

*На правах рукописи*

**ВЕТОШКИН РОМАН ВАЛЕРЬЕВИЧ**

**ПРОТЕОГЛИКАНЫ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ  
РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМЦОВ КРЫС ПРИ  
ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРИРОДНЫХ ТОКСИКАНТОВ**

03.01.04 - биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Астрахань - 2016

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Николаев Александр Аркадьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Евдокимов Валерий Васильевич** д.м.н., главный научный сотрудник отдела андрологии и репродукции НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина - филиал ФГБУ "НМИРЦ" Минздрава России

**Бородулин Владимир Борисович** д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

**Ведущая организация:**

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).

Защита состоится «30» сентября 2016г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д **208.084.05** при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34); на сайте [www.rzgmu.ru](http://www.rzgmu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Жаднов В.А.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

В настоящее время в мире отмечается отчетливая тенденция снижения количественных и качественных характеристик спермы человека (Николаев А.А. и др., 2003; Murray K.S., 2012).

Рост дисфункций репродуктивной системы мужчин, приводящих к субфертильности, основан на множестве причин эндогенного и экзогенного происхождения, среди которых высока роль загрязнений окружающей среды агрессивными поллютантами (Тиктинский О.Л., 2000; Евдокимов В.В. и др., 2002; Adamopoulos D.A. et al., 1997; McLaughlin E.A., 2000; MacLeod J., 2003).

Интенсивное проведение исследований воздействия агрессивных экологических факторов на биологические объекты диктуется экологической ситуацией в Нижнем Поволжье. СВСГ АГКМ занимает одну из центральных позиций в комплексе агрессивных экологических факторов, характерных для этого региона.

Спермоплазма человека имеет молекулярный состав по сложности не уступающий сыворотке крови (Петрунин Д.Д. и др., 1996; Loko F., 2001). Одной из особенностей является высокая концентрация протеогликанов – высокомолекулярных углеводно-белковых соединений. Они относятся к числу наиболее полно изученных биохимических компонентов тканей человека за исключением репродуктивной системы (Николаев А.А., 2000; Гайнуллина Л.Х. и др., 2003).

### **Степень разработанности темы исследования**

Мало изучено влияние токсиканта на морфо-функциональное состояние репродуктивной системы, на процесс сперматогенеза, на формирование оплодотворяющей способности эякулята экспериментальных животных (Курило Л.Ф., Зубинская В.П., Лильп И. Г., 1999; Creasy D.M., 2007; Droguetr M.J., 2011).

Подобная недооценка действия экологических факторов обусловлена отсутствием доступной модели, позволяющей объективно и адекватно с

хорошей воспроизводимостью осуществлять контроль над процессом сперматогенеза и изменением функции органов генеративной системы самцов экспериментальных животных (Николаев А.А., Луцкий Д.Л., 2000; Brown C.D., 2002; Guven M.C. et al., 2007). Сходные протеогликаны содержатся в тканях, гомологичных по своему происхождению и подчиняются закону "биохимической гомологии". Они, как правило, тканеспецифичны, но не видоспецифичны (Mathews M., 1977). Это делает ПГ прекрасным объектом исследования в токсикологических экспериментах, когда выявленные на животных изменения могут экстраполироваться на человека.

**Цель исследования:** изучить влияние сероводородсодержащего газа Астраханского месторождения на протеогликаны и гликозаминогликаны органов репродуктивной системы самцов крыс и оценить влияние изменения этих молекул на процессы сперматогенеза.

**Основные задачи исследования:**

1. Оценить последствия влияние серосодержащего газа Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ) на фертильность экспериментальных животных (крыс);
2. Изучить изменение электрофоретического и хроматографического профиля протеогликанов и гликозаминогликанов органов репродуктивной системы самцов крыс под влиянием СВСГ АГКМ;
3. Изучить изменение моносахаридного состава гликозаминогликанов органов репродуктивной системы самцов крыс под влиянием СВСГ АГКМ;
4. Выделить, очистить и охарактеризовать один из основных коровых белков ПГ семенников и придатков крыс;
5. Исследовать возможность разработки иммуноферментной тест-системы для контроля уровня ПГ семенников и придатков крыс под влиянием СВСГ АГКМ;
6. Определить пути коррекции токсического влияния СВСГ АГКМ на репродуктивную систему самцов крыс.

### **Научная новизна исследования**

Впервые исследовано состояние репродуктивной функции, качественный и количественный состав протеогликанов и гликозаминогликанов репродуктивных органов самцов крыс во время и после хронического воздействия СВСГ АГКМ.

Впервые проведен анализ углеводного компонента ПГ и ГАГ репродуктивных органов самцов крыс и показано, что под влиянием хронического воздействия СВСГ уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата в ткани семенников и придатков крыс.

Впервые получены иммунохимические тест системы на органоспецифические ПГ репродуктивной системы крыс.

### **Научно-практическая значимость работы**

Изучен спектр протеогликанов семенников и придатков крыс в норме и при хроническом воздействии СВСГ АГКМ и показано обеднение спектра ПГ и увеличение содержания сульфатов в них.

Анализ углеводного компонента ПГ показал, что под влиянием хронического воздействия СВСГ уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата в ткани семенников и придатков крыс.

Разработан способ выделения корового белка (62KD) с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов, основанный на преципитации сульфатом аммония, гельфильтрации и аффинной хроматографии на иммобилизованном гепарине.

Новые сведения, полученные в ходе проведенного исследования, расширяют знания о функциональной активности ПГ семенников и придатков крыс.

Полученные данные могут быть использованы в клинической практике, а также при преподавании биохимии, физиологии, акушерства и гинекологии, дерматовенерологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. У крыс, получавших хроническое воздействие малых доз СВСГ АГКМ, отмечено ухудшение генеративных показателей вплоть до инфертильности.
2. Хроническая интоксикация СВСГ вызывает изменение синтеза ПГ эпидидимисов и семенников крыс, проявляющемся в дисбалансе электрофоретического профиля ПГ и увеличении относительного содержания кислых сульфатированных фракций.
3. Анализ спектра ГАГ семенников и придатков крыс, получавших хроническое воздействие малых доз СВСГ АГКМ показал значительное увеличение доли низкомолекулярных фракций. Суммарная доля фракций с молекулярной массой около 14 КДа в контрольной группе составляет в среднем 17,5%, а в группе животных после 96 дней воздействия газа она равна в среднем 25,4%, что достоверно ( $P \leq 0,005$ ) выше.
4. Разработанный способ выделения и очистки гепаринсвязывающего белка семенников и придатков крыс, который представляет собой коровий белок хондроитинсульфатпротеогликана (62KD) с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов, основан на преципитации сульфатом аммония, гельфильтрации и аффинной хроматографии на иммобилизованном гепарине.
5. Разработанная иммуоферментная тест-система на ПГА-2 позволила выявить достоверное снижение уровня этого протеогликана под влиянием интоксикации серосодержащим газом.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов проведенного исследования определяется объемом выполненных исследований, наличием групп сравнения, использованием современных методов исследования и статистической обработки полученных данных

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, ее основные положения были представлены и обсуждены на: XXIV Международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине»

(Париж, Франция, октябрь, 2011); 10-й Международной конференции 10-MEN'S HEALTH and LONGEVITY (Москва, февраль, 2012); XVI Международной конференции FAMILY HEALTH IN XXI CENTURY (Будапешт, Венгрия, апрель, 2012); Российском конгрессе с Международным участием «Молекулярные основы клинической медицины» (Санкт-Петербург, июнь, 2012).

Работа прошла апробацию на межкафедральной конференции с участием кафедр химии, фармацевтической химии, биологической химии, нормальной физиологии, патологической физиологии, микробиологии ГБОУ ВПО Астраханский ГМУ Минздрава России; кафедры молекулярной биологии, генетики и биохимии ГБОУ ВПО Астраханский государственный университет.

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 6 статей - в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в получении исходных данных, апробации результатов исследования, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по выполненной работе, оформлении текста кандидатской диссертации

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка литературы.

Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста, включая 21 таблицу и 18 рисунков. Список литературы состоит из 224 источников, из них 21 отечественных и 203 зарубежных авторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предпринятое исследование представляет собой экспериментально-лабораторное изучение ПГ и ГАГ семенников и придатков крыс. Объектом нашего исследования была суспензия эпидидимисов и семенников интактных беспородных белых крыс и крыс, подвергавшихся воздействию СВСГ АГКМ.

В экспериментах использовано 284 беспородных белых крыс - самцов в возрасте 18 недель. Все животные соответствовали показателям биологической нормы.

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

Хроническому воздействию природного газа животные из опытных групп подвергались в течение 120 дней по 4 часа ежедневно в затравочной камере объемом 1 м<sup>3</sup> (в соответствии с рекомендациями по проведению токсикологических экспериментов (Исаев Л.К., 1997).

Использованы следующие методы исследования: цитоморфологические методы, иммунодиффузионный анализ (ИДА), иммуноэлектрофорез (ИЭФ), ИФА, аффинная хроматография, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, газожидкостная хроматография (ГЖХ). Определение аминсахаров проводили по К. Kaiser (2000). Нейтральные сахара (моносахариды в составе белково-полисахаридных комплексов) во фракциях определялись антроновым методом по Тревелиан и Харрисон (Charlin V.F., Kennedy J.F., 2003). Микроскопические исследования проводили на световом микроскопе «Axioskop» фирмы «Karl Zeiss Jena GmbH». Статистическую обработку полученных количественных данных осуществляли с помощью пакета статистического анализа Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic» с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление

критерия  $t$  Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , достоверные различия обсуждались при  $t \leq 0,001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды в Астраханской области в первую очередь связаны с воздействием природного газа

На первом этапе исследования мы дали морфофункциональные характеристики семенников и эпидидимисов крыс и фертильность крыс в норме и после влияния малых доз СВСГ АГКМ.

Экспериментальные животные, были разделены на две группы: контрольную (К) и опытную (О).

В группу-К вошло 87 животных (42 самки и 45 самцов).

В группу-О вошло 110 животных (46 самок и 64 самцов).

Группа-О в течение 56 дней по 4 часа ежедневно подвергалась воздействию СВСГ АГКМ в затравочной камере. После окончания затравки проводили спаривание животных в течение 22 дней:

22 самок-К с 12 самцами-К (1 группа),

24 самки-О с 12 самцами-К (2 группа),

22 самки-К с 12 самцами-О (3 группа),

25 самки-О с 12 самцами-О (4 группа).

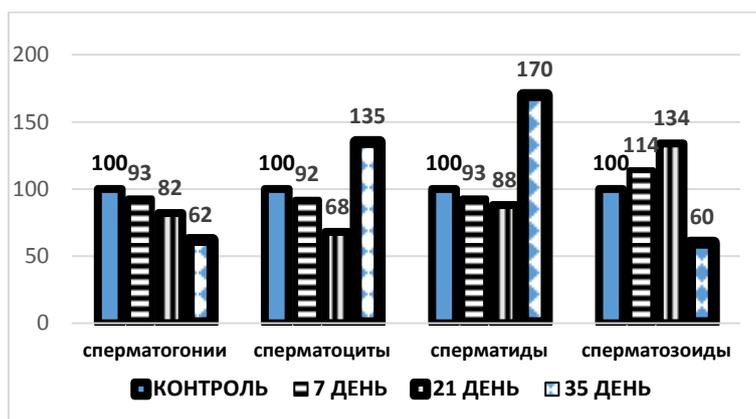
Хроническое отравление приводит к выраженному нарушению функции воспроизводства потомства. Так, в группе-2 доля мертворожденных увеличилась более чем в 5 раз (до  $14,9 \pm 1,1$  %) по сравнению с группой-1, в которой этот показатель составил  $2,7 \pm 0,3$ %. Доля выживших в течение 10 дней после родов снизилась по сравнению с группой-1 и составила в среднем  $66,8 \pm 4,77$  %. Полученные результаты свидетельствуют, что значительно более сильно пострадала репродуктивная функция самцов (группа-3) по сравнению с репродуктивной функцией самок (группа-2).

Анализ состояния сперматогенеза у крыс из контрольной группы показал, что общее количество сперматогенных клеток в семеннике составляет в среднем  $5223 \pm 460$  млн. Для разных типов сперматогенных клеток было характерно определенное достаточно устойчивое процентное соотношение: сперматогонии составляют в среднем  $22,5 \pm 2,0$  %, сперматоциты –  $20,7 \pm 2,1$  %, сперматиды –  $21,6 \pm 2,3$  %, сперматозоиды –  $35,2 \pm 2,7$  %. На фоне постоянного снижения числа сперматогенных клеток от  $5406 \pm 488$  на 7 день затравки до  $700 \pm 220$  млн. клеток на 56 день соотношение сперматогенных клеток постоянно меняется (рис.1). Цитотоксическое действие серосодержащего газа может быть причиной уменьшения числа сперматогенных клеток в семеннике, но не может объяснить изменения профиля сперматогенных клеток. Различная чувствительность звеньев сперматогенеза к воздействию поллютанта более правдоподобно объясняет этот процесс. Самым лабильным оказалось образование сперматогоний-А, угнетаемое в начальные сроки хронического воздействия природного газа. Далее происходит ингибирование дифференцировки сперматид в сперматозоиды. Самым устойчивым является этап перехода сперматоцитов в сперматиды, поражаемый лишь в конце срока хронической интоксикации. Эти значительные изменения носят обратимый характер, через 3 недели отмечается восстановление и даже реактивное увеличение общей численности сперматогенных клеток до  $5600 \pm 510$  млн. клеток при практически полном восстановлении соотношения сперматогенных клеток.

Изучение строения и состава ПГ эпидидимисов и семенников крыс, находящихся в условиях хронического воздействия серосодержащего газа, возможно, позволит объяснить постоянное увеличение числа случаев идиопатического бесплодия в Астраханском регионе.

На первом этапе анализа сравнивали содержание общего белка в полученных образцах ПГ. Показано, что среднее содержание белка в образцах ПГ эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы

составляет  $19,5 \pm 0,76$  мкг/мг ткани. В процессе воздействия природного газа снижение белка в образцах ПГ, выделенных из эпидидимисов и семенников крыс идет наиболее высокими темпами на втором месяце затравки, что согласуется со сроками синтеза ПГ в тканях крыс (Strugnell R., 1986; Sakamoto H., 2006).



**Рис.1.** Изменение соотношения сперматогенных клеток в ходе действия газа АГКМ. Доля сперматогенных клеток в контрольной группе принята за 100%

Далее методом электрофореза на ацетат-целлюлозных пластинах в норме удалось обнаружить 9 фракций ПГ эпидидимисов и семенников крыс (рис.2). В условиях хронической интоксикации отмечается резкое изменение спектра ПГ. На ранних сроках (21-30-день) появляется нехарактерная для нормы фракция 1, обладающая максимальным положительным зарядом. Позднее (110-114 день) массив фракций ПГ от 3 до 8 фракции сливается в практически единое пятно с едва заметным разделением на 3 крупные зоны. Такое резкое изменение электрофоретической картины, вероятно, объясняется увеличением гетерогенности основных фракций ПГ.

Наиболее характерным изменением электрофоретического спектра ПГ эпидидимисов и семенников крыс, опытной группы является увеличение общего количества ПГ, снижение разнообразия фракций и появление фракции 1 с наибольшим положительным зарядом. В норме ближайшая к аноду фракция имеет  $R_f$  равный  $0,94 \pm 0,01$ , а наиболее отрицательно

заряженная фракция ПГ эпидидимисов и семенников крыс на 114 день затравки  $0,92 \pm 0,01$ . Результаты денситометрии свидетельствуют, что в норме распределение массы ПГ по фракциям достаточно однородно и, например, масса ПГ с электрофоретической подвижностью выше 0,5 (фракции 5-9) составляет 58,0% от общей массы фракций. Фракционное распределение ПГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергшихся воздействию природного газа АГКМ показывает, что основная масса (72,75%) ПГ сосредоточены во фракциях с электрофоретической подвижностью выше 0,5.

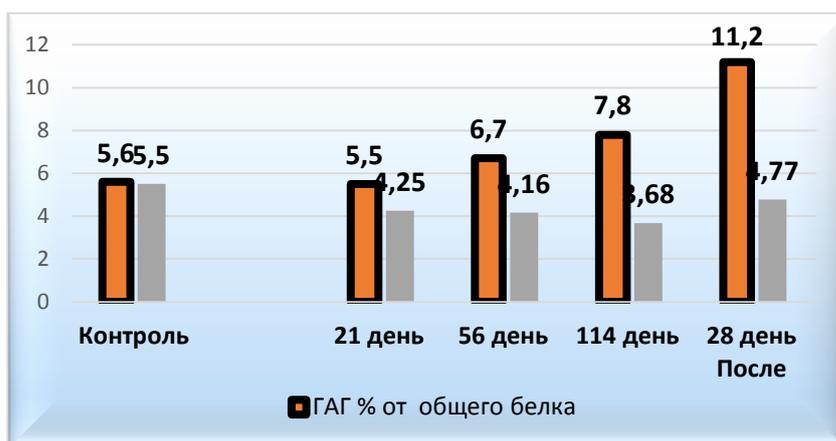


**Рис 2.** Электрофореграмма протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 - номера фракций. А - контроль, В - 28 день затравки, С - 56 день затравки, D - 114 день затравки, Е - 28 день после окончания затравки

Доказательством увеличения доли кислых фракций служит определение во фракции ПГ, сульфатов, турбидиметрическим методом (Бусев И.И., 1999). Содержание сульфатов в контроле составляет  $3,6 \pm 0,3$  мкг/мл. Содержание сульфатов в ПГ эпидидимисов и семенников крыс опытной группы начинает существенно расти только после второго месяца токсического воздействия и если на 14 день составляет  $4,8 \pm 0,2$  мкг/мл, что практически не отличается от нормы ( $P \geq 0,1$ ), то к концу эксперимента увеличивается до  $19,1 \pm 0,85$  мкг/мл. что в 5 раз выше нормы. Анализ ГАГ как углеводных компонентов ПГ представляет наибольший интерес

К настоящему времени доказано (Sakamoto H., 2006; Fatma B.A. et al., 2009), что сперматогенный эпителий и клетки Сертоли активно синтезируют ГАГ, выделяемые затем в эякулят. В образцах тканей семенников и

эпидидимисов крыс происходит незначительное снижение количества ГАГ в расчете на единицу массы ткани. Однако пересчет количества ГАГ на массу ткани в данном случае может оказаться не точным из-за разного содержания жидкости, жира и пр. в контрольных и опытных образцах. Поэтому мы также нормировали количество ГАГ на другой параметр: на содержание белка в пробе (рис.3).

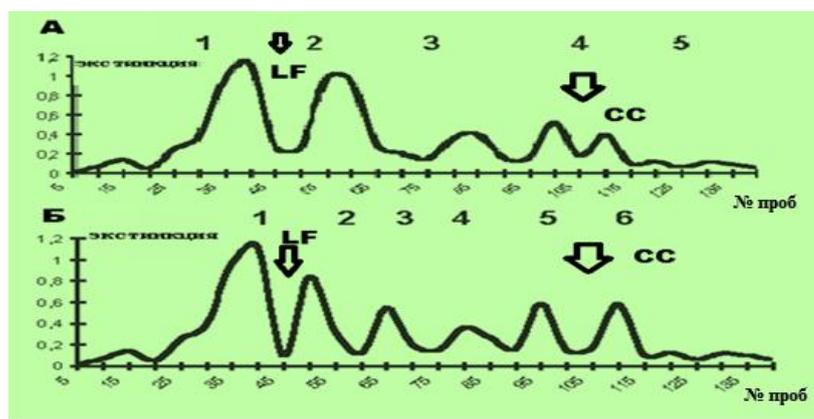


**Рис.3.** Содержание ГАГ ткани семенников и эпидидимисов крыс

Нарушение синтеза ГАГ под действием хронической интоксикации серосодержащим газом может проявляться не только снижением концентрации, но и изменением структуры полисахаридных цепей ГАГ. Изменением их молекулярной массы, заряда и других характеристик. Исследование этих изменений мы проводили при помощи хроматографических исследований. На первом этапе мы сравнивали спектр цепей ГАГ по молекулярной массе. Это исследование проводили методом гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации). Для количественного определения гликозаминогликанов применяли спектрофотометрический метод Дише. Планиметрический анализ хроматограмм показал, что большинство (около 65%) ГАГ независимо от влияния серосодержащего газа имеют молекулярную массу ниже 80 KD (рис.4). Однако под токсическим действием серосодержащего газа значительно увеличивается доля низкомолекулярных фракций. Суммарная доля фракций 4 и 5 в контрольной группе составляет в среднем 17,5%, а в группе животных после 96 дней

воздействия газа она равна в среднем 25,4%, что достоверно ( $P \leq 0,005$ ) выше.

Изменение хроматографического профиля отражает либо

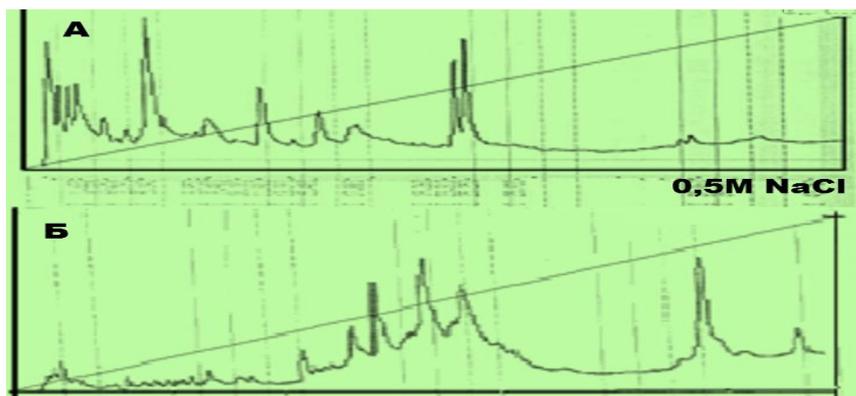


**Рис 4.** Гель-проникающая хроматография ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа Колонка 75,0x1,5см Тойоперл HW-50S А-контрольная группа, Б - 96 день затравки. LF и CC- обозначают пиковые концентрации лактоферрина и цитохрома-С (индикаторы мол. массы) соответственно

процесс дефрагментации гликозаминогликанов, либо нарушение их синтеза. Важнейший показатель этого процесса - накопление кислых сульфатированных гликозаминогликанов мы контролировали с помощью ВЭЖХ. Как видно из рис. 5 при сравнении ГАГ, выделенных из эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы и ГАГ, выделенных из эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа, наблюдается резкое увеличение фрагментов с высоким отрицательным зарядом.

В контрольной группе насчитывается до 17 фракций. В нормальной ткани эпидидимисов и семенников (рис 4А) отсутствует группа фракций, выходящих с колонки в зоне от 0,2 до 0,3 М хлорида натрия, а отмечается единичная фракция при 0, 27 М. составляющая не более 15% от общего количества ГАГ. В нормальной ткани отмечаются незначительные фракции в зоне 0,4 и 0,48 М хлорида натрия. Фракционный состав ГАГ опытной группы существенно меняется (рис.5Б).

Всего насчитывается не более 13 фракций. Четыре фракции ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, составляющие более 65% их общей массы, располагаются в зоне от 0,2 до 0,3 М хлорида натрия. Видно (рис.5Б), что спектр ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа содержит фракции с преимущественно отрицательными зарядами, значительно большими, чем в норме, которые в опытной группе резко возрастают в общей доле ГАГ.



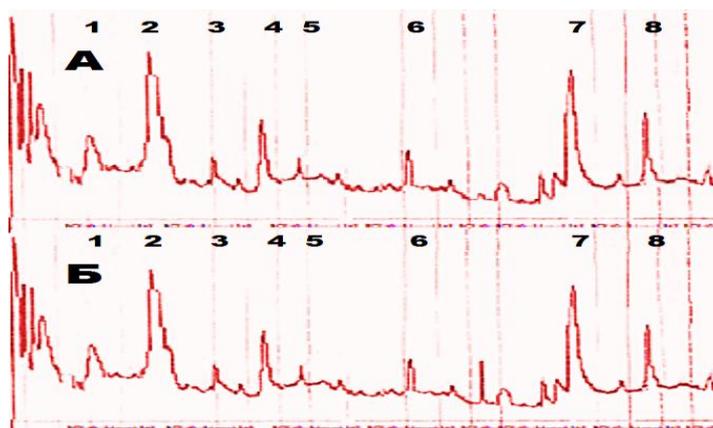
**Рис 5.** ВЭЖХ ГАГ эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы (А) и крыс, подвергавшихся воздействию СВСГ. (Б) Колонка 10x0,2 рН 7,4 градиент хлорида натрия от 0,05 до 0,5 М.

Все эти данные свидетельствуют о том, что хроническая интоксикация природным газом АГКМ способствует нарушению синтеза ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс опытной группы с увеличением доли отрицательно заряженных фракций (вероятно, растет доля сульфатированных ГАГ).

Для того чтобы определить, какие именно ГАГ в составе ПГ семенников и эпидидимисов крыс подвержены наибольшему изменению под действием хронической интоксикации природным газом АГКМ, нами была проведена идентификация моносахаридных компонентов после гидролиза ГАГ, выделенных из семенников и эпидидимисов крыс контрольных и опытных групп.

Гидролиз ГАГ проводили ферментативным методом с использованием иммобилизованного на полимерных носителях гликолитического ферментного комплекса гриба *Trichoderma viride*.

Проведен хроматографический анализ полученной смеси моносахаридов методом ГЖХ (см. «Материалы и методы»). На рис. 6А представлена хроматограмма гидролизата ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы.



**Рис.6.** Хроматограмма гидролизата ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы (А) и опытной группы(Б).. 1- галактозамин; 2 - глюкозамин; 3-манноза; 4-галактоза; 5-ксилоза; 6-глюкоза; 7-идуроновая кислота; 8-глюкуроновая кислота.

Идентификация обозначенных хроматографических пиков проводилась путем сравнения времени удержания фракций со временем удержания на хроматограмме стандартной смеси сахаров. Для сравнительного анализа хроматограмм мы применили планиметрический метод (Рабек Я., 1998).

В образцах от животных контрольной группы структура МС компонентов, свидетельствует о том, что в спектре ГАГ семенников и придатков крыс преобладает гепаринсульфат (димерные звенья которого построены из идуроновой кислоты и глюкозамина и реже гиалуроновой кислоты и глюкозамина). Именно идуронозная кислота и глюкозамин в совокупности составляют более 47% МС гидролизата. Вторым по частоте встречаемости является хондроитинсульфат, так как входящие в него глюкуронозная кислота и галактозамин составляют в сумме в гидролизате 30,9%.

Высокий уровень галактозы (почти 18%) позволяет предположить присутствие в ПГ семенников и придатков крыс кератансульфата особенностью строения которого является наличие неэстерифицированной галактозы в качестве одного из компонентов дисахаридного звена полисахарида. Разумеется, это только наиболее вероятный состав углеводного компонента ПГ, который не исключает присутствие других минорных ГАГ.

В образцах гидролизатов ГАГ семенников и придатков крыс, подвергавшихся воздействию газом АГМК, достоверно повышается доля глюкозамина до 29%, что при неизменном уровне идуруновой кислоты оставляет за гепаринсульфатом первое место среди возможных ГАГ.

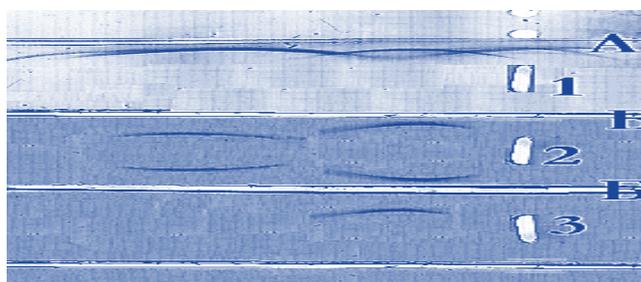
Достоверное снижение уровня глюкуроновой кислоты и галактозамина свидетельствует о снижении доли хондроитинсульфата, уровень галактозы в гидролизате практически не изменяется, а на фоне растущего уровня глюкозамина, мы предполагаем увеличение доли кератансульфата. Таким образом, под влиянием хронического воздействия серосодержащего газа происходит изменение соотношения основных ГАГ. Уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата.

Таким образом, хроническая интоксикация серосодержащим газом приводит к нарушению синтеза и созревания сперматозоидов, проявляющемся в дисбалансе формирования электрофоретического профиля ПГ и сопровождается его упрощением и увеличением доли кислых фракций. Эти данные подтверждаются и хроматографическим анализом ГАГ, по данным которого наблюдается увеличение числа и доли кислых ГАГ на фоне резкого изменения всего спектра. Все эти нарушения в созревании и синтезе ПГ и ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс, по нашему мнению, способствуют возникновению дисбаланса в процессе сперматогенеза.

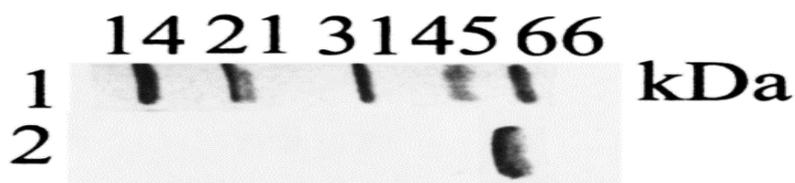
ПГ представляют собой очень гетерогенный класс макромолекул, которые отличаются друг от друга по молекулярному весу, составу, тонкой структуре ГАГ цепей и функциям. В этой части работы мы опишем получение антител

к ПГ эпидидимисов и семенников крыс и последующий иммунохимический анализ распространения и динамики уровня этого вида ПГ.

Выделенные ПГ подвергали ферментации для удаления углеводного компонента и раскрытия специфических белковых детерминант. Полученный препарат ПГ использовали для иммунизации животных. ИЭФ (рис.7) показал, что в водно-солевых экстрактах семенников и эпидидимисов крыс с антисывороткой к сыворотке крови крыс выявляется широкий спектр антигенов, но антисыворотка, полученная к препарату ПГ на уровне чувствительности ИЭФ не обнаруживает антигенной активности. В препарате ПГ семенников и эпидидимисов крыс эта антисыворотка выявляет два антигена с электрофоретической подвижностью альфа-1 и альфа-2 глобулинов. Высокая концентрация антигена ПГА-2 в протеогликановой фракции позволила нам провести очистку этого белка на основе сочетания различных методов хроматографии. Заключительный этап очистки ПГА-2 заключается в аффинной хроматографии ПГА-2 на гепарин-сефарозе.



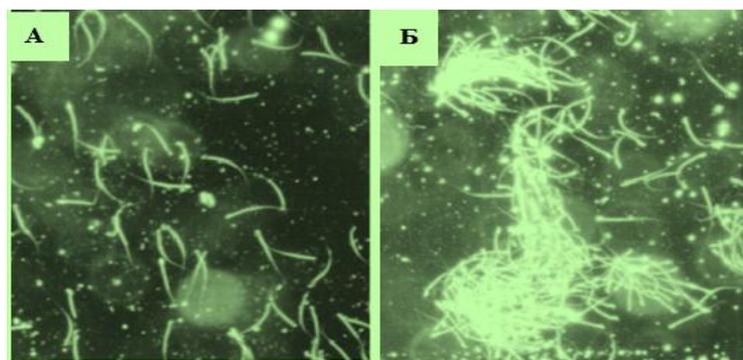
**Рис. 7.** Иммуноэлектрофорез ПГ семенников и эпидидимисов крыс: 1 – водно-солевой экстракт семенников и эпидидимисов крыс; 2 – фракция ПГ семенников и эпидидимисов крыс; 3 – очищенный препарат ПГА-2



**Рис. 8.** Электрофорез в 15% ПААГ 1 – смесь маркеров мол. массы; 2 – очищенный препарат ПГА-2

Контроль чистоты препарата ПАГ-2 при электрофорезе в 15% ПААГ, содержащем додецил сульфат натрия (рис.8) показал результаты молекулярной массы ПАГ-2 отличные от данных хроматографии на сефадексе G-200. Если мол.масса ПАГ-2 по данным хроматографии составила 245-260 КД, то по данным электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия 62 КД. Такое расхождение мы объясняем вероятностью существования тетрамеров ПАГ-2, диссоциирующих в присутствии додецил сульфата. В качестве N-концевой аминокислоты в препарате ПАГ-2 методом двумерной тонкослойной хроматографии дансил производных аминокислот идентифицирован лейцин. Определен также аминокислотный состав этого белка. Особенностью его является высокая доля гидрофобных аминокислот (51,8%) и более четверти (25,4%) аминокислот, несущих положительный заряд. Видимо, гидрофобные аминокислоты формируют центральную часть белка - гидрофобное ядро, а ионизированные радикалы располагаются на поверхности. Обеспечивая, в частности, связь с сульфатированными ГАГ.

Таким образом, нами выделен и охарактеризован новый специфический белок репродуктивной системы самцов крыс. ПАГ-2 скорее всего относится к семейству спермадгезинов, т.к. способен связываться с гепарином и вызывает агглютинацию сперматозоидов (рис.9). Сопоставление с другими известными белками этого семейства показывает, что ПАГ-2 отличается от спермадгезинов хряка, быка и других животных по молекулярной массе и N-концевой аминокислоте. Проведенное иммунохимическое исследование показало не только органную специфичность, но и видоспецифичность.



**Рис 9.** Агглютинация сперматозоидов самцов крыс

А-отмытые эпидидимальные сперматозоиды в 1% растворе белка (БСА). Отсутствие агглютинации. Б - отмытые эпидидимальные сперматозоиды в 1% растворе белка (БСА), содержащем 10,0 мкг\мл ПГА-2. Массивная агглютинация. (увел. 100х).

С помощью очищенного препарата ПГА-2 нами были получены гипериммунные сыворотки к этому белку, которые позволили разработать метод ИФА для определения этого корового белка.

Первые три недели уровень ПГА-2 не изменяется. До 21 дня наблюдений нет достоверных различий в концентрации этого центрального протеина протеогликана эпидидимисов и яичка крыс. С 21 дня уровень ПГА-2 начинает снижаться. Несмотря на всплеск концентрации на 28 день, общая тенденция, рассчитанная по методу наименьших квадратов от 14 дня до окончания затравки, направлена на снижение. Интересно отметить, что через 28 дней после окончания затравки уровень ПГА-2 оставался на достоверно низком уровне и экстраполяция данных показывает, что восстановление уровня ПГА-2 возможно только после 70 дня с момента окончания затравки.

## **ВЫВОДЫ**

1. Хроническое воздействие природного газа приводит к снижению числа плодов у крыс, что вызвано снижением оплодотворяющей способности эякулята.
2. Хроническая интоксикация серосодержащим газом приводит к снижению синтеза протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс, проявляющемся

в уменьшении числа электрофоретических и хроматографических фракций протеогликанов и относительном увеличении доли кислых фракций, содержащих повышенное количество сульфатов.

3. Анализ углеводного компонента показал, что под влиянием хронического воздействия серосодержащего газа уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата в ткани семенников и придатков крыс.

4. Очищен и исследован новый коровый белок протеогликана семенников и придатков крыс с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов, молекулярной массой 62 КД, лейцин в качестве N-концевой аминокислоты.

5. Разработана иммуноферментная тест-система на ПГА-2, позволившая выявить достоверное снижение уровня, содержащего этот белок протеогликана под влиянием интоксикации серосодержащим газом.

6. Разработан способ коррекции повреждающего действия серосодержащего газа на репродуктивную систему самцов крыс, основанный на сочетанном применении органического препарата селена и аскорбиновой кислоты.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Перспективой дальнейшей разработки темы представляется дальнейшее экспериментальное и клиническое исследование уникального протеогликана ПГА-2, как диагностического препарата, для прогноза субфертильности.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Сочетание способов обратимой преципитации и колоночной хроматографии на различных носителях дает возможность при минимальных экономических затратах получать коровый белок протеогликана с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов (ПГА-2), с высоким выходом и степенью чистоты.

2. Способ получения и очистки ПГА-2 может найти применение не только в производстве специфической тест-системы на этот белок, но и в качестве биологически активного препарата с высокой коммерческой перспективой.

3. Уменьшение доли хондроитинсульфата и увеличение доли кератансульфата в составе ГАГ репродуктивной системы крыс может быть использовано для экологической оценки районов с вероятным загрязнением токсическими поллютантами.
4. Исследование хроматографического спектра протеогликанов семенной плазмы может быть использовано как критерий прогноза субфертильности.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Николаев, А.А. Иммунохимический анализ протеогликанов семенников крыс [Текст] / А.А. Николаев, **Р.В. Ветошкин**, П.А. Логинов // **Фундаментальные исследования**. – 2011. – №11. – С.178-180.
2. **Ветошкин, Р.В.** Влияние сероводородсодержащего газа Астраханского газового месторождения на биохимические показатели функционального состояния семенников белых крыс [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев, П.В. Логинов // **Астраханский медицинский журнал**. – 2011. – №2. – С.76-82.
3. **Ветошкин, Р.В.** Уровень сульфатов в протеогликанах семенников крыс в условиях экспериментальной хронической интоксикации серосодержащим газом [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев // **Астраханский медицинский журнал**. – 2011. – №2. – С.227-228.
4. **Ветошкин, Р.В.** Белок кора протеогликанов семенников крыс [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев, П.В. Логинов // **Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований**. – 2011. – №11. – С. 81-82.
5. Николаев, А.А. Иммунохимическая характеристика протеогликанов семенников [Текст] / А.А. Николаев, **Р.В. Ветошкин** // **10-MEN'S HEALTH and LONGEVITY**. – 2012. – С.174.
6. Николаев, А.А. Изменения гликозаминогликанов семенников крыс при

- экспериментальной хронической интоксикации серосодержащим газом [Текст] / А.А. Николаев, **Р.В. Ветошкин**, П.В. Логинов // **Проблемы репродукции.** – 2012. – №2. – С.15-17.
7. **Ветошкин, Р.В.** Новый белок кора протеогликанов семенной плазмы [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев // **Материалы XVI Международной научной конференции «ЗДОРОВЬЕ СЕМЬИ – XXI ВЕК».** – Будапешт, 2012. – С.45-47.
8. **Ветошкин, Р.В.** Роль спермадгезина в развитии мужского бесплодия [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев // **Материалы II Российского конгресса с Международным участием «Молекулярные основы клинической медицины.** – СПб., 2012. – С.238-239.
9. Николаев, А.А. Участие свободных радикалов в функции сперматозоидов [Текст] / А.А. Николаев, П.В. Логинов, **Р.В. Ветошкин** // **Астраханский медицинский журнал.** – 2014. –№1. – С.23-29.
10. **Ветошкин, Р.В.** Протеогликаны мужской репродуктивной системы (обзор литературы) [Текст] / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев // **Фундаментальные исследования.** – 2015. –№ 1 (часть 4) . – С. 848-853.

## ПАТЕНТЫ

1. **Ветошкин Р.В.** Патент РФ 2480221 МПК А61К33/04, А61К31/375, А61К31/375. Способ коррекции сперматогенеза у животных в условиях хронической интоксикации природным газом / Р.В. Ветошкин, А.А. Николаев, П.В. Логинов. – заявл. 28.02. 2012; опубл. 27.04.2013.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГКМ – Астраханское газоконденсатное месторождение  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГАГ – гликозаминогликаны  
ГЖХ – газожидкостная хроматография  
ДМС – 1,9-диметилметиленовый синий

ИДА – иммунодиффузионный анализ в агаре  
ИФА – иммуноферментный анализ  
ИЭФ – иммуноэлектрофорез  
МС – моносахариды  
ПААГ – полиакриламидный гель  
ПГ – протеогликаны  
СВСГ АГКМ – сероводородсодержащий газ Астраханского  
газоконденсатного месторождения  
ТМС – триметилсилиловый эфир  
УДФ – уридиндифосфат  
УТФ – уридинтрифосфат  
DNS –Cl -диметиламинонафталинсульфонил (дансил) хлорид  
KD – килодальтоны

Подписано к печати 2016 г.

Учёт. печ. лист 1,0. .

Тираж 100 экз. Заказ № 1xx

Издательство Астраханского гос. медицинского университета  
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121