



**Рязанцев Никита Валерьевич**, ассистент кафедры «Защита растений и плодовоовощеводство», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Россия.

**Рябушкин Юрий Борисович**, д-р с.-х. наук, проф. кафедры «Защита растений и плодовоовощеводство», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Россия.

**Еськов Иван Дмитриевич**, д-р с.-х. наук, проф., зав. кафедрой «Защита растений и плодовоовощеводство», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Россия.

410012, г. Саратов, Театральная пл., 1.

Тел.: (8452) 26-16-28.

**Морозова Светлана Владимировна**, канд. геогр. наук, доцент кафедры «Метеорология и климатология», Саратовский государственный научный исследовательский университет имени Н.Г. Чернышевского.

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

Тел.: (8452) 26-16-96.

**Ключевые слова:** виноград; сорт; оидиум; макроскопическая диагностика; эпифитотия; устойчивость; толерантность.

## EFFECT OF WEATHER CONDITIONS ON THE DEVELOPMENT OF GRAPE OIDIUM IN THE STEPPE ZONE OF THE LOWER VOLGA REGION

**Ryazantsev Nikita Valeryevich**, Assistant of the chair "Plant Protection and Horticulture", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Russia.

**Ryabushkin Yuriy Borisovich**, Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the "Plant Protection and Horticulture", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Russia.

**Eskov Ivan Dmitrievich**, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the chair "Plant Protection and Horticulture", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Russia.

**Morozova Svetlana Vladimirovna**, Candidate of Geographical Sciences, Associate Professor of the chair "Meteorology and Climatology", Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Russia.

**Keywords:** grape; variety; oidium; macroscopic diagnostics; epiphytity; resistance; tolerance.

*The peculiarities of the oidium spread in the steppe zone of the Lower Volga re-gion were studied on 33 grape varieties taking into account the weather conditions of this region. It has been shown that two of seven years of research were charac-terized by oidium epidhytotics,*

*two years - by the disease of medium severity, and three years - by the mild case. The most favorable weather conditions for the disease development are identified. A macroscopic study of oidium spread has shown that different varieties of grape have different resistance to the causative agent of the disease. The following groups of varieties were identified: unstable – Zhem-chug Saba, MadLen Anzhevin, Shasla belaya; medium resistant - Aleshenkin, Bul-garia, Victoria, Ukraina, Tsvetochnyi; tolerant - Bianca; Kishmish Mirazh, Levokumsky ustoychivyi, Muscat letniy; highly resistant - Augustine, Arcadia, Vostorg, Vostorg Idealnyi, Vostorg krasniy, Vostorg cherniy, GF 14-75, Kantemirovsky, Kobzar, Korinka Russkaya, Lucy Belaya, Pamyati Negrulya, European Pleven, Smuglyanka Moldavskaya, Talisman, Ezop; very highly resistant - Bako cherniy, Kishmish Hungarian, Lediya, Nectarniy, Severniy Plechistic. For industrial culti-vation in the steppe zone of the Lower Volga region, varieties characterized by in-creased oidium resistance are recommended.*

УДК 619:616-07

## ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ИЗ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ

**СТРУЧКОВ Николай Афанасьевич**, Якутская государственная сельскохозяйственная академия

**НИФОНТОВ Константин Револьевич**, Якутская государственная сельскохозяйственная академия

**СИДОРОВ Михаил Николаевич**, Якутская государственная сельскохозяйственная академия

**АЛЕКСЕЕВА Нюргина Илларионовна**, Якутская государственная сельскохозяйственная академия

*Описаны способы получения внеклеточного матрикса (ВКМ) из органов сельскохозяйственных животных. Методом гистологического анализа проверено качество полученного геля, порошка и пластины.*

**Введение.** Изучение внеклеточного матрикса и его компонентов – одно из важных направлений в биохимии и клеточной биологии. Заместительная тканевая терапия развивалась на основе изучения процессов, происходящих при регенерации тканей и органов [4, 5]. Во многих исследованиях показана особенность децеллюляризованного внеклеточного матрикса, полученного по различным технологиям из разных источников, способствовать хемотаксису, миграции и дифференцировке клеток, а также ремоделированию собственных тканей организма [10–12].

Использование матриксов связано с тем, что для успешного лечения клеткам необходим субстрат, на

котором они могут закрепиться или в виде суспензии клеток в гелях, или в виде моно- или многослой на каркасах. Матрикс должны обеспечивать поступление питательных веществ к клеткам и удаление продуктов жизнедеятельности, обладать нужными физико-механическими свойствами для поддержки целостности клеток и тканей в течение всего периода имплантации [7–9].

К преимуществам гелевых форм матриксов относится большая гидратированность материалов, которая позволяет питательным веществам, газам и отходам жизнедеятельности диффундировать по всему объему матрикса, хорошая биосовместимость,



меньшая травматичность при внесении в место имплантации [2]. Некоторые авторы склоняются к использованию синтетических материалов, однако они обладают недостатками – не повторяют пространственную архитектуру, а также не способны сохранять и поддерживать биологическую активность [3].

Внеклеточный матрикс в основном получают из органов сельскохозяйственных животных и человека. Для децеллюляризации подвергаются все органы животного, но необходимо подбирать или подстраивать протоколы для определенного размера и вида органа.

Цель данной работы – получение и исследование ВКМ, а также апробация методики оценки его качества при перфузионной децеллюляризации целых органов.

**Методика исследований.** Для реализации поставленной цели были определены следующие основные задачи:

получение продукта на основе ВКМ из мочевого пузыря северного оленя; из сердца и мочевого пузыря свиньи;

получение экспериментального образца ВКМ.

Для исследования использовали органы северного оленя и свиньи из ООО «Хатасский свиноплекс». Материалом для получения ВКМ в виде геля послужил мочевой пузырь северного оленя. Порошок на основе внеклеточного матрикса получали из сердца свиньи. Децеллюляризованный орган в виде пластины получали из мочевого пузыря свиньи.

Оценку качества ВКМ осуществляли с помощью гистологических исследований. Именно гистологический анализ позволяет удостовериться, полностью ли очищены клетки от ядра и клеточного содержимого. В первый день из полученных материалов изъяли образцы размером около 0,7–1,0 см, фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине в течение суток [3, 4]. Затем образцы помещали в 75%-й спирт от 2 ч до суток, потом в 96%-й и в завершение в 100%-й спирт. На второй день использовали хлороформ в течение суток.

На финальной стадии получения гистопроб использовали парафин, расплавленный с хлороформом, их хранили в течение нескольких часов в термостате при постоянной температуре 37 °С; остывали при комнатной температуре. Полученные парафиновые кубики с гистопробами резали на микротоме на 5 мкм. Гистопрепараты окрашивали гематоксилином и эозином и рассматривали на электронном микроскопе.



Рис. 1. ВКМ в виде геля

**Результаты исследований.** Получение ВКМ в виде геля из мочевого пузыря северного оленя. Мочевой пузырь хранили несколько месяцев в морозильнике при –70 °С в специальном контейнере. После тщательной очистки полученный тонкий слой ткани из внутренней части пузыря несколько раз отмывали дистиллированной водой, а для дезинфекции применяли 70%-й спирт. Затем помещали в сосуд с дистиллированной водой на 30 мин, автоматически смешивая с помощью шейкера. После орган помещали в раствор с 1 × PBS, 1 × SDS и с антибиотиком 1% pen/street на 24 ч. Антибиотик использовали для того, чтобы в органе не развивалась бактериальная микрофлора. После очистки в специальных растворах орган промывали дистиллированной водой в течение 5 ч. Исходные материалы ВКМ из мочевого пузыря помещали в морозильник при –70° С на ночь.

Полученные материалы после заморозки помещали в вакуум для лиофилирования на 12–72 ч. После этого использовали растворы 0,01 N HCL и пепсин. Для получения 50 мл геля нам потребовалось около 50 мл 0,01 N HCL, 0,1 пепсина при 500 мг порошка из оленьего мочевого пузыря. Раствор оставляли при постоянном смешивании на магнитном смесителе в течение 24 ч и более [1].

В результате проведенной децеллюляризации мочевого пузыря оленя было получено серое желеобразное вещество, которое требовало тщательного хранения с соблюдением точной температуры (рис. 1).

**Получение порошка на основе ВКМ из сердца свиньи.** От сердца отделяли жир и соединительные ткани, желудочки промывали водой от крови. Сердце было заморожено при –70 °С в течение 16 ч для хранения и лизиса клеток. Затем его оттаивали в проточной воде при комнатной температуре. В аорту вставляли силиконовый шланг. После этого сердце помещали в химический стакан, содержащий 2 л дистиллированной воды, для рециркуляции с помощью перистальтического насоса в течение 15–20 мин. На следующем этапе заменяли дистиллированную воду на буферный раствор 2×PBS (фосфатный буферный раствор) – 10 мин 2 раза при скорости 700 мл/мин, т. е. 90 оборотов, после чего меняли буферный раствор на дистиллированную воду – 10 мин при скорости 750 мл/мин – 95 оборотов.

На 2 л воды использовали 0,02%-й трипсин (Trypsin) – 0,4 мг; 0,05%-й EDTA – 3,3 мл; 0,05%-й NaN<sup>3</sup> (азид натрия) – 1 мг. Нагревали до 37 °С на водяной бане с перфузией через перистальтический насос в течение 3 ч, скорость которого меняли через каждый пройденный час. В первый час скорость подачи раствора была 1200 мл/мин (115 оборотов), во второй час – 1500 мл/мин (150 оборотов), а в третий час – 1800 мл/мин (165 оборотов). После этого сердце промывали дистиллированной водой в течение 10 мин при скорости 1900 мл/мин (180 оборотов). Затем промывали 2 × PBS (фосфорным буферным раствором) в течение 10 мин при скорости 1950 мл/мин (195 оборотов). Для полной децеллюляризации провели перфузию: Triton X-100 в течение 2 ч при скорости подачи раствора 2000 мл/мин (200 оборотов), затем



заменяли на свежий Triton X-100 – 1,5 ч при скорости 2100 мл/мин (210 оборотов).

Сердце от не ионного моющего средства промывали в дистиллированной воде в течение 10 мин при скорости подачи воды через перфузионный насос 2150 мл/мин (215 оборотов). Затем промывали в буферном растворе 2 × PBS в течение 10 мин при скорости 2150 мл/мин (215 оборотов). После этого использовали перфузию с 4 % Na Deocholate (деоксихолат натрия), на 2 л дистиллированной воды 80 г. Полученный раствор добавили в химический стакан с сердцем и проводили перфузию в течение 3 ч при скорости 2200 мл/мин – (220 оборотов). После каждого химического раствора использовали в качестве перфузата дистиллированную воду и буферный фосфорный раствор в течение 15 мин без рециркуляции и с последующей рециркуляцией для лизиса клеток и удаления клеточных и химических остатков.

Дезинфекция была достигнута путем перфузии 0,1%-й надуксусной кислоты и 4%-м этанолом в течение 1,5 ч при скорости 2200 мл/мин (220 оборотов). Кислоту нейтрализовали и удалили остатки из ВКМ путем перфузии с 1×PBS при скорости насоса 2200 мл/мин (220 оборотов) и дистиллированной водой 2 раза по 5 мин при скорости подачи раствора 2200 мл/мин (220 оборотов). Для подтверждения «чистоты» сердца от клеток брали пробы на ДНК, ИНС, ГАГ – кусочки децеллюляризованного органа, замороженные при –20 °С. После сердце заморозили при –70 °С на ночь и на следующий день лиофили-

зировали в вакууме в течение 3 дней, после чего измельчили в специальном аппарате (до порошка) с добавлением жидкого азота. После проведения лабораторных работ с сердцем свиньи был получен готовый порошок ВКМ (рис. 2). В начале работы сердце взвешивали, его масса составляла 425 г, после децеллюляризации – 210 г, т.е. половину от исходной массы (рис. 3).



**Рис. 2. Готовый порошок ВКМ из сердца свиньи**



**Рис. 3. Процесс децеллюляризации**



**Рис. 4. Готовая пластина из мочевого пузыря свиньи**

Получение пластины из мочевого пузыря свиньи. Тщательно отделили слои для получения тонкой ткани внутреннего слоя мочевого пузыря. Материал поместили в специальную емкость с дистиллированной водой на 1 ч, при постоянном смешивании с помощью шейкера. Процесс повторили 2–3 раза, дополнительно для дезинфекции применяли 70%-й спирт в течение 5–10 мин.

После тщательной промывки материал поместили в растворы – 1 × PBS 250 мл с 3%-м Triton X-100 – 7 мл, антибиотиком 1%-м pen/street – 0,5 мл и дистиллированной водой – 250 мл на 24 ч при постоянном смешивании на шейкере. Чтобы очистить от остатка растворов, материал еще несколько раз промывали дистиллированной водой в течение нескольких часов [1, 2]. Затем поместили на ночь в морозильник и выдерживали при –70 °С. Полностью замороженный материал помещали в вакуум для получения конечного продукта ВКМ. Таким образом получили децеллюляризованный орган из мочевого пузыря свиньи с изготовлением конечного продукта в виде пластины (рис. 4).

**Заключение.** Путем описанных способов мы получили продукт на основе ВКМ из мочевого пузыря северного оленя и из сердца и мочевого пузыря свиньи. Для подтверждения качества проведенных работ и оценки «чистоты» клеток от ядра и клеточного содержимого применяли специальное гистологическое исследование. Оно показало, что выведенный внеклеточный матрикс из свиного сердца и мочевого пузыря готов к использованию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трехмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 8–26.
2. Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс // Гены и клетки. – 2012. – № 4. – Т. 7. – С. 20–27.
3. Иванов С.В., Иванов И.С., Должников А.А. Морфология тканей при использовании протезов из полипропилена и политетрафлена // Анналы хирургии. – 2009. – № 3. – С. 59–64.
4. Николаева Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии // Журнал Сибирского Федерального Университета. Серия: биология. – 2014. – № 2. – Т. 7. – С. 222–233.
5. Носик А.Г., Воронкина И.В., Юдинцева Н.И. Сравнительный анализ ВКМ, синтезируемого фибробластами различного происхождения // Царскосельские чтения. – 2012. – № 16. – С. 226–229.
6. Смоленцев С.Ю., Романюк В., Винницкий С. Гистологическая картина в паренхиматозных органах свиней и крупного рогатого скота при применении лечебно-профилактического иммуноглобулина // Вестник Марийского государственного университета. – 2013. – № 11. – С. 13–16.
7. Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Гилевич И.В. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – № 3. – С. 86–94.
8. Тканевые матрицы клапанов сердца: состо-

яние проблемы и перспективы / П.П. Яблонский [и др.] // Вестник СПбГУ. – 2016. – № 11(2). – С. 51–61.

9. Черных А.В., Малеев Ю.В., Шевцов А.Н. К вопросу о получении внеклеточных матричных каркасов методом перфузионной децеллюляризации // Вестник новых медицинских технологий. – 2016. – № 3. – С. 149–156.

10. Badylak S.F., Gilbert T.W. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // Biomaterials. 2011, Vol. 32, No. 12, pp. 3233–3243.

11. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function // Acta Biomater, 2009, P. 25.

12. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Decellularization and recellularization of three – dimensional matrix scaffolds // Whole – Organ tissue Engineering Annu Rev. Biomed., 2011, P. 20.

**Стручков Николай Афанасьевич**, канд. вет. наук,

доцент кафедры «Внутренние незаразные болезни, фармакология и акушерство» имени профессора Г.П. Сердцева, Якутская государственная сельскохозяйственная академия. Россия.

**Нифонтов Константин Револьевич**, канд. вет. наук, доцент кафедры «Внутренние незаразные болезни, фармакология и акушерство» имени профессора Г.П. Сердцева, Якутская государственная сельскохозяйственная академия. Россия.

**Сидоров Михаил Николаевич**, канд. вет. наук, доцент кафедры «Ветеринарно-санитарная экспертиза и гигиена», Якутская государственная сельскохозяйственная академия. Россия.

**Алексеева Нюргина Илларионовна**, ассистент кафедры «Внутренние незаразные болезни, фармакология и акушерство» имени профессора Г.П. Сердцева, Якутская государственная сельскохозяйственная академия. Россия.

677077, г. Якутск, ул. Чайковского, 32/1.  
Тел.: +79148212703.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия; внеклеточный матрикс; органы; биотехнология.

## EXTRACELLULAR MATRIKS'S (ECM) RECEIVING FROM BODIES OF ANIMALS

**Struchkov Nikolai Afanasyevich**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the chair “Internal Non-communicable Diseases, Pharmacology and Obstetrics named after Prof. G.P. Serdtsev”, Yakut State Agricultural Academy. Russia.

**Nifontov Konstantin Revolyevich**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the chair “Internal Non-communicable Diseases, Pharmacology and Obstetrics named after Prof. G.P. Serdtsev”, Yakut State Agricultural Academy. Russia.

**Sidorov Mikhail Nikolaevich**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the chair “Veterinary-sanitary Examination and Hygiene”, Yakutsk State Agricultural Academy. Russia.

**Alekseeva Nyurgina Illarionovna**, Assistant of the chair “Internal Non-communicable Diseases, Pharmacology and Obstetrics named after Prof. G.P. Serdtsev”, Yakut State Agricultural Academy. Russia.

**Keywords:** tissue engineering; extracellular matrix; organs; biotechnology.

**Methods for obtaining extracellular matrix from the organs of farm animals are described. The quality of the obtained powder and gel was checked by the method of histological analysis.**

УДК 636.084.22:637.04

## ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ РАСЩЕПЛЯЕМОСТИ ПРОТЕИНА КОРМОВ С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

**ФАТТАХОВА Зиля Фидаилевна**, ТамНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН

**ШАРАФУТДИНОВ Газимзян Салимович**, Казанский государственный аграрный университет

**ШАКИРОВ Шамиль Касымович**, ТамНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН

Один из подходов решения проблемы кормового протеина в молочном скотоводстве – повышение эффективности усвоения ингредиентов кормов в многокамерном желудке жвачных. Это возможно путем целенаправленного изменения этих процессов методом соответствующего подбора кормов со сбалансированным соотношением в них питательных веществ, а также применения специальных препаратов, обеспечивающих оптимизацию микробной ферментации корма. Были поставлены научно-хозяйственные опыты по изучению влияния регуляторов рубцового пищеварения «И-Сак 1026» и «Новатан 50», вводимых в рационы коров в период раздоя, на молочную продуктивность. Установлено, что применение данных препаратов привело к положительному сдвигу в регуляции соотношения уровня расщепляемого и нерасщепляемого протеина кормов в рационе и росту молочной продуктивности. Использование «И-Сак 1026» и «Новатан 50» увеличивает среднесуточные удои в пересчете на базисную жирность соответственно на 16,0 и 13,3 % при одновременной оптимизации качественного состава молока. Также повышалась массовая доля жира и белка в молоке на 0,14 и 0,24 % в абсолютных величинах и на 0,13 и 0,05 % соответственно по сравнению с контролем.

**Введение.** Актуальной проблемой развития молочного скотоводства в современных условиях является повышение эффективности гидролиза и всасывания питательных веществ в организме лактирующих коров. Решение этого вопроса должно осуществляться с учетом физиологических особеннос-

тей пищеварения жвачных животных, прежде всего, особенностей переваривания и всасывания протеина кормов [3, 7, 9 12, 15]. Согласно современным представлениям, в физиологии кормления жвачных степень расщепляемости протеина в рубце рассматривается как главный критерий оценки качества

