

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОРТИЗОЛА И ПРОГЕСТЕРОНА НА СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

М. А. Дерхо, Т. В. Янич

Изучены различия в эритроцитарном составе крови беременных животных голштинской породы в со-пряженности с уровнем прогестерона и кортизола, а также триместром беременности. В ходе прогрессиирования беременности в эритrogramме животных уменьшается количество эритроцитов на 16,31%, но сохраняется уровень гемоглобина в пределах $110,60 \pm 1,10$ г/л; увеличивается уровень гематокрита на 7,78% за счет прироста величины среднего объема эритроцитов (на 28,79%), насыщенности клеток гемоглобином (на 21,04%). Уровень прогестерона в крови беременных, по сравнению с небеременными, возрастает более чем в 3 раза и колеблется в среднем за беременность в пределах $28,24 \pm 0,94$ нмоль/л. Концентрация кортизола, наоборот, при наступлении беременности уменьшается, составляя в среднем $31,65 \pm 1,19$ нмоль/л, имея тенденцию к повышению по мере развития плода. Оценка изменчивости эритrogramмы животных методом двухфакторного дисперсионного анализа выявила ее статистически значимую зависимость от триместра беременности, прогестерона и кортизола.

Ключевые слова: эритrogramма, беременность, триместр, кортизол; прогестерон.

Прогестерон и кортизол – это мощные нейромодуляторы, играющие важную роль в сохранении здоровья матери и плода во время беременности [1]. Они синтезируются из холестерина или других стероидных предшественников в гонадах, надпочечниках, плаценте и головном мозге [2].

Биологические свойства прогестерона в организме самок жвачных животных определяются подготовкой эндометрия для имплантации и плацентации эмбриона, а далее сохранения и развития беременности [3]. В свою очередь кортизол помимо того, что является маркером стресса [4], в ходе гестационного процесса регулирует питание развивающегося плода и развитие его органов [3], подготовку организма матери к родам [5, 6]. Во время беременности взаимодействия между данными гормонами определяются их сродством к кортикостероид-связывающему глобулину (КСГ), который транспортирует не только кортизол, но и прогестерон, особенно в условиях маточно-плацентарного круга кровообращения [7]. При этом прогестерон конкурирует с кортизолом за КСГ, что инициирует повышение концентрации последнего в пуповинной крови и в плоде, в котором высокие концентрации кортизола способствуют развитию нервной системы и со-

реванию легких. Кроме этого, прогестерон является предшественником кортизола не только в организме матери, но и плода [8].

Транспорт прогестерона и кортизола, как в организме матери, так и между матерью и плодом, осуществляется кровью, в составе которой существенна объемная доля эритроцитов [9]. Эритроциты не только играют важную роль в транспорте дыхательных газов [10, 11, 12], но и стероидных гормонов [13]. Кроме этого, они имеют рецепторы к стероидным гормонам, посредством которых реализуются их негеномные и геномные эффекты, отражаясь на деформируемости мембран красных клеток [14]. Даные вопросы наиболее основательно изучены в гуманной медицине, как при беременности, так и при различных патологиях. В то же время у сельскохозяйственных животных по этой проблеме сведений недостаточно, что и актуализирует тему исследований.

Настоящее исследование было направлено на изучение различий в эритроцитарном составе крови беременных животных голштинской породы в зависимости от изменчивости уровня прогестерона и кортизола в крови, а также оценку влияния гормонов на изменчивость параметров эритrogramмы при помощи дисперсионного анализа.

Материалы и методы исследования

Животные, использованные в качестве объекта исследований, принадлежали ТОО «Белагаш» (Республика Казахстан). Работа выполнена в 2021–2022 гг. Опытная группа была сформирована из телок, достигших живой массы осеменения, что соответствовало 15-месячному возрасту. Она включала 20 голов. Телок при появлении признаков охоты осеменяли ретроцервикальным методом. Беременность подтверждалась методом УЗИ-диагностики на 45-е сутки после осеменения. При наличии беременности их переводили в секцию беременных животных.

Технология кормления и содержания животных предусматривала беспривязное боковое содержание и двухкратное кормление. Рационы кормления животных регламентировались нормами ВИЖ. В их состав включали корма собственного производства, которые перерабатывались, обогащались минерально-витаминными добавками и подготавливались к употреблению в собственном кормоцехе. В рационе кормления животных после 24-й недели беременности снижался уровень концентрированных кормов. При этом их обеспечивали высококачественным сеном без ограничений.

Образцы крови собирали от телок до появления признаков охоты, а после установления беременности – в конце I, II и III триместров, что соответствовало 12, 24 и 36 неделям. Кровь брали утром до кормления из подхвостовой вены, используя вакуумные системы и пробырки «VACUETTE» с фиолетовой и красной крышками. После взятия образцы крови маркировали, помещали в термоконтейнере, а затем были переданы в ТОО «Лаборатория ИВ Смолина» (г. Костанай) для исследований.

Концентрацию стероидных гормонов (прогестерона, кортизола) определяли в сыворотке крови методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител. Для этих целей использовали готовые наборы реагентов. Анализ выполнен согласно инструкции производителя с соблюдением всех мер предосторожности. Концентрация гормонов при помощи считывавшего микропланшетного ридера в каждом образце планшеты считывали при 450 нм (эталон 630 нм). Концентрации кортизола и прогестерона выражали в нмоль/л. Эритроцитограмму, включающую количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и расчетные эритроци-

тарные индексы, определяли гематологическим анализатором (Sysmex, Япония), имеющим видоспецифичные настройки для крупного рогатого скота.

Статистический анализ выполнен с использованием Statistica 6.0 пакета программы Excel. Во-первых, лабораторные данные проверялись на однородность дисперсий и перед анализом подвергались логарифмическому преобразованию. Во-вторых, статистический анализ был проведен с использованием модели двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (ANOVA) с использованием в качестве главных факторов: триместр беременности, концентрации кортизола и прогестерона и логарифмически преобразованных показателей эритрограммы в качестве зависимых переменных. Уровень значимости для всего статистического анализа был $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

С целью мониторинга состояния здоровья организма матери в ходе беременности важно знать интервалы изменений основных гематологических показателей в соответствии с ее триместрами, что позволит своевременно использовать профилактические меры.

Частью общего анализа крови является эритрограмма, в которой наиболее важную роль играют эритроциты [15], так как посредством данных клеток обеспечивается транспорт дыхательных газов, а за счет этого – окислительно-восстановительный баланс организма [12]. Кроме этого, эритроциты регулируют сосудистый тонус, влияя на вязкость крови [16] и состояние гемостаза [17].

В организме беременных телок, по сравнению с небеременными, достоверно увеличивалась концентрация гемоглобина и, соответственно, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах на 8,29 и 16,26%, что было результатом формирования маточно-плацентарного круга кровообращения и покрытия кислородных затрат развивающегося плода [5, 6, 10]. Это повышало вариабельность объемных свойств эритроцитов, выраженных в относительных и абсолютных числах на 7,99 и 12,18% (табл. 1). По данным [18] выявленные сдвиги в эритрограмме телок в первом триместре беременности являются результатом избыточного синтеза эритропоэтина, повышающего уровень использования железа в синтезе дыхательного белка.



В ходе развития беременности в крови животных снижалось количество эритроцитов на 16,31%, составляя в среднем за беременность $6,01 \pm 0,12 \cdot 10^{12}/\text{л}$ (табл. 1), что было результатом постепенного увеличения в организме матери объема крови [5, 6]. При этом уровень гемоглобина в кровотоке не зависел от триместра беременности, колеблясь в интервале $110,60 \pm 1,10 \text{ г/л}$. В то же время количество гематокрита, несмотря на уменьшение эритроцитов в ходе гестационного процесса, планомерно возрастало на 7,78% ($p < 0,05$), как результат планомерного увеличения среднего объема эритроцитов. Значение данного параметра превышало к концу III триместра беременности уровень первого на 28,79%, отражаясь так же, как на насыщенности эритроцитов гемоглобином (MCH), так и плотности его упаковки в клетках (MCHC). Несмотря на увеличение объема красных клеток, их вариабельность в кровеносном русле по данному параметру уменьшалась как в абсолютном (на 6,09%, $p < 0,05$), так и относительном (на 30,73%, $p < 0,05$) выражении.

Таким образом, в ходе беременности изменения в составе эритроцитарного состава крови были сопряжены с появлением дополнительного круга кровообращения и направлены на сохранение вязкости крови, способности

красных клеток оказывать сопротивление потоку крови и за счет этого мигрировать в кровеносном русле [19], обеспечивая потребности матери и плода.

Развитие и сохранение беременности в организме крупного рогатого скота связано с биологическими эффектами нескольких гормонов, включая прогестерон и кортизол. Так, наступление и развитие беременности в организме животных опытной группы протекало на фоне сохранения высокой концентрации прогестерона в крови, которая превышала уровень небеременных телок в 3 и более раз (табл. 2) и была результатом дополнительного синтеза гормона желтым телом беременности и плацентой [20]. При этом уровень прогестерона отражает функциональное состояние плодной оболочки в организме матери [21] и служит маркером физиологического протекания беременности.

При наступлении беременности концентрация кортизола, наоборот, уменьшалась в крови животных. При этом в конце I триместра, как и в среднем за весь период беременности, она отличалась от уровня небеременных телок на 43,16 и 29,35% соответственно (табл. 2). По данным [22] это связано с адаптивным ответом организма матери, способствующим сохранению и развитию плода. Достигается данный

Таблица 1 – Изменчивость эритrogramмы животных в ходе беременности ($n = 20$), $X \pm Sx$

Показатель / Границы нормы	15-мес. телки (перед охотой)	Сроки беременности, триместр/нед.			В среднем за период беременности
		I/12	II/24	III/36	
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$ / 5,0–7,5	$6,98 \pm 0,18$	$6,50 \pm 0,05$	$6,08 \pm 0,24$	$5,44 \pm 0,07^*$	$6,01 \pm 0,12$
Гемоглобин (Hb), г/л / 90,0–120,0	$101,30 \pm 2,40$	$109,70 \pm 1,68^{*1}$	$111,00 \pm 1,09$	$111,10 \pm 0,53$	$110,60 \pm 1,10$
Гематокрит (Ht), % / 24,0–48,0	$28,50 \pm 0,83$	$30,30 \pm 0,43$	$31,57 \pm 0,28$	$32,66 \pm 0,48^{*2}$	$31,51 \pm 0,39$
Средний объем эритроцита (MCV), фл	$40,83 \pm 0,66$	$46,61 \pm 0,92^{*1}$	$51,92 \pm 1,43^{*2}$	$60,03 \pm 1,18^{*2}$	$52,85 \pm 1,17$
Среднее содержание Hb в эритроцитах (MCH), пг / 16,5–18,5	$14,51 \pm 0,27$	$16,87 \pm 0,36^{*1}$	$18,25 \pm 0,18^{*2}$	$20,42 \pm 0,16^{*2}$	$18,51 \pm 0,23$
Средняя концентрация Hb в эритроците, г/дл	$35,54 \pm 0,27$	$36,20 \pm 0,39$	$35,15 \pm 0,30$	$34,02 \pm 0,50^{*2}$	$35,12 \pm 0,39$
Распределение эритроцитов по MCV, фл	$32,33 \pm 0,08$	$36,27 \pm 0,30^{*1}$	$34,36 \pm 0,17^*$	$34,06 \pm 0,12^*$	$34,89 \pm 0,19$
Ширина распределения эритроцитов по MCV, %	$25,40 \pm 0,49$	$27,43 \pm 0,34^{*1}$	$21,36 \pm 0,52^{*2}$	$19,00 \pm 0,11^{*2}$	$22,59 \pm 0,32^*$

Примечание: $^{*1} - p < 0,05$ по отношению к 15-месячным телкам (перед охотой); $^{*2} - p < 0,05$ по отношению к 1-му триместру беременности.

эффект тем, что в организме беременных животных основным местом синтеза кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ) является плацента, и плацентарная «выработка» КРГ определяет его образование в гипоталамусе. Поэтому материнский организм из-за сниженной активации нейронов гипоталамуса становится менее чувствительным к действию внешних стрессоров.

В ходе беременности концентрация кортизола планомерно увеличивалась. Уровень гормона в конце III триместра беременности, по сравнению с первым, возрос на 49,37%, но все равно был меньше, чем у небеременных телок (табл. 2). В исследованиях [5, 6, 23] отмечено, что данная динамика кортизола в ходе беременности является типичной.

Концентрация прогестерона и кортизола в крови матери находилась в reciprocalных отношениях, о чем свидетельствовала величина Прогестерон / Кортизол. По данным [Donaldson A, 1991], преобладание уровня прогестерона определяло снижение концентрации кортизола

в крови матери за счет его интенсивного использования плодом. И наоборот, в конце III триместра беременности снижение прогестерона в крови создавало основу для повышения кортизола в организме нетелей (табл. 2).

Как видно из данных таблицы 3, выбранные нами главные факторы статистически значимо влияли на изменчивость эритрограммы в организме животных при переходе из состояния «небеременные – беременные», а также в ходе ее развития по триместрам, так как для каждого фактора F-расчетное было выше, чем F-критическое. При оценке двухфакторных взаимодействий между «триместром беременности × показатели эритрограммы», «прогестерон × показатели эритрограммы» и «кортизол × показатели эритрограммы» выявлена аналогичная статистически значимая зависимость.

Следовательно, в организме животных беременность инициирует изменение функций физиологических систем, которые сопряжены с ее триместром и эндокринными сдвигами.

Таблица 2 – Изменчивость стероидных гормонов в крови животных в ходе беременности ($n = 20$), $\bar{X} \pm S_x$

Показатель	15-мес. телки (перед охотой)	Сроки беременности, триместр/нед.			В среднем за период беременности
		I/12	II/24	III/36	
Прогестерон (нмоль/л)	7,37±1,34*	27,47±0,40* ¹	35,63±2,02* ²	21,63±0,40* ²	28,24±0,94*
Кортизол (нмоль/л)	44,80±2,80	25,46±0,53* ¹	31,46±2,09* ²	38,03±0,95* ²	31,65±1,19
Прогестерон / Кортизол (усл. ед.)	0,17±0,02	1,08±0,03* ¹	1,13±0,08	0,57±0,06* ²	0,92±0,57*

Примечание: *¹ – $p < 0,05$ по отношению к 15-месячным телкам (перед охотой); *² – $p < 0,05$ по отношению к 1-му триместру беременности

Таблица 3 – Результаты оценки изменчивости эритрограммы методом дисперсионного анализа

Источник вариации	Общая сумма квадратов, SS	Степень свободы, df	Ср. квадратичное отклонение, MS	F -расчетное	F -критическое	P
Главные факторы						
Триместр беременности	705,87	3	235,28	41,12	2,63	< 0,05
Прогестерон крови	2230,13	3	743,37	103,01	2,63	< 0,05
Кортизол крови	566,34	3	188,78	20,46	2,63	< 0,05
Двухфакторные взаимодействия						
Триместр беременности × эритрограмма	2558,52	21	121,83	21,29	1,59	< 0,05
Прогестерон × эритрограмма	5278,23	21	251,34	34,82	1,59	< 0,05
Кортизол × эритрограмма	4772,82	21	227,27	24,63	1,59	< 0,05



Выводы

При наступлении и физиологическом протекании беременности в организме матери происходят разнообразные изменения, включающие и состав красной крови, и уровень стероидных гормонов. В эритrogramме беременных животных по мере развития плода и приближения родов уменьшается количество эритроцитов на 16,31% на фоне сохранения концентрации гемоглобина в пределах $110,60 \pm 1,10$ г/л, увеличения количества гематокрита на 7,78% ($p < 0,05$) за счет прироста величины среднего объема эритроцитов (на 28,79%) и соответственно насыщенности клеток гемоглобином (на 21,04%), как результат снижения плотности упаковки белка на 6,02 %. При этом популяция эритроцитов становится более однородной по объемным характеристикам. Уровень прогестерона в крови беременных по сравнению с небеременными возрастает более чем 3 раза и колеблется в среднем за беременность в пределах $28,24 \pm 0,94$ нмоль/л. В то же время концентрация кортизола, наоборот, при наступлении беременности уменьшается, составляя в среднем $31,65 \pm 1,19$ нмоль/л, хотя и имеет тенденцию к повышению по мере развития плода и приближения родов. Изменчивость прогестерона и кортизола в крови матери имеет реципрокную взаимосвязь. Метод двухфакторного дисперсионного анализа показал, что вариабельность параметров эритrogramмы животных определяется действием главных факторов (триместр беременности, прогестерон, кортизол) во взаимодействиях «триместр беременности \times показатели эритrogramмы», «прогестерон \times показатели эритrogramмы» и «кортизол \times показатели эритrogramмы».

Список литературы

1. Development and validation of an LC-MS/MS assay for the quantification of allopregnanolone and its progesterone-derived isomers, precursors, and cortisol/cortisone in pregnancy / G. Mayne, E. De Bloois, D. Dabelea, U. Christians // Anal Bioanal Chem. 2021. Vol. 413 (21). P. 5427–5438. DOI: 10.1007/s00216-021-03523-0.
2. Longitudinal proneuroactive and neuroactive steroid profiles in medication-free women with, without and at-risk for perinatal depression: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis / K. M. Deligiannidis [et al.] // Psychoneuroendocrinology. 2020. Vol. 121. P. 104827. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2020.104827.
3. Sawyer G., Webster D., Narayan E. Measuring wool cortisol and progesterone levels in breeding maiden Australian merino sheep (*Ovis aries*) // PLoS One. 2019. Vol. 14 (4). P. e0214734. DOI: 10.1371/journal.pone.0214734.
4. Сайфутдинова Л. Н., Дерхо М. А. Оценка биологических связей кортикостерона и кортизола в организме кур при стрессе // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2021. Т. 246. № 2. С. 187–193.
5. След А. Н., Дерхо М. А. Оценка дыхательной функции крови и ее взаимосвязь с кортизолом у коров при беременности // Ученые записки Казанской ГАВМ им. Н. Э. Баумана. 2020. Т. 241. № 1. С. 193–199.
6. Дерхо М. А., След А. Н., Дерхо А. О. Тромбоцитарный гомеостаз и его взаимосвязь с кортизолом и прогестероном у коров при беременности // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2021. Т. 246. № 2. С. 60–65.
7. High binding site occupancy of corticosteroid-binding globulin by progesterone increases fetal free cortisol concentrations / N. A. Hodyl [et al.] // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020. Vol. 251. P. 129–135. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.05.034.
8. Changes in concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and progesterone in fetal and maternal serum during pregnancy / A. Donaldson [et al.] // Clin Endocrinol (Oxf). 1991. Vol. 35 (5). P. 447–451. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1991.tb03564.x.
9. Tamura T. Blood Count Specimen // Rinsho Byori. 2015. Vol. 63 (12). P. 1387–1396.
10. Sen Gupta A. Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules // Shock. 2019. Vol. 52 (1). P. 70–83. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001009.
11. Immune Functions of Erythrocytes in Osteichthyes / M. Stosik, B. Tokarz-Deptula, J. Deptula, W. Deptula // Front Immunol. 2020. Vol. 15 (11). P. 1914. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01914.
12. Red blood cell dysfunction: a new player in cardiovascular disease / J. Pernow, A. Mahdi, J. Yang, Z. Zhou // Cardiovasc Res. 2019. Vol. 115 (11). P. 1596–1605. DOI: 10.1093/cvr/cvz156.
13. Янич Т. В., Дерхо М. А. Роль кортизола и прогестерона в формировании клеточного состава крови у телок голштинской породы // Генетика и разведение животных. 2022. № 2. С. 107–113.

14. Functional Estrogen Receptors of Red Blood Cells. Do They Influence Intracellular Signaling? / R. Vona [et al.] // Cell Physiol Biochem. 2019. Vol. 53 (1). P. 186–199. DOI: 10.33594/000000129.
15. Acharya V., Kumar P. Identification and red blood cell automated counting from blood smear images using computer-aided system // Med Biol Eng Comput. 2018. Vol. 56. № 3. P. 483–489. DOI: 10.1007/s11517-017-1708-9.
16. Michel J. B., Martin-Ventura J. L. Red Blood Cells and Hemoglobin in Human Atherosclerosis and Related Arterial Diseases // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21. № 18. P. 6756. DOI: 10.3390/ijms21186756.
17. Weisel J. W., Litvinov R. I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis // J Thromb Haemost. 2019. Vol. 17 (2). P. 271–282. DOI: 10.1111/jth.14360.
18. Lesesve J. F., Franczak C., Perrin J. Erythrocytes morphology in pregnancy // Ann Biol Clin (Paris). 2019. Vol. 77 (1). P. 113–115. DOI: 10.1684/abc.2018.1409.
19. Reinhart W. H. The optimum hematocrit // Clin Hemorheol Microcirc. 2016. Vol. 64. P. 575–585. DOI: 10.3233/CH-168032.
20. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being / H. Kindahl, B. Kornmatitsuk, K. Königsson, H. Gustafsson // Domest Anim Endocrinol. 2002. Vol. 23 (1–2). P. 321–328. DOI: 10.1016/s0739-7240(02)00167-4.
21. Endocrine profiles, haematology and pregnancy outcomes of late pregnant Holstein dairy heifers sired by bulls giving a high or low incidence of stillbirth / B. Kornmatitsuk [et al.] // Acta Vet Scand. 2004. Vol. 45 (1–2). P. 47–68. DOI: 10.1186/1751-0147-45-47.
22. Seth S. Lewis A. J., Galbally M. Perinatal maternal depression and cortisol function in pregnancy and the postpartum period: a systematic literature review // BMC Pregnancy Childbirth. 2016. Vol. 16 (1). P. 124. DOI: 10.1186/s12884-016-0915-y.
23. Thompson L. A., Trevathan W. R. Cortisol reactivity, maternal sensitivity, and learning in 3-month-old infants // Infant Behav Dev. 2008. Vol. 31 (1). P. 92–106. DOI: 10.1016/j.infbeh.2007.07.007.

Дерхо Марина Аркадьевна, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой естественнонаучных дисциплин, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: derkho2010@yandex.ru.

Янич Татьяна Валерьевна, аспирант, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: khimieugavm@inbox.ru.

* * *