

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ**

На правах рукописи

УДК 612: 591.146 (575.2) (043.3)

УРАКУНОВА КАЛИМА

**ОСОБЕННОСТИ ЦИТОФИЗИОЛОГИИ
СЕКРЕЦИИ МОЛОКА ОВЕЦ**

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Бишкек - 2002

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

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Турсун Чекирович Чекиров

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Хабдрахман Дюсембинович Дюсембин

доктор медицинских наук,
профессор

Тургунбай Кадыралиевич Кадыралиев

Ведущая организация: Кыргызский научно-исследовательский институт
животноводства, ветеринарии и пастбищ

Защита состоится "19" сентября 2002 г. в 14⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 03.02.179 при Институте биохимии и физиологии
НАН КР (720071 г. Бишкек, пр. Чуй, 265)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национальной академии
наук Кыргызской Республики

Автореферат разослан "18" ноября 2002 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук**

А.Р. Умралина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Овцеводство является традиционной и ведущей отраслью животноводства Кыргызстана. Ее развитию способствует наличие обширных горных пастбищ, занимающих более 90% всей территории. Известно, что одной из важных репродуктивных функций овцематок является - лактационная, которая обеспечивает новорожденных ягнят не только пластическими и энергетическими материалами, но и материнскими иммуно-защитными факторами (иммуноглобулины, лизоцим, лактоферрин и другие, включая клеточные компоненты иммунитета), определяющими их выживаемость. Отсюда значимость лактационной функции овцематок в развитии отрасли.

В настоящее время имеются немало исследований, посвященных различным аспектам лактации овец [С.А. Аминов, 1961; Х.Д. Дюсембин, 1971; Н.У. Базанова, Х.Д. Дюсембин, 1973; И.И. Грачев и др. 1974; М.Н. Лушихин и др. 1978; М.И. Хомякова и др., 1979; К.А. Алагушев, Р.А. Байбеков, А.А. Карашев, 1992, 1995; А.А. Карашев, 1996; З. Мукашев, 2001; С.W. Turner, 1952; R. Denamur, 1972; R.R. Anderson, 1975]. Однако физиолого-биохимические и цитофизиологические аспекты становления лактации овец остаются еще недостаточно изученными. Так, R.R. Anderson [1975], изучая рост и развитие вымени суягных овец по изменению уровня ДНК пришел к заключению, что основной рост происходит в период суягности и зависит от породной особенности животных. Автор ограничивался изучением только количественной стороны развития вымени, не обращая внимания на характер качественного изменения ее функций и структуры. В результате не исследованными остались вопросы формирования секреторной функции и альвеолярно-го комплекса паренхимы, включая ультраструктуру дифференцировки железистых клеток, иммунобиологические особенности первичного молочного секрета (МС) и становление компетентности секреторных клеток (СК) вымени овец к синтезу компонентов молока. Изучение этих вопросов имеет принципиальное значение не только в теоретическом плане, но и в практическом аспекте для развития овцеводства и повышения его эффективности.

Тема диссертационной работы соответствует плану НИР лаборатории биохимии животных Института биохимии и физиологии (ИБФ) НАН КР, утверждена Ученым Советом (протокол №5 от 25 марта 1981 г.) и составляла часть научно-исследовательской тематики лаборатории биохимии животных ИБФ на период с 1981-1985 гг. (регистрационный

номер №01.82.900260) и на период с 1986-1990 гг. (регистрационный номер №01.86.0123991).

Цель исследования. Изучить некоторые особенности цитофизиологии секреции молока овец кыргызской тонкорунной породы (КТП), включая физиолого-биохимические и ультраструктурные аспекты дифференцировки СК вымени в различные периоды суягности и ранней лактации.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить образование альвеолярной структуры вымени овец в различные периоды суягности.
2. Исследовать формирование синтетического аппарата СК молочной железы овец на просвечивающем электронном микроскопе (ЭМ).
3. Определить динамику образования первичного молочного секрета и его иммуно-биологические свойства.
4. Изучить становление компетентности СК к синтезу молочных белков вымени овец.

Научная новизна работы:

1. Изучено становление альвеолярной структуры на основании комплексного изучения микро-ультраструктурной и трехмерной организации ткани вымени овец в различные периоды суягности.
2. Впервые на просвечивающем ЭМ показаны закономерности формирования синтетического аппарата СК вымени овец.
3. Впервые установлены сроки образования первичного молочного секрета в емкостной системе вымени, даны иммуно-биологические характеристики первичного молочного секрета, молозива, молока, особенности секреции молока овец КТП.
4. Установлена динамика образования α - и β -казеинов в железистых клетках вымени овец методом иммунохимического анализа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования углубляют фундаментальные представления физиологии и биохимии лактации в познании закономерностей дифференцировки СК вымени овец, включая экспрессию белковых генов и становление компетентности к синтезу компонентов молока.

Полученные результаты могут быть использованы:

- при разработке иммунохимических тестов экспрессии генов мо-

лочных белков в процессе дифференцировки СК молочной железы (МЖ);

- при селекционно-племенной работе для более точного определения молочности овцематок, иммунологических достоинств молозива.
- при разработке теоретических вопросов дифференцировки СК МЖ, изучении различных аспектов секреции молока овец и написании учебно-методических пособий и монографий по данной тематике.
- Атлас "Микро- и ультраструктура клеток МЖ овец и коров в процессе маммогенеза и лактопоэза" (Бишкек: Илим, 1991) может быть использован как учебное пособие для обучения зооветеринарных специалистов.

Основные положения работы, выносимые на защиту:

1. Основой формирования альвеолы из недифференцированного скопления клеток является стадия многослойного и двухслойного эпителия, который в последующем за счет дегенерации внутреннего слоя преформируется в монослой железистого эпителия.
2. Дифференцировка СК начинается с третьего месяца суягности, а в период лактации ультраструктурная организация СК достигает наибольшей степени дифференцировки.
3. Железистые клетки начинают вырабатывать первый секреторный продукт в конце третьего месяца суягности. Первоначальный МС поступает в полость цистерн емкостной системы вымени овец в конце суягности за 8-12 дней до ягнения.
4. Иммуноэлектрофоретический анализ первичного молочного секрета с антисывороткой к α - и β -казеинам показал меньше линий преципитации, чем молозиво. Только в молозивном периоде суягности происходит окончательная экспрессия казеиновых генов СК вымени овец, что в конечном результате приводит к синтезу полноценной молекулы казеина.
5. Секреторная активность вымени овец (количество молока и его химический состав) зависит не только от условий содержания, кормления, но и от уровня развития емкостной системы вымени, которая является одним из лимитирующих факторов лактации овец КТП.

Апробация работы.

Основные результаты и положения диссертационной работы доложены на: I-ой республиканской научно-технической конференции молодых ученых Киргизии (Фрунзе, 1981), III конференции биохимиков рес-

публик Средней Азии и Казахстана (Душанбе, 1981), VI Всесоюзном симпозиуме по физиологии и биохимии лактации (Львов, 1982), VII Всесоюзном симпозиуме по физиологии лактации (Алма-Ата, 1986), VIII Всесоюзном симпозиуме по физиологии и биохимии лактации (Баку, 1990), международной научной конференции "Пути интенсификации животноводства в условиях рыночной экономики", посвященной 1000-летию юбилею эпоса "Манас" (Бишкек, 1995), III конференции биохимиков Узбекистана (Ташкент, 1996); расширенном заседании лаборатории физиологии и биохимии животных Института биохимии и физиологии НАН КР (Бишкек, 2002), научно-практической конференции "Проблемы повышения продуктивности с-х животных и растений с использованием методов биотехнологии в условиях высокогорья", посвященной 100-летию со дня рождения академика А.А. Волковой и академика Н.И. Захарьева (Бишкек, 2002).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе: 1 атлас, 4 рекомендации, 8 статей.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 274 наименования, из них 107 иностранных. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 50 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты и материалы. Для изучения микро- и ультрацитофизиологии формирования секреторной функции овцематок КТП, образцы ткани получали от 70 голов в различные периоды суягности, сразу после забоя.

В целях изучения микро- и ультрацитофизиологии вымени лактирующих овец, образцы ткани получали при спецзабое от 35 голов на базовых для наших исследований хозяйствах: на племенной овцеводческой ферме колхоза им. "50-летия СССР" Тюпского района и в совхозе "Урюкты" Иссык-Кульского района Иссык-Кульской области.

Исследования особенностей молочной секреции проводились на 70

овцематках первого класса КТП (аналогов по срокам лактации, живой массе, продуктивности) на базе племенной овцеводческой фермы колхоза им. "50-летия СССР" при зимнем стойловом содержании и летнем пастбищном выпасе в урочище Башарын. При стойловом содержании кормление экспериментальных животных проводилось согласно типовым рационам, обеспечивающим потребность суягных и лактирующих овцематок в основных элементах питания. В состав рациона входили: сенаж, сено, эспарцет, концентрированные корма, солома в измельченном виде. В пастбищный период овцематки, кроме пастбы и водопоя, получали только соль-лизунец.

Образцы молочного секрета собирали у овцематок в различные периоды суягности, молозиво – сразу после ягнения до первого кормления и в различные сроки после него.

Электронно-микроскопические исследования проводили в лаборатории электронной микроскопии (заведующие Д.В. Гуляев и И.А. Иванова) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН РФ (г. Москва) за что выражаем им глубокую признательность.

Методы. Для световой микроскопии образцы фиксировали в смеси формалина - спирта - уксусной кислоты по Меркулову [1961]. Для изучения особенностей организации трехмерной структуры емкостной системы МЖ лактирующих овец с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), ткани фиксировали глутароальдегидом с дополнительной фиксацией в четырехокиси осмия. Затем, после дегидратации, ткань высушивали переходом критической точки в специальном аппарате ДХ -1 фирмы "Eiko" (Япония). Вакуумное напыление препарата производили золотом с помощью распылителя FEE - 4. Для получения коррозионного препарата лактирующей МЖ овец в качестве инъекционной массы использовали предполимеры метилметакрилата (ММА) по А.А. Миронову, С.И. Катанову и Ю.И. Алексину [1979].

Для электронномикроскопических исследований обработку проводили согласно руководству Уикли Б. [1975]. Ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме ЛКБ (Швеция) и контрастировали 2% -ным раствором уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу [1973] и затем просматривали под ЭМ JEM - 7 А, 100 СХ.

Количественное определение лактозы в молочном секрете, молозиве и молоке проводили по Slater [1957]. Выделение общего казеина из молока овец и разделение фракций казеина проводили в цитратно-фосфатном буфере по методу Aschafenburg [1961]. Для получения моноспецифической антисыворотки к этим белкам использовали схему иммунизации по Д. Сте-

фани и др. [1972], аналитический иммуноэлектрофорез проводили по методу Г.Фримеля [1987]. Определение молочной продуктивности проводили окситоциновым методом.

Содержание жира в молоке определяли кислотным методом по Герберу [1974]. Концентрацию общего белка в образцах молочного секрета, молозива и молока определяли методом Лоури в модификации Чешева и др. [1967]. Содержание иммуноглобулинов G и M определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [1965], иммунокомпетентность клеток методом розеткообразования по Солодовникову [1983].

Результаты экспериментальных работ обрабатывались математически по общепринятым методикам. В таблицах и в тексте измеряемые величины представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка средней величины [Асатиани В.С., 1964].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование альвеолярного комплекса вымени овец. Наши исследования по изучению ультраструктурной цитофизиологии ткани вымени показали, что в начальных стадиях беременности в МЖ обнаруживается наличие мощного жирового пакета, в результате чего заметно увеличивается объем вымени овец. Характерной особенностью этого срока (первый, второй месяц суягности) является совершенное отсутствие альвеолярной структуры, паренхима железы главным образом заполнена огромными жировыми клетками (Рис. 1).

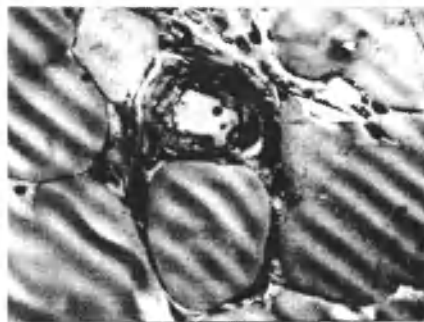


Рис. 1. МЖ (2 мес. суягности), заполненная жировыми клетками. В центре кровеносный сосуд. Гематоксилин+эозин, х550

В середине суягности можно заметить интенсивное уменьшение объема жировой ткани. Жировые клетки МЖ постепенно замещаются соединительно-тканной стромой. Соединительно-тканные пласты, заменившие жировую ткань, в свою очередь, замещаются клетками развивающейся паренхимы (Рис. 2).

Одной из возможных причин формирования альвеолы из скопления клеток можно считать складывающиеся в этот период межклеточ-

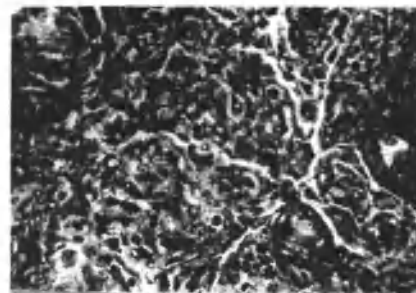


Рис. 2. Образование развивающейся паренхимы вместо соединительной ткани (3-й месяц суягности). Окраска гематоксилин+эозин, х 400.

ные взаимоотношения. Непосредственно контактирующие с окружающей соединительной тканью мезенхимального происхождения клетки зачатка альвеолы находятся в преимущественном положении по

отношению к индуцирующим влияниям [Lenton et al., 1975]. В ходе этого процесса интенсивно окрашенные клетки подвергаются сортировке, при этом наиболее дифференцированные клетки располагаются по периферии будущей альвеолы (рис.3). Создание целого комплекса новых для клеточной поверхности мембранных органелл способствует объединению клеток наружного слоя в сферический монослой, для которого характерна метаболическая и регуляторная кооперация различных клеточных популяций.

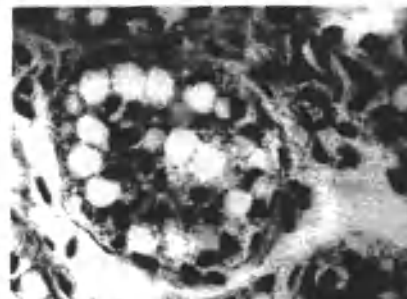


Рис. 3. Один из этапов формирования альвеолы во 2-й половине суягности. Окраска гематоксилин+эозин, х 600

Оставшиеся вне влияния клетки отслаиваются и в последующем подвергаются дегенеративным изменениям и деструкции с участием протеолитических ферментов лимфоидных клеток, а также автолиза,

при котором очищается просвет альвеолы и ее выводной проток для выведения секрета в лактационный период. Это приводит к формированию монослоя секреторного эпителия, выстилающего полость альвеолы (Рис. 4).

Таким образом, необходимым этапом формирования альвеолы из недифференцированного скопления клеток является стадия многослойного и двуслойного эпителия, который в последующем за счет дегенерации внутреннего слоя преформируется в монослой железистого эпителия, контактирующего со стромальными элементами мезенхимального происхождения.

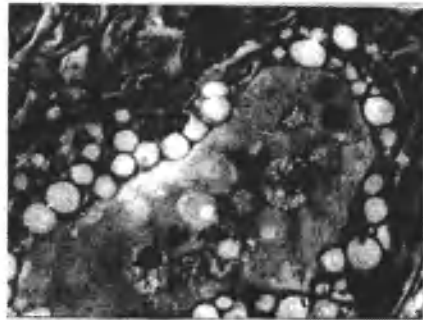


Рис. 4. Образование монослоя секреторного эпителия, выстилающего полость альвеолы. Жировые глобулы локализованы в секреторных клетках, в полости видны лейкоциты, x 600

Исследования на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ). До настоящего времени мы не имели объективных данных о характере пространственной организации альвеол - основных рабочих структурно-функциональных единиц паренхимы МЖ. Мы изучали трехмерную структуру альвеол, исследуя сколы и срезы тканей, реплики коррозионных препаратов вымени овец на СЭМ. Основным достоинством этого метода, благодаря очень высокой глубине резкости, является получение объемных (трехмерных) картин, что позволяет наглядно представить не только топографическую организацию, но и межклеточные и межтканевые взаимодействия в изучаемом органе [Мионов А.А. и др., 1979].

Нами установлено, что альвеолы вымени лактирующих овец разнообразны как по размерам, так и по форме, что зависит не только от уровня прохождения среза через альвеолы, но и от очень плотной их компоновки в органе, вследствие чего они подвержены взаимной "деформации". Наиболее часто на гистологических срезах, сканограммах препарата коррозионных реплик и сколотой поверхности ткани встречались альвеолы несколько неправильной округлой или овальной формы, имеющие стенку, состоящую из одного слоя секреторных клеток. По всему периметру альвеолярной полости (Рис. 5, 6) поверхность альвеол несет множество эпителиальных выростов, возникающих, по-видимому, в лактационный период. Решающая роль в формировании рельефа наружной поверхности альвеол принадлежит миепителиальным клеткам, которые тесно прилегая своими отростками к их поверхности, оставляют на последних глубокие бороздки и вдавливания, особенно четко выраженные, если железа взята сразу же после доения.

В зоне перехода соскового канала в цистерну существенно меняется характер слизистой - продольные складки заканчиваются на границе соска и цистерны, в цистернальной части емкостной системы вымени наблюдаются многочисленные секреторные комплексы. Канал сфинктера соска выстлан многослойным роговеющим эпителием. Наши данные в корне изме-

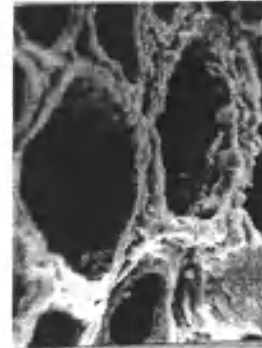


Рис.5. Сканограмма скола вымени лактирующей овцы в разрезе. Видны альвеолы, освобожденные от секрета. x1230



Рис.6. На коррозионном препарате видны альвеолы лактирующей МЖ, x 350

няют представление о строении сфинктера соска, когда считалось, что он состоит из кольцеобразных многослойных гладкомышечных структур. На самом деле, сфинктер соска состоит из нескольких (около 20) валикообразных утолщений, которые в совокупности обеспечивают перекрытие соскового канала.

Таким образом, нам впервые удалось показать характер трехмерной организации альвеол, взаимоотношение капилляров с альвеолами, особенности слизистой сосковой и цистернальной полостей вымени овец. Особенно интересная информация получена о характере трехмерной организации сфинктера соска, который играет исключительно важную роль в проявлении рефлекса молокоотдачи и его торможении.

Формирование секреторной функции железистых клеток вымени овец в период суягности. Наши исследования ультраструктуры вымени овец в различные периоды суягности показали, что в начале третьего месяца суягности железистые клетки имеют бедную цитоплазматическую организацию и немногочисленные органоиды (Рис.7).

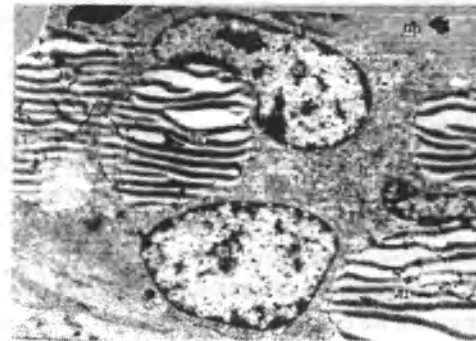


Рис.7. МЖ в середине суягности (2,5 мес.), x 5 000

Базальная мембрана тонкая, неровная и складчатая, густо покрыта микропиноцитозными везикулами. Плотнo прилегающие друг к другу боковые поверхности соседних клеток в некоторых

местах выявляют соединительные комплексы типа десмосом. Ядра эпителиальных клеток имеют округлые формы с неровным контуром и равномерно заполнены хроматином. В цитоплазме обнаруживаются элементы эргестоплазмы, аппарат Гольджи (АГ), вакуоли, везикулы митохондрии. Значительную часть территории клеток занимают округлые жировые гранулы. В паренхиме последовательно все более и более уменьшаются жировые подушки и совершенно исчезают к концу суягности.

На этой стадии отмечается начальная дифференцировка миоэпителиальных клеток (МЭК), в которых обнаруживается наличие крупного многолопастного ядра с хорошо диспергированным хроматином. В ее цитоплазме встречаются редкие миофиламенты различного калибра (толстые и тонкие), а в непосредственной близости от них локализуются каналы эндоплазматического ретикулума (ЭР) и множественные свободные рибосомы.

На третьем месяце суягности наблюдается начальная стадия дифференцировки клеток секреторного эпителия (СЭ), где обнаруживается большое овально-круглое ядро, вытянутое параллельно базальной мембране. Его хроматин располагается по периферии и хорошо диспергирован. Обнаруживается полость альвеол, окруженная слоем секреторного эпителия (Рис.8).

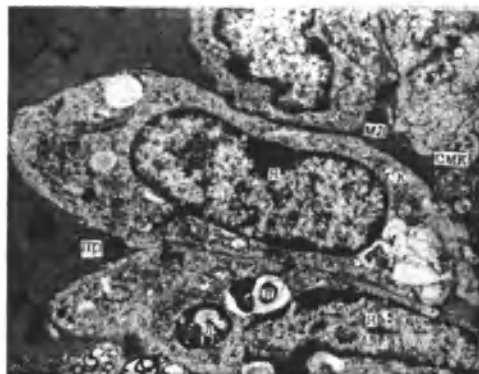


Рис.8. Секреторные клетки формирующихся альвеол во второй половине суягности, х 6 000.

Однако структура замыкающего комплекса и межклеточных связей еще не сформирована. Хорошо выражены межклеточные лакуны, встречаются лизосомы и диктиосомы АГ, которые еще не несут в своем составе секреторный продукт. В апикальной зоне присутствуют

также извитые митохондрии различной формы с электронноплотным матриксом, находящимся на различных стадиях деградации. АГ состоит из цистерн, вакуолей и везикул. ЭР представлен шероховатыми трубочками, которые по своему ходу могут расширяться, но еще слабо развиты.

Наши наблюдения показали, что у овец железистые клетки начинают вырабатывать первый секреторный продукт в конце третьего месяца суягности. К этому времени в цитоплазме появляются молочные жировые капельки и протеиновые гранулы, хотя не во всех клетках наблюдается секреторная активность, только часть железистых клеток готова для синтеза компонентов молока. Выработанные белки появляются в вакуолях АГ как круглые гранулы высокой электронной плотности. На этой стадии беременности они остаются в пределах СК и не выделяются в альвеолярную полость.

В наиболее дифференцированных альвеолах четвертого месяца суягности наблюдается формирование межклеточных щелевых контактов, которые имеют очень протяженную зону. На пятом месяце суягности клеточная дифференцировка прогрессирует, благодаря дальнейшему развитию цитоплазматических органелл, достигая наибольшего развития к концу суягности (Рис.9).

Значительным событием к концу суягности является высвобождение секреторного продукта в альвеолярную полость.

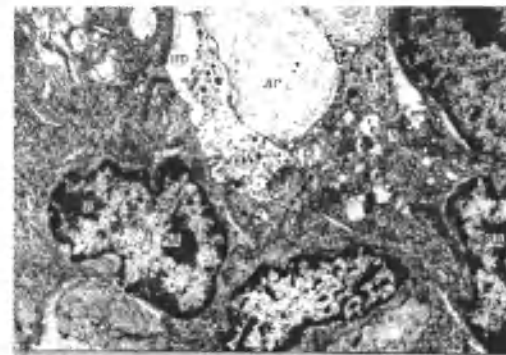


Рис.9. Фрагмент секреторной клетки вымени перед ягнением, х 5 000.

Ультраструктурная цитофизиология вымени лактирующих овец.

Наши данные свидетельствуют о том, что наступление лактации приводит к существенному изменению структурной организации железистого эпителия. В начале лактации

(на 10-ый день после ягнения) в СК количество органоидов существенно увеличивается по сравнению с предлактационным периодом, в результате чего значительно плотнее выглядит цитоплазма. Существенно увеличивается объем ядер, дисперсия хроматина и площадь активной поверхности ядерной оболочки. Вакуоли Гольджи СК содержат протеины, которые постепенно сливаются и образуют белковые молекулы. Цитоплазма насыщена рибосомами. Митохондрии и их скопление в основном находятся в базальной части клетки (Рис.10).

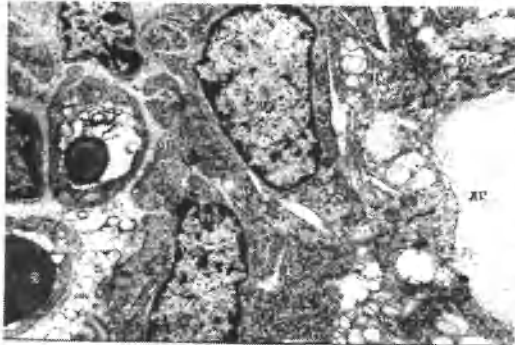


Рис. 10. МЖ овцы в начале лактации (5-8 дней), $\times 5\ 000$.

Митохондрии, эргастоплазма и аппарат Гольджи продолжают увеличиваться в объеме до 5-го и 20-го дня лактации. Некоторые авторы (Verly и Hollman, 1971) объясняют это высоким уровнем пролактина в крови животных.

Таким образом, на основании нами проведенных исследований можно заключить, что в период лактации ультраструктурная организация секреторных клеток достигает наиболее высокой степени дифференцировки.

Характеристика первоначального молочного секрета и молозива овец. Для общей характеристики молочного секрета, молозива и молока мы определяли содержание общего белка, казеина и сывороточных белков, полученных в различные сроки суягности и лактации. Наши опыты показали, что самая высокая концентрация общего белка и сывороточных белков обнаруживается в молочном секрете суягных овцематок (Табл.1).

Это свидетельствует о сравнительно невысоком уровне синтеза казеина в МС, полученном за 8-12 дней до ягнения, и молозиве, а также о значительном увеличении сывороточных белков в этих секретах, в состав которых входят гуморальные иммунологические компоненты, играющие исключительно важную роль в передаче гуморальных иммунозащитных факторов матери новорожденным ягнятам. В молоке, по сравнению с молозивом, меньше в 2,4 раза сухого остатка, в 5 раз общего белка, в 2,3 раза казеина и в 2 раза молочного жира (Табл.2).

Молочный секрет, полученный за 8-12 дней до ягнения, содержит в 2,5 раза больше Ig G ($160,7 \pm 10,0$ мкг/мл) и 2,2 раза больше Ig M ($13,7 \pm 0,7$ мкг/мл), чем молозиво. Возможно, такое резкое уменьшение уровня иммуноглобулинов в молозиве вызвано разбавлением последнего. В то же время молозиво содержит в 136 раза больше IgG ($68,3 \pm 2,4$ мкг/мл) и в 62 раза больше Ig M ($6,2 \pm 0,2$ мкг/мл), чем обычное молоко овцематок. Кроме того, в составе МС и молозива содержатся иммунокомпетентные клетки. Причем в МС Т-лимфоцитов на 46%, В- и К- лимфоцитов на 25% больше,

Таблица 1

Сравнительная характеристика содержания белков в различном молочном секрете овец (Р - относительно молочного секрета)

Название секрета	n	Общий белок, г %	Казеин, г %	Сывороточные белки, г %
		M±m	M±m	M±m
Молочный секрет до ягнения	16	$48,3 \pm 4,4$	$7,5 \pm 1,0$	$40,8 \pm 3,4$
Молозиво	42	$20,9 \pm 0,7$	$5,6 \pm 0,2$	$15,4 \pm 0,5$
Р		< 0,001	> 0,05	< 0,001
Молоко	14	$5,0 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,05$
Р		< 0,001	< 0,001	< 0,001

Таблица 2

Сравнительная характеристика различного молочного секрета

Компоненты	МС за 8-12 дней до ягнения		Молозиво		Молоко на 30 день лактации	
	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n
Сухой остаток, г %	-		$38,9 \pm 1,3$	24	$15,9 \pm 0,4$	15
Лактоза, г %	-		$2,9 \pm 0,8$	11	$5,4 \pm 0,2$	10
Жир, г %	-		$16,1 \pm 0,6$	53	$7,6 \pm 0,3$	23
Активная кислотность, pH	-		$6,3 \pm 0,04$	11	$6,9 \pm 0,03$	16
Титруемая кислотность, T°	-		$70,0 \pm 4,1$	11	$25,0 \pm 1,0$	16
Ig G, мг/мл	$160,7 \pm 10,0$	56	$68,3 \pm 2,4$	108	$0,5 \pm 0,02$	65
Ig M, мг/мл	$13,7 \pm 0,7$	56	$6,2 \pm 0,2$	108	$0,1 \pm 0,01$	21
T-лимфоциты, тыс/мкл	110 ± 10	17	60 ± 7	11	-	-
B-лимфоциты, тыс/мкл	40 ± 4	17	30 ± 5	8	-	-
K-киллеры, тыс/мкл	40 ± 5	15	30 ± 4	8	-	-

чем в молозиве. Следовательно, молозиво является не только источником обеспечения иммуноглобулинами, но и иммунокомпетентными клетками новорожденных ягнят, когда у них еще до конца не запущена собственная лимфоидная система.

Становление компетентности секреторных клеток вымени овец к синтезу компонентов молока. Иммунохимический анализ белков показал, что, несмотря на более высокое содержание их в МС, они качественно отличаются от белков молозива. МС, полученный за 1 день до ягнения с анти β- и α- казеином образует одну полосу преципитации (рис. 11. лунка 2,4), а молозиво до кормления образует с этой же антисывороткой две линии преципитации (лунка 3). МС образует (лунка 8) намного больше линий преципитации с антисывороткой крови овец, молозиво до кормления (лунка 7) с этими антисыворотками дает меньше линий преципитации.

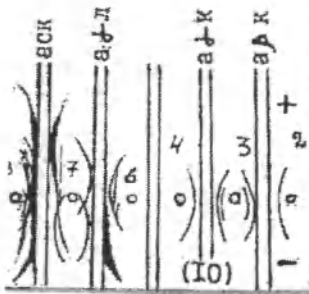


Рис. 11. Иммуноэлектрофорезная диаграмма МС овец за 1 день до ягнения и молозива до кормления. В лунках: 2,4,6,8 - МС за 1 день до ягнения; 3,7 - молозиво до кормления. В траншеях: αβк - антисыворотка к β- казеину; ααк - антисыворотка к α- казеину; αл - антисыворотка к α-лактальбумину; аск - антисыворотка к сыворотке крови овец.

На рис. 12 МС, взятый за 2 дня до ягнения образует с анти α- и β- казеином по одной линии преципитации (Рис. 12, лунка 4,5), молозиво до кормления образует с этой же антисывороткой четыре полосы преципитации (на три линии больше), (лунка 3), МС с антимолоком образует преципитации одинаковые линии (лунка 5,6). МС с антисывороткой крови овец образует на две линии преципитации больше, чем молозиво до кормления (лунка 8).

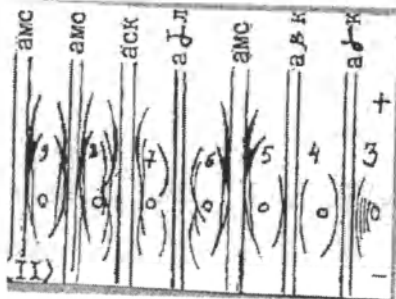


Рис. 12. Иммуноэлектрофорезная диаграмма МС овец за 2 дня до ягнения и молозива до кормления. В лунках: 4,6,8 - МС за 2 дня до ягнения. 3,5,7,9 - молозива до кормления. В траншеях: ααк - антисыворотка к α- казеину; αβк - антисыворотка к β- казеину; амс - антисыворотка к молоку овец; аск - антисыворотка к сыворотке крови овец.

МС, полученный на 7-ой день до ягнения с α- и β- казеином дает на одну линию преципитации меньше, чем молозиво до кормления (рис. 13, лунки 3,4,5).

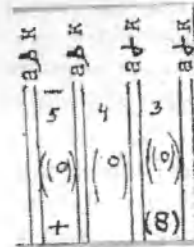


Рис. 13. Иммуноэлектрофорезная диаграмма МС овец за 7 дней до ягнения и молозива до кормления. В лунках: 4 - МС за 7 дней до ягнения; 3,5 - молозиво до кормления. В траншеях: ααк - антисыворотка к α- казеину; αβк - антисыворотка к β- казеину.

Таким образом, на основании наших исследований мы можем заключить, что в предродовой период происходит усиленный переход в МЖ сывороточных белков крови. Результаты показывают, что в МС суягных овцематок молекулы белковых фракций α-, β- казеина не полностью синтезированы и сформированы. На наш взгляд, первоначальный МС претерпевает большие изменения к моменту превращения его в обычное молозиво.

Влияние интервала времени между доениями на секрецию молока. Мы изучали влияние различных интервалов времени между доениями (4, 7, и 12 часов) на процессы секреции молока. Мы при определении молочной секреции дали предпочтение окситоциновому методу, поскольку он является наиболее точным, хотя и довольно трудоемким. Результаты этих исследований показали, что самый высокий уровень суточной молочной секреции был при четырехчасовом интервале между доениями. Изменение этого срока до 7 часов вызывает снижение его на 56% ($952 \pm 0,5$ мл, $P < 0,001$). Удлинение времени между доениями до 12 часов также уменьшает суточную молочную секрецию по сравнению с четырехчасовым интервалом ($P < 0,001$). Следовательно, чрезмерное увеличение интервала между доениями вызывает резкое торможение секреции молока. Отсюда напрашивается практический вывод, что интервал между сосаниями ягнят КТП не должен превышать более 4-х часов и даже лучше, если он будет еще короче (не более 2-х часов), особенно в ранний лактационный период.

ВЫВОДЫ:

1. Необходимым этапом формирования альвеолы из недифференцированного скопления клеток являются стадии многослойного и двухслойного эпителия, которые в последующем за счет дегенерации внутреннего слоя преформируются в монослой железистого эпителия.
2. Впервые методом сканирующего электронного микрофотографирования изучено строение сфинктера соска. Установлено, что он состоит из нескольких (около 20) валикообразных утолщений, обеспечивающих перекрытие соскового канала. Показан характер трехмерной организации альвеол, взаимоотношение капилляров с альвеолами, особенности слизистой и цистернальной полостей вымени овец.
3. С 3-го месяца суягности происходит дифференцировка секреторных клеток молочной железы в результате глубокой перестройки организации внутриклеточных органоидов (ядра, рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи, шероховатый и гладкий эндоплазматический ретикулум и др.). В конце суягности клеточная дифференциация прогрессирует, ультраструктурная организация достигает наиболее высокой степени дифференцировки в период лактации.
4. Секреторные клетки начинают вырабатывать первый секреторный продукт в конце третьего месяца суягности. В период суягности постепенно накапливается молочный секрет, но его экструзия подавлена. Первоначальный молочный секрет поступает в полость цистерны в конце суягности за 8-12 дней до ягнения.
5. В молочном секрете суягных овцематок перед ягнением молекулы белковых фракций α - β -казеина не полностью синтезированы и сформированы. Окончательная экспрессия казеиновых генов происходит в молочивном периоде.
6. Секреторная активность вымени овец (количество молока и его химический состав) зависят не только от условий содержания и кормления, но и от уровня развития емкостной системы вымени, которая является одним из лимитирующих факторов лактации овец кыргызской тонкорунной породы.

Список основных научных трудов, опубликованных по теме диссертации:

1. Влияние пролактина на клетки монослойной культуры молочной железы // Сборник статей: "Роль медиаторов нервного возбуждения в лактации". Фрунзе: Илим, 1980. - С.49-58. (Соавт.: Голубчиков В.С., Мадиева К.Т.).
2. Влияние ацетихолина и инсулина на клетки молочной железы в монослойной культуре // В сб.: "Обмен веществ у животных". - Фрунзе: Илим. -1982. - С. 73-83. (соавт.: Мадиева К.Г., Сухорукова Т.Ф., Чекиров Т.Ч.).
3. Рекомендации по научно обоснованному использованию данных о молочном секрете в развитии и формировании резистентности ягнят // Методические рекомендации. - Фрунзе: Илим, 1983. - 38 с. (соавт.: Чекиров Т.Ч., Хандуев Ц.Ц., Сухорукова Т.Ф. и др.).
4. Молочная продуктивность овец и развитие ягнят кыргызской тонкорунной породы // В сб.: Обмен веществ у животных. - Фрунзе: Илим, 1984. - С.3-18. (соавт: Чекиров Т.Ч., Сухорукова Т.Ф., Мадиева К.Т.).
5. Формирование иммунологического статуса у ягнят // Методические рекомендации для студентов ветеринарного факультета и слушателей факультета повышения квалификации. - Бишкек, 1991. - 30 с. (соавт.: Ногойбаев М.Д., Чекиров Т.Ч., Сухорукова Т.Ф. и др.).
6. Микро - и ультраструктура клеток молочной железы овец и коров в процессе маммогенеза и лактопоэза // (АТЛАС). - Бишкек: Илим, 1991. - 55 с. (соавт.: Чекиров Г.Ч., Чумаков В.П., Скопичев В.Г., Сухорукова Т.Ф.).
7. Рекомендация по определению экспресс-методом иммуноглобулинов в крови и молозиве овец // -Бишкек: Илим, 1995. -10 с. (соавт.: Чекиров Т.Ч., Сухорукова Т.Ф., Валуцкий П.П., Иманов Э.Д. и др.).
8. Изучение лактации овец кыргызской тонкорунной породы // Научно-методические рекомендации для аспирантов, студентов ветеринарного и зооинженерного факультетов. - Бишкек, 1995. - 17 с. (соавт.: Чекиров Т.Ч. Хандуев Ц.Ц., Сухорукова Т.Ф., Иманов Э.Д. и др.)
9. К механизму регуляции функции гладкой мускулатуры емкостной системы вымени // Материалы международной науч. конф. "Пути интенсификации животноводства в условиях рыночной экономики" посвящен. к 1000-летию юбилею эпоса "Манас", - Бишкек. Ч. 3. -

1995. - С. 80-84. (соавт.: Чекиров Т.Ч.).
10. Роль иммунокомпетентных клеток молозива в формировании иммунологического статуса новорожденных телят // Сб. трудов межведомственной практической научно-научной конф. посвященной 50-летию со дня основания Жайылской зональной государственной ветеринарной лаборатории. - Кара-Балта, 2001. - С.352-354. (соавт.: Чекиров Т.Ч., Жунушов А.Т.).
 11. Ультраструктурная цитофизиология вымени лактирующих овец // Научно-практическая конференция "Проблемы повышения продуктивности с-х животных и растений с использованием методов биотехнологии в условиях высокогорья" посвящ. 100-летию со дня рождения акад. А.А.Волковой и акад. Н.И.Захарьева. -Бишкек. -2002. - С. 160-164. (соавт.: Корчубекова Т.А., Ногойбаева Р.С.).
 12. Некоторые особенности лактации овец кыргызской тонкорунной породы// Научно-практическая конференция посвящ. 100-летию со дня рождения акад. А.А. Волковой и акад. Н.И. Захарьева. - Бишкек. - 2002. - С. 197-200. (соавт.: Чекиров Т.Ч., К., Корчубекова Т.А., Ногойбаева Р.С.)
 13. О зависимости молочной секреции овец от развития емкостной системы вымени и количества остаточного молока // Научно-практическая конференция посвящ. 100-летию со дня рождения акад. А.А. Волковой и акад. Н.И. Захарьева. - Бишкек. - 2002. - С. 200-203. (соавт.: Чекиров Т.Ч., Корчубекова Т.А., Ногойбаева Р.С.).

Уракунова Калиманын биология илиминин кандидаты деген даражаны, адистиги 03.00.13 – физиология, жактоо үчүн "Койдун сүтүнүн цитофизиологиялык өзгөчөлүгү" деген темада жазылган диссертациясынын

РЕЗЮМЕСИ

Түйүндүү сөздөр: цитофизиология, лактация, сүт беши, эпителий, секретордук клетка, цистерна.

Диссертациялык иштин максаты, кыргыз уяң жүндүү туку –

мундагы койлордун сүтүнүн цитофизиологиясы, бооз жана лактация башталган кезинде сүт безиндеги секретордук клетканын физиолого – биохимиялык, ультра – структуралык өнүгүүсү каралган.

Изилдөө иштери электрондук микроскоп, физиолого – биохимиялык жана иммуно – химиялык жаңы методдор менен жүргүзүлгөн.

Сүт безиндеги альвеол түзүлүшүнүн эң маанилүү пайда болуу этабы болуп, көп жана эки катмардан турган эпителийден, акырындап бир катмарлуу эпителий пайда болушу аныкталды. Желиндеги секретордук клетканын өнүгүүсү үч айлык бооз кезинин башында башталып, лактациянын башталышында эң жогорку өсүүгө жетет. Акырында сүт безиндеги секретордук клетканын структуралык түзүлүшү кой туурга жакын калганда сандык жана сапаттык татаал өзгөрүүгө учурайт.

Бооз койдун сүт безинде пайда болгон биринчи сүт секретри туурга 8 – 12 күн калганда цистернага келет.

РЕЗЮМЕ

диссертации Уракуновой Калимы на тему "Особенности цитофизиологии секреции молока овец" на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология

Ключевые слова: цитофизиология, ультраструктура, дифференцировка, секреторная клетка, вымени, суягности, альвеол, молочная железа, лактация, эпителий, цистерна.

Целью диссертационной работы являются изучение цитофизиологии секреции молока овец кыргызской тонкорунной породы включая физиолого-биохимические и ультраструктурные аспекты дифференцировки секреторных клеток вымени в различные периоды суягности и ранней лактации.

Исследования проводились с использованием современных электронно-микроскопических, физиолого-биохимических и иммунохимических методов исследования.

Установлено, что важнейшим этапом формирования альвеолярной структуры молочной железы овец является стадии многослойного и двухслойного эпителия, который в последующем преформируются в монослой железистого эпителия. Дифференцировка секреторных клеток вымени начинается в начале третьего месяца суягности, достигая наибольшей степени к началу лактации. В результате процессов дифференцировки в период суягности ультраструктурная организация секреторных клеток молочной железы претерпевает сложные изменения в количественном и качественном отношении.

Первоначальный молочный секрет поступает в полость цистерн емкостной системы вымени в конце суягности за 8-12 дней до ягнения.

RESUME

Dissertation of Mrs. Urakunova K. on the subject: "Some aspects of cytophysiology of secretion of sheeps' milk" for academic degree of candidate of biological sciences. Specialization 03.00.13 - physiology.

Key words: cytophysiology, secretion, ultrastructural, secretory cells, epithelium, differentiation, cistern.

The purpose of this dissertation material is to study the cytophysiology of milk secretion of the kyrgyz fine-fleeced sheeps including physiological-biochemical and ultrastructural aspects of differentiation of the secretory cells of an udder during different periods of pregnancy and early lactation.

The researches were carried out with the help of modern electronic microscopical, physiological-biochemical and immune chemical methods of investigation.

It is established that the most significant stage of the forming the alveolar structure of sheeps' mammary glands is a multi-layer and two-layer epithelium stage, which is later on reformed into monolayer of a ferriferous epithelium. Differentiation of the secretory cells of the udder starts from the third month of pregnancy, reaching the largest degree at the beginning of lactation. As a result of the differentiation processes during the period of pregnancy

ultrastructural organization of the secretory cells of mammary glands undergoes complicated changes in its quality and quantity.

The initial milk secretion comes into the cavity cistern of capacitive systems of the udder at the end of pregnancy, 8-12 days before the lambing.