

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент ветеринарии
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
(ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)



Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Международной научно-практической конференции,
посвящённой памяти профессора Х.Х. Абдуллина
(28-29 ноября 2024 г.)



Казань
2024

УДК 619(063)
ББК 48
ISBN 978-5-6047892-0-9

Редакционная коллегия:

*Мингалеев Д.Н., Ефимова М.А., Зайнуллин Л.И., Яруллин А.И.,
Семенов Э.И., Вагин К.Н., Косарев М.А.*

Компьютерная верстка: *Низамов Р.Н.*

Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК: сборник материалов Международной научно-практической конференции, посвящённой памяти профессора Х.Х. Абдуллина «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК», Казань, 28-29 ноября 2024 г. Казань, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2024. – 663 с.: ил.

В сборнике представлены материалы Международной научно-практической конференции, посвящённой памяти профессора Х.Х. Абдуллина «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК» по следующим направлениям: современные направления биологической безопасности в животноводстве; актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и биотехнологии в диагностике, терапии и профилактике заболеваний животных; актуальные проблемы радиобиологии и радиационных технологий в АПК

Ответственность за соблюдение законов об интеллектуальной собственности, достоверность приведенных сведений несут авторы публикуемых материалов. Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов. При перепечатке ссылка на сборник материалов обязательна.

© ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2024
© Авторы, 2024

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИЗОЛА В ОБРАЗЦАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, ПЛАЗМЫ, МОЛОКА И МОЧИ ДОМАШНИХ КОЗ

Ж.В. Самсонова^{1,2}, Н.Ю. Саушкин¹, А.К. Пискунов²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (ФГБОУ ВО МГУ имени М.В.Ломоносова), Химический факультет, Ленинские горы д.1, стр. 11Б, Москва, 119991, Россия, E-mail: jvsamsonova@gmail.com

²ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук» (ФГБУН ИОГен РАН), ул. Губкина, д.3, Москва, 119991, Россия

Аннотация

Определение кортизола у животных может быть использовано для оценки здоровья и стрессовых состояний, вызванных условиями содержания или влиянием окружающей среды. Проведено исследование содержания кортизола в различных биологических пробах домашних коз (*Capra hircus*), включая цельную кровь, плазму, молоко и мочу. Биологические жидкости анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в нативном состоянии, а также в высушенном на специальном пористом носителе виде. Выявленные концентрации кортизола варьировались в диапазонах 12,4 – 611 нмоль/л (n=102) для цельной крови/плазмы, 0,1 - 273 нмоль/л (n=1221) для молока и 0,7-195 нг/мл (n=30) для мочи. Проведенные эксперименты позволили составить массив данных для анализа ретроспективы стресса и проведения дальнейших исследований. Высушенные пробы показали себя удобной транспортной формой биологических образцов, позволяющие с минимальными затратами доставлять биологический материал из отдаленных территорий в лабораторию.

Ключевые слова: кортизол, ИФА, домашние козы, биологические жидкости, сухие образцы, стресс

CORTISOL DETECTION IN WHOLE BLOOD, PLASMA, MILK AND URINE SAMPLES OF DOMESTIC GOATS

J.V. Samsonova^{1,2}, N.Yu. Saushkin¹, A.K. Piskunov²

¹FSBEI HE M.V.Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU), Chemistry Faculty, Leninskie gory, 1-11B, Moscow, 119991, Russia, E-mail: jvsamsonova@gmail.com

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences (VIGG RAS), Gubkin str., 3, Moscow, 119991, Russia

Abstract

Determination of animal cortisol can be used to assess health and stress caused by housing conditions or environmental influences. In this study the cortisol concentration in various biological samples of domestic goats (*Capra hircus*), including whole blood, plasma, milk and urine was assessed. Biological fluids, native or dried on a special porous carrier, were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The detected cortisol concentrations varied in the ranges of 12.4 - 611 nmol/L (n = 102) for whole blood/plasma, 0.1 - 273 nmol/L (n = 1221) for milk and 0.7-195 ng/ml (n = 30) for urine. The results were applied for a data set creation for stress retrospective analysis and further research. Dried samples are a convenient form of biological samples transportation, allowing biological material to be delivered from remote areas to the laboratory with minimal costs.

Keywords: cortisol, ELISA, domestic goats, biological fluids, dried samples, stress

Введение. Мониторинг гормона кортизола в исследованиях животных обычно используют для выявления стрессовых реакций и угроз благополучию. Благополучие животных зависит от изменений окружающей среды, которые вызывают поведенческие и физические изменения, связанные со стрессом, и помогают им справляться с окружающей средой и быстро адаптироваться к сложным ситуациям. В сельском хозяйстве животные могут реагировать повышением уровня кортизола на такие действия как захват, удерживание, отлов, изоляция, ветеринарная обработка, транспортировка; помимо этого, воздействие токсических веществ, громкий шум и появление хищников также может провоцировать стресс [1, 2]. Поддержание высокого уровня кортизола может

способствовать иммуносупрессии, подавлению воспроизводства и атрофии тканей. Более высокий уровень кортизола может наблюдаться при старении животных или, например, отмечен для многоплодных коз по сравнению с одноплодными [3]. Обычно кортизол измеряют в крови (инвазивный метод), а также в молоке, слюне, моче, кале и волосах (неинвазивные методы) [2, 4]. При этом инвазивный отбор проб может быть связан с повышением кортизола вследствие проведения неприятных для животных манипуляций. Цель данной работы заключалась в сборе и анализе образцов различных биологических жидкостей домашних коз (*Capra hircus*) в нативном и высушенном на мембранном носителе виде для выявления наблюдаемых уровней гормона кортизола и оценке возможности использования сухих образцов для перевозки биологических проб на длинные расстояния с сохранением их свойств для последующей аналитической работы.

Материалы и методы исследований. Для проведения исследований, направленных на изучение поведения животных в условиях свободного содержания, был проведен отбор биологических жидкостей домашних коз (*Capra hircus*) (цельная кровь, плазма, молоко, моча), в том числе одновременно отбирали несколько различных биопроб от одной особи. Цельную кровь отбирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтom ЭДТА, также была показана возможность отбора образцов капиллярной крови из уха непосредственно на мембранный носитель в виде узкой полоски (рис. 1). Биологические жидкости, как то: цельную кровь, плазму крови, молоко и мочу наносили на

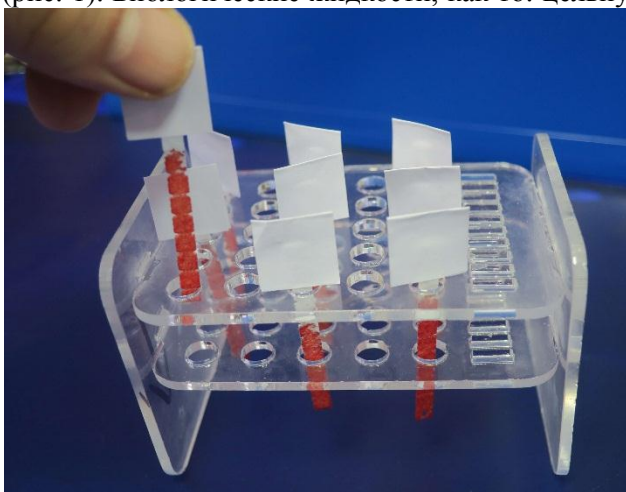


Рис.1. Общий вид стекловолокнистых стрипов с нанесенными образцами цельной крови в штативе для высушивания.

мембранные носители, высушивали при температуре окружающей среды, упаковывали в zip-пакеты с осушителем и транспортировали в лабораторию (более 150 км от места отбора проб) для хранения проб и проведения дальнейших исследований. Использовали два типа носителей для получения высушенных проб – целлюлозную мембрану, на которую капельно наносили 100 мкл пробы (высушенная зона – круг) и стекловолокнистую мембрану в виде узкой полоски (стрипа) шириной 0,5 см, которую погружали в жидкую пробу до полного намокания стрипа и затем высушивали в штативе. Жидкие пробы (плазму, молоко, мочу) замораживали и

перевозили в лабораторию при температурном контроле. Хранение сухих проб на носителе осуществлялось при температуре 4°C в плотно закрытых zip-пакетах с осушителем, жидких –

при -20°C. Определение кортизола в жидких и сухих пробах осуществляли с использованием коммерческих ИФА тест-систем производства «Иммунотех» (Москва) и DiaMetra (Италия). При этом протокол анализа отличался только на стадии добавления образца. При постановке анализа носитель с сухим образцом (стекловолокно - квадратный участок размером 0,5x0,5 см, целлюлозный носитель – круг диаметром 5 мм) помещали непосредственно в лунку ИФА планшета и добавляли необходимые реагенты для дальнейшего проведения анализа согласно инструкции к набору.

Результаты исследований. С использованием метода ИФА были проведены параллельные исследования жидких образцов плазмы/молока/мочи и сухих образцов цельной крови (плазмы)/молока/мочи на двух типах носителей – целлюлозе и стекловолкне. Выявленные в биологических жидкостях концентрации кортизола с использованием количественного метода ИФА составляли от долей единиц до сотен нмоль/л (таблица 1). Следует отметить, что для целлюлозного носителя смываемость образца с носителя хуже, чем со стекловолкна, что связано с пористостью целлюлозных волокон, что, в конечном итоге, оказывало влияние на результат определения кортизола. Кроме того, анализ сухих образцов на целлюлозном носителе связан со значительной вариабельностью получаемых результатов, тогда как для стекловолкна такого явления не наблюдалось. В случае стекловолкнистого стрипа единичный квадратный участок размером 0,5x0,5 см сорбирует одинаковое количество жидкости, что упрощает работу, числовую обработку и интерпретацию данных. Помимо этого, для стекловолкнистого материала практически отсутствует зависимость объема пятна от гематокрита образца (количество форменных элементов крови) и хроматографический эффект, характерные для целлюлозного материала. Выявленные методом ИФА уровни кортизола в жидких и сухих образцах крови (плазмы), молока и мочи на стекловолкнистом стрипе хорошо коррелировали между собой (коэффициент корреляции между сухими и жидкими

пробами составлял не менее 0,8), что говорит об эффективности использования подхода к отбору образцов в высушенном виде (стекловолоконный стрип). Помимо этого, пробы можно хранить без замораживания (при +4°C) по крайней мере не менее 6 месяцев, что было подтверждено выявлением идентичных концентраций кортизола через полгода хранения сухих проб на стекловолоконном стрипе при таких условиях.

Табл. 1. Сводная таблица анализа кортизола в биологических жидкостях домашних коз

№	Образец	Количество животных	Количество образцов	Выявленные концентрации кортизола
1	Цельная кровь (сухие) Плазма (жидкие и сухие)	23	102	12,4 – 611 нмоль/л (4,5 – 222 нг/мл)
2	Молоко (жидкие и сухие)	20	1221	0,1 - 273 нмоль/л (0,04 – 99 нг/мл)
3	Моча (жидкие и сухие)	18	35	0,7 – 195 нг/мл

Концентрация кортизола связана с циркадным ритмом и колеблется в течение дня. В целом, в исследованных образцах крови (плазмы) выявленный уровень кортизола был выше, чем в образцах молока, что связано в том числе с тем, что отбор крови представляет собой более стрессовую ситуацию, чем дойка (рис. 2). Для большинства образцов молока значение кортизола не превышало 20 нмоль/л, при этом у одного больного животного были выявлены повышенный уровень кортизола в диапазоне 200-300 нмоль/л. В большинстве проанализированных образцов плазмы кортизол не превышал значение 100 нмоль/л.

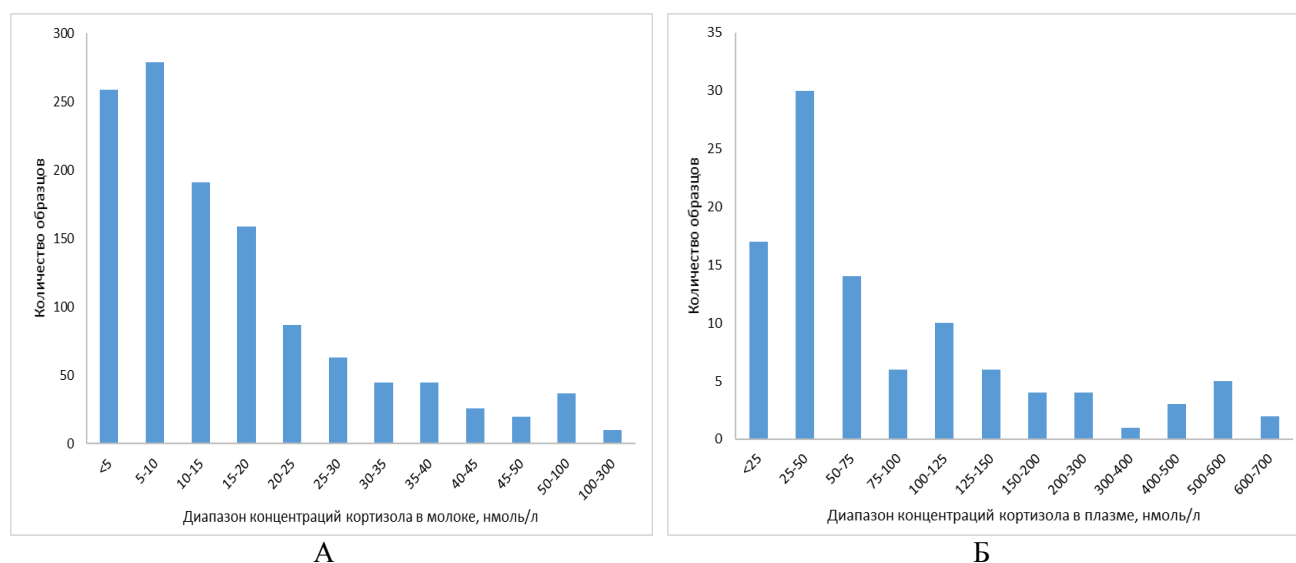


Рис.2. Распределение образцов молока (А) и плазмы (Б) по концентрационным диапазонам при определении уровня кортизола.

Дальнейшие исследования будут посвящены определению кортизола в шерсти (долгосрочный уровень гормона как биомаркер суммарной стрессовой нагрузки) для сопоставления с данными динамического изменения уровня кортизола в различных биологических жидкостях (уровень гормона в момент забора образца) домашних коз.

Заключение. Экспериментально получен массив данных содержания кортизола различных в биологических жидкостях домашних коз для анализа ретроспективы стресса и проведения дальнейших исследований. На примере проведенного нами отбора и анализа проб следует отметить, что нанесение и высушивание образцов биологического материала на стекловолоконных мембранных носителях представляет собой удобный и малозатратный способ получения, перевозки и хранения биологического материала для проведения разнообразных исследований животных. Выявленные в сухих образцах уровни кортизола полностью сопоставимы с результатами, полученными при анализе нативных проб методом количественного ИФА. Биологические образцы в высушенном виде не требуют соблюдения холодовой цепи при транспортировке, занимают мало

места, их легко перевозить и хранить, что повышает доступность лабораторных услуг для отдаленных районов и помогает формировать базу данных образцов при изучении изменения уровня кортизола у животных.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-76-10053).

Литература

1. Aguiar, D., The importance of monitoring cortisol in the agri-food sector - A systematic review / D. Aguiar, C. Marques, A. C. Pereira // *Metabolites*. – 2023. Т. 13. - № 6. - 692. <https://doi.org/10.3390/metabo13060692>.
2. Новгородова, И. П. Методы определения концентрации кортизола у животных / И. П. Новгородова // *Аграрная наука*. – 2024. – Т. 381. - № 4. – С. 35–43. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-381-4-35-43>
3. Афанасьева А. И. Концентрация гормонов в сыворотки крови коз горноалтайской пуховой породы в связи с плодовитостью / А. И. Афанасьева // *Ветеринарная медицина*. - 2007. - Т. 4. - С. 50-52.
4. Анализ кортизола в волосах для оценки ретроспективы стресса: методические подходы / М. В. Онуфриев, С. В. Сидорова, Т. А. Дружкова, А. Б. Гехт, Н. В. Гуляева // *Нейрохимия*. – 2015 - Т. 32. - № 1. - С. 86-88. <https://doi.org/10.1134/S1819712415010067>.