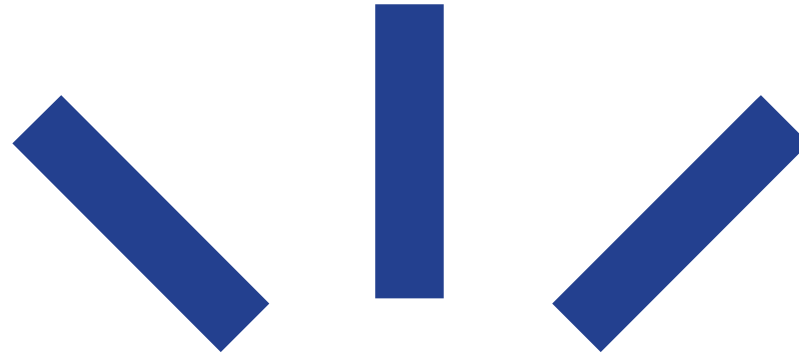


Tutkimuspäällikkö
Pekka Kilpeläinen
pekka.t.kilpelainen@oulu.fi
<https://www.oulu.fi/kajaani/nyliopistokeskus/>



Kalojen stressin seuranta kortisolia vedestä mittaamalla - mittausmenetelmien arviointia ja uuden kehittämistä

Pekka Kilpeläinen
EMKR:n innovaatiopäivät
Marraskuu 2021



Oulun yliopiston mittaustekniikan yksikkö, Kajaanin yliopistokeskus



Soveltavaa tutkimusta elinkeinoelämälle

- Terveys & hyvinvointi, Cleantech, biotalous monelta kantilta ja kahden muun alueen osaamista yhdistäen
- Mittaaminen, analytiikan ja mittalaitteiden kehitys keskiössä
- Budjetista noin 85 % ulkoista rahoitusta
- Noin 30 henkilöä töissä

Nykyisiä hankkeita esimerkiksi:

- ERA-Net ICT Agrifood: Releasing the Potential of ICT for Sustainable Milk and Beef Cattle Value Chains
- Tulossa -> ERA-Net ForestValue: WOODforHEALTH
- Valmisteluhankkeet sekä Itämeren interreg-että Kolarctic-ohjelmalta – biomassoja & luonnontuotteita
- Rakennerahastot: CEMIS-kehitysohjelma yhdessä muiden Kainuun TKI-toimijoiden kanssa
- Maaseuturahasto: Hyvää karjalle EIP-hanke (valtakunnallinen)
- Maaseuturahasto: Puurakentamisen terveysvaikutukset



Kalojen stressi



Luke-Paltamon kalanviljelyn tutkimusasema

Kasvatusolosuhteiden pitäminen sellaisena, että stressitaso ei nouse on tärkeää

- Stressi altistaa infektioitaudeille (globaalisti 30 % kalaviljelyn tuotosta menetetään tauteihin)
- Lisääntyminen hidastuu, poikasten ongelmat

Stressaavia tekijöitä

- Kemialliset: saasteet, hapen puute, ruuan puute / ylimäärä, suolapitoisuus, pH
- Fysikaaliset: vangitseminen, käsittely, istukkaiden kuljetus, lämmön vaihtelu
- Koettu stressi: säikähdykset, ääni, pedot, valaistus, muiden kalojen määrä & käytös

Vasteet

- Primaariset: hormonitasojen muutokset, kortisoli, adrenaali
- Sekundaariset: aineenvaihdunnan muutokset, esim. glukoosi-aineenvaihdunta, immuunipuolustusjärjestelmän toiminnan heikkeneminen
- Tertiaariset: terveyden muutokset (-> kasvu, lisääntyminen, vastustuskyky), käytös (syöminen, aggressiivisuus)



Kalojen stressin mittaaminen

Mitä mitataan

- Käytännössä aina stressihormoni kortisolia
- Spesifisesti stressiin kytkeytyvä ja stabiili analyytti

Mistä mitataan

- Plasma, koko kala, ulosteet, suomut, lima
- Uimavesi
 - ❖ Kortisoli rasvaliukoisena diffundoituu ulos kalasta
 - ❖ Eritys korreloi plasman pitoisuuteen
 - ❖ Ulos erittyvä kortisoli on vapaata, eli biologisesti aktiivista kortisolia
 - ❖ Kortisoli säilyy hyvin vedessäkin
 - ❖ Yhdellä mittauksella saadaan keskiarvo koko kalapopulaatiosta

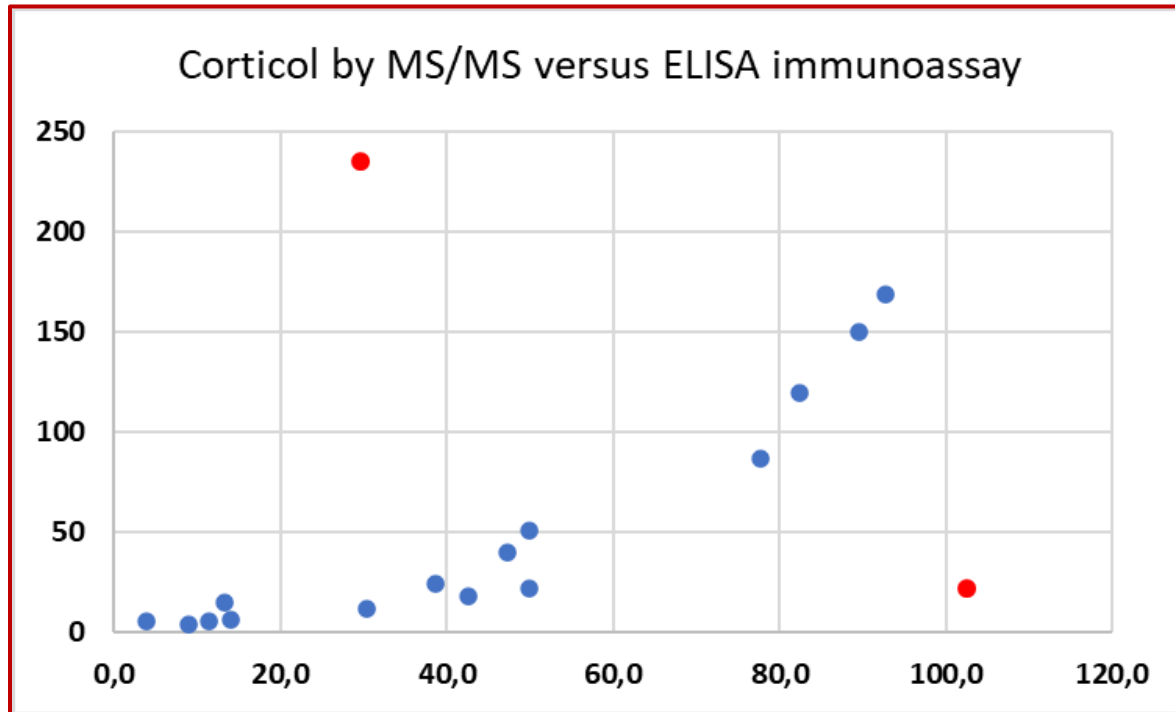
- Uimavesi jatkoa...
 - ❖ Mutta yksittäisen kalan mittaaminen vaatii erittäin herkän mittauksen ja näytteen konsentroinnin
 - ❖ Vie aikaa laboratoriossa

Mittausmenetelmät

- Massaspektrometria, herkkyys esikäsittelyn kanssa yksittäisiä pikogrammoja millilitrassa
- Erilaiset immunomääritykset -> pääsevät herkkyydessä esikäsittelyn (konsentroinnin) kanssa luonnonvesissä hyvin lähelle massaspektrometrian herkkyyttä, tarkkuus (?)
- Nopeiden biosensorimittauksien kehitystyötä meillä ja muualla -> riittävän herkkyyden saavuttaminen luonnonvesissä isoin haaste



Massaspektrometria versus immunomenetelmät (ELISA)



ELISA tarkasteluun:

- UHPL-MSMS-analyysi tehty käyttäen sisäisenä standardina deuteriumilla leimattua kortisolia, joka lisättiin jo esikäsitteilyn alussa
- ELISA-kitin määrittelyalueen pitäisi olla näytteiden konsentration huomioiden 0,5 pg / ml – 120 ng/ml
- Todellisuudessa on ~ 10 pg/ml – 80 pg/ml
- Kompetitiivinen mittausmuoto -> näytteen aiheuttama häiriö suurentaa tuloksia oikeaan verrattuna ja voi pudottaa paljonkin määrittelyalueen ylärajaa
- Kaupalliset immunokitit on – etenkin silloin kuin niitä käytetään “eksoottisen” näyttemateriaalin kanssa - testattava huolellisesti ennen määrittelyä !



Massaspektrometria versus immunomenetelmät (ELISA)

Näyte	1. määrittys	2. määrittys	Näyte	1. määrittys	2. määrittys
1	ND	4	1	12,7	10,9
2	25	18	2	10,4	8,8
3	22	17	3	7,4	6,8
4	27	21	4	7,4	6,6
5	232	237	5	4,4	3,6
6	133	167	6	4,8	4,4
7	163	169	7	4,5	4,6
8	5	6	8	253,9	254,5
9	4	4	9	105,7	100,1
10	93	80	10	131,1	131,3
11	6	5	11	110,0	115,0
12	6	6	12	58,1	56,2
13	15	14	13	88,1	88,3
14	12	11	14	116,5	108,8
15	24	20			
16	119	119			
17	53	48			
18	41	38			

Kortisolipitoisuuksien yksikkö on pg/ml

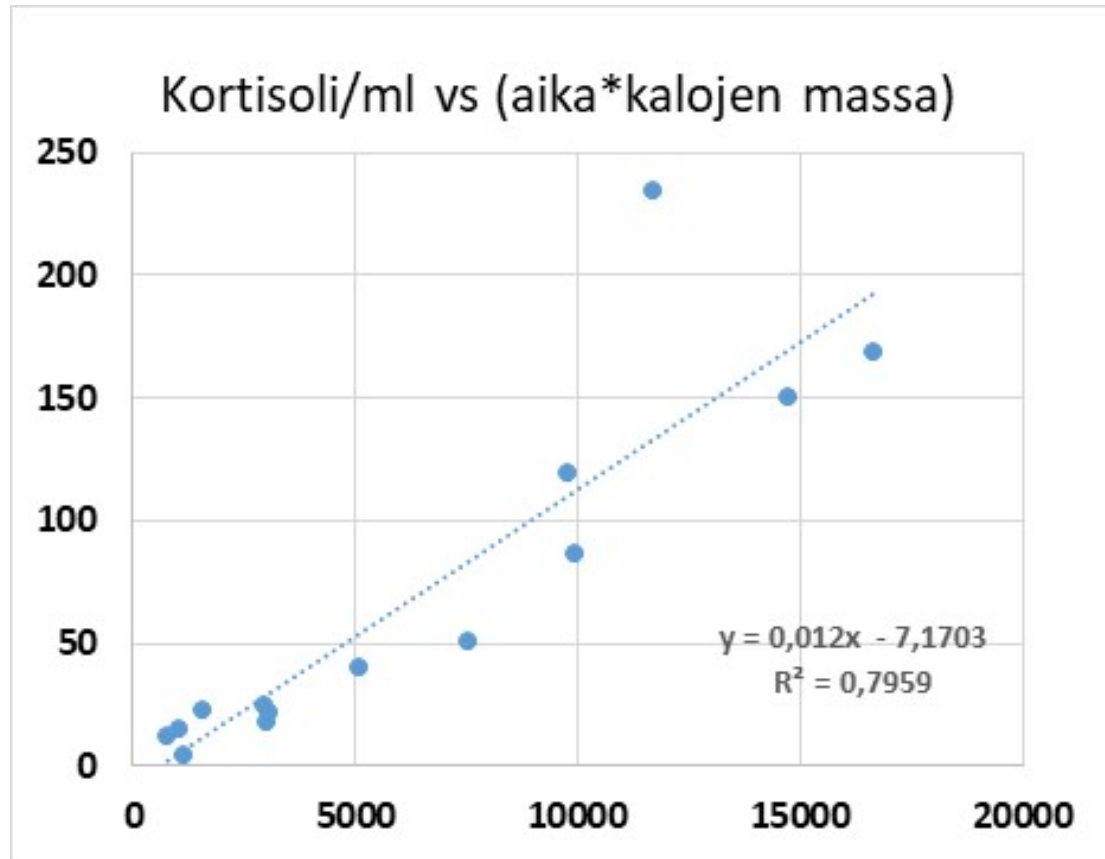
Ja sitten UHPLC....

- Kaksi eri näytesarjaa luonnonvetisistä kasvatusaltasta määritetty kahtena kokonaan erillisenä rinnakkaismäärittäyksessä, rinnakkaisten välissä oli myös näytteiden pakastus





Miten istukkaiden kuljetus stressaa?



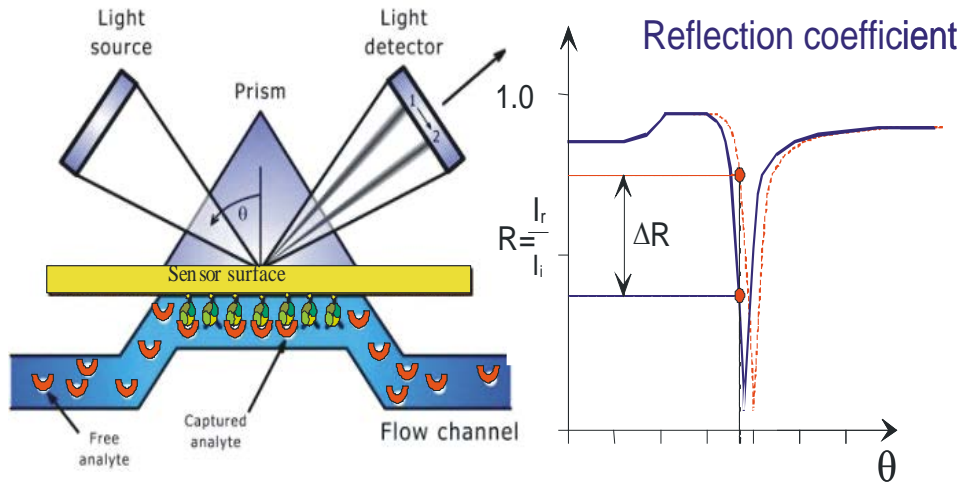
Seurattiin kolmea taimenistukkaiden kuljetusta

- Näytteen altaasta, kuljetustankista alkumatkasta, ja tankista aina kun kaloja laskettiin veteen
- Tankkeja mukana yhteensä 7 kpl
- Kuljetusajat 3-5 tuntia
- Kalojen massa tankissa 17.5 – 55.6 kg

- Kun siirrettiin kerralla 3 tankkia, näistä yhdessä kortisolia oli muita selvästi enemmän -> olosuhteilla voi todella olla merkitystä
- Kahdessa tankissa oli muita vähemmän kaloja, näiden kortisolipitoisuudet jäivät hieman suoran alle.



Pintaplasmoniresonanssi (SPR) –teknologia



Kehitystarpeet

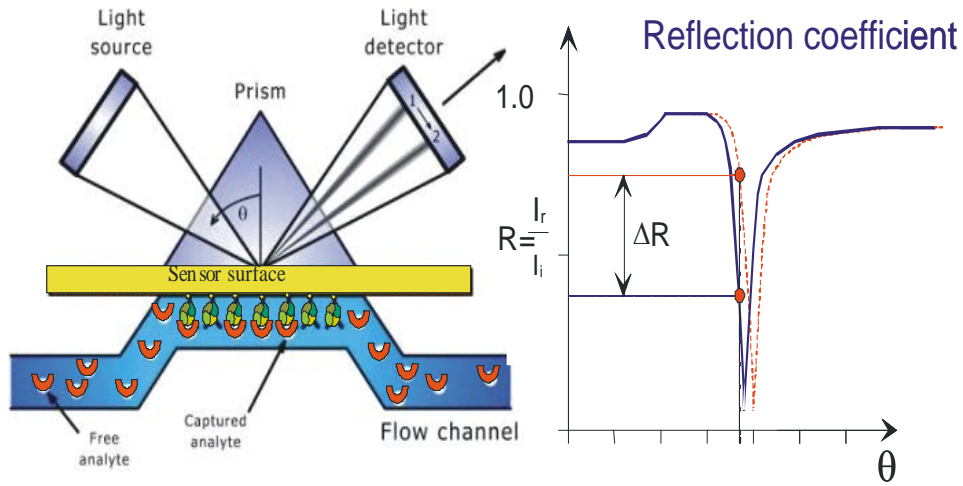
- Nopeampi ja vähemmän asiantuntemusta vaativa mittaus kuin LC-MSMS, edullisempi laitteisto
- Nopeampi kuin immunomääritys, mielellään edullisempi laitteisto
- Ihanteellinen lopputavoite kenttäkelpoinen mittaus
- Herkkyys joko suoraan riittävä veden kortisolin mittaamiseen, tai riittävä, jotta konsentroidaika saadaan lyhyeksi
- Nopeampi vesinäytteiden konsentroitimenetelmä auttaisi sekä asiaa

Kalojen stressin mittaaminen:

- Sähkökemiallinen mittaus ei olisi tarpeeksi herkkä
- Pintaplasmoniresonanssimittauksella voi päästä ilman erikoiskikkojakin tasolle $< 100 \text{ pg/ml}$.
- Se on myös käytännössä lähes tosiaikainen mittaus
- Luonnossa menestyvät istukkaat – hankeosiossa mahdollisuus proof-of-concept-tyyppiseen kokeiluun



SPR–teknologiaan perustuva biosensori kortisolin mittaamiseksi



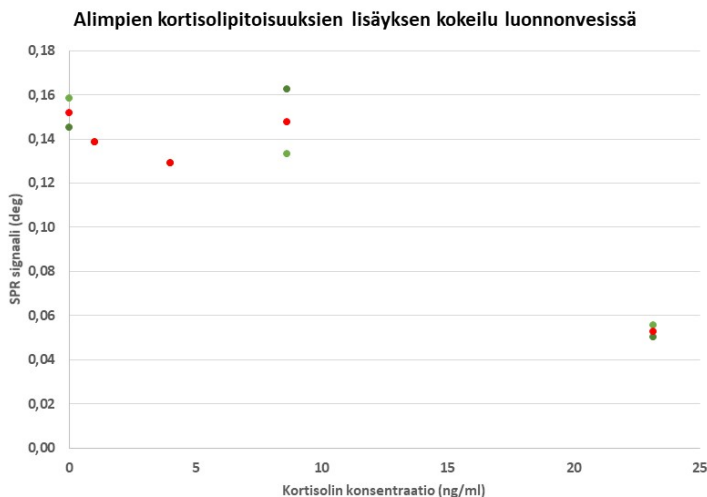
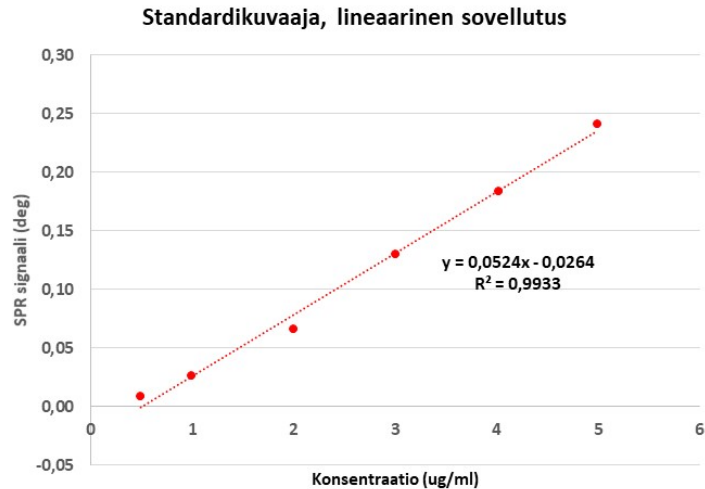
Proof-of-concept

- Täysin ”kotitekoinen” sensoripinta
- Kultapinnalle kiinnitettiin ovalalbumiiniproteiinin ja kortisolin konjugaatti
- Näytteeseen lisättiin kortisolin vasta-ainetta
- Näytevirtauksessa sensoripinnan yli, mitä enemmän näytteessä on kortisolia, sitä vähemmän näytteeseen lisättyä vasta-ainetta sitoutuu sensoripinnan ovalalbumiini-kortisoliin





SPR–teknologiaan perustuva biosensori kortisolin mittaamiseksi



Kesäkokeilun tulokset

- Näytteen yliajon jälkeen sitoutunut kortisoli täytyy saada pestyä pois pinnalta -> tämä vaihe oli koitua ylivoimaisen vaikeaksi
- Toimiva pesu inaktivoi pinnan muutaman näyteajon jälkeen
- Ratkaisu löytyi ”viime hetkillä” -> ”raju” kemikaali, mutta nopea pesu ja neutralointi
- Standardisuora korkeilla pitoisuuksilla puskurissa
- Sen jälkeen herkkyden testaamista lisäämällä kortisolia luonnonveteen
- Kokonaan optimoimaton sensoripinta näyttäisi pääsevän herkkyteen ~ 10 ng/ml
- Luonnonvesi vaikutti yllättävän vähän!
- Jatketaan kevättalvella -> kokeillaan myös esiaktivoitua kaupallista levyä, johon saanee enemmän ovalalbumiinikonjugaattia kiinni
- Välitavoite päästä herkkyteen, jossa riittäisi noin 10 x konsentroida, työtä tehdään myös konsentroidintimenetelmän kanssa



Kiitos!

