

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Кратасюк В.А.

\_\_\_\_\_

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО  
БИОТЕСТА В ТЕСТИРОВАНИИ СЛЮНЫ

06.04.01 Биология  
06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель \_\_\_\_\_ к.б.н. Л. В. Степанова

Выпускник \_\_\_\_\_ О.В. Колесник

Рецензент \_\_\_\_\_ к.б.н., доцент Т. В. Рожко

Красноярск 2019

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация «Возможности использования билюминесцентного биотеста в тестировании слюны» содержит 40 страниц текстового документа, 53 использованных литературных источников, 17 иллюстраций.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ+ЛЮЦИФЕРАЗА, СЛЮНА, ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА, ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ.

Цель работы: выявление возможности использования билюминесцентного биотеста в анализе слюны.

Исследованы слюна человека при психоэмоциональном состоянии или после физической нагрузки; слюна животных после физической нагрузки или при заболевании. Билюминесцентное тестирование слюны проведено с использованием бактериальной биферментной ферментативной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза.

Определено, что для проведения билюминесцентного теста при комнатной температуре необходимо использование центрифугированной слюны в течение 3 часов после сбора. Оптимальный объем супернатата слюны составлял 40 мкл.

Выявлено, что слюна, отобранная во время психоэмоционального состояния, ингибировала билюминесцентное свечение значительно меньше, чем при нормальном состоянии организма. Ингибирование билюминесцентного свечения возрастало при аэробной мышечной работе и ослаблялось – во время анаэробной работы. Результаты билюминесцентного тестирования слюны лошадей аналогичны данным по тестированию слюны человека при физической нагрузке и зависят от характера мышечной работы. Использование билюминесцентного метода в тестировании слюны коров не позволило определить их патологическое состояние.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	5
1.1 СЛЮНА КАК ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЖИДКОСТЬ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ .....	5
1.1.1 СЛЮНА – ИНДИКАТОР СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....	5
1.2 МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА.....	9
1.2.1 Физико-химические методы тестирования слюны человека .....	10
1.2.2 Использование слюны животных в тестировании их функционального состояния .....	13
1.2.3 Биолюминесцентный ферментативный метод – интегральный диагностический метод .....	14
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	17
2.1 Материалы тестирования .....	17
2.2 Пробоподготовка слюны к тестированию.....	17
2.3 Методы тестирования.....	18
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	20
3.1 Использование слюны в качестве тестируемого образца в биолюминесцентном методе.....	20
3.2 Использование биолюминесцентного метода в тестировании слюны человека для выявления психоэмоционального состояния и физической нагрузки.....	23
3.3 Возможности биолюминесцентного метода в анализе слюны животных.	28
ВЫВОДЫ.....	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	34

## ВВЕДЕНИЕ

Слюна является биологической средой и компонентом гомеостаза организма. По сравнению с кровью является динамичной средой, которая отражает ежедневные изменения в организме и свидетельствует об изменениях в нём на соматическом и на психоэмоциональном уровнях [1, 2]. В настоящее время возрос интерес исследователей к тестированию состояния организма человека и животных с использованием слюны [1, 2, 3, 4]. Однако многие способы тестирования слюны малоинформативны, длительны, сложны в выполнении и требуют наличия специально обученного персонала для проведения обследования и не пригодны для массовых диагностических исследований. Предлагаем новый подход экспрессного и простого лабораторного диагностирования – биолюминесцентное тестирование слюны. Основой для биолюминесцентного метода является биферментная система светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза. Изменение метаболического состава слюны будет воздействовать на ферменты биолюминесцентной системы, которая будет давать отклик в виде свечения [5, 6, 7]. Чувствительность анализа высокая и позволяет выявить небольшие изменения в слюне. По результатам такого интегрального теста можно оценить состояние организма на молекулярном уровне.

Поэтому целью исследования явилось выявление возможности использования биолюминесцентного биотеста в анализе слюны.

Задачи исследования:

- 1) подобрать количество слюны и его условия хранения проб для проведения биолюминесцентного ферментативного тестирования;
- 2) понять, позволяет ли биолюминесцентный метод тестирования слюны человека выявить психоэмоциональное состояние и физическую нагрузку;
- 3) проанализировать возможности биолюминесцентного тестирования слюны животных для определения физического и патологического состояний.

## **ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

### **1.1 СЛЮНА КАК ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЖИДКОСТЬ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ**

Слюна – сложный фильтрат плазмы крови. Она отражает состояние динамического постоянства внутренней среды организма. Также она имеет свойство меняться по составу, физико-химическим и биологическим свойствам при воздействии самых разных стимулов, то есть является индикатором реактивности организма [8].

В настоящее время проводятся исследования по применению слюны в качестве биомаркера при различных заболеваниях, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания почек и прочих [9, 10, 11, 12]. Также, слюна отражает состояние организма при действующей на него нагрузке: физической или психоэмоциональной [13].

Однако, существуют ограничения, связанные с диагностированием слюны. Например, на стероидные гормоны. Показатели уровня дегидроэпиандростерона (DHEA-S) в слюне не точно коррелируют с уровнем стероидов в плазме крови. Поэтому для получения количественного результата необходимо определять соотношение слюна/плазма [14].

#### **1.1.1 СЛЮНА – ИНДИКАТОР СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Смешанная слюна человека состоит на 97–99% из воды, на 1–3% из сухого остатка, из которого 1% – органические вещества, а оставшаяся часть представлена неорганическими соединениями. Объём компонентов слюны в смешанной слюне здоровых пациентов составляет всего 0,5%. Секрет слюнных желез содержит воду, ионы и белки [15].

Реакция слюны слабощелочная. Кислотно-основное состояние (рН) слюны является важнейшим показателем гомеостаза органов полости рта. Данный показатель колеблется в интервале 6,4 – 7,4 и подвержен суточным ритмам: в утренние часы рН слюны ниже, чем в вечерние. рН слюны зависит от многих факторов: характера питания, особенностей метаболизма организма, возраста, гигиенического состояния полости рта, а также состава и буферной емкости слюны.

Слюна имеет мицеллярное строение. Устойчивость мицелл слюны в большей степени зависит от нее рН. Изменение рН в кислую и щелочную стороны нарушает стабильность мицелл слюны. [16].

Также человеческая слюна состоит из других соединений, таких как электролиты, растворённые анионы и микроэлементы, органические вещества (аминокислоты, белок и его фракции (альбумин, глобулины)), витамины, слизь, антибактериальные соединения, а также различные ферменты (амилаза, лактаза и т.д.) [17]. Среди многочисленных функций слюны выделяют солубилизацию пищевых веществ и продуктов, смазку мягких тканей, образование болюса, облегчение жевания и очищение от бактерий. Все вышеперечисленные функции связаны с физической характеристикой слюны и отдельных компонентов – текучестью [18].

Иммуноглобулины являются важными специфическими факторами защиты слюны. Иммуноглобулины класса А (IgA), иммуноглобулины класса G (IgG) и иммуноглобулины класса М (IgM) влияют на микрофлору полости рта, препятствуя адгезии бактерий или препятствуют бактериальному метаболизму (в данном случае IgA играют преобладающую роль). Муцины – гликопротеины, производимые подчелюстной и подъязычными слюнными железами, а также другими многочисленными мелкими слюнными железами. Физиологическая роль муцинов (MG1 и MG2) – защита клеток, смазка, защита от обезвоживания, поддержание вязко-упругости в выделениях. Лизоцим – противомикробный фермент, способность которого заключается в расщеплении химических связей

в бактериальной клетке. Он может лизировать некоторые виды клеток гидролизом гликозидных связей в клеточной стенке [19].

Для контроля биохимических показателей организма спортсмена слюна используется не часто, т.к. состав слюны зависит не только от физических нагрузок и связанных с ними изменений внутритканевого обмена веществ, но и от состояния сытости при питании ("голодная" или "сытая" слюна). Для анализа состояния организма спортсмена определяют компоненты иммунной системы, активность ферментов, содержание важнейших продуктов метаболизма, изменения минерального баланса, колебания pH [20].

Во время физической нагрузки отмечается существенное изменение секреции IgA у бегунов на разные дистанции, у футболистов, у теннисистов, при силовых упражнениях. Снижение секреции IgA наблюдали в слюне участников сверхмарафона (160 км), причем у 25% супермарафонцев этот пониженный уровень сохранялся в течении 2-х недель. Также уровень IgA в слюне оказался различным в команде пловцов и наблюдалась корреляция с уровнем их физической подготовки. Отмечалось определенное достоверное снижение количества IgA в слюне велосипедистов при нагрузке, с последующим возвращением к норме. Принятие кофеина перед интенсивной нагрузкой вызывает повышенную секрецию IgA во время тренировки [21].

Изучено циклическое изменение спектра стероидных гормонов в слюне регбистов, волейболистов, гандболистов и дзюдоистов, как во время соревнования, так и в процессе недельного восстановительного периода. Во время соревнования, как у мужчин, так и у женщин наблюдалось существенное увеличение уровня кортизола и тестостерона в слюне [22].

Уровень гормонов в слюне явился тестом в анализе психологического состояния хоккеистов при играх дома и на выезде. Уровень тестостерона и кортизола перед домашней игрой был выше по сравнению с выездной. Психологические измерения указали на то, что игроки были более уверенными в себе, играя в домашней обстановке, а также имели более высокую соматическую и когнитивную тревожность при игре на поле противников [23].

Широко представлены в литературе изменения других биохимических показателей слюны у спортсменов. Здесь наибольший интерес представляет обнаруженная высокая степень корреляции между содержанием лактата в слюне и в крови испытуемых во время бега на различные дистанции (от 400 м до 30 км), во время теннисных соревнований, а также при нагрузках высокой мощности. Выявлено, что хорошо подготовленные спортсмены имеют показатели лактата очень низкие (2 ммоль/л) и могут не изменяться при физических нагрузках [24].

Важным показателем состояния организма спортсмена во время марафонского забега являются повышение уровня таких биохимических показателей слюны, как минеральный состав, содержание гексозамина и свободной сиаловой кислоты, активность амилазы и пероксидазы [25]. Определение активности амилазы, являющейся одним из основных ферментов слюны, часто проводят при биохимическом тестировании. Отмечено, что активность антиоксидантных ферментов слюны (супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы) коррелирует с уровнем свободных сиаловых кислот в слюне.

Определено, что в процессе тренировки изменяется содержание основных компонентов ротовой жидкости: уменьшение концентрации ионов кальция, увеличение концентрации фосфатных ионов, возрастание содержания белка. В группе бадминтонистов и волейболистов происходило подщелачивание слюны, а у футболистов – подкисление. После физической нагрузки в слюне также выявлено снижение концентрации глюкозы, которая не восстанавливалась до первоначального состояния, что свидетельствовало о значительных энергетических затратах спортсменов [26].

Психоэмоциональное состояние имеет большое влияние на гомеостаз организма и, таким образом, вызывает физиологические и поведенческие реакции для восстановления равновесия. К примеру, экзаменационная сессия может являться источником психоэмоциональной нагрузки на организм для студентов [27]. Было установлено, что психоэмоциональное состояние в слюне



изменяются уровень катехоламинов, кортизола, содержание IgA, интенсивность свободно радикальных процессов и активность антиоксидантных ферментов [13, 28, 29].

При эмоциональном напряжении в слюне наблюдается увеличение концентрации глюкозы в слюне, повышение уровня ионов натрия и калия с тенденцией к понижению [30].

У животных показатель сухого остатка в слюне составляет 0,6 – 0,9% и содержит больше органических веществ, чем минеральных. Органические вещества состоят в основном из белков и придают вязкость слюне.

Показатель pH колеблется в интервале 7,5 – 8,5, что значительно выше, чем у людей. Содержание амилазы и мальтазы в слюне различных животных неодинаково. Например, в слюне лошадей, жвачных и птиц их содержится очень незначительное количество, поэтому углеводы в ротовой полости этих животных практически не перевариваются [31].

Иммуноглобулины в слюне животных также являются важными специфическими факторами защиты слюны. IgA и IgM препятствуют адгезии бактерий и бактериальному метаболизму [32].

Гормон кортизол в слюне животных является одним из основных веществ, которые указывает о влиянии нагрузки на организм животного [33]. Повышение уровня гормона кортизола в слюне зафиксировано во время тренировочного процесса у лошадей [34].

Таким образом, метаболический состав слюны человека и животного отличается количеством содержащихся веществ. Однако в диагностировании состояния организма животного, как и человека, участвуют одни и те же вещества.

## 1.2 МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

Исследование слюны относят к неинвазивному методу и проводят для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления функционального состояния организма при физических нагрузках и эмоциональном напряжении, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств. С появлением новых количественных методик для лабораторных исследований чаще используют смешанную слюну. Преимуществом использования слюны по сравнению с плазмой крови является её неинвазивный сбор, что делает удобным диагностирование; отсутствие у пациента стресса при проведении процедуры получения слюны; возможность использовать простые приборы и приспособления для сбора слюны; отпадает необходимость присутствия врача и среднего медицинского персонала при заборе слюны; существует возможность повторного и неоднократного получения материала для исследований; слюна может определённое время сохраняться на холоде до проведения исследований [35].

### 1.2.1 Физико-химические методы тестирования слюны человека

Среди физико-химических методов тестирования слюны широко распространён хемилюминесцентный анализ, основанный на измерении интенсивности свечения (люминесценции) органических соединений в составе слюны при их возбуждении различными видами энергии.

Методом  $H_2O_2$ -люминолзависимой хемилюминесценции слюны оценивают антиоксидантный статус организма. Снижение скорости работы антиоксидантной системы у спортсменов в период максимальной физической нагрузки свидетельствует об интенсивной работе внутренних резервов организма. Спортсменам высшей квалификации свойственно снижение интенсивности обеззараживания продуктов свободнорадикального окисления при высокой скорости реакции [36].

Также достаточно широко распространен спектрометрический анализ слюны по выявлению изменения биохимического состава слюны (макро- и микроэлементов, белков, липидов и аминокислот) при интенсивных физических нагрузках. Анализируя спектры взаимодействия слюны с излучением, определяют качественное и количественное изменения ее биохимического состава. К примеру, увеличение уровня белка у спортсменов после физической нагрузки с тенденцией к возвращению на базовый уровень в течение отдыха [37].

К наименее значимым физико-химическим методам тестирования слюны в спортивной практике относят метод двумерного электрофореза, основанный на разделении белков по заряду, молекулярной массе; кристаллографический (тезиграфический) метод, основанный на изменении формы кристаллов кристаллообразующим веществом при добавлении к нему слюны. Данные методики позволяют выявить изменения структуры слюны и ее биохимический состав при разных видах физической нагрузки на организм. Результаты исследований данными методиками хорошо коррелируют с другими физико-химическими методами. К примеру, методом двумерного электрофореза выявлено, что кратковременная нагрузка высокой интенсивности приводит к изменению белковых составляющих слюны, что подтверждает спектральный анализ [38]. Однако, в связи трудоемкостью, малой информативностью и длительностью проведения анализа, данные методы практически не используют при тестировании слюны.

В настоящее время быстро и широко вошли в спортивную медицину методы иммунного анализа, в частности иммуноферментный метод. Это можно объяснить наиболее чувствительности метода к выявлению ферментов, отвечающих за состояние перетренированности, которое является одной из проблем спортивной медицины.

Количественное изменение стероидных гормонов в слюне, таких как кортизол и тестостерон, определяемое на иммуноферментных наборах позволяет рассчитать индекс анаболизма (ИА) по формуле

$$IA = \frac{C_T}{C_K} \times 100\%$$

где  $C_T$  – количество тестостерона,  $C_K$  – количество кортизола.

Индекс анаболизма позволяет определить степень «равновесия» между анаболическими и катаболическими процессами. Систематические мышечные нагрузки приводят к возникновению ряда адаптационных реакций нейроэндокринной системы, в результате которых происходят изменения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой структуры, что отражается на уровне гормонов кортизола и тестостерона в слюне. При этом количественный состав изменений этих гормонов зависит от объема тренировочных занятий, интенсивности, типа физических упражнений, а также некоторых психологических факторов. Понижение ИА после физической нагрузки более чем на 30% свидетельствовало о преобладании в организме анаболического процесса над катаболическим [39, 40, 41].

Методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа показано резко выраженное различие в показателях гормонального статуса у студентов-спортсменов и студентов, не занимающихся спортом, в зависимости от спортивной нагрузки: увеличение концентрации кортизола на 55% наблюдали у студентов 1 курса, 72% – студентов 3 курса, 85% – студентов 5 курса [28].

Для оценки психоэмоциональной нагрузки организма студентов применяют колориметрический метод. В результате экзаменационного стресса наблюдалось повышенное содержание белка в слюне в связи с активацией симпатического отдела вегетативной нервной системы. Также флуориметрическим методом было определено повышение уровня 11-оксикортикостероидов (11-ОКС), который свидетельствовал об активности

гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) во время экзамена [42].

Иммуноферментный анализ слюны студентов показал тенденцию к увеличению уровня кортизола в слюне во время экзаменационной сессии [27].

Таким образом, наибольшую применимость в тестировании слюны человека имеют методы хемилюминесцентного и спектрометрического анализов белкового, ферментного и гормонального анализов. Физико-химические методы, основанные на выявлении изменения структуры слюны и ее общего биохимического состава при различных нагрузках, используют реже. Это обусловлено малой информативностью для оценки физического состояния организма длительностью проведения анализа.

### 1.2.2 Использование слюны животных в тестировании их функционального состояния

В настоящее время для тестирования слюны животных широко распространен иммуноферментный метод. Данный метод широко используют в ветеринарии для определения концентрации кортизола в слюне спортивных лошадей для выявления действующей на них физической нагрузки. Известно, систематические мышечные нагрузки приводят к возникновению ряда адаптационных реакций нейроэндокринной системы, в результате которых происходят изменения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой структуры, что изменяет уровень гормона кортизола в слюне. Установлено повышение кортизола в слюне лошадей во время физической нагрузки и возвращение на базовый уровень в течение отдыха [43, 44, 45].

Другие методики тестирования слюны по определению функционального и патологического состояний организма животных в доступной литературе не представлены.

В лабораторной диагностике животных часто используют сыворотку крови и сыворотку молока. Применяя биохимический анализ сыворотки крови

было выявлено снижение уровня глюкозы и неорганического фосфата, увеличение концентрации мочевины у коров с кистой яичника [46, 47, 48].

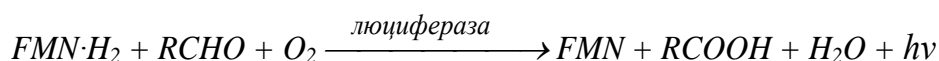
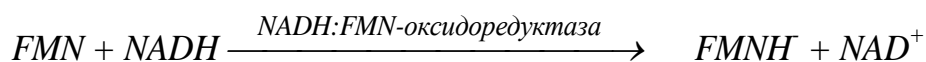
Для диагностики мастита существует биолюминесцентный метод, который позволяет количественно определить содержание соматических клеток в сыворотке молока [49]

Таким образом, разработка комплексного контроля, позволяющего определять функциональное и патологическое состояния организма животного по тестированию слюны, является актуальным. Есть перспектива использования биолюминесцентного метода в тестировании слюны животных для оценки их патологического состояния.

### 1.2.3 Биолюминесцентный ферментативный метод – интегральный диагностический метод

В настоящее время в связи с развитием методов генной инженерии и получением рекомбинантных организмов появилась возможность широкого использования в биолюминесцентном анализе люцифераз из светляков и других светящихся организмов. По простоте и числу анализируемых веществ биолюминесцентные тесты сходны со спектрофотометрическими, но по чувствительности превосходят их на два-три порядка и отличаются экспрессностью [50].

Система, состоящая из смеси двух ферментов: бактериальной люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы получила наиболее широкое применение в биохимических и клинических лабораторных анализах. Биолюминесцентная биферментная система включает две ферментативные реакции:



В результате первой реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой, происходит восстановление флавинмоноклеотида (FMN) с помощью восстанавливающего реагента – восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NADH). При этом NADH переходит в окисленную форму никотинамидадениндинуклеотида (NAD<sup>+</sup>), передавая молекуле FMN протон и два электрона, с образованием депротонированной формы восстановленного флавина (FMN·H<sup>-</sup>).

Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин (FMN·H<sup>-</sup>) и алифатический альдегид (RCHO) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина (FMN), жирная кислота (RCOOH) и испускается квант света. При проведении биолюминесцентной реакции с использованием химически восстановленного FMN·H<sub>2</sub> наблюдается длительное свечение, обусловленное множественными оборотами фермента.

Вмешательство в любую часть метаболизма бактериальной клетки, которое влияет на выделение любого компонента бактериологической биолюминесценции, будет отмечено уменьшением светового излучения. Токсины или тестируемое вещество, влияющие на биолюминесцентную реакцию, катализаторами для которых служат ферменты, будут обнаружены. [51, 52].

К примеру, степень эндотоксикоза при различных заболеваниях проверяют по уменьшению интенсивности свечения биолюминесцентной биферментной системы в ответ на добавление слюны испытуемых. Для этого максимальную интенсивность свечения в каждом случае сопоставляют с контрольным образцом, дающим максимальное свечение, и определяют величину ингибирования свечения. Это значение и используют в качестве показателя степени эндотоксикоза [5, 6, 7].

Биолюминесцентная биферментная система используется также в качестве датчика для измерения различных дегидрогеназ. В присутствии

субстрата лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в биферментной системе определяют его активность по интенсивности биолюминесцентного свечения. Добавление слюны в данную биохимическую реакцию позволяет применять ее для тестирования слюны на содержание лактата [53].

Таким образом, биолюминесцентный метод позволяет проводить лабораторное диагностирование на токсичность и оценку состояния организма.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы тестирования

В исследовании принимали участие спортсмены со спортивными квалификациями 1 спортивный разряд, кандидат в мастера спорта (КМС) и мастер спорта (МС) (n=32); студенты 1-2 курсов из КрасГМУ (n=106); спортивные лошади тракененской породы (n=12) и коровы здоровые и с заболеваниями мастит, киста яичников (n=35).

Психоэмоциональное состояние студентов исследовали до и после экзаменационной сессии. Воздействие физических нагрузок на организм спортсменов и лошадей исследовали в течение 3-5 тренировочных дней с возрастающей физической нагрузкой.

### 2.2 Пробоподготовка слюны к тестированию

Материалом исследования служила слюна исследуемых. Перед тестированием слюну центрифугировали в течение 15 минут при частоте 5000 об/мин и использовали супернатант.

Центрифугирование слюны проводили на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 r (Eppendorf, Германия).

Для выявления времени хранения слюны биoluminesцентное тестирование проводили через каждый час в течение 5 часов. При этом супернатант слюны находился при комнатной температуре (+20°C) и в холодильнике при температуре +5°C.

Для выявления способов хранения слюны биoluminesцентное тестирование проводили с использованием нативной, размороженной (замораживали при температуре -20°C) (замороженная слюна), высушенной, которая хранилась в холодильнике при температуре +5°C в течение 3 месяцев.

## 2.3 Методы тестирования

Биолюминесцентное тестирование проводили на биферментной системе NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, входящий в комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (ИБФ СО РАН, Красноярск), который содержал лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов люциферазы EC 1.14.14.3 (0,4 мг/мл) из рекомбинантного штамма E.coli и NADH:FMN-оксидоредуктазы EC 1.5.1.29 (Ph. leiognathi) (0,18 ед. активности).

В состав реакционной смеси входили 80 мкл 0,05М калий-фосфатного буфера (pH 6,8–7), 5 мкл КРАБа, 10 мкл 0,0025% буферного раствора тетрадеканала (Merck, Германия), 50 мкл 0,4мМ буферного раствора NADH (Sigma, США), 10 мкл 0,5мМ водного раствора FMN (Serva, Германия).

Центрифугирование слюны проводили на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 r (Eppendorf, Германия). Биолюминесцентное тестирование проводили на планшетном люминометре (TriStar LB 941, Германия). Калориметрирование слюны проводили на спектрофотометре Genesys 10S (ThermoScientific, США).

При биолюминесцентном тестировании в ячейку планшета последовательно вносили реакционную смесь и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения биолюминесцентной реакции (контрольное измерение). При экспериментальном измерении 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны. По отношению средних максимальных интенсивностей биолюминесценции экспериментального измерения ( $I$ ) к контрольному ( $I_0$ ) рассчитывали величину остаточного свечения ( $T$ , %):

$$T = \frac{I}{I_0} * 100\%$$

Образцы суператантов слюны животных снижали остаточное свечение более чем на 20% , поэтому их разводили буфером.

Анализировали изменение остаточного свечения, которое определялось вычитанием показателей после и до тестирования состояния испытуемых.

Чувствительность биотеста оценивали по максимальному значению биолюминесценции, которое отличалось не более чем на 20% от контрольного.

Дополнительные сведения о функциональном состоянии организма участников тестирования были предоставлены коллегами из КрасГМУ, ИФКСиТ и КрасГАУ. Для студентов были предоставлены антропометрические и биоимпедансные данные, результаты хемилюминесцентного тестирования слюны. Для спортсменов были предоставлены частота сердечных сокращений (ЧСС) и концентрация лактата в слюне. Для лошадей предоставлены частоты сердечных и дыхательных движений, концентрация лактата в слюне. Для коров предоставлены морфологический и лейкоцитарный анализ крови.

Экспериментальные измерения проводили в течение 300с в двух повторностях. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с подсчетом медианы (Me) и интерквантильных разбросов ( $C_{25}$ - $C_{75}$  перцентили). Различия между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни, корреляционную связь – по критерию Спирмена. Уровень статистической значимости считали достоверными при  $p \leq 0,1$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Использование слюны в качестве тестируемого образца в билюминесцентном методе

Для проведения билюминесцентного тестирования слюны были проанализированы 4 вида нестимулированной слюны: в нативном состоянии, нативная центрифугированная, центрифугированная замороженная и центрифугированная высушенная. Результаты тестирования показали, что слюна в нативном состоянии значительно тушит билюминесцентное свечение, что лишает чувствительности билюминесцентной системы к измерению (рис. 1). Центрифугированная слюна в свежем, замороженном и высушенном состояниях тушит билюминесцентное свечение в пределах, позволяющих проводить билюминесцентный анализ. Достоверного различия между разными состояниями центрифугированной слюны не выявлено.

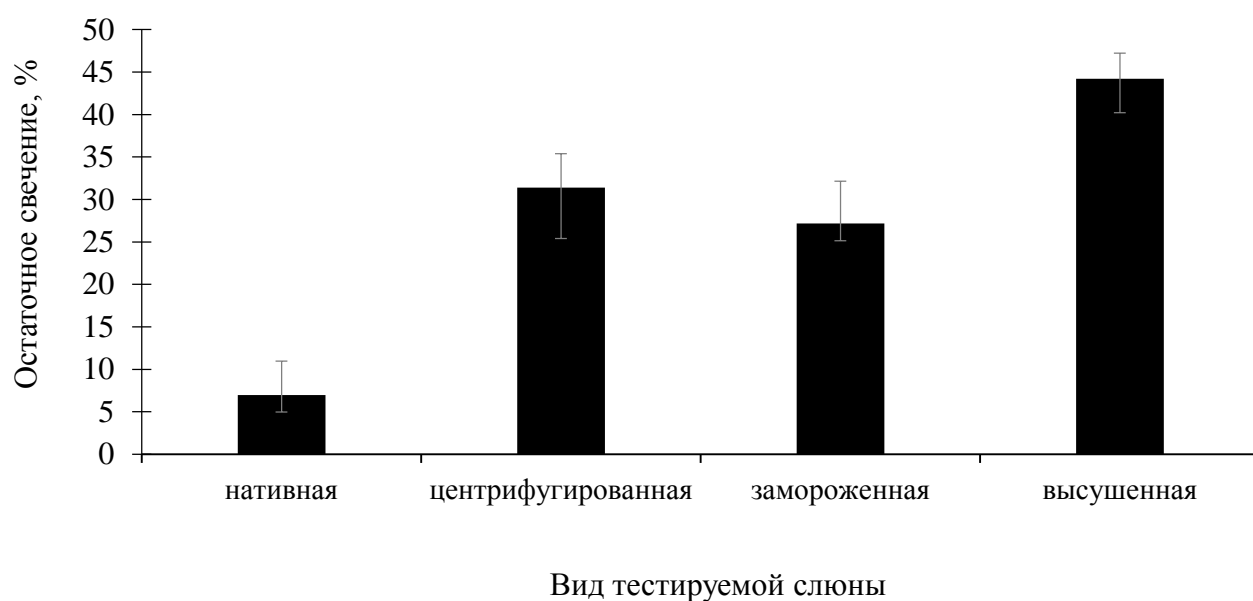


Рисунок 1 – Зависимость остаточного свечения билюминесцентной системы от вида тестируемой слюны

Подбор количества супернатанта нативной слюны для проведения биolumинесцентного анализа представлен на рисунке 2. Экспериментально определено, что для тестирования достаточно 40 мкл супернатанта слюны.

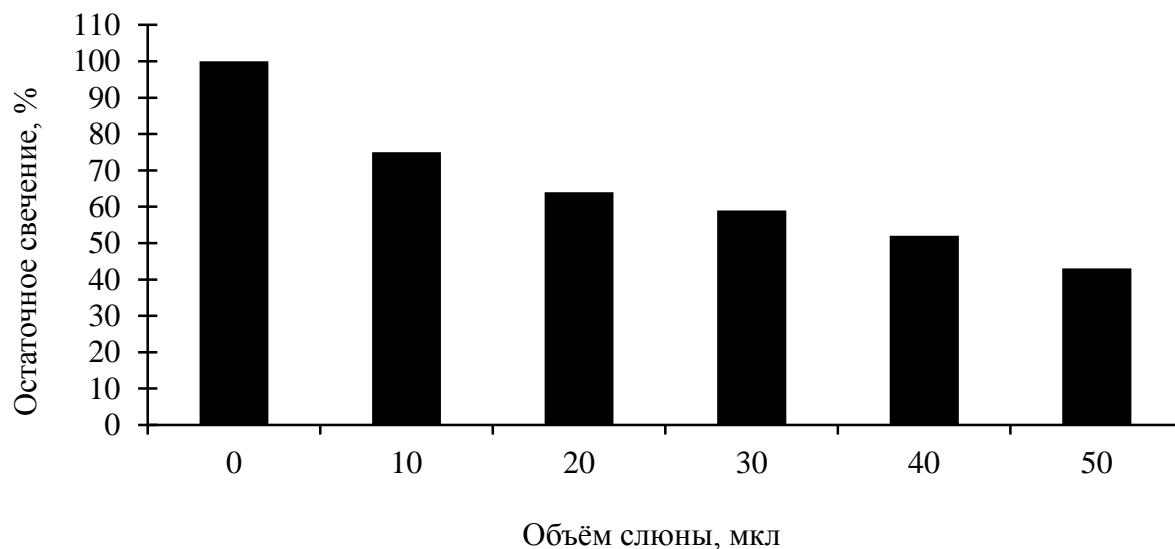


Рисунок 2 – Изменение остаточного свечения биolumинесцентной системы от количества добавляемой слюны

Слюна тестируемых животных была вязкая и сильно ингибировала биolumинесцентное свечение. Поэтому супернатант слюны животных разводили до достижения 50% ингибирования биolumинесцентного свечения. Супернатант слюны лошадей был разбавлен калий-фосфатным буфером в 60 раз (рис. 3), для коров - в 10 раз (рис. 4).

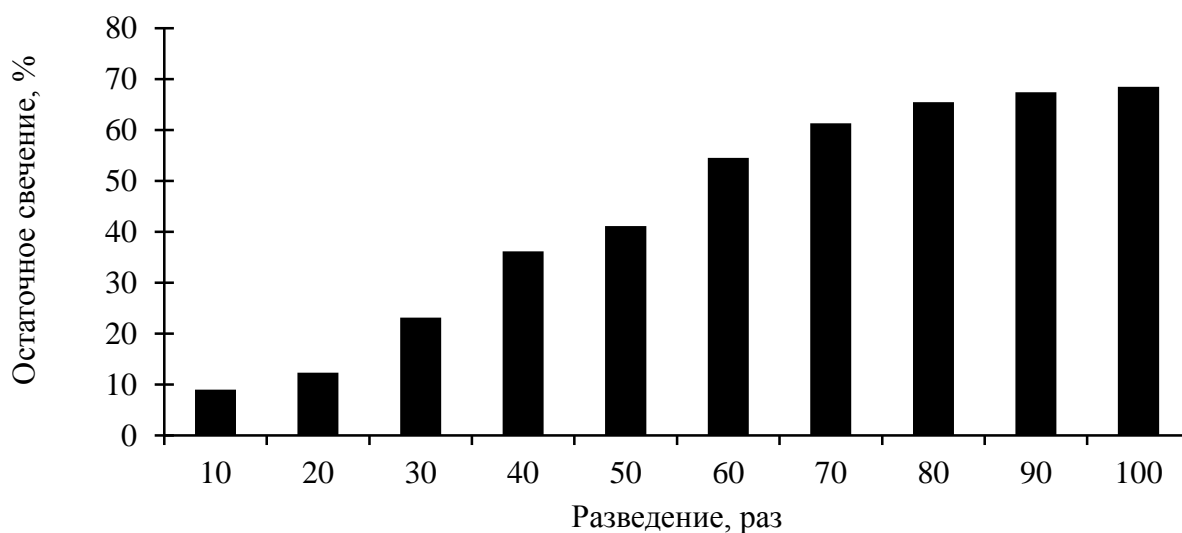


Рисунок 3 – Изменение остаточного свечения билюминесцентной системы при тестировании разбавленного супернатанта слюны лошадей

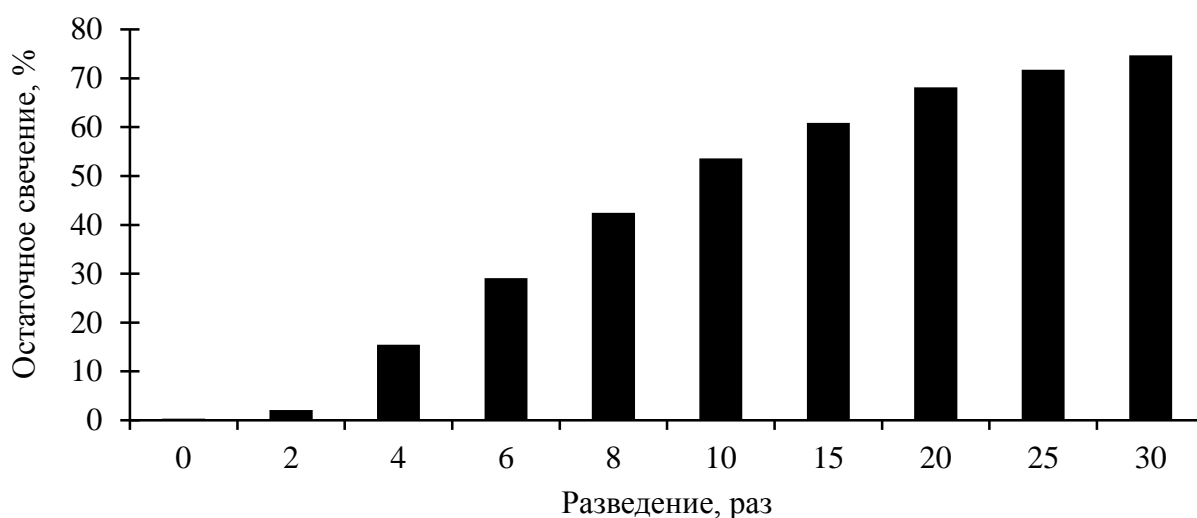


Рисунок 4 – Изменение остаточного свечения билюминесцентной системы при тестировании разбавленного супернатанта слюны коров

Для выявления времени хранения супернатанта слюны проведено тестирование образцов, которые находились при комнатной температуре (+20°C) и в холодильнике при температуре +5°C. Результаты показали, что образцы слюны должны быть охлаждены (+5°C), если их тестируют в течение 3-5 часов после сбора (рис. 5). Использование слюны для билюминесцентного тестирования при комнатной температуре сокращает время хранения слюны до

3 часов. Для хранения образцов слюны в течение длительного времени необходимо замораживать слюну до  $-20-80^{\circ}\text{C}$  для предотвращения роста бактерий. Повторные циклы замораживания и оттаивания не влияют на результат билюминесцентного тестирования.

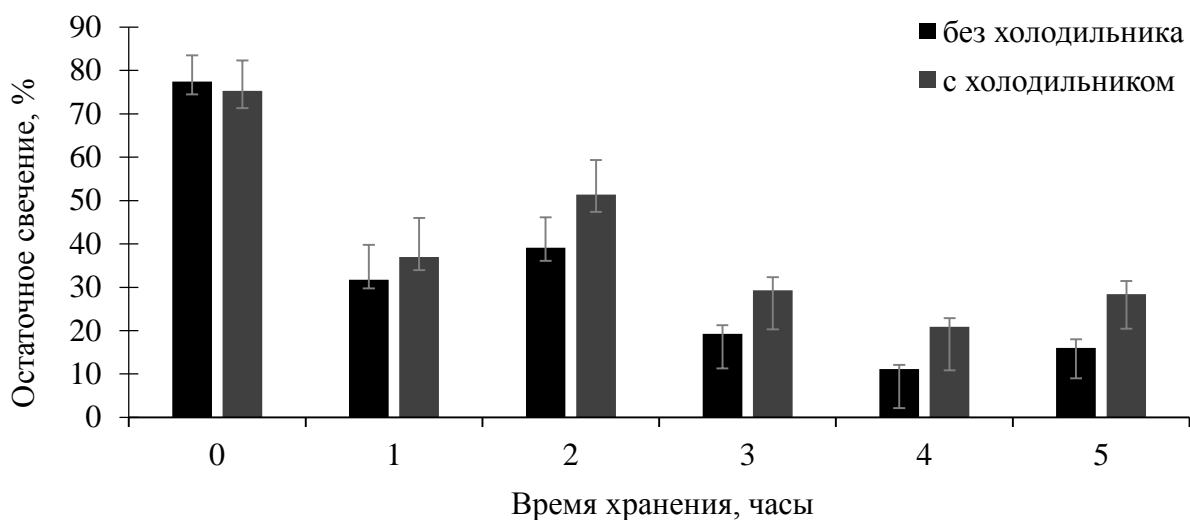


Рисунок 5 – Зависимость остаточного свечения билюминесцентной системы от времени хранения слюны

Таким образом, билюминесцентное тестирование слюны предполагает использование 40 мкл центрифугированной слюны. Супернатант слюны животных для тестирования необходимо разбавлять буфером в 10 и 60 раз. Хранение супернатанта слюны при комнатной температуре возможно в течение 3 часов, охлаждение их до  $+5^{\circ}\text{C}$  увеличивает время хранения до 3-5 часов. Долгое хранение образцов слюны возможно при температуре  $-20-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Использование билюминесцентного метода в тестировании слюны человека для выявления психоэмоционального состояния и физической нагрузки

Результаты биолюминесцентного тестирования показали, что в состоянии «покоя» (до экзаменационной сессии) супернатант слюны студентов сильнее ингибировал биолюминесцентное свечение, чем во время психоэмоционального состояния (во время экзаменационной сессии) (рис.6). При этом изменение величины остаточного свечения было одинаковым независимо от пола и было достоверно не различимо между соматотипом и морфотипом исследуемых.

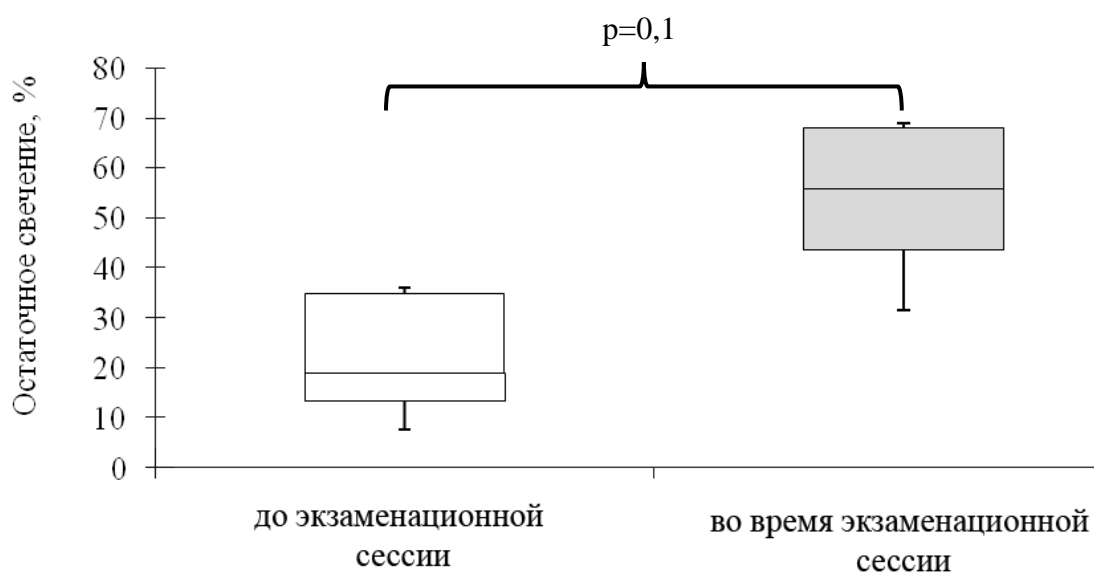


Рисунок 6 – Изменение остаточного свечения биолюминесцентной системы при тестировании слюны до и после экзаменационной сессии

Изменение остаточного свечения хорошо коррелировало с результатами хемилюминесцентного тестирования (максимальная интенсивность свечения) ( $r=0,4$ ) (рис. 7) и повышенной концентрацией лактата в слюне ( $r=0,6$ ) (рис. 8). Полагаем, что возрастание величины остаточного свечения во время психоэмоционального состояния обусловлено увеличением активных форм кислорода и повышением концентрации лактата в слюне.



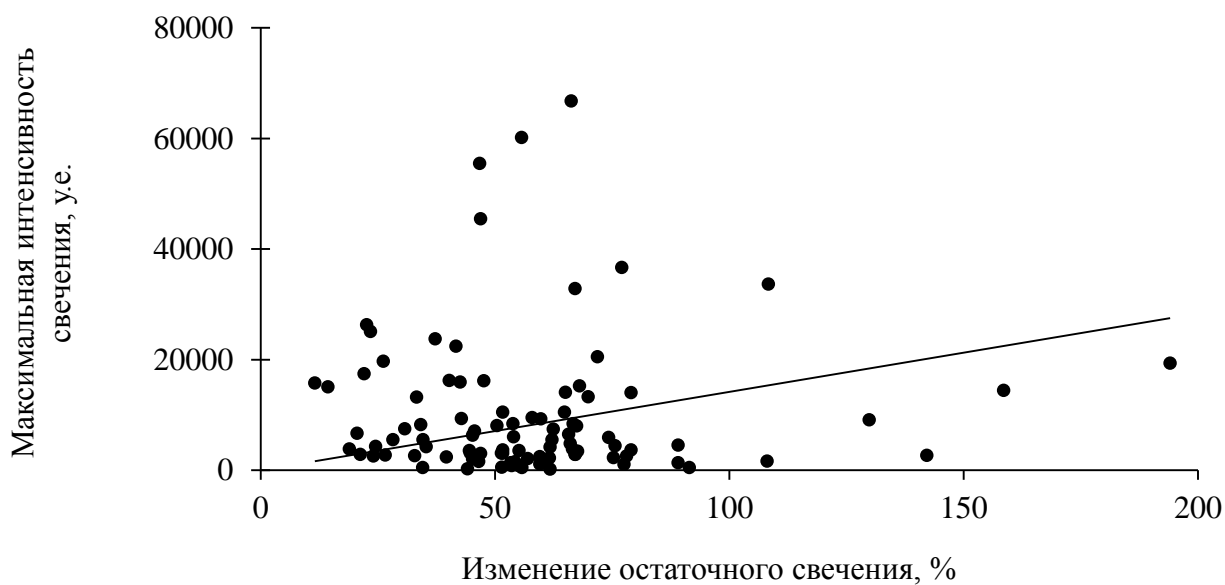


Рисунок 7 – Корреляция между изменением остаточного свечения биoluminesцентного биотеста и интенсивностью свечения хемилуминесценции при тестировании слюны во время экзаменационной сессии

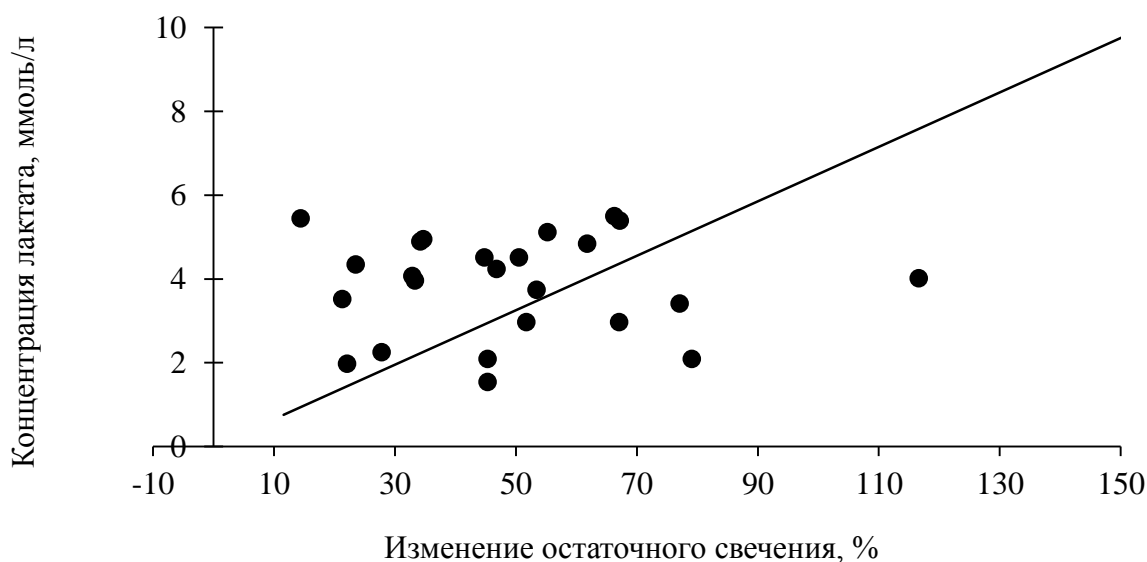


Рисунок 8 – Корреляция между изменением остаточного свечения биoluminesцентного биотеста и концентрацией лактата при тестировании слюны во время экзаменационной сессии

Результаты билюминесцентного тестирования супернатанта слюны спортсменов показали, что слюна усиливала ингибирование билюминесцентного свечения в первые дни тренировок, когда физическая нагрузка была малой (1, 2 дни) и ослабление ингибирования в тренировочные дни с большой физической нагрузкой (3, 4 дни) (рис. 9). Поэтому изменение остаточного свечения было отрицательным для малых физических нагрузок и положительным – для больших физических нагрузок. Отрицательная величина изменения остаточного свечения коррелировала с повышенным содержанием лактата в слюне ( $r=0,5$ ) (рис. 10), положительная величина – с увеличением активных форм кислорода в слюне ( $r=0,6$ ). Изменение остаточного свечения при каждой физической нагрузке хорошо коррелировало с изменением частоты сердечных сокращений ( $r=0,5$ ) (рис. 11).

Полагаем, что ингибирование билюминесцентного свечения вызвано повышенным содержанием лактата в слюне ( $r=0,5$ ) (рис. 11) при аэробной мышечной работе (малая физическая нагрузка) и возрастанием активных форм кислорода в слюне ( $r=0,6$ ) при анаэробной работе (большая физическая нагрузка).

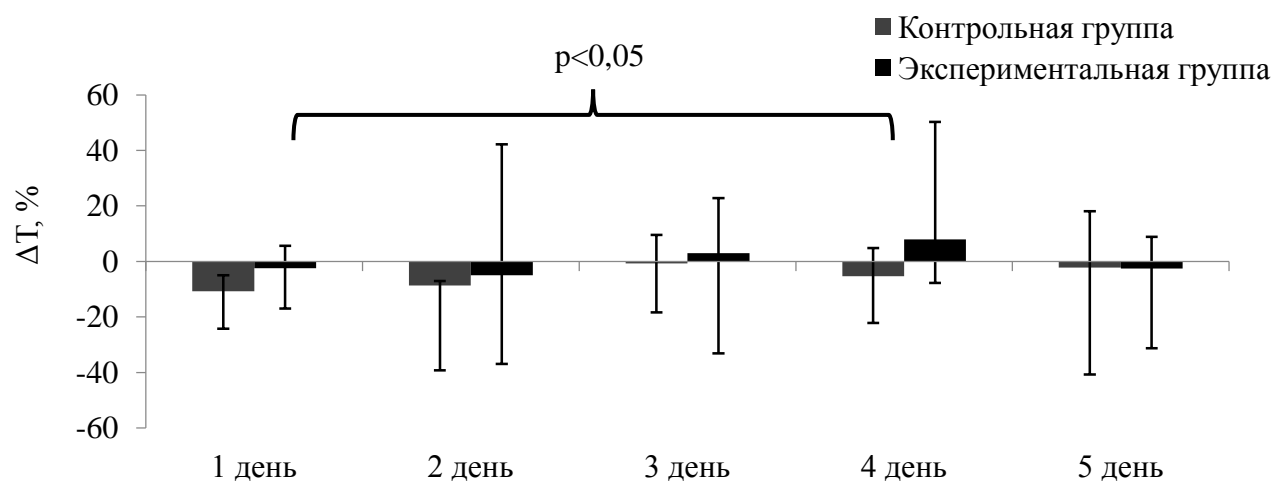


Рисунок 9 – Изменение остаточного свечения биолуминесцентной системы при тестировании слюны контрольной группы и группы спортсменов во время тренировок с увеличивающейся физической нагрузкой

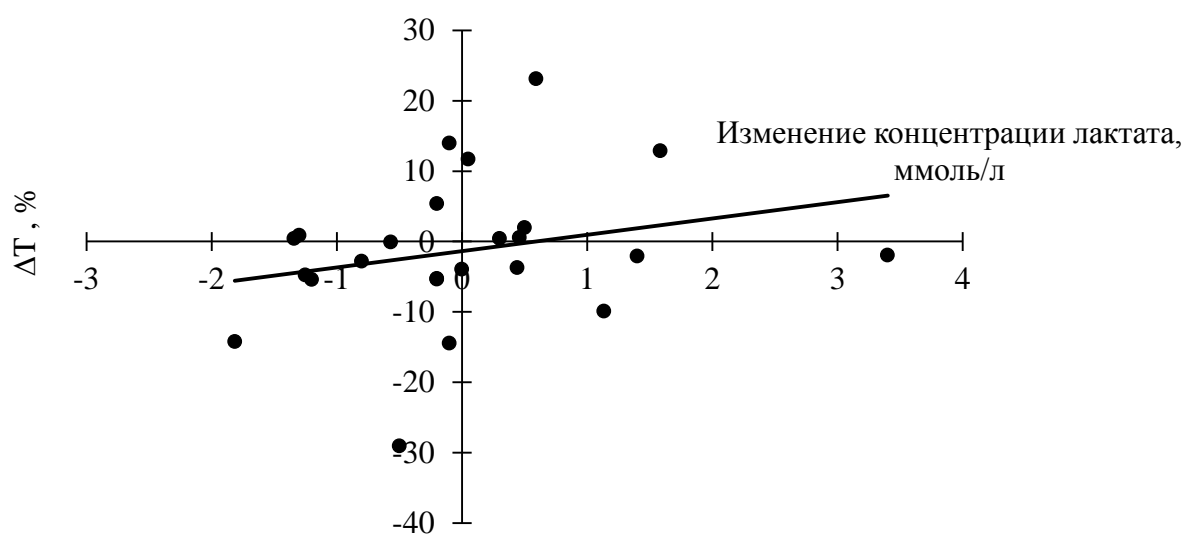


Рисунок 10 – Корреляция между изменением остаточного свечения биолуминесцентного биотеста и изменением концентрации лактата в слюне после физической нагрузки

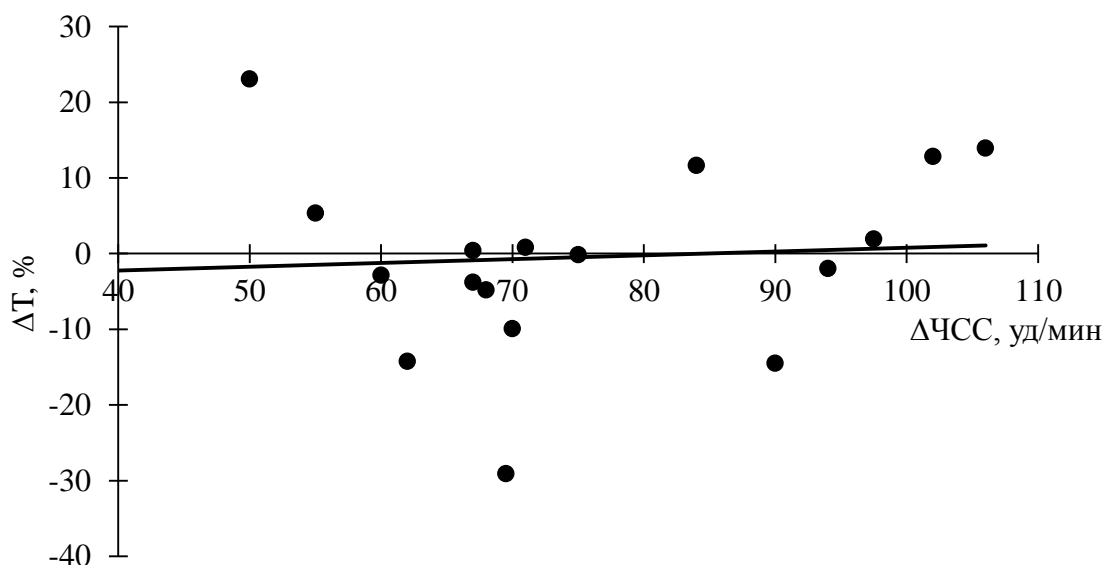


Рисунок 11 – Корреляция между изменением остаточного свечения билюминесцентного биотеста и изменением ЧСС после физической нагрузки

Таким образом, слюна человека, находящегося в психоэмоциональном состоянии или при воздействии физической нагрузки на организм, ингибировала билюминесцентное свечение. При этом слюна человека, который испытывал большую физическую нагрузку сильнее ингибировала билюминесцентное свечение, чем во время психоэмоционального состояния. Ингибирование билюминесцентного свечения в обоих случаях обусловлено повышенным содержанием лактата и возрастанием активных форм кислорода в слюне.

### 3.3 Возможности билюминесцентного метода в анализе слюны животных

Результаты билюминесцентного тестирования слюны показали достоверное снижение билюминесцентного свечения при малой физической нагрузке с последующим возрастанием свечения при повышении физической нагрузки ( $p=0,1$ ) (рис. 12).

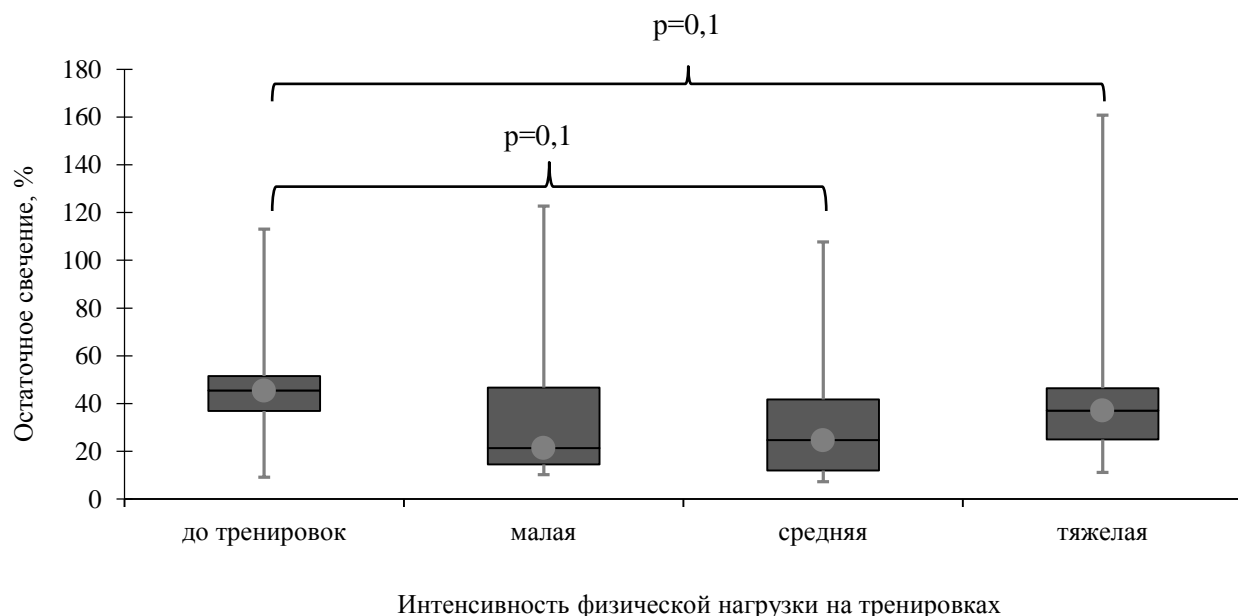


Рисунок 12 – Изменение остаточного свечения биолуминесцентной системы при тестировании слюны лошадей до и после физической нагрузки (Достоверность различий (p) указана относительно значения до тренировок)

Выявлено, что снижение величины остаточного свечения коррелировало с повышением концентрации лактата ( $r=0,6$ ) (рис. 13), повышение остаточного свечения – с возрастанием частот дыхательных движений ( $r=0,6$ ) (рис. 14). Полагаем, что ингибирование биолуминесцентного свечения при малой и средних физических нагрузках обусловлено повышением концентрации лактата в слюне.

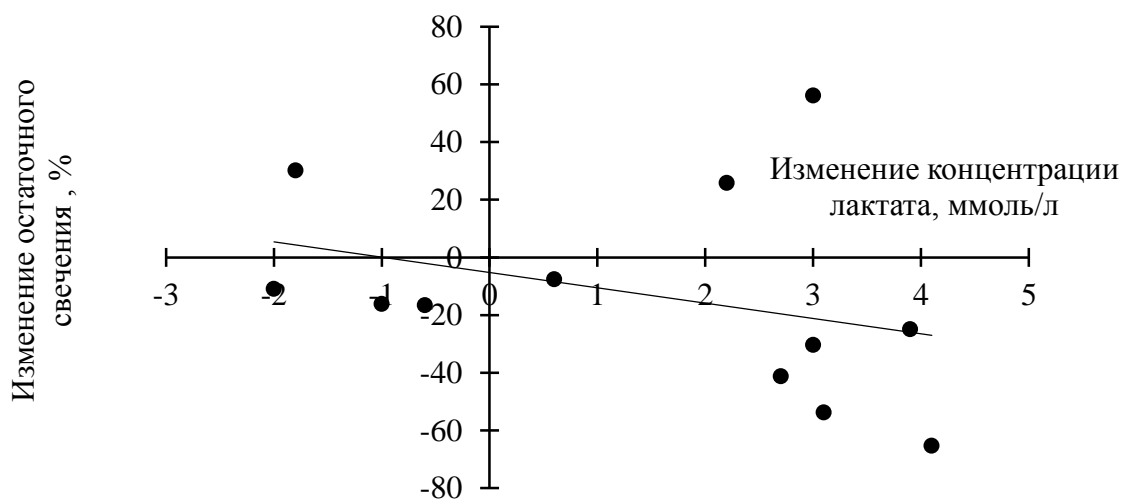


Рисунок 13 – Корреляция между изменением остаточного свечения биолуминесцентного биотеста и изменением концентрации лактата в слюне

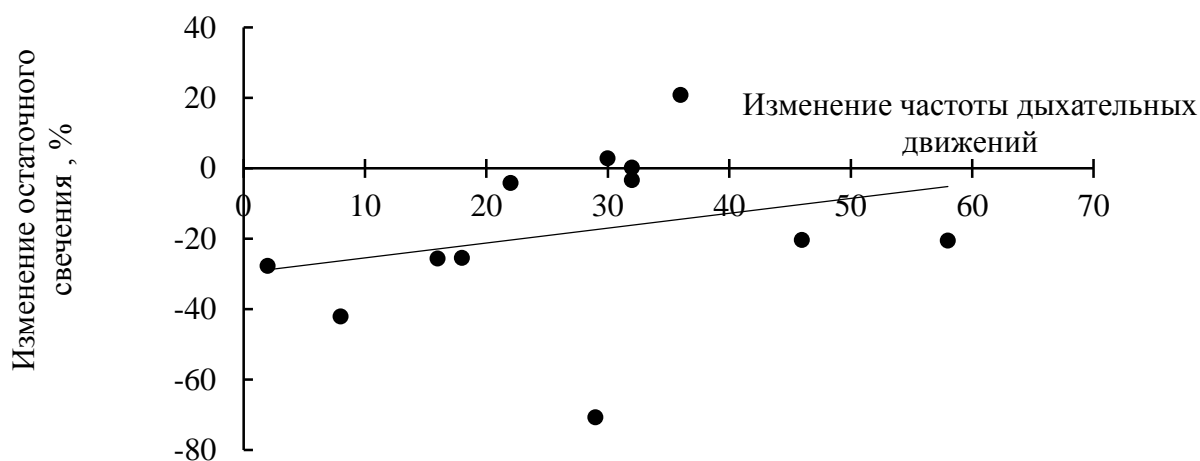


Рисунок 14 – Корреляция между изменением остаточного свечения биолуминесцентного биотеста и изменением количества дыхательных движений

Анализ биолуминесцентного тестирования слюны коров не позволил выявить различия между здоровыми и больными (рис. 15). Слюна здоровых и больных коров одинаково ингибировала активность ферментативной системы.

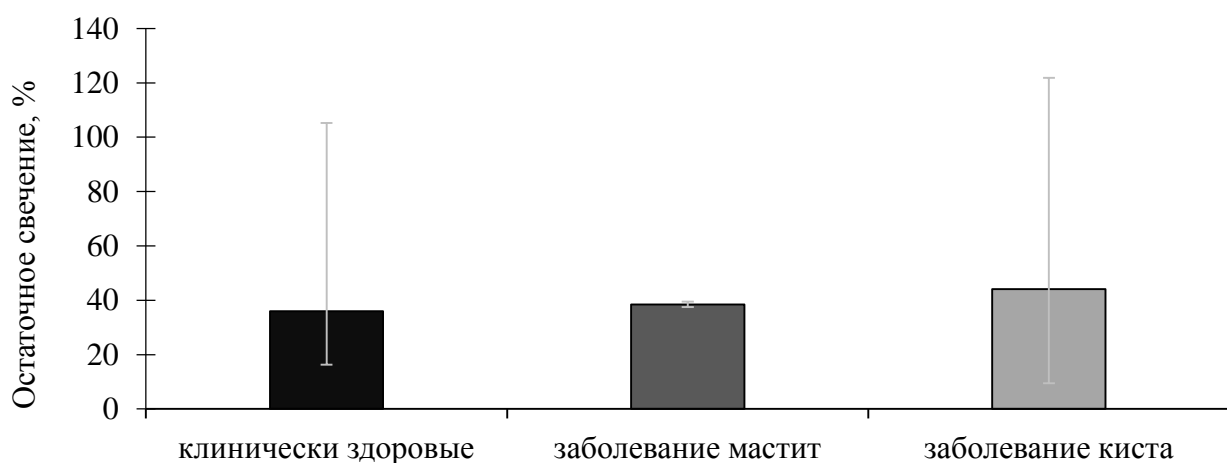


Рисунок 15 – Изменение остаточного свечения биолюминесцентной системы при тестировании слюны коров с различными заболеваниями

Результаты морфологического анализа крови показали отличия между здоровыми и больными коровами в количестве лейкоцитов (рис. 16). Кровь коров с заболеванием мастит содержит наибольшее количество лейкоцитов. Однако анализ лейкоцитарной формулы крови коров не показал достоверных различий в количестве клеток, входящих в лейкоциты (рис. 17). Выявлено незначительное повышенное содержание сегментоядерных нейтрофилов для здоровых коров и лимфоцитов для коров с заболеванием мастит.

Корреляционных взаимосвязей между величиной остаточного свечения и физиологическим состоянием крови не выявлено.

Таким образом, слюна спортивных лошадей ингибировала биолюминесцентное свечения аналогично слюне человека при физической нагрузке с зависимостью от характера мышечной работы. Ингибирование биолюминесцентного свечения слюной коров, видимо, вызвано изменением метаболического состава слюны, которые необходимо исследовать в дальнейшем.

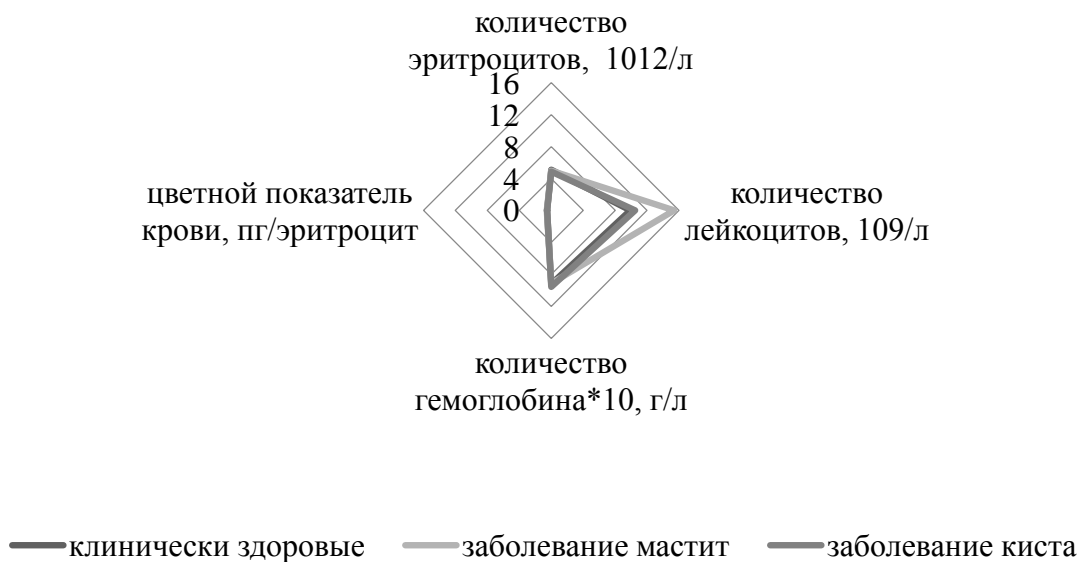


Рисунок 16 – Результаты морфологического анализа крови здоровых и больных коров

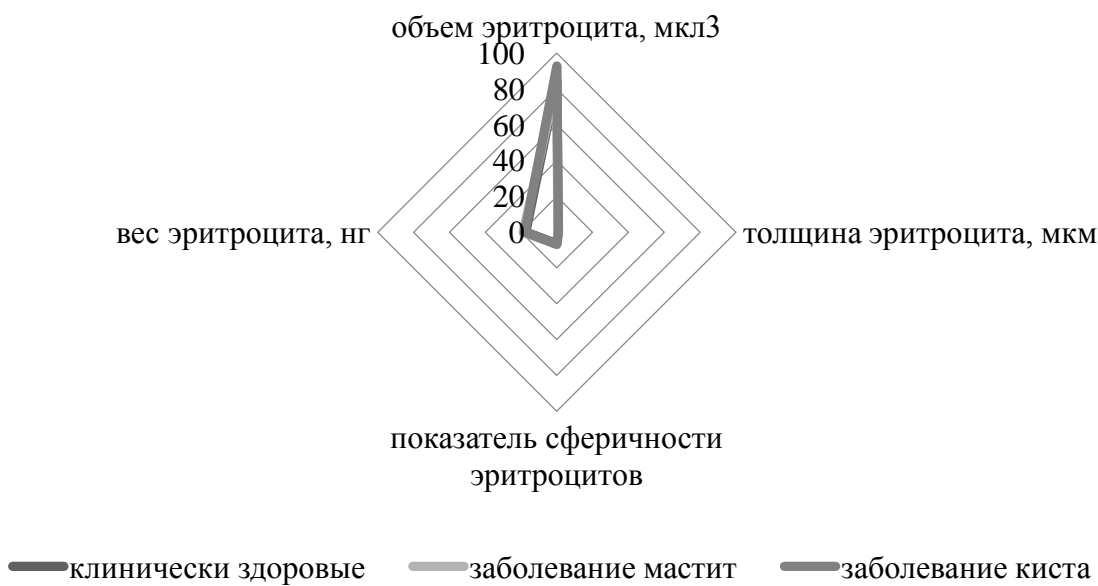


Рисунок 17 – Результаты морфологического анализа крови здоровых и больных коров



## ВЫВОДЫ

1. Оптимальный объем супернатата слюны для биолюминесцентного тестирования составлял 40 мкл. Для проведения биолюминесцентного тестирования возможно использование супернатанта слюны в свежем, замороженном или высушенном состояниях в течение 3 часов при комнатной температуре.

2. Слюна человека во время психоэмоционального состояния слабее ингибировала биолюминесцентное свечение, чем после большой физической нагрузки. При этом ингибирование биолюминесцентного свечения при аэробной мышечной работе больше, чем при анаэробной работе. Повышенное содержание активных форм кислорода и возрастание концентрации лактата в составе слюны вызывали ингибирование биолюминесцентного свечения.

3. Результаты биолюминесцентного тестирования слюны спортивных лошадей аналогичны данным тестирования слюны человека при физической нагрузке и зависят от характера мышечной работы. Использование биолюминесцентного свечения в тестировании слюны коров не позволило определить их патологическое состояние.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бельская, Л. В. Кристаллизация биологических жидкостей – перспективы использования при диагностике. / Л. В. Бельская, О. А. Голованова, В. Г. Туманидзе, Е. С. Шукайло // Бутлеровские сообщения. – 2010. – №15. – С. 175.
2. Дайлиденко, В. Н. Спортивная работоспособность и адаптационные качества лошадей тракененской породы / В. Н. Дайлиденко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2013. – №16 (2). – С. 126–133.
3. Гильмутдинов, Р.Я. Слюна – новый объект диагностических исследований у животных / Р. Я. Гильмутдинов, А.В. Иванов, М.К. Махамат, Е.С. Покровская // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №11. – С. 52–55.
4. Janczarek, I The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration / I. Janczarek, A. Bereznowski, K. Srtzelec // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2013. – №16 (3). – P. 533–541.
5. Esimbekova, E. N. Bioluminescent method to determine non-specific endotoxigenesis in therapy / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, V. V. Abakumova // Luminescence. – 1999. – №14. – P. 197–198.
6. Esimbekova, E. N. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, O. Shimomura // Advances in Biochemical Engineering. – 2014. – Vol. 144. – P. 67–109.
7. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – №18 (10). – P. 952–959.
8. Редуто, К. В. Барьерная функция слюны / К. В. Редуто // Актуальные проблемы современной медицины 2007: материалы

Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – 2007. – Ч. 2. – С. 459–460.

9. Rao, P. V. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes / P. V. Rao, A. P. Reddy, X. Lu, S. Dasari et. al. // Journal of Proteome Research. – 2009. – №8(1). – P. 239–245.

10. Meurman, J. H. Infectious and dietary risk factors of oral cancer / J. H. Meurman // Oral Oncology. – 2010. – №46(6). – P. 411–413.

11. Blicharz, T. M. Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle / T. M. Blicharz, D. M. Rissin, M. Bowden, R. B. Hayman et. al. // Clinical Chemistry. – 2008. – №54(9). – P. 1473–1480.

12. Nagler, R. M. Saliva analysis for monitoring dialysis and renal function / R. M. Nagler // Clinical Chemistry. – 2008. – №54(9). – P. 1415–1417.

13. Григорьев, И. В. Белковый состав смешанной слюны человека: механизмы психофизиологической регуляции / И. В. Григорьев, И. Д. Артамонов, Е. А. Уланова // Вестник РАМН. – 2004. – №7. – С. 36–47.

14. Malamud, D. Saliva as a Diagnostic Fluid / D. Malamud, I. R. Rodriguez-Chavez // Dental Clinics of North America. – 2011. – №55(1). – P. 159–178.

15. Вавилова, Т. П. Слюна. Аналитические возможности и перспективы : монография / Т. П. Вавилова, О. О. Янушевич, И. Г. Островская. – Москва : БИНОМ, 2014. – 312 с.

16. Тарасенко, Л. М. Биохимия органов полости рта: учебное пособие / Л. М. Тарасенко, К. С. Непорада. – Полтава, 2008. – 70 с.

17. Соколова, О. А. Саливадиагностика как метод наблюдения за динамикой развития заболевания у больных с патологией кроветворной системы / О. А. Соколова, А. М. Аванесов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2010. – №3(12). – С. 389.

18. Rathnayake, N Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases / N. Rathnayake, S. Akerman, B. Klinge, N. Lundegren, H. Jansson, Y. Tryselius, T. Sorsa, A. Gustafsson // PLoS One. – 2013. – №8(4). – P. 5.
19. Gianobile W. V. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions / W. V. Gianobile, T. Beikler, J. S. Kinney, C. A. Ramseier, T. Morelli, D. T. Wong // Periodontology 2000. – 2009. – № 50. – P. 52–64.
20. Yoshizawa, J. M. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities / J. M. Yoshizawa, C. A. Schafer, J. J. Schafer, J. J. Farrell et. al. // Clinical microbiology reviews. – 2013. – №26. – P. 781–791.
21. Михайлов, С. С. Слюна как объект биохимического контроля в спорте / С. С. Михайлов, Е. В. Розенгарт // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. – 2008. – №6. – С. 57–61.
22. Edwards, D. A. Intercollegiate soccer: Saliva cortisol and testosterone are elevated during competition, and testosterone is related to status and social connectedness with teammates / D. A. Edwards, K. Wetzel, D. R. Wyner // Physiology & Behavior. – 2006. – №87. – P. 135–143.
23. Carré, J. Pre-competition hormonal and psychological levels of elite hockey players: Relationship to the ‘home advantage’ / J. Carré, C. Muir, J. Belanger, S. K. Putnam // Physiology & Behavior. – 2006. – №89. –P.392–398.
24. Ясен, П. ЧСС, лактат и тренировки на выносливость / П. Ясен. – Пер. с англ. – Мурманск : Тулома, 2006. – 160 с.
25. Ljungberg, G. Saliva and marathon running / G. Ljungberg, T. Ericson, B. Ekblom, D. Birkhed // Scandinavian Journal of medicine & science in sports. – 1997. – №7. – P. 214–219.
26. Чиканова, Е.С. Биожидкости и фракталы: количественный критерий самоорганизации капли / Е. С. Чиканова, В. Б. Федосеев, О. А. Голованова // Вестник Омского Университета. – 2015. – №4. – С. 45–49.

27. O'Flynn, J. Examining stress: an investigation of stress, mood and exercise in medical students / J. O'Flynn, T. G. Dinan, J. R. Kelly // *Irish Journal of Psychological Medicine*. – 2017. – №35(1). – P. 63–68.
28. Черкасов, Д. В. Сравнительный анализ содержания кортизола в слюне студентов вуза с различной спортивной подготовкой / Д. В. Черкасов, А. В. Гулин // *Вестник ТГУ*. – 2011. – №16(2). – С. 517–519.
29. Коленчукова, О. А. Антиоксидантная активность слюны как маркер здоровья студентов в период интенсивной интеллектуальной нагрузки / О. А. Коленчукова, Н. Н. Медведева // *Медицинская иммунология*. – 2017. – №19. – С. 284–285.
30. Шаленкова, М. А. Акустический показатель слюны при стрессе / М. А. Шаленкова, З. Д. Михайлова, В. А. Клемин, Л. В. Коркоташвилли и др. // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2014. – №3. – С. 28–41.
31. Цыганов, А. Р. Биохимия пищеварения : учеб. пособие / А. Р. Цыганов, И. В. Ковалева, Е. В. Мохова. – Горки : Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2008. – 36 с.
32. Palm, A. Secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in horse saliva / A. E. Palm, O. Watte, T. Lundström, E. Wattrang // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2016. – № 180. – P. 59–65.
33. Strzelec, K. Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise / K. Strzelec, M. Kankofer, S. Pietrzak // *Acta Veterinaria Brno*. – 2011. – №80. – P. 101–105.
34. Kang, OD. Changes in Salivary Cortisol Concentration in Horses during Different Types of Exercise / OD. Kang, WS. Lee // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2016. – №29(5). – P. 747–752.
35. Вавилова, Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта : учебное пособие / Т. П. Вавилова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с.
36. Vinnik Yu. S. The clinical aspects of chemiluminescent analysis use / Yu. S. Vinnik, A. A. Savchenko, O. V. Peryanova, O. V. Teplyakova et. al. // *Siberian medical review*. – 2006. – №3. – P. 3–6.

37. Хаустова, С.А. Определение биохимических показателей слюны с помощью Фурье-спектроскопии средней ИК области / М. Ю. Шкурников, Е. С. Гребешок, В. Г. Артюшенко, А. Г. Тоневицкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – №148. – С. 597–600.
38. Бельская, Л. В. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов / Л. В. Бельская, О. А. Голованова, В. Г. Турманидзе, Е. С. Шукайло // Омский научный вестник. – 2011. – №6. – С. 175.
39. Диденко, С.Н. Особенности гормонального статуса юных гандболистов/С.Н. Диденко, Г. Д. Алексанянц // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. – 2014. – №4. – С. 42–46.
40. Banfi, G. Usefulness of Free Testosterone/Cortisol Ratio during a Season of Elite Speed Skating Athletes / G. Banfi, M. Marinelli, G. S. Roi, V Agape // Int J Sports Med. – 1993. – №14(7). – P. 373–379.
41. Chang, C. K. Responses of saliva testosterone, cortisol, and testosterone-to-cortisol ratio to a triathlon in young and middle-aged males / C.K. Chang, H.F. Tseng, H.F. Tan, Y. D. Hsuuw, J. Lee-Hsieh // Biology of Sport. – 2005. – №22(3). – P. 227–235.
42. Подковкин, В. Г. Измерение показателей обмена коллагена при эмоциональном стрессе / В. Г. Подковкин, Д. Г. Иванов // Вестник ОГУ. – 2010. – №2(108). – С. 124–128.
43. Kędzierski, W Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session / W. Kędzierski, A. Cywińska, K. Strzelec S. Kowalik // Animal Science Journal. – 2014. – №85. – P. 313–317.
44. Munk, R An exploratory study of competition scores and salivary cortisol concentrations in Warmblood horses / R. Munk, R. B. Jensen, R. Palme et al. // Domestic Animal Endocrinology. – 2017. – №61. – P. 108–116.
45. Mercer-Bowyer, S. Use of fecal glucocorticoid and salivary cortisol concentrations as a measure of well-being of New York City carriage horses / S.

Mercer-Bowyer, D. C. Kersey, J. J. Bertone // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 2017. – №250(3). – P. 316–321.

46. Гильмутдинов, Р. Я. Слюна – новый объект диагностических исследований у животных / Р. Я. Гильмутдинов, А. В. Иванов, М. К. Махамат, Е. С. Покровская [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №11. – С. 52–55.

47. Дерхо, М. А. Биохимический статус коров при лютеиновых кистах яичников / М. А. Дерхо, Т. И. Серeda, Н. В. Крайнова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – №3(65). – С. 106–108.

48. Yotov, S. A. Investigation on some biochemical parameters and effect of hormonal treatment in anoestrous dairy cows with cystic ovarian follicle / S. A. Yotov, A. S. Atanasov, G. B. Georgiev, J. D. Dineva et. al. // Asian Pacific Journal of Reproduction. – 2014. – №3(1). – P. 41–45.

49. Фрунджян, В. Г. Биоллюминесцентный метод диагностики мастита у коров / В. Г. Фрунджян, О. С. Дорошина, О. В. Лебедева и др. // Ветеринария. – 2005. – №6. – С. 40-44.

50. Экологическая биофизика. Учебное пособие в 3 т. Под ред. И. И. Гительзона, Н. С. Печуркина. Т. 1. Фотобиофизика экосистем / И. И. Гительзон, В. А. Кратасюк, В. Н. Лопатин и др. – Москва: Логос, 2002. – 328 с.

51. Руководство по биоллюминесцентному тестированию на токсичность [Электронный ресурс] : Практическое руководство. – Москва. – Режим доступа: [http://www.pribori.com/lumitesteria/reagent-20/bio\\_tox.html](http://www.pribori.com/lumitesteria/reagent-20/bio_tox.html) [дата обращения: 21 мая 2019 г.]

52. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биоллюминесцентного анализа : учебное пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова.– Красноярск : Краснояр. гос.ун-т., 2002. – 154 с.

53. Davies, R. H. Lactate assay based on bacterial bioluminescence: enhancement, dry reagent development, and miniaturization / R. H. Davies, J. W.

Corry, J. D. Andrade // Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications / Singapore. – 2002. – P. 441–442



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

 Кратасюк В.А.

«10» июня 2019 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО  
БИОТЕСТА В ТЕСТИРОВАНИИ СЛЮНЫ

06.04.01 Биология  
06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель



к.б.н.

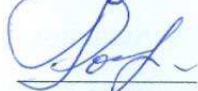
Л. В. Степанова

Выпускник



О.В. Колесник

Рецензент



к.б.н., доцент

Т. В. Рожко

Красноярск 2019