

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 – Биология**

Билюминесцентное тестирование слюны лошадей: перспективы  
использования

Руководитель \_\_\_\_\_ доцент, канд. биол. наук Л.В. Степанова  
подпись, дата должность, ученая степень

Выпускник \_\_\_\_\_ В.Е. Мартын  
подпись, дата

Красноярск 2021

## Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «Биолюминесцентное тестирование слюны лошадей: перспективы использования» содержит: 36 страниц текстового документа, 14 иллюстраций, 25 литературных источников.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, БИФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА, ФЕРМЕНТЫ, ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА, СПОРТИВНЫЕ ЛОШАДИ, СЛЮНА ЛОШАДЕЙ.

Цель работы: выявление возможности использования биолюминесцентного биотеста для определения физической нагрузки спортивных лошадей.

Актуальность исследования обусловлена тем, что для улучшения системы физической подготовки спортивных лошадей необходимы объективные критерии оценки реакции организма лошади на физическую нагрузку. Новый подход в исследовании физиологического состояния организма спортивных лошадей – это тестирование слюны с помощью биолюминесцентного биотеста, которую представляет бактериальная ферментативная система. Изменение активности ферментов в ответ на изменение концентрации метаболитов в слюне во время нагрузки будет определяться по уровню биолюминесцентного свечения.

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны спортивных лошадей показали, что отсутствует однонаправленное изменение величины остаточного свечения с повышением интенсивности физической нагрузки. По ингибированию свечения возможно выявление физической нагрузки высокой интенсивности. На чувствительность иммобилизованного биолюминесцентного реагента не влияло изменения рН слюны и содержание в ней лактата после физических нагрузок. Выявлены взаимосвязи между величинами остаточного свечения и функциональными показателями организма при разных интенсивностях.

## Содержание

Содержание.....	3
Введение.....	4
Глава 1 Литературный обзор.....	5
1.1. Физиологические свойства слюны лошадей.....	5
1.2. Методы тестирования физической подготовленности спортивных лошадей.....	8
1.3. Биолюминесценция как метод тестирования.....	20
Глава 2 Материаллы и методы.....	25
Глава 3 Результаты и их обсуждение.....	27
Выводы.....	33
Список использованной литературы.....	34

## Введение

Слюна — это сложная биологическая жидкость, которая вырабатывается специализированными железами и выделяется в ротовую полость. Изменение биохимического состава слюны может служить

и  
н В настоящее время изучение состояния организма лошади по изменению биохимического состава слюны проводятся исключительно зарубежными исследователями с дорогостоящих реагентов [22]. Методы исследования  
Российские исследования общей физической подготовленности организма лошади проводят по экстерьерно-конституционным особенностям и клинко-физиологическим показателям. Для классификации лошадей создана методология построения логических правил на основании данных об экстерьере и физиологических показателях [1]. Однако существующая методология не дает однозначного представления о состоянии организма лошади во время тренинга.

Использование неинвазивного метода – тестирование слюны лошади с применением биолюминесцентного биотеста представляет практический интерес и является значимым для спортивного коневодства [7, 8].

с Цель исследования: выявление возможности использования биолюминесцентного биотеста для определения физической нагрузки спортивных лошадей.

я Задачи исследования:

- н 1. Выявить влияние слюны лошадей после физических нагрузок разной интенсивности на изменение биолюминесцентного свечения;
- я 2. Определить биохимические или химические показатели слюны, способные влиять на изменение биолюминесцентного свечения.

о

р

г

а

н

## Глава 1 Литературный обзор

### 1.1 Физиологические свойства слюны лошадей

Слюна - важная биологическая жидкостью в организме, а также основной компонент ротовой жидкости [9].

Изучение слюноотделения при помощи фистульной методики показало, что слюна у лошади отделяется только во время еды и начинает выделяться после нескольких жевательных движений. Слюну выделяют преимущественно железы, находящиеся на той же стороне, где происходит жевание. Слюноотделение их желез на противоположной стороне незначительное или даже совсем отсутствует. Слюнные железы у лошади работают в ответ на механическое раздражение рта пищевыми веществами [13].

Количество выделяемой слюной жидкости у лошадей напрямую зависит от качественной характеристики пищи. При употреблении лошадьми грубого корма, такого как – солома, слюнная жидкость превышает в 4-5 раз (по весу), в сравнении со скормленным кормом. При кормлении овсом и кукурузой — в 2 раза, травой — равное количество или несколько меньше, в зависимости от сочности растений. За сутки лошадь выделяет до 40 л слюны с содержанием 1 % сухого вещества [6].

Слюна осуществляет три главные функции:

- муцины участвуют в формировании пищевого комка, так же смазывают поверхность зубов и слизистых оболочек;
- антимикробная функция обволакивающего покрытия, создаваемого слюной, заключается в подавлении микрофлоры ферментами серозного секрета слюнных желез;
- поддержание прочности эмали зубов вследствие поддержания минерального состава слюны, при участии минерал-связывающих белков [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Слюна в основном состоит из воды, которая составляет до 99% от ее общего объема. Кроме того, исследования на лошадях показали, что слюна также содержит такие соединения, как фосфор, лактат, холестерин, жирные кислоты, глюкозу, гормоны, такие как кортизол, триглицериды, мочевины и мочевая кислота. Кроме того, слюна содержит ферменты, такие как слюнной альфа-амилазы, липаза, карбоангидразы, аденозиндезаминаза, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы [19, 22].

Повышенный уровень кортизола широко используется в качестве физиологического индикатора физической нагрузки у животных. Повышение уровня кортизола в крови лошади связано как с физической, так и с психологической нагрузкой.

Во время тренировки происходит повышение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, в результате чего стимулируется секреция кортизола и мобилизация субстрата, путем усиления глюконеогенеза, катаболизма белков и мобилизация свободных жирных кислот. При увеличении количества, интенсивности и продолжительности физических упражнений, увеличивается и секреция кортизола, но уменьшается после повторных тренировок и при увеличении соревновательного опыта лошади.

Количественное определение кортизола в слюне может быть использовано как не инвазивный метод оценки уровня кортизола в плазме крови, хорошо коррелирует с суточным ритмом у лошади.

У лошадей, которые содержались в знакомой обстановке и привыкли к физическим упражнениям, прослеживается постоянный суточный ритм концентрации кортизола в плазме крови и слюне, причем самые высокие концентрации измеряются утром и снижаются в течение всего дня. Также наблюдается влияние дисциплины на исходный уровень концентрации кортизола, выездковые лошади имеют большую концентрация кортизола, чем лошади конкуристы [22].

Концентрация глюкозы и лактата в слюне может показать устойчивость организма к физическим нагрузкам или тренировочным. На концентрацию глюкозы и лактата в слюне влияют различные факторы, такие как: физическая форма, возраст, пол, условия размножения и дисциплина конного спорта. Базовая изменчивость показателей физической нагрузки для прыгающих лошадей во время тренировки представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Основные статистические показатели физической нагрузки для прыгающих лошадей на беговой дорожке

Индикатор нагрузки	Среднее значение	Коэффициент вариации	Минимальное значение	Максимальное значение
Кортизол (нг/мл)	0,91±0,68	74,39	0,02	3,99
Глюкоза (мг/дл)	40,37±51,35	127,21	0,25	366,65
Лактат (ммоль/л)	0,79±0,56	70,45	0,10	3,23

Концентрации кортизола, глюкозы и лактата в слюне в течение всего соревновательного сезона выше для молодых (менее опытных) по сравнению со старшими (более опытными) лошадьми.

Известно, что лошадь с более низким уровнем лактата в слюне более здорова, т.е. мышечная ткань производит меньше молочной кислоты, которая превращается в крови в ион лактата. Поэтому концентрацию лактата в слюне можно использовать в качестве индикатора для оценки эффективности работы лошади. Лошади индивидуально реагируют на физические нагрузки, но с годами тренировок они становятся более равномерными в производительности. Поэтому для старых лошадей значения анализируемых физических показателей ниже.

Данные показатели физических нагрузок самые высокие в пике конкурентного сезона (табл. 2). Поскольку каждая физическая активность вызывает определенное количество напряжения, мониторинг физических

показателей, может быть применен для оценки работоспособности лошади в определенной деятельности [20].

Таблица 2 - Значения показателей физических нагрузок для лошадей на беговой дорожке в зависимости от возраста в соревновательном сезоне – май

Месяц	Возраст	Индикатор нагрузки		
		Кортизол (нг/мл)	Глюкоза (мг/дл)	Лактат (ммоль/л)
Май	Молодые	0,977	50,167	0,934
	Старые	0,736	26,982	0,505
Июль	Молодые	1,144	57,923	1,073
	Старые	0,841	27,615	0,669
Сентябрь	Молодые	1,033	53,912	1,000
	Старые	0,743	25,605	0,556

Таким образом, концентрации лактата и кортизола в слюне являются индикаторами физического и психического состояния лошади, которые могут быть использованы для оценки эффективности её работы.

## 1.2 Методы тестирования физической подготовленности спортивных лошадей

Организм лошади представляет собой сложную систему саморегуляции с большим количеством различных функциональных воздействий и внутренних взаимосвязей. Поэтому ясно, что только многогранный всесторонний анализ состояния физиологических систем, обеспечивающих возможности двигательной функции, может рассматриваться как выражение общей подготовленности организма лошади и служить основой для дозирования и корректировки нагрузок во время тренировок [7].

В настоящее время в конном спорте к турнирным лошадям предъявляют более высокие требования к физиологическим возможностям организма. Тренировка и оценка физической подготовленности спортивных лошадей чаще носит "интуитивный" характер [10].



Традиционно применяют несколько методов оценки физической подготовленности и скоростных качеств спортивных лошадей, например, оценка по экстерьерно-конституциональным особенностям, которая основана на анализе внешнего вида, пригодности конституции животного к передвижению, прямая оценка резвостных качеств во время испытаний. Также, известны более точные методы, которые основаны на анализе внутренних показателей лошадей, изучении тонуса мышц или гематологических показателей.

Наиболее распространенные методы оценки тренированности лошадей.

1) Клиническая оценка при наружном осмотре.

Клиническая оценка при наружном осмотре - оценка внешних показателей, отражающих степень тренированности лошадей, также главный фактор общего состояния лошади, развитие ее двигательной системы. Если у лошади "веселый глаз", блестящая кожа, четко очерченные мышцы, нет заметных глазом симптомов дисфункции жизненно важных, то данная лошадь, может перенести намеченные нагрузки. Тренер должен ежедневно осматривать всех лошадей следующим образом: в отдельном просторном стойле, далее при шаговой проводке до начала тренировки. Преимущество этого метода заключается в том, что он является быстрым способом оценки общего состояния организма лошади и для него не требуется специальное оборудование. Недостатком этого метода является неточность и небольшая информативность при исследовании «на глаз» отдельных частей тела лошади.

Одного глазомерного осмотра недостаточно для достоверной оценки функционального состояния лошади, показывающего степень ее физической подготовленности. Необходимы специальные исследования сердечно-сосудистой и дыхательной систем, показателей крови, функционального состояния центральной нервной системы и периферического нервно-мышечного аппарата в их непрерывной взаимосвязи.

2) Метод тестирования работоспособности лошадей с помощью измерения тонуса мышц.

Метод тестирования работоспособности лошадей с помощью измерения тонуса мышц. Прибор с помощью которого проводят измерение тонуса мышц называется – «электро-миотонometr». В основе работы прибора лежит принцип «неравновесного моста Уинстона». Принцип работы данного прибора: перпендикулярно плоскости исследуемой мышцы осуществляют давление при помощи пружинного тонометрического датчика. В центре этого датчика расположен подвижный индикаторный щуп. В зависимости от степени твердости мышцы, индикаторный щуп вдавливают в ее толщу на определенную глубину. Расположение щупа измерительного прибора связано с изменением электрического сопротивления тонометрического датчика, включенного в сеть.

Тонус мышц измеряют по шкале от 0 до 100 условных единиц: где «0» - отсутствие какой-либо упругости, «100» - упругость абсолютно твердого тела, такого как стекло. В данном диапазоне значений стрелка микроамперметра показывает степень твердости определенной мышцы.

Как правило, для оценки состояния нервно-мышечного аппарата тренируемых лошадей исследуют следующие мышцы: поверхностную грудную - в середине мышцы, на участке с большей мышечной массой; плечеголовную - отступив от плечевого сустава 9-10 см; трехглавый мускул плеча - в центральной части мышцы; длиннейшую мышцу спины - в средней части поясничной области; поверхностную ягодичную мышцу - на расстоянии 7-8 см от выступающего вперед бугра подвздошной кости лошади. Мышечный тонус нужно определять в двух половинах тела животного, в левой и правой [7].

### 3) Метод физиологической оценки тренированности лошадей.

Изучение физиологическое состояние двигательного анализатора лошади проводят с помощью прибора, который подает электротоковый и звуковой раздражители. В качестве электротокового раздражителя используют импульсный ток пиковой формы. Электроды закрепляют на пястях передних правой и левой конечностях лошади. Далее подается

импульсный ток частоты 400-450 Гц в диапазоне 0,3-1,2 В. Индифферентный электрод закрепляют в области грудной кости при помощи резиновой подпруги. Идентичность рефлекторных реакций животного возможна только в том случае, если в двигательном анализаторе происходит точное переключение между нервными структурами. Для данного процесса необходимо скоординированное взаимодействие как возбуждающих процессов, так и тормозных. Отсюда следует, что по данным процессам можно судить о их функциональной активности [10].

Если лошадь демонстрирует выраженную двигательную реакцию соответствующей ногой на комплекс раздражителей, то это является признаком активности как возбуждающих, так и тормозных процессов. Интенсивный отклик (обозначают знаком «+») соответствующей конечностью дополнительно указывает на активность возбуждения, а двойной и тройной ответ указывает на его определенное преобладание. Слабая реакция с соответствующей ногой (обозначают знаком «-») или отсутствие какой-либо реакции указывает на снижение активности возбуждающего процесса.

На активность внутреннего торможения указывают все случаи реакций соответствующей ногой в ответ на раздражители. Реакция ногой, которая не соответствует поданному раздражению, указывает на низкую активность внутреннего торможения, так как не осуществилось корковое переключение обобщенного возбуждения. Так же на это может указывать поочередная реакция одной, затем другой ногой. Волна сокращения, которая проходит через мышцы туловища лошади, указывает на низкий функциональный уровень внутреннего торможения, когда возбуждение свободно и хаотично распределяется по двигательному анализатору. Общее двигательное возбуждение лошади, наступающее во время проведения опыта, доказывает то, что преобладает возбудительный процесс в высших отделах центральной нервной системы.

Таким образом, метод физиологической оценки тренированности лошадей с помощью специального прибора, подающего электроток и

звуковой раздражители, включает в себя 22 блока раздражителей, из которых 11 активирует раздражение тактильных рецепторов правой ноги и столько же левой.

Кроме того, у лошадей всех возрастов, пород и типов высшей нервной деятельности выделяют пять основных форм функционального состояния двигательного анализатора. В рамках одной формы функционального состояния нервной системы обнаруживаются не столь существенные признаки активности возбудительного и тормозного процессов. Они могут варьироваться между несколько лучшей или худшей координации движений. О разладе в двигательном аппарате животного можно судить по различию порогов рефлекторной активности центров левой и правой ног.

Первая форма функционального состояния двигательного анализатора характеризуется адекватными и четко выраженными ответными реакциями лошади, которые свидетельствуют о высокой активности процессов возбуждения и торможения. Вторая форма функционального состояния двигательного анализатора - отличается однозначными и отчетливыми, хорошо скоординированными ответами, с сопутствием добавочных реакций. Данное состояние описывается удовлетворительной активностью процессов возбуждения и торможения. Третья форма характеризуется вялыми, невыраженными ответными реакциями, что указывает на преимущественную активность тормозного процесса. Ответные реакции интенсивные и чаще удвоенные, имеются элементы общего двигательного возбуждения - четвертая форма. Состояние характеризуется преобладанием активности возбудительного процесса. перевозбужденное состояние с многократными сильными, в основном неадекватными ответными реакциями, повышенная двигательная тревога (пятая форма) [7].

4) Метод оценки физической подготовленности спортивных лошадей по физиологическому показателю с помощью ультразвука.

Аналогом выше разобранных методов является метод оценки уровня подготовленности лошадей при помощи ультразвукового анализа. Метод

заключается в измерении усредненного значения распространения ультразвука в костях лошади. Измерения проводят до и после тренировки в центре последнего ребра и 3-ей пястной кости.

Исследователи решают поставленную задачу благодаря тому, в данном методе для оценки физиологического показателя, измеряют биоэлектрический потенциал в биологически активных центрах, для этого используют прибор для электроакупунктуры и для измерения показаний биологического потенциала кожи людей и животных. Высокую физическую подготовленность лошади констатируют при 83-85 мкА.

К недостаткам оценки работоспособности с помощью измерения тонуса мышц, оценка при наружном осмотре, по экстерьерно-конституциональным особенностям относятся:

- необходимость использования лабораторного оборудования и дорогостоящих химических реактивов;
- низкая информативность при глазомерном обследовании отдельных частей тела;
- недостаточная точность [8].

5) Комплексная клиническая оценка уровня тренированности скаковых лошадей.

Клинические показатели физической подготовленности лошадей содержат сведения о состоянии дыхательных функций (частота, глубина, минутный объем дыхания), сердечно-сосудистой системы (частота пульса, артериальное давление, электрокардиограмма), температуру тела и кожи. Общий уровень физической подготовленности спортивных лошадей отражается на их гематологических показателях. Физическая нагрузка скаковых лошадей, направлена на интенсивные и координационно точные движения, что обусловлено функциональным состоянием нервно-мышечного аппарата. Изучение функционального состояния нервно-мышечного аппарата необходимо для улучшения подготовки лошадей к ответственным стартам. Для полного анализа уровня физической подготовленности спортивных

лошадей необходимы данные всех систем, которые обеспечивают мышечную работу, их взаимозависимая оценка и основательный клинический анализ. Ниже представлена таблица клинико-физиологических показателей (табл. 3) [7].

Таблица 3 - Показатели комплексной оценки уровня физической подготовки скаковых лошадей

Показатели	Состояние тренированности лошади		
	Недостаточная тренированность	Хорошая тренированность	Перетренированность
Частота пульса	34-44	24-34	32-48
Частота дыхания	12-16	8-12	12-16
Артериальное давление:			
Максимальное	105-125	85-105	110-125
Минимальное	45-60	35-50	45-60
Среднее	70-85	65-80	70-90
Гематологические показатели:			
Оксигенация венозной крови	60-70	75-88	50-65
Количество эритроцитов	6-8	8,5-10,5	7-8
Количество гемоглобина	12-14	16-18	14-16
Тонус мышц:			
Плечеголовная	45-55	50-60	40-55
3-главая плеча	45-55	50-60	40-55
Длиннейшая спины	60-70	70-80	65-75
Поверхностная ягодичная	60-70	70-80	65-75
Функциональное состояние двигательного анализатора	Преобладание активности тормозного процесса	Высокая или достаточная активность возбудительного и тормозного процессов	Преобладание активности возбудительного процесса, или перевозбуждение

На сегодняшний день легко доступными и довольно объективными в конном спорте и ветеринарии являются следующие клинико-физиологические методы: измерение частоты сердечных сокращений и количества дыхательных движений, температуры, артериального давления, электрокардиография,

биохимический анализ крови, уровня насыщения крови кислородом, исследование функционального состояния двигательного анализатора и периферического нервно-мышечного аппарата. Кроме того, большое значение имеет тип высшей нервной деятельности спортивной лошади, ведь данная характеристика не изменяется с течением жизни. Изучение типов высшей нервной деятельности как правило проводят в начале тренинга, чтобы, опираясь на знание индивидуальных особенностей ее центральной нервной системы, правильно использовать принципы, методы и средства тренировки. Данные исследования проводят с помощью двигательно-пищевой методики [10].

б) Оценка работоспособности лошадей с помощью кардиомониторинга и установления типов высшей нервной деятельности.

Для определения общей тренированности спортивных лошадей разработана универсальная методика с помощью кардиомониторинга тренировочного процесса и установления типов высшей нервной деятельности лошади. Схема исследования приведена ниже (рис. 1) [12]. Проведя кардиомониторинг во время тренинга спортивных лошадей, а также установив тип высшей нервной деятельности и порог анаэробного энергоснабжения можно создать индивидуальную тактику планирования физической нагрузки для сохранения высокого уровня функционального состояния, избежать переутомления диагностировав на начальных этапах признаки перетренированности. Основным способ проявления высшей нервной деятельности спортивной лошади - двигательная активность. Отсюда следует то, что о функциональном состоянии высшей двигательной системы лошади (двигательном анализаторе), можно судить по ее двигательной активности, так как каждое отдельное движение обусловлено центральными процессами интеграции. В современной нейрофизиологии принято отталкиваться от того, что определение функционального состояния центральной нервной системы лошади должно основываться на тестировании активности нейрорефлекторных механизмов биологически преобладающей активности,

подающих необходимые стимулы через ведущую афферентную систему [7, 12].



Рисунок 1 - Схема исследования общей тренированности спортивных лошадей методом кардиомониторинга

7) Оценка работоспособности лошадей с помощью измерения частоты сердечных сокращений.

Не зависимо от вида конного спорта, возраста или типа высшей нервной деятельности, объективным критерием физиологической оценки общей работоспособности спортивных лошадей при анаэробной нагрузке считается показатель частоты сердечных сокращений, величина которого измеряется в уд/мин. Частота сердечных сокращений на уровне порога анаэробного энергообеспечения у подготовленных турнирных лошадей будет варьироваться в диапазоне от 185 до 207 уд/мин.



Составление плана физической нагрузки в индивидуальной аэробно-анаэробной зоне ее энергообеспечения является главным фактором достижения тренировочного эффекта у спортивных лошадей. Диапазон значений частоты сердечных сокращений (ЧСС) между порогом анаэробного и аэробного метаболизма у спортивных лошадей составляет  $21,5 \pm 2,8$  уд/мин [12].

8) Оценка работоспособности лошадей с помощью измерения гематологических показателей.

Множество исследовательских работ установили связь между показателями крови и функциональным состоянием двигательного анализатора. Оксигемометр – прибор показывающий уровень насыщения крови кислородом. Для данного метода используют отражательный кюветный оксигемометр оснащенный процентной шкалой и стрелочным гальванометром, который представляет собой фотоэлектрический прибор для фиксирования степени оксигенации в гематологических пробах.

В основе работы прибора лежит принцип, основанный на фиксирование интенсивности света, с помощью селенового фотоэлемента, который отражается от слоя крови. Прибор работает от сети переменного тока напряжением в 127 или 220 В. В эксперименте используют три кюветы: 2 контрольные кюветы с эталонными стеклами для установки шкалы; и 1 опытная кювета в которую помещают пробу крови, для дальнейшего измерения степени насыщения кислородом.

Материалом исследования служит 2-3 мл крови лошади. Пробу венозной крови берут из яремной вены. Для устранения свертывания крови и контакта с воздухом пробу вводят под вазелин в пробирку, в которой находится антикоагулянт (30%-ный раствор оксалата калия из расчета 0,01 мл на 1 мл крови), сразу же его перемешивают с помощью стеклянной палочки. Также для данной цели можно использовать гепарин, для работы на данном приборе антикоагулянт не должен искажать показания насыщения крови кислородом.

Для проведения измерений необходима разбавляющая смесь. В состав смеси входят следующие реактивы: натрий хлористый - 2,0 г; натрий салициловокислый - 0,3 г; дистиллированная вода до 100,0 г. В однограммовый шприц набирают 0,5 мл разбавляющей смеси, затем из пробирки из-под вазелинового масла набирают 0,5 мл крови. Кровь и разбавляющую смесь тщательно смешивают, встряхивая шприц. Затем, отбросив из иглы шприца 2-3 капли, кровь вводят в опытную кювету. Далее кювету помещают в соответствующую ячейку прибора. Через 30 секунд опытную кювету с кровью помещают над осветителем, стрелка гальванометра отклоняется, и по шкале отсчитывают показания прибора. Процесс измерения кислородного насыщения крови в оксигемометрических приборах вместе с подготовкой занимает не более трех минут. Перед началом работы прибор прогревают в течение 15 мин и проверяют установку шкалы по кюветам с эталонными стеклами. При колебании в сети в пределах  $\pm 10\%$  возможна погрешность показания по шкале прибора  $\pm 1\%$  насыщения.

Традиционно количество лейкоцитов и эритроцитов подсчитывали с помощью микроскопа в камере Горяева, количество гемоглобина определяли по гемометру Салли, данный способ является трудоемким и кропотливым. За последние несколько лет данная работа существенно упростилась, за счет применения специального фотоэлектрического прибора – эритрогемометра. Работа эритрогемометра основана на фотоэлектрическом замере уровня уменьшения света в выбранной спектральной области взвесью эритроцитов и раствором гемоглобина. Определяют число эритроцитов в инфракрасной области спектра, а количество гемоглобина - в зеленой области спектра. Число эритроцитов измеряют во взвеси с разведением 1/700, в котором 20 мм<sup>3</sup> исследуемой крови взяты на 14 см<sup>3</sup> рабочего раствора: 35 г химически чистой поваренной соли (NaCl) в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Количество гемоглобина измеряют в растворе с разведением 1/125, в котором 40 мм<sup>3</sup> исследуемой крови взяты на 5 см<sup>3</sup> рабочего раствора: 1 г углекислой соды на 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Прозрачную кювету с

исследуемой жидкостью помещают в специальное гнездо прибора, через которую проходит поток света от лампы накаливания. Красный или зеленый фильтры помещают на пути светового потока. Световой поток, проходя через фильтр и кювету с жидкостью, попадает на фотоэлемент. Величину возникающего при этом фототока измеряют с помощью компенсационной схемы, она связана с количеством гемоглобина и числом эритроцитов определенной зависимостью. На отсчетном диске прибора три шкалы: I - шкала гемоглобина от 4 до 18 г %, II - эритроцитов от  $2 \cdot 10^6$  до  $7 \cdot 10^6$  в 1 мкл крови, III - шкала для установки и контроля. Если показания не укладываются в шкалу, особенно при определении числа эритроцитов, то имеющуюся взвесь крови разбавляют в 2 раза. Погрешность прибора составляет  $\pm 0,4$  г % гемоглобина и до  $\pm 15\%$  числа эритроцитов. Время исследования одной пробы 3 мин. При работе с оксигемометром и эритрогемометром можно использовать одну и ту же пробу крови. Эти приборы просты в обращении и транспортабельны, что позволяет широко использовать их в коннозаводческой практике.

Максимальное развитие кислородтранспортной функции крови, хорошая тренированность и высокая работоспособность характерны для лошадей в периоды сбалансированного функционального взаимодействия нервных процессов в их двигательном анализаторе, то есть при высокой и достаточной активности возбуждательного и тормозного процессов.

Преобладание активности тормозного процесса в сочетании с низким уровнем гематологических показателей указывает на недостаточную подготовленность лошади к интенсивной мышечной деятельности. Преобладание активности возбуждательного процесса, связанное с низкими гематологическими показателями и снижающейся работоспособностью, свидетельствует о ее перетренированности. Это состояние, как правило, наблюдается во второй половине скакового сезона [7].

Таким образом, способы оценки тренированности лошадей подразделяются на: оценку по экстерьерно-конституциональным особенностям и оценку по физиологическим показателям.

К методу оценки по экстерьерно-конституциональным особенностям относится: изучение внешнего вида животного, изучение тонуса мышц лошадей, оценка резвости при проведении испытаний. Преимуществом данных методов является то, что для оценки не требуется специальное оборудование, недостаток – неточность оценки функционального состояния животного, отражающего степень его тренированности.

Таким образом, методы оценки работоспособности лошадей по физиологическим показателям включают в себя: измерения состояния функций дыхания, сердечно-сосудистой системы, двигательных анализаторов, костей, кожи. Преимущество методов – точность измерений, недостатки – инвазивность, требуют много времени, необходимость использования дорогостоящих химических реактивов и лабораторного оборудования.

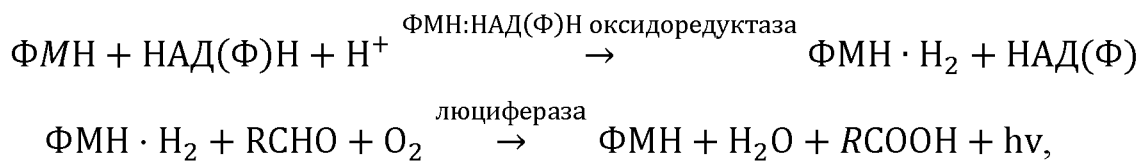
### 1.3 Биолюминесценция как метод тестирования

Биолюминесценция – способность живых организмов светиться, достигаемая самостоятельно или с помощью симбионтов. Биолюминесценция основывается на химических процессах, при которых освобождающаяся энергия выделяется в форме света [4].

Химической основой биолюминесценции бактерий является реакция окисления, восстановленного флавинмоноклеотида ( $FMNH_2$ ) и длинноцепочечного алифатического альдегида молекулярным кислородом, катализируемая ферментом – люциферазой. Продуктами реакции являются соответствующая альдегиду карбоновая кислота, окисленный флавинмоноклеотид, вода и свет видимой области спектра [18].

Биолюминесценция – это результат специфической биохимической реакции окисления, ускоряемой ферментом флавин-монооксигеназой

(люциферазой). Постоянный приток восстановленного флавина для биоломинесцентной реакции обеспечивается NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазой, что представлено на схеме:



где FMN·H<sub>2</sub>- восстановленная форма флавинмоноуклеотида; FMN - окисленная форма флавинмоноуклеотида; R-CHO - алифатический длинноцепочечный альдегид; R-COOH – жирная кислота, соответствующая алифатическому длинноцепочечному альдегиду; hν - излучаемый свет.

Люминесценция бактерий обеспечивается действием фермента люциферазы в отличие от свечения некоторых беспозвоночных организмов (светляков, земляного червя *Diplocardia*, некоторых кишечнополостных), которое является следствием окисления субстрата – люциферина. Химические превращения субстратов люциферазной реакции приводят к образованию промежуточного электронно-возбужденного фермент-субстратного комплекса и эмиссии кванта на последней ступени процесса. Люциферазы и люциферины разных организмов различаются структурно и химическим процессом образования возбужденного продукта. Люцифераза светящихся бактерий катализирует окисление молекулярным кислородом восстановленного флавина FMN·H<sub>2</sub> и длинноцепочечного альдегида RCHO в окисленный флавин FMN и в соответствующую длинноцепочечную жирную кислоту RCOOH. Люминесцентная система у светящихся бактерий рассматривается как альтернативный электрон-транспортный путь, конкурентный цепи дыхательной системы. На флавиновом участке цепи переноса электронов люминесцентная система тесно связана с дыхательной цепью, и ответвление от дыхательной цепи происходит на уровне

восстановленного флавина. В дальнейшем биолюминесцентная реакция не связана с дыханием.

В качестве тест-системы бактериальную люминесценцию широко используют в биотестировании для первичной интегральной экспресс-оценки токсичности различных химических веществ, их смесей, физических факторов и объектов окружающей среды [17].

В аналитической практике для определения интегральной токсичности ксенобиотиков по изменению интенсивности свечения бактерий используют общепринятые показатели: Т – индекс токсичности и ЕС (effective concentration) – эффективные концентрации. Величина ЕС20 – концентрация известного вещества, приводящая в опыте к 20%-ному тушению свечения бактерий по сравнению с контролем. Эта величина является пороговым показателем токсичности ксенобиотика. Интенсивность свечения биотеста ниже ЕС20 характеризует анализируемый ксенобиотик в исследуемом образце как нетоксичный. Величина ЕС50 (50%-ное тушение свечения бактерий) характеризует острую токсичность ксенобиотика. Величины больше ЕС50 характеризуют исследуемые образцы как очень токсичные.

Количественную оценку токсичности проводят, вычисляя индекс токсичности (Т) по формуле:

$$T = 100 \times (I_0 - I) / I_0,$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность свечения контроля и опыта соответственно при фиксированном времени экспозиции контрольного и опытного образцов. Опытные образцы по степени токсичности разделяют на три группы:

- 1) значение Т меньше 20 – образец нетоксичен;
- 2) значение Т от 20 до 50 – образец токсичен;
- 3) значение Т равно или больше 50 – образец очень токсичен.

Есть вещества, которые полностью тушат люминесценцию бактерий, но клетки биотеста при этом не гибнут. Иногда наблюдают стимуляцию свечения

биосенсора, превышающую интенсивность свечения в контроле, то есть величина  $T$  отрицательна. Механизм стимуляции биолюминесценции токсикантом до сих пор неясен. Стимуляция свечения биосенсора затрудняет интерпретацию оценки токсичности. В таких случаях в рекомендациях к анализам предлагают делать вывод об отсутствии токсичности малых доз образца. Одним из объяснений этого эффекта может быть конкуренция за восстановленный флаavin между дыхательной и люминесцентной системами в их начальной цепи переноса электронов, возможно, при низких концентрациях ксенобиотиков в первую очередь реагирует дыхательная цепь. Соответственно, поток электронов эквивалентно возрастает в цепи люминесцентной системы, и, следовательно, свечение бактерий увеличивается в опытных образцах относительно контроля. При этом определяемый в исследуемом образце индекс токсичности химического соединения имеет отрицательное значение [3, 16].

Для быстрого биолюминесцентного тестирования в качестве тест-объекта используют препараты лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные системы из этих бактерий серии «Энзимоллюм».

Многокомпонентный иммобилизованный реагент «Энзимоллюм» представляет собой высушенный диск диаметром 6 мм, сухой вес  $1,5 \pm 0,2$  мг. Процедура получения иммобилизованного многокомпонентного реагента «Энзимоллюм» заключается в следующем: суспензию крахмала нагревают до полного растворения, охлаждают до температуры  $25^\circ\text{C}$ , последовательно вносят ферменты – люциферазу, NADH:FMN-оксидоредуктазу, а также их субстраты – NADH и тетрадеканаль, интенсивно перемешивают. Далее, с использованием автоматической станции пробоподготовки («Eppendorf», Германия) дозируют полученную смесь и высушивают при  $40^\circ\text{C}$  [4].

Перспективность применения биолюминесцентных методов исследования определяется несколькими факторами:

1. Конечным продуктом люциферазной реакции является свет, который легко с большой точностью измеряется при помощи современной электронно-

оптической техники. Пределы обнаружения АТФ и НАДН составляют соответственно 10<sup>-10</sup> и 10<sup>-16</sup> моль/л.

2. Билюминесцентный анализ НАДН обладает в 25000 раз более высокой чувствительностью по сравнению со спектрофотометрией;

3. В основе светоизлучения лежат ферментативные реакции, что определяет специфичность метода;

4. Экспрессность и высокая чувствительность метода позволяет проводить исследования в микрообразцах биологического материала с минимальным количеством реактивов. Это может снизить стоимость билюминесцентного исследования и позволяет применить билюминесцентный метод в клинической практике [2, 14].

Перечисленные преимущества билюминесцентных методов определяют ценность их применения в медико-биологических исследованиях для выявления и тестирования различных метаболических параметров, имеющих диагностическую и прогностическую значимость [2].

Таким образом, явление билюминесценции может быть использовано в основе технологий, для которых необходима визуализация определённых процессов. В область применения таких технологий входит определение состояния окружающей среды, уровня безопасности пищевых продуктов, осуществление медицинской диагностики и другие. Теоретическими преимуществами использования билюминесцентных аналитических методов является высокая скорость, простота использования и дешевизна тестирования. Определяющим фактором создания таких технологий является высокий уровень изученности явления билюминесценции [21, 24].



## **Глава 2 Материалы и методы**

Страницы с 25 по 32 изъяты в связи с авторским правом.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Викулова, Л. Л. Выявление и анализ качественных зависимостей между признаками экстерьера и работоспособностью лошадей чистокровной верховой породы: автореф. дисс... канд. с.-х. наук: 06.02.01 / Викулова Лариса Леонидовна. – ВНИИК, 2000. – 116 с.
2. Гительзон, И. И. Перспективы применения билюминесцентных методов в медицине / И. И. Гительзон, Т. П. Сандалова // Врачебное дело. – 1990. – Т. 9. – С. 31–34.
3. Дерябин, Д. Г. Бактериальная билюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты: книга / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 245 с.
4. Дерябин, Д. Г. Особенности использования билюминесцентных тест-систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей / Д. Г. Дерябин, Е. Г. Поляков, И. Ф. Каримов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2004. – № 5. – 155 с.
5. Есимбекова, Е. Н. Билюминесцентный экспресс-метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха / Е. Н. Есимбекова, Н. В. Римацкая, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – № 10. – 159–163 с.
6. Калашников, В. В. Кормление лошадей: учебник: [для вузов по направлению подготовки "Зоотехния" и "Ветеринария"] / В. В. Калашников, И. Ф. Драганов, В. Г. Мемедейкин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 244 с.
7. Ласков, А. А. Тренинг и испытания скаковых лошадей / А. А. Ласков, А. В. Афанасьев, О. А. Балакшин, Э. М. Пэрн. – М.: Колос, 1982. – 222 с.
8. Мамаев, А. В. Способ оценки резвостной работоспособности лошадей по физиологическому показателю / А. В. Мамаев, Л. Д. Илюшина, К. А. Лещуков // Описание изобретения к патенту Российской Федерации. – Иркутск, 2001. – № 12. – С. 14–17.

9. Михайлов, С. С. Слюна как объект биохимического контроля в спорте / С. С. Михайлов, Е. В. Розенгарт // Ученые записки университета им. ПФ Лесгафта. – 2008. – №. 6. – С. 14–20.
10. Никитина, Д. А. Взаимосвязь типа высшей нервной деятельности с работоспособностью лошадей русской верховой породы: автореф. дисс... канд. с.-х. наук: 06.02.01 / Никитина Дарья Алексеева. – МСХА, 2011. – 16 с.
11. Пашкова, О. Н. Методы функционального тестирования спортивных лошадей для определения уровня работоспособности (кардиомониторинг) / О. Н. Пашкова, Г.Ф. Сергиенко // Коневодство и конный спорт. – 2018. – № 6. – С. 38–39.
12. Пашкова, О. Н. Использование кардиомонитора для регистрации ЧСС и скорости движения спортивных лошадей / О. Н. Пашкова, Г. Ф. Сергиенко // Коневодство и конный спорт. – 2016. – № 3. – С. 14–16.
13. Полтырев, С. С. Физиология пищеварения / С. С. Полтырёв. – М., 1980. – 218 с.
14. Сорокина, Е. В. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода / Е. В. Сорокина, А. П. Зарубина // Успехи современной биологии. – 2017. – Т. 137. – № 6. – С. 613–620.
15. Тарасенко, Л. М. Биохимия органов полости рта / Л. М. Тарасенко, К. С. Непорада. – Полтава: Полтавский МБВ, 2008. – 70 с.
16. Трутяева А. С. Применение метода биолюминесценции для оценки качества воды // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – №. 5 (205). - С. 39–40.
17. Шиманская, Е. И. Оценка биотоксичности природных вод урбанизированных территорий / Е. И. Шиманская // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 6. – С. 65–66.

18. Brodl, E. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence / E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux // *Computational and structural biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – P. 551–564.
19. Contreras-Aguilar, M. D. Changes in saliva analyses in equine acute abdominal disease: a sialo chemistry approach / M. D. Contreras-Aguilar // *BMC veterinary research*. – 2019. – V. 15. – № 1. – 187 p.
20. Gregić, M. The Effect of Horse Age and Competitive Season on Stress Indicators in Jumping Horses in Running Track / M. Gregić // *Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry*. – Springer, Cham. - 2019. – P. 185–190.
21. Kratasyuk, V. A. Polymer immobilized Bioluminescent systems for biosensors and bio investigations / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // *Citus Books*. – London, 2003. – P. 307–343
22. Munk, R. An exploratory study of competition scores and salivary cortisol concentrations in Warmblood horses / R. Munk, R. B. Jensen, R. Palme // *Domestic Animal Endocrinology*. – 2017. – № 61. – P. 108–116.
23. Sizova, E. Comparative characteristic of toxicity of nanoparticles using the test of bacterial bioluminescence / E. Sizova // *OSPC-Biosciences, Biotechnology Research Asia*. – 2015. – T. 12. – 361 p.
24. Vetrova, E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. A. Vetrova // *Luminescence* – 2007. – V. 22. – № 3. – P. 206–214.
25. Yausheva, E. Evaluation of biogenic characteristics of iron nanoparticles and its alloys in vitro / E. Yausheva, E. Sizova, S. Miroshnikov // *Modern Applied Science*. – 2015. – V. 9. – № 10. – 65 p.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк

« 19 » июня 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 – Биология**

Биолюминесцентное тестирование слюны лошадей: перспективы  
использования

Руководитель

В.В. Степанова 21.06.21  
подпись, дата

доцент, канд. биол. наук  
должность, ученая степень

Л.В. Степанова

Выпускник

В.Е. Мартын 21.06.21  
подпись, дата

В.Е. Мартын

Красноярск 2021