

Определение уровня прогестерона в крови крупного рогатого скота методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии и связь концентрации стероида с оплодотворяемостью

Семен Викторович Николаев

Институт агробиотехнологий им. А.В. Журавского Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар, Россия, e-mail: semen.nikolaev.90@mail.ru

Аннотация. В работе подобраны оптимальные условия определения концентрации прогестерона в плазме крови крупного рогатого скота методом высокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии. Изучена связь уровня данного гормона с оплодотворяемостью после синхронизации половой цикличности у коров. Установлено, что время выхода пика прогестерона при выбранном режиме хроматографии находится в пределах 2,7 мин, а оптимальным ион-прекурсором является $[M+H]^+ m/z=315,3$. Разработанная методика позволяет с высокой точностью (до сотых нг/мл) определять эндогенный уровень стероида в крови у крупного рогатого скота. Анализ концентрации прогестерона у коров на момент заключительной инъекции аналога простагландина, показал, что животные с различным репродуктивным статусом не имеют достоверных отличий в содержании данного стероида. Наиболее статистически значимая связь установлена в день осеменения: у бесплодных коров концентрация гормона была ниже в 1,9–4,2 раза по сравнению с оплодотворившимися ($P<0,05$). Более высокое содержание стероида у оплодотворившихся животных на момент осеменения, вероятнее всего, отражает реакцию яичников на преовуляторный выброс лютеинизирующего гормона и готовность фолликула к овуляции.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия; прогестерон; синхронизация половой цикличности; оплодотворение; бесплодие.

Для цитирования: Николаев С. В. Определение уровня прогестерона в крови крупного рогатого скота методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии и связь концентрации стероида с оплодотворяемостью // Аграрный научный журнал. 2022. № 9. С. 68–71. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i9pp68-71>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

Determination of progesterone levels in the blood of cattle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the relationship of steroid concentration with fertilization

Semyon V. Nikolaev

Institute of Agrobiotechnologies named after A.V. Zhuravsky Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktывkar, Russia, e-mail: semen.nikolaev.90@mail.ru

Abstract. The optimal conditions for determining the concentration of progesterone in the blood plasma of cattle were selected by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the relationship of the level of this progestin with fertilization after treatment of cows with hormonal preparations was studied. It was found that the time of progesterone peak release under the selected chromatography mode is within 2.7 minutes, and the optimal precursor ion is $[M+H]^+ m/z=315.3$. The developed technique makes it possible to determine the endogenous level of the steroid in the blood of cattle with high accuracy (up to hundredths of ng/ml). Analysis of progesterone concentration in cows at the time of the final injection of the prostaglandin analogue showed that animals with different reproductive status have no significant differences in the content of this steroid. The most statistically significant indicators were obtained on the day of insemination. Thus, in infertile cows, the hormone concentration was 1.9...4.2 times lower than in fertilized cows ($P<0.05$). The higher steroid content in fertilized animals at the time of insemination most likely reflects the ovarian response to the preovulatory release of luteinizing hormone and the readiness of the follicle for ovulation.

Keywords: cattle; high-performance liquid chromatomass spectrometry; progesterone; synchronization of sexual cyclicity; fertilization; infertility.

For citation: Nikolaev S. V. Determination of progesterone levels in the blood of cattle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the relationship of steroid concentration with fertilization. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal. 2022;(9): 68–71. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i9pp68-71>.

Введение. На фоне роста продуктивности у молочных коров обострилась проблема распространения бесплодия [8, 9]. Основными причинами снижения воспроизводительной функции у крупного рогатого скота, как правило, являются дисгормональные расстройства, которые возникают на фоне метаболических нарушений и патологий органов внутренней секреции [3, 5, 6]. Поэтому оценка гуморального статуса животных является одним из способов прогнозирования бесплодия и выбора объективной тактики коррекции гормональных нарушений [4, 7, 10].

Наиболее доступными методами количественного определения стероидных гормонов в биологическом материале принято считать иммуноферментный и радиоиммунологический анализ. Однако их существенным недостатком является возможность перекрестной реакции с близкими по структуре веществами, что в свою очередь может существенно повлиять на значения и интерпретацию полученных результатов. Также недостатком можно считать потребность в специфических реагентах [1, 2].

Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) является гибридным методом и объединяет независимые друг от друга процессы жидкостного хроматографического разделения и масс-спектрометрического анализа, что обуславливается ее способностью эффективно разделять большой круг органических веществ различной природы с учетом массы молекул и их фрагментов. Это делает ВЭЖХ-МС наиболее предпочтительным методом изучения сложных по составу веществ. Вместе с тем данный метод требует разработки оптимальных индивидуальных условий проведения анализа для каждого определяемого вещества.





Цель исследований – разработать метод определения концентрации прогестерона в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС и установить связь уровня прогестина с последующей оплодотворяемостью коров после обработки гормональными препаратами.

Методика исследований. Исследования проводили на tandemном жидкостном хромато-масс-спектрометре LCMS-8040 (Япония) с системой трех квадруполов. Калибровку прибора к прогестерону осуществляли по методу внешнего стандарта (абсолютная калибровка) с использованием эталонного вещества – прегн-4-ене-3,20-дион. Построение градуировочных зависимостей проводили в трех повторениях. Стандартные градуировочные растворы готовили на метаноле квалификации «для градиентной ВЭЖХ» путем десятикратных разведений. Для учета влияния на результат анализа различных компонентов плазмы крови применяли метод матричной градуировки, т.е. стандартные пробы готовили с использованием «чистой плазмы», заведомо не содержащей естественный (эндогенного происхождения) прогестерон.

С целью апробирования разработанного метода определения концентрации прогестерона 10 коровам в середине полового цикла индуцировали лютеолиз посредством введения аналога простагландина. Кровь от животных получали до инъекции, через 24, 48 и 72 ч после. Из крови путем центрифугирования получали плазму, которую замораживали до исследований. Подготовку проб исследуемой плазмы крови осуществляли по следующей схеме: в пробирки Эппендорфа помещали по 100 мкл исследуемой плазмы крови и по 900 мкл чистого метанола. Смесь шуттелировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после коагулированные метанолом компоненты отделяли путем центрифугирования при 15 тыс. об./мин, надосадочную жидкость фильтровали через мембранный полиамидный шприцевой фильтр «Chromafil Xtra PA-20/13» с размерами пор 0,2 мкм и помещали в вialу автосамплера. Последующую обработку данных, включая расчет площадей хроматографических пиков, проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions LCMS 5.86.

Для изучения связи уровня прогестерона с оплодотворяемостью на 45-й день после родов по принципу пар-аналогов были отобраны 80 коров 1–3-й лактации, не имеющие выраженной гинекологической патологии. Животных разделили на 4 группы по 20 животных. Каждой группе применяли различные синтетические аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ). Обработку проводили в режиме, представленном в табл. 1.

Искусственное осеменение осуществляли цервикальным способом с ректальной фиксацией шейки матки. Наличие стельности устанавливали посредством УЗИ на 30-й день после осеменения. Кровь для определения концентрации прогестерона получали перед заключительной инъекцией синтетического простагландина (эстрофана), а также непосредственно перед искусственным осеменением (27-й день). По результатам сканирования животных ретроспективно разделяли на стельных и бесплодных. Затем рассчитывали среднее содержание прогестерона для каждой группы.

Статистический анализ проводили путем вычисления средней арифметической и стандартной ошибки, достоверность различий сравниваемых величин устанавливали при применении *t*-критерия Стьюдента с использованием пакета программ Microsoft Office Excel.

Результаты исследований. Оптимально подобранные условия определения прогестерона в плазме крови приведены в табл. 2.

Опытным путем было установлено, что время выхода пика прогестерона при заданном режиме находится в пределах 2,72 мин (см. рисунок), а оптимальным ион-прекурсором является $[M+H]^+ m/z=315,3$. Калибровочный график, выстроенный по трем точкам, характеризовался высокой корреляцией повторений стандартных разведений ($r>0,999$) и линейностью.

Далее была проведена оценка возможности применения разработанной методики для определения эндогенного уровня прогестерона у крупного рогатого скота. Анализ полученных результатов показал (табл. 3), что индукция лютеолиза у коров сопровождалась снижением уровня эндогенного гестагена. Так, по истечению суток, после инъекции клопростенола, концентрация прогестерона снижалась на 35,2 % ($P\leq 0,001$), а через 48 ч еще на 44,3 % ($P\leq 0,001$). На момент последнего взятия крови содержание стероида составило в среднем $0,29\pm 0,06$ нг/мл с колебаниями индивидуальных значений 0,66–0,09 нг/мл плазмы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный метод позволяет эффективно определять концентрацию эндогенного прогестерона у крупного рогатого скота.

Анализ связи концентрации прогестерона в крови у коров с показателями воспроизводительной способности представлен в табл. 4. Согласно полученным данным, на момент инъекции аналога простагландина животные разных экспериментальных групп не имели достоверных отличий ни от применяемого препарата, ни от последующей оплодотворяемости. Наиболее статистически значимые значения были получены в день осеменения. Так, у бесплодных коров в 1-й группе концентрация гормона была ниже в 2,7 раза по сравнению с оплодотворившимися ($P<0,05$), у животных 2-й группы – в 4,2 раза ($P<0,05$), 3-й – в 2,0 раза ($P<0,05$), 4-й – в 1,9 раза ($P<0,05$).

Таким образом, при использовании любого аналога ГнРГ просматривается четкая связь уровня стероида на момент искусственного осеменения с последующим оплодотворением, а именно его низкая концентрация у бесплодных коров. Более высокое содержание прогестагена у оплодотворившихся животных на момент осеменения, вероятнее всего, отражает реакцию фолликулов на преовуляторный выброс лютеинизирующего гормона (ЛГ). Низкий уровень стероида может

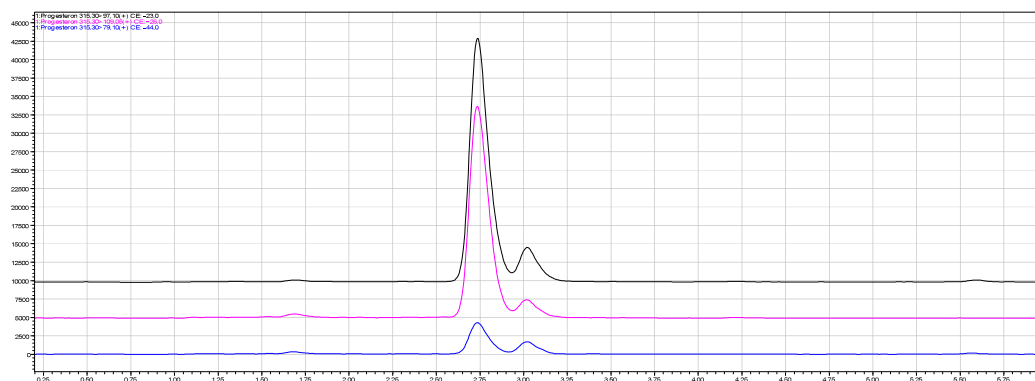
Таблица 1

Схема применения гормональных препаратов для синхронизации полового цикла у экспериментальных коров

Время	Манипуляция
1-й день 8.00	Инъекция аналог ГнРГ
7-й день 8.00	Инъекция эстрофана 4 мл
10-й день 8.00	Инъекция аналог ГнРГ
17-й день 8.00	Инъекция аналог ГнРГ
24-й день 8.00	Инъекция эстрофана 4 мл
25-й день 8.00	Инъекция эстрофана 4 мл
26-й день 16.00	Инъекция аналог ГнРГ
27-й день 8.00	Искусственное осеменение

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа в режиме MRM для определения прогестерона в плазме крови

Параметр	Значения
Хроматограф	
Объем вводимой пробы, мкл	5
Расход подвижной фазы, мл × мин ⁻¹	0,25
Состав подвижной фазы	Фаза А – вода очищенная тип I с добавкой муравьиной кислоты (0,1 %); Фаза Б – ацетонитрил
Режим элюирования, концентрация фазы Б	70 % (0–0,01 мин); увеличение до 90 % (0,01–5,0 мин); 90 % (5–10 мин)
Температура термостата колонок, °С	35
Время выхода пика, мин	2,72
Тип ионизации	Электроспрей (ESI), положительная полярность
Масс-спектрометр	
Напряжение на конусе иглы, кВ	4,5
Температура нагревательного блока, °С	400
Температура линии десольватации, °С	250
Расход газа-осушителя, л × мин ⁻¹	15
Расход газа-распылителя, л × мин ⁻¹	3
Ион-прекурсор, а.е.м.	[M+H] ⁺ m/z 315,3
Ионы-продукты, m/z	97,10 109,05 79,10
Энергия коллизии, эВ	–23,0 315,3 → 97,1 –26,0 315,3 → 109,05 –44,0 315,3 → 79,1
Время измерения (Dwell Time), мс	100



Хроматограмма выхода пиков (3 перехода) стандартного (2,5 нг/мл плазмы) разведения прогестерона

Таблица 3

Изменение концентрации прогестерона в крови у коров (n = 10) после индуцированного лютеолиза, нг/мл

Показатель	Время, после инъекции аналога простагландина			
	до введения	24 ч	48 ч	72 ч
M±m	3,38±0,18***	2,19±0,06***	1,22±0,08***	0,29±0,06***
Max	4,10	2,51	1,56	0,66
Min	2,62	2,03	0,82	0,09

*** достоверно $P \leq 0,001$ по отношению к предыдущим значениям

быть обусловлен слабой чувствительностью клеток аденогипофиза к синтетическому ГнРГ и, как следствие, отсутствием пикового выброса ЛГ в кровь или слабой чувствительностью рецепторов доминантного фолликула к ЛГ (например, при небольшом размере или незрелости), что в конечном итоге негативно отражается на овуляции и оплодотворении.

Заключение. Разработанный метод позволяет эффективно определять концентрацию уровня прогестерона в плазме крови животных. Исследования показали, что наступление стельности у коров после синхронизации по-



Концентрация прогестерона в крови коров с различным репродуктивным статусом в день инъекции аналога простагландина и на момент осеменения

Группа	1-я	2-я	3-я	4-я
Концентрация прогестерона, нг/мл, перед инъекцией аналога простагландина				
В среднем по группе	2,25±0,36	2,18±0,37	2,06±0,31	2,19±0,27
У оплодотворившихся	2,11±0,41	1,51±0,48	2,31±0,49	2,14±0,23
У бесплодных	2,31±0,76	2,42±0,39	1,81±0,36	2,22±0,33
Концентрация прогестерона, нг/мл, через 72 ч после инъекции аналога простагландина				
В среднем по группе	0,26±0,07	0,38±0,09	0,26±0,05	0,24±0,04
У оплодотворившихся	0,32±0,07*	0,50±0,12*	0,34±0,06*	0,34±0,05*
У бесплодных	0,12±0,05	0,12±0,11	0,17±0,03	0,18±0,03

* $P < 0,05$ – различия достоверны по отношению к бесплодным коровам.

ловой цикличности в большей степени зависит от содержания в крови данного гормона на момент искусственного осеменения, который, по всей видимости, отражает реакцию яичников на экogenous введение аналогов ГнРГ.

Таким образом, определение уровня прогестерона у коров при синхронизации половой функции можно использовать как маркер готовности к оплодотворению и целесообразности искусственного осеменения.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки России № 0412-2019-0051 и проекта межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня «Российская Арктика: новые материалы, технологии и методы исследования».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Enzyme linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence conformation of antinuclear antibodies / S. S. Copple et al. // American society for clinical pathology. 2011. Vol. 135. P. 678–684.
2. Garber E. Detection of melamine using commercial enzyme linked immunosorbent assay technology // Journal of food protection. 2008. Vol. 71. № 3. P. 590–594.
3. Авдеев В. С., Калужный И. И., Тресницкий С. Н. Метаболический стресс у сухостойных коров и нетелей при развитии субклинического кетоза // Ветеринария. 2019. № 2. С. 36–41.
4. Дюльгер Г. П., Нежданов А. Г. Вариативность овариальных структур и концентрации прогестерона в плазме периферической крови коров при рецидивирующей форме кистозной болезни яичников // Сельскохозяйственная биология. 2006. Т. 41. № 6. С. 62–68.
5. Гормональный и цитокиновый профиль крови молочных коров в ранний период гестации / А. Г. Нежданов [и др.] // Российская сельскохозяйственная наука. 2020. № 2. С. 70–73.
6. Николаев С. В., Конопельцев И. Г. Пиометра у коров: распространение и терапия // Ветеринария. 2020. № 12. С. 39–43.
7. Николаев С. В., Конопельцев И. Г. Эффективность различных способов терапии коров с гипофункцией яичников // Ветеринария. 2019. № 4. С. 33–37.
8. Прогнозирование нарушения воспроизводительной функции у коров / К. В. Племяшов [и др.] // Ветеринария. 2022. № 2. С. 37–40.
9. Препарат «Лексофлон» для лечения коров при хроническом гнойно-катаральном эндометрите / А. М. Семиволос [и др.] // Аграрный научный журнал. 2019. № 4. С. 63–65.
10. Филатов А. В., Лобанов В. С., Хлопицкий В. П. Коррекция репродуктивных функций свиноматок с помощью лекарственного препарата Прогестамат® // Свиноводство. 2021. № 2. С. 43–45.

REFERENCES

1. Enzyme linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence conformation of antinuclear antibodies/ S. S. Copple et al. *American society for clinical pathology*. 2011;135: 678–684.
2. Garber E. Detection of melamine using commercial enzyme linked immunosorbent assay technology. *Journal of food protection*. 2008;71(3):590–594.
3. Avdeenko V. S., Kalyuzhny I. I., Tresnitsky S. N. Metabolic stress in dry cows and heifers with the development of subclinical ketosis. *Veterinary medicine*. 2019;(2):36–41. (In Russ.).
4. Dyulger G. P., Nejdano A. G. Variability of ovarian structures and progesterone concentration in peripheral blood plasma of cows with recurrent form of ovarian cystic disease. *Agricultural biology*. 2006;41(6):62–68. (In Russ.).
5. Shabunin S. V., Mikhalev V. I., Pasko N. V., Safonov V. A. Hormonal and cytokine blood profile of dairy cows in the early gestation period / A. G. Nejdano et al. *Russian agricultural science*. 2020;(2):70–73. (In Russ.).
6. Nikolaev S. V., Konopeltsev I. G. Pyometra in cows: distribution and therapy. *Veterinary medicine*. 2020;(12):39–43. (In Russ.).
7. Nikolaev S. V., Konopeltsev I. G. Effectiveness of various methods of therapy of cows with ovarian hypofunction. *Veterinary medicine*. 2019;(4):33–37. (In Russ.).
8. Prediction of reproductive function disorders in cows / K. V. Plemyashov et al. *Veterinary medicine*. 2022;(2):37–40. (In Russ.).
9. Kashkovskaya L. M., Pankov I. Yu., Bryukhanova A. A. Drug «Lexoflon» for the treatment of cows with chronic purulent-cataral endometritis / A. M. Semivolos et al. *Agricultural Scientific Journal*. 2019;(4):63–65. (In Russ.).
10. Filatov A. V., Lobanov V. S., Khlopitsky V. P. Correction of reproductive functions of sows with the help of the drug Progestamat®. *Pig breeding*. 2021;(2):43–45. (In Russ.).

Статья поступила в редакцию 27.03.2022; одобрена после рецензирования 04.05.2022; принята к публикации 15.05.2022.

The article was submitted 27.03.2022; approved after reviewing 04.05.2022; accepted for publication 15.05.2022.

