

УДК 599.32,59.089

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В ЭКСКРЕМЕНТАХ ПОЛУДЕННОЙ ПЕСЧАНКИ (*MERIONES MERIDIANUS* PALLAS 1773, MURIDAE, RODENTIA): БИОЛОГИЧЕСКИЙ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОДЫ

© 2023 г. Е. Н. Суркова^а, *, Л. Е. Савинецкая^а, А. В. Чабовский^а

^аИнститут проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,
Москва, 119071 Россия

*e-mail: immaly@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.05.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 10.07.2023 г.

Оценка уровня стресса в природных популяциях открывает возможности для изучения многих популяционных процессов, в т.ч. регуляции численности и расселения. В последние десятилетия активно развиваются неинвазивные методы определения уровня глюкокортикоидов, которые наиболее пригодны для оценки долговременного стресса, однако перед их использованием необходима валидация. Мы провели биологическую и физиологическую (АКТГ-тест) валидацию неинвазивного метода определения метаболитов глюкокортикоидов (МГК) в экскрементах полуденной песчанки (*Meriones meridianus*). Согласно данным, полученным с помощью обоих методов, спустя одинаковое время после воздействия (4–5 часов после стрессирующих процедур или введения АКТГ) происходил значительный подъем концентрации МГК, а пиковые значения в два раза превышали базовый уровень. Инъекция физраствора песчанкам (контрольная группа) не вызвала значимого отклика в концентрации МГК. Отсутствие реакции у контрольных животных согласуется с мнением о том, что сглаженный уровень МГК в фекалиях лучше отражает долговременный стресс, чем чувствительный к острым краткосрочным воздействиям уровень глюкокортикоидов в крови. По эффективности биологическая валидация оказалась не хуже физиологического метода, который большинство исследователей считают более надежным. Высокая эффективность в сочетании с низкой инвазивностью расширяют возможности применения биологического подхода.

Ключевые слова: стресс, метаболиты глюкокортикоидов, валидация, неинвазивный метод, полуденная песчанка

DOI: 10.31857/S004451342309012X, EDN: QNWWRN

В современном мире природные популяции подвергаются множеству внешних воздействий, в основном, антропогенного характера. Изучение реакции организмов на внешние стрессоры может дать представление о чувствительности популяций к изменению внешней среды. Например, показано, что антропогенное нарушение местообитаний может приводить к повышению уровня стресса (Kuznetsov et al., 2004; Jossierand et al., 2017). Стресс считают одним из важных факторов регуляции численности, отмечая положительную связь между уровнем стресс-гормонов и плотностью (Christian, 1950; Шилов, 1984; Boonstra, Boag, 1992; Novikov, Moshkin, 1998; Shang et al., 2022), хотя данные на этот счет противоречивы (Creel et al., 2013). Наконец, стресс-реактивность может определять проактивную или реактивную жизненную стратегию особей и, соответственно,

склонность к расселению (Koolhaas et al., 1999; Cote et al., 2010), влияя тем самым на процессы колонизации новых территорий, расширение ареалов и инвазии (Clobert et al., 2009; Chuang, Petteyson, 2016).

Внешние факторы (стрессоры) активируют комплекс физиологических реакций, повышающих адаптацию, и, в конечном счете, выживание особей в новых условиях (Селье, 1960). Центральное место в регуляции физиологических процессов животных в ответ на стресс занимает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС). Глюкокортикоиды (ГК) – одни из основных гормонов, продуцируемые этой системой в ответ на стресс, поэтому уровень ГК (в основном, кортизол или кортикостерон, в зависимости от вида животного) в крови часто используют для оценки стрессированности организмов (Möstl, Palme,

2002). Однако в последние два десятилетия все больше получают распространение неинвазивные методы определения уровня ГК (Palme et al., 2005; Palme, 2019). ГК в крови циркулируют в неизменном виде, тогда как в продуктах выделения встречаются в основном их метаболиты (МГК), и по концентрации этих метаболитов можно определить уровень стресса. Для этого чаще всего производят сбор проб фекалий, который, по сравнению с взятием образцов крови, имеет ряд преимуществ при исследовании природных популяций. В отличие от взятия крови, сбор фекалий совсем не стрессует или мало стрессует животное, эта процедура не требует вмешательства в организм, что само по себе является сильным стрессовым фактором, также чаще всего не требуется иммобилизация или даже отлов животного. Пробы фекалий можно собирать неограниченное число раз в любой промежуток времени и при любом физиологическом состоянии животного, тогда как забор крови не может осуществляться слишком часто у животных небольшого размера. Кроме того, в фекалиях представлен сглаженный уровень МГК за предшествующий взятию пробы определенный промежуток времени — этот уровень меньше зависит от краткосрочных стрессовых событий и лучше подходит для оценки долгосрочных эффектов (Touma, Palme, 2005).

Для измерения концентрации ГК в сыворотке и плазме крови разработано множество готовых, относительно недорогих и простых в использовании наборов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), однако их нельзя применять для определения концентрации МГК как показателя стресса без проведения процедуры валидации (Герлинская и др., 1993; Möstl, Palme, 2002; Touma, Palme, 2005; Palme, 2019), поскольку в фекалиях почти не представлены сами гормоны в нативном виде, а только их метаболиты (Stead et al., 2000; Chen et al., 2017; Palme, 2019). Перекрестная реактивность наборов для ИФА нативных ГК в крови к их метаболитам была многократно отмечена, но при этом каждый набор требует валидации для каждого нового вида (Abelson et al., 2016).

Главенствующая роль в принятии решения о возможности использовать тот или иной набор реагентов для ИФА для неинвазивной оценки уровня стресса по концентрации МГК принадлежит биологической и физиологической валидации (Palme, 2019). Аналитическая валидация (включая “тест на параллелизм”) (Колосова и др., 2008) используется дополнительно для оценки точности, чувствительности и специфичности анализа. Известно множество случаев, когда аналитическая валидация была пройдена, а биологическая или физиологическая валидация не показывали отклика на стресс (например, Fanson et al., 2017).

Для валидации неинвазивной оценки стресса, как правило, используют физиологический и реже — биологический подходы (Touma, Palme, 2005; Palme et al., 2005; Palme, 2019), каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Биологический подход нацелен на исследование динамики МГК после стрессирующих воздействий на животное, часто связанных с отловом, иммобилизацией, транспортировкой и другими манипуляциями, которые приводят к изменению активности ГГНС (Goymann et al., 1999; Touma, Palme, 2005; Palme, 2019). Например, у дальневосточного леопарда транспортировка вызывала подъем МГК, что указывало на валидность неинвазивной оценки уровня стресса (Иванов и др., 2014). Биологический способ валидации относительно прост (образцы для последующего анализа можно собирать в поле) и мало инвазивен. При этом успешная биологическая валидация показывает, что неинвазивный метод определения уровня стресса позволяет обнаружить биологически значимые изменения в активности ГГНС (Palme, 2019). Однако биологический метод нельзя стандартизировать, поскольку трудно, если вообще возможно, стандартизировать уровень стрессирующего воздействия.

Физиологический подход к валидации считается более надежным, но более сложным (Touma, Palme, 2005). В отличие от биологического, физиологический подход предусматривает создание стандартных лабораторных условий и обязательное вмешательство в организм животного. Один из самых точных и распространенных физиологических методов — введение тестируемому животному адренокортикотропного гормона (АКТГ) — гормона гипофиза (Goymann et al., 1999; Touma, Palme, 2005; Павлова, Найдено, 2008; Palme, 2019). АКТГ по кровяному руслу направляется в кору надпочечников, где стимулирует выработку ГК, которые затем метаболизируются и в виде метаболитов попадают в фекалии. Если после инъекции проверяемый набор для ИФА обнаруживает подъем уровня МГК в образцах фекалий, то можно считать валидацию успешной и применять набор для неинвазивной оценки стресса у конкретного вида. Таким образом, для валидации неинвазивного метода определения уровня стресса важны оба подхода (Palme, 2019), а сравнительный анализ их результатов представляет собой самостоятельную научную задачу, позволяя оценить их эффективность и применимость на практике (см., например, Иванов и др., 2014).

Полуденная песчанка — фоновый вид грызунов в пастбищных экосистемах юга Калмыкии. Использование этого вида в качестве модельного объекта в природных популяциях позволяет определить степень воздействия внешних факторов, в т.ч. антропогенной трансформации местообитаний, на популяцию и на экосистему в целом

(Kuznetsov et al., 2004; Surkova et al., 2019; Tchabovsky et al., 2016, 2019). Популяция полуденной песчанки в Калмыкии в настоящее время, в связи с ростом пастбищной нагрузки и начавшимся новым циклом опустынивания, расширяет свой ареал, открывая возможности для исследования синдрома расселения (Суркова и др., 2022; Чабовский и др., 2023) и, в частности, уровня стресса у колонистов. Валидация неинвазивного метода определения уровня стресса по МГК откроет возможность для изучения этого вопроса. Цель нашей работы – валидировать метод неинвазивной оценки уровня стресса у полуденной песчанки (*Meriones meridianus*) и сравнить эффективность биологического и физиологического подходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическая валидация. Биологическую валидацию осуществляли в полевых условиях в Калмыкии (с 29 апреля по 3 мая). Отлов проводили по стандартной процедуре с помощью сетчатых живоловок конструкции Щипанова (1987), в качестве приманки использовали семена подсолнечника (подробности см., например, в Tchabovsky et al., 2016). Ловушки выставляли непосредственно у выхода из норы в начале активности, около 20:00 часов, и проверяли не реже чем один раз в течение часа (для того, чтобы потенциально стрессовая процедура отлова не успела отразиться на концентрации МГК в собранных пробах). Под сетчатое дно ловушки подстилали гигроскопичную белую синтетическую ткань, которая впитывала мочу и защищала фекалии от попадания песка. Полуденные песчанки – семено-ядные пустынные грызуны и выделяют мало мочи, поэтому вероятность контаминации фекалий мочой была крайне мала; тем не менее, в редких сомнительных случаях фекалии отбраковывались.

В опытах мы использовали четырех взрослых зверьков (2 самки и 2 самца). Первую пробу фекалий мы собирали после того, как зверек попадал в ловушку (в среднем около 22:00), и считали концентрацию МГК в этой пробе базовой, отражающей уровень стресса до отлова и начала стрессирующих манипуляций. Следующую пробу брали в 3:00, спустя 5 часов после отлова, в течение которых зверек подвергался стрессирующим воздействиям, включающим сам отлов, стандартные манипуляции с животным (определение пола, возраста, массы тела, мечения и пр.), проведение поведенческих тестов, взятие пробы ДНК и транспортировку до полевой лаборатории. Далее пробы собирали каждые 4 часа (7:00, 11:00, 15:00, 19:00, 23:00, 3:00) в течение трех суток для того, чтобы оценить не только реакцию на стрессовый фактор, но и суточные колебания концентрации МГК. Зверьков держали поодиночке в сетчатых

клетках (30 × 15 × 15 см), каждая клетка стояла на фильтровальной бумаге в отдельной вентилируемой картонной коробке под навесом, который обеспечивал защиту от солнца, ветра и холода. Корм (семена подсолнечника, овес, морковь и яблоки) добавляли после каждого сбора проб, а также одновременно меняли бумагу под клеткой, чтобы избежать смешивания фекалий и мочи. Фекалии собирали все (без исключения) в бумажные пакеты, которые хранили в одинаковых условиях в сухом вентилируемом месте, чтобы предотвратить их заплесневение, при температуре 15–25°C до конца полевого сезона в течение 10–14 дней. Для территории Калмыкии характерен засушливый климат, поэтому пробы не требовали дополнительной сушки. По окончании биологической валидации зверьков сразу же выпускали в их норы. После транспортировки проб из поля в лабораторию их высушивали до постоянной массы при температуре 60°C в течение 12–16 часов и хранили в плотно закрытых пробирках при –20°C до проведения экстракции (в том случае, если экстракцию не проводили сразу после сушки).

Физиологическая валидация. Физиологическую валидацию проводили в лабораторных условиях. Для эксперимента использовали 9 зверьков (5 самцов и 4 самки), отловленных в мае в Калмыкии. Перед началом эксперимента зверьки акклиматизировались два месяца в условиях вивария. Песчанки жили одиночно в пластиковых клетках с сетчатой крышкой (50 × 30 × 20 см), внутри каждой клетки был домик для укрытия и предметы, которые песчанка могла грызть (ветки яблони, шишки без следов смолы). Зерновой корм (смесь проса и овса) находился в клетке в постоянном доступе, семена подсолнечника и сочные корма (морковь, яблоки, кабачки) давали два раза в неделю. Воду песчанкам не давали, поскольку в природе песчанки не пьют и получают влагу с кормом.

Процедуру валидации начинали в 15:00, рассаживая песчанок в новые клетки из металлической сетки с ячейками 1 см (30 × 15 × 15 см), под клетку подкладывали фильтровальную бумагу. Сетчатая структура клеток упрощала сбор проб и процедуру кормления без лишнего беспокойства зверьков. Также, поскольку полуденные песчанки – ночные зверьки, мы накрывали клетки тканью, чтобы свет не провоцировал стресс. Первую пробу фекалий собирали через 4 часа (в 19:00) и считали уровень МГК в этой пробе базовым. Далее пробы собирали каждые 4 часа в течение суток (23:00, 3:00, 7:00, 11:00, 15:00, 19:00). Через сутки, после сбора пробы в 15:00, всем песчанкам делали инъекцию синтетического АКТГ (Synacthen, Германия) в дозировке 40 мкг на 100 г веса (средняя дозировка для АКТГ-теста, Palme, 2019). Так как сама процедура инъекции могла быть стрессовым

фактором, для трех песчанок мы повторили процедуру, описанную выше, за исключением того, что вместо АКТГ вводили физраствор (контроль). После инъекции пробы собирали еще в течение двух суток с теми же временными интервалами (23:00, 3:00, 7:00, 11:00, 15:00, 19:00). Пробы сразу же высушивали до постоянной массы при температуре 60°C в течение 12–16 часов и хранили в плотно закрытых пробирках при –20°C до проведения экстракции (в том случае, если экстракцию не проводили сразу после сушки).

Экстракция метаболитов. Экстракцию метаболитов ГК из фекалий проводили по стандартной процедуре (Kretzschmar et al., 2004) с небольшими изменениями: фекалии измельчали с помощью фарфоровой ступки и пестика, отмеряли при помощи весов аликвоты измельченных фекалий массой 0.05 г с точностью до 0.001 г на весах Ohaus (Scout SPX 123) и переносили в микроцентрифужную пробирку 1.5 мл для дальнейшей экстракции. Далее в каждую пробирку добавляли 0.9 мл 80% метанола (наиболее пригодная концентрация для экстракции метаболитов ГК у млекопитающих, Palme et al., 2013) и экстрагировали в течение 30 мин в ротационном шейкере (BioSan Bio RS-24). Затем экстракты центрифугировали 10 мин при скорости 4000 оборотах в мин (Erpen-dorf, Centrifuge 5424), и 400 мкл полученного супернатанта переносили в чистые пробирки. К полученному экстракту добавляли 400 мкл дистиллированной воды и хранили при –20°C до проведения ИФА.

Иммуноферментный анализ проводили в Центре коллективного пользования “Живая коллекция диких видов млекопитающих” ИПЭЭ РАН с применением спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan FC. Мы использовали готовые коммерческие наборы для определения кортизола в сыворотке крови ХЕМА (г. Ростов-на-Дону) в соответствии с инструкцией. Поскольку мы работали не с сывороткой крови, а с экстрактами фекалий на основе метанола, мы разводили им калибровочные пробы из набора. Каждое измерение концентрации МГК в каждой пробе проводили дважды для определения коэффициента вариации, а для дальнейшего анализа принимали среднее значение. Если коэффициент вариации превышал 10% для конкретной пробы, анализ переносили до достижения значения меньше 10%. В подавляющем большинстве случаев этот показатель был меньше 5% (132 из 150, 88%), составляя в среднем 2.1% (медиана = 1.9) и варьируя от 0.1 до 9.8%.

Обработка данных и статистический анализ. Выборки, полученные в биологическом тесте, соответствовали критериям нормальности (Shapiro-Wilk, $p > 0.05$), однако данные физиологической валидации только приближались к нормальному

распределению и сильно варьировали, поэтому мы их логарифмировали, чтобы достичь нормального распределения.

Не все песчанки в ходе АКТГ-теста выделяли экскременты за четырехчасовой интервал, особенно в дневные часы (песчанки – ночные грызуны). Поэтому для статистического анализа данных физиологической валидации мы использовали пробы за восьмичасовые интервалы. Для того чтобы оценить изменение концентрации МГК в фекалиях после инъекции АКТГ, мы выбрали для сравнения четыре последовательных измерения (интервала): в 07:00–15:00 (период непосредственно до инъекции), 15:00–23:00 (после введения АКТГ), 23:00–07:00 и 15:00–23:00 (на следующие сутки после введения АКТГ). Интервал 07:00–15:00 на следующий день после инъекции был исключен, поскольку не все песчанки выделяли экскременты за этот период. Сравнение концентраций МГК за эти четыре последовательных измерения проводили с помощью дисперсионного анализа (АНОВА) для связанных измерений (Repeated Measures ANOVA).

Для того чтобы проконтролировать возможный эффект суточных колебаний ГК (Palme, 2019), мы сравнили концентрации МГК в фекалиях в одинаковое время суток (15:00–23:00) за день до инъекции, в день после инъекции и через сутки после инъекции АКТГ (АНОВА для связанных данных). Сравнение уровней МГК у песчанок, получивших АКТГ, и контрольных, получивших инъекцию физраствора, проводили с помощью *t*-теста (критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биологическая валидация. Стрессовое воздействие на песчанок в результате отлова, последующих манипуляций в поле и перевозки в полевую лабораторию (период с 22:00 до 03:00) вызвало значительное повышение уровня МГК в пробах, взятых через 5 часов после начала манипуляций, и повышение до пиковых значений – в пробах, взятых через 9 часов. За пиком последовали спад и выход на базовые значения (около 350 нг/г) через сутки после начала теста (рис. 1). Уровень МГК значительно варьировал в течение первых суток опыта (начиная с контрольных проб, взятых около 22:00 до начала манипуляций, и до 23:00 следующего дня; ANOVA для связанных данных: $F_{3,15} = 9.1$, $p = 0.0004$), а его значения в пробах, взятых через 5 и 9 часов после стрессового воздействия, достоверно превышали базовый уровень (в 1.6 и 1.8 раза, соответственно; рис. 1).

Физиологическая валидация (АКТГ-тест). Концентрация МГК заметно менялась на протяжении трех суток опыта (рис. 2а). В первые сутки (до инъекции АКТГ) концентрация МГК варьирова-

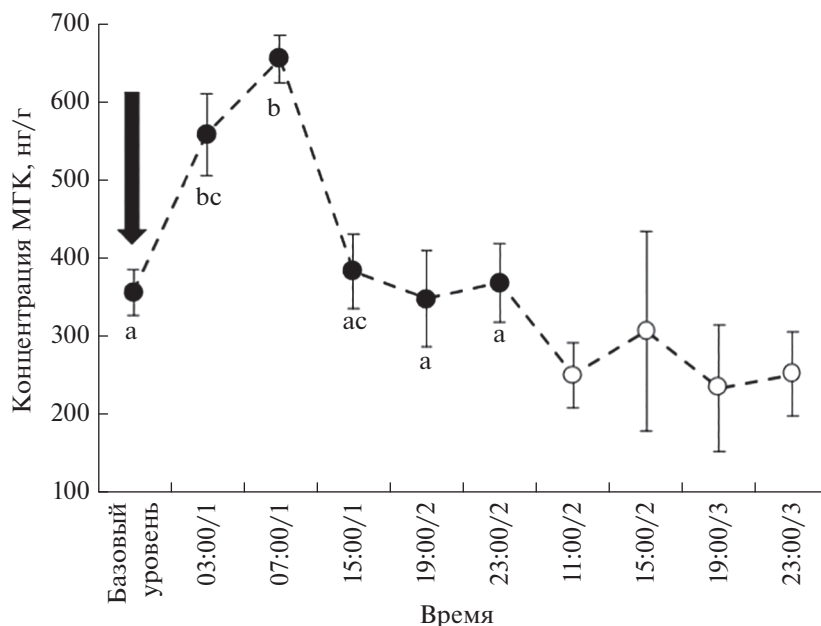


Рис. 1. Динамика уровня МКГ (среднее \pm ошибка среднего) после стрессового воздействия на песчанок в полевых условиях. Черными кружками обозначены пробы за первые сутки после стрессового воздействия (стрелка вниз), использованные в дисперсионном анализе (АНОВА для связанных данных). Одинаковые латинские буквы показывают отсутствие значимых различий ($p > 0.05$, тест Тьюки). Базовый уровень – пробы, взятые около 22:00 до начала манипуляций с песчанками. Цифры после временных интервалов показывают порядковый номер суток опыта.

ла незначительно, оставаясь примерно на одном уровне – около 400 нг/г. После инъекции АКТГ произошел резкий подъем концентрации (примерно в два раза) с двумя пиками – в пробах, взятых через 4 часа (в 19:00) и 16 часов (в 07:00 следующего дня), – и небольшим спадом между ними. К базовому уровню концентрация МКГ вернулась лишь через сутки после инъекции.

Дисперсионный анализ для связанных измерений (АНОВА) для восьмичасовых интервалов показал, что концентрация МКГ значимо варьировала на протяжении суток после инъекции (между первым интервалом – 07:00–15:00, до введения АКТГ, и последним – 15:00–23:00, через сутки после инъекции; $F_{3,24} = 5.1$, $p = 0.007$, рис. 2б). При этом концентрации МКГ в интервалах 15:00–23:00 и 23:00–07:00 после инъекции (через 4–8 и 12–16 часов, соответственно) были выше, чем концентрация МКГ до инъекции (07:00–15:00, тест Тьюки, различия близки к значимым: $p = 0.06$ в обоих случаях, рис. 2б) и через сутки после инъекции (15:00–23:00 на следующий день, различия значимы: $p = 0.04$ в обоих случаях), но не различались между собой ($p = 1.0$, рис. 2б).

Сравнение концентраций в одинаковое время суток (15:00–23:00) за день до инъекции АКТГ, в день инъекции и через сутки после инъекции показало значимые различия (АНОВА для связанных данных: $F_{2,16} = 5.4$, $p = 0.02$). Концентрация МКГ после введения АКТГ была значимо вы-

ше, чем в то же время суток за день до инъекции и на следующий день после инъекции (тест Тьюки: $p = 0.04$ и 0.02 , соответственно). Различий в концентрациях за день до инъекции и через сутки после инъекции не обнаружено (тест Тьюки: $p = 0.9$). Таким образом, подъем концентрации МКГ после инъекции АКТГ (рис. 2) очевидно не связан с суточными колебаниями уровня гормонов.

У контрольных песчанок, получивших вместо АКТГ инъекцию физраствора, заметных колебаний уровня МКГ на протяжении трех суток не обнаружено. Концентрация МКГ у песчанок, получивших инъекцию АКТГ, была значимо выше в интервале с 15:00 до 23:00 после инъекции, чем у контрольных (тест Стьюдента: $t = 2.8$, $p = 0.03$, рис. 3). Судя по нетрансформированным данным, уровень МКГ у песчанок из контрольной группы был ниже более чем в два раза по сравнению с аналогичным показателем у песчанок из опытной группы (329.6 и 810.7 нг/г, соответственно). Таким образом, подъем концентрации МКГ после инъекции АКТГ не связан с возможным стрессом в результате манипуляций со зверьком. В целом, можно заключить, что подъем уровня МКГ адекватно отражает повышение ГК в крови песчанок в ответ на действие АКТГ, т.е. служит надежным индикатором стресса.

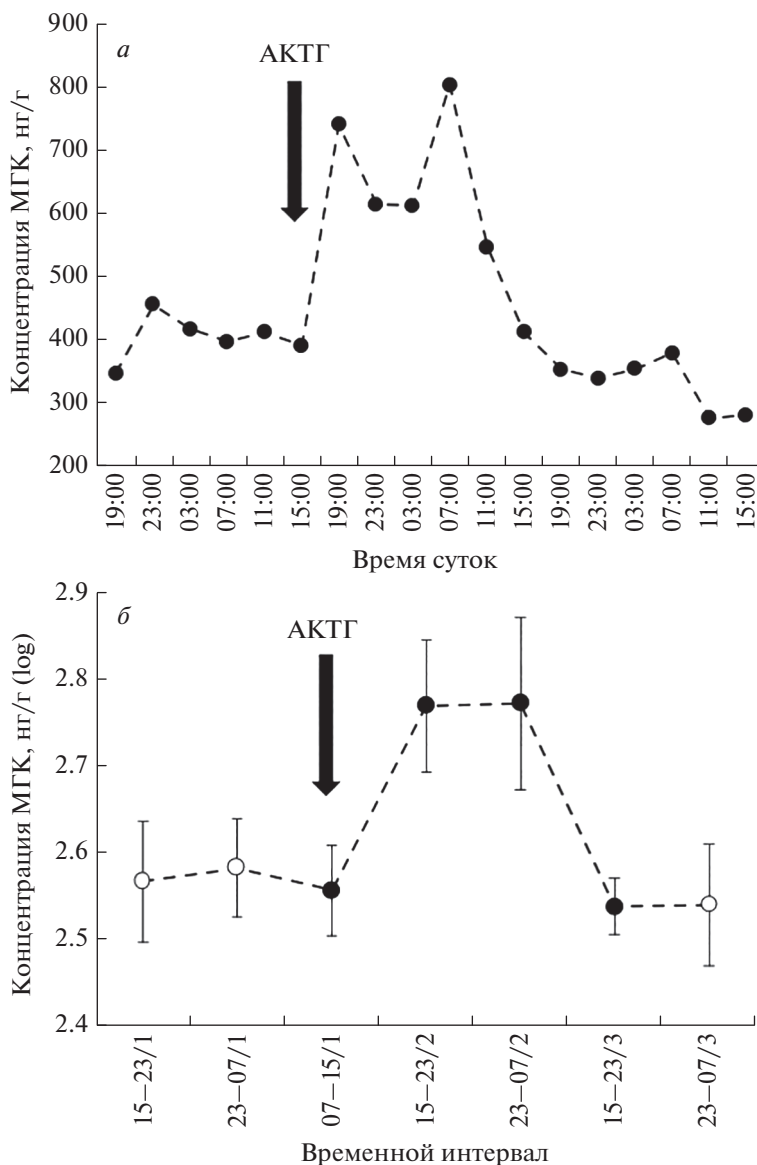


Рис. 2. Динамика концентрации МКГ в фекалиях песчанок в АКТГ-тесте: *a* – исходные, не трансформированные средние значения за каждый четырехчасовой интервал за трое суток; *b* – логарифмированные средние значения (\pm ошибка среднего) для восьмичасовых интервалов (исключены периоды, в которых не для всех животных получены пробы за восьмичасовой интервал: с 11:00 до 19:00 во вторые и третьи сутки опыта). Черные кружки обозначают интервалы, использованные в дисперсионном анализе (АНОВА) для сравнения концентраций МКГ до и после инъекции АКТГ. Цифры после временных интервалов показывают порядковый номер суток опыта.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что аналитическая характеристика пула метаболитов глюкокортикоидов в фекалиях полуденной песчанки не проводилась (Palme, 2019), биологический и физиологический методы валидации показали пригодность коммерческих наборов для определения кортизола в сыворотке для измерения уровня МКГ и позволили получить биологически значимую информацию, касающуюся активности ГГНС полуденных песчанок. Оба метода показали схожие

результаты, а эффективность биологической валидации оказалась не хуже физиологического метода, который считают, как правило, более надежным. Учитывая низкую инвазивность биологического метода, это расширяет возможности его применения.

Уровень МКГ в течение суток, предшествующий инъекции АКТГ (около 400 нг/г, рис. 2*a*), был относительно стабильным и сравним с концентрацией МКГ в природной популяции (около 350 нг/г, рис. 1). Это говорит о том, что концентрация МКГ до инъекции хорошо отражает базо-

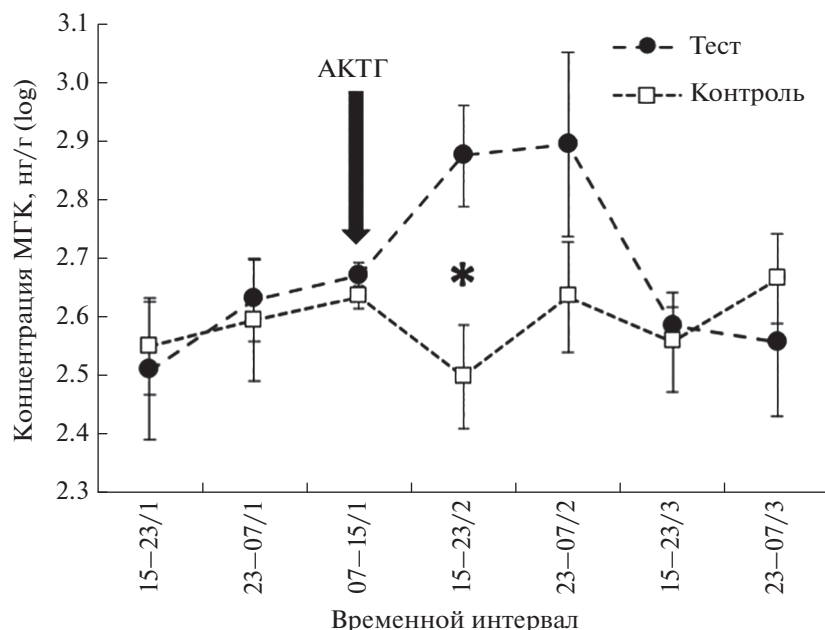


Рис. 3. Динамика концентрации МГК (среднее \pm ошибка среднего, логарифмированные данные) у контрольных песчанок (инъекция физраствора) и опытных (инъекция АКТГ). Звездочкой показаны значимые различия (тест Стьюдента). Цифры после временных интервалов показывают порядковый номер суток опыта.

вый уровень стресса, а манипуляции с песчанками, предшествующие АКТГ-тесту, не оказывали существенного стрессующего воздействия. Более того, мы не обнаружили эффекта инъекции физраствора на уровень МГК в фекалиях. Сама по себе инъекция может быть стрессовым фактором, повышая уровень МГК, что затрудняет интерпретацию результатов физиологической валидации неинвазивной оценки уровня стресса (Palme, 2019; Navarro-Castilla et al., 2021). Отсутствие ответа на инъекцию как таковую в наших экспериментах подтверждает тот факт, что краткосрочный стресс не вносит существенных изменений в уровень МГК, который, таким образом, отражает сглаженный, базовый уровень ГК, т.е. стресса (Touma, Palme, 2005). Это повышает валидность результатов проведенного нами АКТГ-теста для полуденной песчанки, позволяя тем самым оценивать долговременный уровень стресса в природных популяциях, что очень важно для такого рода исследований (Touma, Palme, 2005; Palme, 2019).

Скачок концентрации МГК в обоих тестах произошел (с учетом разрешающей способности экспериментов) примерно через одинаковое время: через 5 часов в биологическом и через 4 часа в физиологическом. Это указывает на то, что концентрация МГК в фекалиях сходно отражает скорость ответа ГГНС, как на стрессующие манипуляции, так и на введение АКТГ, непосредственно стимулирующее выброс ГК в кровь.

Пиковые значения превышали изначальные примерно в два раза в обоих тестах, что соответствует подъему концентрации МГК в 2–3.5 раза, признанному валидным для АКТГ-теста у других видов песчанок (St. Juliana et al., 2014, 2019; Navarro-Castilla et al., 2021). Различия в динамике концентраций МГК между биологическим и физиологическим тестами проявляются во временных параметрах пиковых значений: после манипуляций с песчанками в поле пик наступал позже (через 9 часов) и был один, тогда как АКТГ-тест вызывал два пика: через 4 и 16 часов. Два пика в АКТГ-тесте отражают межиндивидуальную изменчивость в скорости ответа: у других песчанок достижение пика варьировало в пределах одного вида от 6 до 24 часов (*Gerbillus gerbillus*) (Navarro-Castilla et al., 2021), а у *G. andersoni* от 6 до 9 часов (St. Juliana et al., 2014, 2019). Возвращение на базовый уровень у полуденных песчанок происходило уже через сутки в обоих тестах, тогда как у песчанок рода *Gerbillus* — только через трое суток. Таким образом, полуденные песчанки, по сравнению с песчанками рода *Gerbillus*, демонстрируют сходную по силе, но более быструю динамику как скорости ответа на стрессор, так и скорости возвращения на исходный уровень. Можно предположить, что такая стресс-реактивность — это видовая особенность полуденных песчанок, которая согласуется с их высокой поведенческой реактивностью (Гольцман и др., 1994).

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим Р. Палме, С.В. Найдено, К.А. Роговина и Е. Кузнецову за консультации, А. Богатчук и П. Ключникову за помощь в подготовке образцов и проведении иммуноферментного анализа, а также всех коллег, принимавших участие в сборе материала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-14-00223, <https://rscf.ru/project/22-14-00223/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Все экспериментальные процедуры с животными были одобрены Комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН (протокол № 58).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Герлинская Л.А., Мошкин М.П., Евсиков В.И., 1993. Методические подходы к оценке стрессированности диких млекопитающих // Экология. № 1. С. 97–100.
- Гольцман М.Е., Попов С.В., Чабовский А.В., Борисова Н.Г., 1994. Синдром социальности. Сравнительное исследование поведения песчанок // Журнал общей биологии. Т. 55. № 1. С. 49–69.
- Иванов Е.А., Сидорчук Н.В., Рожнов В.В., Найдено С.В., 2014. Неинвазивная оценка активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у дальневосточного леопарда // Доклады Академии наук. Т. 456. № 5. С. 622–622.
- Колосова И.Е., Роговин К.А., Мошкин М.П., 2008. Возможность и ограничения неинвазивной оценки уровня стресса на основе определения глюкокортикоидов в фекалиях большой песчанки (*Rhombomys opimus*) // Зоологический журнал. Т. 87. № 1. С. 104–113.
- Павлова Е.В., Найдено С.В., 2008. Неинвазивный мониторинг глюкокортикоидов в экскрементах дальневосточного лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) // Зоологический журнал. Т. 87. № 11. С. 1375–1381.
- Селье Г., 1960. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз. 254 с.
- Суркова Е.Н., Кулик А.А., Кузнецова Е.В., Базыкина С.Г., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В., 2022. Черные земли Калмыкии: пустыня возвращается? // Природа. № 8. С. 13–20.
- Чабовский А.В., Суркова Е.Н., Савинецкая Л.Е., Кулик А.А., 2023. Расширение ареала и особенности популяции на волне расселения: пример полуденной песчанки (*Meriones meridianus* Pallas 1773, Muridae, Rodentia) в Калмыкии // Зоологический журнал. Т. 103. № 4. С. 443–452.
- Шолов И.А., 1984. Стресс как экологическое явление // Зоологический журнал. Т. 63. № 6. С. 805–812.
- Щупанов Н.А., 1987. Универсальная живоловка для мелких млекопитающих // Зоологический журнал. Т. 66. № 5. С. 759–761.
- Abelson K.S., Kalliokoski O., Teilmann A.C., Hau J., 2016. Applicability of commercially available ELISA kits for the quantification of faecal immunoreactive corticosterone metabolites in mice // In Vivo. V. 30. № 6. P. 739–744.
- Boonstra R., Boag P.T., 1992. Spring declines in *Microtus pennsylvanicus* and the role of steroid hormones // Journal of Animal Ecology. № 61. P. 339–352.
- Chen H., Yao H., Yang W., Fan P., Xiang Z., 2017. Assessing the utility of urinary and fecal cortisol as an indicator of stress in golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) // PeerJ. V. 5. P. e3648.
- Christian J.J., 1950. The adreno-pituitary system and population cycles in mammals // Journal of Mammalogy. № 31. P. 247–259.
- Chuang A., Peterson C.R., 2016. Expanding population edges: theories, traits, and trade-offs // Global change biology. V. 22. № 2. P. 494–512.
- Clobert J., Le Galliard J.F., Cote J., Meylan S., Massot M., 2009. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations // Ecology letters. V. 12. № 3. P. 197–209.
- Cote J., Clobert J., Brodin T., Fogarty S., Sih A., 2010. Personality-dependent dispersal: characterization, ontogeny and consequences for spatially structured populations // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. V. 365. № 1560. P. 4065–4076.
- Creel S., Dantzer B., Goymann W., Rubenstein D.R., 2013. The ecology of stress: effects of the social environment // Functional ecology. V. 27. № 1. P. 66–80.
- Fanson K.V., Best E.C., Bunce A. et al., 2017. One size does not fit all: monitoring faecal glucocorticoid metabolites in marsupials // General and Comparative Endocrinology. V. 244. P. 146–156.
- Goymann W., Mostl E., Van't Hof T., East M.L., Hofer H., 1999. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta* // General and comparative endocrinology. V. 114. № 3. P. 340–348.
- Josserand R., Dupoué A., Agostini S., Haussy C., Le Galliard J.F., Meylan S., 2017. Habitat degradation increases stress-hormone levels during the breeding season, and decreases survival and reproduction in adult common lizards // Oecologia. № 18. P. 75–86.
- Koolhaas J.M. et al., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. T. 23. № 7. P. 925–935.
- Kretzschmar P., Gansloßer U., Dehnhard M., 2004. The development of a non-invasive method to analyse the effect of season, mating behavior and fighting on gonadal activity of male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) in South Africa // Hormones and Behavior. № 45. P. 1–9.
- Kuznetsov V.A., Tchabovsky A.V., Kolosova I.E., Moshkin M.P., 2004. Effect of habitat type and population density on the stress level of midday gerbils (*Meriones meridianus* Pall.) in free-living populations // Biology Bulletin. V. 31. № 6. P. 749–754.

- Möstl E., Palme R., 2002. Hormones as indicators of stress // Domestic animals endocrinology. V. 23. № 1. P. 67–74.
- Navarro-Castilla Á., Garrido M., Hawlena H., Barja J., 2021. Non-invasive monitoring of adrenocortical activity in three sympatric desert gerbil species // Animals. V. 11. № 1. P. 75.
- Novikov E., Moshkin M., 1998. Sexual maturation, adrenocortical function and population density of red-backed vole, *Clethrionomys rutilus* (Pall.) // Mammalia. № 62. P. 529–540.
- Palme R., 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems // Physiology & behavior. № 199. P. 229–243.
- Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El-Bahr S.M., Mostl E., 2005. Stress hormones in mammals and birds. Comparative aspect regarding metabolism, excretion, and non-invasive measurement in fecal samples // Annals of the New York Academy of Sciences journal. V. 1040. № 1. P. 162–171.
- Palme R., Touma C., Arias N., Dominchin M.F., Lepschy M., 2013. Steroid extraction: get the best out of faecal samples // Wiener Tierärztliche Monatsschrift. № 100. P. 238–246.
- Shang G., Du S., Yang Y., Wu Y., Cao Y., Bian J., 2022. Is negative density-dependent reproduction regulated by density-induced stress in root voles? Two field experiments // Ecology and Evolution. V. 12. № 5. P. e8927.
- St. Juliana J.R., Khokhlova I.S., Wielebnowski N., Kotler B.P., Krasnov B.R., 2014. Ectoparasitism and stress hormones: Strategy of host exploitation, common host–parasite history and energetics matter // Journal of Animal Ecology. № 83. P. 1113–1123.
- St. Juliana J.R., Bryant J.L., Wielebnowski N., Kotler B.P., 2019. Physiological validation of a non-invasive method to evaluate adrenocortical activity and the time course for the excretion of stress hormones in the feces of three species of desert gerbils // Israel Journal of Ecology and Evolution. № 65. P. 21–27.
- Stead S.K., Meltzer D.G.A., Palme R., 2000. The measurement of glucocorticoid concentrations in the serum and faeces of captive African elephants (*Loxodonta africana*) after ACTH stimulation: research communication // Journal of the South African Veterinary Association. V. 71. № 3. P. 192–196.
- Surkova E., Popov S., Tchabovsky A., 2019. Rodent burrow network dynamics under human-induced landscape transformation from desert to steppe in Kalmykian rangelands // Integrative Zoology. V. 14. № 4. P. 410–420.
- Tchabovsky A.V., Savinetskaya L.E., Surkova E.N., Ovchinnikova N.L., Kshnyasev I.A., 2016. Delayed threshold response of a rodent population to human-induced landscape change // Oecologia. № 182. P. 1075–1082.
- Tchabovsky A., Savinetskaya L., Surkova E., 2019. Breeding versus survival: proximate causes of abrupt population decline under environmental change in a desert rodent, the midday gerbil (*Meriones meridianus*) // Integrative Zoology. V. 14. № 4. P. 366–375.
- Touma C., Palme R., 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation // Annals of the New York Academy of Sciences. V. 1046. № 1. P. 54–74.

VALIDATION OF A METHOD FOR MEASURING THE FECAL GLUCOCORTICOID METABOLITES IN THE MIDDAY GERBIL (*MERIONES MERIDIANUS* PALLAS 1773, MURIDAE, RODENTIA): BIOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL APPROACHES

E. N. Surkova¹, *, L. E. Savinetskaya¹, A. V. Tchabovsky¹

¹A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: immaly@yandex.ru

Estimating the level of stress in natural populations opens the opportunities for studying various populational processes, including population dynamics, range expansions, and colonization. Over two last decades, methods for a non-invasive assay of the glucocorticoid levels have been actively developed and widely implemented in various biological fields. They are most suitable for assessing long-term stress, but require a validation procedure for each new animal species studied. We have conducted a biological and physiological validation of a non-invasive method for the determination of fecal glucocorticoid metabolites (FGM) in the Midday gerbil, *Meriones meridianus*. Both methods showed a significant increase in the concentration of FGM after a similar time after manipulations (4–5 h after the stressful procedures or the administration of ACTH), and peak values were twice the baseline. Saline injection (control group) did not cause a significant increase in FGM concentration, this confirming that the non-invasive measuring a smoothed level of FGM is more suitable for assessing a long-term stress, in contrast to the assay of glucocorticoids in the blood. The biological validation was as effective as ACTG-test, which is commonly considered more reliable. Given the low invasiveness of the biological method, this expands the possibilities for its application. This research was supported by the Russian Science Foundation (project number 22-14-00223, <https://rscf.ru/project/22-14-00223/>).

Keywords: rodent, physiology, stress, non-invasive study