

УДК 519.16+591.26:616-003.219

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОГЛИКАНОВ СЕМЕННИКОВ КРЫС

Николаев А.А., Ветошкин Р.В., Логинов П.А.

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»,
Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

Цель исследования – получение антител к протеогликанам эпидидимисов и семенников крыс и последующий иммунохимический анализ распространения и динамики уровня этого вида протеогликанов. Показано, что для получения антител к протеогликанам семенников и эпидидимисов крыс оптимально подходят в качестве продуцентов антител куры. Приведен анализ результатов иммунохимического изучения протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс, после ферментативного удаления углеводного компонента с помощью иммобилизованных препаратов хондроитиназы АС и гепариназы III. Идентифицировано два антигена кора протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс. Один из белков очищен сочетанием преципитации сульфатом аммония, гел-фильтрации и аффинной хроматографии и охарактеризован как альфа-2 глобулин с молекулярной массой 245–260 КД.

Ключевые слова: протеогликаны, сперматогенез, иммунохимическое изучение

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS EPIDIDYMISS AND TESTICULAR PROTEOGLYCANS OF THE RATS

Nikolaev A.A., Vetchkin R.V., Loginov P.V.

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

The purpose of the study is to get antibodies to proteoglycans of epididymis and testes in rats and then to conduct the analysis of diffusion and dynamics of the proteoglycans level. It has been shown that in order to get antibodies to proteoglycans in testes and epididymis in rats you should take hens to produce the antibodies. The analysis of the results of immunochemical study of proteoglycans in epididymis and testes in rats has been presented after the enzymatic moving away the carbohydrate component was realized by means of immobilized samples of chondroitinase AC and heparinase III. Two antigens of proteoglycan base of epididymis and testes have been identified in rats. One of the proteins was purified by combination of ammonium sulfate precipitation and gel-filtration of affine chromatography; and the protein is characterized as alpha-2 globulin with the molecular weight of 245–260 KD.

Keywords: Proteoglycans, spermatogenesis, immunochemical studying

Протеогликаны (ПГ) – сложные макромолекулы, состоящие из цепей гликозаминогликанов (ГАГ), ковалентно связанных с белковым кором. Они являются обязательным компонентом всех животных клеток и участвуют в таких фундаментальных биологических процессах, как дифференцировка, морфогенез, пролиферация [2; 3]. В частности, имеются данные об активной роли протеогликанов в регуляции сперматогенеза [7, 9, 10].

Протеогликаны представляют собой очень гетерогенный класс макромолекул, которые отличаются друг от друга по молекулярному весу, составу, тонкой структуре ГАГ цепей и функциям. Особенностью этого класса биологических молекул является их строгая органная специфичность и отсутствие видовой специфичности [8]. Это, в частности, делает протеогликаны прекрасным объектом исследования в токсикологических экспериментах, когда выявленные на животных изменения могут смело экстраполироваться на человека. Актуальность этой задачи диктуется увеличением числа случаев идиопатического бесплодия у мужчин репродуктивного возраста.

Целью нашего исследования стало получение антител к протеогликанам эпидидимисов и семенников крыс и последу-

ющий иммунохимический анализ распространения и динамики уровня этого вида протеогликанов.

В экспериментальной части работы использовались беспородные белые крысы. Все животные соответствовали показателям биологической нормы. Возраст крыс составлял 6–7 месяцев (половозрелые особи). Масса тела крыс была 180–240 г.

Забор семенников и эпидидимисов у крыс проводили под эфирным наркозом (экспериментальные исследования проводились в строгом соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным). Контрольная группа состояла из 156 самцов.

Для выделения протеогликанов использовали методику В.И. Рыковой с соавт. [4]. Из гомогенизированной ткани получали ферментальный экстракт, водную фазу его подкисляли, отделяли осадок, промывали его спиртом и сушили. Контроль проводили методом электрофореза на ацетат-целлюлозных пластинах pH – 5,0. Окраска осуществлялась 0,1% альциановым голубым в 1% $\text{CH}_3\text{CO}-\text{OH}$. На следующей стадии выделенные протеогликаны подвергали ферментации для удаления углеводного компонента и раскрятия специфических белковых детерминант. С этой целью препарат протеогликанов смешивали с иммобилизованными препарата-

ми хондроитиназы AC(Sigma) и гепариназы III (Sigma) из расчета 0,01 ед. каждого фермента на 20 мкг протеогликана в пробе [1]. Ферментативное расщепление проводили в течение 5 часов при 37 °С в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Далее фракции протеогликанов центрифугировали, диализовали и лиофилизировали.

Полученный препарат ПГ использовали для иммунизации кроликов и кур. Выбор разных животных обусловлен общеизвестным фактом отсутствия видовой специфичности у протеогликанов, но особенностью семенников является их «иммунопривлекательность» [6].

Для иммунизации животных нами применены несколько схем иммунизации

1. Иммунизацию кроликов проводили путем 8 внутримышечных инъекций в возрастающих дозах препарата ПГ с интервалом в 2–3 дня. При этом антиген вводили отдельно в разные участки тела животного. Через 7–10 дней брали кровь, получали сыворотку и определяли ее активность в реакции преципитации. Ввиду разной реактивности продуцентов целесообразно проводить гипериммунизацию по циклам: 1-й цикл – 8 инъекций, 2-й цикл – 2 инъекции. Животных, давших активную сыворотку после 1-го цикла, переводят в эксплуатационную группу, остальных подвергают второму циклу гипериммунизации, что экономически оправдано.

2. 2-й способ включает двух- или трехкратную иммунизацию кроликов антигеном с адьювантом Фрейнда для достижения в крови животных необходимого уровня антител к ПГ с титром по реакции преципитации не менее 1:2.

3. При иммунизации кур иммуноген вводили подкожно трехкратно с двухнедельными интервалами. Однократная доза иммунизации составляла 1000 мкг (по белку) на животное. Через десять дней после последней иммунизации проводили определение титров антител к ПГ.

4. При иммунизации кур животным вводили внутримышечно трехкратно с интервалом через две недели по 450 мкг (по белку) препарата протеогликана.

Анализ полученных сывороток показал, что для получения антител к протеогликанам семенников и эпидидимисов крыс оптимально подходят в качестве продуцентов антител куры. При меньших затратах антигена и в сравнимые сроки удалось получить преципитирующие сыворотки со значительно большим титром антител. Далее в работе применялась лишь сливная куриная антисыворотка к протеогликанам семенников и эпидидимисов крыс.

Имуноэлектрофоретический анализ (рис. 1) показал, что в водносолевых экстрактах семенников и эпидидимисов крыс с антисывороткой к сыворотке крови крыс

выявляется широкий спектр антигенов, но антисыворотка, полученная к препарату протеогликанов на уровне чувствительности иммуноэлектрофореза не обнаруживает антигенной активности. В препарате протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс эта антисыворотка выявляет два антигена с электрофоретической подвижностью альфа-1 и альфа-2 глобулинов. Полуколичественный анализ обнаруженных антигенов (титрование с антисывороткой) показал, что содержание протеогликана альфа-2 (ПГА-2) более чем в 128 раз превышает содержание протеогликана альфа-1 (ПГА-1). Предварительный расчет показывает, что концентрация ПГА-2 с учетом общепринятой чувствительности иммунодиффузионных тест систем 5 мкг/мл и концентрации белка в препарате протеогликанов после ферментации – 7,5 мг/мл составляет 1,3 мг/мл или 17% от общего белка препарата.

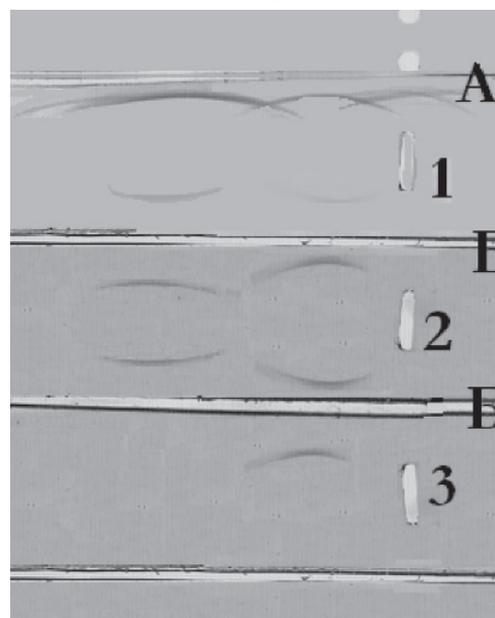


Рис. 1. Иммуноэлектрофорез протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс: 1 – водносолевой экстракт семенников и эпидидимисов крыс; 2 – фракция протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс; 3 – очищенный препарат ПГА-2

Достаточно высокая концентрация антигена ПГА-2 позволила нам провести очистку этого белка на основе сочетания различных методов хроматографии.

Очистку ПГА-2 мы проводили по разработанному нами способу. Лиофилизированный после ферментации препарат протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс растворяли в ТРИС-НСI буфере (рН = 7,8). Полученный раствор смешивали с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 45–50 мин.

при 10000 об./мин. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме буфера и наносили на колонку сефадекс G-200. (Колонка 1,2×95 см, фракции по 1,5 мл).

Иммунохимический анализ хроматографических фракций показал что ПГА-2 выходит в свободном объеме колонки и расчет молекулярной массы белков содержащихся в 1 пике показал молекулярную массу 245–260 KD.

Следующая стадия очистки ПГА-2 основана на обнаруженной нами способности гепарина преципитировать ПГА-2. Заключительная стадия очистки ПГА-2 представляет собой аффинную хроматографию ПГА-2 на

иммобилизованном гепарине. ПГА-2 обогащенные фракции объединяли и диализовали на «Amicon» PM 10. Через колонку (1×18 см) гепарин-сефарозы, уравновешенную трис-НС1 буфером, пропускали весь объем, полученных на предшествующей стадии фракций, содержащих ПГА-2. После нанесения препарата, колонку отмывали буфером (рН 7,5), содержащим 300 мМ NaCl. Элюцию аффинно-связанной фракции осуществляли с помощью ступенчатого градиента (ступень по 0,3 моль/л) хлористого натрия до концентрации 1,8 моль/л. Фракция, содержащая ПГА-2, отбиралась и концентрировалась.



Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле:

1 – очищенный препарат ПГА-2; 2 – фракция протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс; 3 – водно-солевой экстракт протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс

Иммунохимическая «чистота» препарата подтверждалась с помощью метода иммуноэлектрофореза (см. рис. 1), а также электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Препарат формировал одну линию преципитации в альфа-2-зоне глобулинов. При электрофорезе в ПААГе после окраски выявилась единственная полоса в альфа-2-зоне глобулинов.

Таким образом, иммунохимическими методами во фракции протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс после ферментативного удаления большей части углеводной части обнаружено два антигенных компонента, представляющих собой, так называемые, коровые белки протеогликанов. Один из них удалось очистить и частично охарактеризовать. Это белок с молекулярной массой 245–260 KD и электрофоретической подвижностью альфа-2-глобулинов.

Учитывая данные об активной роли протеогликанов в регуляции сперматогенеза [9, 10] и многостадийный в том числе и пострибосомальный процесс [5] сборки этих сложных биомолекул, можно предположить, что протеогликаны могут являться одним из наиболее уязвимых звеньев сперматогенеза и быть подвержены как эндогенным, так и экзогенным неблагоприятным факторам, вызывающим в конечном итоге, субфертильность и инфертильность. На этом основании нам представляется весьма перспективным разработку высокочувствительных и специфических иммунохимических тестов для мониторинга уровня протеогликанов, например, в семенной плазме.

Список литературы

1. Протеогликаны внеклеточного матрикса млекопитающих. Характеристика и влияние на адгезию / И.И. Ермакова, М.А. Черткова, А.Л. Мокрушин, А.В. Романок Г.А., Сакута, В.И. Морозов // Цитология. – 2008. – Т. 50, №8. – С. 692–699.
2. Зимица Н.П. Протеогликаны животных тканей // Успехи современной биологии. – 2002. – 122, № 4. – С. 571–590.
3. Роничевская Г.М., Рыкова В.М. Роль протеогликанов в регуляции пролиферации клеток // Докл. АН СССР – 2007. – 256, № 2. – С. 481–492.
4. Рыкова В.И., Роничевская Г.М., Салганик Р.И. Выделение протеогликанов из печени крыс // Известия СО АН СССР – 1992. – № 2. – С. 144–155.
5. Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell behaviour / P.M. Allien, J.P. Perin, P. Jolles, F.J. Bonnet // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 214, №3. – P. 347–350.
6. Daniel C., Nolting J., von Boehmer H. Mechanisms of self-nonsel self discrimination and possible clinical relevance // Immunotherapy. – 2009. – Vol. 1, №4. – P. 631–644.
7. Fatma Ch. Nozha F.D., Ammar K.L. Sperm quality improvement after date seed oil *in vitro* supplementation in spontaneous and induced oxidative stress // Asian Journal of Andrology. – 2009. – №11. – P. 393–398.
8. Alteration hepatic proteoglycans by environmental influence / C. Mathews, A.P. Reddy, J.D. Hendricks, G.S. Bailey // J. Environ Pathol Toxicol Oncol. – 1999. – Vol. 18, №4. – P. 261–269.
9. Rodriguez-Martinez H., Larsson B., Pertoff H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. [Review]. Reprod Fertil Dev. – 2007. – №19(3). – P. 297–308.
10. Sakamoto H., Ogawa Y., Yoshida H.I. Relationship between testicular glycosaminoglycan and testicular function: comparison in patients with infertility // Asian Journal of Andrology. – 2006. – Vol. 7. – P. 319–324;

Рецензенты:

Никулина Д.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии с курсом лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань;
Молдавская А.А., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 09.09.2011.