

**ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ
VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE**

Научная статья

УДК 639.215.2:574.24:574.625

doi: 10.34655/bgsha.2021.65.4.006

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНДОГЕННОГО КОРТИЗОЛА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ
НАПРЯЖЕННОСТИ ГОРМОНИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА У КАРПА
(*CYPRINUS CARPIO*)**

Дарья Игоревна Березина¹, Любовь Леонидовна Фомина²

^{1,2}Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина, Вологда, с. Молочное, Россия

¹vetxwork@gmail.com

Аннотация. В исследованиях стресса у рыб часто бывает трудно определить степень реакции в результате влияния различных стресс-факторов, и интерпретация этого влияния, как правило, производится по повышению уровня эндогенного кортизола. В ихтиологической практике широко используется имитация стресса синтетическими кортикостероидами, в связи с чем возникает вопрос о том, является ли уровень эндогенного кортизола наиболее подходящим параметром для измерения уровня стресса в рамках таких исследований. В данной работе приведена динамика плазменного уровня кортизола при имитации острого и хронического стресса у 24 карпов путем однократной инъекции дексаметазона первой экспериментальной группе и бетаметазона второй экспериментальной группе в сравнении с контрольной группой (без инъекции) в течение 21 суток. Анализ производился перед инъекцией, а также через 7, 14 и 21 сутки после обработки. Проведено сравнение гормонального ответа с реакцией рыб, стрессированных естественными факторами (гипоксией). Установлено, что бетаметазон инактивирует выработку эндогенного кортизола в течение всех последующих за инъекцией суток эксперимента с $353,68 \pm 66,39$ нг/мл до $7,28 \pm 1,27$ нг/мл к концу, тогда как влияние дексаметазона вызвало разнонаправленные колебания его уровня: с $346,25 \pm 43,16$ нг/мл до $242,25 \pm 58,49$ нг/мл на 7-е сутки, $388,25 \pm 37,51$ нг/мл на 14-е сутки и $264,25 \pm 21,21$ нг/мл на 21-е сутки по сравнению с плавной динамикой у контрольных рыб: $376,25 \pm 44,04$ нг/мл, $366,75 \pm 42,82$ нг/мл, $335,33 \pm 8,57$ нг/мл и $366,00 \pm 89,22$ нг/мл соответственно. Сделано заключение, что определение уровня эндогенного кортизола не рекомендовано при оценке степени имитации стресса данными гормонами, и в исследованиях такого типа необходим поиск других индикаторов.

Ключевые слова: карп, кортизол, стресс, дексаметазон, бетаметазон, диагностика.

Финансирование: Работа выполнена в рамках реализации гранта РФФИ 19–34–90109.

Original article

USING OF ENDOGENOUS CORTISOL IN DIAGNOSIS OF INTENSITY HORMONE-INDUCED STRESS IN CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Darya I. Berezina¹, Lyubov L. Fomina²

^{1,2}Vologda State Dairy Academy named after N.V. Vereshchagin, Vologda, Molochnoe village, Russia

¹vetxwork@gmail.com

Abstract. *With stress studies in fish it is often difficult to determine the degree of response to various stressors, and the interpretation of this influence is usually based on an increase in endogenous cortisol levels. Simulation of stress with synthetic corticosteroids is widely used in ichthyological practice, which raises the question of whether endogenous cortisol is the most appropriate parameter for measuring stress levels in such studies. This work presents the dynamics of the plasma cortisol level in simulating acute and chronic stress in 24 carps by a single injection of dexamethasone in the first experimental group and betamethasone in the second experimental group, in comparison with the control group (without injection) for 21 days. The analysis was performed before injection, as well as after 7, 14 and 21 days of treatment. The hormonal response was compared with that of fish stressed by natural factors (hypoxia). It was found that betamethasone inactivates the production of endogenous cortisol during all subsequent days of the experiment after injection from 353.68±66.39 ng/ml to 7.28±1.27 ng/ml by day 21, while the effect of dexamethasone caused multidirectional fluctuations in its level: from 346.25±43.16 ng/ml to 242.25±58.49 ng/ml on the 7th day, 388.25±37.51 ng/ml on the 14th day and 264.25±21.21 ng/ml on day 21 compared with smooth dynamics in control fish: 376.25±44.04 ng/ml, 366.75±42.82 ng/ml, 335.33±8.57 ng/ml and 366.00±89.22 ng/ml, respectively. It was concluded that measuring the level of endogenous cortisol is not recommended when assessing the degree of stress imitation by these hormones, and in studies of this type it is necessary to search for other indicators.*

Keywords: carp, cortisol, stress, dexamethasone, betamethasone, diagnostic

Financial Support: this work was carried out within the framework of the RFFI grant 19–34–90109.

Введение. Выращивание рыбы в условиях интенсивной аквакультуры сопряжено с постоянным влиянием на нее ряда повреждающих факторов внешней среды (стресс-факторов). Первичной реакцией на воздействие стрессора у рыб являются эндокринные изменения, включающие, прежде всего, выработку катехоламинов и глюкокортикоидов [1, 2]. Они вызывают вторичные метаболические, осмотические и другие изменения [3, 4]. Регулируется кортикальный ответ у костистых рыб гипоталамо-гипофизарно-интерренальной (НПИ) осью [5].

В исследованиях стресса часто бывает трудно определить степень реакции в результате влияния различных стресс-факторов, и интерпретация этого влияния, как правило, производится по повышению уровня эндогенного кортизола

[6, 7, 8, 9]. В других исследованиях в качестве главных либо дополнительных стресс-маркеров используется уровень катехоламинов, концентрация глюкозы и хлоридов [10, 11, 12].

Искусственное увеличение концентрации кортизола крови и, тем самым, индукция стресс-реакций могут быть осуществлены путем введения экзогенного кортизола перорально, путем внутривентрикулярных [13] и внутримышечных инъекций [14], а также внедрением масляных имплантов [15, 16, 17]. Также в ихтиологической практике широко используется имитация стресса разной продолжительности при помощи синтетических кортикостероидов – дексаметазона [18], триамцинолона [19]. Может возникнуть закономерный вопрос о том, является ли уровень эндогенного кортизола наиболее подходящим пара-

метром для измерения уровня стресса в рамках таких исследований.

В труде А.К. Gamperl и др. [16] сообщается, что дексаметазон и бетаметазон подавляют выработку эндогенного кортизола путем ингибирования адренокортикотропного гормона (АКТГ) при воздействии на гипоталамус и гипофиз от 80 до 100%. При этом необходимо учитывать хэндлинг-стресс при инъекции, способный поднять уровень эндогенного кортизола. Авторы приходят к выводу, что дексаметазон и бетаметазон имеют кортизолподобные эффекты, но их значение для оценки гормональной реакции во время стресса может быть ограничено.

Целью данной работы является оценка пригодности эндогенного кортизола для мониторинга напряженности стресса в рамках исследований с модуляцией стресс-реакций у карпов.

Материал и методика исследований. Эксперимент с гормональным индуцированием стресс-реакций проводили на 24 карпах *Cyprinus carpio L.*, которых предварительно разделили на три группы (табл. 1): рыбы с имитацией острого стресса (первая экспериментальная группа), рыбы с имитацией хронического стресса (вторая экспериментальная группа) и контрольные животные.

Таблица 1 – Характеристика групп рыб в эксперименте по влиянию гормониндуцированного стресса

Группа	Воздействие	Модель
Контрольная (n=8)	интактная	контроль
I экспериментальная (n=8)	инъекция раствора дексаметазон-фосфата (4 мг/мл) в дозе 0,2 мл/особь однократно	острый стресс
II экспериментальная (n=8)	инъекция суспензии бетаметазона (2,63 мг+6,43 мг/мл) в дозе 0,5 мл/особь однократно	хронический стресс

Рыб содержали в экспериментальной установке, обеспечивающей непрерывную циркуляцию воды между аквариумами с аэрацией и температурой воды 18–20°C, режим кормления 1 раз в сутки. Отбор проб крови проводился сразу же после 24-часовой акклиматизации и далее через 7, 14 и 21 сутки после инъекции препаратами [18]. Перед отбором проб рыб анестезировали при помощи добавления в воду гвоздичного масла в дозе 0,033 мл/л [20] с последующей выдержкой в ней 15 минут. Отбор проб проводился пункцией хвостовой вены, после чего осуществляли индивидуальное мечение рыб.

Количественный анализ кортизола сыворотки определяли методом твердофазного хемилюминесцентного иммуноанализа при участии ООО Центр лабораторной диагностики «Целди».

Значения полученных результатов в работе представлены в виде средней

величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Достоверность различий показателей для множественных независимых выборок определяли с помощью критерия Кроскелла-Уоллеса, для парных зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона. Результаты исследования со значением вероятности допущения альфа-ошибки, равные либо менее 5% ($p < 0,05$), расценивались как статистически значимые. Различие двух показателей считали достоверным, если оно равнялось или превышало свою среднюю ошибку разности в два и более раз.

Результаты и их обсуждение. По данным доступной литературы, уровни кортизола до стресса у рыб значительно варьируются и составляют 2-42 нг/мл, постстрессовый уровень кортизола колеблется от 20 до 500 нг / мл [21].

В результате проведенного нами исследования (табл. 2) было отмечено, что

уровень кортизола плазмы у рыб, не получавших инъекцию гормонов, претерпел плавное снижение к 14-м суткам и даль-

нейшее восстановление концентрации к 21-м суткам эксперимента, а его разброс составил 335-376 нг/мл за все время.

Таблица 2 – Количественная характеристика уровня эндогенного кортизола у карпов в течение эксперимента

Группа	Кортизол, нг/мл
До обработки	
контроль (n=8)	376,25±44,04
первая группа (n=8)	346,25±43,16 ^{bd}
вторая группа(n=8)	353,68±66,39 ^{bcd}
7-е сутки	
контроль (n=8)	366,75±42,82*
первая группа (n=8)	242,25±58,49* ^{cd}
14-е сутки	
вторая группа(n=8)	5,25±1,49 ^d
контроль (n=8)	335,33±8,57*
первая группа (n=8)	388,25±37,51 ^{ad}
вторая группа(n=8)	6,00±1,08
21-е сутки	
контроль (n=8)	366,00±89,22*
первая группа (n=8)	264,25±21,21*
вторая группа(n=8)	7,28±1,27

* – Различия с показателем второй экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^b – Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 7-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^c – Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 14-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); ^d – Различия с аналогичным показателем аналогичной группы на 21-е сутки эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$)

У рыб, стрессированных дексаметазоном, содержание эндогенного кортизола изменялось скачкообразно и разнонаправленно, дважды резко снизившись на 7-е и 21-е сутки эксперимента и составив 246-346 нг/мл в ходе исследования. Вероятно, 80-100% блокирование синтеза кортизола дексаметазоном у рыб [16] проявляется в период 24-96 часов [22], вызывая последующие колебания. В группе рыб, подвергнувшихся инъекции гормона пролонгированного действия (бетаметазона), произошло полное ингибирование выработки эндогенного кортизола к 7-м суткам эксперимента с 353 до 5 нг/мл, не восстановившееся к концу опыта, что связано с постепенным высвобождением действующего вещества из депо. В обоих случаях происходят колебания в гормональном составе крови исследованных рыб, отличные от контроля. Дополнительный стрессовый эффект инъекции у экспериментальных животных в данном слу-

чае можно исключить, поскольку инъекции препаратов проходило сразу после первичного взятия крови у всех групп рыб, в связи с чем воздействие хэндлинг-стресса было одинаково.

Заключение. Таким образом, имитация стрессовых условий путем инъекции синтетических кортикостероидов приводит к снижению выработки и дальнейшим колебаниям (дексаметазон) до значительного и долгого блокирования (бетаметазон) выработки эндогенных гормонов. Такие данные несомненно подтверждают тезис коллег [16] о том, что применение дексаметазона и бетаметазона не рекомендовано в качестве индикаторов стрессового ответа у карпов в подобных экспериментах. В связи с этим, остается актуальной проблема оценки напряженности и продолжительности стресс-реакции у рыб с применением синтетических аналогов кортизола.

Предположительно, таким индикато-

ром может выступать концентрация глюкозы крови, в наибольшем числе случаев у других рыб, также имеющая тенденцию к повышению при применении кортикостероидов у карпов [12], хотя и чувствительная к воздействию прочих факторов. Также глюкокортикоиды обладают явным иммуносупрессивным [18] и гиперкоагуляционным [6, 23] влиянием у карпов, в связи с чем эффективность искусственно вызванной стресс-реакции может определяться по показателям иммунитета и гемостаза при изучении других физиологических систем. В любом случае, вопрос пригодности этих показателей для указанных целей требует дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Smith L.S. Introduction to fish physiology // Neptune City, TFH Publications. 1982. 352 p.
2. Schreck C.B., Tort L., Farrell A.P., Brauner C.J. The concept of stress in fish // Fish physiology. 2016. Vol. 35. Pp. 1-34.
3. Mazeaud M.M., Mazeaud F., Donaldson E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review // Transactions of the American Fisheries Society. 1977. Vol. 106(3). Pp. 201-212.
4. Pickering A.D. Introduction: the concept of biological stress // Stress and fish. 1981. Pp. 1-9.
5. Donaldson E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish // Stress and fish. 1981. Pp. 11-47.
6. Пересторонина Е.А, Березина Д.И., Фомина Л.Л. Влияние кортизола на коагуляционные и иммунологические показатели крови рыб // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионом. 2019. Т. 3 (2). С. 84-89.
7. Ruane N.M., Huisman E.A., & Komen J. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement // Journal of fish biology. 2001. Vol. 59(1). Pp. 1-12.
8. Dobšíková R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H., & Velíšek J. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Czech Journal of Animal Science. 2009. Vol. 54(11). P. 510-518.
9. Ruane N.M., Carballo E.C., & Komen J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.) // Aquaculture Research. 2002. Vol. 33(10). Pp. 777-784.
10. Van Heel T. I., Van Den Thillart, G. E. E. J. M., Vianen, G. J., Steffens, A. B., Van Kampen, M. Plasma lactate and stress hormones in common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during stepwise decreasing oxygen levels // Netherlands Journal of Zoology. 2001. Vol. 51(1). Pp. 33-50.
11. Lutnicka H., Bojarski, B., Witeska, M., Tombarkiewicz, B., Formicki, G. Exposure to herbicide linuron results in alterations in hematological profile and stress biomarkers of common carp (*Cyprinus carpio*) // Ecotoxicology. 2019. Vol. 28(1). Pp. 69-75.
12. Svobodová Z., Kaláb, P., Dušek, L., Vykusová, B., Kolářová, J., Janoušková, D. The Effect of Handling and Transport of the Concentration of Glucose and Cortisol in Blood Plasma of Common Carp // Acta Veterinaria Brno. 1999. Vol. 68(4). Pp. 265-274.
13. Espelid S., Luskken G.B., Steiro K., Bshgwald J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) // Fish & Shellfish Immunology. 1996. Vol. 6(2). Pp. 95-110.
14. Roth R.R. Some factors contributing to the development of fungus infection in freshwater fish // Journal of Wildlife Diseases. 1972. Vol. 8(1). Pp. 24-28.
15. Van Weerd J.H., Komen, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 1998. Vol. 120(1). Pp. 107-112.
16. Gamperl A.K., Vijayan M.M., & Boutilier R.G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 1994. Vol. 4(2). Pp. 215-255.
17. Vijayan M.M., Pereira C., Grau E.G., Iwama G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1997. Vol. 116(1). P. 89-95.
18. Балабанова Л.В., Микряков Д.В., & Микряков В.Р. Реакция лейкоцитов карпа *Cyprinus carpio* на гормониндуцируемый стресс // Биология внутренних вод. 2009. № 1. С. 91-93.
19. Houghton G., Matthews R.A.

Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L.: the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21 hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet // *Journal of Fish Diseases*. 1990. Vol. 13(4). Pp. 269-280.

20. Hamackova J., Kouril, J., Kozak, P., Stupka, Z. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2006. Vol. 12(2). Pp. 185-194.

21. Barton B.A., & Iwama G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids // *Annual Review of fish diseases*. 1991. Vol. 1. Pp. 3-26.

22. Pickering A.D., Pottinger T.G., Sumpter J.P. On the use of dexamethasone to block the pituitary-interrenal axis in the brown trout, *Salmo trutta* L // *General and comparative endocrinology*. 1987. Vol. 65(3). Pp. 346-353.

23. Berezina D. I, Fomina L. L, Goreva A. D. Effect of Stress Factors on the Coagulogram of Common Carp, *Cyprinus carpio* // *Biosci Biotech Res Asia*. 2020. Vol. 17(3). Pp. 629–635.

References

1. Smith L.S. Introduction to fish physiology. *Neptune City, TFH Publications*. 1982. 352 p.

2. Schreck C.B., Tort L., Farrell A.P., Brauner C.J. The concept of stress in fish. *Fish physiology*. 2016;35:1-34.

3. Mazeaud M.M., Mazeaud F., Donaldson E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*. 1977;106(3):201-212.

4. Pickering A. D. Introduction: the concept of biological stress. *Stress and fish*. 1981. Pp. 1-9.

5. Donaldson E. M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. *Stress and fish*. 1981. Pp. 11-47.

6. Perestoronina E.A., Berezina D.I. and Fomina L.L. The Influence of Cortisol on Coagulation and Immunological Parameters of Fish Blood. *Young Researchers of Agro-Industrial and Forestry Complexes to the Regions: Biological Sciences*. 2019;1.3(2):84-89 (In Russ.).

7. Ruane N.M., Huisman E.A., & Komen J. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during

confinement. *Journal of fish biology*. 2001;59(1):1-12.

8. Dobšíková R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H., & Velíšek J. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science*. 2009;54(11):510-518.

9. Ruane N.M., Carballo E.C., & Komen J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquaculture Research*. 2002;33(10):777-784.

10. Van Heel T.I., Van Den Thillart G E. E. J. M., Vianen G.J., Steffens A.B., Van Kampen M. Plasma lactate and stress hormones in common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during stepwise decreasing oxygen levels. *Netherlands Journal of Zoology*. 2001;51(1):33-50.

11. Lutnicka H., Bojarski B., Witeska M., Tombarkiewicz B., Formicki G. Exposure to herbicide linuron results in alterations in hematological profile and stress biomarkers of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*. 2019;28(1):69-75.

12. Svobodová Z., Kaláb, P., Dušek L., Vykusová, B., Kolářová, J., Janoušková D. The Effect of Handling and Transport of the Concentration of Glucose and Cortisol in Blood Plasma of Common Carp. *Acta Veterinaria Brno*. 1999;68(4):265-274.

13. Espelid S., Luskken G.B., Steiro K., Bwagwald J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 1996;6(2):95-110.

14. Roth R.R. Some factors contributing to the development of fungus infection in freshwater fish. *Journal of Wildlife Diseases*. 1972;8(1):24-28.

15. Van Weerd J.H., Komen J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 1998;120(1):107-112.

16. Gamperl A.K., Vijayan M.M., & Boutilier R.G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1994;4(2):215-255.

17. Vijayan M.M., Pereira C., Grau E.G., Iwama G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of

cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1997;116(1):89-95.

18. Balabanova L.V., Mikryakov D.V. and Mikryakov V.R. The Reaction of Leukocytes from Carp *Cyprinus Carpio* to Hormone-Induced Stress. *Biology of Inland Waters*. 2009;1:91-93 (In Russ.).

19. Houghton G., Matthews R.A. Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L.: the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21 hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Journal of Fish Diseases*. 1990;13(4):269-280.

20. Hamackova J., Kouril J., Kozak P.,

Stupka Z. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2006; 12(2):185-194.

21. Barton B.A. & Iwama G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*. 1991;1:3-26.

22. Pickering A.D., Pottinger T.G., Sumpter J.P. On the use of dexamethasone to block the pituitary-interrenal axis in the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and comparative endocrinology*. 1987;65(3):346-353.

23. Berezina D.I., Fomina L.L, Goreva A.D. Effect of Stress Factors on the Coagulogram of Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Biosci Biotech Res Asia*. 2020;17(3):629-635.

Информация об авторах

Дарья Игоревна Березина – ассистент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства;

Любовь Леонидовна Фомина – кандидат биологических наук, доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства.

Information about the authors

Darya I. Berezina – Assistant, Internal Non-infectious Diseases, Surgery and Obstetrics Chair;
Lyubov L. Fomina – Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Internal Non-infectious Diseases, Surgery and Obstetrics Chair.

Статья поступила в редакцию 26.10.2021; одобрена после рецензирования 23.11.2021; принята к публикации 25.11.2021.

The article was submitted 26.10.2021; approved after reviewing 23.11.2021; accepted for publication 25.11.2021.