной ткани у молодняка свиней подтвердили необходимость совершенствования условий белково-аминокислотного питания помесей путем установления их оптимального уровня.

Введение

В настоящее время усилия исследователей направлены на совершенствование системы питания гибридных свиней. Несомненно, что решение этой проблемы кроется в уточнении потребности свиней в питательных и биологически активных веществах и балансировании рационов с учетом условий содержания и наследственных

особенностей роста и развития гибридов. Актуальность научных поисков в этом плане определяется недостаточной изученностью потребности помесей в основных факторах питания и механизмов, регулирующих процессы биосинтеза белка и липогенеза в тканях, т.е. процессов, определяющих формирование мясных качеств у свиней. Исследования последних лет свидетельствуют о все возрастающем интересе ученых к проблеме оптимизации условий белково-аминокислотного и энергетического питания гибридных свиней нового поколения (Susenbeth et al., 1999; Smith et al., 1999; Nico P. Lenis et al., 1999; Flynn et al., 2000). Создание системы питания гибридов свиней также требует накопления данных о скорости роста, параметрах метаболизма, биосинтеза компонентов мяса и использования питательных веществ корма их организмом при различных условиях питания. Ранее проведенные исследования в нашем институте показали, что в период доращивания комбикорма с повышенным уровнем обменной энергии, а именно 12,73 МДж / кг, в большей степени соответствуют потребностям двухпородных помесей (крупная белая × дюрок), чем используемые в настоящее время на свиноводческих комплексах комбикорма с уровнем обменной энергии 12,12 МДж/кг. В связи с вышеизложенным в задачу исследований входило изучение интенсивности и направленности метаболизма азотистых веществ и формирования мышечной ткани у молодняка свиней в связи с различным уровнем протеина и аминокислот с целью установления их оптимального уровня.

Материал и методы

В комплексе с другими лабораториями для решения поставленной задачи проведен научно-хозяйственный опыт в условиях ЗАО «Кузнецовский комбинат» Московской области на помесных поросятах (крупная белая × ландрас; крупная белая × польский ландрас Pisi-402). По принципу парных аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста в возрасте 35 дней были сформированы две группы по 530 голов в каждой. Научно-производственный опыт был поделен на три периода: доращивания, первый и второй периоды откорма. Каждому периоду соответствовали разные по составу и питательности комбикорма.

Животные контрольной группы получали типовые комбикорма с премиксами КС-3; КС-4 и КС-5, изготовленные на Раменском комбикормовом заводе Московской области, а опытные комбикорма произведены на Ардымском комбикормовом заводе Пензенской области. Опытные комбикорма отличались повышенным содержанием сырого протеина (лизина, метионина+цистина) и вводом премиксов

фирмы «Хайфид», по сравнению с используемыми в настоящее время на свиноводческих комплексах уровнями протеина и аминокислот (данные контрольной группы). В итоге в период доращивания в рационе поросят опытной группы (в 1 кг корма) уровень сырого протеина составлял 194,6 г, лизина 9,25 г, метионина + цистина – 6,4 г; в комбикорме свиней контрольной группы – 181,3, 8,0 и 5,4 соответственно; в I период откорма - 157,9 и 153,8 г сырого протеина, 8,0 и 6,4 г лизина, 5,2 и 4,2 г метионина + цистина; во II период откорма – 152,0 и 149,3 г сырого протеина, 6,5 и 5,8 г лизина, 4,9 и 4,0 г метионина + цистина соответственно в опытной и контрольной группах (табл.1).

Для изучения интенсивности роста молодняка свиней проводили групповое взвешивание животных в начале и конце каждого возрастного периода.

В условиях вивария института в 109-114-дневном возрасте на 4-х боровках из каждой группы проводили балансовый опыт с целью изучения переваримости азотистых веществ и усвоения азота корма.

В 114-дневном возрасте были взяты пробы крови из хвостовой артерии у поросят подопытных групп. В конце опыта проводили убой животных по 3 головы из каждой группы, с последующей обвалкой туш и взятием образцов крови, печени и длиннейшей мышцы спины.

Таблица 1. Содержание незаменимых аминокислот в комбикормах для поросят в период доращивания, г/кг корма

Аминокислоты	Группы	
	контрольная	опытная
Треонин	6,2	7,1
Валин	5,0	6,6
Цистин	2,5	3,0
Метионин	2,9	3,4
Изолейцин	4,7	8,9
Лейцин	10,6	16,4
Фенилаланин	8,3	12,3
Лизин	8,0	9,25
Гистидин	3,6	5,6
Аргинин	8,1	10,7

Для характеристики метаболизма азотистых веществ были определены: концентрация мочевины в плазме крови по Coulambe, Fawcett (1963); концентрация свободных аминокислот в плазме крови, печени, кале и длиннейшей мышце спины на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339; активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в длиннейшей мышце спины и печени по Reitman, Frankel (1967); содержание креатинина в плазме крови и моче

по Лемперт (1968). Химический анализ мышечной ткани (сухое вещество, азот) проводили по общепринятым методам (Лебедев, Усович, 1976). В пробах длиннейшей мышцы спины определяли также белковые фракции (саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные белки) по Helander (1957). В ходе опыта проводили анализ кормов, кала и мочи на содержание азота по Кьельдалю. Для оценки качества туш и мяса нами были определены следующие показатели: площадь «мышечного глазка», толщина шпига, pH в динамике созревания мяса, его влагоудерживающая способность, окраска, нежность и белково-качественный показатель (Гуменюк, Черкасская, 1977).

Математическую обработку данных проводили стандартными методами (Овсянников, 1976).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что использование в кормлении молодняка свиней сбалансированных по аминокислотному составу рационов позволило увеличить среднесуточные приросты живой массы животных и снизить затраты корма на единицу прироста в период выращивания и откорма в условиях промышленного содержания (табл.2). В частности, прирост живой массы у свиней опытной группы в период выращивания и откорма был выше контроля на 15,1 – 7,0 %, при снижении на 4,0 – 6,4 % затрат корма на единицу прироста.

Таблица 2. Интенсивность роста и расход корма на единицу прироста в период доращивания и откорма свиней

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Период доращивания		
Среднесуточный прирост живой массы, г	338 ± 23	389 ± 26
Расход корма на 1 кг прироста, кг	3,19	3,06
За весь период откорма		
Среднесуточный прирост живой массы, г	582 ± 43	623 ± 48
Расход корма на 1 кг прироста, кг	4,19	3,92

Как показывают данные 3, 4 и 6 таблиц, лучший рост свиней опытной группы обусловлен более эффективным использованием азотистых веществ корма в биосинтетических процессах в их организме. Из таблицы 3 следует, что поросята опытной группы по усвоению азота корма значительно (на 4,33 г/сут) превосходили животных контрольной группы. Более высокая ретенция азота у них

обусловлена как повышением переваримости азотистых веществ корма, так и лучшим использованием азота в межклеточном обмене по сравнению с поросятами контрольной группы. Аналогичные изменения отмечены и по характеру усвоения аминокислот поросятами в период выращивания.

Таблица 3. Усвоение азота корма 109-114-дневными поросятами, г/сут

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
Принято азота с кормом	43,84 ± 0,32	50,37 ± 0,00
Выделено:		
с калом	10,25 ± 0,42	10,81 ± 0,76
с мочой	17,37 ± 1,24	19,01 ± 1,73
Переварено, г	33,59 ± 0,80	39,56 ± 1,41
%	76,62	78,54
Усвоено, г	16,22 ± 1,43	20,55 ± 1,26
% от принятого	37,00	40,80
% от переваренного	48,29	51,95

Как видно из таблицы 4, у животных опытной группы процент усвоения всех аминокислот, в том числе лизина и метионина+цистина, был на 5-6% выше, чем в контроле.

Таблица 4. Использование аминокислот корма поросятами, г/сут

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
Потреблено аминокислот	276,3	298,8
Выделено с калом	66,7	67,1
Усвоено, г	209,6	231,7
%	75,9	77,5
% усвоения: лизина	80,7	85,9
метионина+ цистина	80,9	84,8

В пользу последнего утверждения говорят и данные по концентрации свободных аминокислот в плазме крови. Так, у свиней опытной группы уровень свободных аминокислот в плазме крови в период доращивания и откорма был на 15 и 10% выше, чем у контрольных животных. При этом наиболее заметное увеличение отмечалось по незаменимым аминокислотам (на 26 и 14%) (табл.5).

Таблица 5. Концентрация свободных аминокислот в плазме крови свиней, мг%

Аминокислоты	Период дорастивания		Период откорма	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1	2	3	4	5
Аспарагиновая кислота	1,03±0,09	1,04±0,3	0,18±0,03	0,19±0,13
Треонин	1,52±0,13	1,57±0,3	0,67±0,10	0,72±0,10
Серин	1,46±0,10	1,36±0,32	0,56±0,16	0,65±0,15

Продолжение таблицы 5				
1	2	3	4	5
Глутаминовая кислота	4,02±0,22	4,20±0,9	1,56±0,17	2,06±0,26
Глицин	5,80±0,27	6,35±0,99	4,39±1,48	4,67±0,96
Аланин	2,68±0,29	2,68±1,90	1,49±0,30	1,65±0,30
Валин	3,26±0,18	3,25±0,60	2,05±1,45	2,58±0,61
Цистин	0,32±0,05	0,45±0,25	1,06±0,06	0,84±0,17
Метионин	0,49±0,07	0,56±0,11	0,26±0,02	0,33±0,07
Изолейцин	0,96±0,15	1,11±0,51	0,65±0,20	0,78±0,23
Лейцин	1,95±0,06	2,42±0,48	1,46±0,21	1,70±0,31
Тирозин	1,02±0,15	1,32±0,49	0,64±0,07	0,52±0,04
Фенилаланин	1,05±0,06	1,67±0,59	0,81±0,18	0,60±0,06
Лизин	1,02±0,14	1,66±0,32	0,78±0,21	0,98±0,09
Гистидин	0,67±0,02	0,86±0,23	0,58±0,11	0,62±0,12
Аргинин	1,28±0,27	2,28±0,65	1,06±0,14	1,12±0,80
Сумма	28,53±0,78	32,78±6,81	18,20±2,77	20,01±3,54
в т.ч. незаменимых	12,20±0,34	15,38±3,69	8,30±1,19	9,43±1,77
заменяемых	16,33±0,65	17,40±3,55	9,90±1,63	10,58±1,83

Концентрация мочевины – конечного продукта азотистого обмена, в плазме крови, напротив, во все исследованные периоды была существенно ниже у животных опытной группы, тогда как концентрация креатинина (метаболита, характеризующего массу скелетных мышц) – ниже у свиней контрольной группы (табл.6). Приведенные данные свидетельствуют о более эффективном использовании аминокислот в тканях свиней. На это указывают и данные, характеризующие активность ферментов, ответственных за катаболизм аминокислот в тканях (табл.6).

Таблица 6. Показатели азотистого обмена у свиней

Показатели	Контроль	Опыт
114 -дневный возраст		
Мочевина, ммоль/л в плазме крови	4,29 ± 0,64	4,09 ± 1,74
Креатинин, мкмоль/л в плазме крови	39,21 ± 2,70	44,33 ± 1,98
Щелочная фосфатаза, мкат/л в плазме крови	1,29 ± 0,14	1,33 ± 0,08
239 -дневный возраст		
Активность в печени:		
аспаргатаминотрансферазы, мг пирувата Na/г ткани	36,56 ± 2,16	39,87 ± 3,23

аланинаминотрансферазы, мкг пирувата Na/г ткани	4963,2 ± 8,71	5011,8 ± 6,95
Мочевина, ммоль/л в плазме крови	7,23 ± 0,64	4,88 ± 1,12**
Креатинин, мкмоль/л в плазме крови	84,19 ± 3,15	97,00 ± 4,21*
Щелочная фосфатаза, мккат/л в плазме крови	1,09 ± 0,04	1,11 ± 0,08

Так, у свиней опытной группы активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, являющейся интегрирующим ферментом в белковом синтезе, в печени была выше, чем у животных контрольной группы. Следовательно, лучшее обеспечение процессов метаболизма аминокислотами путем оптимизации белково-аминокислотного питания свиней способствовало увеличению отложения мышечной ткани, белка в скелетных мышцах и улучшению их качественного состава (табл.7,8).

Таблица 7. Параметры отложения мышечных белков и мышечной ткани у свиней, кг

Показатели	Контроль	Опыт
114-дневный возраст		
Мышечная ткань	14,00 ± 0,37	16,01 ± 1,28*
Мышечный белок	2,80 ± 0,61	3,21 ± 0,45
239-дневный возраст		
Мышечная ткань	36,99 ± 1,74	43,58 ± 1,57**
Мышечный белок	7,44 ± 0,38	8,80 ± 0,57

*- по данным выделения креатинина с мочой

** - по данным обвалки туш

Например, накопление мышечной ткани у них в период доращивания и откорма было выше контроля на 14,4 – 17,8%, отложение белка в скелетных мышцах при этом повысилось на 14,6 – 18,3% (табл.7). Установлено также существенное повышение отложения полноценных белков, к которым относят саркоплазматическую и миофибриллярную фракции, а также некоторое снижение содержания белков стромы (табл.8).

Таблица 8. Фракционный состав белков длиннейшей мышцы спины, г %

Показатели	Контроль	Опыт
Саркоплазматические	8,17 ± 0,53	8,34 ± 0,61
Миофибриллярные	8,83 ± 0,47	8,92 ± 0,32
Белки стромы	3,00 ± 0,65	2,82 ± 0,41
Общий белок	20,00 ± 0,51	20,08 ± 0,45

Необходимо также отметить, что у животных опытной группы, наряду с более высокими показателями накопления мышечной массы, имело место и повышение отложения липидов в длиннейшей мышце спины по сравнению с контролем (табл. 9).

Таблица 9. Химический состав мышц свиней 239 - дневного возраста, %

Показатели	Группы	Длиннейшая мышца спины
Сухое вещество	контрольная	25,54 ± 1,15
	опытная	26,41 ± 0,99
Белок	контрольная	20,00 ± 0,51
	опытная	20,08 ± 0,45
Общие липиды	контрольная	2,13 ± 0,038*
	опытная	2,43 ± 0,15*

*- по данным лаборатории межклеточного обмена

Результаты исследований показали, что обеспеченность рациона подопытных животных аминокислотами отразилась как на количестве, так и на качестве мяса. Мясо животных опытной группы отличалось более высокими значениями физико-химических показателей и содержанием полноценных белков, по сравнению с контролем (табл.10).

Таблица 10. Физико-химические и качественные показатели мяса свиней 239-дневного возраста

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
pH через 12 часов после убоя	6,00 ± 0,02	6,11 ± 0,05
pH через 24 часа после убоя	5,71 ± 0,012	5,80 ± 0,06
Интенсивность окраски, ед. (экстинция×1000)	129 ± 9	155 ± 12
Нежность мяса, см ² / г	1268,4 ± 62,1	1346,2 ± 47,5
Влагоудерживающая способность, %	87,39 ± 6,46	98,36 ± 1,57
Качественный показатель белков, ед. (отношение саркоплазматической+миофибриллярной к стромальной фракции мышечных белков)	5,67 ± 0,29	6,12 ± 0,35
Площадь «мышечного глазка», см ²	38,75 ± 4,61	48,80 ± 8,27
Толщина шпика над 6-7 грудными позвонками, см	3,93 ± 0,51	4,15 ± 0,39

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности оптимизации белково-аминокислотного питания помесных свиней при интенсивном выращивании их на мясо в условиях промышленного содержания. Так, при скормливании молодняку свиней сбалансированных по аминокислотному составу рационов повысилась эффективность использования азотистых веществ корма в

биосинтетических процессах, накопление мышечной массы и качественные показатели мяса. Таким образом, на основании полученных данных, характеризующих количественную сторону отложения мышечной ткани, белков скелетных мышц и направленность азотистого метаболизма в целом, можно заключить, что уровни сырого протеина, лизина, метионина + цистина в 1 кг корма, составляющие в период выращивания, 194,6 г, 9,25 г, 6,4 г; в I период откорма - 157,9, 8,0 и 5,2 и во II период откорма – 152,0, 6,5 и 4,9, соответственно, являются наиболее оптимальными для 2-породных помесных свиней, по сравнению с существующими в настоящее время на свиноводческих комплексах.

В целом проведенные эксперименты свидетельствуют об актуальности исследований по выяснению механизмов, участвующих в реализации продуктивного потенциала животных, и выявлению факторов, определяющих эффективность образования основных компонентов мяса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Susenbeth A., Dickel T., Diekenhorst A. and Hohler D. Effect of Energy Intake, Genotype and Body Weight on Protein Retention in Pigs When Dietary Lysine Is the First-Limiting Factor. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77:2985-2989.
2. Smith J. W., Tokach M. D., O'Quinn P. R., Nelssen J. L. and Goodband R. D. Effect of Dietary Energy Density and Lysine: Calorie Ratio on Growth Performance and Carcass Characteristics of Growing-Finishing Pigs. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77:3007-3015.
3. Nico P. Lenis, Hans T. M. van Diepen, Paul Bikker, Age W. Jongbloed and Jan van der Meulen. Effect of the Ratio Between Essential and Nonessential Amino Acids in the Diet on Utilization of Nitrogen and Amino Acids by Growing Pigs. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77:1777-1787.
4. Flynn N. E., Knabe D. A., Mallick B. K. and Wu G. Postnatal Changes of plasma amino acids in suckling pigs. *J. Anim. Sci.*, 2000, 78:2369-2375.
5. Coulambe S.S., Favre S. New the semimicro method determination of urea. *Clin. Chem.* 1963, 1, 9 : 23.
6. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the transaminases. *Am. J. Clin. Path.*, 1957, 1: 28.
7. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968. 18-20.
8. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976, 389.
9. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasm and myofibrile protein content of normal and atrophy skeletal muscle. *Acta physiological Scand.*, 1957, 41: 141.
10. Гуменюк Г.А., Черкасская Н.В. Методические рекомендации по исследованию кормов и продуктов животноводства. Киев, 1977, 256.

11. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве М.: Колос, 1976, 210.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ КОРМА ПОМЕСНЫМ МОЛОДНЯКОМ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО ПИТАНИЯ

В.П.Лазаренко, С.Ю. Гулюшин
Лаборатория энергетического питания

В научно-производственном опыте на двух группах помесных свиней (крупная белая х ландрас; крупная белая х польский ландрас) установлено, что у опытных животных, получавших комбикорма с повышенным содержанием протеина и сбалансированные по незаменимым аминокислотам (лизину, метионину+цистину), в период выращивания среднесуточные приросты увеличились на 15 %, а затраты обменной энергии на 1 кг прироста снизились на 5 % по сравнению с контрольными животными, получавшими типовые комбикорма КС-3, КС-4, КС-5. Эффективность использования обменной энергии на прирост у свиней опытной группы увеличилась на 5,6 %.

Введение

В настоящее время в многоотраслевых и специализированных хозяйствах для производства свинины в основном используют помесных свиней, поскольку они отличаются повышенной жизнеспособностью, лучше усваивают корма, быстрее растут и развиваются (Тепер, 1987; Герасимов, 2002;). Кроме того, этот метод разведения позволяет автоматически избежать стихийного инбридинга, исключить проявление инбредной депрессии и использовать эффект гетерозиса для усиления откормочных и мясо-сальных качеств помесных свиней (Герасимов, 2002). В то же время для помесных животных характерна повышенная потребность в энергии, протеине и других питательных и биологически активных веществах. Поэтому лучшие результаты по интенсивности выращивания помесного молодняка свиней обеспечиваются при сочетании высокой концентрации обменной энергии и протеина в кормосмесях с учетом возрастных и породных особенностей (Дмитrochenko, 1974; Доброхотов, 1974; Мысик, 1975; Дегусса, 2002).

В существующих рекомендациях недостаточно представлена детализация нормирования с учетом динамики роста животных (Нормы и рационы..., 1995). К тому же, важное значение в кормлении растущих

свиней имеет оптимальное сочетание нутриентов в кормосмеси, определяющее не только интенсивность роста животных, но и качество мяса, зависящее от содержания жировой ткани. Обеспечение животных энергией и белком составляет основную часть затрат на кормление. С увеличением цен на белковые корма возникла необходимость регулировать содержание незаменимых аминокислот или сырого протеина в рационах свиней в соответствии с их физиологическими потребностями. Свободные аминокислоты, в отличие от жиров, углеводов, минеральных веществ и витаминов, в организме не депонируются, приток их должен быть постоянным и ритмичным. При недостатке в рационе даже одной незаменимой аминокислоты животное пополняет ее за счет потребления большего количества корма. В этом случае затраты на получение единицы продукции увеличиваются и, более того, ухудшается использование других питательных веществ. Поэтому важно добиваться оптимального баланса незаменимых аминокислот в рационах животных для обеспечения их роста (Калашников и др., 1987; Чиков, 2002).

Целью исследований являлось изучение особенностей энергетического обмена, определение накопления энергии в тканях и органах у молодняка помесных свиней и затраты ее на прирост живой массы при разных уровнях аминокислот в кормосмесях.

Материал и методы

Опыт проведен в условиях ЗАО «Кузнецовский комбинат» Московской области на помесных поросятах (крупная белая х ландрас; и крупная белая х польский ландрас), начиная с 35- дневного возраста.

Были сформированы две группы животных по 530 голов. Поросята были подобраны по принципу аналогов с учетом живой массы и возраста. Научно-производственный опыт был проведен в три периода: выращивание (35-108 дней), первый (109-165) и второй (166-239 дней) периоды откорма. Каждому периоду соответствовали разные по составу и питательности комбикорма.

Животные контрольной группы получали типовые комбикорма, изготовленные на Раменском комбикормовом заводе Московской области с премиксами КС-3, КС-4, КС-5. Опытные комбикорма были изготовлены на Ардымском комбикормовом заводе Пензенской области и отличались большей сбалансированностью по питательности, минеральным веществам и витаминам за счет повышения содержания в них сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина и метионина+цистина), а также премиксов фирмы «Хайфид». Различия в количестве и качестве кормов представлены в таблице 1.

Содержание и кормление животных было групповое, с соблюдением зоотехнических и ветеринарных требований,

предъявляемых на комплексе. В период выращивания поросят кормили вволю. В период откорма комбикорм скармливали в жидком виде (1:3), согласно программе кормления. Для изучения динамики роста молодняка свиней проводили групповое взвешивание животных в начале и в конце каждого возрастного периода.

Таблица 1. Состав и питательность комбикормов

Компоненты	Выращивание		I период откорма		II период откорма	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Пшеница, %	30,0	41,1	24,5	39,7	15,0	22,9
Ячмень лущеный, %	—	23,1	—	35,9	—	46,4
Ячмень, %	39,0	—	34,3	—	38,8	—
Овес, %	—	—	10,0	—	10,0	—
Отруби пшеничные, %	10,0	7,0	12,0	4,12	17,0	14,9
Мука травяная, %	—	—	—	2,0	—	—
Мука рыбная, %	2,0	2,75	1,5	—	1,7	—
ЗЦМ, %	—	1,0	—	—	—	—
Шрот подсолнечный, %	8,0	7,0	12,0	5,9	15,0	10,0
Шрот соевый, %	8,0	13,1	1,0	9,4	—	—
Дрожжи кормовые, %	—	—	—	—	—	2,5
Известняк, %	0,5	1,0	0,5	1,0	—	1,4
Монокальцийфосфат, %	1,7	0,59	0,8	0,8	1,0	0,4
Жир кормовой, %	—	1,9	—	—	—	—
Соль, %	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4
Лизин, %	—	0,155	—	0,044	—	0,058
Премикс, %	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В 1 кг содержится:						
Кормовые единицы	1,19	1,22	1,12	1,14	1,02	1,04
Обмен. энергия, МДж	13,01	13,59	12,50	12,89	12,43	12,56
Сырой протеин, г	181,3	194,6	153,8	157,9	149,3	152,0
Перевар. протеин, г	136,1	145,9	115,3	117,7	107,2	109,4
Лизин, г	8,0	9,25	6,4	8,0	5,8	6,5
Метионин+цистин, г	5,4	6,4	4,2	5,2	4,0	4,9
Сырая клетчатка, г	40,2	39,6	49,8	48,3	52,3	51,7
Сырой жир, г	24,0	43,7	28,8	29,6	21,3	22,8
Кальций, г	8,7	9,2	7,0	7,2	6,8	7,0
Фосфор, г	6,4	6,9	6,0	5,7	5,8	—
Сахар, г	23,9	25,6	22,9	21,7	21,0	20,6

В 110-114- дневном возрасте в условиях вивария института был проведен балансовый опыт на 4 животных из каждой группы с целью детального изучения особенностей обмена энергии у растущих свиней, при скармливании им рационов с разным уровнем сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина, метионина+ цистина).

В конце опыта провели контрольный убой животных, по 3 головы из каждой группы, с последующим определением убойного выхода и количества мышечной, жировой и костной тканей. Была определена масса и взяты пробы тканей и внутренних органов для

калориметрических измерений. Калориметрические измерения провели в адиабатическом калориметре (Надальяк и др., 1985).

Результаты и обсуждение

Известно, что высокая интенсивность роста, сопровождающаяся значительным отложением белковых веществ и жира, сопровождается возрастанием напряженности физиологических и биохимических процессов в организме. Поэтому очень важно регулировать содержание незаменимых аминокислот или сырого протеина в рационах свиней в точном соответствии с их физиологическими потребностями. Например, избыток протеина в рационе будет увеличивать стоимость кормов, а его недостаток – снижать продуктивность свиней. Поэтому рациональное кормление свиней основывается на детальном выяснении их потребностей в питательных и биологически активных веществах.

Рацион помесных свиней опытной группы был сбалансирован по незаменимым аминокислотам (табл.1) и, в первую очередь, по лизину, поскольку известно, что он является лимитирующей аминокислотой, так как почти полностью идет на синтез белка, из которого состоит масса тела свиней. Балансирование рационов положительно сказалось на приросте массы тела опытных животных и снижении затрат корма на единицу прироста (табл. 2).

Таблица 2. Затраты корма и энергии на единицу прироста в периоды выращивания и откорма свиней

Показатели	Группы животных	
	контроль	опыт
Период выращивания		
Количество голов	530	530
Прирост живой массы, кг	25,01	28,8
Среднесуточный прирост, г	338±23	389±26
Затраты ОЭ на 1 кг прироста, МДж	41,2	41,6
I период откорма		
Прирост живой массы, кг	26,24	28,67
Среднесуточный прирост, г	468 ± 31	512 ± 37
Потреблено корма на 1 голову, кг	113,3	113,3
Затраты ОЭ на 1 кг прироста, МДж	53,9	50,9
II период откорма		
Прирост живой массы, кг	49,5	52,4
Среднесуточный прирост, г	669 ± 55	708 ± 58*
Потреблено корма на 1 голову, кг	204,2	204,2
Затраты ОЭ на 1 кг прироста, МДж	51,3	48,9
За весь период откорма		
Прирост живой массы, кг	75,74	81,07
Среднесуточный прирост, г	582 ± 43	623 ± 48*
Потреблено корма на 1 голову, кг	317,5	317,5
Затраты ОЭ на 1 кг прироста, МДж	52,2	49,6

* – достоверно (P<0,05)

В период выращивания среднесуточный прирост у животных опытной группы был на 15 % выше контрольной и составил 389 ± 26 г/сутки. Затраты обменной энергии в опытной группе в этот период составили 41,6 МДж, в контрольной – 41,2 МДж (табл.2).

В первом периоде откорма рацион молодняка помесных свиней опытной группы, сбалансированный по незаменимым аминокислотам, способствовал не только увеличению живой массы животных, но и снижению затрат обменной энергии на кг прироста - на 6,1 % по сравнению с контролем (50,9 МДж и 53,9 МДж, соответственно), хотя потребление корма в обеих группах было одинаковым - 113,3 кг на голову. Во втором периоде откорма наблюдалась такая же тенденция - при одинаковом потреблении корма (204,2 кг на голову) в опытной группе среднесуточный прирост был выше контроля на 5,8 %, а затраты корма на 1 кг прироста снизились на 5,6 %. Затраты обменной энергии на 1 кг прироста за весь период откорма у свиней опытной группы были ниже на 5 % и составили 49,6 МДж (в контроле 52,2 МДж, табл.2).

Для более детального выяснения эффективности использования энергии у растущих свиней при скормливания рационов с разным уровнем сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина, метионина+цистина) в условиях вивария института был проведен балансовый опыт в период 110-114 дней (1 период откорма). Из каждой группы было отобрано по 4 животных. В ходе балансового опыта одно животное в опытной группе заболело и было снято с опыта. Результаты балансового опыта представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты балансового опыта

Показатели	Группы животных	
	контроль	опыт
Фактическое потребление корма, г/сут	$1633 \pm 13,04$	$1650 \pm 0,0$
В пересчете на возд. сухое вещество, г/сутки	$1486,23 \pm 8,84$	$1504,14 \pm 0,0$
Переварено СВ, г	$1209,05 \pm 27,76$	$1279,54 \pm 51,4$
% переваримости	$81,3 \pm 1,04$	$85,0 \pm 3,41$
Валовая энергия корма, МДж/сут	$26,379 \pm 0,14$	$26,885 \pm 0,0$
Энергия кала, МДж/сут	$4,756 \pm 0,41$	$3,889 \pm 0,78$
Переваримая энергия, МДж/сут	$21,623 \pm 0,54$	$22,996 \pm 0,82$
Энергия мочи, МДж/сут	$0,393 \pm 0,05$	$0,568 \pm 0,07$
Обменная энергия, МДж/сут	$21,230 \pm 0,48$	$22,428 \pm 0,75$
Коэффициент переваримости	$81,90 \pm 1,65$	$83,40 \pm 2,80$
ОЭ к потребленному СВ	$17,5 \pm 0,07$	$17,5 \pm 0,14$

Процент переваримости сухого вещества корма у животных опытной группы составил $85 \pm 3,41$, что на 3,7 % выше контроля. Количество переваримой энергии на 6,3 % было выше у животных опытной группы и составило $22,996 \pm 0,82$ МДж/сутки. Коэффициент переваримости составил $83,4 \pm 2,8$, что на 1,8 % выше контроля. По данным Ноздрина и Мысик (1975) уровень переваримой энергии у молодняка свиней в этот период составляет 20-21 МДж/сутки.

Известно, что обеспеченность свиней энергией зависит не только от поступления валовой энергии корма, но и от эффективности использования обменной энергии. Обменная энергия была выше у свиней опытной группы – $22,428 \pm 0,75$ МДж/сутки, в контрольной группе – $21,230 \pm 0,48$ МДж/сутки.

Таким образом, данные балансового опыта показали, что животные опытной группы, получавшие комбикорма, сбалансированные по незаменимым аминокислотам (лизину, метионину+цистину) с добавлением премиксов фирмы "Хайфид", имели более высокую переваримость сухого вещества корма (на 5,8 % выше контроля). Обменная энергия была также выше у животных опытной группы - на 5,6 %, что способствовало интенсивному росту животных опытной группы по сравнению с контролем (табл.2). Прирост живой массы у свиней опытной группы в этот период составил 287,67 кг, что на 9,3% выше контроля.

В конце опыта провели убой животных по 3 головы из каждой группы, обвалку туш с последующим взятием образцов органов и тканей. Результаты контрольного убоя свиней представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты контрольного убоя свиней в конце откорма

Показатели	Группы животных	
	контроль	опыт
Живая масса, кг	$111,66 \pm 2,39$	$117,66 \pm 1,71$
Вес туши, кг	$87,3 \pm 2,45$	$94,73 \pm 1,88$
Вес полутуши, кг	$43,66 \pm 1,33$	$47,8 \pm 0,82$
Выход мяса: кг	$18,9 \pm 0,78$	$22,33 \pm 0,75$
МДж	$316,95 \pm 18,93$	$381,18 \pm 6,17$
Выход сала: кг	$19,63 \pm 1,26$	$19,6 \pm 1,43$
МДж	$579,9 \pm 31,38$	$592,56 \pm 57,51$
Выход костей: кг	$5,13 \pm 0,2$	$5,96 \pm 0,31$
МДж	$23,64 \pm 0,96$	$27,47 \pm 1,4$
Содержание энергии в полутуше, МДж	$920,49 \pm 20,6$	$1001,22 \pm 31,96$
Накопление энергии во внутренних органах, МДж	$154,1 \pm 18,97$	$195,9 \pm 23,57$

Живая масса животных опытной группы в конце исследований была выше контроля на 6 кг, вес туши – на 7,43 кг. Содержание энергии в полутуше у свиней опытной группы составило $1001,22 \pm 31,96$ МДж, в том числе мяса $381,16 \pm 6,17$ МДж, сала – $592,66 \pm 57,51$ МДж, костей – $27,47 \pm 1,40$ МДж. Содержание энергии в полутуше у свиней контрольной группы было ниже, чем у опытных животных на 80,73 МДж и составило $920,49 \pm 20,60$ МДж, в том числе выход мяса – $316,95 \pm 18,93$ МДж, выход сала – $579,9 \pm 31,38$ МДж, костей – $23,64 \pm 0,96$ МДж, или соответственно на 20,2 %, 2,2 % и 16,2 % ниже опыта. Накопление энергии во внутренних органах в опытной группе составило $195,9 \pm 23,57$ МДж, в контрольной группе – $154,1 \pm 18,97$ МДж. Калорийность 1 кг мяса у свиней контрольной группы составляла 16,77 МДж, опытной – 17,068 МДж, что на 1,8 % ниже опыта. Содержание энергии в полутуше у свиней опытной группы было выше контроля на 8,8 %.

Заключение

Наряду с улучшением селекционно-племенной работы, непременным условием достижения высоких показателей в свиноводстве является обеспечение животных полноценными высококачественными кормами. В коммерческих рационах свиней усваивается только 35 % протеина, а остальное количество азота выделяется с экскрементами (Герасимов, 2002). Степень усвоения протеина рациона можно увеличить добавлением синтетических аминокислот. Причем, чем ближе состав аминокислот рациона к потребности животных, тем меньше белка разрушается и выводится из организма.

Опыт, проведенный в условиях свинокомплекса «Кузнецовский» Московской области на свиньях в период выращивания и откорма, с использованием комбикормов с повышенным содержанием протеина и сбалансированных по незаменимым аминокислотам (лизину, метионину+цистину) показал, что у животных опытной группы, получавших данные комбикорма, на 15 % увеличились среднесуточные приросты в период выращивания (до 109 дней). Средняя масса тела поросят в контрольной группе составила 34,56 кг, в опытной группе – 38,53 кг, что на 3,97 кг выше контроля. При этом на 4 % снизились затраты кормов на 1 кг прироста живой массы. Затраты обменной энергии на 1 кг прироста в опытной группе составили 57,6 МДж, в контрольной – 66,3 МДж (на 13 % выше опыта).

Затраты обменной энергии на 1 кг прироста за весь период откорма по опытной группе составили 49,6 МДж, по контрольной – 52,2 МДж, что на 5 % ниже контроля.

Эффективность использования обменной энергии на прирост свиней при скормливании им сбалансированных комбикормов с повышенным содержания сырого протеина и незаменимых аминокислот (лизина, метионина + цистина) увеличилась на 5,6 %.

На основании результатов установлено, что оптимальной концентрацией обменной энергии в комбикормах для помесного молодняка свиней в период выращивания является 13,6 МДж/кг сухого вещества, в первый период откорма – 12,9 МДж/кг и во второй период откорма – 12,6 МДж/кг сухого вещества.

Результаты контрольного убоя животных показали, что содержание энергии в полутуше у свиней опытной группы составило $1001,22 \pm 31,96$ МДж, в контрольной группе – $920,49 \pm 20,60$ МДж. При этом процент выхода мяса, сала, костей (по содержанию в них энергии) у свиней опытной группы был равен 38,07; 59,18 и 2,74, соответственно, в контрольной – 34,43; 62,10 и 2,57 %. Следовательно, у свиней опытной группы содержание энергии в полутуше за счет выхода мяса было выше контроля на 3,64 %. В то же время было замечено снижение содержания энергии в полутуше опытных животных за счет меньшего содержания сала на 2,92 % по сравнению с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов В., Пронь Е. Мясо-сальные качества трехпородных помесей различных генотипов. Свиноводство, 2002, 5: 5-7.
2. Дегусса А.Г. Идеальный протеин для свиней. Свиноводство, 2002, 3: 17-19.
3. Дмитроченко А.П. Кормление сельскохозяйственных животных. Л.: Колос. 1974: 324 с.
4. Доброхотов Г.Н. М.: Колос. Свиноводство, 1974: 543 с.
5. Мысик А.Т., Проваторов Г.В., Фесина Б.Е. Мясной и беконный откорм. М.: Россельхозиздат, 1975: 187 с.
6. Ноздрин Н.Т., Мысик А.Т. Обмен веществ и энергии у свиней. М.: Колос. 1975: 239 с.
7. Нормы и рационы кормления с.-х. животных. Справочное пособие. Ч.1 А.П.Калашников и др. М.: Знание. 1995: 400 с.
8. Тепер Н.М. Питание свиней: теория и практика. Перев. с англ. М.: Агропромиздат, 1987: 313 с.
9. Надальяк Е.А., Агафонов В.И., Решетов В.Б. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у с.-х. животных. Методические указания. Боровск, 1986: 58 с.
10. Чиков А., Кононенко С. Обеспеченность свиней биологически активными веществами и протеином. Свиноводство, 2002, 3: 16-17.

ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА И ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА ПОМЕСНЫХ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ АМИНОКИСЛОТНОГО ПИТАНИЯ

В.А. Матвеев, Т.Н. Дворецкая, А.М. Коровяцкий, Г.Н. Пахмутова
Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности с.-х. животных

Для характеристики обмена минеральных веществ у помесных поросят крупная белая*ландрас, крупная белая*польский ландрас определяли поступление их с кормом, выделение с калом и мочой, содержание в крови. На основании этих анализов представлены данные о биологической доступности и эффективности использования меди, цинка, кобальта, марганца, железа и фосфора у 114-дневных поросят при использовании двух комбикормов, отличающихся по содержанию в них лизина, метионина и цистеина, и по составу премикса. В сыворотке крови помесных поросят определена концентрация меди, магния, цинка, кобальта, марганца, железа и фосфора в связи с возрастом и уровнем аминокислотного питания.

Введение

При интенсивном выращивании и откорме свиней особое значение имеет обеспечение животных высококачественными комбикормами в соответствии с их физиологическими потребностями. В связи с этим, совершенствование системы питания свиней и на ее основе разработка полнорационных комбикормов с оптимальным содержанием протеина, энергии, незаменимых аминокислот и минеральных веществ, позволяющих получать высокие среднесуточные приросты массы тела и качественное мясо, продолжает оставаться актуальной проблемой для повышения эффективности производства свинины. В настоящее время в промышленном свиноводстве все шире начинает применяться использование помесных животных, обладающих более высоким продуктивным потенциалом. Соответственно, уточнение норм потребности их в питательных веществах приобретает важное практическое значение.

Наряду с белками, аминокислотами, углеводами и липидами в организме животного важную роль играют минеральные вещества. Биологическая эффективность использования минеральных веществ существенно зависит от сбалансированности рациона по питательным и биологически активным веществам. Поэтому оценка состояния минерального обмена у свиней при совершенствовании системы протеинового и аминокислотного питания целесообразна и достаточно обоснована.

Минеральные вещества не могут синтезироваться в организме животных и, следовательно, обеспеченность ими обмена веществ полностью определяется условиями питания. Недостаток минеральных элементов в кормах компенсируют вводом в рацион химических соединений и природных источников (Кузнецов, 1989; Кокорев, 1990; Mahan, 1990; Слесарев, 1995). Доступность для организма животного макро- и микроэлементов из этих источников значительно различается и может изменяться с возрастом. В связи с этим в комплексной работе, выполненной сотрудниками ряда лабораторий института, в задачу наших исследований входило:

- определить параметры обмена минеральных веществ у помесных свиней при выращивании и откорме в условиях промышленной технологии производства свинины;
- изучить эффективность использования минеральных веществ при применении типовых и разработанных в институте экспериментальных комбикормов с повышенным вводом ряда незаменимых аминокислот (лизина, метионина + цистеина);
- изучить связь между параметрами обмена минеральных веществ и показателями мясной продуктивности свиней.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи опыт проведен в условиях ЗАО «Кузнецовский комбинат» Московской области на 1060 помесных поросятах (крупная белая*ландрас; крупная белая*польский ландрас Pisi-420) с живой массой при постановке на опыт 9 -10 кг. По принципу парных аналогов с учетом живой массы, пола и возраста были сформированы две группы животных, по 530 голов в каждой. Научно-производственный опыт включал три технологических периода: выращивание (возраст животных 35 –109 суток); первый период откорма (возраст животных 109 –165 суток); второй период откорма (возраст животных 166 –239 суток).

Каждому периоду соответствовали разные по составу и питательности комбикорма. Животные контрольной группы получали типовые комбикорма КС-3; КС-4 и КС-5. В них содержалось: лизина - 8,0; 6,4 и 5,8 г; метионина + цистеина – 5,4; 4,2 и 4,0 г соответственно периодам. Поросята опытной группы получали комбикорма, которые отличались более высоким содержанием сырого протеина, незаменимых аминокислот (лизина, метионина + цистеина) и вводом премиксов фирмы «Хайфид». По периодам опыта в них содержалось: лизина -9,25; 8,0 и 6,5 г; метионина + цистеина – 6,4; 5,2 и 4,9 г.

Содержание подопытных животных групповое, согласно технологии, применяемой в промышленном комплексе. Кормление свиней в период выращивания вволю, а в период откорма корма

скармливали в жидком виде в соотношении 1:3, согласно принятой программе кормления.

Для изучения динамики роста молодняка свиней проводили групповое взвешивание животных в начале и конце каждого возрастного периода. Для биохимических исследований у свиней брали пробы крови из сосудов хвоста на 35-й, 114-й и 239-й дни жизни. В конце опыта провели убой животных по 3 головы из каждой группы. При этом брали пробы крови, длиннейшей мышцы спины и печени и провели обвалку туш.

Из животных, находящихся на опыте в хозяйстве, в 109-дневном возрасте были сформированы две группы поросят по 4 головы в каждой, живая масса которых в среднем соответствовала данным по контрольной и опытной группам животных в целом. На этих поросятах в 109-114-дневном возрасте в условиях вивария института провели балансовый опыт в целях изучения переваримости и усвоения питательных веществ и макро- и микроэлементов. На начало баланса средний вес животных контрольной группы составил – 40 кг, а опытной - 43 кг. В конце балансового опыта средний живой вес поросят в контроле был 42 кг, а в опытной группе - 46 кг.

В пробах сыворотки крови, печени, в длиннейшей мышце, комбикормах, в моче и кале определяли концентрацию железа, меди, цинка, магния, марганца, кобальта на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант», а содержание общего фосфора - химическим методом с применением аммония метаванадата. Твердые образцы (кал, комбикорм, печень, мышца) переводили в водный раствор после сухого озоления, а мочу и сыворотку - после влажного.

Результаты и обсуждение

Применение комбикормов с оптимизированным уровнем протеинового и аминокислотного питания обеспечило увеличение интенсивности роста молодняка свиней опытной группы по сравнению с контролем и снизило затраты корма на единицу прироста в период выращивания и откорма (табл. 1). Среднесуточный прирост массы тела у молодняка свиней опытной группы в период выращивания составил 389 ± 26 г и превышал контроль на 15 %. При этом средняя масса тела животных в контрольной группе была $34,56 \pm 0,35$ кг, а в опытной – $38,53 \pm 0,42$ кг ($P < 0,005$) при снижении на 4 % расхода корма на 1 кг прироста живой массы.

В первый период откорма у свиней опытной группы по сравнению с контролем был выше прирост массы тела на 9,3% и на 8,4% меньше затраты корма на 1 кг прироста. Такая же тенденция получена и во второй период откорма. В целом за весь период откорма в опытной группе по сравнению с контролем среднесуточный прирост

был больше на 7,0% и составил 623 ± 48 г. При этом затраты корма на единицу прироста живой массы в опытной группе были меньше на 6,4%.

Известно, что биологическая доступность минеральных элементов из разных источников, используемых при кормлении свиней, может иметь существенные различия. Поэтому при проведении балансового опыта на поросятах 114-дневного возраста, наряду с определением переваримости основных питательных веществ и энергии, определяли эффективность использования минеральных веществ корма. Согласно данным таблицы 1, животные опытной группы по сравнению с контролем получали комбикорм, в котором было меньше на 9,4% меди и на 14,1% марганца, но больше содержалось цинка на 13,4%, кобальта на 6,5% и железа на 9,1%. Потребление корма поросятами разных групп было практически одинаковым и составило 1,63 и 1,65 кг на голову в сутки. Следовательно, разная обеспеченность организма свиней по отдельным элементам зависела от их содержания в корме, биологической доступности из разных химических соединений, а также интенсивности экскреции с мочой, желчью и пищеварительными соками.

Таблица 1. Содержание микроэлементов в комбикормах для 114-дневных поросят в период проведения балансового опыта, мг/кг натурального корма

Вид комбикорма	Cu	Zn	Co	Mn	Fe	P, г/кг
СК-4а (контроль)	106,51	18,23	0,42	117,53	62,18	3,91
СК- 4 (опыт)	96,62	20,69	0,45	101,10	67,91	3,80
% к контролю	90,7	113,5	107,1	86,0	109,2	97,2

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что у растущих животных шло интенсивное использование организмом микро- и макроэлементов, поступивших с кормом. У животных обеих групп установлено достаточно высокое усвоение исследованных минеральных элементов из кормов, и их высокая степень отложения в организме (табл. 2). Другими исследователями так же показано, что организм растущих животных усваивает микроэлементы интенсивнее, чем организм взрослых (Батаева и др., 1970).

Результаты балансового опыта указывают на то, что для разных минеральных элементов значительно различается соотношение между выделением их из организма животного с калом или мочой. Например, основное выделение фосфора, железа и марганца происходит с калом и в меньшей степени с мочой (табл. 2) С калом, как правило, выделяется невсосавшаяся и эндогенная часть минеральных веществ, экскретируемых с желчью и пищеварительными соками. Такие же

результаты были получены в ранее проведенных исследованиях (Коломийцева и др., 1970; Батаева и др., 1980; Кокорев, 1992; Кузнецов, 1999). В то же время объем выделения с мочой меди, цинка и кобальта в ряде случаев аналогичен их выделению с калом (табл. 2). По-видимому, это свидетельствует о том, что в результате достаточно хорошего переваривания и всасывания из пищеварительной системы в метаболический пул организма свиней поступило такое количество минеральных веществ, которое превышало потребности организма животного. В этой ситуации регуляторные системы организма свиней обеспечивают усиление экскреции минеральных веществ с мочой. Эти результаты свидетельствуют о целесообразности сокращения норм ввода в состав комбикорма в период дорастивания поросят меди, цинка и кобальта.

Таблица 2. Параметры среднесуточного обмена минеральных веществ в организме растущих свиней в период балансового опыта

Группы животных х	Поступил о с кормом, мг	Выделено из организма, мг		% переваре нного от принятог о	Отложен о, мг	% отложенн ого от принятог о
		с калом	с мочой			
Медь						
Контроль	173,88 ±1,1	79,30 ±5,48	16,42 ±4,92	54,4±3,3	78,16 ±2,10	44,9 ±0,9
Опыт	159,42 ±0,00	47,45 ±10,94	48,37 ±4,32	70,2±6,9	63,61 ±14,33	39,9 ±9,0
Цинк						
Контроль	29,76 ±0,19	5,69 ±0,39	5,85 ±1,75	80,9±1,4	18,22 ±1,29	61,3 ±4,4
Опыт	34,14 ±0	8,12 ±1,87	10,07 ±0,9	76,2±5,5	15,95 ±2,59	46,7 ±7,6
Кобальт						
Контроль	0,69 ±0	0,17 ±0,01	0,22 ±0,06	75,7±1,8	0,30 ±0,05	44,2 ±7,6
Опыт	0,74 ±0	0,15 ±0,04	0,17 ±0,01	79,3±4,8	0,42 ±0,05	56,7 ±6,4
Марганец						
Контроль	191,87 ±1,21	67,86 ±4,69	0,05 ±0,01	64,6±2,6	123,96 ±5,51	64,6 ±2,6
Опыт	166,82 ±0,0	74,95 ±17,29	0,25 ±0,02	55,1±10,4	91,62 ±17,30	54,9 ±10,4
Железо						
Контроль	101,51 ±0,64	27,18 ±1,88	9,99 ±2,99	73,2±2,0	64,34 ±1,19	63,4 ±1,1
Опыт	112,05 ±0,0	33,07 ±7,63	13,73 ±1,23	70,5±6,8	65,25 ±8,54	58,2 ±7,6
Фосфор						
Контроль	6383,1 ±40,3	4126,1 ±285,1	105,1 ±31,4	35,3±4,7	2151,9 ±281,6	33,7 ±4,2
Опыт	6270,0 ±0,0	4180,0 ±964,1	126,7 ±11,3	33,3±15,4	1963,3 ±972,2	31,3 ±15,5

Более высокий уровень протеинового и аминокислотного питания поросят опытной группы по сравнению с контролем оказал определенное влияние и на обмен минеральных веществ. Рассматривая данные по использованию меди, можно отметить, что свиньи опытной группы достоверно меньше на 8,3 % ($P<0,02$) потребляли с кормом меди (табл. 2). Однако, биологическая доступность меди, выраженная как отношение переваренной к потребленной, у них была значительно выше ($P<0,05$). Возможно, это связано с использованием в составе премиксов разных источников меди. Однако, эффект более высокой биологической доступности меди из корма у поросят опытной группы

нивелировался достоверным увеличением (на 194,6 %), по сравнению с контролем, выделения меди с мочой (табл. 2). В результате этого в целом эффективность использования меди у них оказалась меньше, чем в контроле (табл. 2).

Животные опытной группы достоверно больше (на 14,7 %) потребляли с кормом цинка (табл. 2). Биологическая доступность цинка из кормов существенно не различалась между группами. Однако, в результате более значительного выделения цинка с мочой у животных опытной группы по сравнению с контролем был достоверно ниже показатель эффективности использования цинка, рассчитанный как отношение количества отложенной меди к принятой.

Анализ данных по использованию кобальта не выявил существенных различий между группами животных (табл. 2). Следовательно, уровень аминокислотного питания не оказал значительного влияния на метаболизм кобальта в организме растущих свиней.

Показано, что выделение марганца с калом существенно превышало таковое с мочой (Батаева и др., 1980). В нашем опыте получены аналогичные результаты. Причем, животные в опытной группе по сравнению с контролем менее эффективно использовали марганец, поступивший с кормом, так как у них процент отложенного количества элемента от принятого составил 54,9 %, а у поросят контрольной группы – 64,6 % (табл. 2).

Аналогичные данные установлены и в метаболизме железа. У животных опытной группы была ниже эффективность использования железа. Возможно, это связано с тем, что они на 10,4% ($P < 0,002$) больше потребляли железа с кормом, так как не установлено значительных различий между группами по его переваримости.

Самая низкая доступность для всасывания из желудочно-кишечного тракта у животных обеих групп установлена для фосфора (табл. 2). Соответственно, определена самая низкая эффективность использования фосфора из корма у поросят обеих групп (табл. 2). Разный уровень аминокислотного питания свиней не оказал существенного влияния на усвоение и использование фосфора.

Одним из интегральных показателей, характеризующих обмен минеральных веществ в организме животных, является уровень минеральных элементов в крови. Данные по концентрации минеральных веществ в крови поросят, представленные в таблице 3, свидетельствуют о наличии возрастных изменений в метаболизме минеральных веществ и о влиянии на эти процессы уровня аминокислотного питания.

Характеризуя эти данные, необходимо отметить, что в целом содержание минеральных веществ в крови свиней находилось в пределах физиологической нормы. В процессе роста поросят с 35-

дневного по 239-дневный возраст у них в сыворотке крови увеличилась концентрация меди на 102,7%, цинка на 39,8%, марганца на 421,7% и снизилось содержание магния на 15,8%, кобальта – на 13,8% и железа – на 21,1% (табл. 3). По-видимому, эти возрастные изменения в содержании минеральных элементов в крови отражают изменения в интенсивности процессов обмена веществ, включая и метаболизм белков.

Таблица 3. Параметры концентрации минеральных элементов в сыворотке крови помесных поросят, мг/л

Показатели	Группы		%
	контроль	опыт	к контролю
Исходные данные в 35-дневном возрасте			
Медь	3.65+0.41		
Магний	1.52+0.14		
Цинк	2.46+0.32		
Кобальт	0.094+0.03		
Марганец	0.046+0.01		
Железо	80.9+2.1		
Фосфор	100.3+3.4		
114-дневный возраст			
Медь	8,93±1,6	5,95±1,83	66,6
Магний	2,7±0,38	1,67±0,23	61,8
Цинк	2,8±0,23	2,6±0,28	92,9
Кобальт	0,09±0,005	0,086±0,02	95,6
Марганец	0,039±0,015	0,053±0,02	135,9
Фосфор	129,3±16,5	110,7±2,3	85,6
239-дневный возраст			
Медь	7,4±0,3	11,4±1,5	154,1 *
Магний	1.28±0.15	1.62±0.13	126,6
Цинк	3,44±0,34	3,77±0,6	109,6
Кобальт	0.081±0.01	0.09±0.01	111,1
Марганец	0,24±0,03	0,31±0,04	129,2
Железо	63.8±2.9	69.3±5.4	108,6
Фосфор	108±6.8	115,3±3.6	106,8

* - $P \leq 0,05$.

Известно, что многие минеральные элементы входят в структуру белков и, в том числе, ферментов. Можно было полагать, что разный уровень аминокислотного питания свиней окажет влияние и на обмен минеральных веществ. Действительно в сыворотке крови поросят опытной группы по сравнению с контролем в 114-дневном возрасте установлено более низкое содержание меди, магния, цинка и фосфора на фоне более высокого уровня марганца. В тоже время в конце опыта в сыворотке крови 239-дневных поросят опытной группы наблюдалась тенденция к более высокому уровню всех исследованных элементов.

Концентрация минерального элемента в крови отражает результат взаимодействия ряда метаболических потоков: поступление элемента из желудочно-кишечного тракта в кровь, поглощение его клетками органов и тканей, поступление его из клеток органов и тканей в составе определенных веществ, выведение элемента из метаболического пула с мочой, желчью и пищеварительными соками.

Исходя из изложенного можно полагать, что более низкий уровень в сыворотке крови 114-дневных поросят опытной группы по сравнению с контролем меди, цинка и фосфора отражает величину общего метаболического пула данных элементов, что согласуется с приведенными выше данными (табл. 2) о более низком отложении у них этих элементов.

Заключение

Одним из направлений развития технологий промышленного свиноводства является использование помесных животных. В условиях оптимального питания помесные животные более полно способны реализовать потенциал мясной продуктивности. Однако, для этих целей необходимо удовлетворение потребностей организма не только в основных питательных веществах и энергии, но и в таких элементах как незаменимые аминокислоты, витамины, макро и микроэлементы. Установлено, что обмен минеральных веществ в организме тесно связан с обеспеченностью животных другими пластическими и энергетическими субстратами. Показано, что отложение фосфора зависит от содержания в рационе лизина. При дефиците лизина в рационе снижается степень усвоения фосфора. Недостаточная обеспеченность рационов лизином ведет к уменьшению насыщенности плазмы крови фосфором. На усвоение фосфора в некоторой степени влияет и соотношение лизина с другими аминокислотами и, прежде всего, с метионином. Нарушение оптимального соотношения этих аминокислот ведет к понижению отложения фосфора в теле животных (Григорьев, 1971). Известно (Кузнецов и др., 1988; Кальницкий и др., 1986), что уровень каждого минерального элемента в организме животных имеет свою возрастную динамику, что необходимо учитывать при оценке обеспеченности организма минеральными веществами.

В целом результаты опыта свидетельствуют о том, что оптимизация аминокислотного питания помесных свиней в период их интенсивного выращивания и откорма оказала положительное влияние на их интенсивность роста и эффективность использования питательных веществ корма. Полученные в эксперименте данные свидетельствуют о наличии связи между уровнем аминокислотного питания и обменом ряда минеральных веществ. Эти результаты

исследований необходимо учитывать в дальнейшей работе при совершенствовании системы питания свиней в условиях промышленной технологии производства свинины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кокорев В.А. Биологическое обоснование потребности супоросных свиноматок в макроэлементах. Саранск, 1990:172 с.
2. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность и метаболизм минеральных веществ у молодняка свиней. Автореф. дисс...д.б.н., Боровск, 1989:37 с.
3. Потребность свиней в питательных веществах (перевод с англ.). Национальный исследовательский совет. Киев, 1991:95 с.
4. Слесарев И.К., Пилук Н.В. Минеральные источники Беларуси для животноводства. Жодино-Минск, 1995:176 с.
5. Mahan D.S. Mineral nutrition of the sow: a review. J.Anim. Sci., 1990, 68: 537-582.
6. Методы биохимического анализа. Боровск, 1997: 111-143.
7. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. и др. Методические указания по изучению минерального обмена у с.-х. животных. Боровск, 1988: 103 с.
8. Кузнецов С.Г., Батаева А.П., Пустовой В.В. Минеральный состав тела молодняка свиней разного возраста. Бюл. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1991, 1(100): 45-51.
9. Афонский С.И. Биохимия животных. М., 1964: 450 с.
10. Кузнецов С.Г. Физиолого-биохимическое обоснование системы минерального питания молочных коров. Сб. науч. тр. ВНИИФБиП с.-х. жив-х. Боровск, 1999, 38 : 418-450.
11. Кокорев В.А., Гурьянов А.М., Тихомирова Г.С. Обмен марганца в организме свиней и потребность в нем молодняка. Сельхоз. биология, 1992, 4 : 56-65.
12. Коломийцева М.Г., Смоляр В.И., Артамонов В.С. Влияние меди на фосфорно-кальциевый обмен в эксперименте и клинике. В кн.: Биологическая роль меди. М., 1970.
13. Батаева А.П., Кальницкий Б.Д., Цветкова Н.Я. Обмен и депонирование основных макро и микроэлементов в организме поросят при раннем отъеме. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск, 1980, 24 :139-150.
14. Батаева А.П. Влияние цинка, меди, кобальта и железа на их обмен и депонирование в организме растущих свиней. Автореф. дисс ... к.б.н., Боровск, 1970: 17 с.
15. Григорьев В.В. Использование свиньями кальция и фосфора из рационов в зависимости от обеспеченности их аминокислотами. Межд. симпозиум: Аминокислоты в животноводстве. Тезисы докладов ВНИИФБиП. Калуга, 1971: 89 с.
16. Кальницкий Б.Д., Кузнецов С.Г., Батаева А.П. Влияние уровня и источника марганца в рационе на активность металлоэнзимов, усвоение и распределение минеральных веществ в организме поросят. Сб. науч. тр. ВНИИФБиП. Боровск, 1986, 32 : 141-154.

**ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ ЖИРА И ОБМЕННОЙ ЭНЕРГИИ В
РАЦИОНЕ НА А И Е - ВИТАМИННУЮ ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ПОРОСЯТ
В ПЕРИОД ВЫРАЩИВАНИЯ И ОТКОРМА**

Т.Е. Рябых, Н.С. Ниязов, А.М. Соловьев
Лаборатория биологически активных веществ

Повышение на 5% уровня обменной энергии в рационе поросят за счет добавок кормового жира, по сравнению с технологическим комбикормом СКЗ, улучшает обеспеченность их организма витаминами А и Е. Повышение уровня энергии на 10% за счет кормового жира оказалось не эффективным по приросту, живой массе и обеспеченности витаминами А и Е.

Введение

Исследования, проведенные у нас в стране и за рубежом, показали, что балансирование уровня энергии в рационах за счет добавок кормовых жиров оказывает положительное влияние на эффективность использования корма и продуктивность животных. Положительный эффект использования жиров в кормлении отмечали Сотская (1973), Тищенко и др. (1973), Черная (1989), Burke (1973), Kramr (1974). В опытах других авторов этого не наблюдалось (Кучерова и др., (1973); Архипов 1974; Hartfiel (1972), а Старикова (1973) и Шадрин (1974) отмечали отрицательный результат.

Однако в целом результаты этих исследований указывают на целесообразность балансирования энергии рационов с помощью жировых добавок, что свидетельствует о необходимости изучения их влияния на обмен веществ, и особенно на обеспеченность жирорастворимыми витаминами.

Материал и методы

Опыты проводили на 3-х группах поросят 3-породных помесей (крупная белая × ландрас × дюрок) в возрасте 65 дней по 12 голов в группе. Группы формировали по принципу аналогов. Содержали поросят в клетках по 3-4 головы в каждой. Кормили два раза, остатки корма собирали один раз в сутки. Поили вволю из автопоилок. Животные всех групп получали полнорационный комбикорм с одинаковым уровнем протеина. Минеральный и витаминный состав соответствовал нормам потребности. Уровень обменной энергии повышали за счет кормового жира животного происхождения. Первая группа служила

контролем, а вторая и третья опытные группы получали повышенный на 5 и на 10% уровень обменной энергии, соответственно. Контрольный убой поросят проводили в конце каждого опытного периода, по 4 головы из каждой группы.

Таблица 1. Компонентный состав и питательность комбикормов

Компоненты и показатели питательности	Выращивание			Откорм		
	1-я (контроль)	2-я (опыт) 5%	3-я (опыт) 10%	1-я (контроль)	2-я (опыт) 5%	3-я (опыт) 10%
<i>Состав комбикормов, %</i>						
Кукуруза	12,0	24,2	35,0	10,0	15,0	20,0
Пшеница	10,5	11,1	11,0	10,0	10,0	10,0
Ячмень	38,2	23,2	10,2	50,0	43,3	36,5
Шрот соевый	15,0	15,0	15,5	8,0	8,2	8,5
Шрот подсолнечниковый	4,0	5,0	5,5	5,0	5,0	5,0
Мука рыбная	5,0	5,1	5,5	2,0	2,0	2,0
Молоко регенерированное	7,0	7,0	7,0	—	—	—
Отруби пшеничные	3,0	3,0	2,8	12,0	12,0	12,0
Жир кормовой	2,5	3,6	4,7	—	1,5	3,0
Трикальцийфосфат	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Мел кормовой	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
Соль кормовая	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
Премикс КС-3	0,5	0,5	0,5	—	—	—
Премикс КС-4	—	—	—	1,0	1,0	1,0
<i>Питательность комбикормов</i>						
Кормовые единицы, кг	1,17	1,22	1,28	1,11	1,17	1,22
Обменная энергия, МДж	12,9	13,5	14,2	12,1	12,7	13,3
Сухое вещество, г	914	914	915	900	903	905
Конц. обмен. энергии, МДж	14,11	14,77	15,52	13,44	14,06	14,70
Сырой протеин, г	179,4	178,3	179,2	152,7	150,9	154,6
Сырая клетчатка, г	34,3	32,3	29,5	47,0	45,7	44,8
Сырой жир, г	43,4	54,5	64,9	32,4	41,1	58,3
Кальций, г	12,1	12,3	12,0	8,0	8,0	7,99
Фосфор, г	7,3	7,1	7,2	7,1	7,1	7,26
Лизин, г	9,3	9,1	9,0	6,51	6,41	6,39
Метионин + цистин, г	6,5	6,4	6,3	5,1	5,06	5,03
Сахар, г	24,1	27,5	31,0	20,0	21,5	23,0
Витамин А, тыс. МЕ	8,0	8,0	8,0	6,0	6,0	6,0
Витамин Е, мг	50,0	50,0	50,0	22,0	22,0	22,0

Результаты и обсуждение

При изучении влияния различных уровней жира в рационе на содержание витаминов А и Е в плазме крови поросят в период выращивания и откорма установлено (табл. 2), что в период выращивания наибольший уровень витамина А в плазме крови отмечался во 2-й опытной группе с 5 % повышением обменной энергии

за счет кормового жира (на 4 %), а низкий – в 3-й группе (на 6 %) по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние разных уровней жира и обменной энергии в рационе на концентрацию витаминов А и Е в плазме крови свиней в период выращивания и откорма

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	ретинол, мкг/мл		альфа-токоферол, мкг/мл	
1	0,392 ±0,047	0,455 ±0,029	4,68 ±0,284	5,56 ±0,340
2	0,408 ±0,031	0,469 ±0,024	5,35 ±0,134	5,93 ±0,471
3	0,368 ±0,008	0,484 ±0,038	4,65 ±0,403	5,54 ±0,376

В период откорма положительный эффект от введения в рацион дополнительной энергии за счет кормового жира проявился в повышении концентрации ретинола во 2-й и 3-й группах на 3,1 % и 6,4 %, соответственно, по сравнению с контролем. В возрастном аспекте отмечена тенденция увеличения ретинола в плазме крови свиней.

Изменения в уровне альфа-токоферола в плазме крови в период выращивания имели аналогичную направленность. Уровень его во 2-й опытной группе превышал контроль на 14 %, а в 3-й группе был практически одинаковым с ним. В период откорма уровень альфа-токоферола повторял ту же направленность изменений, которая наблюдалась в период выращивания, но по относительным показателям был выше.

Определение уровня ретинола в печени поросят в период выращивания и откорма показало (табл. 3), что усвоение витамина А находилось в определенной зависимости от усвоения жира и обменной энергии и рационе.

Таблица 3. Влияние различных уровней жира и обменной энергии в рационе на содержание ретинола в печени свиней разного возраста

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/орган	мкг/г	мг/орган
1	113,17 ±12,7	120,18 ±13,58	209,78 ±19,98	402,64 ±29,14
2	121,95 ±7,24	127,35 ±9,47	276,06 ±20,84	481,47 ±46,14
3	128,51 ±5,20	130,58 ±10,18	308,84* ±18,46	456,52 ±41,29

Примечание: * P ≤ 0,05

В период выращивания в опытных группах концентрация ретинола в печени в оба периода была выше контроля на 7,8 % (2-я

группа) и на 13,6 % (3-я группа), и в период откорма на 31,6 % (2-я группа) и на 47,2 % (3-я группа). Тотальное содержание ретинола в печени имело сходную направленность изменений с концентрацией витамина в органе. Аналогичные изменения отмечены и по содержанию витамина А в печени в период откорма. Однако лучшая обеспеченность печени витамином А отмечена во 2-й группе (19,6 %). За период откорма содержание ретинола в печени увеличилось более чем в 3 раза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что повышение энергии в рационе на 10 % за счет добавки кормового жира не способствовало большему накоплению ретинола в печени по сравнению с группой, где количество внесенного жира было в 2 раза меньше. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей (Крюкова (1959), Сень (1965), Уласевич (1970), Двинская (1972; 1973), Steger *et.al.* (1965), Wiss *et.al.* (1965), Harmon (1966)). Четкой закономерности в изменениях концентрации ретинола в плазме крови и в печени не установлено. Эти материалы подтверждают мнение ряда исследователей о том, что концентрация ретинола в плазме крови не отражает его содержания в печени (Brackkann, 1963; Silke. *et.al.* 1967).

Данные по содержанию альфа-токоферола в печени показали, что повышенный энергетический уровень в рационе не способствовал увеличению накопления этого витамина в опытных группах (табл. 4).

Таблица 4. Влияние разных уровней жира и обменной энергии в рационе на содержание альфа-токоферола в печени свиней

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/орган	мкг/г	мг/орган
1	12,82 ±1,54	14,20 ±2,94	13,11 ±0,45	25,77 ±3,47
2	13,57 ±0,685	14,17 ±0,923	11,34 ±0,58	19,82 ±1,21
3	12,96 ±1,02	13,09 ±1,30	10,72 ±0,21	15,98 ±1,80

В период выращивания наибольшая концентрация витамина отмечена во 2-й группе (на 6 % выше по сравнению с контролем). Что касается общего содержания альфа-токоферола в печени, то в контрольной и 2-й группах оно было практически одинаковым, а в 3-й группе накопление альфа-токоферола снизилось на 7,8 %.

В период окорма наблюдалось снижение концентрации альфа-токоферола в опытных группах на 16,5-17,0 % и незначительное увеличение в контрольной группе на 2,2 % по сравнению с уровнем альфа-токоферола в предыдущем возрастном периоде. В этом возрасте

наименьший уровень альфа-токоферола отмечен в опытных группах, а общее его содержание в печени повторяло эту направленность.

Таким образом, повышенный энергетический уровень рациона не оказал положительного влияния на накопление альфа-токоферола в печени.

Анализ содержания витамина А в жировой ткани свиней показал (табл. 5), что повышение уровня энергии в рационе не сказалось на накоплении витамина А. В период выращивания отмечено увеличение концентрации витамина А в опытных группах на 4,5 % и 6,8 % (2-я и 3-я группы соответственно) по сравнению с контролем.

Таблица 5. Содержание ретинола в жировой ткани свиней в зависимости от уровня жира и обменной энергии в рационе

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/полутуша	мкг/г	мг/полутуша
1	0,176 ±0,040	0,259 ±0,052	0,179 ±0,013	1,39 ±0,101
2	0,184 ±0,040	0,346 ±0,055	0,188 ±0,022	1,80 ±0,210
3	0,188 ±0,011	0,334 ±0,111	0,183 ±0,014	1,62 ±0,124

В период откорма тенденция повышения уровня ретинола в опытных группах сохранялась. Наибольшая обогащенность жировой ткани витамином А отмечена во 2-й опытной группе.

Аналогичные изменения, проявившиеся в отношении уровня ретинола в жировой ткани, имели место и по содержанию альфа-токоферола. В период выращивания в опытных группах отмечено лишь некоторое повышение его уровня по сравнению с контролем, но разница недостоверна. Тотальное содержание повторяло направленность изменений концентрации альфа-токоферола в жировой ткани (табл. 6).

Таблица 6. Содержание альфа-токоферола в жировой ткани свиней в зависимости от уровня жира и обменной энергии в рационе

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/полутуша	мкг/г	мг/полутуша
1	4,91 ±0,143	7,32 ±2,39	3,99 ±0,36	30,96 ±2,79
2	5,32 ±0,287	9,98 ±2,28	4,24 ±0,19	40,58 ±1,82
3	5,08 ±0,119	10,68 ±3,44	4,01 ±0,29	35,57 ±2,57

В период откорма отмечалось некоторое снижение уровня витамина по сравнению с периодом выращивания. Наибольшая

обогащенность жировой ткани альфа-токоферолом была во 2-й опытной группе, что обусловлено не только повышением концентрации, но и большим отложением жира в организме свиней.

Как видно из данных, представленных в таблицах 2 и 6, определенной количественной зависимости между уровнем альфа-токоферола в плазме крови и содержанием в жировой ткани, в связи с увеличением обменной энергии в рационе за счет добавок кормового жира, не установлено. Следует отметить, что в жировой ткани откладывается до 40% альфа-токоферола от содержания его в печени, поэтому одновременное определение его в печени и жировой ткани дает более полное представление о Е-витаминной обеспеченности животных.

Результаты приведенных исследований свидетельствуют о том, что наблюдается тенденция лучшей обеспеченности жировой ткани витаминами А и Е при 5 % увеличении обменной энергии (2-я группа), по сравнению с технологическим комбикормом СК, применяемым в промышленных комплексах.

Положительное влияние повышенного уровня обменной энергии отразилось и на уровне ретинола в мышечной ткани (табл. 7).

Таблица 7. Содержание витамина А в мышечной ткани свиней в зависимости от уровня жира и обменной энергии в рационе

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/полутуша	мкг/г	мг/полутуша
1	0,300 ±0,006	2,12 ±0,185	0,278 ±0,010	5,52 ±0,199
2	0,315 ±0,009	2,47 ±0,294	0,283 ±0,013	6,37 ±0,292
3	0,318 ±0,009	2,28 ±0,245	0,280 ±0,010	4,55* ±0,163

Примечание: * $P \leq 0,05$

В период выращивания концентрация ретинола в опытных группах на 5 % и на 6 % превышала данный показатель в контрольной группе. В период откорма тенденция изменений сохранилась. По данным обвалки лучший выход мышечной массы имели животные 2-й группы, в связи с этим и общее содержание витаминов в этой группе было выше. В 3-й группе отмечено низкое накопление ретинола в мышечной ткани ($P \leq 0,05$), что объясняется и меньшим её образованием у животных данной группы.

Изучение влияния различных уровней жира и, соответственно, обменной энергии в рационе свиней на содержание витамина Е в мышечной ткани показало (табл. 8), что концентрация его возрастала с повышением обменной энергии в рационе. Уровень альфа-токоферола в опытных группах в период выращивания превышал на 7,3 % и 9,3 %

контрольную группу. В период откорма концентрация альфа-токоферола в мышечной ткани контрольной и 2-й опытной групп была одинаковой, а в 3-й группе отмечено понижение его концентрации ($P \leq 0,05$).

Таблица 8. Содержание витамина Е в мышечной ткани свиней в зависимости от уровня жира и обменной энергии в рационе

Группы	Возраст, дней			
	107		204	
	мкг/г	мг/полутуша	мкг/г	мг/полутуша
1	0,900 $\pm$ 0,018	6,36 $\pm$ 0,619	0,913 $\pm$ 0,034	18,14 $\pm$ 0,676
2	0,966 $\pm$ 0,036	7,58 $\pm$ 0,901	0,913 $\pm$ 0,034	20,54 $\pm$ 0,765
3	0,984 $\pm$ 0,018	7,05 $\pm$ 0,702	0,860* $\pm$ 0,032	13,98** $\pm$ 0,520

Примечание: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,02$

Заключение

Представленные материалы указывают на то, что используемые в качестве энергетических добавок жиры оказывают определенное влияние на обеспеченность организма поросят жирорастворимыми витаминами. По комплексу показателей: динамике роста, эффективности использования питательных веществ корма, оплате корма привесами и витаминной (А и Е) обеспеченности свиней лучшие условия обеспечиваются при повышении уровня обменной энергии рациона на 5 %.

Увеличение содержания витамина А в печени и витаминов А и Е в жировой и мышечной ткани в период откорма свиней во 2-й опытной группе объясняется, вероятно, оптимальным уровнем энергии, содержащейся в рационе. Поскольку поступление витаминов А и Е с жиром было незначительным: в период выращивания отмечено увеличение всего лишь на 0,05 % и 0,1 % витамина А и на 0,11 % и 0,22 % альфа-токоферола в опытных группах, а в период откорма потребление витамина А возросло на 0,08 % и 0,16 % (2-я и 3-я опытные группы соответственно), альфа-токоферола на 0,3 % и 0,6 %, считаем, что такое увеличение не могло оказать существенного влияния на содержание витаминов А и Е в органах и тканях животных опытных групп. Более благоприятное влияние на обеспеченность поросят витаминами А и Е в печени, жировой и мышечной ткани оказало включение кормового жира в рацион в период выращивания 3,6 % и в период откорма – 1,5 %, что обеспечивало повышение уровня обменной энергии на 5 %. Увеличение обменной энергии рациона на 10

% за счет кормового жира было неэффективно по приросту живой массы, использованию корма и обеспеченности витаминами А и Е.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов А.В. Особенности липидного и фосфолипидного обмена у кур в зависимости от уровня жира в рационе. В кн.: Липидный обмен у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1974: 301-309.
2. Двинская Л.М., Бритарева Р.С. Влияние окисленных жиров рациона на обеспеченность цыплят жирорастворимыми витаминами. Бюлл. ВНИИФ-БиП с.-х. животных, Боровск, 1972, 2: 27-29.
3. Двинская Л.М. Влияние антиокислителей на А и Е- витаминную обеспеченность цыплят-бройлеров при высоких уровнях жира в рационе. В кн.: Витаминное питание с.-х. животных. М.: Колос, 1973: 342-349.
4. Крюкова Л.В. О характере действия витамина Е на обмен витамина А у белых крыс. В сб.: Вопросы витаминологии, Барнаул, 1959-1960: 183-187.
5. Кучерова Р.И., Куцак С.Н. Изучение различного энерго-протеинового отношения в рационах кур 288 и 444 в условиях БССР. В кн.: Физиолого-биохимические и генетические основы повышения эффективности использования кормов в животноводстве (птицеводстве). Боровск, 1973: 11-12.
6. Сень И.П. Развитие клинико-морфологических признаков Е-витаминной недостаточности у белых крыс при питании качественно различным жиром. Вопросы питания, 1965, 24: 41-49.
7. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение альфа-токоферола и ретинола в плазме крови с.-х. животных методом микроколоночной ВЖХ. Сельхоз. биология, 1989, 4: 127-129.
8. Скурихин В.Н., Шабаетов С.В. Методы анализа витаминов А, Е, D и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М.: Химия, 1996.
9. Сотская А., Владимиров Л. Влияние разных жировых добавок на рост цыплят и оплату корма. Доклады ТСХА, 1973, 191: 75-80.
10. Старикова Н.П. Влияние окисленного жира и антиоксидантов на воспроизводительные функции животных. Тр. Дальневосточного НИИСХ, 1973, 13, 2: 358.
11. Тищенко А.Н., Родин И.А., Ирушкин И.И. Влияние различных уровней протеина и обменной энергии на обмен и использование питательных веществ у бройлеров в клетках. В кн.: Физиолого-биохимические и генетические основы повышения эффективности использования кормов в животноводстве (птицеводстве). Боровск, 1973: 16-17.
12. Уласевич Т.П. Влияние добавок технического жира в рационы бройлеров на потребность в витамине Е. Сб. работ молодых ученых ВНИТИП, Загорск, 1970, 11: 257-263.
13. Черная М.И. Продуктивность помесного и гибридного молодняка свиней при интенсивном откорме в зависимости от обеспеченности энергией, протеином и лизином. Автореферат, Киев, 1989.

14. Шадрин Н.В. Условия эффективного использования технического жира, витамина Е и витаминов группы В при мясном откорме свиней. Автореферат канд. дисс. М.: 1974.
15. Brackkan O.R. Vitamin A status of young chicks during absorption and depic-tion different single doses. Internat. Z. Vitaminforsch., 1963, 33, 2: 154-157.
16. Bürke R.P. Verbesserte Fishmehlgustität Stabilisierung mit santoquin. I. Einfluss der stabilisierung aug die Hitseschädigung von Fischmehl Während der Lagerung. Kragfutter, 1965, 48: 677-684.
17. Harmon E.M., Witting Z.A. Horwitt M.K. Relative rates of depletion of α -tocopherol and linoleic acid after feeding polyunsaturated fats. Amer. J. Clin. Nutr., 1966, 18, 4: 243-248.
18. Haftfiel W. Beitrag zur Ätiologie der Fettleberbeim fluha. Zeitschr. fur Fierphysiel. tierernähr. und Futtermittelkunde, 1972, 30, 3: 157.
19. Kramp J., Brautz H. Fierkörperfett aus Mischfutterkomponente. Getreidewirtschaft, 1974, 8, 2: 39-42.
20. Silko M.R., Barnhard C.E. Vitamin A requirement of the gestating and lactating sow. J. Animal Sci., 1967, 26, 4: 459-463.
21. Steger H., Piatkowaki B. Ernährungstudien an kälbern. 1. Mitt. Vergleichende Untersuchungen über der Eincatz von Dortschleberel verschiedener Gewinnung auf den vitamin A und Fettstoff wechsl von Kalbern. Arch. Fierernährung, 1965, 15, 4: 269-276.
22. Wiss O. Gloor U. Vitamin A and lipid metabolism. Vitamins and flormones, 1960, 18: 485.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГИПОФИЗА И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПОРОСЯТ ПРИ ВВЕДЕНИИ СВИНОМАТКАМ РАЗЛИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СЕЛЕНА

О. Б. Брускова

Кабинет морфологических исследований

Введение селенита натрия в дозе 0,2 мг Se/кг корма в селенодефицитный рацион супоросных и подсосных маток и подкожные инъекции пролонгированной формы селенопирана в период покрытия и за 8-12 суток до опороса (в дозе 280 мг и 135 мг Se/голову в расчете на чистый элемент), обеспечивает их потомству повышение функциональной активности клеток аденогипофиза и щитовидной железы. Число ацидофилов (соматотрофов) достоверно увеличилось с $14,7 \pm 0,6$ у контрольных до $17,4 \pm 0,2$ у подопытных поросят. В щитовидной железе наблюдалось усиление резорбции коллоида, что указывает на положительное влияние препаратов селена, при использовании их в антенатальный период, и на повышение

постнатальной устойчивости к неблагоприятным условиям среды и рождение более крупного и выносливого потомства.

Введение

При организации питания животных важная роль отводится минеральным веществам, в том числе селену. Дефицит этого элемента в кормах вызывает нарушения в обмене белков, жиров, углеводов и приводит к возникновению заболеваний. Особенно страдают из-за недостатка селена интенсивно растущие и беременные животные. Не менее опасен для организма и избыток селена в рационе, при котором наблюдаются хронические или острые отравления в результате блокирования SH-групп и нарушения синтеза ряда аминокислот (Behne, 1988; Bellomo, 1991).

Биологическая роль селена окончательно не выяснена, однако данные о его распределении в органах, клетках и в составе ферментов позволяют считать, что этот элемент обеспечивает функциональную активность антиоксидантной, иммунной и детоксицирующей систем организма. По этой причине в последние годы ведется активный поиск новых препаратов селена. К их числу относится органическое соединение селенопиран. Влияние пролонгированных форм этого препарата практически не изучалось.

Исходя из вышеизложенного, задачей исследований было изучение морфофункционального состояния гипофиза и щитовидной железы у поросят при использовании свиноматками различных соединений селена.

Материал и методы

Исследования проведены в виварии института на 15 свиноматках крупной белой породы по второму опоросу и их потомстве. Все свиноматки содержались в одинаковых условиях и получали основной рацион согласно рекомендациям (Калашников, 1985). В 1 кг корма содержалось 0,055 мг селена (1-я группа). Подкормку селенитом натрия в дозе 0,2 мг Se/кг корма начали после покрытия маток и продолжали до отъема в возрасте 28 суток (2-я группа). Масляный раствор пролонгированной формы селенопирана вводили подкожно в дозе 280 мг Se/голову при постановке на опыт и в дозе 135 мг Se/голову за 10 суток до опороса в расчете на чистый элемент (3-я группа). Поросята от свиноматок 1-й и 2-й групп добавок селена не получали, а поросятам 3-й группы был подкожно введен масляный раствор селенопирана в дозе 14 мг/голову в первые сутки жизни.

По окончании опыта был проведен убой животных и взяты образцы гипофиза и щитовидной железы для морфологических исследований от новорожденных и 28-дневных поросят по 4 головы из каждой группы. Материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (рН 7,4), жидкости Буэна, Корнуа и заливали в парафин. Срезы окрашивали по Акимченкову, дифференцированное окрашивание клеток гипофиза проводили по Хальми-Дыбану. В щитовидной железе с помощью окуляр-микрометра измеряли внутренний диаметр 50 фолликулов и высоту тиреоцитов.

Для электронной микроскопии образцы фиксировали в четырех-окиси осмия, заливали в смесь эпоксидных смол, изготавливали срезы на ультратоме и просматривали в электронном микроскопе ЭМ-100к.

Цифровой материал обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Гипофиз. У новорожденных поросят основная масса клеток была представлена ацидофилами (табл. 1). При изучении ультраструктуры клеток установлено, что они относятся к соматотрофам, которые вырабатывают гормон роста. Эти клетки были округлой формы и сравнительно небольших размеров. Плазматическая мембрана соматотрофов имела ровные контуры, мембраны соседних клеток были расположены параллельно друг другу и разделены межклеточной щелью. Сомато-трофы контактировали друг с другом и с тиреотрофами. Главной отличительной чертой соматотрофов является наличие в их цитоплазме крупных секреторных гранул диаметром до 300-600 нм. Количество гранул в соматотрофах варьировало, хотя большинство клеток содержали много гранул. Последние были расположены или равномерно по всей цитоплазме, или концентрировались на одном из полюсов и чаще всего на стороне клетки, прилежащей к перикапиллярному пространству. В некоторых соматотрофах гранулы располагались в один или несколько рядов. Ядро округлой формы располагалось в центре клетки или несколько эксцентрично. В цитоплазме соматотрофов находилось большое количество органелл: гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии, комплекс Гольджи. Лизосомы встречались редко.

В аденогипофизе интактных половозрелых животных соматотрофы находятся в различном функциональном состоянии, однако большинство клеток заполнено секреторными гранулами и содержат слабо развитый эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи. У молодых растущих животных эти клетки находятся в более активном функциональном состоянии, которое характеризуется низким содержанием секреторных гранул, увеличенным количеством элементов грану-

лярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи (Sasaki et al., 1988).

Прямым доказательством причастности соматотрофов к продукции СТГ является их положительная реакция с антисывороткой на СТГ, меченной флуорохромами или пероксидазой (Moriarty, 1973). Кроме того, было показано, что высокая активность СТГ определяется во фракции секреторных гранул диаметром 370-470 нм, характерных только для соматотрофов (Nakayama et al., 1973; Shirosawa et al., 1985).

Таблица 1. Изменение клеточного состава аденогипофиза поросят при введении свиноматкам разных препаратов селена (ср. число/поле зрения)

Группа животных	Возраст	Тип клеток		
		ацидофилы	базофилы	хромофобы
1-я	новорожденные	14,7±0,6	5,1±0,02	3,7±0,01
	28 дней	19,1±0,7	3,1±0,07	2,1±0,04
2-я	новорожденные	17,0±0,3*	5,1±0,05	2,5±0,04
	28 дней	19,0±0,1	4,1±0,06	2,0±0,01
3-я	новорожденные	17,4±0,2*	5,4±0,01	2,5±0,08
	28 дней	7,3±0,3	5,6±0,05	2,6±0,04

- - здесь и далее $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Применение селенита натрия и селенопирана свиноматкам в период супоросности и 28 суток лактации привело к повышению числа соматотрофов в гипофизе новорожденных поросят (на 16 и 18% соответственно по сравнению с 1-й группой). Кроме того, изменялась функциональная активность соматотрофов: наблюдалось усиленное выведение секреторных гранул в перикапиллярное пространство (рис. 1), а также расширение гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи (рис. 2, 3). Несмотря на интенсивное выведение секреторных гранул, число их в соматотрофах подопытных поросят существенно не отличалось от контрольных животных. Это может свидетельствовать о том, что препараты селена стимулируют не только экструдицию секреторных гранул, но и их синтез. У 28-суточных поросят число и функциональная активность соматотрофов не отличались от контрольных животных.

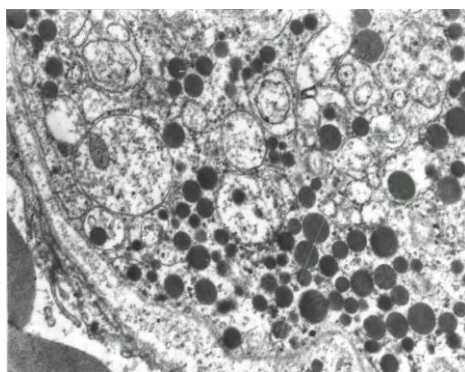


Рис. 1. Ультраструктура гипофиза новорожденного поросенка. Опыт. Усиленное выделение секреторных гранул из соматотрофов в перикапиллярное пространство, $\times 14000$.

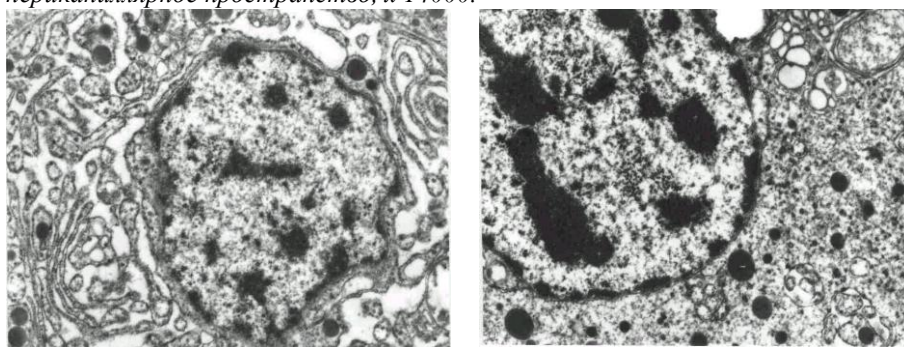


Рис. 2, 3. Ультраструктура гипофиза новорожденного поросенка. Опыт. Расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи в соматотрофах свидетельствуют о стимуляции синтеза и выведения секреторных гранул под влиянием препаратов селена. $\times 14.000$.

Базофилы или тиреотрофы имели полигональную или отростчатую форму и большие размеры. Расположены они были диффузно по всей железе вблизи капилляров, однако в центральной зоне аденогипофиза поросят они встречались наиболее часто. В цитоплазме тиреотрофов определялась отчетливая грануляция, которая окрашивалась альдегид-фуксином, альциановым синим и давала слабую ШИК—положительную реакцию. Количество тиреотрофов было сравнительно невелико и составляло около 4% общего числа клеток аденогипофиза. При изучении ультраструктуры было установлено, что характерной особенностью этих клеток является наличие в их цитоплазме секреторных гранул диаметром от 100 до 250 нм, которые располагались преимущественно вблизи плазматической мембраны. В цитоплазме тиреотрофов был хорошо развит комплекс Гольджи, он занимал околядерную зону и состоял из вакуолей и

микropузырьков. Митохондрии имели палочковидную форму. Лизосомы встречались редко.

Тиреотрофы синтезируют ТТГ, что показано с помощью иммуноцитохимических методов (Nakane, 1970). Секреция тиреотропного гормона в аденогипофизе зависит от уровня тиреоидных гормонов в циркулирующей крови. Введение животным тироксина вызывает постепенную инволюцию тиреотрофов, которая происходит параллельно снижению ТТГ в аденогипофизе, число базофилов при этом значительно снижается (Imura, 1985). При изучении ультраструктуры тиреотрофов было установлено, что эти клетки тесно контактировали с соматотрофами, поэтому, учитывая данные о том, что ТТГ может усиливать выведение секреторных гранул из ацидофилов (Гордиенко, Козырицкий, 1978), можно предположить, что препараты селена активируют как сомато-, так и тиреотрофы в аденогипофизе подопытных поросят. В передней доле гипофиза, помимо дифференцированных аденоцитов, специализированных для продукции определенного гипофизарного гормона, тропного к соответствующей периферической эндокринной железе, существует пул камбиальных, недифференцированных, так называемых хромофобных клеток, способных в определенных ситуациях дифференцироваться в любой основной тип аденоцитов.

Хромофобные клетки были расположены диффузно по всему аденогипофизу, они отличались небольшими размерами и имели длинные цитоплазматические отростки, которые проникали между соседними гранулированными аденоцитами и достигали перикапиллярного пространства. Нередко группа клеток образовывала замкнутый фолликул, в полости которого обнаруживалось коллоидоподобное вещество. По мнению Kurosuni (1968), эти образования правильнее называть псевдофолликулами, так как в отличие от истинных фолликулов они выстланы базальной мембраной. В цитоплазме хромофобных клеток содержалось небольшое количество митохондрий, слабо развитый комплекс Гольджи, немногочисленные вакуоли эндоплазматической сети, большое число свободных рибосом, собранных в полисомные группы и единичные лизосомоподобные тельца. У подопытных новорожденных и 28-суточных поросят не было выявлено изменений в ультраструктуре хромофобов, число их также не имело существенных различий, что свидетельствует об отсутствии структурных нарушений в аденогипофизе при использовании препаратов селена.

Установлено, что при интраперитонеальном введении ^{75}Se -селено-метионина содержание селена в аденогипофизе было наивысшим по сравнению с другими эндокринными железами и достигало $7,6 \pm 1,8$ мг/г живой массы, что в 2 раза выше, чем в щитовидной железе и надпочечниках. Высокое содержание селена в аденогипофизе обу-

словлено тем, что секреторные гранулы аденоцитов содержат большое количество серосодержащих белков, а метаболизм серы и селена имеет много общего и поэтому селен может замещать серу в белках. Учитывая важную роль этих белков в секреции гипофизарных гормонов можно считать, что увеличение их содержания в аденоцитах обеспечивает более высокую секрецию гормона роста (Levander, 1976).

Campbell, Combs (1987) установили, что у свиноматок, получавших селенообогащенный рацион, селен влиял на функциональную деятельность щитовидной железы, обеспечивая нормальную деятельность гипофиза, и повышал сохранность эмбрионов за счет снижения негативных последствий стресса, возникающего под влиянием внешних воздействий – физических или нервных раздражителей на ранних стадиях беременности, что согласуется с результатами наших исследований.

Щитовидная железа. Фолликулярные эпителиальные клетки (тиреоциты) составляли основную массу паренхимы и формировали главную структурную единицу щитовидной железы – фолликулы. Последние представляли собой округлые или слегка овальные пузырьки, тесно прилежащие друг к другу. Между фолликулами располагались прослойки соединительной ткани, пронизанные многочисленными капиллярами (рис.4).

При изучении ультраструктуры щитовидной железы было установлено, что просвет фолликула был заполнен коллоидом, который непосредственно прилегал к апикальной поверхности тироцита, а базальная его часть тесно контактировала с перикапиллярным пространством. На апикальной поверхности тироцитов обнаруживались многочисленные микроворсинки, образованные выступами плазматической мембраны (рис. 5). Мембрана этой части тироцита содержит ферменты – пероксидазу, аминопептидазу и обладает способностью генерировать перекись водорода, необходимую для биосинтеза тиреоидных гормонов (Kvikalas et al., 1995). В базальном отделе клетки плазматическая мембрана тироцита образует глубокие впячивания (складки), что значительно увеличивает ее поверхность, контактирующую с кровеносным капилляром. Базальная часть мембраны тироцита содержит Na, K — АТФ-азы и рецепторы к ТТГ (Colzani et al., 1999). Ядро тироцитов округлой или овальной формы располагалось в базальной части клетки. В цитоплазме особенно сильного развития достигала гранулярная эндоплазматическая сеть. Она была представлена многочисленными канальцами и более крупными полостями, заполненными гомогенным мелкозернистым материалом. Митохондрии тироцитов обнаруживали отчетливую топографическую связь с гранулярной эндоплазматической сетью. Тесные контакты этих органелл необходимы для выполнения специфических функций тироцитов.

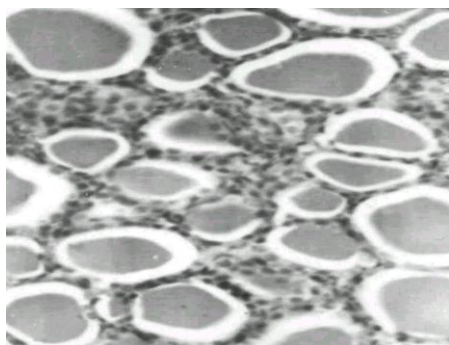


Рис. 4. Щитовидная железа новорожденного поросенка. Контроль. Мелкие фолликулы содержат в просвете темно-красный коллоид. Окраска по Акимченкову. $\times 160$.

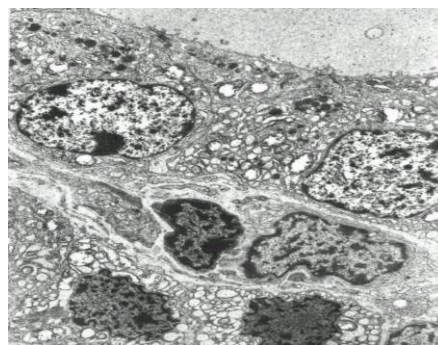


Рис. 5. Ультраструктура щитовидной железы 28 - дневного поросенка. Контроль. На апикальной поверхности тиреоцитов расположены микроворсинки. В базальной части тиреоциты контактируют с многочисленными капиллярами. $\times 7000$.

Комплекс Гольджи был хорошо выражен и представлен тремя основными компонентами: крупными вакуолями, уплощенными цистернами и микропузырьками. Внутри комплекса Гольджи, а также вблизи его обнаруживалось варьировующее количество гранул различной величины, плотности и формы. Одни из них отличались высокой электронной плотностью, крупными размерами (0,2-1 мкм) и полиморфизмом. Они были окружены мембраной, тесно прилегающей к содержанию гранул. Подобные образования содержат кислую фосфатазу и их можно отнести к лизосомам (Nakai, Fukita, 1970; Дмитриева, 1973). В апикальной зоне тиреоцитов располагались гранулы диаметром 200-250 нм. Они не содержат кислую фосфатазу и, вероятно, являются секреторными гранулами (Горбунова, 1968). Методом электронной цитохимии показано, что апикальные гранулы содержат пероксидазу (Дмитриева и др. 1975). Кроме характерных гранул в апикальной части цитоплазмы тиреоцитов иногда выявлялись капли коллоида, при этом наблюдался тесный контакт коллоидных капель с апикальными гранулами, а иногда и с лизосомами.

У новорожденных подопытных поросят ультраструктура тиреоцитов была аналогична таковой у контрольных животных. На 28 сутки наблюдалось отчетливое увеличение числа секреторных гранул в тиреоцитах, усиление резорбции коллоида. При этом, наряду с микропиноцитозом захватывались крупные капли люминального коллоида с помощью псевдоподий. Одновременно с усилением процесса эндоцитоза коллоида из полости фолликулов усиливалось новообразование тиреоглобулина и ферментов, необходимых для его гидролиза. Последние

накапливались в лизосомах. Образовавшиеся в результате эндоцитоза капли коллоида постепенно перемещались к базальной части клетки. На различных этапах этого перемещения они были окружены апикальными гранулами и лизосомами. Часто наблюдался их тесный контакт и слияние. По мнению большинства исследователей (Nuner et al., 1982; Ruz et al., 1999) феномен слияния коллоидальных капель с лизосомами свидетельствует об участии ферментативного набора лизосом в расщеплении молекулы тироглобулина, в результате которого освобождаются тироксин и трийодтиронин. Появление коллоидных капель в цитоплазме тиреоцитов является результатом резорбции коллоида при стимуляции щитовидной железы под влиянием препаратов селена. Аналогичные данные были получены Войткевичем, Зензеровым (1968).

Применение как селенита натрия, так и селенопирана свиноматкам в период всего воспроизводительного цикла привело к структурным изменениям в щитовидной железе. Так, у 28-суточных поросят высота фолликулярного эпителия была выше на 20%, а диаметр на 65% меньше по сравнению с 1-й группой. Индекс Брауна (частное от деления внутреннего диаметра фолликула на высоту тиреоцита) также был ниже у подопытных поросят (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют об усилении резорбции коллоида и повышении функциональной активности тиреоцитов под влиянием препаратов селена.

У новорожденных и 28-суточных поросят 1-й группы щелочная фосфатаза выражена в коллоиде большинства фолликулов, на фоне которого несколько выделяются контуры стенки фолликулов и эндотелий капилляров. В щитовидной железе поросят 2 и 3-й групп наблюдалась высокая активность щелочной фосфатазы во всех элементах железы. Активность кислой фосфатазы у поросят контрольной группы была умеренно выражена. У новорожденных поросят 2 и 3-й групп наблюдалось увеличение активности кислой фосфатазы, достигающее максимума у 28-суточных поросят. Это происходило за счет хорошо выраженной реакции по всей цитоплазме тиреоцитов и в коллоиде.

Быков (1979) считает, что кислая и щелочная фосфатазы отражают уровень обмена в щитовидной железе и существует прямая зависимость между функциональным состоянием железы и их активностью. Гидролазы принимают активное участие в накоплении тироглобулина в просвете фолликула, расщеплении эндогенного белка, содержащего предшественник гормона и в его трансэндотелиальном транспорте, поэтому можно считать, что применение препаратов селена оказало положительное влияние на транспортно-синтетические функции и процессы йодирования гормонов в щитовидной железе.

Таблица 2. Морфологическая характеристика щитовидной железы поросят при использовании свиноматкам разных препаратов селена

Группа животных	Возраст	Показатели		
		высота тиреоцитов, мкм	внутренний диаметр фолликулов, мкм	индекс Брауна
1-я	новорожденные	9,9±0,3	64,8±2,3	6,5±0,2
	28 суток	11,3±0,6	81,0±4,7	7,3±0,6
2-я	новорожденные	9,3±0,6	63,2±5,9	6,8±0,4
	28 суток	14,0±0,5*	56,0±3,4*	4,0±0,2*
3-я	новорожденные	10,5±0,9	73,5±3,9	7,0±0,4
	28 суток	13,6±0,7*	56,3±3,0*	4,5±0,1

Установлено, что при дефиците селена в рационе у животных с недостатком или избытком йода, в щитовидной железе возникает воспаление, некроз и фиброз, при этом наблюдается компенсаторная пролиферация тиреоцитов (Contempre et al., 1995). Было выявлено (Colzani et al., 1999), что поступление с водой большого количества йода у беременных крыс при недостатке селена в рационе сопровождалось воспалением щитовидной железы у крысят. Считают, что при нормальном статусе селена воспаление и некрозы в щитовидной железе не возникают при избытке или недостатке йода.

Дефицит селена является кофактором в развитии миксематозного кретинизма при недостатке йода в рационе. Механизм данного явления заключается в том, что при дефиците йода образуется большое количество гидроперекисей, а селен удаляет свободные радикалы (Glatture, 1995).

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что введение свиноматкам в течение всего воспроизводительного цикла селенита натрия и селенопирана обусловило изменение клеточного состава гипофиза новорожденных поросят. Так, было отмечено, что число ацидофилов (соматотрофов) достоверно увеличивалось с 14,7±0,2 у контрольных до 17,4±0,2 у подопытных поросят ($P<0,05$). К 28-суточному возрасту эти изменения сглаживались и по числу соматотрофов подопытные поросята не отличались от контрольных животных. Были обнаружены отличия в ультраструктуре соматотрофов - у подопытных поросят отмечали усиленное выведение секреторных гранул в перикапиллярное пространство, при этом число секреторных гранул оставалось достаточно высоким, что свидетельствует о том, что препараты селена, введенные свиноматкам в период супоросности и лактации стимулировали в аденогипофизе поросят не только экструдию

секреторных гранул, но и их синтез. Содержание тиреотрофов и хромофобов в аденогипофизе поросят менялось незначительно, однако, функциональная активность тиреотрофов была несколько выше, по сравнению с контрольными поросятами.

Использование селена свиноматкам в период супоросности и лактации повысило функциональную активность клеток щитовидной железы поросят. При этом наблюдалась интенсивная резорбция коллоида тиреоцитами, диаметр фолликулов у 28-суточных поросят снизился с $81,0 \pm 4,7$ в контроле до $56,0 \pm 3,4$ мкм у подопытных поросят. Высота тиреоцитов, напротив, была выше у поросят 2-й и 3-й групп: $11,3 \pm 0,6$ в контроле против $14,0 \pm 0,5$ и $13,6 \pm 0,7$ мкм – у подопытных животных. Следует отметить, что повышение функциональной активности щитовидной железы поросят было в пределах физиологической нормы и свидетельствовало о высокой метаболической активности тиреоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Гистогенез и классификация элементов паренхимы щитовидной железы млекопитающих. Успехи современной биологии, 1979, 88,3:469-478.
2. Войткевич А.А., Зензеров В.С. Интрацеллюлярное образование тиреоидных фолликулов. Цитология, 1968, 10, 8: 945- 952.
3. Горбунова М.П. Электронно-микроскопическое исследование особенностей секреторного процесса тиреоидного эпителия. Цитология, 1968, 10, 4: 422-429.
4. Гордиенко В.М., Козырицкий В.Г. Ультраструктура желез эндокринной системы. Киев, 1978: 287 с.
5. Дмитриева Н.П., Бухвалова И.Б., Амирханян Е. Электронно-цитологические исследования локализации эндогенной пероксидазы в клетках интактной и гиперплазированной щитовидной железы крысы. Изв. АН. СССР. Сер. Биол., 1975, 4: 781-784.
6. Дмитриева Н.П. Электронно-микроскопический анализ дифференцировки клеточных органоидов щитовидной железы крысы в процессе эмбриогенеза. Архив анат., гист. и эмбриол., 1973, 69, 9: 58-59.
7. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. Под ред. Калашникова А.П. и Клейменова Н.И., М., Агропромиздат, 1985.
8. Behne D. Selenium homeostasis. Selenium in Medicine and Biology. Berlin - New York, 1988:83-91.
9. Bellommo G. Cell damage by oxygen free radicals. Citotechnology, 1991,1: 71-73.
10. Campbell D., Combs G. The effect of selenium supplementation in diets fed to starting, growing and finishing swine. Res. Rep., 1987, 32: 1-7.

11. Colzani R., Alex S., Fang S. et al Effects of iodine repletion on thyroid morphology in iodine and /or selenium deficient rat term fetuses, pups and mothers. *Biochimie*, 1999, 81,5: 485-491.
12. Contempre B., Dumont I., Denel J., Many M. Effect of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedema-tous cretinism *Eur. J. Endocrinol*, 1995, 155: 838-850.
13. Glatture E., Mravcova A., Lepen I. et al. Study of distribution and interaction of arsenic and selenium in rat thyroid. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1995, 49, 2: 177-186.
14. Imura H. The pituitary gland. N. I. Reaven Press, 1985: 350.
15. Kurosumi K. Functional classification of cell types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy *Arch. Histol. Jap*, 1968, 29: 329-362.
16. Kvikas I., Zamrazil V., Soutorova M., Tomisca F. Correlation between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst*, 1995, 120, 3: 959-965.
17. Levander O. Selected aspect of comparative metabolism and biochemistry of selenium and sulfur. Essential and toxic elements. N. J. Academic Press, 1976,2: 135-163.
18. Moriarty G. Adenohypophysis: ultrastructural cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem*, 1973, 21: 855-894.
19. Nakai Y., Fukita H. Fine structure localization of peroxidase in the thyroid rat thyroid. *Z. Zellforsch*, 1970, Bd., 107: 104-110.
20. Nakane P. Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem*, 1970, 18: 9-20.
21. Nakayama L., Nikerson P. Suppression of somatotrophs in growth hormone injected rats. *Z. Zellforsch*, 1973, 40: 309-314.
22. Nunner I., Pommier I. Formation of thyroid hormones. *Vit. Horm*, 1982, 39: 175-182.
23. Ruz M., Codoceo I., Galapani I. et al Single and multiple selenium. - Zinc. - Iodine deficiencies affect rat thyroid metabolism and ultrastructure. *Nutr.*, 1999, 129,1:174-80.
24. Sasaki F., Iwama Y. Sex difference in prolactin and growth hormone cells in mouse adenohypophysis. *Endocrinology*, 1988, 123: 905-912.
25. Shirosawa N., Kihara H., Yoshimura F. Fine structural and immunohistochemical studies of goat adenohypophyseal cells. *Cell tissue res.*, 1985, 250: 315-321.

СИСТЕМА МЕТАБОЛИТОВ α -ТОКОФЕРИЛХИНОНА И ЕЕ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ СОГЛАСОВАНИЯ ДЫХАНИЯ, ГЛИКОЛИЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ

(гипотеза)

В.И. Дудин

Лаборатория биологически активных веществ

В работе представлены материалы по выделению и первичной идентификации неизвестных продуктов метаболизма α -токоферилхинона. Охарактеризованные продукты выстроены в логической последовательности и представляют собой систему, отвечающую за купирование лактатацидоза в печени путем участия пирувата в синтезе ацетопирувата, который, как предполагается, в митохондриях преобразуется за счет пируватдегидрогеназного комплекса в ацетоацетил-КоА. Последний в тиокластической реакции дает 2 молекулы ацетил-КоА, являющегося непрямым участником пируваткарбоксилазы, которая способна резко усиливать глюконеогенез из лактата. К этому предрасполагает тот факт, что увеличение концентрации ацетил-КоА тормозит использование пирувата в процессе окислительного декарбоксилирования и стимуляция пируваткарбоксилазы осуществляется за счет ацетил-КоА, поступающего из гипотетического пути. Система производных α -токоферилхинона, образующихся в процессе развития лактатацидоза, препятствует ему путем выведения из гликолиза за один оборот 2-х молекул пирувата, трансформируя их в 4 молекулы ацетил-КоА, которые, в свою очередь, резко усиливают глюконеогенез из лактата.

Введение

В литературе был описан случай выделения из неомыляемых липидов, после парентерального введения крысам ^{14}C - α -токоферилсукцината, вещества с меньшей полярностью, чем у обычного α -токоферилхинона (Pelissier et al., 1989). Вещество не являлось убихиноном, несмотря на то, что имело максимум поглощения при 272 нм. В другом исследовании (Plack et al., 1964), в подобных условиях опыта, в неомыляемых липидах печени крыс было обнаружено менее полярное, чем α -токоферилхинон меченое соединение с кривой поглощения УФ-света, как у аутентичного α -

токоферилхинона, с максимумом при 265 нм. В одной из первых работ по исследованию метаболизма меченного лабильными изотопами α -токоферола (Krishnamurthy et al., 1963) также обнаружено неизвестное вещество в печени, плазме и особенно в почках, в очень высоких количествах (более высоких, чем во фракциях α -токоферола и α -токоферилхинона) с полярностью большей, чем у α -токоферола, но более низкой, чем у α -токоферилхинона. Анализы с помощью ТСХ показали, что более 70% радиоактивности в кале валухов, получивших дозу меченого α -токоферола, присутствовало во фракции с подвижностью α -токоферола: печень - $71 \pm 3,5$ %; надпочечник - $73 \pm 2,9$; селезенка - $79 \pm 3,4$; мышца - $74 \pm 3,6$; панкреас - $78 \pm 4,6$ % (Hidioglou, 1977). Остальная радиоактивность оставалась на старте, этот материал не идентифицировался, но все что оставалось на старте элюировалось этанолом и являлось очень полярным. Как мы уже упоминали, существует неидентифицированный путь превращений α -токоферилхинона в связи с кальциевым питанием клеток печени (Pascoe et al., 1987). В настоящей работе получили развитие исследования 17-летней давности (Дудин и др., 1986) об обнаружении кислых производных α -токоферола в организме цыплят.

Материал и методы

Эксперимент 1 провели на цыплятах 1,5,10- и 20-дневного возраста. Цыплята получали однократную оральную дозу D- α -[5-метил- ^3H]токоферола в количестве 0,16 (1 и 5 суток); 0,32 (10 суток) и 0,68 (20 суток жизни) МБк на 1 цыпленка. В этих опытах через 24 часа по 3-4 цыпленка в каждой группе убивали декапитацией. Вынимали печень и легкие и хранили до анализа в пластиковых контейнерах в рефрижераторе при -20°C .

В эксперименте 2 исследовали печень эмбрионов-задохликов в 2-х партиях яиц, инкубированных в лабораторном инкубаторе с хорошей терморегуляцией, нормальным влагообменом, но плохой вентиляцией. Погибшие от асфиксии эмбрионы вскрывали после вылупления основного количества цыплят. Печени извлекали также у только что вылупившихся цыплят.

Для эксперимента 3 использовали две печени от свиней, получавших в течение 3-х недель до убоя D,L- α -токоферилхинон (50 мг/кг корма). Печень измельчали до небольших фрагментов. К гомогенату каждой печени в антисептических условиях добавляли α -токоферол в количестве 100 мкг/г в форме эмульсии в 1% (в/о) растворе твина-80 в 20% растворе этанола в воде (5 мл приготовленной формы на 100 г печеночного гомогената). После этого препарат разделили на 3 части, одна из которых была контрольной. Во 2-ую часть добавили

монокальциевую соль фруктозо-1,6-бисфосфата в количестве 8 мкМ/г гомогената. Часть 3 гомогената обогащали путем добавления фторида натрия в количестве 50 мкМ/г. Инкубацию проводили при 37°C в запаянных полиэтиленовых пакетиках, которые вынимали из термостата и помещали в рефрижератор через 20, 120, 240, 480 и 960 минут. Вслед за этим образцы автолизатов использовали для обнаружения и изоляции производных α -токоферилхинона.

В опыте 4 готовили гомогенат из печени от 5 цыплят суточного возраста. Гомогенат помещали в колбу объемом 50 мл, содержащую 2 мл физраствора + 10 мг тритона X-100 + 0,16 МБк D α -[5-метил-³H]токоферола. Инкубационные периоды составляли 15, 30, 60, 120, 240, 960 и 2400 минут. В других опытах, смотря по обстоятельствам, использовали другие режимы приготовления препаратов и различные виды животных (свиньи, цыплята, кролики).

Выделение α -токоферола, s1+s2 в форме s2, s8,s4a и общего ретинола проводили с применением омыления. С этой целью к 2 г тканевого гомогената приливали 25 мл этанола + 2,5 мл серного эфира + 200 мг аскорбиновой кислоты + 2,5 мл 60% (в/в) водного раствора гидроксида калия. После этого смесь нагревали при 80°C в течение 45 минут. После охлаждения и добавления 15 мл воды проводили экстракцию гексаном (3x25 мл). Объединенный экстракт отмывали водой до нейтральной реакции, сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали и растворяли в небольших количествах (0,2-1,0 мл) гексана. В дальнейшем определяли содержание с помощью ВЭЖХ или очистку с помощью колоночной и/или тонкослойной хроматографии под контролем ВЭЖХ. Для выделения s1+s2 в форме s2 среду омыления подкисляли до pH 3-4 и экстрагировали гексаном или серным эфиром, а затем поступали, как описано выше.

Выделение s1+ s2 в форме s1 проводили с помощью кислотного гидролиза тканей. Хорошо измельченную нативную ткань по 2 г на каждый анализ смешивали с 25 мл 4М водного раствора концентрированной соляной кислоты и смесь нагревали при помешивании при 80°C в течение 2 часов. После охлаждения осуществляли экстракцию гексаном (3x25 мл). Экстракт объединяли и отмывали водой до нейтральной реакции смывных вод, упаривали над безводным сульфатом натрия, упаривали растворитель и растворяли в небольшом количестве гексана. После этого вели ВЭЖ-хроматографический анализ или очистку под контролем ВЭЖХ.

Выделение s1, s2, s3, s4, s5, α -токоферилхинона и α -токоферола проводили с помощью прямой экстракции в ацетон. В этих целях образец ткани основательно перетирали с безводным сульфатом натрия в фарфоровой ступке с пестиком до порошкообразного состояния, который переносили в колбу на 100 мл, куда добавляли 50 мл ацетона,

перемешивали и оставляли в ночь. Утром экстракт фильтровали с использованием дополнительных количеств (25 мл) ацетона. Фильтрат объединяли с 50 мл воды и экстрагировали гексаном 2x25 мл. Объединенный экстракт отмывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали и растворяли в небольшом количестве гексана.

Для выделения s3 ацетоновый экстракт, после удаления из него липидов экстракцией гексаном, подщелачивали до pH 10. Экстрагировали диэтиловым эфиром. Затем во всех случаях следовал ВЭЖХ анализ или очистка под его контролем.

Взаимопревращения s2 и s1 проводили в среде этанола. К 15 мл раствора s2 добавляли 0,2 мл 60% (в/в) водного раствора гидроксида калия и оставляли стоять в течение 4 часов. Затем раствор подкисляли до pH 3-4, добавляли 10 мл воды и s1 экстрагировали гексаном. Экстракция шла лучше, если использовали серный эфир. Для обратного превращения вместо щелочи применяли концентрированную соляную кислоту в тех же количествах. Экстракцию вели гексаном после добавления 10 мл воды.

Выделение s6 и s7 осуществляли с помощью хлороформ-метаноловой смеси согласно общепринятой прописи (Folch et al., 1957). Липидные экстракты печени и легких цыплят готовили с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком в среде хлороформ-метаноловой смеси (2:1, о/о). На каждый 1 г ткани приливали 20 мл смеси. Затем фильтровали, выпаривали, растворяли сухой остаток в 10 мл гексана, добавляли 90 мл охлажденного ацетона, фильтровали на холоду, упаривали и остаток растворяли в 5 мл гексана. Этот раствор наносили на силикагелевую колонку (200мм x 20 мм, адсорбент силикагель L с размерами частиц 100/160 мкм). Во всех случаях в качестве мобильной фазы использовали смесь, состоящую из гексана/хлороформа/этанола (95%). Элюент вводили в колонку порциями по 5 мл. В результате получили следующие послеколоночные фракции: 1-5 (90/9,9/0,1); 6-10 (50/49,5/0,5); 11-35 (0/99/1); 36-50 (0/97/3); 51-60 (0/9/1); 61-70 (0/7/3); 71-80 (0/4/6); 81-90 (0/2/8). Фракции упаривали, остатки растворяли в сцинтилляционной жидкости (0,5% PPO и 0,05% POPOP в толуоле). Использовали сцинтилляционный счетчик «Ultrobeta» (LKB-1210, Швеция). Тушение корректировали с помощью внешней стандартизации.

Для выделения s6 и s7 образцы печени массой около 10 г гомогенизировали с 4-х кратным объемом воды. Вначале из водного гомогената при pH 8,5 гексаном (5x100 мл) экстрагировали нейтральные липиды, а затем при pH 3,0 кислые этилацетатом (5x100 мл). Последний упаривали и его липиды хроматографировали на колонках из силикагеля, как описано выше.

В экспериментах мы использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле, приготовленном по E. Stahl (1969) с подвижной фазой для нейтральных и полярных липидов (гексан, серный эфир, уксусная кислота:70/30/1 и хлороформ, метанол, вода: 65/24/4). Образцы снимали с пластинок и липиды экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью (2:1). Для изоляции кислотных продуктов после кислотного или щелочного гидролиза в качестве подвижной фазы мы использовали смесь этанола/водного аммиака (25%)/воды (80/4/16). Хроматографические пластинки после процедуры разгонки опрыскивали этанольным раствором бромкрезолового зеленого (растворить 40 мг препарата в 100 мл этанола, затем очень разбавленным раствором едкого натра по каплям довести раствор до устойчивого синего цвета). Гидролиз очищенных препаратов проводили в среде этанола (20 мл). Сюда добавляли 4н соляную кислоту (3 мл) или 60% водный раствор едкого кали (2 мл) и нагревали при 70°C в течение 2 часов. Затем разводили равным объемом воды, щелочную среду подкисляли разведенной соляной кислотой. И ту и другую смесь экстрагировали серным эфиром (5 x 20 мл).

Хроматограф «Милихром» (Россия) использовали для ВЭЖХ, микроколонка 120 мм x 2 мм, адсорбент силасорб-600 с размером частиц 5 мкм. В качестве элюентов использовали смеси из гексана, серного эфира и метанола (о/о): 96,7/3/0,3 (по.1); 89/10/1 (по.2) и 60/30/10 (по.3). УФ-спектры поглощения измеряли в остановленном потоке элюента. УФ-детектор имел диапазон 190-360 нм. Прибор позволяет изменять длину волны детекции не останавливая анализ.

Фосфор определяли с помощью микрометода (Morrison, 1964), азот измеряли по нитропруссидной реакции (Kates, 1972). Первичные аминогруппы идентифицировали с использованием пробы с салициловым альдегидом. Для этого очищенное соединение растворяли в метаноле (20 мл), затем добавляли 50 мкл уксусной кислоты + 60 мкл салицилового альдегида. Через 2 часа стояния при 30°C реакционную смесь экстрагировали гексаном. Идентификацию индольных продуктов осуществляли по реакции с 4-диметиламинобензальдегидом (Коренман, 1970). Синтез 2,4-динитрофенилгидразонов проводили после кислотного гидролиза испытуемого вещества (Шрайнер и др., 1983).

Результаты и обсуждение

Обнаружение и первичная характеристика веществ с предполагаемой структурой: 3`дезоксид, 2`кето α -токоферилхинона (s1) и 3`дезоксид, 2`енол α -токоферолхинона (s2).

Обнаружение многих веществ было связано с опытами на цыплятах, которые предварительно получали однократную оральную дозу D-[³H-5-метил] α-токоферола. На колоночных хроматограммах общих липидов печени проявляется при этом максимум во фракциях 15-16, который оказался несколько менее подвижным, чем максимум α-токоферола (22-24 фракции). Дальнейшие исследования осуществляли в опытах с автолизатами печени свиней, в течение 3-х недель до убоя получавших оральную дозу нерадиоактивного α-токоферилхинона (50 мг/кг корма). S1 был выделен после кислотного гидролиза ткани, автолизованной в течение 16 часов при 37°C. На колоночных хроматограммах s1 проявляется во фракциях с большей подвижностью, чем α-токоферол. На ВЭЖ хроматограммах s1 проявляется там же, где и неполярный дезокси-α-токоферилхинон (объем элюции максимума – 400 мкл). S1 не наблюдается при щелочном гидролизе ткани. В щелочной среде s1 может быть превращен в соединение s2, которое экстрагируется из подкисленной среды (pH 3-4) гексаном или, что лучше, серным эфиром. S2 имеет такую же ВЭЖхроматографическую подвижность (900 мкл), как и аутентичный α-токоферилхинон. Дополнительные доказательства, что s1 может быть кетоном, получены в опытах, когда енол превращали в кетон при кислотном гидролизе ткани в процессе первичного выделения s1. Затем, после хроматографической очистки s1 и по его переходу в более полярное и более кислое соединение s2 в щелочной среде, и по возвращению в исходное соединение s1 под действием кислой среды (рис.1), мы не обнаружили существенных различий между s1 и s2 по поглощению УФ-света. В том и другом случаях проявился мажорный максимум при 268 нм и минорные: при 278 нм. Помимо s1 и s2 мы обнаружили соединение (рис. 2 справа), которое по спектру поглощения и по инертности можно отнести к метоксипроизводным s1.

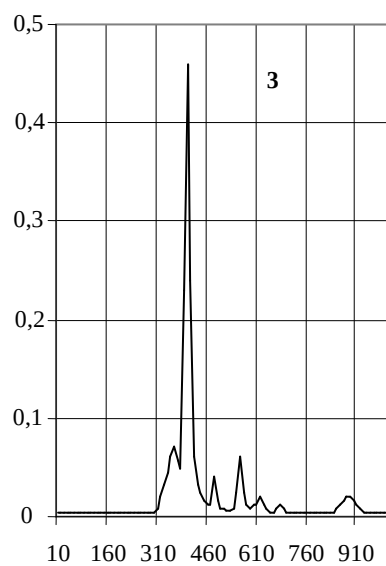
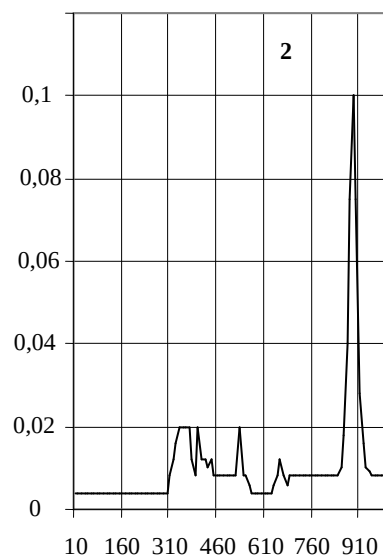
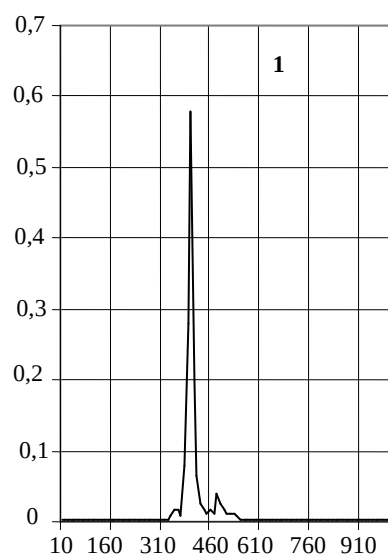


Рис. 1. ВЭЖХ подвижность кетонного и енольного производного α -токоферилхинона. Производные α -токоферилхинона, изолированные после кислотного гидролиза, как сумма s1 и s2 в форме s1 (1) из аутолизированной печени свиней, получивших α -токоферилхинон. После колоночной очистки, s1 превращен в щелочной среде в енол s2 (2), который в свою очередь после выделения и очистки превращен в кислой среде в кетон s1 (3). Волна детекции – 268 нм, фаза по.2)

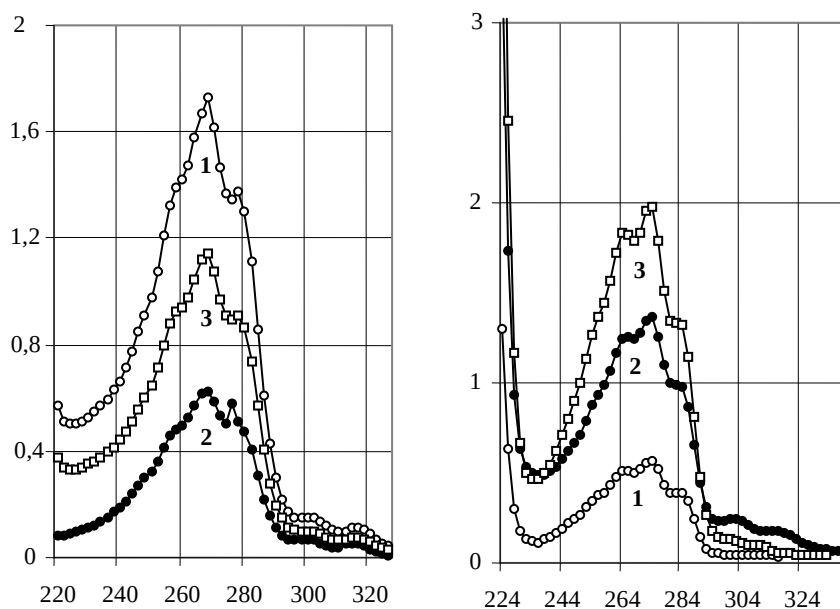


Рис. 2. УФ-спектр в остановленном потоке элюента веществ, представленных на рис. 1 (слева) и возможных метоксиэфиров s1 (справа) из ацетонового экстракта (1), из омыленного образца, отэкстрагированной среды омыления после подкисления до pH=3,0 (2) и из образца подвергнутого HCl-гидролизу (3) (количество пробы во всех 3-х случаях одно и то же).

Мы также выделяли s2 из стенки тонкого кишечника цыплят через 24 часа после однократного орального введения меченого тритием α -токоферола с помощью экстракции гексаном или серным эфиром после удаления липидов и ацидификации среды омыления.

Соединение было обнаружено во фракциях 39-40 колоночной хроматограммы (рис.

3). Из радиоактивной печени 5-ти и 10-суточных цыплят s2 был изолирован путем экстракции этилацетатом липидов из подкисленного гомогената после удаления липидов из щелочной среды гексановой экстракцией (рис. 4). На первых порах можно предположить, что синтез s1 протекает обычным путем: дегидратация α -токоферилхинона с последующей гидратацией в положение 2' и окислением гидроксильной группы в карбонильную. Мог иметь место также внутримолекулярный перенос гидроксильной группы из положения 3' в положение 2' боковой цепи α -токоферилхинона с образованием двойной связи между указанными углеродными атомами. В связи с тем, что углерод в положении 3' боковой цепи α -токоферола является ассиметрическим, отрыв водорода при этом углероде протекает довольно легко – (Несмеянов и

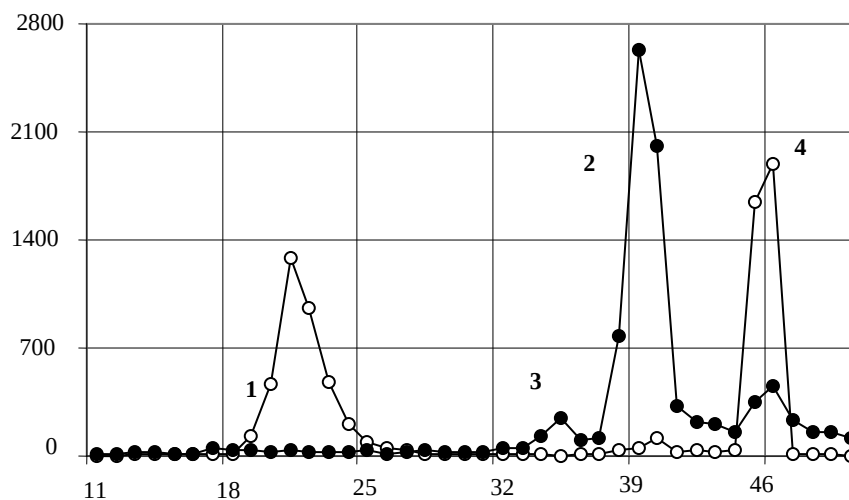


Рис. 3. Профиль радиоактивности колоночных хроматограмм общих липидов легких (o-o) и кислых неомыляемых липидов стенки тонкого кишечника (•-•) (1 – α -токоферол, 2 – s2, 3 – s3b, 4 – α -токоферилгидрохинон) 10-суточных цыплят через 24 часа после однократного орального введения D- α -[5-метил- ^3H]токоферола; y- радиоактивность, dpm; x-№ фракций)

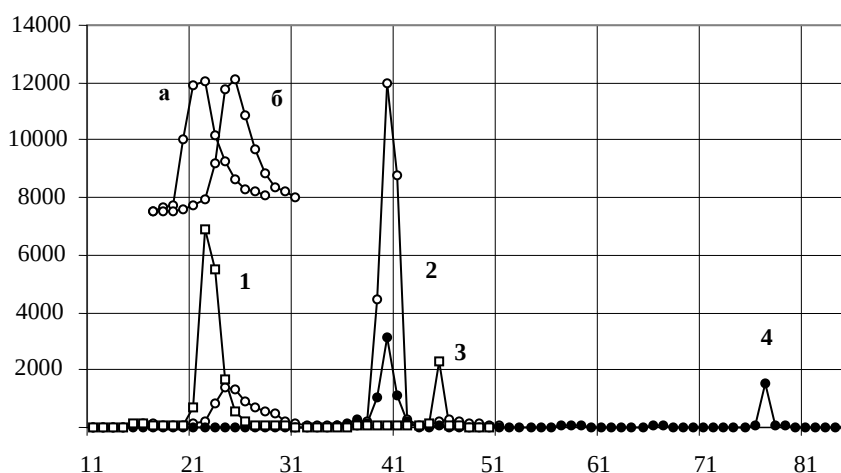


Рис. 4. Профиль радиоактивности колоночных хроматограмм кислых липидов 5-и (●-●) и 10-ти (○-○) сутокных цыплят через 24 часа после получения однократной оральной дозы $[^3\text{H}]\alpha$ -токоферола (1 – α -токоферол, 2 – s2, 3 – α -токоферилгидрохинон, 4 – s6; фрагмент хроматограммы смеси α -токоферола, а, и s4a,б; y- радиоактивность, dpm; x-№ фракций)

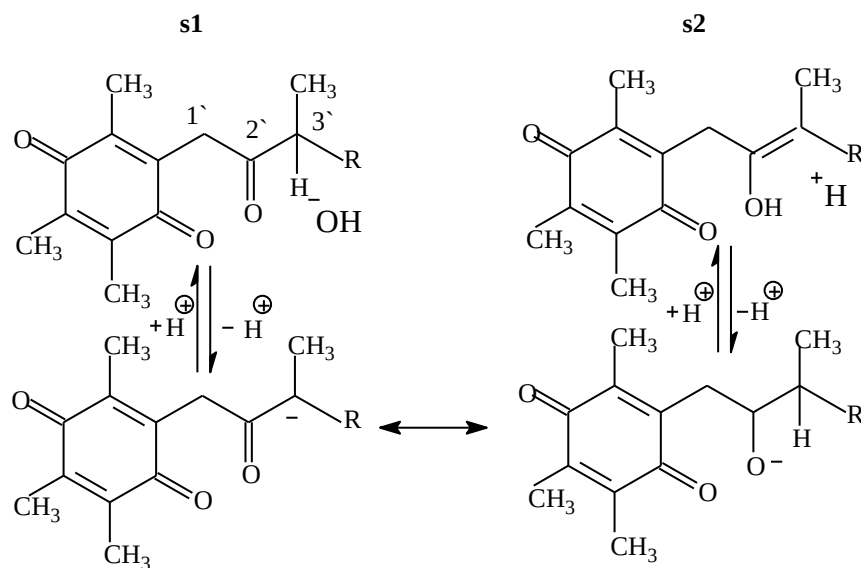


Рис. 5. Предполагаемые структуры s1 и s2 и схема их превращения друг в друга

др.,1974). В частности под действием аниона гидроксила он превращается в енолят-ион, который при подкислении среды переходит в енол (рис.5). Обратный переход енола в кетон мы достигали действием соляной кислоты в спиртовой среде. В этом случае реакция протекает по

классическому пути обратного превращения енола в кетон, катализируемому кислотой (Несмеянов и др., 1974).

Обнаружение и характеристика вещества с предполагаемой структурой: 3'-дезоксигидро-2'-амино- α -токоферилхинона (s3).

Мы наблюдали это соединение в автолизатах свиней и кроликов. Вещество s3 изолировали после удаления липидов из подкисленного ацетонового экстракта последующей экстракцией из подщелоченной среды гексаном или серным эфиром (рис. 6). На ВЭЖ-хроматограммах максимум s3 появляется при 650 мкл объема элюции, между α -токоферолом (520 мкл) и аутентичным α -токоферилхиноном (900 мкл). Максимум поглощения ультрафиолета для s3 равен 278 нм (рис. 7). Амин вступает в реакцию конденсации с салициловым альдегидом. Продукт конденсации имеет максимум подвижности при 720 мкл объема элюции (для салицилового альдегида 490 мкл, для s3 650 мкл).

Воздействие на s3 соляной кислотой ведет к образованию вещества (s3a) со свойствами индолинового производного с УФ-максимумом поглощения при 258 нм и с ВЭЖ-хроматографической подвижностью при максимуме элюции 460 мкл. При хранении в течение 24 часов при комнатной температуре s3a спонтанно переходит в индольное производное (s3b) с ультрафиолетовым максимумом при 222 нм (мажорный) и 274 нм (минорный) с максимумом объема элюции при 540 мкл.

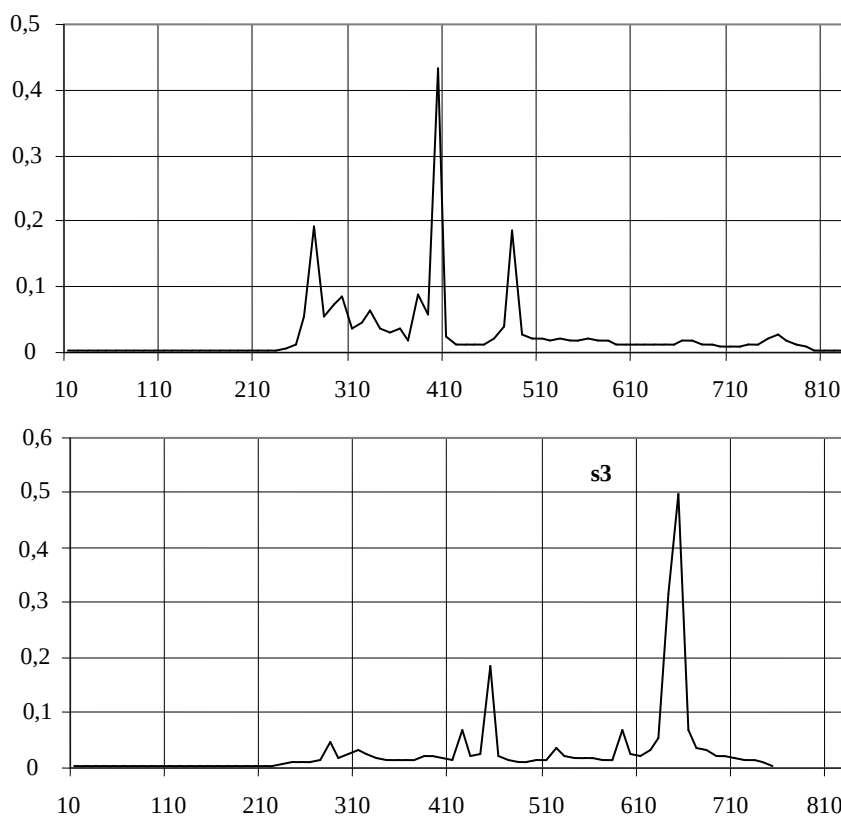


Рис. 6. Выделение s3 из аутолизированной печени кроликов (вверху – кислый экстракт, полученный экстракцией гексаном из подкисленного ацетонового экстракта, внизу – щелочной экстракт после удаления кислых липидов и подщелачивания ацетонового экстракта)

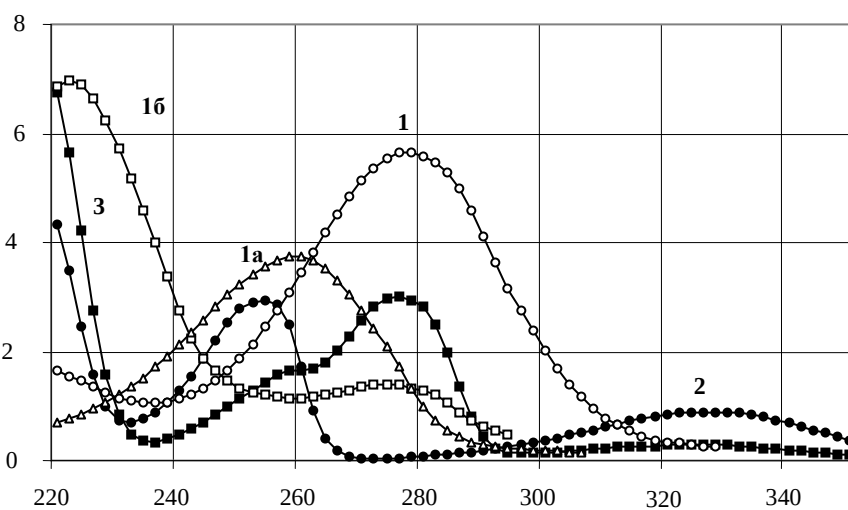


Рис. 7. УФ-спектры в остановленном потоке элюента s3 и его производных, а также доказательств наличия первичной аминогруппы в s3 (1 – s3, 1a – s3a, 1б – s3b; 2 – салициловый альдегид; 3 – аддукт s3 и салицилового альдегида)

Обнаружение и характеристика вещества с предполагаемой структурой: 3`дезоксид, 2`кетиминоацетопирувата (s4).

S4 был обнаружен в полярной зоне экстракта общих липидов с ВЭЖХ подвижностью (фаза по.3) с максимумом при 550 мкл объема элюирования (рис. 8). УФ-спектр s4 в

значительной степени напоминает полосу поглощения s3 с максимумом при 274 нм (рис. 9). Под действием щелочного раствора на s4, последний переходит в s4a и s4b. S4b идентичен s3b, но s4a не превращается в s4b. При щелочной обработке очищенного s4a появляются 2 продукта неизвестной структуры. При кислотном гидролизе s4 образуется только s4b. S4a имеет УФ-спектр с максимумом при 268 нм и ВЭЖ-хроматографической подвижностью при 450 мкл. Под действием соляной кислоты на s4a образуются

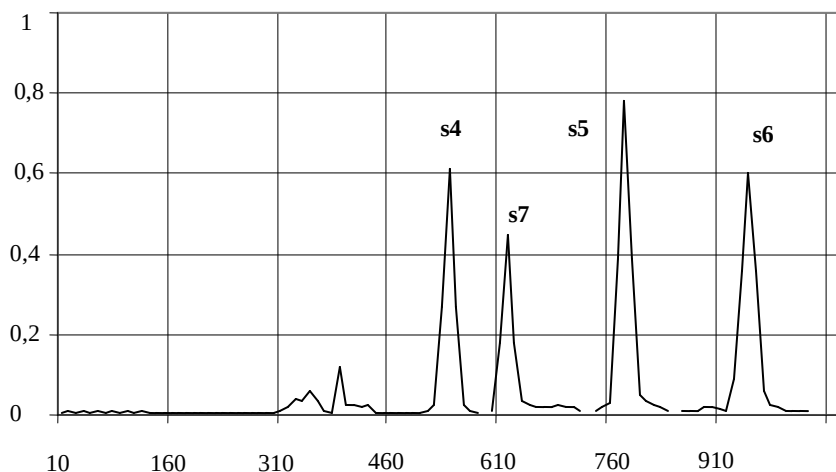


Рис. 8. ВЭЖХ-подвижность (фаза по.3) кетиминных производных s3 (x – объем элюции, мкл; y – абсорбция)

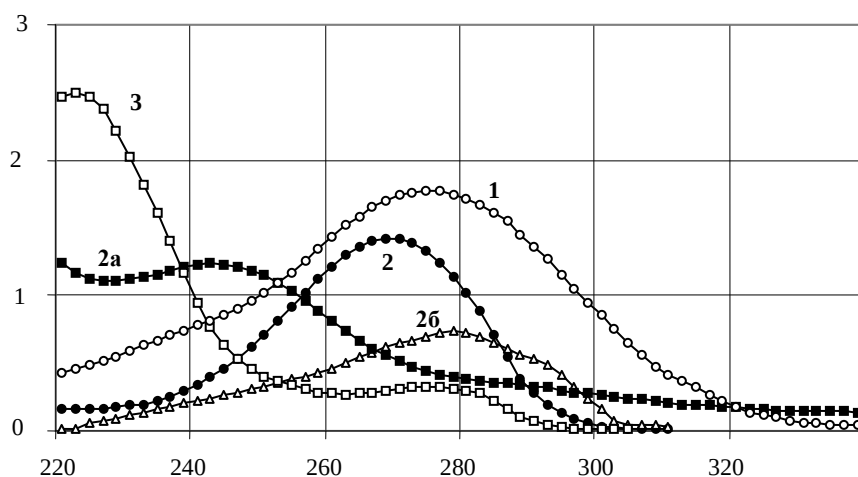


Рис. 9. УФ-спектры в остановленном потоке элюента (1 – s4, 2 – s4a, 2a и 2b – производные s4 в щелочной среде, 3 – s4b)

небольшие количества s4b. S4a положительно реагирует с 4-диметиламинобензальдегидом, как вторичный ароматический амин. Среди продуктов гидролиза мы обнаружили вещество с кислотными свойствами. На основе вышеустановленного можно заключить, что s4 построено как основание Шиффа с вовлечением кетогруппы кислоты и аминокруппы s3. Как уже упоминалось, s4a в больших количествах содержится в неомыляемых липидах печени эмбрионов-задохликов. В исследованиях, проведенных на 2-х партиях яиц, инкубированных в лабораторном инкубаторе с плохой вентиляцией, нами было показано, что неомыляемые липиды печени задохликов содержат очень большие количества s4a и очень пониженные уровни α -токоферола по сравнению с нормально вылупившимися цыплятами (таблица 1). Общее содержание ретинола в печени цыплят в обоих случаях было одинаковым.

Таблица 1. Концентрация α -токоферола, s4a и общего ретинола в печени нормально вылупившихся цыплят и задохликов в двух партиях (нмоль/г нативного образца, s4a – выражен как α -токоферилхинон)

Показатели	Партия 1	Партия 2
α -токоферол:		
нормальные цыплята	127,2 $\pm$ 17,4	282,7 $\pm$ 34,6
задохлики	42,3 $\pm$ 28,3	90,9 $\pm$ 22,6
s4a:		
нормальные цыплята	32,8 $\pm$ 5,1	16,6 $\pm$ 3,1
задохлики	528,8 $\pm$ 183,3	132,8 $\pm$ 17,1
Общий ретинол:		
нормальные цыплята	–	96,5 $\pm$ 2,7
задохлики	–	109,4 $\pm$ 10,1

В опытах, проведенных на аутолизованной печени поросят, до убоя в течение 3-х недель получавших добавки α -токоферилхинона (50 мг/кг корма), было обнаружено (таблица 2), что деградация лизосом, определенная по освобождению ретинола из его эфиров, начинается через 4 часа инкубации. Спустя еще 4 часа происходит интенсификация синтеза α -токоферилхинона и s4a-генерирующего продукта (s4). Эти изменения стимулируются за счет добавок фруктозо-1,6- бисфосфата и ингибируются добавками фторида. Указанный факт подтверждает, что интенсификация синтезов в системе α -токоферилхиноновой метаболической системы зависит от степени лактат-ацидоза. Здесь уместно предположить участие s3 в образовании кетоиминного производного с ацетопировиноградной кислотой. С помощью тонкослойной хроматографии кислотный продукт гидролиза s4, выделенный путем экстракции среды гидролиза серным эфиром после удаления липидов с помощью гексана, давал кислотное пятно (R_f =0,75 против 0,63 для пирувата). На ВЭЖ-хроматограммах максимумы объемов элюирования составляли 780 мкл и 840 мкл соответственно.

Таблица 2. Изменение концентрации свободного ретинола, α -токоферола, α -токоферилхинона и s4a в процессе аутолиза печени свиней, в течение 3 недель получавших экзогенный α -токоферилхинон (s4a – выражен как α -токоферилхинон) в зависимости от включения в инкубационную смесь фруктозо-1,6-дифосфата (ФБФ) или фтористого натрия (NaF)(нмоль/г нативного образца печени)

Варианты	Время инкубации, мин				
	20	120	240	480	960
Свободный ретинол					
Контроль	36,3 $\pm$ 11,7	33,9 $\pm$ 9,0	35,6 $\pm$ 11,1	181,1 $\pm$ 4,1	292,3 $\pm$ 45,0
+ФБФ	29,7 $\pm$ 3,4	36,7 $\pm$ 3,8	41,9 $\pm$ 2,0	244,0 $\pm$ 87,4	314,6 $\pm$ 49,3
+NaF	17,8 $\pm$ 8,3	13,2 $\pm$ 3,8	12,3 $\pm$ 2,4	16,0 $\pm$ 2,4	135,6 $\pm$ 52,0
α -токоферол					

Контроль	159,4±27,1	143,8±38,3	145,1±31,2	149,2±20,4	130,8± 6,5
+ФБФ	135,5± 7,4	147,1±10,9	151,6±11,1	133,7±11,2	134,5± 8,4
+NaF	135,4±10,7	142,1± 1,1	136,0± 3,8	151,7±22,9	162,4±32,6
α -токоферилхинон					
Контроль	4,2±1,67	2,0±0,6	1,8±0,3	1,6±0,1	14,2±1,9
+ФБФ	3,8±0,2	3,2±0,7	4,2±1,9	3,8±1,7	16,0±0,9
+NaF	3,1±0,5	2,8±0,1	2,8±0,6	2,4±0,2	3,3±0,9
S4a					
Контроль	2,0±0,1	2,2±0,3	2,6±0,8	2,8±0,0	29,9±0,5
+ФБФ	2,2±0,2	1,9±0,4	8,5±0,5	16,2±0,0	44,6±0,8
+NaF	2,6±1,5	2,3±0,8	4,3±3,2	4,7±3,8	1,7±0,1

На рис. 10 изображены абсорбционные спектры стандартных и обнаруженного соединения. Последнее имеет максимумы при 200 и 236, 276, 320 нм. Примерно такой спектр образуется путем суммирования спектров пирувата и ацетона. Максимум при 320 нм иногда наблюдается при ВЭЖ-хроматографировании пировиноградной кислоты. Возможно, что это енолят-ион. Помимо изображенного на рис. 10, в автолизатах тканей содержатся в свободном виде еще две неполярные кислоты (рис. 11). В связи с изложенным, обнаруженная выше кетонокислота вполне может быть ацетопировиноградной.

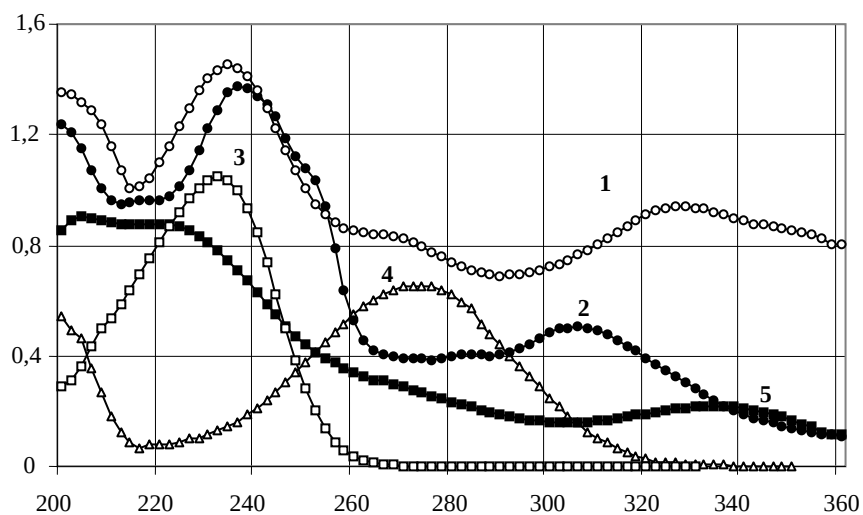


Рис. 10. УФ-спектры в остановленном потоке элюента (1 – ацетопируват; 2 – ацетоуксусный альдегид; 3 – пировиноградная кислота, кетонная форма; 4 – ацетон, 5 – неизвестная форма пировиноградной кислоты)

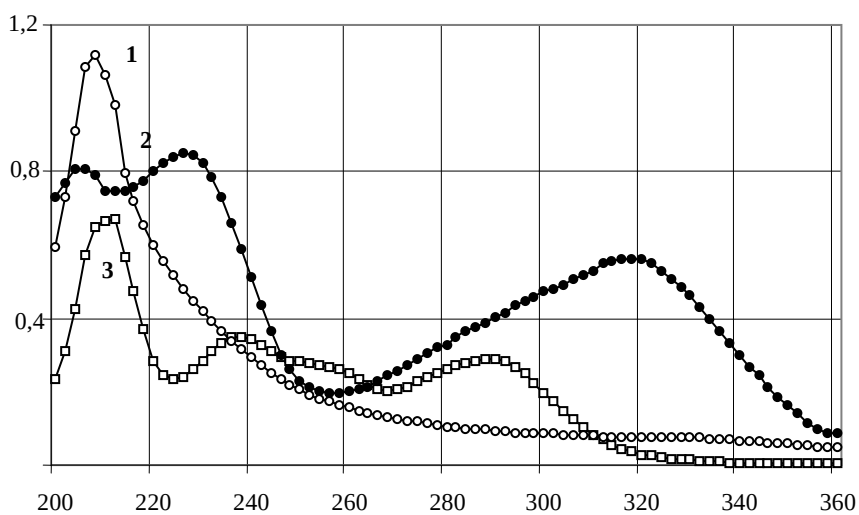
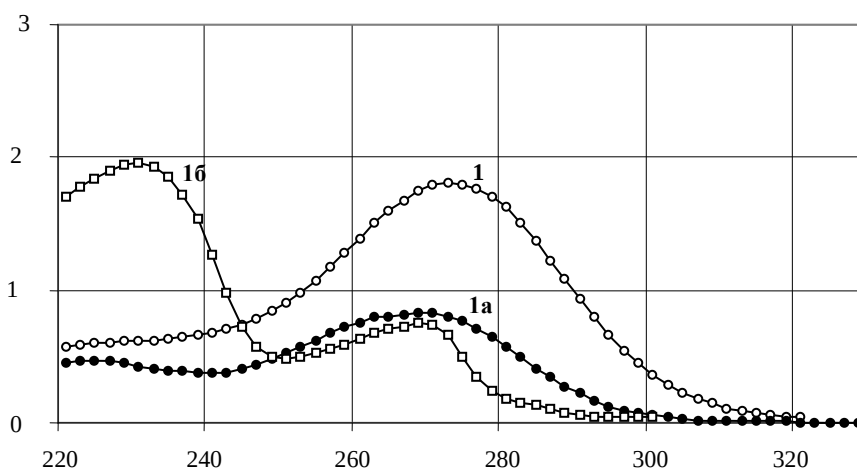


Рис. 11. УФ-спектр енольной формы пирувата (1 – 840 мкл), а также кислых продуктов аутолизированной печени свиней с большей (2 – 684 мкл) и меньшей (3 – 871 мкл) подвижностью (x – длина волны, нм; y – абсорбция).

Обнаружение и характеристика вещества с предполагаемой структурой: 1оксо, 4диокси,3`дезоксид,2`кетопиридиноацетопиридин- α -токоферилхинона (s5):

Это соединение выделяли из стенки тонкого кишечника поросят с супердозой витамина Е в рационе. На ВЭЖ-хроматограммах s5 движется медленнее, чем s4 (рис. 8), но имеет очень похожий ультрафиолетовый спектр (рис. 12) с максимумом



при 272 нм.

Рис .12. УФ-спектры в остановленном потоке (1 – s5, 1a и 1б – продукты кислотного гидролиза; x - длина волны,нм, y - абсорбция)

При щелочном гидролизе s5 дает продукт (s5a) с максимумом поглощения при 268 нм. При кислотном гидролизе s5 получается другой продукт (s5b) с максимумами поглощения УФ-света при 224 нм (мажорный) и 268 нм (минорный). Объемы элюирования для этих веществ составляют 470 и 540 мкл, соответственно. Оба продукта положительно реагируют с 4-диметиламинобензальдегидом. Возможно, что s5a и s5b изомерны друг другу. В общем-то прослеживается некоторая аналогия с веществами, получающимися в результате гидролиза s3 и s4. Среди продуктов гидролиза обнаружена та же самая кислота (ацетопиридинат), которая описана выше, а также она же после выделения с помощью ТСХ, включающего слабый прогрев

хроматографической пластинки с последующей экстракцией кислоты из пятна метанолом и затем ВЭЖХ (рис. 10,1). На хроматограмме, изображенной на рисунке 4, наблюдается максимум радиоактивности, связанной с фракциями 45-46. Фракции 45-46 обнаруживаются также на хроматограмме радиоактивности хлороформ-этанольного экстракта легких и печени. Эта радиоактивность, безусловно, связана с α -токоферилгидрохиноном. В противоположность этому, в процессе омыления без добавления в среду омыления антиоксидантов, α -токоферилхинон и тем более α -токоферилгидрохинон разрушаются и на рис. 3, изображающем хроматограмму радиоактивности кислых липидов стенки тонкого кишечника во фракциях 45-46, могли быть остатки соединения, неплохо выдерживающего омыление, но не являющегося α -токоферил-гидрохиноном. С известным допущением оно может соответствовать s5, как результат недошедшего до конца процесса.

Обнаружение и характеристика веществ с предполагаемой структурой: 1оксо, 4 фосфо, 3`дезоксид, 2`кетиминоацетопируват- α -токоферилхинона (s6) и 1 оксо, 4 фосфо, 3`дезоксид, 2`амино α -токоферилхинона (s7):

Вещества s6 и s7 имеют очень различную ВЭЖХ подвижность (рис.8), но практически одинаковые УФ-спектры (рис.13) с максимумами при 245, 308, 322 нм и плечами при 292-294 нм. При хроматографировании радиоактивных липидов этилацетатного экстракта печени 10-дневных цыплят, получивших однократную оральную дозу меченого тритием α -токоферола, во фракциях 76-78 (рис. 4-4) обнаруживается вещество s6. После щелочного гидролиза вещества s6 или кислотного гидролиза s7 освобождается вещество, идентичное s3b (s4b). Это соединение получается также в опытах с меченым тритием α -токоферолом. После многократной очистки оно составляло 2% общей радиоактивности неомыляемых липидов печени суточных цыплят. S3b обнаруживается при колоночной хроматографии кислых липидов после омыления стенки тонкого кишечника цыплят, получивших однократную оральную дозу [^3H] α -токоферола, во фракции 35 (рис.3). Ацетопируват появляется среди продуктов гидролиза s6. На основании меньшей полярности s7 по сравнению с s6 мы предположили для s7 структуру фосфорилированного производного дезокси - α -токоферилхинона (s3).

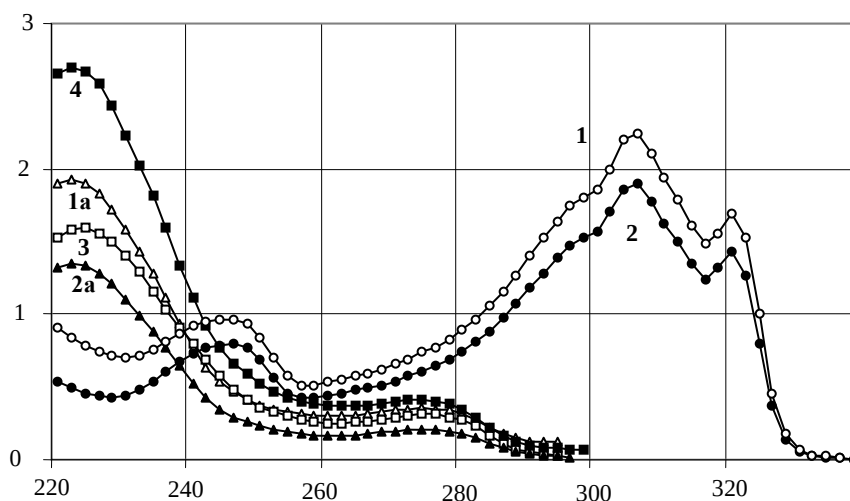


Рис. 13. УФ-спектры в остановленном потоке элюента (1 – s6; 2 – s7; 1a, 2a – продукты гидролиза s6 и s7; 3 – фракции № 35 рис. 3; 4 – радиоактивный продукт гидролиза печени цыплят)

Среди продуктов мягкого окисления α -токоферола в растительных маслах встречаются вещества со спектром поглощения УФ-света, напоминающим спектр поглощения s6 и s7 (Frampton et al., 1952). Это вещество авторы интерпретировали как гидроокси-п-хинон. Еще более близкий по характеру полосы поглощения спектр, но основательно различающийся по максимумам, обнаружен для ретинолсвязывающего белка (Душейко, 1989). В общем-то спектры s6 и s7 имеют сходство с веществами s1 и s2 при большом батохромном сдвиге у первых.

Обнаружение и характеристика вещества с предполагаемой структурой: 3'-дезоксиди, 2'-альдоиминоацеталь- α -токоферилхинона (s8):

S8 имеет ультрафиолетовый спектр поглощения, очень похожий (рис. 14, 1) на спектры поглощения s3, s4 и s5 с максимумом при 274 нм (рис. 14, 2). После кислотного гидролиза s8 в гексановом экстракте обнаружено соединение, идентичное s3b (s4b). После щелочного гидролиза в подкисленной среде омыления обнаруживается вещество, которое по УФ-спектру напоминает s1 и s2 с гипсохромным сдвигом (рис. 14, 3-4).

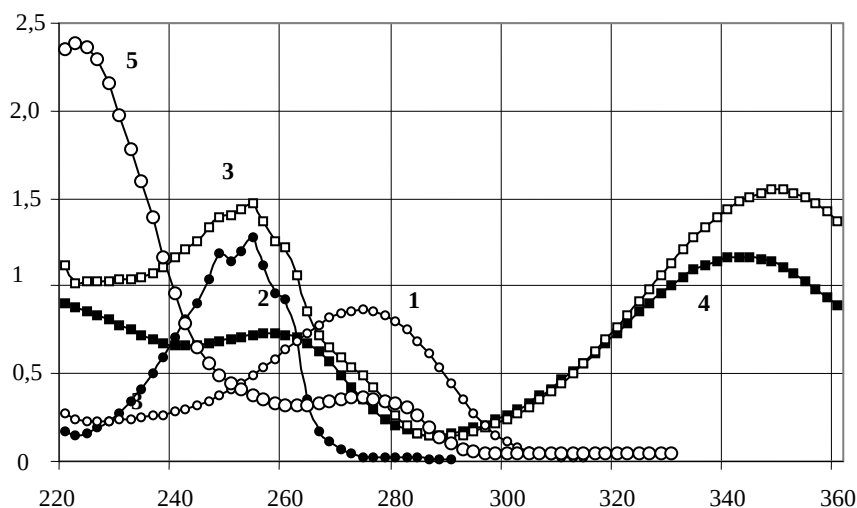


Рис. 14. УФ-спектры в остановленном потоке элюента (1 – s8, 2 – кислый продукт после щелочного гидролиза s8, 3 – 2,4-динитрофенилгидразон кислого продукта щелочного гидролиза s8, 4 – 2,4-динитрофенилгидразин, 5 – продукт кислотного гидролиза s8)

Путь метаболизма α -токоферола в общих чертах давно известен и состоит в образовании α -токоферилхинона в животных тканях (Draper et al., 1969). В наших исследованиях на свиньях показано, что α -токоферилхинон является ингибитором (регулятором) роста животных (Гришук., 1993; Жарова, 1999). По нашим данным, пониженное потребление кислорода во время сна ведет к уменьшению корреляции между концентрациями в печени α -токоферилхинона и убихинона с одновременным уменьшением площади среза печени. Одной из главных причин здесь может служить невысокая интенсивность набухания митохондрий в период их пониженной функциональной активности, возникающей вследствие недостаточного поступления кислорода в печень во время сна. Нами обнаружена прямая зависимость между временем бодрствования и уровнем корреляционной связи между концентрациями убихинона и α -токоферилхинона в печени. Подобная связь может быть следствием дальнейшего, зависящего от дыхания, превращения α -токоферилхинона в α -токоферилгидрохинон. Система производных α -токоферилхинона, описанная в данной работе, может функционировать, по-видимому, в патологических ситуациях, а в норме вряд ли ее проявление можно заметить.

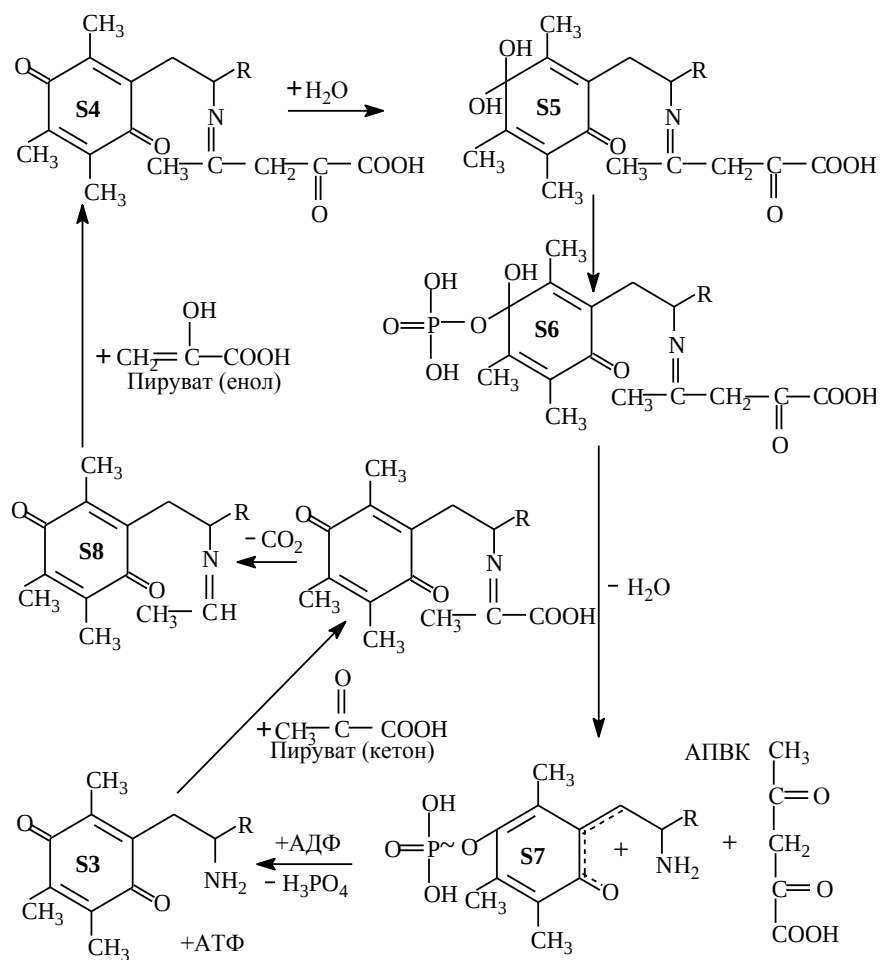
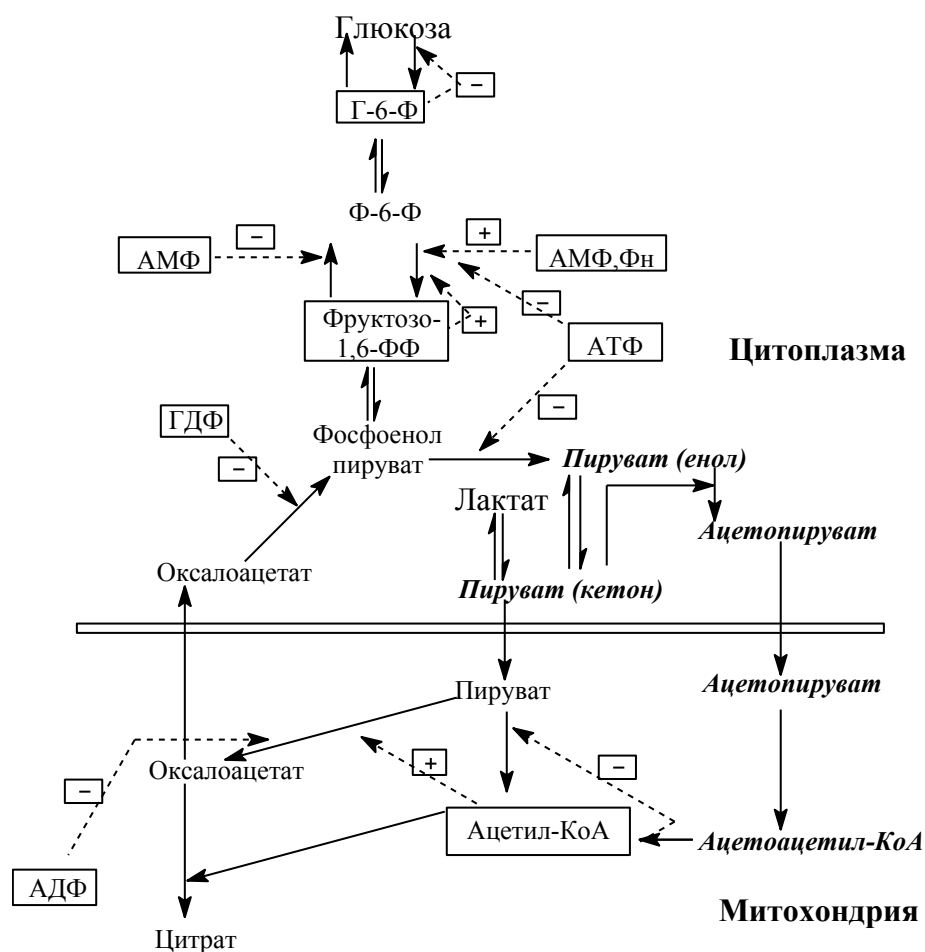


Рис. 15. Один из возможных путей участия производных α -токоферилхинона в блокировании процесса развития лактатацидоза в печени животных



Система предусматривает участие в противодействии развитию лактат-ацидоза путем трансформации 2-х молекул пирувата в 1 молекулу ацетопировиноградной кислоты (АПВК), что, возможно, сопровождается субстратным фосфорилированием АДФ (рис. 15). Образовавшаяся ацетопировиноградная кислота может подвергнуться окислительному декарбоксилированию по аналогии с окислительным

декарбоксилированием пирувата (Hoffman, 1966) с образованием ацетоацетил-КоА. Последний является хорошим стимулятором пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1.) за счет разложения на 2 молекулы ацетил-КоА, от которого этот фермент целиком зависит (КФ, 1979). Пируваткарбоксилаза в присутствии лактата резко усиливает глюконеогенез. Таким образом, представленная выше схема (рис. 16) взаимосвязи производных α -токоферилхинона, образующихся в процессе развития лактатацидоза, препятствует последнему, путем выведения за один оборот 2-х молекул пирувата, трансформируя их в 4 молекулы ацетил-КоА, которые, в свою очередь, резко усиливают глюконеогенез из лактата (рис. 16). Введение лактата в организм животных увеличивает содержание пирувата, что в свою очередь стимулирует активность пируват-карбоксилазы (Ньюсхолм и др., 1977). При перфузии добавленный лактат почти полностью превращается в глюкозу. Хорошо известно, что ишемия усиливает гликолиз в результате ухудшения работы дыхательной цепи.

В опыте с инкубацией гомогената суточных цыплят в присутствии меченого тритием α -токоферола мы попытались проверить правильность предложенной схемы (рис. 17). В результате установили, что

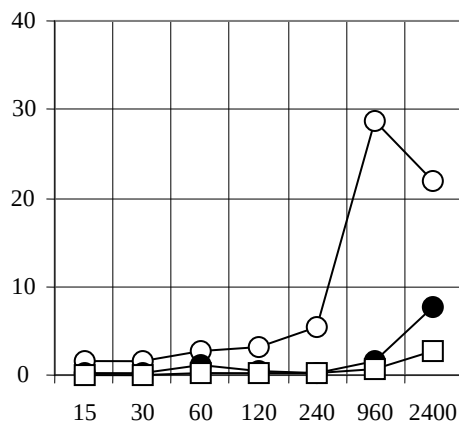


Рис. 17. Образование продуктов окисления $[^3\text{H}]$ - α -токоферола в процессе аутоокисления печени суточных цыплят (y — радиоактивность в % от радиоактивности добавленного $[^3\text{H}]$ - α -токоферола; x — время аутолиза; o-o — α -токоферил-хинон+s5; ●-● — s6, □-□ — α -токоферилгидрохинон)

в процессе инкубации в качестве конечного продукта образуется s6. При этом путь от α -токоферола идет через α -токоферилхинон и s4. Безусловно необходимы более детальные исследования, в том числе по установлению точной структуры ключевых метаболитов.

Таким образом, судя по приведенным выше рассуждениям, согласование активностей дыхания и гликолиза, по крайней мере, в печени, может происходить за счет изменения интенсивности

глюконеогенеза из лактата с регуляцией путем изменения соотношения в клетке пирувата и ацетил-Ко А.

Механизмы согласования дыхания и гликолиза до сих пор доподлинно неизвестны, однако описаны состояния клетки, которые демонстрируют результаты проявления таких механизмов (рис.18).

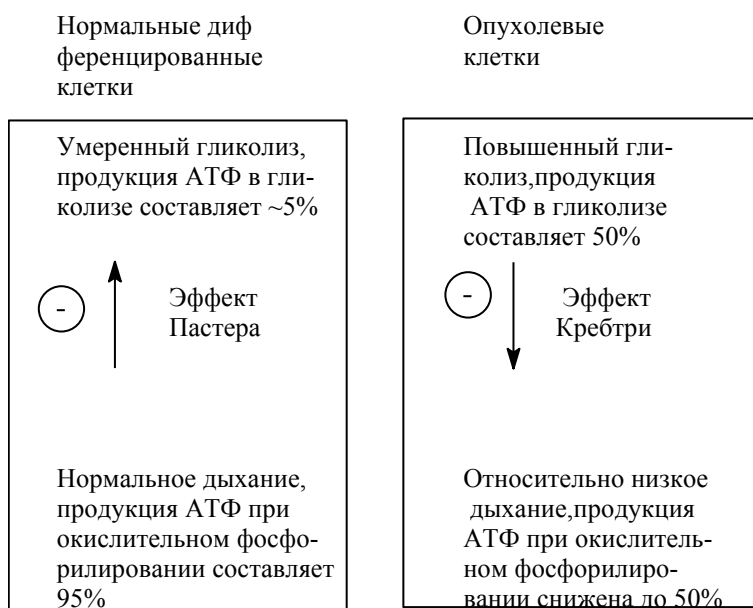


Рис.18. Согласованность гликолиза и дыхания в нормальных и опухолевых клетках (Евтодijenко и др.,1996)

В раковых клетках усилен гликолиз и относительно низка активность дыхания и окислительного фосфорилирования. При этом высокий гликолиз коррелирует с высокой скоростью роста клеток и интенсивностью биосинтеза макромолекул и является характерным признаком быстро пролиферирующих клеток. Эффект Пастера отражает основной принцип согласования дыхания и гликолиза (дыхание блокирует гликолиз). Кребтри обнаружил, что при добавлении глюкозы к срезам опухолей происходит угнетение потребления кислорода. В норме глюкоза кратковременно активирует дыхание. Эффект Кребтри в какой-то степени проявляется и в нормальных клетках. Одна из последних интерпретаций эффекта Кребтри заключается в привлечении к его объяснению знаний о регулирующей роли Ca^{2+} (Евтодijenко и др.,1996):

Эффект Пастера демонстрирует лишь факт наличия согласования дыхания и гликолиза в клетках. Ведущая роль в этой связке без сомнения принадлежит сопряженному дыханию, как

энергетически резко более выгодному процессу. К настоящему времени исследовано много регуляторных моментов указанной взаимосвязи и все же не считается, что механизм согласования дыхания и гликолиза твердо установлен. Имеет смысл рассматривать вопрос согласования дыхания и гликолиза с позиций антагонистических отношений гликолиза и глюконеогенеза в связи с интенсивностью снабжения клетки кислородом, когда ишемия активирует гликолиз, ингибируя глюконеогенез (Ньюсхолм и др.,1977). Это возможно при разделении гликолиза и глюконеогенеза за счет компартментализации. Согласно теории компартментализации глюкокиназа и глюкозо-6-фосфатаза никогда не проявляют свою активность одновременно, так как они локализованы в различных, разделенных мембраной клеточных пространствах. В современном понимании не обязательно для обеспечения компартментализации необходимы мембранные образования (Липская,2001). Компартментализацию может обеспечивать микросреда, например около внутриклеточных поверхностей. Такую компартментализацию называют метаболической или функциональной. Она не имеет видимых границ, но сохраняет полную или частичную кинетическую изоляцию. Так или иначе механизм регуляции гликолиза и глюконеогенеза в общем виде может выглядеть, как это показано на рис.19.

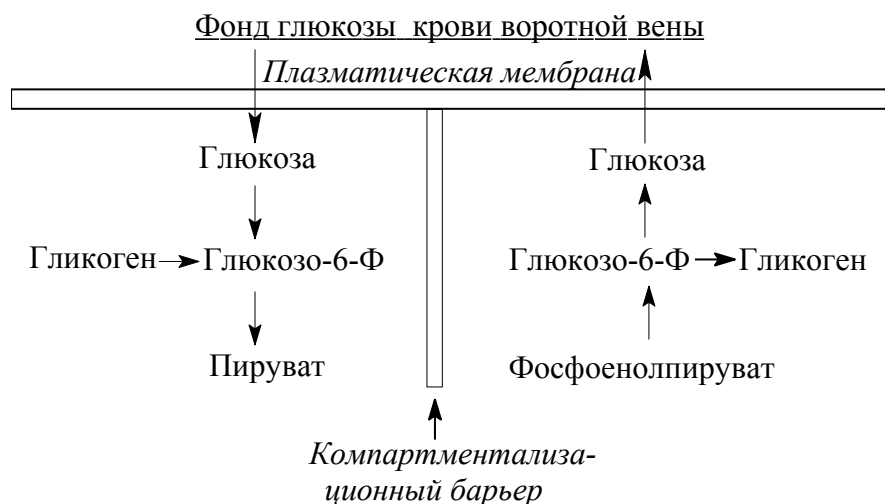


Рис.19. Компартментализация гликолиза и глюконеогенеза в печени (Ньюсхолм и др.,1977)

Возвращаясь к схеме субстратной регуляции гликолиза и глюконеогенеза (рис.16), следует обратить внимание на участок, связывающий всех трех участников согласования дыхания и гликолиза, включая глюконеогенез. Речь вновь идет о регуляции синтеза из субстратов гликолиза и вовлечения оксалоацетата в цикл Кребса и глюконеогенез (рис.20).

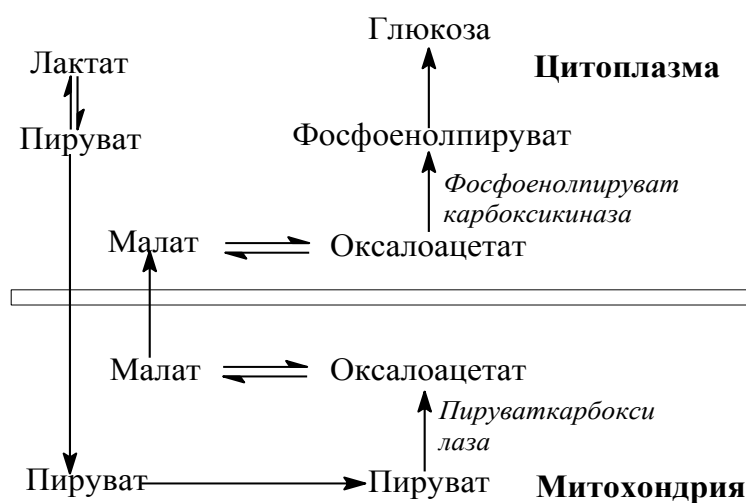


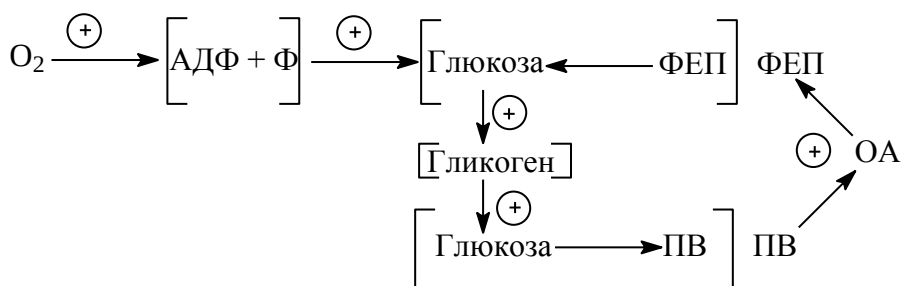
Рис. 20. Один из моментов субстратной регуляции уровней оксалоацетата внутри клетки (Ньюсхолм и др., 1977).

Вполне возможно, что учет неизвестной пока компартментализации, а также участия вторичных мессенджеров, таких как Ca^{2+} и/или активные формы кислорода, и полученные нами данные позволят создать удовлетворительную концепцию согласования дыхания, гликолиза и глюконеогенеза в биологических клетках, которая в настоящее время выглядит как эффект Пастера и, возможно, как результат сопряжения дыхания и глюконеогенеза тоже с неизвестным пока механизмом.

Очень часто большие дозы α -токоферола могут явиться источником повышенного количества в тканях α -токоферилхинона. В одном из таких случаев большая доза витамина Е (325 промилле) повысила уровень в плазме крови Са, Р и активность всех щелочных фосфатаз.

Если представить существенные связи в системе сопряженного дыхания, гликолиза и глюконеогенеза, то обнаруживается прямая

зависимость цикла окисления и восстановления фонда внутриклеточной глюкозы от дыхания.



где: ФЕП – фосфоенолпироват, ОА – оксалоацетат, ПВ – пироват.

Этот факт не вяжется с внешним проявлением эффекта Пастера (дыхание подавляет гликолиз). Удовлетворительное объяснение возможно лишь с точки зрения энергетического согласования. Рассмотрим две ситуации. Первая – минимальное потребление O_2 . В этих условиях поток АТФ из митохондрий минимален, антипорт АДФ также находится на минимуме. Дефицит АДФ для гликолиза отсутствует и окисление глюкозы усиливается. Вторая ситуация – усиление потребления O_2 митохондриями увеличивает поток АТФ в цитоплазму и эквимоларно антипорт АДФ в митохондрии, что ведет к дефициту АДФ для гликолиза, интенсивность которого падает.

Эффект Кребтри проявляется у патологически измененных клеток. Быстро проходящая фаза усиления дыхания при добавлении глюкозы, как известно, объясняется затратами АТФ на фосфорилирование глюкозы. Образовавшийся АДФ транспортируется в митохондрии и вызывает усиление дыхания до тех пор, пока АДФ не израсходуется. Появившийся АТФ в цитоплазму не транспортируется, вследствие чего прекращается использование эндогенных субстратов (аминокислот, жирных кислот) и окислению подвергается только глюкоза. Частичное (до 20%) ингибирование дыхания глюкозой наблюдается и в норме, что можно объяснить не столь большим, как в раковых клетках, нарушением антипорта АТФ в цитоплазму. Безусловно, эта гипотеза должна быть еще экспериментально подтверждена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Номенклатура ферментов. Рекомендации Международного биохимического союза (1972 г) с дополнениями по 1975 год. Москва, 1979.

2. Грищук С.В. Влияние внутримышечного введения α -токоферилхинона на связывание α -токоферола стенкой тонкого кишечника поросят. Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания сельскохозяйственных животных. Боровск, 1993, 281-283.
3. Дудин В.И., Двинская Л.М. Участие α -токоферола в синтезе кислых липидов в организме цыплят. Сельскохозяйственная биология, 1986, 5: 101-105
4. Душейко А.А. Витамин А, обмен и функции. Киев. Наукова думка., 1989.
5. Евтодченко Ю.В., Теплова В.В. Биологическое значение и механизмы реализации эффекта Кребтра в быстро пролиферирующих клетках. Роль ионов Ca^{2+} . Биохимия, 1996, 61, 11: 1995-2004.
6. Жарова Т.В. Распределение и утилизация экзогенного и эндогенного α -токоферилхинона в организме поросят. Автореферат кандидатской диссертации. Боровск, 1999.
7. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М: Химия, 1970: 150-152
8. Липская Т.Ю. Физиологическая роль кретинокиназной системы : эволюция представлений. Биохимия, 2001. 66, 2: 149-166.
9. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. М: Химия, 1974, т.1 и 2.
10. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М. Мир, 1977.
11. Шрайнер З., Фьюзон Р., Кертин Д., Моррилл Т. Идентификация органических соединений. М: Мир, 1983: 205
12. Draper H.H., Csallany A.S. Metabolism and Function of vitamin E. Fed. Proc., 1969, 28, 5: 1690-1695.
13. Frampton V., Skinner W.A., Bayley P.S. Some Oxidation Products of D, α -Tocopherol Obtained with Ferric Chloride. Science, 1952, 116, 11: 34-35.
14. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. The Journal of Biological Chemistry, 1957, 226: 497-509.
15. Hidioglou M. Effect of diet on the metabolism of labelled tocopherol in sheep. The British Journal of Nutrition, 1977, 37, 2: 215-225.
16. Hofman E. Dinamische Biochemie. Berlin, 1966.
17. Kates M. Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids. Amsterdam, London, New York, 1972
18. Krishnamurty S., Bieri J.G. The absorption, storage, and metabolism of alpha-tocopherol ^{14}C in the rat and chicken. J. of Lipid Research, 1963, 4, 3: 330-336.
19. Morrison W.R. A Fast, Simple and Reliable Method for the Microdetermination of Phosphorus in Biological Materials. Analytical Biochemistry, 1964, 7: 218-224.
20. Pascoe G.A., D.J. Reed. Relationship between Cellular Calcium and Vitamin E Metabolism during Protection against Cell Injury. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987, 253, 2: 287-296.
21. Pelissier M.A., Boiset M., Albrecht R. The effects of vitamin A nutritional status on microsomal lipid peroxidation and alpha-tocopherol level in rat liver. Experientia, 1989, 45: 342-343.

22. Plack P.A., Bieri J.G. Metabolic products of alpha-tocopherol in the livers of rats given intraperitoneous injections of ^{14}C -alpha-tocopherol. Biochem. et Biophys. Acta, 1964, 84: 729-738.
23. Stahl E. (ed). Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag, New-York, Inc., New York, 1969.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ α -ТОКОФЕРОЛА С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА (обзор)

В.И.Дудин

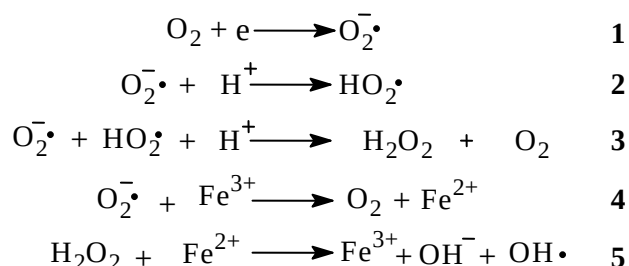
Лаборатория биологически активных веществ

В настоящее время в научной литературе происходит переосмысление роли активных форм кислорода в биологических процессах. α -Токоферол в реакциях с активными формами кислорода образует токофероксильный радикал, который затем реагирует с молекулярным кислородом. При этом, в качестве основного продукта выявляется α -токоферилхинон. Это физико-химическое проявление можно по всей видимости перенести на условия *in vivo*, как результат выполнения биологической функции активными формами кислорода (супероксид-анион радикал).

Несомненно, что кислород абсолютно необходим для существования высших организмов. В основном состоянии молекулярный кислород парамагнитен и, обладая двумя расположенными на разных орбиталях неспаренными электронами с параллельными спинами, фактически представляет собой бирадикал (Уайт и др., 1981). Молекулярный кислород легко вступает в реакцию с соединениями, содержащими одиночные неспаренные электроны. Взаимодействие с веществами, все электроны которых спарены, крайне затруднено из-за спиновых запретов. На этом основании реакции кислорода, находящегося в основном состоянии, протекают по свободнорадикальному механизму, поэтому большой интерес представляют исследования по изучению влияния гипероксии на Е-витаминный статус животных. Ряд полезных сведений получен в опытах на крысах, выдержанных в камерах с кислородом 99,5% чистоты (опыт *in vivo*), а также с плазмой крови, которую инкубировали с H_2O_2 (опыты *in vitro*) (Szabo et al., 1968). В опыте *in vivo* при экспозиции крыс в атмосфере кислорода концентрация токоферолов в плазме крови составляла $4,9 \pm 0,8$ мкг/мл (контроль— $5,9 \pm 1,2$), при экспозиции животных в атмосфере кислорода на фоне диеты без витамина Е в течение 5 суток концентрация была на уровне $2,8 \pm 0,6$

мкг/мл (контроль – $3,5 \pm 0,6$). В то же время, инкубация плазмы с H_2O_2 приводила к практически полному разрушению витамина Е.

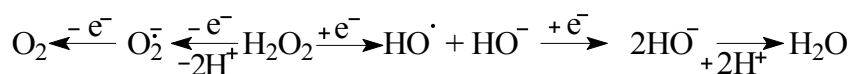
Перекись водорода (H_2O_2) может появляться при многих вариантах одноэлектронного восстановления кислорода (Уайт и др., 1981):



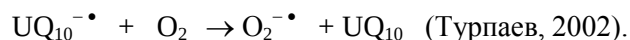
Супероксид-анион может протонироваться до гидроперекисного радикала (2). Следующая реакция (3) представляет собой спонтанную дисмутацию, приводящую к образованию $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Совокупность всех выше приведенных реакций дает основание думать, что любая система, продуцирующая супероксиданион вскоре будет продуцировать и перекись водорода. Железосодержащие соединения (4; 5 и 5 – реакция Фентона) могут катализировать реакцию между супероксиданионом и перекисью водорода с образованием гидроксидного радикала, крайне токсичного продукта, обладающего мутагенными свойствами и появляющегося в результате ионизирующего излучения.

В организме кислород в результате одноэлектронного восстановления дает супероксиданион ($\text{O}_2^{\bullet -}$) и гидроксильный радикал ($\text{HO}^{\bullet}$) (Ullrey, 1981). Эти токсические продукты играют роль в разрушении бактерий полиморфноядерными лейкоцитами и альвеолярными макрофагами, однако клетки тканей должны быть защищены от их губительного действия. В организме функционирует несколько систем защиты. К ним относят супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу (селен-зависимую и селен-независимую), а также тушители свободных радикалов, такие как α -токоферол, включающиеся в клеточную мембрану.

Опасность перекиси водорода состоит в ее двойственной природе в связи со способностью к окислительным и к восстановительным реакциям (Самуилов и др., 1999):



В клетках эукариот образование активных форм кислорода происходит в реакциях, катализируемых НАД(Ф)Н-оксидазой и некоторыми другими специализированными оксидазами (Турпаев, 2002). Подъем клеточного синтеза активных форм кислорода выше определенного уровня ведет к окислительному стрессу, сопровождающемуся интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификацией белков и нуклеиновых кислот, что опасно для жизнеспособности клеток. В низких концентрациях активные формы кислорода действуют как вторичные мессенджеры, передающие сигнал от межклеточных сигнальных молекул и их мембранных рецепторов на контролирующую экспрессию генов регуляторные системы. Кроме активных форм кислорода такую роль выполняет окись азота (NO), которая вступает в реакцию с $O_2^{\cdot -}$ и другими свободными радикалами с образованием высокоактивных промежуточных соединений. При окислительном фосфорилировании 1% кислорода восстанавливается в $O_2^{\cdot -}$. Одним из основных поставщиков супероксида в митохондриях является неферментативное окисление полувосстановленного убихинона ($UQ_{10}^{\cdot -}$):



Неконтролируемое образование $O_2^{\cdot -}$ происходит как неизбежный побочный процесс в реакциях гидроксилирования через цитохром P₄₅₀. В реакциях, катализируемых НАД(Ф)Н-оксидазой, ксантинооксидазой, индоламинодиоксигеназой, $O_2^{\cdot -}$ образуется в качестве одного из основных продуктов. Перекись водорода (H_2O_2) образуется при двухэлектронном восстановлении кислорода, что происходит в реакциях с участием оксидазы L-аминокислот, альдегиддегидрогеназы, 5-монооксигеназы, супероксиддисмутазы. В отличие от $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 может свободно проникать через клеточные мембраны. Транскрипционный ответ клеток на воздействие активных форм кислорода обусловлен активизацией МАП-киназ и подчиненных им факторов транскрипции (Турпаев, 2002). Согласно современным представлениям (Гольдштейн, 2002), в свободнорадикальных патологиях повреждающее действие кислорода обусловлено не столько $O_2^{\cdot -}$, сколько продуктами его дальнейшего преобразования H_2O_2 , $HO^{\cdot}$, а также $^1O_2$ и радикалами, появляющимися при распаде гидроперекисей. Несмотря на это, однако, супероксиданион является родоначальником большинства из указанного ряда активных форм кислорода и прочих свободных радикалов. В здоровой клетке поддерживается оптимальное соотношение между продукцией и улавливанием $O_2^{\cdot -}$. В последнее время роль $O_2^{\cdot -}$ в биологических процессах основательно пересматривается (Калуев, 1998). В частности,

стало известно, что супероксиданион радикал (Смирнова и др., 2002) стимулирует деление клетки, активирует апоптоз. Программируемая клеточная смерть у животных имеет 2 формы: апоптоз и парптоз (Самуилов и др., 2002), которые различаются по морфологическим и биохимическим критериям и ответом на действия ингибиторов апоптоза. Ядерная фрагментация и образование везикул не наблюдаются при парптозе. Апоптоз у животных сопровождается переходом фосфатидилсерина из внутреннего слоя плазматической мембраны в наружный, уменьшением объема клетки, появлением пузырьвидных выростов плазматической мембраны, уплотнением ядра, межнуклеосомными разрывами ядерной ДНК с последующим распадом ядер на части, фрагментацией клетки (апоптозные тельца), фагоцитируемых макрофагами и клетками-соседями. Установлено, что инициация апоптоза в листьях растений зависит от сочетанного действия активных форм кислорода и восстановленных хинонов цепи переноса электронов. Апоптоз (фрагментация ДНК) стимулируют также перекиси. Апоптоз, контролируемый активными формами кислорода может модулироваться анти- и прооксидантами (Замятина и др., 2002). Уровень продукции супероксида у больных гиперхолестеринемией АП в 4-5 раз больше, чем у здоровых людей (Куликов и др., 2002). Исследовалась роль фактора некроза опухолей- α и активации сфингомиелинового цикла в индукции апоптоза в условиях ишемии/реперфузии печени (Алесенко и др., 2002). Ишемия, наблюдающаяся при инсультах и инфарктах, сопровождается нарушениями, протекающими по типу апоптоза. Сигнальные пути, по которым ишемия с последующей реперфузией вызывает апоптоз, могут включать секрецию фактора некроза опухолей- α , генерацию церамида и инициацию ПОЛ. Супероксид является при этом сигнальной молекулой внутри сфингомиелинового пути. На модели этиолированных проростков пшеницы показано, что при некоторых условиях в водной среде ионол (бутилгидроокситолуол) взаимодействует с кислородом с образованием супероксида (Смирнова и др., 2002). Ионотропные рецепторы обеспечивают ингибирование Na/K АТФ-азы преимущественно через внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (Булыгина и др., 2002). Метаботропные рецепторы действуют через протеинкиназу C, чувствительность которой к субстрату в высокой степени зависит от α -токоферола (Мальцева и др., 1998). Указанные действия являются обратимыми, что указывает на возможную реализацию этих механизмов при функционировании нейронов. Одним из характерных признаков апоптоза является снижение электрического потенциала на внутренней мембране митохондрий, что объясняется открытием кальциевой поры и индукцией неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны (Галитовский и др., 2001). Необходимым условием этого

является накопление в митохондриях ионов кальция. Количество ионов, которое требуется для открытия поры, зависит от агентов, индуцирующих неспецифическую проницаемость (активные формы кислорода). Несмотря на благотворное действие супероксиданиона, существуют данные (Вартанян и др., 2000), что в связи с увеличением концентрации активных форм кислорода отмечается экстремальное увеличение активности (Cu, Zn) супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы до момента, после которого скорость образования активных форм кислорода не компенсируется повышением активности обезвреживающих ферментных систем. Быстрее всего этот баланс нарушается в ядрах и микросомах. Митохондрии представляют собой наиболее стабильные структуры клетки. Этот факт может быть связан с тем, что митохондриальное дыхание является основным антикислородным фактором в антиокислительной системе организма (Лю, 2001). Нарушения в дыхании и разобщение окислительного фосфорилирования ведут к окислительному стрессу.

Есть доказательства (Гольдштейн и др., 2002), подтверждающие важную биологическую роль $O_2^- \cdot$ атмосферного воздуха. Возникновение атмосферных ионов связано с действием естественных ионизаторов. При использовании радиоактивного источника α -излучения, основными продуктами ионизации являются «легкий» ион $O_2^- \cdot$ и его кластеры вида $O_2^- \cdot \times (H_2O)_n$, где $n = 1-3$. Вообще считается (Лю, 2001), что эволюционно повышение количества кислорода в атмосфере способствовало формированию многоуровневой антиокислительной системы, в связи с жизненной необходимостью поддерживать определенный баланс прооксидантов и антиоксидантов в организмах.

К фотосенсибилизированным продуктам относится синглетный кислород ($^1O_2$). Он образуется при особых условиях и может находиться в 2-х возбужденных синглетных состояниях, не содержащих неспаренных спинов, и следовательно свободных от спиновых запретов, препятствующих взаимодействию с ковалентными соединениями. Синглетный кислород – это крайне токсичный продукт, но в животном организме он вряд ли играет существенную роль (Willis, 1983). Синглетный кислород может образовываться в растворах птеринов и флавинов за счет импульсного лазерного возбуждения с высокой фотосенсибилизирующей активностью испытанных веществ (Егоров и др., 1999). Показано (Fragata et al., 1980), что α -токоферол способен снижать концентрацию синглетного кислорода за счет перевода его в невозбужденное состояние. В участках мембраны с диэлектрической постоянной равной 25, α -токоферол, прежде чем вступить в необратимую реакцию, успевает дезактивировать до 40

молекул синглетного кислорода, причем в более гидрофобных областях биомембраны эффективность α -токоферола, как тушителя, оказывается еще выше. Полагают (Gogman et al., 1985), что существует 2 механизма тушения синглетного кислорода витамином Е: физический и химический. Баланс между ними зависит от моментов спин-орбитального сопряжения и энтропийных факторов.

В опытах на мембранах митохондрий печени установлено (Dean et al., 1987), что α -токоферол обеспечивает защиту моноаминоксидазы от активных форм кислорода, образующихся при радиоллизе воды. При повышенном содержании в мембранах α -токоферола разрушение ферментного белка уменьшается в 2-3 раза. К интересным системам антиокислительной защиты организма можно смело отнести H_2O_2 - сенсоры (Скулачев, 2001). В нейроэпителиальных тельцах легких и каротидного синуса присутствуют сенсоры, отслеживающие уровень H_2O_2 . Эти системы локализуются в плазматических мембранах и состоят из НАДФН-оксидазы и K^+ -канала, активируемого перекисью водорода.

Образование конъюгированных диенов происходит в результате взаимодействия полиненасыщенных жирных кислот, например с синглетным кислородом (рис. 1).

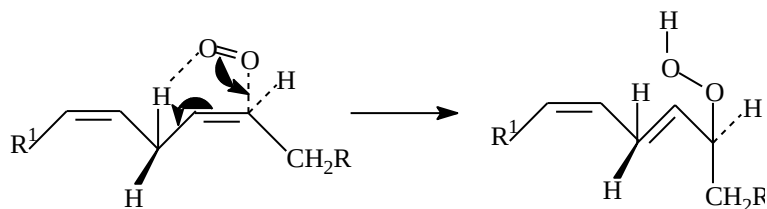


Рис.1 .Схема образования конъюгированных диенов (Thomas et al., 1980)

Образование конъюгированных диенов является процессом довольно случайным, так как в реакции с синглетным кислородом образуются также неконъюгированные диены (рис. 2).

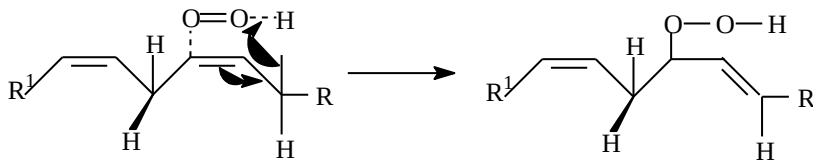


Рис.2. Схема образования неконъюгированных диенов (Thomas et al., 1980)

В том и другом случаях образуются преимущественно цис, транс – изомеры. Образование α -токоферилхинона происходит также в реакции α -токоферола с супероксиданионом (рис.3). При этом супероксид выступает в качестве катализатора (Matsuo et al.,1987). В апротонных растворителях он действует как основание Бренстеда, вырывая протон фенольной группы с образованием хроманолат-аниона. После отрыва протона гидроксильной группы α -токоферола супероксидный радикал дисмутирует. Окисление аниона молекулярным кислородом приводит к образованию перокси-аниона, который протонируется в гидроперекись, а та, в свою очередь, через стадию гидроксида превращается в бензохинон (α -токоферил-хинон). Существуют также иные, катализируемые супероксидом, пути

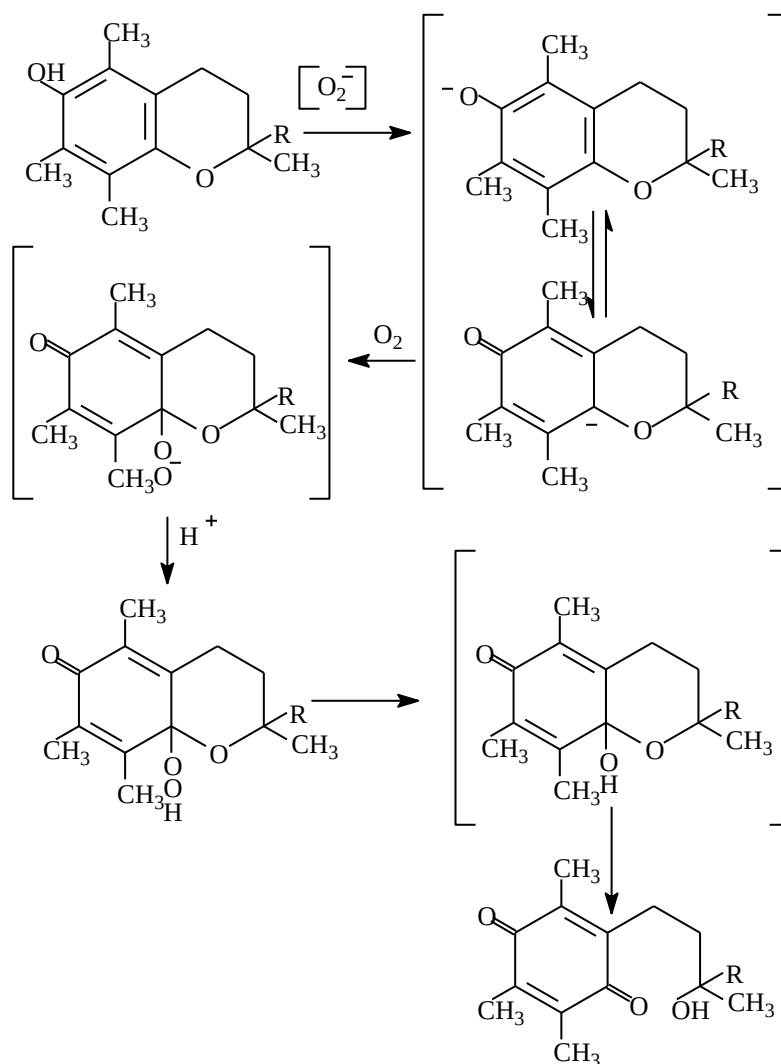
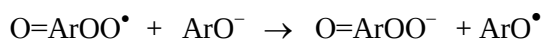
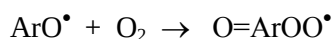
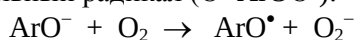


Рис 3. Реакция α -токоферола с супероксиданионом (Matsuo et al.,1987)

оксигенации α -токоферола через стадии образования эпоксидов, однако в биологических объектах доказано присутствие лишь α -токоферилхинона. В то же время все иные пути и соединения могут иметь место на промежуточных этапах превращений α -токоферола в тканях. Среди прочих химических продуктов, таких как эпоксиды, α -токоферилхинон образуется в реакциях α -токоферола с синглетным кислородом (Nuly et al.,1988). Основным моментом реакции является

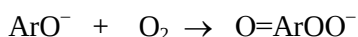
взаимодействие хроманолят-аниона с молекулярным кислородом. На этот счет предложено 3 возможных механизма катализируемого щелочью окисления фенолов. По 1-ому механизму (механизм Рассела) перенос электронов между фенолят-анионом (ArO^-) и молекулярным кислородом приводит к усилению образования феноксильных ($\text{ArO}^\bullet$) и супероксидных радикалов. В результате взаимодействия феноксильного радикала с молекулярным кислородом возникает [оксоциклогексадиенил]пероксильный радикал ($\text{O}=\text{ArOO}^\bullet$):



Согласно механизму 2, пероксианион образуется в результате рекомбинации феноксильного и супероксидного радикалов:



Механизм 3 основывается на перестройке нарушенных π^* -орбиталей молекулярного кислорода в результате раздвоения уровня, вследствие чего повышенные орбитали занимаются анионом, что сопровождается обращением спина и образованием перокси-аниона:



Для катализируемой супероксид-анионом оксигенации хроманолят-аниона механизм 1 исключается. Для α -токофероксильного радикала наблюдается невысокая активность в отношении молекулярного кислорода. Предпочтительно оксигенация протекает по механизмам 2 и 3.

Судя по всему, биологическая функция α -токоферола состоит в образовании токофероксильного радикала. Такая возможность в литературе отражена (Bourgeois, 1981). α -Токофероксильный радикал очень быстро образуется в реакции с другими свободными радикалами. Появившийся свободный радикал α -токоферола восстанавливается за счет аскорбиновой кислоты до α -токоферола. Включенный в мембраны α -токоферол может подвергаться ферментативному превращению в α -токофероксильный радикал, который включается в состав лецитиновых липосом и субклеточных мембран (Mehlhorn et al., 1989). При этом аскорбиновая кислота препятствует образованию токофероксильных радикалов. С

увеличением размеров боковых алкильных групп у токофероксильных радикалов резко уменьшается скорость их реакции с аскорбатом (Mikai et al., 1989). Свободнорадикальное состояние характерно также для самой аскорбиновой кислоты (Евстигнеева, 1998). Как уже сообщалось, синтетический антиоксидант ионол при некоторых условиях способен инициировать появление супероксиданион радикала (Смирнова и др., 2002). Восстановленный глутатион в аэробных условиях через образование глутатионильного радикала продуцирует синглетный кислород (Sies, 1988). Таким образом, похоже, что в истории изучения витамина Е и в антиоксидантной теории вообще возникает новый поворот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алесенко А.В., Гальперин Э.И., Дудник Л.Б., Коробко В.Т., Мочалова Е.С., Платонова Л.В., Шингарова Л.Н., Шона Н.М., Шупик М.А. Роль фактора некроза опухолей и активации сфингомиелинового цикла в индукции апоптоза в условиях ишемии/реперфузии печени. Биохимия, 2002, 67, 12: 1632-1642.
2. Булыгина Е.Р., Ляпина Л.Ю., Болдырев А.А. Активация глутаматных рецепторов ингибирует Na/K – АТФазу гранулярных клеток мозжечка. Биохимия, 2002, 67, 9: 1209-1214.
3. Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Лозовская Е.Л., Бурлакова Е.Б. Измерение скорости образования супероксидных радикалов и активности супероксиддисмутазы в субклеточных органеллах печени мышей при низкоинтенсивном облучении в малых дозах. Биохимия, 2000, 65, 4: 522-527.
4. Галитовский В.Е., Гогвадзе В.Г. Исследования Ca^{2+} – аккумулярующей способности митохондрий тимоцитов при апоптозе. Биохимия, 2001, 66, 6: 775-779.
5. Гольдштейн Н. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды. Биохимия, 2002, 67, 2: 194-204.
6. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран. Биологические мембраны, 1998, 15, 2: 137-167.
7. Егоров С.Ю., Красновский А.А., мл. Баштанов М.Е., Миронов Е.А., Людникова Т.А., Крицкий М.С. Исследование фотосенсибилизации образования синглетного молекулярного кислорода птеринами и флавинами методом разрешенного во времени измерения фосфоресценции кислорода при лазерном возбуждении. Биохимия, 1999, 64, 10: 1325-1330.
8. Замятина В.А., Бакеева Л.Е., Александровская Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз в первом листе у этиолированных проростков пшеницы: влияние антиоксиданта ионола (ВНТ) и перекисей. Биохимия, 2002, 67, 2: 253-264.
9. Калувев А.В. К вопросу о регуляторной роли активных форм кислорода в клетке. Биохимия, 1998, 63, 9: 1305-1306.
10. Куликов В.И., Музя Г.И. Влияние фактора активации тромбоцитов, его клеточных аналогов и антагонистов на образование супероксидных

радикалов лейкоцитами крови здоровых людей и больных гиперхолестеринемией. Биохимия, 2002, 67, 6: 798-803.

11. Лю Б.Н. Кислородно-пероксидная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма. Успехи современной биологии, 2001, 121, 5: 488-501.
12. Мальцева Е.А., Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б. Природный (α -токоферол) и синтетический (калиевая соль фенозана), как регуляторы активности протеинкиназы С в широком диапазоне концентраций (10^{-4} – 10^{-20} М). Биологические мембраны, 1998, 15, 2: 199-212.
13. Самуилов В.Д., Лагунова Е.М., Дзюбинская Е.В., Изюмов Д.С., Киселевский Д.Б., Макарова Я.В. Участие хлоропластов в программируемой гибели клеток у растений. Биохимия, 2002, 67, 6: 757-765.
14. Самуилов В.Д., Безряднов Д.В., Гусев М.В., Киташов А.В., Федоренко Т.А. H_2O_2 ингибирует рост цианобактерий. Биохимия, 1999, 64, 1: 60-67.
15. Скулачев В.П. H_2O_2 -сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма. Биохимия, 2001, 66, 10: 1425-1429.
16. Смирнова Е.Г., Любимов Ю.И., Малинина Т.Г., Любимова Е.Ю., Александровская Н.И., Ванюшин Б.Ф., Колесова Г.М., Ягузинский Л.С. Ионол (БНТ) продуцирует супероксиданион. Биохимия, 2002, 67, 11: 1539-1544.
17. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. Биохимия, 2002, 67, 3: 339-352.
18. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. М.: Мир, 1981, т.1: 336-337.
19. Bourgeois C.F. Propriétés antioxygènes des tocopherols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses. Revue Française des Corps Gras, 1981, 28, 9: 353-356.
20. Dean R.J., Cheeseman K.H., Kevin H. Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environments. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1987, 148, 3: 1277-1282.
21. Fragata M., Bellamare P. Model of singlet oxygen scavenging by α -tocopherol in biomembranes. Chem. and Phys. Lipids, 1980, 27, 2: 93-99.
22. Gorman A.A., Hamblet J., Standen M.C. The mechanism of reaction of singlet oxygen with vitamin E. Primary Photoprocesses Biol. and Med. Proc. Nato ADV. Study Inst. Bressanone, 16-28 Sept. 1984. London, 1985, 4: 201-203.
23. Nuly W.C., Martin G.M., Barker S.A. Products and relative reaction of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. Photochem. and Photobiol., 1988, 48, 4: 423-428.
24. Matsuo M., Matsumoto S. Oxidations of Vitamin E (α -Tocopherol) and Its Model Compound 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-ol in the Presence of the Superoxide Radical Solubilized in Aprotic Solvents: Unique Epoxidation and Recyclizations. J.Org.Chem., 1987, 52: 3514-3520.
25. Mehlhorn R., Sumida S., Packes L. Tocopheroxyl radical persistence and tocopherol consumption in liposomes and in vitamin E-enriched rat liver mitochondria and microsomes. J.Biol. Chem, 1989, 264, 23: 13448-13452.

26. Mikai K., Nishimura M., Ishizu K., Kitamura Y. Kinetic study of the vitamin C with vitamin E radicals (tocopheroxyls) in solution. *Biochim. et Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 1989, 991, 2: 276-279.
27. Sies H. Antioxidant defense: glutathione, selenium and vitamin E. *J. Cell Biochem.*, 1988. Suppl., 12A, 31.
28. Szabo S.J., Mengel C.E. Effect of Diet and In Vivo Hyperoxia on Plasma Tocopherol Levels. *The American J. of the Medical Sciences*, 1968, 255: 132-136.
29. Thomas M.J., Prior W.A. Singlet Oxygen Oxidation of Methyl Linoleate: Isolation and Characterisation of the NaBH_4 – reduced Products. *Lipids*, 1980, 15: 7.
30. Ullrey D.E. Vitamin E for swine. *J. of Animal Science*, 1981, 53: 4.
31. Willis R.J. Lysis of vitamin E deficient rat erythrocytes by rat liver microsomes in on NADPH-dependent process in the presence of inhibitors of lipid peroxidation. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983, 61, 1: 139-145.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В ПРОЦЕССЕ ВЭЖХ

М.В. Брусков

Лаборатория биологически активных веществ

В работе исследовали возможности спектрофотометрического детектирования водорастворимых витаминов, разделяемых методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии. Большинство из изученных витаминов (аскорбиновая кислота, тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, пиридоксин, ниацин, цианкобаламин, фолиевая кислота) имеют УФ-спектры поглощения с выраженными максимумами, что может быть использовано для их количественного определения с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Некоторая неясность возникла при анализе кормового и фармакопейного препаратов витамина B_6 , в которых обнаружены два соединения, имеющие разную хроматографическую подвижность, но принципиально схожие УФ-спектры. Отсюда следует, что в фармакопейном препарате, названном пиридоксин, помимо последнего, содержится продукт его окислительного превращения - пиридоксаль, карбонил которого гораздо менее полярен, чем гидроксильная группа пиридоксина. В результате исследований отработана схема детектирования водорастворимых витаминов при использовании метода ВЭЖХ.

Введение

Контроль витаминного питания животных является едва ли не самым уязвимым звеном при производстве продуктов животноводства, ввиду чрезвычайной сложности методов анализа и широкого спектра нарушений метаболизма при недостатке или несбалансированности витаминного питания. Ситуация осложняется еще и тем, что для большинства витаминов существуют клинически слабо проявляющиеся гипо- и гипervитаминозы, часто на фоне практически нормальных уровней этих витаминов в крови. В связи с этим, необходима разработка простых и информативных способов биохимического контроля содержания в кормах рациона животных водорастворимых витаминов. Эта работа предполагает отбор метаболических тестов по критерию информативности о содержании тех или иных витаминов в организме. В настоящее время анализ все еще ведется с применением микробиологических способов, требующих больших затрат труда и средств для организации рабочего места и поддержания в чистоте штаммов микроорганизмов, а также разнообразных химических анализов, в том числе использующих ядовитые соединения (например, цианистый бром при анализе ниацина по реакции Кенига). В этой связи перед нами стояла задача разработать метод одновременного определения наибольшего числа водорастворимых витаминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материал и методы

В работе использовали высокоэффективный жидкостный полуавтоматический хроматограф "Милихром-4" (ПО НАУЧПРИБОР, г. Орел) с УФ спектрофотометрическим детектором (190-360нм). Хроматографическая колонка (120x2 мм) была заполнена обращенной фазой: силасорб SPH C₁₈ с диаметром частиц 6,0 мкм. Элюентом служил водный метанол (10 или 20% воды в метаноле). В качестве стандартов использовали готовые растворы фармакопейных препаратов.

Результаты и обсуждение

Одновременное определение широкого спектра водорастворимых витаминов является крайне сложной задачей, ввиду больших различий их физико-химических свойств, решение которой возможно только путем изменения классической схемы анализа витаминов. Для начала изучили возможности самого распространенного детектора - спектрофотометрического. С этой целью определяли УФ-спектр поглощения витаминов в этом потоке, с

автоматическим вычетом фона в максимуме выхода против поглощения в остановленном потоке элюента, когда выход витамина из колонки уже закончился. Знание всей полосы поглощения позволяет планировать программу детектирования как дополнительного средства разделения определяемых витаминов.

УФ-спектр тиамин (витамина В₁) имеет максимум при 292 нм и большое остаточное поглощение (210 нм) с инфлексией при 240 нм (рис. 1). Использование детектирования тиамин при 210 нм нецелесообразно из-за большого поглощения фона. Наиболее пригодным для анализа оказывается пик с максимумом при 294 нм. Здесь возможен анализ по разнице между максимумом и минимумами (256 и 320 нм), что довольно часто применяется в чисто спектрофотометрических измерениях концентрации хорошо поглощающих веществ в присутствии мешающих соединений. В классических исследованиях измерение количества тиамин обычно проводят после его окисления в тиохром. Последний определяют с помощью флуоресцентного метода, чувствительность которого очень высока. При достаточном концентрировании исходного раствора витамина чувствительность метода его определения ВЭЖХ также может быть вполне удовлетворительной.

УФ-спектр рибофлавин (витамин В₂) имеет 2 четко выраженных максимума (224 и 266 нм) с примерно одинаковой интенсивностью поглощения (рис. 1). Это обстоятельство можно использовать как дополнительный фактор идентификации при разделении смеси витаминов. В классическом варианте рибофлавин определяют флуоресцентным методом, для чего не требуется модифицировать молекулу витамина. Флуоресцентный детектор также может быть использован в анализе. В этом случае ход анализа смеси водорастворимых витаминов может включать смену детекторов, что также является дополнительным фактором идентификации при разделении смеси витаминов.

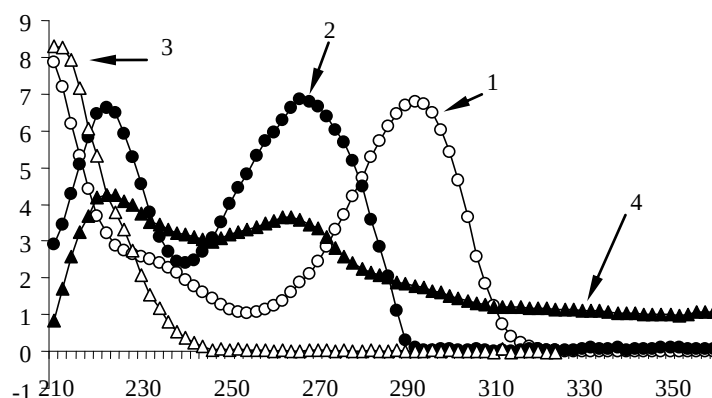


Рис. 1. УФ-спектр поглощения 1 - тиамина, 2 - рибофлавина, 3 - пантотеновой и 4 - никотиновой кислот в остановленном потоке элюента (х-длина волны, нм; у-абсорбция)

УФ-спектр пантотеновой кислоты в пределах представленных длин волн имеет максимум при 210 нм и выглядит как остаточный. Последнее обстоятельство не является слишком обнадеживающим фактом, ввиду большого поглощения фона в этой области спектра.

УФ-спектр никотиновой кислоты имеет 3 максимума поглощения – 2 мажорных (222 и 264 нм) и 1 минорный (356 нм). Для исследований количества никотиновой кислоты наиболее подходящим является детектирование этого витамина при 264 нм. В классических вариантах никотиновая кислота определяется с помощью реакции Кенига (с использованием ядовитых веществ) или микробиологическим методом.

В фармакопейных и кормовых препаратах витамина В₆ было обнаружено 2 вещества – полярное (350 мкл) и менее полярное (550 мкл) (рис. 2), имеющие похожие УФ-спектры поглощения (рис. 3). Фармакопейный препарат, названный пиридоксином, в большем количестве содержит полярный агент. Что касается другого вещества, менее полярного, то им может оказаться пиридоксаль, альдегидная группа которого гораздо менее полярна, чем гидроксильная у пиридоксина. Наличие пиридоксаля в свежем препарате пиридоксина можно объяснить технологией получения пиридоксина, если на конечной стадии его синтезируют путем восстановления пиридоксаля. Очень возможно также, что между этими формами существует равновесие, независящее от того, каким способом вещества были получены. УФ-спектр пиридоксина имеет максимумы: мажорные при 214 и 290 нм и минорный при 330 нм. УФ-спектр пиридоксаля

принципиально не отличается от УФ-спектра пиридоксина: мажорные при 218 и 286 нм, минорный при 328 нм.

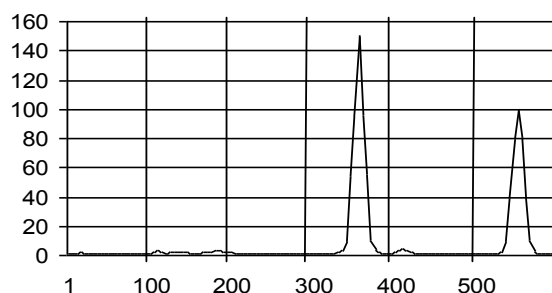


Рис. 2. ВЖХА поглощения в остановленном потоке элюента (20% метанола, 80% вода) препарата пиридоксина (х –объем элюента, у – концентрация).

УФ-спектр цианкобаламина не имеет четко выраженных максимумов (рис. 3). В то же время детектирование витамина можно вести при длинах волн, равных 278 нм или 360 нм, с предпочтением последней, ввиду того, что в этой зоне постороннее поглощение других витаминов не столь значительно.

УФ-спектр фолиевой кислоты имеет 1 мажорный (282 нм) и 1 минорный (350 нм) максимумы (рис.3). Безусловно, для детектирования витамина В₅ целесообразно использовать длину волны, равную 282 нм.

УФ-спектр аскорбиновой кислоты (витамин С) имеет только один максимум (268 нм) с минимумами при 210 и 310 нм (рис. 3). В классических вариантах определение витамина С ведут с использованием восстановительных свойств аскорбиновой кислоты или по образованию окрашенных озаонов при реакции с 2,4-динитрофенилгидразином: дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот. Впрочем эти реакции не являются очень чувствительными для определения витамина С, поэтому ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией может вполне конкурировать с классическими способами их определения.

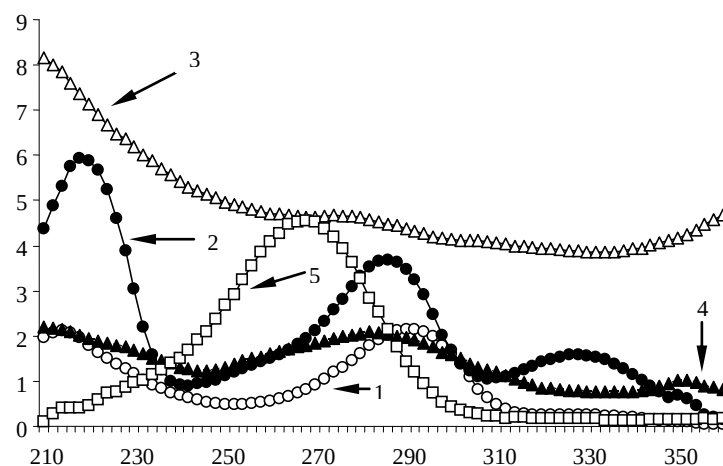


Рис. 3. УФ-спектры поглощения полярного (а) и менее полярного (б) компонентов фармакопейного препарата пиридоксин и пиридоксаль, цианкобаламина, фолиевой и аскорбиновой кислот в остановленном потоке элюента (х-длина волны, нм; у-абсорбция)

На основе результатов проведенных исследований, для определения широкого спектра витаминов рекомендовано использовать следующие длины волн спектрофотометрического детектора «Милихрома-4» (табл.1).

Таблица 1. Длины волн детекции водорастворимых витаминов

Витамины	Длины волн (нм) максимумов поглощения		
Тиамин (В ₁)			292*
Рибофлавин(В ₂)	222	266*	
Пантотенат (В ₃)	210*		
Никотинат(В ₅)	222	264*	
Пиридоксин	214*		290*
Пиридоксаль	218*		286*
Цианкобаламин(В ₁₂)		274*	328
Фолиевая кислота(Вс)		282*	360*
Аскорбиновая кислота (С)		268*	350

(*) рекомендуемые

Заключение

Таким образом, нами отработана первая стадия метода одновременного определения широкого спектра водорастворимых витаминов. Данный метод включает также стадию хроматографического разделения смеси витаминов с помощью обращенной фазовой ВЭЖХ. Проведенная в текущем году работа

важна тем, что получены УФ-спектры витаминов в конкретных условиях ВЭЖ хроматографии, поскольку приведенные в литературе максимумы поглощения получены в основном в водных растворах с различной реакцией сред. Обращеннофазовая ВЭЖХ предусматривает использование элюэнта на основе метанола, что требует корректировки УФ-спектров определения витаминов. Исследования по окончательной отработке метода продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А.: Справочник по биохимии, Наукова думка, Киев, 1971: 518-609

ВЛИЯНИЕ ТАННИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ИХ НЕГАТИВНОГО

ВЛИЯНИЯ: ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO

С.Ю. Гулюшин, Д.Н. Морозов

Лаборатории обмена энергии и пищеварения;

Е.В. Барашкова (аспирант отдела кормления ВНИТИП).

Многие виды зерна просяных культур, содержащие высокий уровень танинов, недостаточно эффективно используются в комбикормах для с.-х. животных и птицы. В работе, имитирующей пищеварение *in vitro*, показано, что конденсированные полифенольные антифиданты обладали выраженной способностью ингибировать активность пищеварительных ферментов у цыплят-бройлеров и коров. При этом наибольшее влияние на изменение активности оказали содержание танинов в среде (увеличение их концентрации на каждые 0,1 % способно в 2-5 раз ингибировать активность α -амилазы и липазы, но трипсина – лишь на 30-32 %), природа используемого субстрата, а также происхождение энзима.

Второй эксперимент позволил установить, что введение в среды некоторых свободных ферментолитантов имело протекционное действие против неконкурентного ингибирования танинами части пищеварительных ферментов. Концентрациями железа, лизина, метионина, глюкозы и глицерина, снижающими наполовину угнетение активности пищеварительных ферментов, являются значения, превышающие их нормальное содержание в дуоденум в 3,5; 4,6; 4,8; 7,1 и 8,2 раза, соответственно. В работе дается ряд практических рекомендаций, позволяющих снизить влияние дубильных веществ на организм животных.

Введение

Таннины (от фр. *tanner* – дубить кожу) – полифенольные метаболиты растений (производные биофлавоноидов), в практике кормления сельскохозяйственной птицы идентифицируются как антипитательные вещества или природные антифиданты (Дмитров и др., 1986, Метод. рекомендации..., 1999, Vernon et.al., 1999, Jimenez Ramsey et.al., 1994).

Известно, что высоким содержанием конденсированных дубильных веществ (0,41-0,87 %) филогенетически характеризуются просяные культуры семейств *Panicum*, *Echinochloa* и *Setaria*. После окультуривания растений это обстоятельство стало одним из главных факторов, тормозящих широкое использование зерна в комбикормах для птицы. Хотя работы, проведенные селекционерами, значительно снизили содержание таннинов как в семенах, так и в вегетативной массе, полностью эта проблема до сих пор не решена (Ермаков и др., 1987, Farrel et.al., 1999).

Многие птицеводческие хозяйства в целях сокращения затрат на корма строят мини-комбикормовые заводы и используют при приготовлении полнорационных кормосмесей фуражное зерно собственного производства, в том числе просяных культур (Метод. рекомендации..., 1999). Поэтому при включении такого зерна в комбикорма для птицы содержание таннинов (как фактора питания) будет возрастать пропорционально уровню введения «нетрадиционного» ингредиента в рацион, оказывая при этом выраженное негативное влияние на процессы пищеварения (Гулюшин и др., 2002, Bagliacca et.al., 1999).

Ряд работ указывает, что конденсированные полифенолы обладают «вяжущей» способностью, отнимая воду с поверхности клеток и тканей, и вызывают коагуляцию белков слизистой оболочки кишечника. Обладая Р-витаминной активностью, они уменьшают проницаемость капилляров и сосудов микроциркуляторного русла, нарушают циркуляцию крови в ворсинках пищеварительного тракта, что сопровождается снижением метаболических процессов в слизистой оболочке. В результате этого угнетается перистальтика кишечника и нарушается нервно-акцепторная регуляция пищеварения (Виноградов и др., 1998, Масевич и др., 1975).

В пищеварительном тракте танины образуют трудногидролизуемые комплексы с протеинами, углеводами, минеральными элементами и т.д., что снижает доступность для птицы структурного и энергетического материалов, большая часть которых транзитно выводится из организма (Гулюшин и др., 2002, Ермаков и др., 1987). В конечном итоге, все это существенно снижает питательную ценность корма, а угнетение роста и продуктивности птицы обычно бывает напрямую связано с концентрацией дубильных антифидантов в рационе (Ferket et.al., 1998, Elkin et.al., 1990).

Интервенция дубильных веществ «в тыл» организма чревата серьезными последствиями. Таннины и их основная составляющая – галловая кислота являются одним из наиболее сильных печеночных ядов, способных уже через 24 ч после дачи подопытным животным вызывать обширные интралобулярные некрозы печени. Поэтому при чрезмерном введении зерна просяных культур может угнетаться активность детоксицирующих ферментов и изменяться ферментный статус, вызывающие нарушение многообразных функций печени. При этом пероральной дозой таннинов, вызывающей 50 % гибель мышей, являлось 7,52 г/кг, для крыс ЛД₅₀ – 9,96 г/кг, а период их полувыведения из организма составлял около 3-7 ч (Кретович и др., 1973, Цариченко и др., 1982).

Негативная динамика серьезно усугубляется снижением активности пищеварительных ферментов дуоденум, которые подвержены аналогичным изменениям в желудочно-кишечном тракте. Таннины способны легко конденсироваться с апоферментами энзимов, имеющих белковую природу. Происходит изменение молекулярной конфигурации фермента, связывание их активных центров или простетических групп, что сопровождается потерей каталитической активности последних. Эффект неконкурентного ингибирования гидролаз, в свою очередь, эпатирует не только изменения в использовании питательных веществ, но и становится причиной алиментарных сдвигов, предопределяющих дальнейшие нарушения метаболизма птицы (Масевич и др., 1975, Черниговский и др., 1974, Farrell et.al., 1999).

Однако в литературе практически отсутствуют данные о том, использование каких эндогенных «приемов» и на сколько снижает негативное влияние полифенолов при наличии их в

рационе животных. Изучение данного вопроса явилось целью настоящего исследования.

Материал и методы

Исследование состояло из двух экспериментов, проведенных *in vitro* в лаборатории пищеварения ВНИИФБиП с.-х. животных. В качестве источников ферментов использовали сборный дуоденальный химус крупного рогатого скота (виварий ВНИИФБиП) и цыплят-бройлеров (виварий ЭПХ ВНИТИП), получавших хозяйственные рационы.

Определение активности пищеварительных ферментов [трипсина В (КФ 3.4.21.4), α -амилазы (КФ 3.2.1.1) и панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3)] проводили по принятым методикам (Методы..., 1997). В качестве субстратов использовали казеин по Гаммерсену, очищенный крахмал, липофундин С-20. В опыте жестко контролировали оптимальные значения pH (7,2-7,5), температуры (38,0 °C) и продолжительность реакций.

Опыт 1. Целью первого исследования явилось изучение сравнительного влияния разных концентраций таннинов на изменение активности пищеварительных ферментов (Е/л) двух видов животных и кинетики их катализа (K_m , K_i).

Для этого готовили рабочие растворы химуса КРС и бройлеров разведением их в 60 раз. Градации концентрации таннинов в инкубационных средах имитировали возможное их содержание в дуоденум животных при использовании в комбикормах зерна просяных культур. Для этого 1 мл раствора фармацевтического таннина – галло-дубильной кислоты (сокр. ГДК) добавляли к субстрату и энзиму так, чтобы их концентрация в пробах была равна 0,05-0,3 % (что соответствовало их содержанию в кормосмеси на уровне 0,1-0,8 %).

Опыт 2. Как было отмечено, таннины способны связываться с питательными веществами в трудногидролизуемые комплексы. Однако со свободными продуктами ферментолитического расщепления они конденсируются значительно лучше, чем с полимерными молекулами (Кретович и др., 1973). Принимая во внимание эти данные, во втором опыте в качестве технологического приема инактивации таннинов были использованы растворы нескольких наиболее распространенных гидролизантов, чтобы интенсификацией конденсации таннинов с повышенными уровнями свободных

продуктов ферментолиза «связать» последние. При этом уменьшающееся количество свободных таннинов в опытных растворах должно было в меньшей степени ингибировать изучаемые ферменты, по изменению активности которых можно судить об эффективности предполагаемого метода биоинактивации таннинов в пищеварительном тракте животных и птицы. Отметим также, что ферменты (в т.ч. пищеварительные) являются одним из наиболее чувствительных классов биологически активных веществ в организме, поэтому их способность лабильно отражать происходящие изменения можно с успехом положить в основу подобных оценок.

Во втором исследовании методическую часть эксперимента оставили прежней. Однако к субстрату с 1 мл таннина добавляли по 1 мл раствора глюкозы (1,0 %), L-лизина-Cl (0,45 %), D,L-метионина (0,15 %), глицерина (1,2 %) и Fe+2 (0,25 мг%). Концентрации указанных веществ в контрольных средах соответствовали их содержанию в дуоденальном химусе бройлеров. В опытных пробирках содержание увеличивали в 2 и 4 раза. После 5 мин выдержки и перемешивания в инкубационные среды вводили растворы дуоденального химуса.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что таннины способны в значительной степени ингибировать активность всех пищеварительных ферментов, независимо от вида животного (КРС или птица) (табл. 1).

Анализируя данные таблицы отметим, что в контрольных пробах активность дуоденальных гидролаз была на стабильно высоком уровне.

Таблица 1. Активность дуоденальных пищеварительных ферментов двух видов животных и их константа Михаэлиса (n=3)

ФЕРМЕНТ	Содержание таннинов в среде, %					Константа Михаэлиса (K _m), М/л
	K (0)	0,05	0,10	0,20	0,30	
Цыплята-бройлеры (49 дней)						
α-Амилаза, кЕ/л	310,7±13,5	203,2±15,0	127,1±6,3	96,3±4,9	21,4±1,9	6,02±0,02
	100	65,4**	40,9** *	31,0** *	6,9** **	×10 ⁻³
Трипсин, Е/л	74,4±8,6	52,5±3,2	50,7±5,2	44,0±3,7	37,1±3,9	2,73±0,29
	100	70,5*	68,2*	59,2*	49,8* *	×10 ⁻³
Липаза, мЕ/л	236,2±38,2	193,8±29,4	53,3±9,9	48,3±13,2	23,6±5,3	4,62±0,34
	100	82,0**	22,5**	20,4**	10,0*** ***	×10 ⁻³
Коровы 1-й фазы лактации						
α-Амилаза, кЕ/л	264,8±12,4	173,7±15,7	131,3±6,3	68,6±3,6	49,8±7,0	5,92±0,01
	100	65,6**	49,6** *	25,9** *	18,8*** ***	×10 ⁻³ ***
Трипсин, Е/л	70,2±8,1	48,5±3,0	43,5±4,4	41,5±3,7	34,3±2,6	2,19±0,20
	100	65,2*	58,5*	55,8*	46,1** **	×10 ⁻³
Липаза, мЕ/л	214,7±32,5	107,0±23,5	32,0±8,6	27,8±4,6	12,7±2,3	4,33±0,31
	100	49,8*	14,9** *	12,9** *	5,9** **	×10 ⁻³

* ... *** P ≤ 0,05 ... 0,001 (по сравнению с контрольной группой)

Так, один литр химуса животных за 1 минуту (в абсолютном исчислении через постоянную Авогадро) был способен образовывать более 15,9-18,7; 12,9-14,2 и 4,2-4,5 секстиллиона молекул мальтозы, пальмитиновой кислоты и тирозина, соответственно. Увеличение же концентрации дубильных веществ

на каждые 0,1 % сопровождалось ингибированием α -амилазы в 2-5 раз; липазы – в 3-5 раз, но трипсина – лишь на 30-32 %. Наибольшему ингибированию каталитической активности были подвержены панкреатические липаза и α -амилаза. Несмотря на разную природу, происхождение и исходную активность ферментов, в опыте отмечалась аналогичная динамика их ингибирования под влиянием высоких уровней конденсированных полифенолов – наложение двух динамических кривых красноречиво подтвердило это заключение. Так, уменьшение образования пальмитата и предельных декстринов из полимерных структур липофундина и крахмала начинало фиксироваться уже в первых опытных пробах. И в средах с максимальным содержанием (0,3 %) галлодубильной кислоты, находившейся в той же фазе, было ярко выражено, что обуславливало снижение активности данных ферментов в 5-15 и 10-15 ($P \leq 0,001$) раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Данные энзимологических исследований дополнил дисперсионный анализ, который показал, что влияние таннинов на угнетение активности липазы и амилазы находилось в пределах от 82 до 93 % ($P \leq 0,001$) всей совокупности внешних факторов. Несколько меньшее влияние оказал субстрат (6 %, $P \leq 0,05$), однако ни происхождение, ни вид фермента (за исключением α -амилазы) не оказали сколько-нибудь значимого и достоверного влияния.

Руководствуясь основными принципами энзимологии, на основании вспомогательных опытов, были рассчитаны ингибиторные константы для таннинов (по отношению к ферментам), что позволило глубже осмыслить обнаруженные в опыте изменения и выделить совокупность факторов, определяющих как степень, так и условия ингибирования пищеварительных ферментов конденсированными полифенолами (Досон и др., 1991, Иванов и др., 1974).

Ингибиторная константа таннинов K_i^{-1} , характеризующая интенсивность их присоединения к активным центрам (поляриметрический анализ), показала, что полифенольные вещества во всех случаях были очень «неравнодушны» ко всем дуоденальным энзимам ($18-20 \times 10^6$ /мкМ фермента) и чуть менее – к казеину ($16,2 \times 10^6$). Однако они полностью обделяли своим вниманием и крахмал, и триглицериды (менее $24-32 \times 10^3$) –

различия по сравнению с первыми двумя носили достоверный характер ($P \leq 0,01$).

Обобщая собственные результаты исследования, и подкрепляя их литературными данными, химизм ингибирования пищеварительных ферментов таннинами можно свести к следующим пунктам:

1. Исходя из того, что влияние таннинов на пищеварительные ферменты выражается не просто механически, а сопряжено с глубокой структурной деформацией их молекул, можно предположить, что интенсивная конденсация дубильных веществ снижала сродство фермента к субстрату, что, по-видимому, явилось одной из основных причин снижения каталитической активности изучаемых ферментов и скорости энзиматического гидролиза (Досон и др., 1991).

2. Отчасти обнаруженные изменения можно связать с природой используемых субстратов. Поскольку для определения активностей α -амилазы и липазы мы использовали очищенные крахмал и липиды (вещества неспособные к реакции с ГДК), основная масса таннинов в инкубационных средах была в свободном виде. Отметим также, что комплексы безазотистых веществ с таннинами крайне неустойчивы и под влиянием пищеварительных ферментов легко «разрушаются», что ведет к их появлению в свободном виде вновь. В конечном итоге, полифенолы связывались с именно апоферментом α -амилазы и липазы в энергетически более стабильные молекулярные соединения. Этого нельзя сказать о трипсине, где в качестве субстрата уже использовался протеин, способный частично «принять на себя» удар таннинов, оставляя энзим активным достаточно продолжительное время. Поэтому в данных средах даже при контрастно-высоком уровне таннинов, активность трипсина не снизилась больше половины. Влияние таннинов составило лишь 64 % ($P \leq 0,001$) и несколько компенсировалось антагонистическим действием таннинов влиянием казеина (16-27 %, $P \leq 0,001$) (Кретович и др., 1973).

3. Определенное влияние на характер ингибирования оказал сам фермент. Известно, что энзимы (в том числе и пищеварительные) во многих организмах существуют как ряд изоферментов. Механизмы реакций, катализируемые этими изоферментами, могут несколько отличаться друг от друга, хотя

каждый изофермент способен катализировать течение той или иной реакции (включая гидролиз субстрата) (Laigler et.al., 1968).

Используя метод двойных обратных величин Лайнуивера-Бэрка, были рассчитаны константы Михаэлиса (K_m) для изучаемых ферментов. Известно, что размерность K_m в определенных условиях является весьма полезной характеристикой, хотя не всегда может быть истолкована в терминах механизма ферментной реакции. Она не определяется концентрацией фермента, но характеризует зависимость между скоростью ферментной реакции и концентрацией субстрата в стационарном состоянии процесса, при которой скорость реакции составляет половину от максимально возможной ($\square\square\square = \frac{1}{2}V_1$). Для каждого фермента или изофермента (в случае отсутствия конкурентного ингибирования) константа Михаэлиса является постоянной величиной, отражающей его индивидуальность и специфичность (Досон и др., 1991, Laigler et.al., 1968).

Результаты исследования показали (табл. 1), что все дуоденальные ферменты имели высокую степень сродства с субстратом. Однако величина константы Михаэлиса как для липаз, так и трипсина химуса двух животных не позволила сделать достоверного заключения об их нетипичности друг другу, в то время как высокодостоверное различие K_m для α -амилазы бройлеров и КРС явилось достаточно хорошим свидетельством того, что мы имели дело с двумя ее изоферментами, различия в молекулярном строении которых, по-видимому, и обуславливали неодинаковое изменение их активностей под влиянием таннинов.

Дисперсионный анализ также зафиксировал индивидуальный ответ обеих дуоденальных α -амилаз на действие таннинов, при этом влияние самих энзимов было хотя и невелико (3,2 %), но отличалось высокой степенью достоверности ($P \leq 0,001$). Таким образом, α -амилаза бройлеров оказалась менее устойчива к негативному влиянию аналогичных уровней конденсированных полифенолов, по сравнению с таковой у КРС.

4. В порядке обсуждения результатов исследования мы хотели бы заострить внимание на изменениях, не способных проявить себя в опыте *in vitro*, однако у интактных животных они, несомненно, имеют большую силу действия. Предыдущее исследование показало, что у птицы, получавшей соразмерное

количество дубильных веществ с кормом (0,1-0,3 %), характер ингибирования пищеварительных ферментов в дуоденум был менее выражен (в 3-7 раз) по сравнению с модельным имитированием пищеварения. В то же время динамика угнетения протеолитической группы ферментов (из-за отсутствия гарантированно-высокого содержания белка) практически совпадала с таковыми у α -амилазы и липазы.

Объяснение данных изменений можно связать: 1) с химическим составом химуса, который у интактных животных уже содержит определенное количество свободных продуктов ферментолита (потенциально способных образовывать соединения с таннинами инкубационной среды); 2) непрерывной экскрецией пищеварительных ферментов в желудочно-кишечный тракт во время переваривания корма; 3) а также интенсивным всасыванием конечных продуктов гидролиза кишечными ворсинками. Последнее подпункт тесно связан с кинетикой катализа, поскольку в результате абсорбции продуктов ферментолита в обратимом процессе не может достигаться «подвижного равновесия» – постоянное уменьшение их концентрации в химусе способно увеличивать скорость прямых энзимических реакций по Закону действия масс.

Четвертый пункт косвенно подтверждается литературными данными о более интенсивном течении процессов метаболизма у разных животных (следовательно, разной интенсивностью экскреции дуоденальных гидролаз), эффективностью использования кормов (т.е. разной концентрацией продуктов ферментолита в химусе) и многими другими факторами. Однако прямое подтверждение данного факта требует отдельного научного исследования.

Результаты второго опыта (табл. 2) показали, что использование повышенных концентраций свободных продуктов ферментолита способно «защитить» дуоденальные ферменты конкурентным связыванием дубильных веществ и, таким образом, снизить их негативное действие в 1,36-2,03 раза.

Наибольшее влияние на конденсированные полифенолы оказало железо (1,73-2,03 раза), которое как и все металлы (особенно тяжелые) способно образовывать неспецифичные окрашенные хелатные комплексы: с галловой кислотой – фиолетовую, пирогаллолами – синюю и катехинами – зеленую. Существенным недостатком этого метода явилась быстрая

регенерация полифенолов, что со временем (через 2,5-3 часа) снижало степень защиты, однако этого времени вполне было достаточно для эвакуации порции корма из ЖКТ. Второе место занимали обе аминокислоты (в 1,55-1,83 раза), где благодаря эффекту ионизации фенольных групп в соответствующих средах образовывались конъюгированные связи таннинов с аминным азотом. Меньшее влияние, как и ожидалось, оказали глюкоза и глицерин (на 38-40 %). Во всех случаях пищеварительные ферменты КРС на 5-20 % интенсивнее реагировали увеличением своей активности по сравнению с таковыми у птицы. Антиингибиторные константы для используемых продуктов ферментолита, т.е. их концентрации, необходимые для связывания $\frac{1}{2}$ таннинов, оказались равными 7,07; 2,06; 0,72; 9,85 % и 0,88 мг%, соответственно, что более чем в 7,1; 4,6; 4,8; 8,2 и 3,5 раза превышает их физиологически нормальное содержание в желудочно-кишечном тракте животных.

Таблица 2. Активность пищеварительных ферментов цыплят-бройлеров и коров при добавлении в среду некоторых ферментоллизантов, Е/л

ФЕРМЕНТ	Содержание таннинов в инкубационной среде, %								
	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
	Глюкоза 1 %			Глюкоза 2 %			Глюкоза 4 %		
<i>α-Амилаза бройлеров</i>	161,7	118,6	31,8	184,9	143,3*	30,7	198,5**	154,4***	32,3
	±34,1	±16,2	±5,4	±20,7	±36,4	±8,3	±17,6	±13,4	±5,7
<i>Трипсин бройлеров</i>	64,1	53,5	46,1	76,2*	69,4	55,1***	76,6*	68,5	58,9**
	±15,3	±7,4	±5,0	±9,9	±13,7	±0,9	±8,2	±13,5	±5,3
<i>Липаза бройлеров</i>	54,7	50,6	23,8	71,1	59,9	26,1	73,0	64,9	40,3*
	±8,4	±4,8	±3,5	±13,1	±8,1	±4,9	±7,6	±14,8	±3,9
<i>α-Амилаза КРС</i>	174,8	84,7	59,2	172,5	93,6	72,0	193,2	141,5***	70,6
	±41,9	±10,3	±11,5	±40,7	±23,5	±8,7	±46,7	±16,2	±14,0

<i>Трипсин КРС</i>	56,7	54,8	44,5	60,8	52,2	42,5	68,3	61,8	51,7*
	$\pm 7,3$	$\pm 13,6$	$\pm 8,4$	$\pm 8,1$	$\pm 13,1$	$\pm 7,9$	$\pm 16,4$	$\pm 9,5$	$\pm 7,4$
<i>Липаза КРС</i>	37,6	34,6	14,7	52,1	38,6	17,2	58,7*	42,8*	18,6
	$\pm 4,4$	$\pm 8,0$	$\pm 1,5$	$\pm 8,3$	$\pm 4,0$	$\pm 2,2$	$\pm 7,1$	$\pm 3,4$	$\pm 4,6$
	<i>Лизин 0,45 %</i>			<i>Лизин 0,9%</i>			<i>Лизин 1,8%</i>		
<i>α-Амилаза бройлеров</i>	190,2	148,0	39,4	213,5	162,1	34,8*	230,7*	173,8***	43,5*
	$\pm 44,2$	$\pm 33,5$	$\pm 8,6$	$\pm 50,2$	$\pm 33,1$	$\pm 4,9$	$\pm 32,0$	$\pm 17,6$	$\pm 9,7$
<i>Трипсин бройлеров</i>	75,4	62,2	56,5*	72,4	59,8	54,3*	90,6*	78,1	60,2**
	$\pm 19,2$	$\pm 15,5$	$\pm 6,3$	$\pm 11,3$	$\pm 10,8$	$\pm 5,7$	$\pm 15,9$	$\pm 19,8$	$\pm 5,3$
<i>Липаза бройлеров</i>	56,1	48,6	39,2*	72,5	55,8	36,1	106,1	85,3	39,4
	$\pm 14,3$	$\pm 11,4$	$\pm 4,6$	$\pm 6,7$	$\pm 7,0$	$\pm 5,8$	$\pm 27,4$	$\pm 14,8$	$\pm 8,6$
<i>α-Амилаза КРС</i>	166,4	90,7	63,2	198,0	106,8	76,8*	213,4	111,8*	72,7
	$\pm 44,1$	$\pm 10,3$	$\pm 16,0$	$\pm 42,0$	$\pm 29,0$	$\pm 7,8$	$\pm 40,7$	$\pm 16,6$	$\pm 12,1$

Продолжение таблицы 2

ФЕРМЕНТ	Содержание таннинов в инкубационной среде, %								
	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
Трипсин КРС	58,8	52,6	43,3	68,0	62,6	53,8	80,6**	74,9***	62,1**
	$\pm 13,2$	$\pm 13,0$	$\pm 10,8$	$\pm 18,1$	$\pm 12,2$	$\pm 12,3$	$\pm 10,6$	$\pm 6,2$	$\pm 7,8$
Липаза КРС	52,2	47,2	27,2*	59,7*	58,3***	37,5***	101,9* *	76,6***	45,0*
	$\pm 11,5$	$\pm 10,9$	$\pm 5,3$	$\pm 8,8$	$\pm 5,6$	$\pm 5,9$	$\pm 19,4$	$\pm 9,6$	$\pm 12,1$
	Метионин 0,15 %			Метионин 0,3 %			Метионин 0,6 %		
α -Амилаза бройлеров	169,0	136,4	31,2	210,9* *	153,1	36,2	230,4*	180,1**	39,0
	$\pm 20,1$	$\pm 22,3$	$\pm 7,5$	$\pm 28,2$	$\pm 36,9$	$\pm 10,1$	$\pm 36,8$	$\pm 28,6$	$\pm 9,8$
Трипсин бройлеров	63,8	57,7	48,1	75,5	61,1	57,6**	90,6**	79,0* *	64,9
	$\pm 10,8$	$\pm 5,6$	$\pm 5,5$	$\pm 13,5$	$\pm 15,9$	$\pm 5,6$	$\pm 12,2$	$\pm 13,3$	$\pm 13,0$
Липаза бройлеров	55,3	40,8	34,2	76,9	47,5	36,9	102,5	60,8	50,3**
	$\pm 4,8$	$\pm 3,5$	$\pm 6,9$	$\pm 12,8$	$\pm 6,8$	$\pm 5,5$	$\pm 24,2$	$\pm 11,7$	$\pm 4,8$

<i>α-Амилаза КРС</i>	184,9*	93,6	72,9	209,4*	116, 3	81,0 *	225,6	120, 2	91,5
	±21,9	±21, 0	±11,1	±25,9	±22, 4	±8,8	±57,4	±33, 5	±21,0
<i>Трипсин КРС</i>	60,1	57,2	48,0	58,7	58,7	48,1	69,6	66,1	52,6**
	±15,7	±8,3	±7,9	±7,6	±11, 1	±8,2	±18,2	±11, 1	±5,5
<i>Липаза КРС</i>	52,8	45,0	24,7** *	61,7	52,8	31,7 **	91,0**	80,8 ***	57,5** *
	±14,4	±9,9	±2,0	±11,8	±12, 7	±5,1	±18,7	±7,2	±10,8
	Глицерин 1,2 %			Глицерин 2,4 %			Глицерин 4,8 %		
<i>α-Амилаза бройлеров</i>	167,5	133, 4	30,4	169,2	136, 4**	31,7 *	209,1	161, 2*	33,7
	±31,5	±33, 1	±7,9	±30,1	±12, 4	±3,6	±43,7	±24, 4	±7,9
<i>Трипсин бройлеров</i>	60,4	59,8	50,0*	68,4	58,3	46,0	76,1	62,3	53,7*
	±12,4	±15, 2	±4,6	±19,0	±8,5	±5,6	±18,5	±11, 2	±5,6
<i>Липаза бройлеров</i>	данных нет			данных нет			данных нет		
Продолжение таблицы 2									
ФЕРМЕНТ	Содержание таннинов в инкубационной среде, %								
	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3

<i>α-Амилаза КРС</i>	178,7	86,2	70,4	192,4	93,0	66,2	217,4	106,8**	82,8
	±47,7	±8,4	±16,2	±47,8	±20,4	±11,8	±42,6	±11,7	±16,2
<i>Трипсин КРС</i>	50,1	50,0	37,2	55,6	48,9	45,6	60,7	54,5	49,6
	±10,9	±11,4	±4,6	±13,7	±8,0	±7,3	±15,5	±6,4	±9,5
<i>Липаза КРС</i>	данных нет			данных нет			данных нет		
	Fe ⁺² 0,25 мг%			Fe ⁺² 0,5 мг%			Fe ⁺² 1,0 мг%		
<i>α-Амилаза бройлеров</i>	173,6	137,7**	28,0	207,6*	160,8***	34,8*	246,1*	180,0*	41,5*
	±25,4	±12,4	±4,4	±36,6	±13,2	±4,4	±35,8	±36,7	±9,0
<i>Трипсин бройлеров</i>	64,5	61,0	47,6	77,3	70,0**	59,9*	97,9*	85,6	69,8**
	±6,4	±14,6	±6,8	±16,7	±6,2	±7,7	±25,3	±21,1	±8,5
<i>Липаза бройлеров</i>	62,3	55,7	41,8*	77,3	50,0	62,5***	164,5*	95,1*	74,0**
	±8,4	±7,3	±6,5	±13,1	±7,6	±5,5	±28,2	±10,3	±10,6

<i>α-Амилаза КРС</i>	174,3	80,2	72,1*	209,3	107,5**	78,0	250,3	125,5	90,2*
	±48,5	±12,3	±6,0	±39,6	±11,9	±19,8	±67,6	±34,8	±17,2
<i>Трипсин КРС</i>	60,1*	62,1	50,3	73,7	68,9**	59,6*	78,6**	73,7***	63,5*
	±5,2	±12,1	±13,6	±6,3	±7,8	±10,9	±7,3	±7,4	±11,3
<i>Липаза КРС</i>	56,1	42,6	23,8	83,5*	74,9***	49,9**	135,3*	82,1***	51,3**
	±7,9	±7,0	±5,6	±21,8	±6,4	±11,9	±32,2	±11,7	±7,0

Примечание: * – *** достоверно по сравнению с активностью ферментов без ферментолизантов (табл. 1) для $P \leq 0,10-0,02$

Однако влияние экзогенных гидролизантов было явно недостаточным даже после использования предлагаемых «защитных» мероприятий. Результаты дисперсионного анализа показали, что в данном случае уровень инактивации таннинов обуславливался взаимодействием градаций (не менее 3,6-5,2 %, $P \leq 0,05$) и суммарным действием факторов (15,2 %, $P \leq 0,05$). Анализ действия каждого фактора (вид вводимого ферментолизанта или его концентрация) без совместного их действия дает ложное заключение о слабом и недостоверном влиянии каждого из них в отдельности. Оба этих фактора могут иметь силу действия, но только при определенной градации другого.

Необходимо обратить внимание, что перед измерением скорости реакций химус диализировали, поэтому маловероятно, что кроме таннинов в реакционной смеси могли присутствовать какие-нибудь низкомолекулярные ингибиторы или модификаторы, тем не менее, нами было отмечено значительное влияние и каких-то иных, не учитываемых факторов, дающих определенную ошибку.

Особо отметим, что на протяжении опыта фиксировалось уменьшение скорости прямых энзимологических реакций без достоверного изменения K_m ферментов. Известно, что неконкурентные ингибиторы не изменяют измеряемую константу Михаэлиса, поэтому стабильная степень сродства субстрата и энзима при низкой активности гидролаз (по сравнению с фоновым уровнем первого опыта) явилась признаком количественного уменьшения активного энзима в средах. Таким образом, связывание пищеварительных ферментов с таннинами, выступающими в роли неспецифических ингибиторов, является ярким подтверждением необратимого биохимического процесса – денатурирования ферментов (Досон и др., 1991, Диксон и др., 1982).

По результатам второго опыта считаем возможным заключить, что концентраций глюкозы, лизина, метионина, глицерина и железа в средах, необходимых для полного антиингибирования пищеварительных ферментов таннинами, достичь нельзя. Однако в некоторой степени эту проблему можно решить либо непосредственным увеличением содержания продуктов ферментоллиза в химусе в 1,5-2 раза от физиологической нормы, либо косвенно – путем включения в рационы ферментных препаратов. Последнее явилось бы предпосылкой

конкурентного связывания таннинов с некоторыми реактантами в дуоденум и последующего удаления труднопереваримых комплексов в дистальные участки пищеварительного тракта животных, где изначально нет активных гидролитических процессов.

Заключение

По результатам исследований можно констатировать, что таннины (при их высоком содержании в инкубационных средах) способны неконкурентно снижать активность пищеварительных ферментов в опытах *in vitro*. При этом наибольшему ингибированию подвержены α -амилаза, липаза и, наконец, протеазы.

С учетом незначительных корректив аналогичную динамику можно дублировать на желудочно-кишечный тракт птицы. Однако в силу того, что дуоденальный химус птицы и КРС уже содержит фоновый уровень свободных продуктов ферментолита, негативные изменения *in vivo* будут несколько сдержаны. Тем не менее, для поддержания высокой продуктивности животных, в случае включения в рационы кормов с высоким содержанием дубильных веществ, необходимо уделять большее внимание способам их биоинактивации.

Проведенные опыты позволили установить, что повышенный уровень свободных продуктов ферментолита: железа, аминокислот, а также глюкозы конкурентно снизил связывание дубильных веществ с апоферментом пищеварительных энзимов. В связи с этим, гипотетически можно очертить некую закономерность: чем меньше переваривается корм у птицы, и чем меньше в дуоденум образуется свободных продуктов гидролиза (способных образовывать комплексные связи с полифенолами) – тем больше таннинов остается в свободном виде, и тем интенсивнее они связываются с дуоденальными энзимами или проникают через стенку пищеварительного тракта.

Результаты настоящего исследования могут явиться теоретическим обоснованием использования следующих приемов, позволяющих снизить негативное влияние таннинов:

1. Для уменьшения поступления таннинов в организм необходимо:

а) лимитировать использование в кормосмесях для высокопродуктивной птицы ингредиентов с высоким (более 0,5 %) содержанием танинов; обобщая данные предыдущих исследований, для определения безопасного уровня ввода зерна просяных культур в полнорационные комбикорма, в зависимости от содержания в нем танинов, можно пользоваться следующей формулой:

$$\text{Уровень ввода (\%)} = -123,254 \times T^3 + 224,955 \times T^2 - 164,780 \times T + 64,405,$$

где Т – содержание танинов в зерне (от 0,1 до 1,0 %);

б) повышать питательную ценность зерна проса, африканского проса, чумизы, пайзы и др. с помощью экстракции фенольных веществ 1-2 % растворами карбамида, гидроокиси аммония (NH_2^- и NH_4^+ группировки) или просто горячей водой в течение 3-4 часов.

2. Для выведения танинов из организма и снижения их влияния целесообразно:

а) увеличивать нормы кормления моногастричных с.-х. животных и птицы (на 5-8 % по обменной энергии и на 10-15 относ.% по сырому протеину), в комбикормах которых содержится высокий уровень (свыше 0,1-0,2 %) конденсированных полифенолов;

б) обязательно обогащать такие рационы экзогенными ферментными препаратами широкого спектра действия, и включать особенно те из них, которые обладают выраженной протеазной и амилазной активностями;

в) в качестве менее эффективного, но достаточно доступного способа можно рекомендовать общеукрепляющие мероприятия – вводить в рацион в виде премиксов витамины (А, С и Е) в комплексе с минеральными элементами (Fe, Co, Mn, Se, J и др.) на 5-10 относ.% сверх гарантированного количества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия, Пятигорск, 1996, 2: 153.
2. Виноградов В.И., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Ветеринарная фармакология с рецептурой, М.: Колос, 1998: 360.

3. Гулюшин С.Ю., Ленкова Т.Н. Влияние таннинов на интенсивность тканевого дыхания цыплят. Сб. научн. трудов ВНИИФБиП, 2002, 41: 121-129.
4. Гулюшин С.Ю., Морозов Д.Н. Исследование функции желудочно-кишечного тракта ваккат-кислородным методом под влиянием таннинов. Сб. научн. трудов ВНИИФБиП, 2002, 41: 130-141.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, М.: Мир, 1982, 1: 56-452.
6. Дмитриев С., Джуров А., Антонов С. Диагностика отравлений животных, М.: Агропромиздат, 1986: 245.
7. Досон Р, Эллиот Д., Досон К. Справочник биохимика, М.: Мир, 1991: 408-411.
8. Ермаков А.И. Таннины. В кн. Методы биохимических исследований растений. М.: 1987: 420.
9. Иванов И.И., Коровкин Б.Ф. Введение в клиническую энзимологию, Л.: Медицина, 1974.
10. Кретович В.Л. Дубильные вещества и биофлавоноиды. В кн.: Техническая биохимия. М.: Высшая школа, 1973: 221-230.
11. Краткая химическая энциклопедия, М.: Советская энциклопедия, 1964, 3: 247-249.
12. Масевич Ц.Г., Рысса С.М. Болезни органов пищеварения, Л.: Медицина, 1975: 680.
13. Методические рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы. Под общ. редакцией В.И. Фисинина. ВНИТИП, Сергиев Посад, 1999.
14. Методы биохимического анализа (справочное пособие) под общ. ред. Б.Д. Кальницкого. ВНИИФБиП, Боровск, 1997: 352.
15. Таннины. Сб. научных трудов Химические вещества зерновых культур ВИР, 1971, 77: 57-60.
16. Черниговский В.Н., Соловьев А.В. Физиология пищеварения, Л.: Наука, 1974: 737.
17. Цариченко Г.В., Шашкина Л.Ф., Рындина С.Е. Токсикологические свойства веществ, используемых в химико-фармацевтической промышленности (обзорная информация), М, 1982, 5: 11.
18. Bagliacca M., Paci G., Marzoni M., Biagi G., Avanzi CDiao QiYu, Qi Guang Hai, Diao Q.Y., Qi G.H., Brooker J.D. Tannins in livestock feeds in China. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June (Australian Center for International Agricultural Research), 1999: 66-70..
19. Elkin R.G., Rogler J.C. Comparative effect of dietary tannin in ducks, chicks and rats (Metabolism and Nutrition). / Poultry Sci., 1990, 69, 10: 1685-1693.
20. Farrell D.J., Perez Maldonado R.A., Brooker J.D. Tannins in feedstuffs used in the diets of pigs and poultry in Australia. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May - 2 June. (Australian Center for International Agricultural Research), 1999: 24-29.
21. Jimenez Ramsey L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Elkin R.G. Absorption and distribution of ¹⁴C-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. J. Agr. Food Chem., 1994, 42, 4: 963-967.
22. Laigler K.J. The chemical kinetics of enzyme action. Oxford, 1968: 365-396.

23. Vernon B.G., Caygill J.C., Mueller H.I. Tannins: implications for non ruminants. Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. (Nottingham University Press, Nottingham, UK), 1999: 41-49.
24. Ferket P. R., Middelton T. Антипитательные вещества в кормах и их влияние на здоровье и продуктивность птицы. Университет Северной Каролины, США (реферативный журнал интернет-издания).

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ И САНИТАРНЫХ УСЛОВИЙ ПРЕДЫНКУБАЦИОННОГО ХРАНЕНИЯ НА ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЯЙЦА И ЦЫПЛЕНКА

Д.Н. Морозов, С.Ю. Гулюшин

Лаборатории пищеварения и энергетического питания

Установлено, что при продолжительном предынкубационном хранении яйца (6-7 сут) в условиях высоких температур (свыше 20 °С), и особенно, в случае загрязнения скорлупы условно-патогенной микрофлорой (*E.coli*) наблюдалось абсолютное снижение содержания или активности большинства показателей естественной резистентности как у самих яиц, так и у выведенных цыплят. Следствием интенсивного проникновения микрофлоры в такие яйца являлась высокая эмбриональная смертность и низкий экономический эффект инкубации. Некоторые данные позволили утверждать, что интенсивный рост микроорганизмов на поверхности скорлупы и последующее их проникновение внутрь яйца является одним из основных факторов в патогенезе иммунологической толерантности к определенному антигену. Проблема становления иммунитета, в свою очередь, является реальной, но скрытой причиной необратимых изменений, вызывающих получение молодняка, подверженного влиянию распространенных инфекционных заболеваний и отходу птицы в продуктивный период её использования.

Введение

Реактивность, как способность организма отвечать изменением жизнедеятельности на воздействие окружающей среды, широко распространена в природе и представляет собой такое же важное свойство всего живого как обмен веществ, рост, размножение, поведение и т.д., выражающееся в совокупности двигательных, пищевых, ориентировочных и многих других условных и безусловных рефлексах животного (Адо и др., 1973, Болотников, 1993).

Изменения реактивности у животных носят преимущественно защитно-приспособительный характер, поэтому все они направлены на противодействие и повышение устойчивости организма к негативным

условиям внешней среды, способствуя сохранению его функциональной целостности (Маслянюк и др., 1987). Частным случаем проявления реактивности является резистентность. Этот комплекс, представленный реакциями биологической защиты, направленными на сохранение и поддержание постоянства генетического гомеостаза и устойчивости состава и свойств каждого отдельного организма – в широком понимании является важнейшим выражением реактивности в целом (Гулый и др., 1977).

Природа позаботилась о том, чтобы снесенное яйцо содержало не только необходимое количество энерго-пластического материала, обеспечивающего полноценное развитие эмбриона вне организма матери, но и наделила его достаточным количеством гуморальных факторов неспецифической защиты. Свежее яйцо обладает очень изощренной противомикробной защитной системой, так необходимой эмбриону для успешной борьбы с негативными факторами окружающей среды (Бессарабов и др., 1992, Орлов и др., 1987, Царенко и др., 1988). Последняя включает в себя: непроницаемость скорлупы и подскорлупных оболочек яйца (конфигурация которых не способствует проникновению микрофлоры внутрь); наличие в биологических жидкостях белка бактерицидных субстанций – лизоцима, пропердина, комплемента (т.е. комплексов транслоцированных сывороточных белков, ответственных за реактивность); ряда ферментов, противовирусных веществ (интерферона, термоустойчивых ингибиторов) и др. Поэтому для большинства микроорганизмов эти «входные ворота» являются как бы закрытыми, однако в определенных случаях они могут частично открываться (Загаевский и др., 1956, Митюшников и др., 1987). В случае же проникновения посторонних агентов (при уменьшении уровня биологической защиты или увеличении интенсивности их атаки), факторы неспецифической резистентности первыми включаются в борьбу и «подготавливают почву» для дальнейшего развертывания иммунных реакций, которые и определяют исход борьбы (Кондратьева и др., 1994, Отыганиев и др., 1981).

Внешняя среда оказывает существенное влияние на качественные показатели инкубационных яиц. Отклонение зоогигиенических параметров предынкубационного хранения от оптимальных значений может вызвать резкое изменение статуса гуморальных факторов как в яйце, так и у цыпленка, в результате чего уменьшается их использование в защитно-приспособительных целях. При этом возбудители, находящиеся в среде, могут интенсивно и почти беспрепятственно проникать под скорлупу. В благоприятных температурных и трофических условиях они активно развиваются и, минуя белковую составляющую яйца, могут вызывать гибель эмбриона (путем конкурентного использования питательных веществ и приоритетного выделения токсичных продуктов жизнедеятельности), ухудшая, тем самым,

биологические, технологические и экономические показатели инкубации (Антонова и др., 1964, Бессарабов и др., 2000).

Известно, что все изменения параметров хранения яйца обязательно отражаются на морфологическом и биохимическом составе как содержимого яйца, так и крови у выведенного молодняка. Сохраняя постоянство состава, белок и кровь являются, тем не менее, достаточно лабильными системами, быстро отражающими процессы, происходящие в норме и патологии. По ряду показателей (лизоцимной, бактерицидной и β -лизиновой активности, содержанию иммунных белков и γ -глобулинов, комплимента, интерферона, пропердина, титру антител и др.) можно судить о степени защиты яйца и организма цыпленка, что в практических условиях весьма удобно для установления оптимальных технологических параметров хранения яиц до инкубации, при которых они не теряли бы «первозданные» свойства и обеспечивали получение здорового молодняка (Бессарабов и др., 1992, Болотников, 1972).

Библиотечные полки изобилуют работами, посвященными изучению влияния температуры (как фактора, отличающегося наибольшей вариабельностью) на качество и инкубационные свойства яйца кур. Однако, несмотря на большое количество эмпирического материала, вопрос установления ее воздействия на элементы биологической защиты яйца крайне слабо освещен в литературе. Авторы единичных и раритетных, в своем роде, работ кардинально разнятся во взглядах (Болотников, 1972, Воронянский и др., 1966, Кондратьева и др., 1994, Owen *et al.*, 1945, Seemann *et al.*, 1998). Горячо заинтересовавшись этой проблемой, мы провели собственное исследование, имеющее цель – установить влияние температуры предынкубационного хранения и санитарного состояния яйца на активность и уровень факторов неспецифической защиты как самих яиц, так и выведенных из них цыплят.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели были сформированы пять групп, в которые входило племенное яйцо кур кросса «Радонеж», отобранное по принципу аналогов ($n = 35$). Яйцо 1-й группы (свежее) не подлежало хранению и служило контролем. В остальных группах его хранили в течение 6-7 суток при разных температурных условиях: во 2-й (контрольной-2) группе – при 8 ± 1 °C (нижняя полка бытового холодильника); в 3-й и 4-й опытных группах – при 20 ± 1 °C и 35 ± 1 °C (в термостатах с

влажностью 65-70 %). Яйцо 5-й группы хранили при температуре 4-й группы, однако поверхность скорлупы с первого дня хранения обрабатывали суспензией *E.coli* (1,53 млрд./см³), выделенной на среде Эндо из помета кур-несушек (ЭПХ ВНИТИП).¹

Морфологические и иммунологические исследования яйца и цыплят проводили во ВНИИФБиП с.-х. животных. По истечении указанного срока в яичном белке у пяти яиц из группы определяли: концентрацию общего азота и белка, иммунных белков, γ -глобулинов, пропердина и гликопротеидов; бактерицидную активность (*E.coli*), активности лизоцима (*M.lyzodeicticus*), β -лизинов (*B.subtitis*) и комплимента (эритроциты человека); интерферона (вирус гриппа человека «А»); титры гетеро- и нормальных агглютининов (по отношению к антигенным факторам эритроцитов человека, *Escherichia coli*, *Bacillus subtitis* и *Trichomonas vaginalis*) (Митюшников, 1987).

С целью установления абсолютного содержания гуморальных элементов биозащиты проводили морфологические исследования, включающие определение массы и потери массы яйцом за время хранения, массу яичного белка, а также содержание воздушно-сухого вещества в нем.

Остальное яйцо (30 штук) инкубировали в производственных условиях ГУП Боровской ИПС. В сыворотке крови выведенного молодняка в 10- и 25-дневном возрасте определяли аналогичный спектр показателей – до и после провокации иммунитета перитональной инъекцией живой тест-культуры *E.coli* (0,2 мл /гол).

Для опыта использовали микрофлору, полученную из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Штаммы стандартных тест-культур были отселекционированы по наибольшей чувствительности к исследуемым веществам, по выраженности антагонистических свойств к ряду других представителей и высокой скорости микробного роста. Работу с культурами проводили в соответствии с наставлениями ГКПМ.

¹ Данная микрофлора использовалась исключительно для поверхностной обработки яйца, но не для инъекций или постановки реакций агглютинации (Прим. автора).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что в процессе хранения инкубационное яйцо претерпевало значительные изменения (табл. 1).

Таблица 1. Содержание и активность факторов неспецифической защиты в белке яиц кур, хранившихся при разной температуре

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы				
	1 (Свежее)	2 (К)	3	4	5'
Общий белок (N×6,25), г/л	100,9±5,2	102,1±3,7	109,6±3,8	116,3±5,1 ¹	114,3±4,3 ¹
Общий белок (по Лоури), г/л	99,4 ±4,7	100,6±3,3	107,9±4,1	113,9±4,6 ¹	112,0±4,2 ¹
Соот. белкового N к остаточному	66,3	67,1	63,5	47,5	46,6
Общ. иммунные белки (ЦСТ), г/л	12,1 ±2,0	12,3 ±3,1	13,2 ±2,6	13,9 ±2,7	13,4 ±2,9
γ-Глобулины, в % от массы белка	14,3 ±3,2	14,3 ±3,6	14,3 ±3,4	14,4 ±2,9	14,3 ±1,5
Гликопротеиды, ед./л	76,5±12,3	77,4 ±11,7	81,8 ±10,6	84,8 ±11,7	80,3 ±8,3
Бактериц. активность (E.coli), %	76,0 ±5,0	77,0±3,1	82,5±4,6	83,7±4,1	80,1±4,2
Лизоцим (M.lyzodeicticus) г/л	5,4 ±0,15	5,5 ±0,1	5,8 ±0,2	6,0±0,2 ²	5,8 ±0,1 ¹
Комплекс (эр. человека), ед./л	0,40±0,08	0,40±0,07	0,43±0,08	0,44±0,05	0,43±0,04
Пропердин, мг/л	42,2 ±4,7	42,7 ±3,5	45,9 ±6,3	48,3 ±5,1	47,2 ±4,2
Интерферон (вир. группа «А»), ЕДх10 ³ /л	2,40±1,2	2,42±1,1	2,55±1,3	2,60±1,7	2,49±1,4
Гетороагглютинины, ГАЕ ₅₀ /л	350,0 ±7,0	350,6 ±6,7	361,1 ±8,2	293,4 ±2,5 ³	264,0 ±9,0 ³
Н.агглютинины (E.coli), ГАЕ ₅₀ /л	1283 ±12	1302 ±15	1295 ±15	1224 ±12 ²	1036 ±15 ³
Н.агглютинины (B.subtitis), ГАЕ ₅₀ /л	1008 ±8	1019 ±15	1050 ±15 ²	1036 ±11 ¹	969 ±12 ²
Н.агглютинины (T.vaginalis), ГАЕ ₅₀	3,2 ±0,1	3,1 ±0,1	3,3 ±0,1	3,4 ±0,15	3,3 ±0,1

¹ ... ³ P ≤ 0,10...0,001

Так, если оно хранилось в условиях холодильной камеры (8 °C), то по истечении 5-6 суток по комплексу исследуемых показателей крайне незначительно отличалось от свежего. В опытных же группах в зависимости от температуры хранения фиксировались существенные изменения практически всех его характеристик: в яичном белке «горячих» групп возросло содержание общего азота и белка (на 8,6-15,3 %, $P \leq 0,10$), общих иммунных белков (на 9,1-14,9 %, $P \geq 0,10$). Увеличилось абсолютное содержание белков γ -глобулиновой фракции (на 8,4-14,7 %), хотя относительное – практически не изменилось.

Одним из важных факторов неспецифической резистентности яйца является наличие в нем специфического фермента, способного катализировать гидролиз β -1,4-гликозидных связей между остатками аминсахаров гетерополисахаридных стенок бактериальных клеток, что ведет к разрушению оболочки и гибели возбудителей, попавших в яйцо (Болотников, 1972). Лизирующим началом является энзим – мурамидаза или мукопептид-гликогидролаза (КФ 3.2.1.17.), часто именуемый как «лизозим». В нашем случае максимальной лизозимной активностью также отличалось яйцо опытных групп, в которых 1 литр белка за 1 минуту обладал способностью лизировать $145,1-147,7 \times 10^3$ КОЕ микробных тел тест-культуры *M.lyzodeicticus* (штамма АСТТ 4698 $\rightarrow$ NCTC 2665), что соответствовало его концентрации 5,8-6,0 г/л.

В опытных группах возросли, хотя в меньшей степени, бактерицидная активность сыворотки крови, являющаяся интегральным фактором естественной резистентности гуморального типа, а также комплимента, пропердина, интерферона, гликопротеидов и др., однако титр антител в большинстве случаев несколько уменьшился (на 5-25 %)

Налицо совершенно парадоксальная ситуация: в «горячих» группах возрастало относительное содержание элементов неспецифической защиты. Аналогичная ситуация стабильно дублировалась в ходе трех рекогносцировочных экспериментов на пищевом яйце, поэтому возможность метрических ошибок была минимальна. Может ли такое быть, если все исследователи «хором» утверждают о снижении неспецифической защиты яйца при неблагоприятных и продолжительных условиях хранения?

Ответ на этот вопрос мы нашли в морфологических показателях (табл. 2). Так, если во 2-й (контрольной) группе

изменение массы яиц практически не отмечалось, то несколько большее увеличение данного показателя начало фиксироваться в 3-й группе, и уже в 4-й и 5-й группах было существенным (на 2,1 и 8,7-9,0 %, соответственно). В «горячих» группах уменьшилась абсолютная масса яичного белка (на 7,1-12,0 %, $P \leq 0,05-0,01$), увеличилось содержание сухого вещества в единице его массы (на 8,5-14,2 %,). В то же время, яйца как контрольных, так и опытных групп ни по массе желтка, ни по массе скорлупы достоверно не различались между собой, что позволило подтвердить предположение об «усушке» яйца и, особенно, его белковой составляющей.

В этом аспекте становятся понятными изменения в яичном белке опытных групп. Содержание воды в яичном белке выше, чем в большинстве животных тканей, он почти полностью состоит из протеина и воды, представляя собой редкое исключение в живой природе. Поскольку именно белок через подскорлупные оболочки граничит с пористой структурой скорлупы, то при высокой температуре предынкубационного хранения потеря массы яйца происходит преимущественно за счет испарения влаги из белка, следовательно, концентрация элементов неспецифической защиты в единице его объема или массы будет пропорционально возрастать.

Таблица 2. Морфологические изменения в яйце при разных температурных условиях его хранения (M = 62 г)

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы				
	1 (Свеж.)	2 (К)	3	4	5'
Потеря массы яйцом, %	–	0,48±0,06	2,05±0,19	9,00±0,38	8,72±0,31
Абсолютная масса яичн. белка, г	35,1±0,7	34,7±0,8	32,6±0,7 ¹	30,9±0,4 ²	31,2±0,6 ²
Потеря массы яичного белка, %	–	1,14	7,12	11,97	11,11
Воздушно-сухое вещество белка, %	12,35±0,8	12,5±1,1	13,4±1,6	14,1±1,1	13,7±0,9
Абсолютная масса скорлупы, г	6,8±0,1	6,9±0,2	7,0±0,2	6,8±0,2	6,9±0,2
Абсолютная масса желтка, г	20,1±0,5	20,2±0,6	20,0±0,4	20,4±0,5	20,3±0,5

¹ ... ³ $P \leq 0,10 \dots 0,001$

Таким образом, для установления динамических изменений в яйце в зависимости от тех или иных условий его хранения, основывать свои выводы на относительном содержании в белке каких-либо биологически активных субстанций нельзя, поскольку между данными факторами имеется лишь опосредованная зависимость. Для нахождения абсолютных значений гуморальных элементов биозащиты в яйце мы рассчитали их содержание с учетом концентрации и массы белка, что позволило нам совершенно наглядно доказать абсолютное снижение содержания или активности большинства из них при хранении яйца в условиях высоких температур и, особенно, при загрязнении скорлупы условно-патогенными микроорганизмами (табл. 3). Последнее обстоятельство можно с полной уверенностью связать не только с влиянием физического агента (температуры), сколько с интенсивным течением микробиологических процессов (5-я группа), негативно воздействующих в подавляющем большинстве случаев не на сам протеин как таковой, а на биологически активные белки-энзимы, осуществляющие микробиологическую защиту желтка – развивающегося эмбриона.

Так, например, в яйце контрольной группы с массой 62,0 г содержалось 35,1 г или 30,98 мл яичного белка, в котором обнаружено 5,4 г/л лизоцима или 167,29 мг – в яйце. После потери массы яйцом на 11,97 % (в 4-й группе) абсолютное содержание белка в яйце уменьшилось до 30,9 г (26,76 мл), в котором содержалось уже 160,56 мг лизоцима ($6,0 \text{ мг/мл} \times 26,76 \text{ мл} = 160,56$). В результате, абсолютное содержание лизоцима в процессе хранения яйца уменьшилось на 4,0 %, несмотря на то, что относительное его количество в белке возросло на 11,1 %, и белок стал более «концентрированным». Очевидно, что при более длительном хранении и большем усыхании яйца эти значения будут намного больше (за исключением случаев аутоферментного расщепления яичного белка и перехода его части в желток).

Таблица 3. Абсолютное изменение факторов неспецифической защиты яйца по сравнению с контрольной группой (в расчете на целое, M=62 г), %

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы			
	2 (К)	3	4	5'
Воздушно-сухое вещество	+0,1	+0,1	-0,0	-1,4
Влага	-1,1	-7,1 ²	-11,8 ³	-11,1 ³
Общий азот (N), %	-0,1	-0,2	-0,4	-0,8
Общий белок (по Лоури), г/л	-0,1	-0,3	-1,0	-1,3
Общие иммунные белки	+0,2	-0,2	-0,8	-3,0
γ-Глобулины	-0,1	-0,3	-0,7	-1,3
Гликопротеиды	-0,1	-1,8	-4,3	-8,1
Бак. активность (E.coli)	0,0	-0,3	-4,9	-7,7
Лизоцим (M.lyzodeicticus)	-0,1	-1,3	-4,0	-5,9
Комплимент (эр.человека)	-0,2	-0,1	-5,0	-6,9
Пропердин	-0,1	-0,1	-1,1	-2,0
Интерферон (вир. гриппа «А»), ЕДх10 ³ /л	-0,2	-2,1	-6,1	-8,9
Гетороагглютинины	-1,1	-5,2	-27,6 ³	-33,9 ³
Нормальные агглютинины (E.coli)	+0,2	-7,3	-17,6 ²	-29,3 ³
Нормальные агглютинины (B.subtitis)	-0,2	-4,3	-11,2 ²	-15,8 ²
Нормальные агглютинины (T.vaginalis)	-1,3	-2,2	-5,3	-6,8

По-видимому, «усушка» яйца и увеличение содержания факторов биологической защиты в яичном белке, является одним из важных приспособительных механизмов, благодаря которому в ходе первой половины инкубации способность яйца противостоять внешним патогенным факторам резко возрастает. Во второй же половине, когда фиксируется количественное уменьшение данных веществ (их разрушение под влиянием условий внешней среды, «износ» и частичный распад для питания эмбриона), яйцо становится более уязвимо влиянию микрофлоры. И только тогда чрезмерно высокое (даже разовое) ее проникновение извне способно оказать негативное влияние на эмбрион. Ситуация серьезно усугубляется недостаточно развитой иммунной системой эмбриона, неспособной оказать должного противодействия проникающим микроорганизмам.

Зоотехнические показатели косвенно подтвердили этот вывод (табл. 4) Выводимость цыплят из яиц в 4-й и 5-й опытных группах была значительно ниже (на 6,7-22,6 %), чем в контроле; принимая во внимание статистическую погрешность в нашем наблюдении, можно отметить, что в отходе инкубации доминировали «задохлики» (8,5-21,6 %). Слабые цыплята быстро (в течение 1,5-3 ч) погибали. Однако оставшиеся отличались высоким баллом бонитировки (имели более презентабельный вид в 1- и 14-дневном возрасте) по сравнению с обеими контрольными группами (на 3,8-12,7 %, $P \leq 0,05$), но низкой живой массой (на 3,4-5,2 %, $P \leq 0,05-0,01$) и скоростью роста.

Таблица 4. Зоотехнические показатели инкубации яиц (в расчете на 100 % оплодотворенное яйцо)

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы				
	1(Свежее)	2 (К)	3	4	5'
Выводимость яиц, %	87,8 $\pm$ 3,6	88,8 $\pm$ 3,4	84,3 $\pm$ 4,2	81,1 $\pm$ 5,2	65,2 $\pm$ 5,9 ²
Брак инкубации, %	12,2 $\pm$ 4,8	11,2 $\pm$ 4,5	15,7 $\pm$ 4,2	18,9 $\pm$ 4,3	34,8 $\pm$ 4,0 ²
в том числе:					
замершие, %	3,7 $\pm$ 3,1	3,8 $\pm$ 2,1	2,5 $\pm$ 3,0	3,2 $\pm$ 2,6	4,2 $\pm$ 2,6
тумаки, %	3,4 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 1,5	3,9 $\pm$ 2,6	3,3 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 1,3
задохлики, %	1,2 $\pm$ 1,2	1,3 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 3,7	9,7 $\pm$ 4,2	21,8 $\pm$ 4,0 ²
Масса суточного цыпленка, г	38,6 $\pm$ 0,4	38,3 $\pm$ 0,5	38,5 $\pm$ 0,5	37,3 $\pm$ 0,3 ¹	36,3 $\pm$ 0,4 ²
Балл бонитир. суточ. цыплят (100 б.)	77,3 $\pm$ 5,0	69,7 $\pm$ 3,3	71,7 $\pm$ 3,7	81,1 $\pm$ 3,1	90,0 $\pm$ 3,4 ¹
Сохранность за 14 дн. выращ., %	94,3 $\pm$ 2,8	87,5 $\pm$ 3,7	95,8 $\pm$ 2,4	86,8 $\pm$ 3,9	76,1 $\pm$ 5,1 ²
Масса 14-дневного цыпленка, г	133,9 $\pm$ 3,8	130,7 $\pm$ 1,6	137,0 $\pm$ 2,6	126,6 $\pm$ 1,7	123,8 $\pm$ 5,7

¹ ... ³ $P \leq 0,05 \dots 0,001$

Как известно, факторы гуморальной биозащиты, проникая из яйца в эмбрион, являются практически единственными веществами, обеспечивающими колостральный иммунитет у цыплят первых дней жизни (Адо и др., 1973). Это послужило основанием для оценки уровня неспецифической защиты у цыплят, выведенных из этих же яиц (табл. 5).

Анализируя таблицу 5, отметим, что с увеличением температуры предынкубационного хранения яйца уровень неспецифической резистентности у этих цыплят резко упал. При этом практически все показатели были несколько ниже соответствующих значений в контрольных группах, и особенно сильно снизились у цыплят, выведенных из загрязненных яиц.

В контрастных опытных группах заметно (на 7-12 %) снизилась активность β -лизинов, представляющих собой совокупность белков, формирующих одну из важнейших бактерицидных систем сыворотки. Последние содержат катионный белок, отличаются термолабильностью и избирательностью в отношении грамположительных микроорганизмов (Герасименко, 2002). При относительно постоянном содержании белка в сыворотке крови, концентрации иммунных белков и γ -глобулинов, а также бактерицидная активность и активности комплемента, лизоцима, интерферона и др. были также ниже (на 6-32 %) по сравнению с контролем.

Таблица 5. Содержание и активность факторов неспецифической защиты в сыворотке крови цыплят 10-дневного возраста

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы				
	1 (Свежее)	2 (К)	3	4	5'
Общий белок (N×6,25), г/л	38,2 ±1,2	38,1 ±1,3	38,5 ±1,0	37,9 ±0,9	36,1 ±0,2
Общий белок (по Лоури), г/л	37,1 ±0,7	37,2 ±1,5	36,1 ±0,9	36,1 ±1,5	35,5 ±0,6
Общ. иммунные белки (ЦСТ), г/л	1,5 ±0,2	1,5 ±0,5	1,7 ±0,3	1,6 ±0,1	1,3 ±0,2
γ -Глобулины, г/л	4,8 ±0,5	4,6 ±0,6	4,8 ±0,4	3,5 ±0,2 ¹	3,3 ±0,4 ¹
Гликопротеиды, ед./л	173 ±11	177 ±7	173 ±9	168 ±6	159 ±7
Бактериц. активность (E.coli), %	48,6 ±1,2	46,2 ±0,6	38,5 ±0,8 ²	44,4 ±0,8	42,9 ±0,6
Лизоцим (M.lyzodeicticus) мг/л	24,0 ±0,8	23,9 ±0,6	20,5 ±1,6	21,5 ±2,4	23,5 ±2,7
β -Лизины (B.subtitis), %	35,3 ±2,8	40,3 ±2,7	35,4 ±3,2	31,0 ±3,0	32,7 ±3,4
Комплекс (эр. человека), ед./л	33,2±2,3	33,2±3,2	32,9±1,2	31,2±2,0	30,8±2,3
Пропердин, мг/л	4,34 ±0,37	4,26 ±0,28	4,22 ±0,48	4,24 ±0,50	4,18 ±0,32
Интерферон (вир. группа «А»), ЕДх10 ⁵ /л	1,1±0,3	1,1±0,2	1,2±0,1	1,0±0,2	1,1±0,2

Фагоцитарная активность, %	72,3 ±6,3	76,4 ±3,0	72,9 ±9,0	77,1 ±3,5	76,0 ±4,7
- фагоцитарное число	5,5 ±0,5	4,8 ±0,5	4,7 ±0,5	5,3 ±0,6	6,1 ±0,5
Гетороагглютинины, ГАЕ ₅₀ /мл	21,8 ±1,5	26,9 ±2,3	25,1 ±1,7	13,6 ±2,2 ²	18,6 ±0,9
Н.агглютинины (E.coli), ГАЕ ₅₀	392 ±84	334 ±70	386 ±65	308 ±76	204 ±43 ¹
Н.агглютинины (B.subtitis), ГАЕ ₅₀	209 ±23	217 ±17	220 ±36	156 ±20	167 ±12
Н.агглютинины (T.vaginalis), ГАЕ ₅₀	0,05 ±0,00	0,05 ±0,00	0,05 ±0,00	0,04 ±0,00	0,04 ±0,00

¹ ... ³ P ≤ 0,05...0,001

Отметим, что температурные условия в 5-й группе были намеренно созданы не только для испарения влаги, но и для благоприятных условий роста микрофлоры на поверхности скорлупы и ее проникновения внутрь яйца. Данные нашей предыдущей работы показали, что к 5-7 суткам после аналогичного орошения скорлупы яйца суспензией E.coli, ее численность увеличилась: на скорлупе в 2,6-3,5 раза, на подскорлупных оболочках – 9-29 раз и в желтке – 6-300 раз. Причем 60-70 % обнаруженных микроорганизмов были представлены серотипом, идентичным таковому у используемой микрофлоры (Морозов и др., 2003).

Таким образом, интервенция микрофлоры и ранняя контаминация эмбриона в процессе инкубации подопытного яйца, равно как и неблагоприятные температурные параметры его хранения, должны были вызвать изменения со стороны иммунной системы, для изучения функционального состояния которой, в ходе эксперимента, мы использовали две провокации иммунитета у цыплят той же самой культурой в 5- и 20-дневном возрасте.

Организм отвечает на заражение носителем инфекции рядом изменений на клеточном и метаболическом уровнях, приводящих в конечном итоге к специфически направленному иммунному воздействию на патоген. Оно заключается в выработке специфических антител или лимфоцитов, способных уничтожить вторгшийся патоген. В этом процессе участвует множество иммунных клеток, которые синтезируют различные лимфокины, играющие важную роль в иммунном ответе.

Одним из важных факторов иммунологической защиты организма является выработка антител. Известно, что антитела

являются сложными белками (гликопротеиды), обладающими способностью специфически связываться с чужеродными веществами – поверхностными антигенами клеточных мембран бактерий, эритроцитов и т.д., приводя к агглютинации (агрегации) и деструкции (лизис) последних, которые усиливаются под влиянием факторов неспецифической резистентности (Болотников и др., 1993, Бухарин и др., 1977). Мы использовали постановку реакции агглютинации в качестве основной оценки уровня иммунореактивности в организме цыплят.

Таблица 6. Титры гетеро- и нормальных агглютининов в сыворотке крови цыплят (10 дн.) по отношению к некоторым антигенным факторам

ПОКАЗАТЕЛИ	Группы				
	1(Свежее)	2 (К)	3	4	5'
Гетороагглютинины, ГАЕ ₅₀	33,2 ±1,5	29,7 ±1,8	37,6 ±1,6	26,4 ±1,8	25,1 ±1,7
Н.агглютинины (E.coli), ГАЕ ₅₀	2726±203	2353±164	2504±124	2266±237	217±37 ³
Н.агглютинины (B.subtitis), ГАЕ ₅₀	336 ±28	317 ±19	259 ±25	344 ±25	270 ±16
Н.агглютинины (T.vaginalis), ГАЕ ₅₀	0,05 ±0,01	0,05 ±0,00	0,06 ±0,00	0,05 ±0,00	0,05 ±0,00

¹ ... ³ P ≤ 0,05 ... 0,001

Результаты исследования показали (табл. 6), что после первой же провокации иммунитета, на фоне 20-30 % повышения уровня естественной резистентности, птица как обеих контрольных, так и 3-й и 4-й опытных групп наиболее остро (с повышением температуры тела) и интенсивно (в 6,5-7,5 раз) реагировала выработкой агглютининов ограниченной гетерогенности против провоцирующего антигена (E.coli). Несколько сдержанной (в 1,2-1,9 раза) была реакция в отношении остальных антигенных факторов (эритроциты человека и B. subtitis). Однако цыплята практически никак не реагировали, и во всех случаях оставались абсолютно индифферентными к представителю простейших – возбудителю трихомоноза (T.vaginalis).

В этом плане птица из 5-й опытной группы, не в пример прочим, далеко не лучшим образом отличалась от сверстников из

остальных групп. Несмотря на отличное качество цыплят – подвижность, чистоту оперения и хороший аппетит – даже после вакцинации их сывороточный титр антител к *E.coli* почти не отличался от аналогичных значений суточного возраста и оставался весьма низким (в 10-13 раз,

$P \leq 0,001$). В то же время выработкой других антител и фагоцитозом цыплята реагировали несколько не хуже, а в некоторых случаях даже лучше по сравнению с остальными группами. Повторная вакцинация птицы (в 20 дней) суспензией живой *E.coli* вызвала 100 % гибель цыплят 5-й группы (клиника коллибактериоза) и положила конец сравнительным исследованиям. По-видимому, индукция специфической иммунологической толерантности и проявивший себя синдром иммунодефицита у цыплят данной опытной группы имел место в нашем исследовании.

Впервые аналогичные результаты были получены Owen (1945), который показал, что при введении белкового антигена (живых размножающихся клеточных культур) в организм крыс в перинатальный период, лишал его на всю жизнь способности продуцировать антитела против данного антигена. При этом даже если новорожденным проводить повторные инъекции антигена, то индуцированная иммунологическая толерантность может длиться неопределенно долго. Кроме того, и инаktivированные клетки, например *Salmonella pullorum*, введенные в эмбрион цыплят до 16-го дня развития, также могли индуцировать толерантность в постнатальный период (Smith, Bridger et al., 1958; Kely, Brown, et al., 1965).

Заключение

В развитии промышленного птицеводства важное значение имеет инкубация яиц как основное звено в технологическом процессе воспроизводства птицы. Качество снесенного яйца уже невозможно улучшить никакими методами, поэтому все операции с ним должны быть направлены на его максимальное сохранение. Защита инкубационных яиц и поддержание здоровья вновь вылупившихся цыплят – две наиболее важные стороны процесса инкубации. Так как все процессы в инкубатории являются стрессом для цыплят,

осторожное обращение с ними – необходимое условия для лучшего роста и жизнеспособности.

В этом свете, результаты исследований наводят на размышления о значимости и важности предынкубационного хранения инкубационных яиц, поскольку их влияние распространяется не только на показатели инкубации как таковой, но и на резистентность, и иммунореактивность (дифференциация и пролиферация) птицы. Пролонгированное действие санитарных и технологических «огрех» будет являться одним из определяющих факторов жизнеспособности (сенсбилизации) полученного поголовья, который рано или поздно непременно проявит себя в условиях птичника: при неблагоприятных условиях содержания и стрессах птицы в продуктивный период. Однако выявить его по зоотехническим показателям молодняка за 14 дней жизни (установленный срок опытов по биоконтролю инкубации) не представляется возможным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А.Д., Ишимова Л.М., Бурлаков Г.В. и др. Патологическая физиология, М.: Медицина, 1973: 524.
2. Антонова М.Е. Обеззараживание куриных яиц перед инкубацией, Ветеринария, 1964, 4: 18-19.
3. Бессарабов Б.Ф. Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы (справочник), М.: ФГНУ Росинформатагротех, 2000: 23.
4. Бессарабов Б.Ф. Практикум по инкубации яиц и эмбриологии сельскохозяйственной птицы, М.: Агропромиздат, 1992: 144.
5. Болотников А.М. Экология инкубации и эмбрионального развития птиц: Автореф. дис.... д-ра биол. наук, Казань, 1972: 38.
6. Болотников И.А., Конопатов Ю.В. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы, С.-Петербург: Наука, 1993: 205.
7. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Система β -лизина и её роль в клинической и экспериментальной медицине, Томск, 1977: 186.
8. Воронянский В.И. Белки и гликопротеиды сыворотки крови кур в связи с возрастом и физиологическим состоянием. В кн.: Исследования в птицеводстве, Киев: Урожай, 1966: 66-74.
9. Герасименко В.В. Обмен веществ и продуктивность гусей, выращиваемых на мясо, при использовании лактоамиловорина, Дисс. ... канд биол. наук, Боровск, 2002: 145.
10. Гулый М.Ф. Природа и биологическое значение некоторых метаболических приспособительных реакций организмов, Киев: Наукова думка, 1977: 240.

11. Загаевский И.С. Предынкубационная дезинфекция яиц // Загаевский И.С. Лекции по вопросам гигиены, микробиологии и дезинфекции яиц, Белая церковь, 1956: 22-23.
12. Кондратьева Т.А. Бактериальные липополисахариды. В кн.: Иммунология инфекционного процесса. Под ред. В.И. Покровского и др., М: Медицина, 1994.
13. Маслянюк Р.П. Иммунологические методы исследования в животноводстве, Львов, 1987: 48.
14. Митюшников В.М., Варакина Р.И., Злочевская К.В. Методические рекомендации по использованию в селекционной работе тестов для повышения уровня естественной резистентности у кур, Загорск, 1987: 16.
15. Морозов Д.Н., Гулюшин С.Ю. Интенсивность проникновения микрофлоры под скорлупу и оценка статического действия препаратов антибиотиков при глубокой обработке яйца, Сб. научн. трудов ВНИТИП, Сергиев Посад, 2003, 80: 122-134.
16. Морозов Д.Н., Кривопишин И.П. Оценка чувствительности эмбрионов к антибиотикам, применяемым для глубокой обработки инкубационного яйца кур, Сб. научн. трудов ВНИТИП, Сергиев Посад, 2002, 78: 98-109.
17. Орлов М.В. Биологический контроль в инкубации / Под общ. ред. И.П. Кривопишина; 3-е изд. перераб. и доп., М.: Россельхозиздат, 1987: 223.
18. Отрыганьев Г.К., Бессарабов Б.Ф., Исаев Ю.В. Болезни эмбрионов птиц, М.: Россельхозиздат, 1981: 136.
19. Царенко П.П. Повышение качества продукции птицеводства: пищевые и инкубационные яйца, Л.: Агропромиздат, 1988.
20. Bekämpfung von Salmonellen in Zucht- und Ablegebetrieben für Legehennen.// Geflügelkrankheiten, Hannover, Germany, 1997: 5-16.
21. Kely W., Brown J., Martinez C. – Fed. Proc., 1965, 24: 376.
22. Owen J. Introduction to egg pasteurization.// Poultry Sci., 1996, 75, 9: 1121-1140.
23. Owen R.D. – Science, 1945, 102: 400.
24. Seemann G. Desinfektion von Bruteiern und Farmen ohne Formalin. // Lohmann Inform, Cuxhaven, 1998: 27-32.
25. Smith R.T., Bridger R.A. – J. Exp. Med., 1958, 108: 227.

**Труды Всероссийского научно-исследовательского института
физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.**

Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2003, т.42, 293 с

*Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии,
биохимии и питания с.-х. животных.*

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

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных. Лицензия ИД № 03641
Формат 70х100/16 Объем 17,7 п.л. (22,8 усл. п. л.) Тираж 100 экз.

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