

**Ветеринария**

УДК 619:[577.17:612.1:618.2]636.2.034

DOI:10.31857/S2500-2627-2020-2-70-73

**ГОРМОНАЛЬНЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ МОЛОЧНЫХ КОРОВ  
В РАННИЙ ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ**

**А.Г. Нежданов<sup>1</sup>**, доктор ветеринарных наук, **С.В. Шабунин<sup>1</sup>**, академик РАН,  
**В.И. Михалев<sup>1</sup>**, доктор ветеринарных наук, **Н.В. Пасько<sup>1</sup>**, кандидат биологических наук,  
**В.А. Сафонов<sup>2</sup>**, доктор биологических наук

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,  
394087, Воронеж, ул. Ломоносова 114б,  
E-mail: mikhalevviit@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН,  
119991, Москва, ул. Косыгина, 19  
E-mail: safrus2003@mail.ru

*Представлены результаты исследований по оценке изменений гормонального и цитокинового статуса коров голштинской породы (n=25) в период эмбриогенеза при физиологическом формировании беременности, задержке развития и гибели эмбриона. В динамике гестации в сыворотке крови определяли содержание прогестерона, кортизола, интерлейкина IL-2, фактора некроза опухолей TNFα, интерферонов γ и τ. Установлено, что у коров с нарушением эмбрионального развития концентрация в крови прогестерона была ниже, чем у животных с физиологическим течением беременности, на 14,0-30,1%, кортизола – на 17,8-35,2%, интерферона-τ – на 22,0-37,7% при превышении показателей IL-2 на 46,5-31,0%, TNFα – на 11,7-36,2% и интерферона-γ – на 44,0-78,0%. Нарушение в организме осемененных и оплодотворенных животных гормонально-цитокинового баланса является универсальным патогенетическим механизмом развития ранних эмбриопатий и выступает ключевым моментом в клинической манифестации данных патологий.*

**HORMONAL AND CYTOKINE BLOOD PROFILE OF DAIRY COWS  
IN THE EARLY GESTATION PERIOD**

**Nezhdanov A.G.<sup>1</sup>, Shabunin S.V.<sup>1</sup>, Mikhalev V.I.<sup>1</sup>, Pasko N.V.<sup>1</sup>, Safonov V.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy,  
394087, Voronezh, ul. Lomonosova, 114-b  
E-mail: mikhalevviit@yandex.ru

<sup>2</sup>Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of Russian Academy of Sciences,  
119991, Moskva, ul. Kosygina, 19  
E-mail: safrus2003@mail.ru

*The results of the studies on the evaluation of changes in the hormonal and cytokine status of the black-and-white Holstein cows (n=25) during the period of embryogenesis at the physiological formation of pregnancy, intrauterine growth retardation and the Embryonic demise are presented. The level of progesterone, cortisol, interleukin IL-2, tumor necrosis factor TNFα, interferon-γ and interferon-tau were determined in the dynamics of gestation in blood serum. It was found out that in case of embryogenesis disorder the concentration in blood of progesterone was lower than in animals with physiological course of pregnancy by 14.0-30.1%, cortisol – by 17.8-35.2%, interferon-tau – by 22.0-37.7% at excess of IL-2 indexes by 46.5-31.0%, TNFα – by 11.7-36.2%, and interferon-γ – by 44.0-78.0%. It is concluded that the disturbance of the hormonal-cytokine balance in the organism of inseminated and fertilized animals is a universal pathogenesis of early embryopathies, and is a key point at the clinical manifestation of these pathologies.*

**Ключевые слова:** коровы, эмбриогенез, задержка развития, гибель эмбриона, гормоны, цитокины

**Key words:** cows, embryogenesis, intrauterine growth retardation, embryonic demise, hormones, cytokines

Высокая степень проявления эмбриональных потерь на ранних сроках гестации и связанная с ней низкая плодovitость маточного поголовья животных – одна из актуальных проблем современного высокопродуктивного молочного скотоводства [1-4]. Центральное место в концепции формирования и проявления эмбриопатий отводится оксидативному стрессу, дисбалансу гормонального и цитокинового профиля, складывающемуся при взаимодействии тканевых эндометриальных структур матери и трофобластных структур формирующегося эмбриона [4-6]. В установлении этого взаимодействия участвуют половые и кортикостероидные гормоны и цитокины (интерлейкины, интерфероны и другие соединения данного класса биологического действия). Стероидные гормоны, синтезируемые половыми и надпочечными железами, обеспечивают функциональную дифференциацию эндометриальных структур, мобилизацию энергетических ресурсов и иммуносупрессию в формирующейся

системе мать-зародыш-плод, необходимых для успешной имплантации и плацентации эмбриона. Цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками маточно-плацентарного комплекса, представляют собой группу полипептидных медиаторов, составляющих новую самостоятельную систему регуляции гемостаза, которая находится в тесном взаимодействии с нервной и эндокринной системами [7, 8]. Действуя ауто-пара-эндокринно, данные соединения определяют формирование локальной воспалительной реакции в матке, необходимой для имплантации бластоцисты, характер эндокринной гипоталамо-гипофизарно-гонадальной секреции и иммуотрофические взаимоотношения в системе мать-зародыш-плод. Особое место в системе цитокинов принадлежит интерферону-τ (INFτ), синтезируемому в естественных условиях трофобластными клетками зародыша и обеспечивающему иммунологическую толерантность матки к принятию эмбриона путем пролонгации прогестероносинтезиру-

ющей функции желтого тела и ингибирования продукции провоспалительных интерлейкинов [9-12].

В этой связи углубленное изучение иммунноэндокринных механизмов регуляции эмбрионального развития и патогенетических механизмов формирования эмбриопатий у продуктивных животных может составить основу разработки новых более эффективных средств и методов контроля эмбрио-фетогенеза, повышения фертильности. Однако исследования в этом направлении крайне ограничены.

Цель работы – оценка гормонального и цитокинового статуса коров в период раннего эмбриогенеза при физиологическом формировании эмбриона, задержке его развития и гибели.

**Методика.** Исследования проведены на 25 коровах голштинской породы со среднегодовой продуктивностью 6500-7500 кг молока, принадлежащих сельхозпредприятию «СП Вязноватовка» Воронежской области. В день осеменения (О), в период раннего бластогенеза (8-9 дни), имплантации эмбриона (15-16 дни), формирования первичных половых органов (32-33 дни) и при завершении эмбрионального периода (60-62 дни) от коров получали венозную кровь, в сыворотке которой методом ИФА определяли содержание прогестерона и кортизола с использованием тест-систем ЗАО «НВО Иммунотех» (Россия) и интерлейкина IL-2, фактора некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), интерферона- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), интерферона-*tau* (INFT) с использованием видоспецифичных тест-систем Elisa Kit (Cloud-Clone Corp., USA). Все коровы на 32-33, 38-45 и 60-65 дни после осеменения подвергались клинико-эхографическому исследованию с использованием ультразвукового сканера EasyScan-3 (Великобритания), оборудованного линейным датчиком с частотой 7,5 МГц. По результатам этих исследований животные были разделены на три группы. В I группу были включены коровы с физиологическим течением беременности (n=9 гол.), во II – с задержкой развития эмбриона (n=8 гол.) и в III – с гибелью эмбриона (n=8 гол.). Диагноз ставили на основании наличия/отсутствия эмбриона в матке и учета его метрических показателей [13].

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием прикладной статистической программы «Statistica 8.0» («Stat-Soft, Inc», USA). Результаты выражали как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Коррелятивные связи между показателями выявляли с помощью непараметрических критериев Спирмена ( $r_s$ ).

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что уже в день осеменения прогестеронсинтезирующая функция яичников у коров с последующей задержкой развития эмбриона и его гибелью оказалась ниже, чем у животных с физиологическим формированием эмбриона (табл. 1). Концентрация прогестерона в сыворотке крови коров II и III групп была ниже на 22,1-24,4%. На этапе раннего бластогенеза (8-9 дни) разница в содержании прогестерона составила соответственно 15,2 и 28,0%, в период имплантации (15-16 дни) – 14,0 и 30,1%, закладки первичных половых органов (32-33 дни) – 17,7 и 27,2%. При завершении эмбриогенеза у коров с задержкой развития эмбриона количество прогестерона в сыворотке крови оказалась ниже на 16,8% в сравнении с животными I группы, а при гибели зародыша – в 4,4 раза.

В физиологических концентрациях прогестерон обеспечивает секреторную и трофическую функцию матки, подавляет контрактильную активность миометрия и иммунный ответ матери на отцовские антигены

**Табл. 1. Концентрация стероидных гормонов в сыворотке крови коров в разные сроки гестации, н Моль/л**

День после осеменения	Группа		
	I	II	III
<b>Прогестерон</b>			
О	1,23±0,12	0,97±0,09	0,93±0,06
8-9	16,4±0,7	13,9±0,4*	11,8±0,8**
15-16	30,9±1,8	26,6±0,5*	21,6±1,3**
32-33	51,4±3,6	42,3±2,2	37,4±1,6**
60-62	61,5±2,3	51,2±1,2	14,1±1,1***
<b>Кортизол</b>			
О	45,5±1,8	50,2±2,2	81,8±2,4***
8-9	59,2±1,4	43,7±2,9**	57,7±1,5
15-16	93,3±6,3	76,1±2,3*	76,7±2,0*
32-33	157,2±6,1	120,4±9,2*	101,9±4,9***
60-65	235,9±10,4	209,5±6,4	44,5±4,5***

\*P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\*P<0,001 по сравнению с I группой

эмбриона и плода посредством блокады эндометриального синтеза PGF $_{2\alpha}$  и стимуляции синтеза PGE $_2$  [7, 14]. Кроме того, прогестерон способствует супрессии образования хемокина ИЛ-8 и индукции продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 [7, 15]. В итоге данный гормон создает все условия для нормального формирования и развития эмбриона и плода. При пониженной продукции яичниками коров прогестерона формирующийся после оплодотворения эмбрион попадает в дискомфортные условия, приводящие к замедлению его развития вплоть до последующей гибели.

Из данных таблицы 1 также следует, что формирование эмбриона на этапе имплантации и плацентации сопровождается постепенным увеличением функциональной активности надпочечных желез и концентрации в крови кортизола в 4-4,8 раза. При этом у коров с задержкой развития эмбриона содержание кортизола в сыворотке крови в разные периоды исследований оказались ниже, чем у коров с физиологическим течением беременности, на 11,2-26,2%. У животных III группы количество кортизола во время осеменения было выше, чем у коров I группы, на 79,8%, на этапе имплантации и закладки первичных органов эмбриона – ниже на 17,8-35,2%, а после его гибели – в 5,3 раза.

Можно полагать, что глюкокортикоидный гормон кортизол, не являясь прямым репродуктивным стероидом, через регуляцию обмена веществ и энергии выполняет модулирующую роль в адаптации животных к беременности. Пониженная продукция данного гормона у коров в период имплантации и начала плацентации эмбриона ассоциируется с гиперчувствительностью организма матери к его отцовским антигенам и со снижением его блокирующего действия на продукцию провоспалительных цитокинов [7].

В тесной взаимосвязи с гормональным статусом коров находится и их цитокиновый профиль (табл. 2). Концентрация в сыворотке крови IL-2, ключевого цитокина в реализации механизмов иммунного ответа

матери на инвазию эмбриона [7, 8], у всех животных в день осеменения была примерно на одном уровне (58,3±4,65 – 60,6±3,37 пг/мл). В дальнейшем, в динамике формирования физиологически протекающей беременности, она постепенно снизилась на 52,8% (P<0,01). Та же закономерность отмечена у коров II группы – снижение составило 33,5% (P<0,05). Однако в период плацентации эмбриона содержание интерлейкина IL-2 у животных II группы было на 46,5% достоверно выше, чем у коров I группы. У коров с гибелью эмбриона, наоборот, зарегистрирован постепенный рост концентрации IL-2 в сыворотке крови с 59,4±2,94 пг/мл до 85,4±6,47 пг/мл, или на 43,8% (P<0,05).

Физиологическое формирование беременности у коров ассоциируется с относительно стабильным содержанием в крови многофункционального цитокина TNF $\alpha$  – фактора некроза опухолей. Увеличение его концентрации к периоду имплантации составило 15,9%. Этого увеличения оказывается достаточным для индукции умеренного воспаления эндометрия, необходимого для физиологического его взаимодействия с бластоцистой в процессе имплантации. В последующие две недели формирования эмбриона количество TNF $\alpha$  в крови снизилось на 19,5%. У коров II группы увеличение концентрации в крови данного цитокина в период имплантации составило 40,9%, а у животных III группы – 49,8% (P<0,01). Различия с показателями коров с физиологическим течением беременности составили 11,7 и 36,2% соответственно.

Исследование интерферонового статуса коров показало, что антигенное раздражение их полового тракта введенной спермой уже в день осеменения индуцирует продукцию интерферона- $\gamma$ . У животных I группы его

концентрация в сыворотке крови составила 883,5±44,2 пг/мл. Через две недели она снизилась на 41,4%, а через месяц – в 2,2 раза. У коров с задержкой развития эмбриона содержание INF- $\gamma$  в день осеменения была выше на 41,3%, в период имплантации – на 58,1% и плацентации – на 70,8%, чем у животных I группы. У коров с последующей гибелью эмбриона эти различия составили 44,0, 69,2 и 296% соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что смерти зародыша предшествует всплеск продукции INF- $\gamma$ . Его концентрация в крови с 876,9±50,5 пг/мл в период имплантации возросла с началом плацентации до 1153,4±66,9 пг/мл, или на 31,5% (P<0,05). В этот период в качестве источников повышения продукции интерферона могут выступить не только иммунокомпетентные клетки крови матери, но и формирующейся плаценты [15]. Высокий уровень продукции провоспалительных цитокинов, как показали наши исследования, связан с недостаточным биосинтезом глюкокортикоидного гормона кортизола и прогестерона, как супрессоров иммунных реакций. Обнаружена статистически значимая связь (P<0,05 – 0,01) между концентрациями в крови кортизола и IL-2 ( $r_s = -0,62$ ), TNF $\alpha$  ( $r_s = -0,78$ ) и INF- $\gamma$  ( $r_s = -0,55$ ). Между концентрациями прогестерона и данными цитокинами эта связь выразилась, соответственно, как – 0,54; – 0,83 и – 0,45.

Установлено, что при физиологическом формировании эмбриона концентрация INF $\tau$  с 364,0±22,1 пг/мл (8-9 дни развития) возросла до 1403,2±71,8 пг/мл (период имплантации) или в 3,85 раза. К 32-33 дню после осеменения она снизилась от максимального уровня на 42,0%. Та же динамика содержания интерферона- $\tau$  в сыворотке крови зарегистрирована у коров II и III групп. Однако уровень его концентрации у коров с симптомами задержки развития эмбриона во все периоды исследований был ниже, чем у животных I группы, на 22,0-25,3%, а у коров с гибелью эмбриона – на 22,6-37,7%. Неадекватная продукция развивающимся зародышем INF $\tau$  отрицательно сказывается на гормоносинтезирующей функции желтого тела, надпочечных желез, ингибировании синтеза провоспалительных цитокинов и на иммуотрофическом взаимоотношении развивающегося зародыша с эндометриальными структурами матки и в целом с организмом матери. Прямым доказательством данного заключения являются показатели коррелятивной связи концентрации INF $\tau$  в крови с показателями содержания определяемых нами гормонов и цитокинов. С концентрацией прогестерона корреляция составила +0,87 (P<0,01), кортизола — +0,79 (P<0,05), IL-2 — -0,83 (P<0,01), TNF $\alpha$  — -0,84 (P<0,01), INF- $\gamma$  — -0,92 (P<0,01).

Таким образом, физиологическое формирование эмбриона у коров в ранние сроки гестации во многом определяется уровнем продукции INF $\tau$ , прогестерона и кортикостероидов. При их дефиците у осемененных и оплодотворенных животных возрастает синтез провоспалительных цитокинов IL-2, TNF $\alpha$  и INF- $\gamma$ , активно участвующих в проявлении иммунных реакций и создании некомфортной коммуникационной сети между организмом матери и формирующимся эмбрионом. В конечном итоге это приводит к задержке эмбрионального развития вплоть до гибели зародыша. Можно полагать, что нарушение в организме оплодотворенных животных гормонально-цитоклинового баланса является универсальным патогенетическим механизмом развития ранних эмбриопатий и выступает ключевым моментом в клинической манифестации этих патологий.

**Табл. 2. Содержания цитокинов в сыворотке крови коров в ранние сроки гестации, пг/мл**

День после осеменения	Группа		
	I	II	III
<b>Интерлейкин, IL-2</b>			
О	58,3±4,65	60,6±3,37	59,4±2,94
15-16	46,7±3,21	49,2±2,19	77,9±4,12***
32-33	27,5±1,95	40,3±2,64**	85,4±6,47***
<b>Фактор некроза опухолей, TNF<math>\alpha</math></b>			
О	254,2±12,4	233,6±11,8	267,8±15,7
15-16	294,6±14,1	329,1±16,6	401,2±19,8**
32-33	237,1±10,4	278,1±12,4	309,7±18,3**
<b>Интерферон-<math>\gamma</math></b>			
О	883,5±44,2	1248,1±69,7**	1272,4±81,9**
15-16	518,2±31,8	819,1±61,7**	876,9±50,5**
32-33	389,5±23,7	693,2±37,4***	1153,4±66,9***
<b>Интерферон-<math>\tau</math></b>			
8-9	364,0±22,1	278,4±19,4*	285,5±20,8*
15-16	1403,2±71,8	1046,4±62,7*	845,2±51,7**
32-33	813,2±37,9	634,2±45,8*	571,9±38,2**

\*P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\*P<0,001 по сравнению с I группой

**Литература.**

1. Янчуков И., Панфёров В., Мороз Т. Пренатальные потери у высокопродуктивных коров // *Молочное и мясное скотоводство*. – 2011. – №8. – С. 2-4
2. Гуськова С.В., Турбина И.С., Ескин Г.В., Комбарова Н.А. Эмбриональные потери в молочном скотоводстве: основные генетические причины // *Молочная промышленность*. – 2015. – №7. – С. 48-50.
3. Нежданов А.Г., Михалёв В.И., Лозовая Е.Г., Лободин К.А., Сафонов В.А. Патологические аспекты эмбриональной смертности у молочных коров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2017. – Т. 52. – №2. – С. 338-348.
4. Nyman S., Gustafsson H., Berglund B. Extent and patent of pregnancy losses and progesterone levels during gestation in Swedish Red and Swedish Holstine dairy cows // *Acta Vet. Scand.* – 2018. – Oct. 30. - №60 (1). – P. 68.
5. Шабунин С.В., Нежданов А.Г., Михалёв В.И., Лозовая Е.Г., Черницкий А.Е. Прогностическое значение показателей эндогенной интоксикации и оксидативного стресса в оценке раннего эмбриогенеза коров // *Российская сельскохозяйственная наука*. – 2015. – №6. – С. 54-56.
6. Brooks K., Burns G., Spencer T.E. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon-tau and cortisol // *J. Anim. Sei. Biotechnol.* – 2014. – №5 (1). – P.53.
7. Ширшев С.В. Механизмы иммунноэндокринного контроля процессов репродукции: Т. 2. – Екатеринбург: Уро РАН, 2002. – 557 с.
8. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. – СПб.: Фолиант, 2018. – 512 с.
9. Demmers R.J., Derecka K., Flint A. Trophoblast interferon and pregnancy // *Reproduction*. – 2001. – №121. – P. 41-49.
10. Forde N., Lonergan P. Interferon-tau and fertility in ruminants // *Reproduction*. – 2017. – №154 (5). – P. 33-34.
11. Hansen T.R., Sinedino L.D.P., Spencer T.E. Paracrine and endocrine actions of interferon-tau (INFT) // *Reproduction*. – 2017. – №154 (5). – P. 45-49.
12. Tuo W.B., MacMillan H., Gunter N., Bazer F.M., Brown W.C. Upregulation of interleukin-4 and IFN-gamma expression by IFN-tau, of member of the type I INF family // *J. of Interferon and Cytokine Research*. – 1999. – №19. – P. 179-187.
13. Ультразвуковая диагностика беременности и задержки развития эмбриона и плода у коров: методическое пособие. – Воронеж: Истоки, 2013. – 19 с.
14. Piccini M.P., Giudizi M.G., Biagiotti R. et al. Progesterone favors the development of human T-helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – P. 128-133.
15. Королёва Л.И. О системе интерферона, его формировании в раннем онтогенезе человека и особенностях у новорожденных детей с внутриутробной инфекцией // *Журнал акушерства – женских болезней*. – 2010. – Т. LIX. – Вып. 6. – С. 35-44.

Поступила в редакцию 29.04.19

После доработки 10.05.19

Принята к публикации 05.06.19