



Авторы:

Ширяев Г. В., с.н.с. группы биохимии ВНИИГРЖ, к.с.-х. н.

Притужалова А. О. – м.н.с. лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ

Старикова Д. А. – с.н.с. лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ, к.б.н.

Концентрация 3-гидроксибутирата в фолликулярной жидкости, сыворотке и цельной крови

Всероссийская школа-конференция «Клеточные и геномные технологии для совершенствования сельскохозяйственных животных», 26-27 июня 2023, Пушкин-СПб

Введение

В настоящее время главным ориентиром при диагностике состояния субклинического кетоза (СКК) у молочных коров (ввиду наибольшего процентного содержания (78%) по отношению к другим кетоновым телам и биохимической стабильности) является измерение 3-гидроксибутирата (ВНВ) в сыворотке, плазме или цельной крови. Анализируя научную литературу, можно отметить, что взаимосвязь концентрации ВНВ в фолликулярной жидкости (ФЖ) и цельной крови практически не изучалась. В тех публикациях, которые можно обнаружить в свободном доступе, исследователи анализировали эту взаимосвязь, рассматривая фолликулярную жидкость, получаемую методом трансвагинального аспирирования *in vivo* фолликулов одного размера – самого крупного и второго по величине. Есть также исследования в которых анализировался уровень ВНВ в различных по диаметру фолликулах *post mortem*. Однако технология аспирирования (забор ФЖ в один шприц) не позволял установить возможные отличия по концентрации ВНВ в ФЖ фолликулов одного диаметра. Во многом это объясняется отсутствием методов определения концентрации ВНВ в ФЖ очень малого объема (первое исследование датируется 2004 годом). Поэтому представляет интерес рассмотрение концентрации ВНВА в ФЖ недостаточной для ИФА исследований, но достаточных для экспресс-теста.

Цель

Определение взаимосвязи концентрации ВНВ в ФЖ, сыворотке и цельной крови.

Материалы и методы

Для анализа *in vivo* для трансвагинальной аспирации ФЖ использован аспирационный комплекс, с основой из аспирационного блока Minitube. Исследовалось 6 голов. В полученных образцах ФЖ определено содержание ВНВ. Параллельно у коров определялся уровень ВНВ в цельной крови. Для анализа *post mortem* на бойне у коров перед забоем бралась кровь в пробирки с активатором свертывания. Исследовалось 18 голов. Каждая пробирка подписывалась согласно нумерации коров. После забоя овариоэктомированные яичники коров доставляли в лабораторию в индивидуальном для каждой коровы стерильном термосе со средой TC-199 при температуре 30-35°C в пределах 3-4 часов. Номер пробирки с кровью соответствовал номеру термоса. ФЖ аспирировали одноразовыми шприцами из фолликулов, разделенных по группам 2-3 мм, 3-5 мм и 6-8 мм, и сразу же подвергали экспресс-тесту (глюкометр TD-4235E).

Результаты

Обращает на себя внимание, что в большинстве случаев, где фолликулы были больше 7 мм, можно утверждать о совпадении уровня ВНВ в цельной крови и ФЖ, что подтверждает ранее полученные данные другими авторами. Средний уровень ВНВ у коров 1-5 составил: в крови $0,88 \pm 0,07$, в ФЖ $0,92 \pm 0,13$ ммоль/л, при среднем размере рассматриваемого фолликула $11,14 \pm 2,37$ мм. Удалось получить фолликулярную жидкость у коровы №6 из фолликула диаметром 3 мм. Ранее *in vivo* по имеющимся литературным данным этого не осуществляли, и в этом случае совпадения не произошло. В крови уровень ВНВ составил $1,1$ ммоль/л, а в ФЖ $0,1$ ммоль/л. Это несоответствие способствовало появлению идеи обратить внимание на уровень ВНВ в фолликулах различного диаметра (табл. 2).

Проведя однофакторный дисперсионный анализ с помощью IBM Statistics (без учета коровы №6) установлено, что есть достоверные различия между группами: <3 мм и 6–8 мм ($p < 0,05$); 3–5 мм и 6–8 мм ($p < 0,01$) (апостериорные сравнения - критерий Тьюки). Корова № 6 была выведена из общей выборки т.к. уровень ВНВ в крови зафиксирован на клиническом значении кетоза 2,2.

Таблица 1. Концентрация 3-гидроксибутирата в цельной крови и фолликулярной жидкости, полученных у коров *in vivo*

Порядковый номер животного	Концентрация ВНВ в цельной крови, ммоль/л	Размер фолликула, мм	Концентрация в ФЖ, ммоль/л
1	0,8	8,7	0,9
2	1,1	7	1,4
3	0,7	12	0,6
4	1	8	0,9
5	0,8	20	0,8
6	1,1	3	0,1

Таблица 2. Концентрация 3-гидроксибутирата в фолликулярной жидкости, полученных у коров *post mortem*, в зависимости от концентрации в сыворотке крови

№ коровы	Общее кол-во фолликулов	Концентрация ВНВ в фолликулярной жидкости в зависимости от диаметра фолликула, мм; $\pm m$							
		<3		3–5		6–8		>8	
		ммоль/л	n	ммоль/л	n	ммоль/л	n	ммоль/л	n
0,1 ммоль/л									
7	1	–	–	0,10	1	–	–	–	–
12	9	$0,30 \pm 0,20$	2	$0,37 \pm 0,08$	7	–	–	–	–
Итого	10	$0,30 \pm 0,20$	2	$0,34 \pm 0,08$	8	–	–	–	–
0,2 ммоль/л									
3	9	$0,47 \pm 0,07$	3	$0,84 \pm 0,21$	5	0,60	1	–	–
4	3	–	–	–	–	$0,33 \pm 0,15$	3	–	–
5	3	–	–	–	–	0,30	1	$0,6 \pm 0,1$	2
8	8	–	–	$0,90 \pm 0,26$	8	–	–	–	–
9	1	0,40	1	–	–	–	–	–	–
11	2	0,50	1	–	–	0,50	1	–	–
13	9	$0,78 \pm 0,16$	6	$1,03 \pm 0,22$	3	–	–	–	–
16	16	1,40	1	$0,55 \pm 0,08$	6	$0,40 \pm 0,05$	9	–	–
Итого	51	$0,70 \pm 0,11$	12	$0,81 \pm 0,11$	22	$0,40 \pm 0,04$	15	$0,60 \pm 0,10$	2
0,3 ммоль/л									
1	2	–	–	1	1	0,5	1	–	–
0,4 ммоль/л									
2	7	–	–	$0,68 \pm 0,09$	4	$0,77 \pm 0,20$	3	–	–
10	10	$0,33 \pm 0,12$	2	$0,78 \pm 0,09$	8	–	–	–	–
14	36	$0,84 \pm 0,07$	12	$0,76 \pm 0,05$	13	$0,46 \pm 0,02$	9	0,40	2
15	11	–	–	$0,45 \pm 0,09$	4	$0,34 \pm 0,08$	7	–	–
17	14	–	–	$0,77 \pm 0,1$	7	$0,54 \pm 0,08$	7	–	–
Итого	78	$0,76 \pm 0,08$	14	$0,72 \pm 0,04$	36	$0,48 \pm 0,04$	26	0,40	2
0,5 ммоль/л									
18	11	0,60	1	$1,02 \pm 0,04$	5	$0,55 \pm 0,05$	2	$0,50 \pm 0,12$	3
2,2 ммоль/л									
6	4	–	–	0,80	1	$1,95 \pm 0,25$	2	2,20	1

Корреляционный анализ показал прямую корреляционную связь между концентрацией ВНВ в крови с уровнем 3-гидроксибутирата в ФЖ фолликулов диаметром 3-5 мм ($r=0,340$; $p < 0,01$), 6-8 мм ($r=0,326$; $p < 0,05$). Это говорит о том, что при повышении концентрации в крови ВНВ происходит повышение и в ФЖ. Это особенно можно отследить в таблице 2 на коровах с различным уровнем 3-гидроксибутирата в сыворотке крови. При этом можно также отметить интересную тенденцию – при повышении ВНВ в крови в случае фолликулов диаметром 6-8 мм и >8 мм уровни ВНВ в крови и в ФЖ начинают приближаться к совпадению.

Работа проведена в рамках выполнения научных исследований
Министерства науки и высшего образования РФ
по теме № АААА-А18-118021990006-9