

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФСГ СВИНЬИ В КРОВИ И В ГОНАДОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТАХ

¹Матевосян К.Ш., ¹Степанова И.И., ¹Алексанкина В.В., ¹Тихонова Н.Б.,
¹Алексанкин А.П., ¹Болтовская М.Н., ¹Козловский Ю.Е., ²Овчарова А.Н.

¹НИИ морфологии человека, Москва, ²ВНИИ физиологии, биохимии и питания
животных, Боровск Калужской обл., Российская Федерация

Гормональные гонадотропные препараты широко применяются в животноводческой практике для регулирования воспроизводительной функции животных в условиях интенсивного животноводства. Одним из гонадотропинов гипофизарного происхождения является фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллитропин). Физиологическая роль ФСГ в организме животного заключается в регуляции функции половых желез. У женских особей ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, овуляцию и развитие желтых тел, у мужских – сперматогенез. Цель исследования – разработка тест-системы для количественного определения уровня ФСГ свиньи в сыворотке крови, моче и в гонадотропных препаратах. Диапазон измеряемых разработанной тест-системой концентраций ФСГ составляет 0,1 -20 нг/мл, что позволяет определять физиологическую концентрацию гормона в системной циркуляции, выявлять гормональную недостаточность, контролировать содержание введённого препарата в организме свиней и сроки его выведения. Разработанная тест-система не имеет аналогов в Российской Федерации и может применяться в ветеринарии и животноводстве для контроля репродуктивной функции свиней, в селекционной работе, а также для контроля гонадотропных препаратов на основе ФСГ свиньи, применяемых при регулировании воспроизводительной функции.

Ключевые слова: свиньи, гонадотропные препараты, ФСГ, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, тест-система

Проблемы биологии продуктивных животных, 4: 94-104

Введение

Используемые сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид; ЕОП – единицы оптической плотности; ИФА – иммуноферментный анализ; ЛГ – лютеинизирующий гормон; МкАт – моноклональные антитела; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; ТТГ – тиреотропный гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, фоллитропин; BSA (bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин; PBS (phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер.

Фолликулостимулирующий гормон относится к гонадотропным гормонам, секретлируемым передней долей гипофиза в ответ на продукцию гипоталамусом гонадолиберина. В эволюционном плане ФСГ впервые появился у челюстных позвоночных (Sower et al., 2009). Его физиологическая функция направлена на регуляцию работы половых желез и проявляется при влиянии на секрецию гонадами эстрогенов и андрогенов и при повышении чувствительности половых желез к другому гипофизарному гонадотропному гормону – лютеинизирующему гормону (ЛГ). У женских особей ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, а в последующем, совместно с ЛГ, – овуляцию и развитие жёлтых тел. Недостаточная продукция ФСГ в организме самок приводит к торможению

созревания фолликулов, недоразвитию молочных желез, половому инфантилизму и бесплодию. У самцов ФСГ регулирует сперматогенез и его недостаточность сопровождается недоразвитием половых желез, расстройствами роста и общего развития, недостаточной выраженностью вторичных половых признаков (Pierce, Parsons, 1981).

Уровень ФСГ в сыворотке крови здоровых животных зависит от пола, возраста, физиологических особенностей породы, стадии эстрального цикла. У свиней клетки передней доли гипофиза первые порции ФСГ, как и ЛГ, начинают синтезировать уже на 40-45 день эмбрионального развития и показывают максимальную продукцию к 80-85-му дню (Dacheux, 1983). Молодые свинки обычно достигают пубертатного периода на 150-220-й день жизни, в зависимости от многих факторов, включая начало контактов с хряком и конституцию самой свинки. После наступления половой зрелости длительность эстрального цикла составляет 18-24 дня и большинство свинок оплодотворяются в течение 2-го или 3-го эстрального цикла. От успешного осеменения до опороса обычно проходит 114-116 дней. Период 14-40 дней лактации у свиноматки – это период лактационного анэструса, который заканчивается после отёма поросят, и через 4-6 дней вновь наступает эструс.

Все репродуктивные стадии контролируются системой положительных и отрицательных взаимных влияний репродуктивных гормонов, которые продуцируются гипоталамусом (гонадотропин-релизинг гормон), гипофизом (ФСГ, ЛГ, окситоцин, пролактин), яичниками (прогестерон, 17β -эстрадиол, ингибины, релаксин) и маткой (простагландин F 2α). За один эстральный период у свиней может овулировать от 15 до 30 ооцитов. Уровень и качество овулировавших яйцеклеток зависит от развития фолликулов в предшествующий период, в течение которого происходит индукция группы «спящих» фолликулов к созреванию и селекция этих развивающихся фолликулов (Soede et al., 2011).

В работах ряда исследователей показано, что уровень сывороточного ФСГ зависит от породы свиней и коррелирует с уровнем овуляции, характерным для породы (Cassady et al., 2000; Borg et al., 1993). Для животных с высоким уровнем овуляции характерен и высокий уровень ФСГ в сыворотке крови (Shaw, Foxcroft, 1985).

Несмотря на индивидуальные отличия в частоте, длительности и амплитуде пиковых значений ФСГ (Knox et al., 2003), в течение эстрального цикла выделяют три характерных для большинства свиноматок периода повышенного уровня гормона – за 2-4 дня до овуляции, на 2-5 и 6-10 сутки после овуляции. Однако, по данным (Noguchi et al., 2010), существует три основных пика – за 8-10 дней (около 1,7 нг/мл), 2 дня (1,5 нг/мл) до овуляции и на 2-й день (2,3 нг/мл) после овуляции. Повышение концентрации ФСГ в периферическом кровотоке на 2-й день после овуляции стимулирует начало синхронного развития фолликулов и увеличение количества малых и средних фолликулов. Количество малых антральных фолликулов также увеличивается к 9-му дню, что соответствует второму пику ФСГ после овуляции (Knox et al., 2003, 2005).

Некоторое повышение ФСГ в сыворотке крови наблюдается и за 9 дней до овуляции, что соответствует периоду начала лютеолиза (деградации и рассасыванию жёлтых тел яичника), и, как следствие – снижению прогестерона, а также увеличению количества малых фолликулов. Небольшой пик ФСГ за 2 дня до овуляции, совпадающий с основным пиком ЛГ, стимулирует разрыв зрелых фолликулов и выход яйцеклеток. Таким образом, повышение ФСГ в сыворотке крови можно соотнести с процессом активизации групп антральных фолликулов и стимуляции овуляции. Физиологические уровни ФСГ у половозрелых животных несколько отличаются по данным различных исследований, однако в среднем их диапазон составляет 0,5-3 нг/мл. У мужских особей уровень ФСГ обычно ниже, чем пиковые женские значения. Базальные уровни женских и мужских особей находятся примерно на одном уровне. Впрочем, уровни ФСГ в пренатальном периоде у самцов значительно ниже, чем у самок.

Гормональные гонадотропные препараты широко применяются в животноводческой практике для регулирования воспроизводительной функции животных, стимуляции роста

фолликулов, овуляции и образования жёлтых тел, что приводит к синхронизации половой охоты у маточного поголовья. Гонадотропины применяют также для коррекции функциональных расстройств репродуктивной системы, вызывания суперовуляции у самок-доноров, сокращения сервис-периода. Своевременное покрытие животных в оптимальный период повышает рентабельность в условиях интенсивного животноводства (Завертяев, 1989).

Получают гонадотропные препараты для целей животноводства либо из сыворотки крови жеребых кобыл, либо из гипофиза различных видов сельскохозяйственных животных. Препараты первой группы могут вызывать нежелательные побочные явления, проявляющиеся в виде анафилаксии. Для получения требуемого эффекта необходимы высокие дозы препаратов, приводящие к образованию крупных фолликулов с кровоизлияниями, множественных жёлтых тел и кист яичников. Длительный период полураспада препаратов обуславливает накопление в организме животных экзогенных гормонов, и как следствие, – сдвиги в гормональном статусе. Яичники таких животных находятся в состоянии гиперстимуляции, изменяется нормальное развитие гамет и степень оплодотворяемости, что приводит к дегенеративным изменениям зародышей. В связи с этим, многократное использование препаратов из сыворотки крови жеребых кобыл нежелательно. Препараты гипофизарного происхождения не вызывают аллергических реакций и обладают коротким периодом полураспада. При длительном применении таких препаратов не наблюдается заметных нарушений в репродуктивной системе животных и сохраняется чувствительность яичников к гонадотропинам (Эрнст, Сергеев, 1989).

Одним из наиболее доступных и часто применяемых гонадотропинов гипофизарного происхождения является фолликулостимулирующий гормон свиньи. ФСГ – это гонадотропный гормон передней доли гипофиза, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 30 кД, состоящий из α - и β -субъединиц. Субъединица α -ФСГ идентична α -субъединицам лютеинизирующего гормона (ЛГ), тиреотропного гормона (ТТГ) и кодируется одним геном для всех трёх гормонов. Субъединица β -ФСГ специфична для данного гормона и кодируется отдельным геном. Молекулы ФСГ человека и разных видов животных, обладая значительной гомологией, совпадают не полностью. Видовых структурных различий в α -субъединице значительно больше, чем в β -субъединице (Pierce, Parsons, 1981). ФСГ свиньи по своим антигенным свойствам отличается от ФСГ человека, что, по-видимому, связано не только с отличиями в аминокислотной последовательности полипептидных цепей, но также с особенностями в строении их гликозилирования и состава олигосахаридных цепей (Parkoff, 1969). Перекрёстная реактивность моноклональных антител (МкАт), полученных к ФСГ свиньи в нашей коллекции, с гонадотропными гормонами человека не выявлена (Вербицкий и др., 1994).

Таким образом, определение концентрации ФСГ в крови или моче животных может быть полезным при отборе высокопродуктивных особей маточного поголовья свиней, контроле репродуктивной функции маточного стада, при регулировании воспроизводительной функции и синхронизации охоты. Важно точно определять концентрацию вводимого препарата и проводить мониторинг его содержания в крови стимулируемых особей, так как показано, что при гиперстимуляции гонадотропинами возможно ингибирование проницаемости сосудов и нарушение имплантации (Kramer, 1997).

Нами ранее была разработана количественная иммуноферментная тест-система «ФСГ-свиньи-ИФА» на основе оригинальных мышинных моноклональных антител, продуценты которых получены ранее сотрудниками НИИ морфологии человека (Вербицкий и др., 1994) и хранятся в коллекции института (Матевосян и др., 2018). Тест-система «ФСГ-свиньи-ИФА» предназначена для определения концентрации ФСГ свиньи в сыворотке крови и в препаратах, изготавливаемых из сыворотки крови и гипофизов свиней. Однако эта тест-система обладает недостаточной чувствительностью для определения физиологических уровней ФСГ в сыворотке крови и моче свиней. В данной работе мы увеличили чувствительность и добились стабильных показателей определения физиологических базальных уровней ФСГ свиньи в

биологических жидкостях, что позволит выявлять репродуктивные проблемы у отдельных особей в ранние сроки.

Материал и методы

Получение гибридных клеток – продуцентов мышинных моноклональных антител против ФСГ свиньи. Гибридные клеточные линии, продуцирующие МкАт против ФСГ свиньи, были получены в результате слияния клеток миеломной линии X63.Ag.8653 с лимфоцитами мышей линии BalB/c, иммунизированных ФСГ свиньи (Sigma #F-8001). Клеточные линии были помещены для длительного хранения в дьюары с жидким азотом. Для разработки иммуноферментной тест-системы клеточные линии доставали из хранилища, культивировали и проводили характеристику продуцируемых ими МкАт.

Хранение гибридных клеток. Гибридные клетки для длительного хранения закладывали в дьюары с жидким азотом. Клетки ресуспендировали в среде для хранения на основе культуральной среды RPMI-1640 с глутамином, содержащей 50% бычьей фетальной сыворотки и 10% ДМСО. Суспензию объёмом 1 мл с концентрацией клеток 2×10^9 /мл вносили в пластиковые флаконы на 2 мл для хранения в жидком азоте. Флаконы с суспензией помещали в пенопластовую упаковку и ставили на сутки в морозильную камеру при -70°C , затем флаконы доставали из пенопластовых упаковок и сразу помещали в дьюары, содержащие жидкий азот. Для получения моноклональных антител флаконы с гибридными клетками-продуцентами доставали из жидкого азота, быстро размораживали при 37°C , осаждали центрифугированием при 1500 g и отмывали культуральной средой RPMI-1640 с глутамином.

Культивирование гибридных клеток. Культивировали гибридные клетки в условиях CO_2 -инкубатора при 5% CO_2 и 37°C в малых культуральных матрасах в объёме 10-12 мл культуральной среды RPMI-1640 с глутамином до получения концентрации клеток 10^9 /мл. Продукцию моноклональных антител определяли в культуральной среде при проведении иммуноферментного анализа на 96-луночных полистироловых планшетах (Корея, SPL Maxibinding #38296) с иммобилизованным на дне лунок ФСГ свиньи, в качестве детектора использовали конъюгат пероксидазы хрена с козыими антителами против иммуноглобулинов мыши (Invitrogen #62-6520). Результат реакции учитывали по изменению окраски хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ООО «Диатех-ЭМ» #PM-01).

Получение и очистка моноклональных антител. Гибридные клетки переносили из культуральных матрасов в центрифужные пробирки, осаждали центрифугированием при 1500 g и ресуспендировали в культуральной среде до концентрации 2×10^9 /мл. Мышам линии BalB/C внутрибрюшинно вводили 1 мл клеточной суспензии. После развития асцита внутрибрюшную жидкость откачивали и из неё получали фракцию иммуноглобулинов. Очистку иммуноглобулинов из асцитической жидкости проводили в несколько последовательных этапов. Нативную асцитическую жидкость разводили в 2 раза PBS и к полученному раствору добавляли равный объём насыщенного раствора сульфата аммония, оставляли на 2 часа при 4°C , а затем центрифугировали при 5000 g в течение 40 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в PBS до конечного объёма, равного начальному объёму нативного асцита. Полученную фракцию (сульфатную) диализовали в течение ночи против PBS. Затем проводили ионообменную хроматографию сульфатной фракции на колонке с Q-сефарозой (Sigma #GE17-0510-01) согласно рекомендациям производителя, либо аффинную хроматографию на А-протеин сефарозе (Healthcare #17-0402), либо получали фракцию иммуноглобулинов с применением каприловой кислоты (Temponi et al., 1989).

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Чистоту препарата МкАт на каждом этапе фракционирования определяли при проведении электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и при восстановлении дисульфидных связей (Кондратьева и др., 2004). Электрофорез проводили в 5%-ном концентрирующем и

10%-ном разделяющем ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Для электрофоретического разделения в полиакриламидном геле использовалась камера VE-1M для вертикального электрофореза белков (ООО Хеликон, Россия). Гель, окрашивали кумасси синим (G 250) в течение часа, после чего гель отмывали в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 5% изопропанола.

Антиген и приготовление калибровочных образцов для тест-системы. Калибровочные образцы для иммуноферментной тест-системы готовили на основе стабилизирующего буфера для длительного хранения белковых растворов (ООО Диатех-ЭМ #PM-03). В стабилизирующий буфер вносили ФСГ свиньи (Sigma #F-8001) до концентрации, соответствующей значениям отметок шкалы 0,5; 1; 5 10 и 20 нг/мл.

Иммобилизация моноклональных антител на полистироловые планшеты. Для приготовления твёрдой фазы иммуноферментной тест-системы в лунки 96-луночных полистироловых планшетов вносили по 100 мкл раствора МкАт против ФСГ свиньи в PBS в концентрации 5 мкг/мл, инкубировали в течение ночи при 4°C, содержимое лунок удаляли, вносили в лунки планшета по 200 мкл 1%-го раствора BSA в PBS для блокирования свободных сайтов на полистироле и инкубировали в течение суток при 4°C. Затем раствор альбумина удаляли из лунок, а планшет либо сразу использовали для проведения иммуноферментного анализа, либо оставляли на воздухе при комнатной температуре в течение суток для полного высыхания лунок и затем упаковывали в пакеты из фольги для дальнейшего хранения.

Приготовление конъюгата моноклональных антител с пероксидазой хрена. Конъюгат пероксидазы хрена (ПХ) с МкАт готовили по методу (Nakane, Kawaoi, 1974) с некоторыми модификациями (Elwell, Howard, 2001).

Проведение иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-системы для определения ФСГ свиньи. Калибровочные стандарты и исследуемые образцы сыворотки крови свиньи вносили в дубли по 100 мкл в свободные лунки планшета. Закрывали планшет самоклеящейся плёнкой и инкубировали в течение 60 мин в темноте при температуре 37°C. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок декантированием и промывали лунки 4 раза раствором PBS с 0,05% твином по 200 мкл в лунку. Вносили во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, закрывали планшет самоклеящейся плёнкой и инкубировали в течение 60 мин. в темноте при температуре 37°C. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок и промывали 4 раза раствором PBS с 0,05% твином. Затем вносили во все лунки по 100 мкл субстратно-хромогенной смеси с тетрабензидином. Планшет закрывали самоклеящейся плёнкой и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин. в темноте. Затем вносили 1 М серную кислоту по 100 мкл в лунку. Фотометрию проводили на спектрофотометре (аппарат для регистрации иммуноферментативных реакций «Униплан», НПО Пикон) вертикального сканирования с 96-ю луночными планшетами при длине волны 450 нм сразу после остановки реакции. После проведения фотометрии вычисляли среднее значение единиц оптической плотности (ЕОП) лунок для каждого дубля и строили калибровочный график для определения концентрации ФСГ свиньи в сыворотке крови, моче свиней и в препаратах, содержащих ФСГ.

Результаты и обсуждение

Для получения чистой фракции иммуноглобулинов культуры гибридных клеток двух отобранных ранее клонов (Матевосян и др., 2018) были введены мышам линии Balb/C для формирования асцита. Полученная асцитическая жидкость была подвергнута сульфатному фракционированию. Для улучшения чувствительности тест-системы провели сравнение методов очистки сульфатной фракции асцитической жидкости ионообменной хроматографией на Q-сефарозе (рис. 1), аффинной хроматографией на А-протеин сефарозе (Матевосян и др., 2018) и каприловой кислотой.

При проведении ионообменной хроматографии было получено три пика (рис. 1). Собранные фракции, соответствующие каждому пику, концентрировали осаждением белка сульфатом аммония, анализировали на содержание IgG методом электрофоретического разделения в ПААГ (рис. 2) и определяли их активность при проведении иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ ионообменных фракций проводили на полистироловых 96-луночных планшетах с адсорбированным на дне лунок ФСГ свиньи. Комплекс антигена (ФСГ свиньи) с IgG выявляли с использованием в качестве детектора конъюгата антимышиных антител с пероксидазой хрена. В качестве хромогена использовали раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина.

По данным электрофоретического анализа, наиболее чистой по содержанию IgG оказалась фракция пика, вышедшего вторым (рис. 1, указ. 3; рис. 2, дор. 4), эта фракция показала также наибольшую активность.

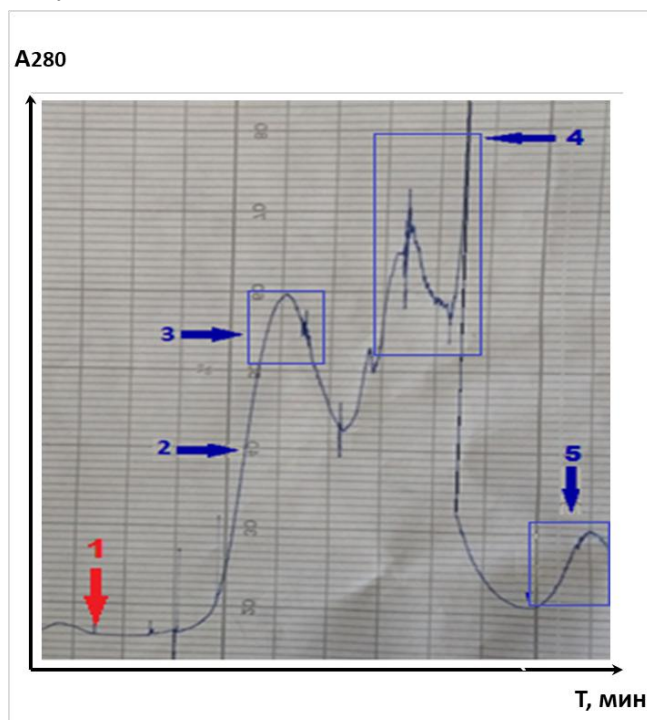


Рис. 1. Ионообменная хроматография сульфатной фракции асцитической жидкости. 1 — нанесение на колонку, 2 — плечо первого пика, 3 — первый пик, 4 — второй пик, содержащий наиболее активную фракцию; 5 — третий пик.

МкАт активной фракции после ионообменной хроматографии, а также очищенные аффинным и каприловым методами показали в ИФА примерно одинаковый уровень активности. Конъюгаты, приготовленные с МкАт клона G22, после разных методов очистки, показали при равнозначной белковой концентрации разную степень активности в иммуноферментном анализе. Наиболее активным оказался конъюгат, приготовленный из МкАт, очищенных ионообменной хроматографией. Наименьшую активность показал конъюгат из МкАт, очищенных с использованием каприловой кислоты. Конъюгаты, приготовленные из антител, подвергнутых аффинной хроматографии и обработке каприловым методом, показывали значительно более высокую воспроизводимость результатов в ИФА в сравнении с конъюгатом из МкАт, подвергнутых ионообменной хроматографии. Такие результаты не стали неожиданностью, так как известно, что ионообменная хроматография — это более мягкий метод фракционирования, в отличие от каприлового метода и аффинной хроматографии (Temponi et al., 1989).

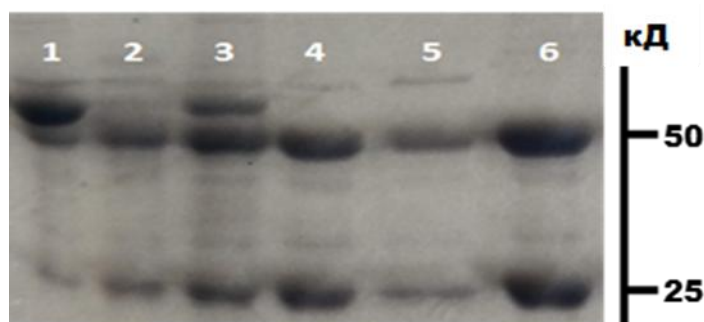


Рис. 2. Электрофореграммы МкАт на различных стадиях очистки. 1 – сульфатная фракция; 2 – плечо первого пика ионообменной хроматографии, 3 – первый пик ионообменной хроматографии, 4 – второй пик ионообменной хроматографии, 5 – третий пик ионообменной хроматографии, 6 – контрольный образец чистых мышинных IgG; кД – килодальтон

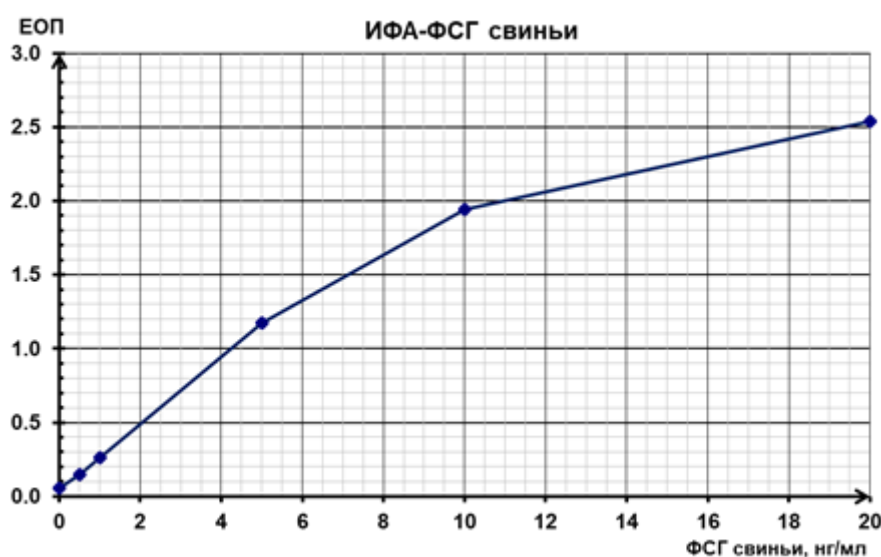


Рис. 3. Калибровочная кривая для определения концентрации ФСГ свиньи. ЕОП – единицы оптической плотности

В ранее описанной тест-системе (Матевосян и др., 2018) учитывались данные литературы, которые показывали, что физиологические значения концентрации ФСГ у половозрелых свиней изменяются в диапазоне от 0,7 до 7 нг/мл (Кпюх, 2015), что входит в диапазон физиологической нормы и у человека. Однако, чувствительность этой системы на уровне 0,3 нг/мл является недостаточной для работы в диапазоне показателей ниже нормальных значений. Работа на пороге чувствительности системы, а именно в эту категорию попадает базальный уровень значений гормона, также рискованна и может привести к ошибочным заключениям.

Для оценки рабочих характеристик тест-системы в разных диапазонах концентрации ФСГ, была проведена сравнительная оценка результатов, полученных при использовании разных методов очистки при адсорбции на полистироловые планшеты при концентрации гормона в диапазонах 0,1-5, 5-10 и 10-20 нг/мл. Типичная калибровочная кривая для определения концентрации ФСГ свиньи с использованием разрабатываемой тест-системы, приведена на рис. 3.

Для метрологической характеристики разрабатываемой тест-системы были определены рекомендуемые показатели (Тигранян и др. Методическое руководство по проведению контроля качества наборов реагентов для иммуноферментного анализа, М., 1994),

а именно – чувствительность, специфичность, тест на «открытие», тест на «линейность» и контроль воспроизводимости результатов.

Технические характеристики тест-системы на основе планшетов с МкАт, очищенными ионообменной и аффинной хроматографией, были стабильными в течение не менее 6 мес. хранения, тогда как каприловый метод очистки показал неудовлетворительные результаты (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика параметров чувствительности и воспроизводимости тест-системы ИФА-ФСГ свиньи/

Методы очистки МкАт клона G2 ¹	Чувствительность, нг/мл	КВС 1, %	КВС 2, %	КВС 3, %
Ионообменная хроматография	0.1	5.2	5.4	4
Аффинная хроматография	0.5	7.3	4.8	4.4
Каприловый метод	5	48	33	10

Примечания: МкАт – моноклональные антитела, иммобилизованные на дно лунок полистироловых планшетов, КВС 1 – коэффициент вариации контрольной сыворотки свиньи с концентрацией ФСГ в диапазоне 0,1-5 нг/мл, КВС-2 – в диапазоне 5-10 нг/мл, КВС-3 – в диапазоне 10-20 нг/мл.

Для тест-системы на основе МкАт, очищенных ионообменной хроматографией чувствительность тест-системы составляла не более 0,1 нг/мл, что представляет собой наименьшую концентрацию ФСГ свиньи, определяемую данной тест-системой. Величину чувствительности рассчитывали как коэффициент вариации, т.е. частное от деления среднеквадратичного отклонения значений оптической плотности (ОП) калибровочной пробы, не содержащей исследуемое вещество, на среднее значение ОП калибровочной пробы с наименьшим содержанием гормона (Тигранян и др. Методическое руководство по проведению контроля качества наборов реагентов для иммуноферментного анализа, М., 1994). Высокая специфичность тест-системы определялась специфическими МкАт, на основе которых она была разработана.

Тест «на открытие» представляет собой определение количества ФСГ свиньи в образце, полученном при смешивании равных объемов калибровочной пробы и анализируемого образца сыворотки крови свиньи с известной концентрацией ФСГ. Величина теста на «открытие» находилась в допустимых пределах от 90 до 110 %. Тест на «линейность» заключался в последовательных разведениях калибровочных проб, содержащих гормон, и нулевой пробы, не содержащей ФСГ свиньи, с последующим сравнением полученных результатов ИФА с ожидаемыми при таком разведении. Значения теста на «линейность» находились в допустимых пределах – от 90 до 110 %. Воспроизводимость результатов ИФА оценивали по коэффициенту вариации, как отношению среднеквадратического отклонения к среднему значению, получаемому при многократном измерении одного и того же образца. При проведении этого теста использовали образцы с низким (1-5 нг/мл), средним (5-10 нг/мл) и высоким (15-30 нг/мл) содержанием ФСГ свиньи. Коэффициент вариации во всех случаях не превышал 8%.

Заключение

Разработана тест-система для определения концентрации ФСГ свиньи в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа по «сэндвич»-типу на основе оригинальных мышинных моноклональных антител против ФСГ свиньи. Моноклональные антитела, использованные в тест-системе, являются видоспецифичными и не реагируют с другими гонадотропными гормонами, что обеспечивает высокую специфичность системы и точность получаемых результатов. Технические характеристики тест-системы являются удовлетворительными для определения концентрации ФСГ свиньи в сыворотке крови и моче животных в норме и при нарушениях репродуктивной функции. Разработанная тест-система

не имеет аналогов в Российской Федерации и может применяться в ветеринарии и животноводстве для контроля репродуктивной функции свиней, в селекционной работе, а также для контроля гонадотропных препаратов на основе ФСГ свиньи, применяемых при регулировании воспроизводительной функции сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербицкий М.Ш., Фидлер Р., Матевосян К.М. и др. Моноклональные антитела к антигенам и гормонам репродуктивной системы: использование в иммунологии репродукции // Иммунология – 1994 – № 4 – С. 26-30.
2. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота – Л.: Агропромиздат, 1989 – 610 с.
3. Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г. и др. Практикум по иммунологии – М.: Академия, 2004 – 272 с.
4. Матевосян К.Ш., Степанова И.И., Алексанкина В.В., Алексанкин А.П., Козловский Ю.Е. Разработка тест-системы для количественного определения фолликулостимулирующего гормона свиней в биологических жидкостях методом иммуноферментного анализа // Наука, техника и образование – 2018 – № 11 – С. 24-32. DOI: 10.20861/2312-8267-2018-52-006
5. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных – М.: Агропромиздат, 1989. – Р. 88-93.
6. Borg K.E., Lunstra D.D., Christenson R.K. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars // Biol. Reprod – 1993 – Vol. 49 – No. 3 – P. 515-521. PubMed PMID: 8399844. <<https://doi.org/10.1095/biolreprod49.3.515>>
7. Cassady J.P., Johnson R.K., Ford J.J. Comparison of plasma FSH concentration in boars and gilts from lines selected for ovulation rate and embryonal survival, and litter size and estimation of (co)variance components for FSH and ovulation rate // J. Anim. Sci. – 2000 – Vol. 78. – No. 6. – P. 1430-1435. PubMed PMID: 10875623 <<https://doi.org/10.2527/2000.7861430x>>
8. Dacheux F., Martinat N. Immunocytochemical localization of LH, FSH and TSH in the fetal porcine pituitary // Cell Tissue Res. – 1983. – Vol. 228. – No. 2. – P. 277-295. PubMed PMID: 6402304. DOI:10.1007/BF0020487
9. Elwell K., Howard G.C. Chemically Modifying Antibodies // In: Basic Methods in Antibody Production and Characterization (Gary C. Howard, Delia R. Bethell, Eds). – Boca Raton-London-New York-hington: CRC Press LLC Publ., 2001. – P. 199-215.
10. Knox R.V., Vatzias G., Naber C.H., Zimmerman DR. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts // J. Anim. Sci. – 2003. – Vol. 81. – No. 1. – P. 249-260. PubMed PMID: 12597396. DOI:10.2527/2003.811249x
11. Knox R.V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig // Domest. Anim. Endocrinol. – 2005. – Vol. 29. – No. 2. – P. 385-397. Epub 2005 Apr 7. Review. PubMed PMID: 15998504. DOI:10.1016/j.domaniend.2005.02.025
12. Knox R.V. Recent advancements in the hormonal stimulation of ovulation in swine // Vet. Med. – 2015. – Vol. 5. – No. 6. – P. 309-320. DOI: 10.2147/VMRR.S68960
13. Kramer B. Changes in vascular permeability and deciduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins // Anat Rec. – 1997. – Vol. 247. – No. 1. – P. 20-24.
14. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. – 1974. – Vol. 22. – No. 12. – P. 1084-1091. DOI: 10.1177/22.12.1084
15. Noguchi M., Yoshioka K., Itoh S., Suzuki C., Arai S., Wada Y., Hasegawa Y., Kaneko H. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow // Reproduction. – 2010. – Vol. 139. – No. 1. – P. 153-161. PubMed PMID:19778995. DOI:10.1530/REP-09-0018
16. Papkoff H. Chemistry of the gonadotropins // In: Reproduction in Domestic Animals. 2nd Edition (Cole H.H., Cupps P.T., Eds.). – New York-San Francisco-London: Acad. Press Publ., 1969. – 684 p. (P. 70-72). eBook ISBN: 9781483263151
17. Pierce J. G., Parsons T.F. Glycoprotein hormones: structure and function // Ann. Rev. Biochem. – 1981. – Vol. 50. – P. 465-495. DOI: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002341
18. Shaw H.J., Foxcroft G.R. Relationships between LH, FSH and prolactin secretion and reproductive activity in the weaned sow // J. Reprod. Fertil. – 1985. – Vol. 75. – No. 1. – P. 17-28. PubMed PMID: 3928882. DOI:10.1530/jrf.0.0750017

19. Soede N.M., Langendijk P., Kemp B. Reproductive cycles in pigs // *Anim. Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 124. – No. 3-4. – P. 251-258. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.025. Epub 2011 Feb 23. Review. PubMed PMID: 21397415.
20. Sower S.A., Freamat M., Kavanaugh S.I. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 161. – No. 1. – P. 20-29. DOI: 10.1016/j.ygcen.2008.11.023. Epub 2008 Dec 3. Review. Erratum in: *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009. – Vol. 163. – No. 3. – P. 342-343. PubMed PMID: 19084529.
21. Temponi M., Kageshita T., Perosa F., Ono R., Okada H., Ferrone S. Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification // *Hybridoma*. – 1989. – Vol. 8. – No. 1. – P. 85-95. PubMed PMID: 2784406.

REFERENCES

1. Borg K.E., Lunstra D.D., Christenson R.K. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars. *Biol. Reprod.* 1993, 49(3): 515-521. PubMed PMID: 8399844. <<https://doi.org/10.1095/biolreprod49.3.515>>
2. Cassady J.P., Johnson R.K., Ford J.J. Comparison of plasma FSH concentration in boars and gilts from lines selected for ovulation rate and embryonal survival, and litter size and estimation of (co)variance components for FSH and ovulation rate. *J. Anim. Sci.* 2000, 78(6):1430-1435. PubMed PMID: 10875623. <<https://doi.org/10.2527/2000.7861430x>>
3. Dacheux F., Martinat N. Immunocytochemical localization of LH, FSH and TSH in the fetal porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* 1983, 228(2): 277-295. PubMed PMID: 6402304. DOI:10.1007/BF0020487
4. Elwell K., Howard G.C. Chemically modifying antibodies. In: *Basic Methods in Antibody Production and Characterization* (Gary C. Howard, Delia R. Bethell, Eds). Boca Raton-London- New York-Washington: CRC Press LLC Publ., .2001, Ch. 14: 199-215.
5. Ernst L.K., Sergeev N.I. *Transplantatsiya embrionov sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* (Transplantation of embryos of farm animals). Moscow: Agropromizdat Publ., 1989, P. 88-93 (In Russian)
6. Knox R.V., Vatzias G., Naber C.H., Zimmerman D.R. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. *J. Anim. Sci.* 2003, 81(1): 249-260. PubMed PMID: 12597396. DOI:10.2527/2003.811249x
7. Knox R.V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2005, 29(2): 385-397. Epub 2005 Apr 7. Review. PubMed PMID: 15998504. DOI:10.1016/j.domaniend.2005.02.025
8. Knox R.V. Recent advancements in the hormonal stimulation of ovulation in swine. *Vet. Med.* 2015, 5(6): 309-320. DOI: 10.2147/VMRR.S68960
9. Kramer B. Changes in vascular permeability and deciduoma formation during the peri-implantation period of the rat in response to exogenous gonadotropins. *Anat. Rec.* 1997, 247(1): 20-24.
10. Matevosyan K.Sh., Stepanova I.I., Aleksankina V.V., Aleksankin A.P., Kozlovskii Ju.E. [Development of ELISA for the quantitative determination of the porcine follicle-stimulating hormone in biological liquids]. *Nauka, tehnika i obrazovanie - Science, technology and education.* 2018, 11: 24-32. DOI: 10.20861/2312-8267-2018-52-006 (In Russian)
11. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974, 22(12):1084-1091. DOI: 10.1177/22.12.1084
12. Noguchi M, Yoshioka K, Itoh S, Suzuki C, Arai S, Wada Y, Hasegawa Y, Kaneko H. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction.* 2010, 139(1): 153-161. PubMed PMID:19778995. DOI:10.1530/REP-09-0018
13. Papkoff H. Chemistry of the gonadotropins. In: *Reproduction in Domestic Animals*. 2nd Edition (Cole H.H., Cupps P.T., Eds). New York-San Francisco-London: Acad. Press. Publ., 1969, 684 p. (P. 70-72) eBook ISBN: 9781483263151
14. Pierce J.G., Parsons T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 1981, 50: 465-495. DOI: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002341
15. Shaw H.J., Foxcroft G.R. Relationships between LH, FSH and prolactin secretion and reproductive activity in the weaned sow. *J. Reprod. Fertil.* 1985, 75(1): 17-28. PubMed PMID: 3928882. DOI:10.1530/jrf.0.0750017

16. Soede N.M., Langendijk P., Kemp B. Reproductive cycles in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 124(3-4): 251-258. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.025. Epub 2011 Feb 23. Review. PubMed PMID: 21397415.
17. Sower S.A., Freamat M., Kavanaugh S.I. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009, 161(1): 20-29. DOI: 10.1016/j.ygcen.2008.11.023. Epub 2008 Dec 3. Review. Erratum in: *Gen Comp Endocrinol.* 2009, 163(3): 342-343. PubMed PMID: 19084529.
18. Temponi M., Kageshita T., Perosa F., Ono R., Okada H., Ferrone S. Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification. *Hybridoma.* 1989, 8(1): 85-95. PubMed PMID: 2784406.
19. Verbitsky M.Sh., Fidler R., Matevosyan K.M. et al. [Monoclonal antibodies to antigens and hormones of the reproductive system: use in reproduction immunology]. *Immunologiya -Immunology.* 1994, 4: 26-30.
20. Zavertyaev B.P. *Biotehnologiya v vosproizvodstve i selektsii krupnogo rogatogo skota* (Biotechnology in the reproduction and selection of cattle). Leningrad: Agropromizdat Publ., 1989, 610 p. (In Russian)

Quantitative immuno-enzyme test system for determining pig FSH in blood and in gonadotropic preparations

¹Matevosyan K.Sh., ¹Stepanova I.I., ¹Aleksankina V.V., ¹Tikhonova N.B.,
¹Aleksankin A.P., ¹Boltovskaya M.N., ¹Kozlovskii Yu.E., ²Ovcharova A.N.

¹*Institute of Human Morphology, Moscow, ²Institute of Animal Physiology, Biochemistry
and Nutrition, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Hormonal gonadotropic preparations are widely used in animal husbandry to regulate the reproductive function of animals in intensive animal husbandry. One of the gonadotropins of the pituitary origin is the follicle-stimulating hormone (FSH, follitropin) of the pig. The physiological role of FSH in the animal is to regulate the function of the gonads. In females, FSH stimulates the growth and maturation of follicles in the ovaries, the ovulation and development of the corpus luteum, as well as spermatogenesis in males.

The aim of the study was to develop a test system for the quantitative determination of the level of pig FSH in serum, urine and in gonadotropic drugs. The range of FSH concentrations measured by the developed test system is 0.1-20 ng/ml, which makes it possible to determine the physiological concentration of the hormone in the systemic circulation, detect hormonal deficiency, control the content of the injected drug in the pig body and the timing of its excretion. The developed test system has no analogues in the Russian Federation and can be used in veterinary medicine and animal husbandry to control the reproductive function of pigs, in breeding work, as well as to control the quality of gonadotropic drugs based on pig FSH, used in the regulation of reproductive function.

Keywords: pigs, gonadotropic drugs, follicle-stimulating hormone, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay, test system

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 4: 94-104

Поступило в редакцию: 08.09.2019 Получено после доработки: 21.10.2019

Матевосян Каринэ Шагеновна, к.м.н., в.н.с., тел.8 (499) 129-55-22; mkarik@mail.ru;

Степанова Ирина Ильдаровна, н.с.;

Алексанкина Валентина Викторовна, к.б.н., с.н.с.;

Тихонова Наталия Борисовна, к.б.н., в.н.с.;

Алексанкин Андрей Павлович, к.б.н., н.с.;

Болтовская Марина Николаевна, д.б.н., в.н.с.;

Козловский Юрий Евгеньевич, к.б.н., в.н.с.,

Овcharова Анастасия Никитична, к.б.н., с.н.с, тел. 8(495) 996-34-15, 8(48438) 4-30-26, 4-30-32