

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫЙ АНАЛИЗ ДИОКСИНОВ И ДИОКСИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ DR.CALUX® В МЯСЕ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Л.П. Сатюкова, кандидат ветеринарных наук, заведующая отделом
ФГБУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория (ФГБУ ЦНМВЛ),
тел. 8 (495) 700-01-37

Ключевые слова: диоксины и диоксиноподобные вещества, методы определения, скрининговый метод DrCalux®, влияние диоксинов на организм сельскохозяйственной птицы.

Диоксины поражают большинство форм живой матери– от бактерий до теплокровных. Кумулятивные свойства делают каждое последующее поступление диоксинов и диоксиноподобных веществ в организм токсичнее предыдущего. Они проявляют высокую токсичность в малых дозах (минимальная токсическая доза для животных составляет 0,5 – 1 мкг/кг массы тела). Превышение остаточных количеств диоксинов и диоксиноподобных веществ неоднократно становилось причиной массовых отравлений диких и сельскохозяйственных животных, человека, а так же выбраковки продукции животноводства.

Введение. В настоящее время ограниченное число лабораторий проводит анализ на диоксины любой степени сложности, в частности, их количественное определение в различных матрицах (биологических жидкостях организма, объектах окружающей среды, кормах, продуктах растительного и животного происхождения и др.). Такие исследования связаны с большими методическими, техническими и материальными трудностями.

Одним из современных методов является Dr.Calux®- скрининговый метод определения диоксинов и диоксиноподобных веществ, предложенный голландскими учеными (2). Данный метод имеет ряд преимуществ перед другими, и с его помощью можно осуществлять контроль безопасности сельскохозяйственной продукции и продуктов питания.

Ключевые методы определения диоксинов в различных объектах. При всем многообразии методы анализа диоксинов и диоксиноподобных веществ, включают ряд обязательных этапов: отбор и подготовку пробы, экстракционное извлечение, очистку экстрактов от мешающих примесей биогенного и антропогенного происхождения, хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое определение. Сочетание газовой хроматографии высокого разрешения с масс-спектрометрическим анализом обеспечивает возможность определения отдельных, наиболее токсичных

изомеров на уровне следовых количеств. Эти анализы трудоемки, продолжительны и дороги. В данных методах информативное значение имеют факты выявления токсикантов каждого в отдельности. Суммарная оценка в ТЕQ (ToxicEquivalencyQuantity) производится в связи с тем, что в природу диоксины поступают в составе сложных смесей, а не в виде отдельных веществ (3,6).

Материалы и методы. Объектом исследования служили клинически здоровые цыплята-бройлеры массой 1,8-2,2кг в возрасте 1,0-1,5 месяцев. Материалом для проведения исследований служила мышечная ткань цыплят-бройлеров данной группы.

Протокол анализа. Исследование диоксинов по методу DrCalux® является достаточно новым и малоизвестным методом, однако число лабораторий, внедряющих его, растет. Причиной этому служат достоинства метода, а именно: доступность и простота, выполнение исследования в сжатые сроки, высокие производительность и чувствительность метода, использование доступных реагентов, исследование широчайшего спектра матриц (пищевые продукты, корма, сырье и т.д.). Результат анализа выдается в виде суммы токсических эквивалентов. Кроме того, метод позволяет рассчитать отдельно содержание диоксинов и ПХБ, что имеет большое значение, т.к. с 2006 года вступили в силу новые ПДК для диоксинов и ПХБ (1,2).

Таблица 1 - Нормы содержания диоксинов и их аналогов в различных объектах

Матрица	Норма содержания диоксинов и диоксинподобных веществ, нг ТЭК ВОЗ/кг жира
Растительный корм (комбикорма)	1,25 – 1,5
Корм животного происхождения	3,0
Яйцо	5,0
Птица (мясо)	3,0
Птица (печень)	10,0

Таблица 2 - Исследование мышечной ткани цыплят-бройлеров и кур

№ пробы	Содержание диоксинов и ДПВ в мышечной ткани цыплят-бройлеров, нг ТЭК ВОЗ/кг жира	M±m, нг ТЭК ВОЗ/кг жира, где n=9	N, нг ТЭК ВОЗ/кг жира
1	0,54	1,21±0,17*	3,00
2	0,84		
3	0,91		
4	1,02		
5	1,19		
6	1,26		
7	1,3		
8	1,64		
9	2,17		

*Статистически рассчитанный достоверный результат ($p \leq 0,05$)

Таблица 3 - Положительные пробы в мясе птицы

Исследуемый объект	Диоксины + ПХБ, нг ТЭК ВОЗ/кг жира	
	Полученный результат	Нормативное значение
Мясо птицы (бедро)	3,68	3,0
Мясо птицы (грудка)	4,10	3,0

Структура анализа включает в себя стандартный набор этапов: гомогенизация проб, экстракция, очистка, культивация клеток Calux®, экспонирование клеток диоксинами, измерение биолюминесценции, обработка результатов.

Принцип метода: диоксины связываются в клетке Calux® с арилгидрокарбонным рецептором (AhR), затем комплекс переносится в ядро клетки и взаимодействует со специфической последовательностью ДНК, что запускает процесс экспрессии генов фермента люциферазы. Затем, после освобождения люциферазы, путем лизирования клеток добавлением пигмента люциферина инициируется свечение люциферазы. С помощью прибора люминометра измеряется интенсивность люминесценции, которая пропорциональна содержанию диоксинов в исследуемой пробе.

Разделение диоксинов и ПХБ. Метод DrCalux® позволяет отдельно рассчитать содержание в пробе диоксинов и ПХБ. Метод основан на различном хроматографическом поведении диоксинов и ПХБ в колонке с оксидом алюминия.

Полученные элюенты испаряют в слабом токе азота, затем переносят в малые конические пробирки, чтобы в дальнейшем экспонировать клетки.

Культивирование и поддержание клеток Calux®. В методе Dr.Calux® используются генно-модифицированные клетки опухоли печени крысы со встроенным геном светлячка. Клетки культивируются в CO₂-инкубаторе при 37°C с 5,0%-CO₂ и в условиях 100%-влажности. Для них используют среду альфа-МЕМ с добавлением глутамина и эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС).

После определения люминесценции ее оставляют раствором гидроксида натрия во избежание взаимных помех между лунками. После измерения люминесценции люминометром, подключенным к компьютеру, специальная программа подсчитывает концентрации диоксинов и диоксинподобных веществ и строит калибровочный график.

Затем, пользуясь таблицей норм концентраций для каждого вида исследуемого материала (таблица 1), отбираются ложные и истинные результаты. В случае получения подозрительного результата и для подтверждения положительного результата, пробу необходимо переделать еще раз. Результаты выдаются в нг/кг жира (нг/л) или в пг/г (пг/мл). Предел обнаружения от 0 до 3 пмоль/лунка.

Для исследования были взяты различные образцы мяса (мышечной ткани) цыплят-бройлеров, а также, проведена статистическая обработка результатов.

Собственное исследование. Исследование проводили в мышечной ткани цыплят-бройлеров. В качестве объекта для исследования было взято 9 навесок массой 120 г (таблица 2) от цыплят-бройлеров разных возрастов.

Большая часть проб мышечной ткани цыплят-бройлеров находилось в пределах допустимого уровня и имела отрицательный результат, т.е. количество диоксинов, выделенных из них, находилось в пределах нормы.

Однако в двух образцах куриного мяса (бедро и грудка) было обнаружено превышение нормативного значения. Повторный анализ подтвердил повышенное содержание диоксинов и диоксиноподобных веществ в указанных пробах (таблица 3).

Заключение. Экспериментальная апробация метода DrCalux® показала, что данный метод применим для количественного определения диоксинов и диоксиноподобных веществ в животных тканях и объектах окружающей среды с высокой точностью результатов измерения.

Использование описанного метода позволяет наладить путь к мониторингу диоксинов и диоксиноподобных веществ в различных биологических объектах, что в данный момент целесообразно и актуально для решения вопросов поддержания экологического равновесия в природе и сохранения здоровья человека.

Библиографический список:

1. Галкин А. Биосистема для определения диоксинов в кормах / А. Галкин // Комбикорма. – 2011. - №8. – С. 97-98.
2. Галкин А., Бениш П. Диоксины в кормах. Риски для человека // Комбикорма. 2011. № 2. С. 64 – 67.
3. Желтов В.А. Особенности диагностики отравлений животных диоксинами / В.А. Желтов // Ветеринария. – 2002. - №4. - С. 35-38.
4. Желтов В.А. Токсичность 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксина для сеотскохозяйственных животных / В.А. Желтов, А.Л. Лавров, Н.Г. Пименова // Токсикологический вестник. – 2004. - №1. – С. 30-34.
5. Сарапулова Г.И. Экологическая безопасность продуктов питания. Диоксины // ж. Безопасность жизнедеятельности. 2005. № 10. С. 28–30.
6. Тремасов М.Я. Диоксины: источники загрязнения, опасность, предупреждение отравлений / М.Я. Тремасов, В.А. Новиков // Ветеринария. – 2004. - №5. – С. 46-50.

VETERINARY AND SANITARY ANALYSIS OF DIOXINS AND DIOXIN-LIKE SUBSTANCES BY DR. CALUX® IN MEAT OF BROILER CHICKENS

L.P.Satyukova

Keywords: *dioxins and dioxin-like substances, hygiene cultivation, screening method Dr.Calux®, dioxins in meat of broiler chickens.*

Dioxins affect most forms of living matter - from bacteria to warm-blooded animals. Cumulative properties make each subsequent intake of dioxins and dioxin-like substances in the body more toxic than previous. They exhibit high toxicity at low doses (minimal toxic dose for animals is 0.5 - 1 mg / kg body weight). Excess residual amounts of dioxins and dioksin-like substances often become a cause of mass poisoning of wild and farm animals, humans, as well as culling of livestock products (3,4,5).