

XVII 200

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

**КОРЧУБЕКОВА ТОТУКАН АДЫЛБЕКОВНА**

УДК 612:612.664:612.111.91.636.32/.38

**ЛАКТОФЕРРИН МОЛОЧНОГО СЕКРЕТА  
И СЫВОРОТКИ КРОВИ ОВЕЦ ПРИ  
СТАНОВЛЕНИИ ЛАКТАЦИИ**

Специальность 14.00.17 – Нормальная физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Бишкек – 2000

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии им. Н.И.Захарьева  
Национальной Академии наук Кыргызской Республики

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник **Т.Ч. Чекиров**

**Научный консультант:** кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник **В.Н. Кокряков**

**Официальные оппоненты:**  
доктор биологических наук, профессор **В.Н. Кобзарь**  
кандидат биологических наук, доцент **А.А. Абдиев**

**Ведущая организация:**  
Институт физиологии человека и животных Министерства  
образования и науки Республики Казахстан

Защита состоится « 14 » декабря 2000 г. в 13 часов  
на заседании специализированного Совета Д 14.98.84 при Кыргызской государственной  
медицинской академии.

Адрес: 720020 г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГМА

Автореферат разослан « 9 » ноября 2000 г.

**Ученый секретарь  
специализированного Совета,  
доктор медицинских наук**



**Р.Р. Тухватшин**

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В Кыргызской Республике овцеводство всегда являлось одной из ведущих и традиционных отраслей животноводства. В настоящее время правительством республики уделяется большое внимание развитию этой отрасли. Однако ощутимый урон приносит значительный падеж молодняка в период раннего постнатального развития, обусловленный как незрелостью основных механизмов иммунитета у новорожденных, так и неполноценными условиями кормления и содержания. В формировании защитных сил новорожденных велика роль материнских иммунологических факторов [A.S. Goldman, 1993; A.S. Goldman et al., 1994; J. Newman, 1995], но конкретные компоненты и пути передачи их от матери плоду и новорожденному, формирование иммунозащитных механизмов в процессе постнатального развития последнего изучены недостаточно.

Одним из факторов неспецифической иммунной защиты молочного секрета является железосодержащий гликопротеид - лактоферрин (ЛФ), являющийся компонентом антимикробной системы нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и внешних секретов. ЛФ обладает рядом важных иммунобиологических свойств: оказывает как бактериостатическое, так и бактерицидное действие на многие виды патогенных агентов [P.L. Masson, 1970; R.R. Arnold et al., 1980, 1981; J. Stuart et al., 1984; C.A. Bortner et al., 1986], усиливает бактерицидность клеток крови [M. Lima, F. Kierszenbaum, 1985, 1987]. Предполагают, что он модулирует киллерную активность моноцитов [D.A. Horwitz et al., 1984; K. Nichiya, D.A. Horwitz, 1983] и участвует в регуляции гранулоцитопозеза [H.S. Birgens, 1984; H.E. Broxmeyer et al., 1977, 1984, 1985; J. Fletcher, J. Willars, 1986]; по-видимому, ЛФ играет также важную роль в защите организма от вредного воздействия ионов тяжелых металлов [J.H. Brock, 1980; E. Sabbiani, J. Rade, 1980].

Учитывая тот факт, что у овец передача иммунологических факторов матери потомству осуществляется, главным образом, трофогенным путем [У.Д. Герберт, 1974; П.А. Емельяненко, 1974; D.L. Watson, 1980], исследование ЛФ в секрете молочной железы в период становления лактации и в сыворотке крови ягнят до и после первого приема молозива имеет большое значение в понимании иммунологических взаимоотношений в системе "мать - плод - новорожденный" и формирования защитных механизмов у молодняка.

**Цель исследования.** Изучить динамику образования ЛФ в молочном секрете овец при становлении секреторной функции и роль колострального ЛФ в формировании неспецифической гуморальной резистентности ягнят. Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи:**

1. Выделить высокоочищенные препараты ЛФ из молока и нейтрофильных гранулоцитов (НГ) крови овец. Определить иммунохимическую идентичность белков из обоих источников.
2. Получить моноспецифическую антисыворотку к ЛФ для иммунохимического анализа и количественного определения этих белков в молочном секрете и сыворотке крови, используя в качестве антигена выделенный иммунохимически чистый ЛФ.
3. Изучить некоторые физико-химические и иммунохимические свойства ЛФ овец.
4. Определить количественное содержание ЛФ в молочном секрете суягных овец, молозиве и в молоке.
5. В сравнительном аспекте исследовать количество ЛФ в крови ягнят до и после приема молозива, а также в сыворотке крови овцематок.

**Научная новизна работы:**

- впервые получены высокоочищенные препараты ЛФ из молока и НГ крови овец кыргызской тонкорунной породы;
- изучены некоторые физико-химические и иммунохимические свойства ЛФ овец. Установлено, что ЛФ овцы из молока и НГ крови иммунохимически идентичны;
- впервые показана динамика уровня ЛФ в молочном секрете суягных овцематок, молозиве и молоке овец в течение ранней лактации;
- впервые установлена динамика формирования уровня ЛФ в сыворотке крови ягнят в постнатальном онтогенезе;
- установлено, что плацентарная система овец непроницаема для молекул ЛФ.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследования углубляют фундаментальные представления физиологии и биохимии лактации в области познания закономерностей взаимоотношений в системе мать-плод - новорожденный, а также образования одного из важных факторов неспецифического гуморального иммунитета - ЛФ в молочном секрете овец и его роли в становлении иммунологического статуса ягнят в раннем постнатальном онтогенезе.

Полученные результаты исследований могут быть использованы:

- при разработке теоретических аспектов образования компонентов молочного секрета, формирования иммунологического статуса новорожденных ягнят, а также при написании учебно-методических пособий и монографий;

- при разработке тестов определения молозивного периода и ранней диагностики воспалительных процессов в молочной железе; оценке отдельных показателей неспецифической резистентности овец и при создании новых лечебно-профилактических препаратов;
- при дальнейшем изучении многогранных функциональных свойств данного белка из других источников при различных физиолого-патологических состояниях организма.

По материалам исследований опубликованы две методические рекомендации (в соавторстве), которые могут использоваться для оценки иммунологического статуса молодняка сельскохозяйственных животных, и рассчитаны на зооветспециалистов, научных работников и студентов.

**Основные положения работы, выносимые на защиту:**

1. Получены высокоочищенные препараты ЛФ из молока и НГ крови овец кыргызской тонкорунной породы. ЛФ, выделенные из молока и НГ, иммунохимически идентичны.
2. Наибольшее количество ЛФ содержится в молочном секрете суягных овцематок, т.е. в период становления секреторной функции, когда ткань молочной железы активно перестраивается для лактационной деятельности и идет накопление иммунных компонентов молочного секрета.
3. Заметное увеличение ЛФ в сыворотке крови новорожденных ягнят после первого приема молозива свидетельствует о важной роли колострального ЛФ в формировании неспецифической гуморальной резистентности ягнят.
4. Установлено, что плацентарная система овец непроницаема для ЛФ.

**Апробация работы.** Основные результаты и положения диссертационной работы были доложены на VIII Всесоюзном симпозиуме по физиологии и биохимии лактации (Баку, 1990г.); юбилейной научной конференции, посвященной 60-летию образования Кыргызстана (г. Бишкек, 1992 г.); международной научной конференции «Актуальные проблемы вирусологии» (Казахстан, 1994 г.); международной научной конференции «Пути интенсификации животноводства в условиях рыночной экономики», посвященной 1000-летию юбилею эпоса «Манас» (г. Бишкек, 1995 г.); на III конференции биохимиков Узбекистана (г. Ташкент, 1996 г.); на расширенном заседании лаборатории биохимии животных ИБ и Ф НАН КР; на заседании Ученого Совета Института биохимии и физиологии НАН КР; на расширенном заседании кафедры нормальной физиологии КГМА КР.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав: 1-ая глава – обзор литературы, 2-ая глава – “Материалы и методы исследований”, 3-я глава – “Собственные исследования и их обсуждение”, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 16 рисунками. Список литературы содержит 247 наименований, из них 57 на русском языке.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты и материалы.** Опыты проведены на 60 овцематках кыргызской тонкорунной породы 2-й и 3-й лактации и 55 ягнятах. Для исследований использованы животные овцеводческой фермы колхоза “Рассвет” Сокулукского района, которые были аналогами по возрасту, живой массе и продуктивности. Кормление животных проводилось согласно типовым рационам, обеспечивающим потребности суягных и лактирующих овцематок в основных элементах питания.

Образцы молочного секрета собирали у овцематок в различные периоды суягности, сразу после ягнения до первого кормления ягнят, затем ежедневно первые десять дней лактации. Образцы крови у ягнят и овцематок получали сразу после ягнения до кормления молозивом, затем ежедневно у ягнят первые десять дней жизни.

Экспериментальные исследования по выделению ЛФ из молока и НГ овец и изучение некоторых физико-химических свойств этих белков проводились в отделе общей патологии ИЭМ АМН Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

**Методы.** Выделение ЛФ из молока овец проводили по модифицированному методу Р. Masson [1970]. ЛФ из НГ крови овец получали по трехстадийному методу Г.М. Ротовой с соавт. [1985]. Электрофорез полученных препаратов в полиакриламидном геле в кислой буферной системе проводили методом S. Papuim и R. Chalkley [1969], а в присутствии додецилсульфата натрия (ДС-На) - методом U. Laemmli [1970] в модификации J. Thomas и R. Kornberg [1975].

Молекулярную массу определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДС-На [K. Weber, M. Osborn, 1969]. Содержание углеводов в белках (без аминокислот) определяли фенол-сульфатным методом [M. Dubois et al., 1956]. Комплексообразование ЛФ с железом определяли по методу P. Azari, R. F. Vaughn [1967]. Спектры поглощения ЛФ в видимой области получали на спектрофотометре Beckman модель 35 (США).

Моноспецифические антисыворотки к ЛФ получали путем иммунизации кроликов высокоочищенными препаратами ЛФ по схеме В.Н. Кокрякова с соавт.

[1988]. Двойную радиальную иммунодиффузию проводили по методу Оухтерлони в модификации А.И. Гусева и В.С. Цветкова [1961], аналитический иммуноэлектрофорез по методу Г. Фримеля [1987]. Количественное определение ЛФ в биологическом материале проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [1965].

Определение активности лизоцима проводили турбодиметрическим методом в модификации О.В. Бухарина [1974]. Общий белок в молочном секрете определяли по Лоури в модификации Чешева [1967], а в сыворотке крови биуретовым методом [1974].

Результаты экспериментальных работ статистически обрабатывались по Стьюденту [В.С. Асатиани, 1964], все расчеты (определение коэффициента корреляции, достоверности) проведены с помощью электронной таблицы “Excel” из пакета “MS - office” на IBM-PS Pentium-II.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение и очистка ЛФ из молока и НГ овец.** ЛФ молока овец получали по методу Массона [1970], который мы использовали с некоторой модификацией. Основными этапами метода являются извлечение ЛФ из обезжиренного молока с помощью ионообменного сефадекса и элюция белков ступенчатым градиентом ионной силы. В наших опытах ЛФ элюировался при 0,2-0,3 М концентрации NaCl в фосфатном буфере, что указывает на более низкую изоэлектрическую точку, чем у коровьего или свиного ЛФ [Алешина, 1988]. Далее элюаты подвергались концентрации на аппарате для ультрафильтрации фирмы “Amicon” (ХМ-50). Сконцентрированный материал фракционировали на Сефадексе G-100, уравновешенном 0,01 М Na фосфатным буфером с 1 М NaCl. Все процедуры проводили при 4°C. Типичный профиль элюции представлен на рис. 1. Фракции, выходящие в объеме элюции 152-156 мл, содержат чистый ЛФ. Выход составил 60 мкг на 1 мл.

Выделение ЛФ из сыворотки крови проводили по трехстадийному методу Г.М. Ротовой с соавт. [1985]. Сначала получали лейкоцитарную фракцию, обогащенную НГ, что обусловлено низким содержанием белка в исходном материале. Поскольку ЛФ является нейтрально-основным белком, то экстракцию белков осуществляли с помощью катионного детергента ЦТАБ (бромистый цетил триметиламмония), который по конкурентному электростатическому механизму вытесняет в раствор нейтрально-основные компоненты из липополисахарид-белковых комплексов гранул. Клетки суспендировали в 0,3% растворе ЦТАБ в 0,01 М Na фосфатном буфере, pH 7,5 (на 1г клеток 100 мл раствора). Нерастворимый материал осаждали центрифугированием. Для полного извлечения белков экстрак-

цию повторяли многократно. Полученные таким образом ЦТАБ-экстракты из лейкоцитарной фракции крови овец, обогащенной НГ, использовали для выделения ЛФ. Элюцию белков проводили с помощью увеличивающейся молярности NaCl (0,1; 0,15; 0,2) в исходном буфере. Фракции, содержащие ЛФ, концентрировали и подвергали гель-фильтрации на Сефадексе G-100. Профиль элюции при гель-фильтрации представлен на рис.2. За ходом элюции следили спектрофотометрически. Все процедуры проводили при 4°C. Фракции, выходящие в объеме элюции 172-174 мл, содержат чистый ЛФ.

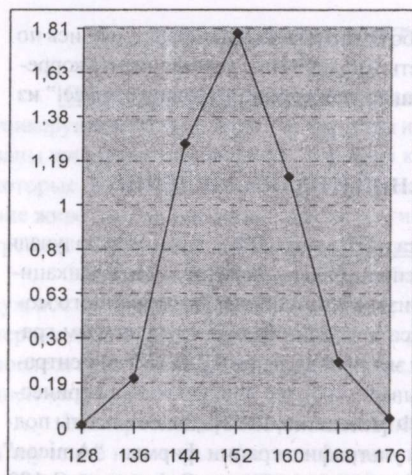


Рис.1. Гель-фильтрация препарата ЛФ молока овцы после концентрирования на аппарате для ультрафильтрации "Amicon". По оси ординат - концентрация белка, мг. По оси абсцисс - объем фракций, 8,0 мл. Объем колонки 365 мл. Скорость элюции 26 мл/ч. Элюент - 0,01 M Na фосф.буфер с 1 M NaCl, pH 7.4

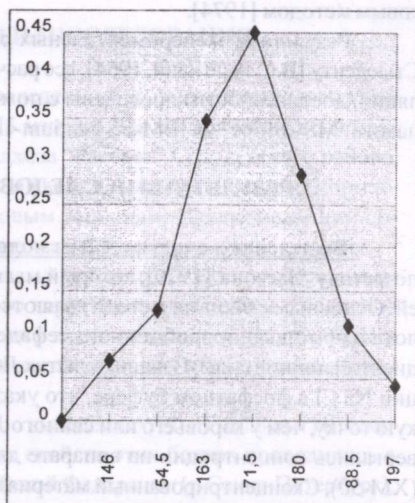


Рис.2. Гель-фильтрация препарата ЛФ НГ овцы после концентрирования на аппарате для ультрафильтрации "Amicon". По оси ординат - концентрация белка, мг. По оси абсцисс - объем фракций, 8,5 мл. Объем колонки 365 мл. Элюент 0,01 M Na фосф.буфер с 1 M NaCl, pH 7.2-7.6.

Гомогенность полученных препаратов ЛФ оценивали с помощью 2-х вариантов электрофореза: в кислой буферной системе и с добавлением DS-Na. В обоих случаях выявляется только одна белковая фракция (рис. 3, 4). Кроме того, известно, что одной из главных примесей при выделении ЛФ является пероксидаза (в молоке - лактопероксидаза, в НГ - миелооксидаза). Контроль за содержа-

нием этого фермента в препаратах проводили путем выявления пероксидазной активности [S.J. Klebanoff, 1965]. Во всех выделенных препаратах ЛФ не выявлялись компоненты, дающие окрашивание на пероксидазу.

Следующим этапом исследования было получение моноспецифических антисывороток к ЛФ. Иммунизацию кроликов проводили по схеме описанной В.Н. Кокряковым с соавт. [1988]. Иммунохимические методы также позволили подтвердить чистоту полученных белков.

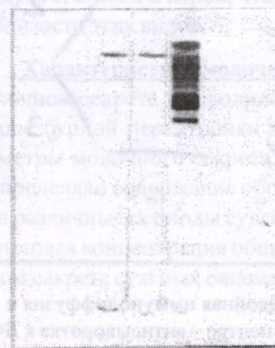


Рис.3. Электрофореграмма ЛФ в кислой буферной системе, pH 2,2; 6,25 мочевины, 15% акриламида. Слева направо: ЛФ нейтрофилов овцы; ЛФ молока овцы; молоко овцы.

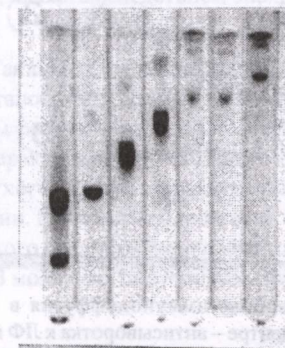
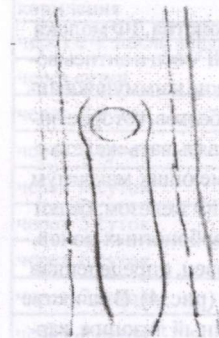


Рис.4. Электрофореграмма ЛФ в присутствии DS-Na. Слева направо: яичный лизоцим; карбоангидраза; овальбумин; бычий сывороточный альбумин; ЛФ молока овцы; ЛФ нейтрофилов крови овцы, фосфоорилаза.



Аналитический иммуноэлектрофорез, который является очень чувствительным методом, показывает только одну полосу precipitation между полученной моноспецифической антисывороткой к ЛФ и молоком овцы (рис.5).

Рис.5. Иммуноэлектрофореграмма ЛФ молока овцы. В траншеях - антисыворотка к ЛФ молока овцы; в лунке - молоко овцы.

В опытах двойной иммунодиффузии по Оухтерлони антисыворотки к полученным препаратам ЛФ также давали только одну полосу преципитации с лейкоцитарной фракцией крови и молоком овцы (рис.6, 7).

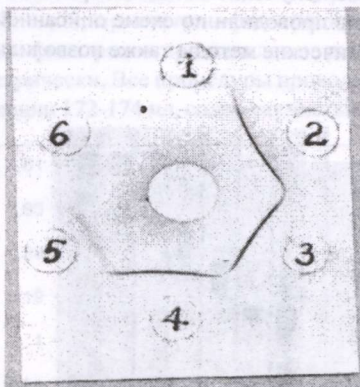


Рис.6. Двойная иммунодиффузия в 1,2% агаре. В центре – антисыворотка к ЛФ молока овцы; 1- 0,85% NaCl; 2- ЛФ молока овцы; 3- молочная сыворотка овцы; 4- ЛФ НГ овцы; 5- ЛФ молока коровы; 6- ЛФ молока человека.

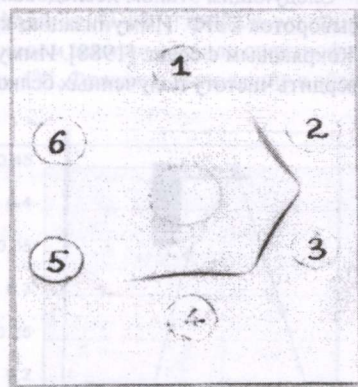


Рис.7. Двойная иммунодиффузия в 1,2% агаре. В центре – антисыворотка к ЛФ НГ овцы; 1 - 0,85% NaCl; 2 - ЛФ НГ овцы; 3 - лейкоцитарная фракция крови овцы; 4 - ЛФ молока овцы; 5- плазма крови овцы; 6- сыворотка крови человека.

В наших аналитических опытах по определению антигенного сходства ЛФ из молока и НГ крови овец методом двойной иммунодиффузии показана иммунохимическая идентичность этих белков из обоих источников (рис.6,7)

**Некоторые физико-химические и иммунохимические свойства ЛФ молока и НГ овец.** Получение гомогенных препаратов ЛФ из молока и НГ овец и антисывороток к ним, позволило нам изучить некоторые физико-химические и иммунохимические свойства этих белков. Основным свойством выделенных белков, которое позволяет идентифицировать их как ЛФ, является способность связывать железо с образованием окрашенных в красноватый цвет комплексов, имеющих максимум поглощения при 470 нм. Как следует из динамики насыщения ЛФ железом, белки связывают по два атома железа на молекулу в присутствии бикарбонатных ионов.

В наших опытах молекулярная масса ЛФ молока и НГ овец, определенная методом электрофореза с DS - Na, составила  $75\,000 \pm 1500$  Da (рис. 4). В качестве стандартных метчиков использовали белки фирмы «Serva»: яичный лизоцим, карбоангидразу, овальбумин, бычий сывороточный альбумин, фосфорилазу В (с

молекулярными массами: 14 000; 29 000; 45 000; 68 000; 92 500 Da соответственно). Установлено, что в составе ЛФ молока овец содержится 3,3% гексоз, или 14 остатков на молекулу белка.

Иммунохимический анализ методом двойной иммунодиффузии показал, что между ЛФ овцы и человека отсутствуют общие антигенные детерминанты, а между ЛФ коровы и овцы обнаруживается частичный перекрест (рис. 6). Эти результаты указывают на наличие некоторых общих антигенных детерминант в молекуле ЛФ овец и коров, что, по-видимому, является следствием эволюционной близости этих видов.

**Характеристика молочного секрета.** Так как исследование содержания ЛФ в молочном секрете проводилось в период становления секреторной функции, на фоне бурной перестройки паренхимы, мы решили рассмотреть некоторые параметры молочного секрета. Для общей характеристики молочного секрета мы определяли содержание общего белка и сухого остатка в образцах, полученных в различные периоды суягности и лактации. Наши опыты показали, что самая высокая концентрация общего белка и сухого остатка обнаруживается в молочном секрете суягных овцематок (табл.1). В молозиве, полученном сразу пос-

Таблица 1.

**Содержание сухого остатка и общего белка в молочном секрете овец, (г / %) (Р – относительно молозива до первого кормления)**

Сроки взятия пробы	Сухой остаток			Общий белок		
	М ± m	N	P	М ± m	N	P
Молочный секрет до ягнения	32,90 ± 2,2	9	>0,5	29,4 ± 3,3	11	< 0,02
Молозиво до первого кормления	31,88 ± 1,6	10		19,9 ± 1,5	20	
через 6 ч. после ягнения	31,88 ± 1,6	8	>0,5	14,1 ± 0,6	12	< 0,01
через сутки	19,90 ± 1,67	10	< 0,001	8,1 ± 0,9	15	< 0,001
через 2 суток	14,16 ± 0,58	18	< 0,001	5,3 ± 0,4	21	< 0,001
через 3 суток	13,74 ± 0,44	15	< 0,001	4,7 ± 0,3	23	< 0,001
через 4 суток	12,74 ± 0,32	15	< 0,001	4,0 ± 0,1	24	< 0,001
через 5 суток	13,62 ± 0,58	15	< 0,001	3,9 ± 0,1	23	< 0,001
через 6 суток	12,39 ± 0,18	9	< 0,001	4,1 ± 0,1	19	< 0,001
через 7 суток	12,35 ± 0,24	9	< 0,001	4,0 ± 0,1	18	< 0,001
через 8 суток	12,09 ± 0,30	10	< 0,001	3,5 ± 0,1	18	< 0,001
через 9-10 суток	12,28 ± 0,35	8	< 0,001	3,8 ± 0,1	20	< 0,001

ле ягнения до первого кормления, содержание сухого остатка практически не меняется, тогда как, количество белка уменьшается на 32%. Общий белок молозива составляет всего 62% от сухого остатка, а в молочном секрете до ягнения на его долю приходилось 89%. Это, по-видимому, обусловлено резким изменением нейро-эндокринного статуса организма овцематок, вызванного родовым процессом. После родов, с удалением плаценты, снимается тормозное влияние прогестерона на секрецию гипофизарного пролактина и тем самым развязывается пусковой механизм дифференцированных секреторных клеток молочной железы к синтезу различных специфических компонентов молока, включая жир, сахар, что вызывает уменьшение доли общего белка в молозиве. Через сутки после ягнения содержание сухого остатка уменьшается на 62%, а общего белка на 73%, по сравнению с их уровнем в молочном секрете суягных овцематок. Причем, удельный вес общего белка составляет 40% от сухого остатка. Стабилизация состава молока происходит на 4-5 сутки после ягнения.

В молочном секрете суягных овцематок содержится значительное количество лейкоцитарных клеток (табл.2). После ягнения их количество постепенно уменьшается, а в молоке содержится в 6 раз меньше, чем в секрете до ягнения.

Таблица 2

**Содержание лейкоцитов в молочном секрете и крови овец**  
(тыс/мкл)

Пробы	M ± m	N	%
Молочный секрет до ягнения	993,0 ± 114,8	43	11,69
Молозиво	756,0 ± 51,1	45	8,90
Молоко	191,0 ± 41,4	16	2,25
Кровь	8495,0 ± 524,0	26	100

Инфильтрация лейкоцитарных клеток в ткань молочной железы может быть вызвана структурными и дегенеративными изменениями паренхимы в период активной дифференцировки секреторных клеток вымени и началом синтеза специфических молочных компонентов, которые стимулируют хемотаксис лейкоцитов вследствие отсутствия надлежащей изоляции секреторных клеток от окружающей среды из-за недостаточной развитости межклеточных контактов.

Сравнительный анализ лейкоцитарных клеток показывает, что они различаются не только количественно, но и по клеточному составу. Основную массу лейкоцитарных клеток молочного секрета и молозива составляют нейтрофилы (около 60%).

На основании результатов предварительного исследования состава молочного секрета, молозива и молока овец следует подчеркнуть, что за месяц до ягнения в молочной железе суягных овец идет активная инфильтрация лейкоцитов и дифференцировка паренхиматозной ткани, включая секреторные клетки. Об этом свидетельствуют увеличение объема вымени и интенсивное формирование и накопление первичного молочного секрета. Отличительной особенностью первичного молочного секрета и молозива является высокое содержание в них сухих веществ, общего белка и лейкоцитарных клеток.

**Содержание ЛФ в молочном секрете овец.** Наши исследования показали, что содержание ЛФ в молочном секрете суягных овцематок, молозиве и молоке положительно коррелирует с содержанием общего белка и лейкоцитарных клеток (табл. 1, 2). Наибольшая концентрация этого белка обнаружена в молочном секрете, полученном за 26-13 дней до ягнения ( $413,5 \pm 56,8$ ; табл.3). Что почти в 7 раз больше его уровня в молозиве, полученном через сутки после ягнения ( $62,4 \pm 9,9$ ,  $P < 0,001$ ), и почти в 3 раза больше, чем в сыворотке крови овце-

Таблица 3

**Содержание лактоферрина в молочном секрете овец**  
(мг/л) (P – относительно молозива до первого кормления)

Сроки взятия пробы	M ± m	N	P
Молочный секрет до ягнения :			
26-13 дней	$413,5 \pm 56,8$	14	$< 0,001$
12- 5 дней	$320,6 \pm 47,6$	19	$< 0,01$
4 - 1 день	$311,9 \pm 41,0$	14	$< 0,01$
Молозиво до первого кормления	$164,0 \pm 32,0$	26	
Молочный секрет после ягнения :			
через сутки	$62,0 \pm 6,2$	34	$< 0,01$
через 2 суток	$62,4 \pm 9,9$	18	$< 0,01$
через 3 суток	$56,0 \pm 11,0$	15	$< 0,01$
через 4 суток	$68,0 \pm 9,0$	15	$< 0,01$
через 5 суток	$78,0 \pm 13,0$	15	$< 0,02$
через 6 суток	$54,0 \pm 8,3$	9	$< 0,01$
через 7 суток	$43,0 \pm 6,0$	9	$< 0,001$
через 8 суток	$47,0 \pm 5,3$	10	$< 0,001$
через 9-10 суток	$53,0 \pm 5,5$	8	$< 0,01$

ток ( $146,6 \pm 13,7$  мг/л,  $P < 0,001$ , табл.5). В молочном секрете, полученном за 12-5 дней до ягнения, количество ЛФ уменьшается на 22 % ( $320,6 \pm 47,6$  мг/л), за 4-1 день до ягнения почти сохраняется данный уровень ( $311,9 \pm 41,0$  мг/л). Сразу после ягнения концентрация ЛФ резко падает на 60% ( $164,0 \pm 6,2$  мг/л,  $P < 0,001$ ), а через сутки на 85% ( $62,0 \pm 6,2$  мг/л,  $P < 0,001$ ), по сравнению с его уровнем в молочном секрете. Это согласуется с литературными данными, так Welty с сотрудниками обнаружили резкое падение ЛФ сразу после отела [242], а по мнению S.Tsujii с соавт. снижение уровня ЛФ после отела вызвано сосанием [232]. В дальнейшем содержание ЛФ в молоке более или менее стабилизируется.

**Динамика активности ЛЦ в молочном секрете овец.** Учитывая то обстоятельство, что лизоцим (ЛЦ), как и ЛФ, является одним из компонентов антимикробной системы нейтрофилов, в целях сравнительного анализа экспериментальных данных наряду с количественным изучением ЛФ мы определяли и активность ЛЦ.

Наши опыты по изучению активности ЛЦ показали, что в молочном секрете содержится довольно высокий уровень ЛЦ (табл. 4). Сразу после ягнения наблюдается резкое увеличение ЛЦ в первой порции молозива ( $48,1 \pm 7,3$  мкг/мл, табл.4). Через сутки после ягнения активность ЛЦ снижается в 2,5 раза. По истечению 3-х суток происходит стабилизация уровня ЛЦ.

Таблица 4

**Динамика изменения активности ЛЦ в молочном секрете овец, (мкг/мл), (P - относительно молозива до первого кормления)**

Сроки взятия пробы	M ± m	N	P
Молочный секрет до ягнения:			
за 26-14 дней	$26,8 \pm 6,5$	7	$< 0,05$
за 4-1 день	$23,2 \pm 8,8$	6	$< 0,05$
Молозиво до первого кормления	$48,1 \pm 7,3$	16	
через сутки	$18,9 \pm 3,3$	18	$< 0,001$
через 2 суток	$11,0 \pm 1,7$	8	$< 0,001$
через 3 суток	$10,8 \pm 1,9$	22	$< 0,001$
через 4 суток	$9,7 \pm 1,3$	21	$< 0,001$
через 5 суток	$9,4 \pm 1,2$	21	$< 0,001$
через 6 суток	$9,9 \pm 1,1$	16	$< 0,001$
через 7 суток	$8,9 \pm 1,1$	16	$< 0,001$
через 8 суток	$9,0 \pm 2,3$	10	$< 0,001$
через 9 суток	$7,5 \pm 1,2$	15	$< 0,001$
через 10 суток	$5,0 \pm 0,7$	12	$< 0,001$

### **Сравнительный анализ содержания ЛФ и ЛЦ в молочном секрете овец.**

Анализ содержания ЛФ и ЛЦ в молочном секрете в различные периоды суягности и лактации показывает существенное различие. Наглядно это представлено на рис.8 и 9. На диаграммах видно, что динамика активности ЛЦ отличается от таковой ЛФ.

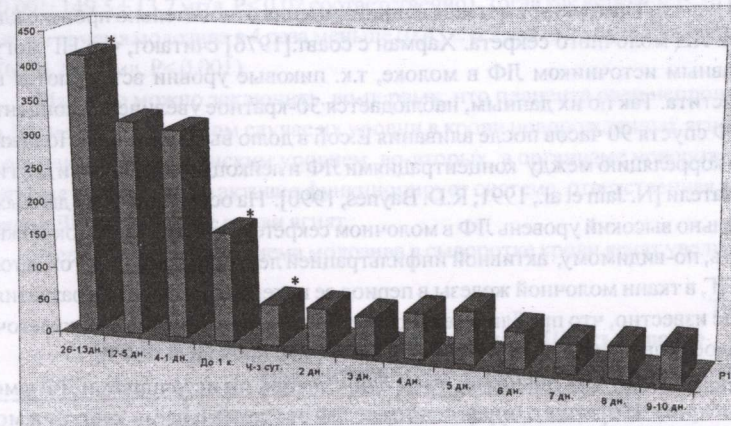


Рис.8. Содержание ЛФ в молочном секрете в различные периоды суягности и лактации, мг/л. (\* - достоверность,  $p < 0,01$ )

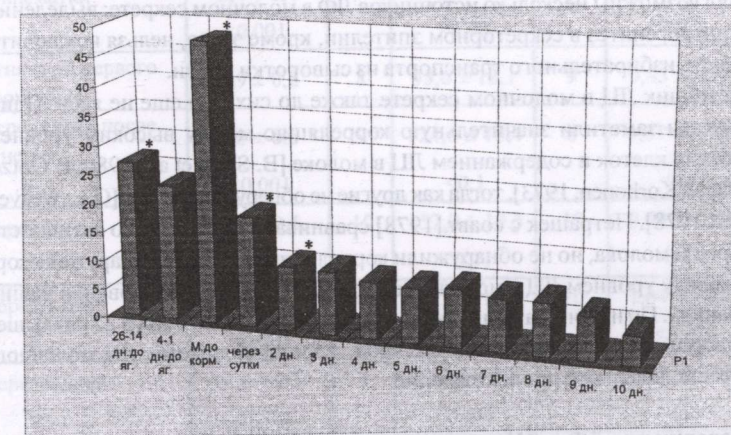


Рис. 9. Активность ЛЦ в молочном секрете овец в различные периоды суягности и лактации, мкг/мл. (\* - достоверность,  $p < 0,05$ )



Так, если максимальная концентрация ЛФ наблюдается в молочном секрете суягных овцематок за 26-13 дней до ягнения ( $413,5 \pm 56,8$  мг/л, табл.3), то наивысшая активность ЛЦ обнаруживается в молозиве сразу после ягнения ( $48,1 \pm 7,3$  мкг/мл, табл.4). Это в 2,5 раза превышает уровень ЛЦ в молочном секрете, полученном через сутки после ягнения ( $18,9 \pm 3,3$  мкг/мл.  $P < 0,001$ ).

В научной литературе нет еще единого мнения относительно происхождения ЛФ и ЛЦ молочного секрета. Харман с соавт.[1976] считают, что НГ могут быть главным источником ЛФ в молоке, т.к. пиковые уровни встречаются во время мастита. Так по их данным, наблюдается 30-кратное увеличение концентрации ЛФ спустя 90 часов после вливания *E.coli* в долю вымени коров. Положительную корреляцию между концентрациями ЛФ и лейкоцитов выявили и другие исследователи [N. Jain et al., 1991; R.D. Baynes, 1990]. На основании этих данных, сравнительно высокий уровень ЛФ в молочном секрете суягных овцематок можно объяснить, по-видимому, активной инфильтрацией лейкоцитарных клеток, в том числе и НГ, в ткани молочной железы в период ее интенсивного роста и развития. Тем более известно, что приблизительно 80% ЛФ высвобождается в межклеточную жидкость при дегрануляции НГ [M.S. Leffel, J.K. Spitznagel, 1975].

НГ могут быть основными, но не единственными источниками ЛФ в молочном секрете. Имеются данные о синтезе ЛФ эпителиальными клетками молочной железы [A. Carlsson et al., 1989; А.Е. Сухарев и др., 1990]. Благодаря всепроникающей способности НГ, трудно установить источники этих белков. На наш взгляд возможны несколько источников ЛФ в молочном секрете: выделение из лейкоцитов, синтез в секреторном эпителии, кроме этого, нельзя исключить возможность избирательного транспорта из сыворотки крови.

Источник ЛЦ в молочном секрете также до сих пор еще не ясен. Одни исследователи заметили значительную корреляцию между высоким уровнем соматических клеток и содержанием ЛЦ в молоке [B. Senft et al., 1980; P. Gotze et al., 1977; H. Korhonen, 1973], тогда как другие не обнаружили этого [G.L. Weaver, M. Kroger, 1978]. Петрашек с соавт.[1978] сравнивали лизоцимную активность крови коров и молока, но не обнаружили корреляцию. Не была обнаружена корреляция между уровнем ЛЦ в молочном секрете и в сыворотке крови и в наших исследованиях. По нашим данным, активность колострального ЛЦ в 27 раз выше, чем в сыворотке крови овцематок (см. табл. 4,5), по-видимому, ЛЦ молочного секрета имеет локальное происхождение

**Содержание ЛФ и ЛЦ в сыворотке крови овцематок и ягнят.** Как уже отмечалось, молозиво у жвачных животных играет огромную роль в обеспечении новорожденных не только энергетическими и пластическими материалами,

но и иммунологическими факторами защиты. Поэтому мы исследовали содержание ЛФ и ЛЦ в сыворотке крови новорожденных ягнят до и после приема молозива. Опыты показали, что в сыворотке крови новорожденных ягнят до приема молозива содержание общего белка составляет только 70,2% ( $5,9 \pm 0,2$  г/%, табл.5), а ЛФ 62,6 % ( $93,7 \pm 13,1$  мг/л) от материнского уровня ( $8,4 \pm 0,4$  г/%,  $P < 0,001$ ;  $149,5 \pm 13,7$  мг/л,  $P < 0,02$  соответственно). Тогда как активность ЛЦ крови ягнят до приема молозива в 4 раза меньше ( $0,43 \pm 0,2$  мкг/мл), чем в крови матери ( $1,76 \pm 0,2$  мкг/мл,  $P < 0,001$ ).

Из этого можно заключить, во-первых, что плацента овец непроницаема для ЛФ и ЛЦ, в противном случае их уровни в крови новорожденных ягнят были бы одинаковы с материнским уровнем, во-вторых, в организме новорожденных ягнят еще недостаточно активно функционирует система, ответственная за образование ЛЦ в сыворотке крови ягнят.

Через сутки после приема молозива в сыворотке крови ягнят увеличивается

Таблица 5

Содержания общего белка, лактоферрина и ЛЦ в сыворотке крови овцематок и ягнят

Пробы	Общий белок, г/%		Лактоферрин, мг/л		Лизоцим, мкг/мл	
	М ± m	N	М ± m	N	М ± m	N
Овцематки	$8,4 \pm 0,4$	7	$149,5 \pm 13,7$	7	$1,76 \pm 0,20$	6
P	<0,001		<0,02		<0,001	
Ягнята до первого кормления	$5,9 \pm 0,2$	8	$93,6 \pm 13,1$	9	$0,43 \pm 0,20$	8
Через сутки после ягнения	$9,8 \pm 0,6$	9	$124,6 \pm 10,4$	8	$0,81 \pm 0,36$	8
P	<0,001		<0,1		<0,5	
Через 2 дня	$9,3 \pm 0,5$	10	$152,0 \pm 10,5$	10	$0,99 \pm 0,12$	10
P	<0,001		<0,01		<0,05	
Через 4 дня	$9,0 \pm 0,3$	10	$137,1 \pm 10,8$	10	$1,04 \pm 0,17$	9
P	<0,001		<0,05		<0,05	
Через 6 дней	$9,8 \pm 0,3$	9	$139,8 \pm 9,9$	9	$0,90 \pm 0,16$	9
P	<0,001		<0,05		<0,1	
Через 8-10 дней	$8,4 \pm 0,2$	9	$123,4 \pm 8,9$	10	$0,80 \pm 0,18$	10
P	<0,001		<0,2		<0,5	

ся количество общего белка на 66% ( $P < 0,001$ ), ЛФ на 33% ( $P < 0,1$ ) и ЛЦ на 88% ( $P < 0,001$ ) по сравнению с его содержанием до кормления. Данный факт свидетельствует, что в первые дни жизни в кровь новорожденных ягнят через недифференцированные эпителиальные клетки кишечника переходит значительное количество ЛФ и ЛЦ. Если содержание ЛФ в крови ягнят через сутки после ягнения почти достигает материнского уровня, то активность ЛЦ составляла только 58% от материнской в течение 10 дней наших исследований (табл. 5). Аналогичная закономерность установлена и для ЛЦ коров [Емельяненко, 1976].

Эти данные свидетельствуют о важной роли молозива в обеспечении новорожденных ягнят такими существенными компонентами неспецифического гуморального иммунитета как ЛФ и ЛЦ. Тем более если учесть тот факт, что существует синергизм между этими белками в отношении их антибактериальных действий [M.S. Carlsson et al., 1989].

#### Выводы:

1. Получены высокоочищенные препараты ЛФ из молока и НГ овец. Установлена иммунохимическая идентичность ЛФ молока и НГ овцы. Антигенная чистота препаратов лактоферрина подтверждена методом иммуноэлектрофореза и в реакциях диффузной преципитации с использованием полученной антисыворотки.
2. Молекулярная масса ЛФ молока и НГ овец определена в пределах  $75\ 000 \pm 1\ 500$  Da. ЛФ молока овцы содержит 14 остатков нейтральных сахаров на молекулу. Методом двойной иммунодиффузии установлено отсутствие общих антигенных детерминант у ЛФ овцы и человека и наличие частичного перекреста у ЛФ овцы и коровы.
3. Наиболее высокие концентрации ЛФ и ЛЦ в молочном секрете и молозиве овец обнаружены, главным образом, в период дифференцировки секреторных клеток вымени, когда идет активная инфильтрация лейкоцитарных клеток и перестройка ткани молочной железы для лактационной деятельности.
4. Заметное увеличение ЛФ и ЛЦ в сыворотке крови новорожденных ягнят после приема молозива свидетельствует о важной роли этих колостральных белков в формировании неспецифических гуморальных факторов иммунитета ягнят.
5. Установлена, что плацентарная система овец непроницаема для молекул ЛФ.

#### Основные результаты диссертации опубликованы

##### в работах:

1. Корчубекова Т.А., Алешина Г.М. Выделение лактоферрина из молока овец // Тезисы докладов VII Всесоюзного симпозиума по физиологии и биохимии лактации, посвященной 100-летию проф. Г.И. Азимова - г. Баку, 1990, с.101-102.
2. Корчубекова Т.А., Алешина Г.М. Выделение лактоферрина из нейтрофильных гранулоцитов крови овец // Тезисы докладов Юбилейной научной конференции, посвященной 60-летию образования Кыргызстана - г. Бишкек, 1992, ч.1, с.108.
3. Корчубекова Т.А., Чекиров Т.Ч., Уракунова К.У., Мурсакулова С. Содержание лактоферрина в молочном секрете // там же, с.60.
4. Корчубекова Т.А., Алешина Г.М., Чекиров Т.Ч., Кокряков В.Н., Уракунова К.У. Лактоферрин молока и сыворотки крови овец // Известия АН РК - г. Бишкек, 1992, N1, с.36-40.
5. Корчубекова Т.А., Чекиров Т.Ч. Колостральный лактоферрин овец // Тезисы докладов Международной конференции «Актуальные проблемы вирусологии» - п.г.т. Гвардейский, Республика Казахстан, 1994, ч.2, с.82.
6. Корчубекова Т.А., Ногойбаева Р.С. Лизоцим овец // Материалы Международной научной конференции «Пути интенсификации животноводства в условиях рыночной экономики», посвященной 1000-летию юбилею эпита «Манас» - г. Бишкек, 1995, ч.3, с. 56-60.
7. Ногойбаев М.Д., Чекиров Т.Ч., Сухорукова Т.Ф., Уракунова К.У., Мадиева К., Ногойбаева Р.С., Корчубекова Т.А. Формирование иммунологического статуса у ягнят // Методические рекомендации для студентов ветеринарного факультета и слушателей ФПК - г. Бишкек, СХИ, 1991 г.
8. Чекиров Т.Ч., Сухорукова Т.Ф., Валуйский П.П., Иманов Э.Д., Уракунова К.У., Абрамова И.А., Ногойбаева Р.С., Корчубекова Т.А. Рекомендации по экспресс-методам определения иммуноглобулинов в крови и молозиве коров и овец // г. Бишкек, 1995 г.
9. Корчубекова Т.А., Чекиров Т.Ч., Ногойбаева Р.С. Динамика изменения активности лизоцима и лактоферрина молочного секрета овец в зависимости от уровня гормонов // Тезисы докладов III конференции биохимиков Узбекистана - г. Ташкент, 1996 г.
10. Корчубекова Т.А. Роль колостральных лактоферрина и лизоцима в становлении неспецифического гуморального иммунитета у ягнят // Известия НАН РК - г. Бишкек, «Илим», 1999 г., №1. - С. 34-36

11. Корчубекова Т.А. Сравнительный анализ динамики содержания лактоферрина и лизоцима в молочном секрете овец //Наука и новые технологии, 1999 г. №4. –С.124-126.
12. Корчубекова Т.А., Алешина Г.М. Некоторые физико-химические и иммунохимические свойства лактоферрина овец//Известия НАН КР – г. Бишкек, "Илим", 2000 г., №3. (в печати).

## АННОТАЦИЯ

Диссертациялык иште лактация калыптануу мезгилинде уздун спецификалык эмес иммунитетинин маанилүү факторлорунун бири болгон лактоферриндин койдун сүт секретинде пайда болуу динамикасы изилденген. Сүттөн жана кандын нейтрофилдеринен таза лактоферрин препараты бөлүнүп алынып, алардын иммунохимиялык окшоштуктары аныкталган. Койдун лактоферринин кээ бир физика-химиялык жана иммунохимиялык касиеттери изилденген.

Эң жогорку концентрациядагы лактоферрин, желиндеген койдун сүт секретинде желиндин секретордук функциясы калыптануу учурунда, качан сүт бездер ткандары жаңыдан жаралып, лактация функциясына даярданып, уздун иммундук компоненттери жыйналып жаткан мезгилде кездешет.

Ууз менен тоюттандырылгандан кийин жаңы туулган козулардын канында лактоферриндин көбөйүшү алардын спецификалык эмес гуморалдык иммунитетинин пайда болушунда ууз лактоферринин чоң мааниси бар экендигин далилдейт.

## SUMMARY

The dissertation researches dynamics of creation of one of the critical factors of non-specific colostrum immunity – lactoferrin in the milk secrets of sheep during evolution of lactation function.

Lactoferrin has been extracted from milk & blood neutrophils of sheep in gomogeneous condition, their immunochemical identity. Some physical, chemical & immunochemical properties of sheep lactoferrin has been researched.

The highest concentration of lactoferrin has been identified in milk secret of ewes in yeau during evolution of secretion function when tissues of the mammary gland is preparing for lactation, and immunity milk components are accumulating.

Significant increase of lactoferrin in blood serum of newborn lambs after first feeding with colostrum proves impotent role of colostrum lactoferrin in formation of non-specific humoral resistance of lambs.