

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ВАРИАЦИЯ УРОВНЯ КОРТИЗОЛА В МОЛОКЕ ДОМАШНИХ КОЗ В ЕСТЕСТВЕННОЙ СРЕДЕ ОБИТАНИЯ

© 2025 г. А. К. Пискунов¹, кандидат биологических наук, Н. Ю. Саушкин², кандидат химических наук, Ж. В. Самсонова^{1,2}, кандидат химических наук

¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 11Б
E-mail: sushk_90@mail.ru

*Исследования проводили с целью определения диапазона изменений концентрации гормона кортизола в молоке свободноживущих в природной среде домашних коз (*Capra hircus*) и оценки потенциального влияния индивидуальных и средовых факторов на физиологический уровень гормона. Материалом для исследования служили образцы молока пяти коз, отобранные во время утренней и вечерней дойки в течение 10-недельного мониторинга (с августа по октябрь). Всего было собрано 416 образцов молока, аликвоты которых наносили на целлюлозную мембрану, высушивали и перевозили в лабораторию для проведения количественного иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрация кортизола в молоке достигала уровня до 76...116 нмоль/л. При этом наблюдаемая внутрииндивидуальная вариация гормона в молоке была значительно выше (53 %), чем межиндивидуальная (26 %). Отмечено резкое повышение концентрации кортизола (до 330...460 нмоль/л) в молоке болеющего животного за несколько дней перед летальным исходом. В ходе анализа данных не выявлено значимых корреляций уровня кортизола с возрастом животного, объемом выдоенного молока за одну дойку, временем дойки и временем ожидания дойки. Однако достоверно более низкие уровни гормона отмечали у первого в очереди на дойку животного, по сравнению со вторым, а достоверно самые высокие – у второго, по сравнению со всеми остальными особями. Вследствие этого выдвинуто предположение о том, что определяющее влияние на уровень кортизола в молоке домашних коз могут иметь текущие психоэмоциональные реакции, связанные с социальным взаимодействием – как внутри вида, так и с человеком. Они могут вносить больший вклад в вариацию уровня гормона, чем циркадные ритмы, возраст и наполненность молочной железы.*

BIOLOGICAL VARIATION OF CORTISOL LEVEL IN MILK OF DOMESTIC GOATS IN NATURAL HABITAT

A. K. Piskunov¹, N. Yu. Saushkin², J. V. Samsonova^{1,2}

¹Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, 119991, Moskva, ul. Gubkina, 3

²Lomonosov Moscow State University, 119991, Moskva, Leninskie gory, 1, str. 11B
E-mail: sushk_90@mail.ru

*The purpose of the study was to determine the milk cortisol range of free-living domestic goats (*Capra hircus*) and to assess the potential influence of individual and environmental factors on the physiological level of the hormone. Milk samples from five goats were collected during morning and evening milking during a 10-week monitoring period (from August to October). 416 milk samples were collected and aliquots were applied onto a cellulose membrane, dried, and transported to the laboratory for quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The milk cortisol concentration reached 76...116 nmol/l. Moreover, the observed intra-individual variation of the milk hormone was significantly higher (53 %) than the inter-individual variation (26 %). A significant increase of milk cortisol (up to 330...460 nmol/L) was found for a sick animal several days before death. During the data analysis, there were no significant correlations between the cortisol level and the age of the animal, the milk volume milked per one milking, the time of milking and the time of waiting for milking. However, significantly lower levels of the hormone were observed for the first animal in line for milking compared to the second, and significantly higher levels were observed for the second animal compared to all others. It is therefore assumed that the current psychoemotional reactions associated with social interaction – both within the species and with humans – may have a determining effect on the milk cortisol level of domestic goats. They may make a greater contribution to the variation of the hormone level than circadian rhythms and age, fullness of the mammary gland.*

Ключевые слова: кортизол, домашние козы, ИФА, молоко, стресс.

Keywords: cortisol, domestic goats, ELISA, milk, stress.

Глюкокортикоиды (ГК) играют многогранную и важную роль в регуляции практически всех физиологических процессов. Они способны напрямую влиять на транскрипцию генов, связываясь с ядерными рецепторами непосредственно на молекулах ДНК. Их часто называют стрессорными гормонами, поскольку у позвоночных животных ГК обеспечивают адаптацию к изменениям внешней или внутренней среды путем координации метаболических, иммунных и поведенческих

реакций [1]. Таким образом, изучение ГК представляет интерес как для физиологии, так и для более прикладных областей, например медицины и ветеринарии. В частности, ГК могут быть использованы как биомаркеры адаптивной реакции организма на изменение условий среды или гомеостаза [1]. Кортизол и другие ГК – химически стабильные аналиты, методы их определения отличаются простотой и высокой аналитической точностью [2, 3]. Однако интерпретация измеряемых *in vivo*

концентраций кортизола довольно затруднительна, поскольку индивидуальный уровень гормона складывается под влиянием многих факторов, среди которых могут быть пол и возраст [4, 5], время года [6], наличие острых и хронических стрессоров [7, 8, 9], воспалительных процессов [10, 11] и др. [12]. Например, существенные изменения в уровне кортизола у животных может вызывать реакция на отбор крови, а также на другие ветеринарные манипуляции [2, 3].

Обычными матрицами для анализа кортизола или его метаболитов служат кровь, слюна, моча и фекалии. В этих биологических материалах измеренные уровни кортизола представляют собой концентрацию гормона в определенный момент времени или усредненный уровень за 1...2 дня [2, 5]. Более предпочтительным для мониторинга кортизола может стать использование альтернативных неинвазивных методов отбора проб (молока, шерсти) [5, 13, 14]. Однако это требует уточнения ряда методических аспектов. Кортизол может быть использован как биомаркер адаптивной реакции организма на изменение условий среды или гомеостаза животных, что позволяет контролировать стресс и благополучие животных [15, 16, 17].

Цель исследований – определение пределов изменения концентрации гормона кортизола в молоке свободноживущих в природной среде обитания домашних коз и изучение потенциального влияния индивидуальных и средовых факторов на физиологический уровень этого гормона в молоке для оценки возможности применения молока как удобной неинвазивной матрицы при исследовании факторов, влияющих на благополучие животных (условия содержания, манипуляции с животными и др.).

Методика. Образцы молока отбирали от лактирующих домашних коз (*Capra hircus*), принадлежащих к свободноживущей в природных условиях популяции, созданной и поддерживаемой на опытной биологической станции «Шаховская» ИОГен РАН. Эта популяция используется в рамках экспериментальной парадигмы изучения поведения и других сложных явлений, полноценная реализация которых происходит в естественной среде. Животные сохраняют контакт с человеком, приучены к ветеринарным манипуляциям. Образцы собирали во время ручной дойки, на которую козы приходят самостоятельно.

Отбор проб осуществляли во время утренней и вечерней дойки у пяти животных в течение 10 недель в период с августа по октябрь. Молоко отбирали, фиксируя дату, время дня, очередность животного, время, проведенное животным в ожидании, и время, затраченное на дойку. Кроме того, отмечали нетипичные обстоятельства, например, наличие видимого воспалительного процесса. Непосредственно после дойки на целлюлозную фильтровальную бумагу (TE46, Hoefel Scientific Instruments, США) наносили аликвоты проб молока (по 20 мкл) и высушивали при комнатной температуре. Полученные образцы в виде сухих пятен молока на листах фильтровальной бумаги хранили в плотно закрытом пластиковом пакете с осушителем при температуре +4°C. Всего было собрано и проанализировано 416 образцов. Отбор проб осуществлял один человек на протяжении всего эксперимента, за исключением трех последовательных дней, в которые было получено 24 образца. Для проведения анализа пробы перевозили в лабораторию, расположенную на расстоянии 150 км от места их отбора.

Для измерения кортизола в молоке использовали диагностический набор «ИФА-кортизол» (Иммунотех, Россия). Для проведения анализа на том же целлюлозном носителе аналогично образцам молока

были приготовлены сухие пятна стандартных растворов (0...1200 нмоль/л) и контрольный образец из ИФА-набора. Содержание кортизола определяли в соответствии с инструкцией к набору с некоторыми изменениями. Для анализа использовали выбитые дыроколом диски целлюлозной бумаги диаметром 0,5 см с высушенным стандартом/образцом. Бумажные диски помещали в лунки ИФА планшета и предварительно смачивали 20 мкл дистиллированной воды. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл конъюгата (кортизол-фермент). Планшет инкубировали в течение 15 мин с постоянным перемешиванием при 37 °C для пропитки дисков раствором, а затем еще 1 ч при тех же условиях. Все остальные процедуры выполняли в соответствии с инструкцией к набору.

Результаты анализа обрабатывали методами описательной статистики (с применением t-критерия Стьюдента) и корреляционного анализа по методу Пирсона с использованием программы SPSS Statistics v. 26 (IBM, США). Оценивали диапазон наблюдаемых концентраций кортизола для каждого животного, а также взаимосвязь его физиологического уровня в молоке с индивидуальными (возраст, объем выдоенного молока за одну дойку) и средовыми (время дня, время ожидания дойки, дневная и ночная температуры) факторами, а также очередности подхода на дойку, которую исследуемые животные определяли самостоятельно.

Результаты и обсуждение. Содержание кортизола в молоке коз в большинстве случаев не превышало 100 нмоль/л (рис. 1). Коэффициент индивидуальной вариации величины этого показателя составил 53 %, межиндивидуальной – 26 %. Как было показано ранее при исследовании растущих козлят, с возрастом средний выявленный уровень кортизола повышается [4]. В нашем исследовании принимали участие козы возрастом от двух до девяти лет и прямой зависимости между возрастом и уровнем кортизола в молоке не установлено (табл. 1). Например, для трехлетней и девятилетней особи предельные значения кортизола находились на одном уровне и превышали 100 нмоль/л, при этом медианные значения также были близки (32 и 21 нмоль/л соответственно). Кроме того, не отмечено явной тенденции к увеличению либо к уменьшению средних значений и медианы концентраций кортизола в выборке при увеличении возраста особи (табл. 1). При этом в ходе анализа образцов молока был обнаружен факт резкого повышения уровня кортизола (до 330...460 нмоль/л) для болеющего животного за несколько дней перед наступлением летального исхода.

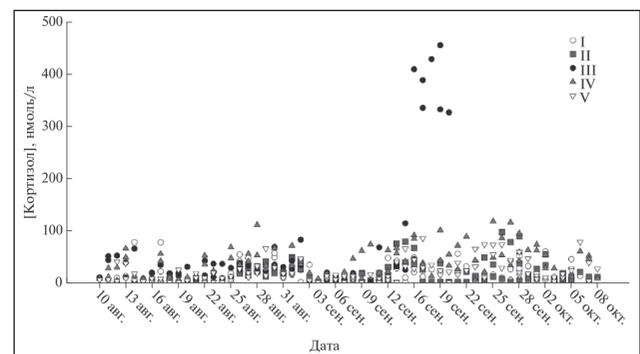


Рис. 1. Изменение содержания кортизола в молоке пяти домашних коз в течение 10 недель (различные символы обозначают разных животных).

Табл. 1. Статистические показатели уровня кортизола в молоке для каждого из пяти животных и итоговые для всей выборки*

Код	Возраст	N	M	Медиана	SEM	SD	Асимметрия	Экспесс	Диапазон	5 %	95 %
I	4	92	20	13	2	18	1,3	1,2	76	2	56
II	7	63	25	18	3	23	1,5	1,9	95	2	78
III	9	61	26	21	3	22	1,6	3,8	113	2	68
IV	3	106	36	32	3	28	0,9	0,2	116	4	93
V	2	94	23	16	2	20	1,3	1,1	84	2	72
Все		416	26	18	1	23	1,4	1,7	116	2	73

*N – количество образцов в выборке, M – среднее значение, SD – стандартное отклонение, SEM – стандартная ошибка среднего.

По результатам расчета коэффициентов корреляции Пирсона между объемом молока, сдоенного за одну дойку (утром или вечером), и наблюдаемой в нем концентрацией кортизола (табл. 2) значимая связь была обнаружена только у животного IV ($p < 0,01$). Соответствующие значения для этой особи отображены на диаграмме, на которую также была помещена аппроксимирующая линия (рис. 2). Как видно из диаграммы, по мере увеличения объема молока возрастает содержание в нем кортизола, причем эта закономерность становится несколько более выраженной с ростом объема. Возможно, что такая зависимость, которая не наблюдается в группе в целом, может носить индивидуальный характер. Для ответа на вопрос о существовании какой-либо закономерности необходимо провести исследование на большем числе особей и в течение более продолжительного временного промежутка.

Табл. 2. Коэффициенты корреляции между концентрацией определяемого кортизола и объемом сдоенного молока за одну дойку, рассчитанные для каждого животного

Животное	r	p
I	0,13	0,20
II	-0,13	0,33
III	-0,22	0,09
IV	0,33*	0,01
V	0,15	0,15

*корреляция достоверна при $p < 0,01$.

Также был проанализирован уровень кортизола в молоке в зависимости от очередности доения, которая определялась самими животными. Достоверно более низкие уровни гормона отмечали у первого в очереди животного, по сравнению со вторым, а достоверно наиболее высокие – у второй особи, по сравнению со всеми остальными (рис. 3). У последнего (5-го) в очереди на дойку животного также отмечали высокий средний уровень гормона в выдоенном молоке, однако различия со 2-м, 3-м и 4-м животным в очереди были недостоверными согласно выбранному уровню значимости t-критерия (рис. 3). Вероятнее всего, гормон равномерно поступает в молоко

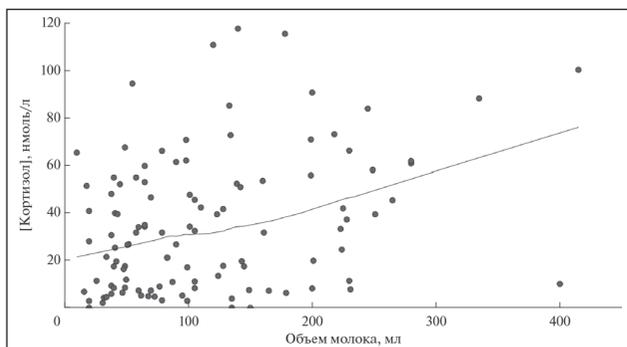


Рис. 2. Зависимость концентрации определяемого кортизола от объема сдоенного за одну дойку молока у животного IV.

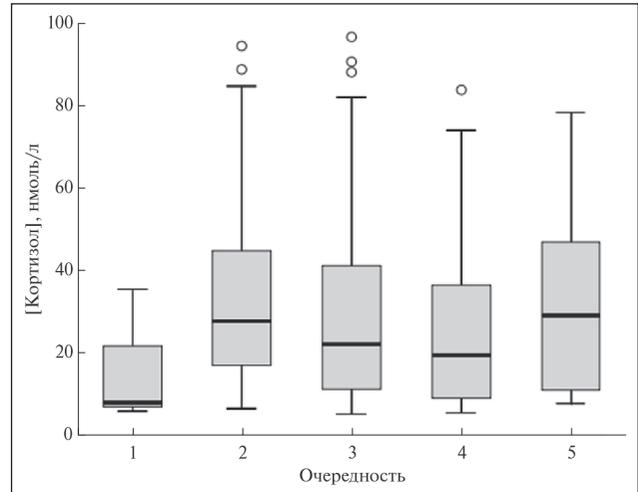


Рис. 3. Зависимость уровня кортизола в молоке от очередности дойки козы (статистически значимое различие наблюдается при переходе от 1 ко 2 особи (t -test, $p < 0,05$); горизонтальные барты обозначают медианное значение и квартили с шагом 25 %, выбросы отмечены круговыми символами).

в ходе его образования в альвеолах и скорость диффузии кортизола в молоко сопоставима со скоростью его образования. В то же время изменение психоэмоционального статуса, например, при определении очередности подхода на дойку, которую козы определяли самостоятельно, быстро, в течение нескольких минут, отражаются на концентрации кортизола в молоке. Это предполагает наличие альтернативного пути его поступления.

В целом, полученные данные не выявили выраженного циркадного паттерна в уровне кортизола в молоке. Содержание гормона в утренние и вечерние часы значительно не отличалось (рис. 4а), так же как оно не за-

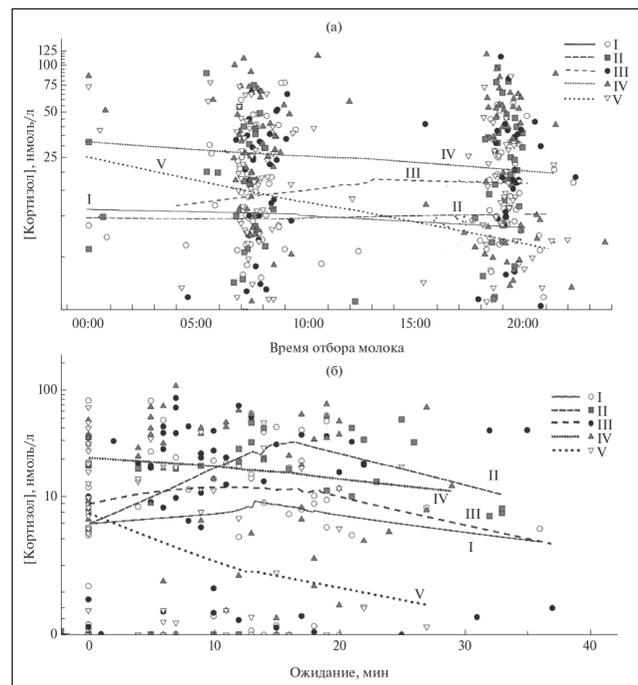


Рис. 4. Изменение содержания кортизола в молоке пяти домашних коз в зависимости от: а) времени дойки, б) времени ожидания дойки (различные символы и линии обозначают разных животных и соответствующие им линии аппроксимации).

висело от времени ожидания дойки (рис. 46). Значимым предиктором уровня гормона в молоке может быть среднесуточная температура окружающей среды или сочетание дневной и ночной температуры на конкретную дату отбора образца [18]. Это может быть напрямую связано как с физиологической адаптацией животных к ее изменению, так и опосредованно, например, с двигательной активностью, уровень которой различается при разной погоде. Однако в нашем исследовании значимой корреляции между уровнем кортизола и среднесуточной температурой не установлено. Для выявления потенциальной зависимости необходимо проведение годового мониторинга, учитывающего сезонные колебания температуры и освещенности.

Выводы. Молоко можно использовать в качестве удобного неинвазивного биологического образца при исследовании различных факторов, влияющих на благополучие животных, поскольку не выявлено значимого воздействия индивидуальных и средовых факторов на физиологический уровень кортизола. По-видимому, определяющее влияние на уровень кортизола в молоке домашних коз будут оказывать текущие психоэмоциональные реакции, связанные с социальным взаимодействием как внутри вида, так и с человеком, а также наличие заболеваний. Они могут вносить большой вклад в вариацию уровня гормона, чем циркадные ритмы и возраст, а также наполненность молочной железы. Наблюдаемая внутрииндивидуальная вариация уровня кортизола в молоке была значительно выше, чем межиндивидуальная. В связи с изложенным популяционные референтные интервалы могут иметь ограниченную ценность для интерпретации значений, получаемых при анализе молока определенного животного.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература.

1. Джафаров М. Х., Зайцев С. Ю., Максимов В. И. Стероиды. Строение, получение, свойства и биологическое значение, применение в медицине и ветеринарии. СПб.: Лань, 2011. 288 с.
2. Новгородова И. П. Методы определения концентрации кортизола у животных // *Аграрная наука*. 2024. Т. 4. С. 35–43. doi: 10.32634/0869-8155-2024-381-4-35-43
3. Aguiar D., Marques C., Pereira A. C. The importance of monitoring cortisol in the agri-food sector—A systematic review // *Metabolites*. 2023. Vol. 13. No. 6. Article 692. URL: <https://www.mdpi.com/2218-1989/13/6/692> (дата обращения: 21.12.2024). doi: 10.3390/metabo13060692.
4. Пушкарев Н. Н. Уровень и динамика половых гормонов у коз оренбургской породы с возрастом // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2015. Т. 2. № 52. С. 185–187.
5. Heimbürge S., Kanitz E., Otten W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals // *General and Comparative Endocrinology*. 2019. Vol. 270. P. 10–17. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.09.016.
6. Effect of seasonal stress on cortisol level of goats / S. Shukla, A. Ludri, A. Parashar et al. // *The Pharma Innovation Journal*. 2021. Vol. 10. No. 11s. P. 2654–2656.
7. Tajik J., Nazifi S., Eshtraki R. The influence of transportation stress on serum cortisol, thyroid hormones, and some serum biochemical parameters in Iranian cashmere (Raini) goat // *Veterinarski Arhiv*. 2016. Vol. 86. P. 795–804.
8. Use of goat interleukin-6, cortisol, and some biomarkers to evaluate clinical suitability of two routes of ascorbic acid administration in transportation stress / K. T. Biobaku, T. O. Omobowale, A. O. Akeem, et al. // *Veterinary World*. 2018. Vol. 11. No. 5. P. 674–680. doi: 10.14202/vetworld.2018.674-680.
9. Hydrbring-Sandberg E., von Walter L. W., Forkman B. Cortisol is not enough: A complex stress reaction in tethered goats // *Animal Welfare*. 2022. Vol. 31. No. 1. P. 91–98. doi: 10.7120/09627286.31.1.008.
10. Serum cortisol of Sahel goats following rumenotomy with assorted anaesthetics and sutures / A. M. Saidu, P. B. Bokko, A. Mohammed, et al. // *International Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2016. Vol. 4. No. 1. P. 23–26. doi: 10.1016/j.ijvsm.2016.10.008.
11. Acute cortisol and behavior of dairy goat kids administered local anesthesia, topical anesthesia or systemic analgesia prior to cautery disbudding / M. N. Hempstead., T. M. Lindquist, J. K. Shearer, et al. // *Physiology & Behavior*. 2020. Vol. 222. Article 112942. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938420302560> (дата обращения: 21.12.2024). doi: 10.1016/j.physbeh.2020.112942.
12. Altered stress-induced cortisol levels in goats exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) during fetal and postnatal development / K. E. Zimmer, A. C. Gutleb, J. L. Lyche, et al. // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2009. Vol. 72. No 3–4. P. 164–172. doi: 10.1080/15287390802539004.
13. Within-day variation and effect of acute stress on plasma and milk cortisol in lactating goats / G. Romero, I. Restrepo, R. Muelas, et al. // *Journal of Dairy Research*. 2015. Vol. 98. No. 2. P. 832–839. doi: 10.3168/jds.2014-8052.
14. Variation in milk cortisol during lactation in Murciano-Granadina goat / J. R. Díaz, M. Alejandro, G. Romero, et al. // *Journal of Dairy Research*. 2013. Vol. 96. No. 2. P. 897–905. doi: 10.3168/jds.2012-5614.
15. Comparison of cortisol concentrations in plasma and saliva in dairy cattle following ACTH stimulation / A. Riek, L. Schrader, F. Zerbe, et al. // *Journal of Dairy Research*. 2019. Vol. 86. No. 4. P. 406–409. doi: 10.1017/S0022029919000669.
16. Within a hair's breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle / S. Heimbürge, E. Kanitz, A. Tuchscherer, et al. // *General and Comparative Endocrinology*. 2020. Article 113359. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648019304885> (дата обращения: 21.12.2024). doi: 10.1016/j.ygcen.2019.113359.
17. Cavallino L., Rincón L., Scaia M. F. Social behaviors as welfare indicators in teleost fish // *Frontiers in Veterinary Science*. 2023. Vol. 10. Article 1050510 URL: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2023.1050510/full> (дата обращения: 21.12.2024). doi: 10.3389/fvets.2023.1050510.
18. Serum cortisol levels in goats exhibit seasonal but not daily rhythmicity / A. Alila-Johansson, L. Eriksson, T. Soveri, et al. // *Chronobiology International*. 2003. Vol. 20. No. 1. P. 65–79. doi: 10.1081/cbi-120017684.

Поступила в редакцию 26.12.2024
После доработки 29.01.2025
Принята к публикации 23.04.2025