

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АСТРАХАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ВЕТОШКИН РОМАН ВАЛЕРЬЕВИЧ
«ПРОТЕОГЛИКАНЫ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ
СИСТЕМЫ САМЦОВ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
ПРИРОДНЫХ ТОКСИКАНТОВ».

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор А. А. Николаев

Астрахань – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	
1.1 Строение и функции протеогликанов.....	9
1.2.Протеогликаны и гликозаминогликаны в мужской репродуктивной системе	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
3.1. Влияние на фертильность хронической интоксикации природным газом.....	58
3.2. Спектр протеогликанов и гликозаминогликанов эпидидимисов и семенников крыс в норме и после воздействия природного газа астраханского газоконденсатного месторождения.....	64
3.3. Разработка способа коррекции репродуктивной функции с помощью селенсодержащего биокомплекса.....	81
3.4. Иммунохимический анализ протеогликанов семенников крыс.....	87
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИРОДНЫМ ГАЗОМ.....	99
ВЫВОДЫ.....	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

ВВЕДЕНИЕ

В последние 50 лет в мире наметилась тенденция снижения количественных и качественных характеристик спермы человека [12,13,24,142]. Массовые лабораторные исследования (около 15000 спермограмм), проведенные группой бразильских ученых под руководством Christofolini J (53), показали, что усредненные количественные характеристики эякулята снизилось в 1,7 раза. С 1986 года международные критерии ВОЗ по определению качества спермы снижали три раза, как по численности сперматозоидов, так и по их динамическим характеристикам [3,7,10, 142,181].

Рост нарушений репродуктивной функции мужчин, вызван множеством причин эндогенного и экзогенного происхождения среди которых высока роль загрязнений окружающей среды агрессивными поллютантами [11,12,19;22,193].

Интенсивное проведение исследований воздействия агрессивных экологических факторов на биологические объекты диктуется экологической ситуацией в Нижнем Поволжье. [12, 109,170].

Сероводородсодержащий газ Астраханского газоконденсатного месторождения имеет очень высокое содержание сероводорода – 24 % и содержит также метилмеркаптан и сероуглерод. Поэтому сероводородсодержащий газ АГМК занимает важное место среди вредных поллютантов Нижнего Поволжья.

Спермоплазма человека имеет молекулярный состав по сложности не уступающий сыворотке крови [157, 23]. Ряд биохимических особенностей состава спермоплазмы делает её уникальной биологической жидкостью как по составу, так и по свойствам [12, 202, 127]. Одной из особенностей является высокая концентрация протеогликанов – высокомолекулярных углеводно-бековых соединений. Они относятся к числу наиболее полно изученных биохимических компонентов тканей человека за исключением репродуктивной системы [16,20,21,]. Протеогликаны являются разновидностью углеводно-

белковых комплексов и отличаются самым высоким (50-85%) содержанием углеводов среди всех видов гликопротеидов.

Действие токсиканта определяется его канцерогенным эффектом, мутагенностью, эмбриотоксичностью [108]. Но мало интересуются исследованием влияния токсиканта на морфо-функциональное состояние репродуктивной системы, на процесс сперматогенеза, на формирование оплодотворяющей способности эякулята экспериментальных животных [51,57,64,65,170]. Проблема бесплодия в условиях стагнации численности населения становится не только медицинской, но приобретает и социально-демографическую значимость. В настоящее время в России наблюдается устойчивая тенденция к постепенному повышению рождаемости, но опасение вызывает рост числа супружеских пар репродуктивного возраста, страдающих бесплодием, которых насчитывается в настоящее время 15-17%, причем в структуре бесплодия до 45% приходится на долю женщин и 40% на долю мужчин [17,19].

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 [41, 42, 89,170]. Эти исследования помогут контролировать воздействие экологических факторов на функцию воспроизводства, и разрабатывать виды протекции репродуктивной системы самцов от воздействия неблагоприятных экологических факторов.

Сходные протеогликаны содержатся в тканях, гомологичных по своему происхождению и подчиняются закону "биохимической гомологии". Они, как правило, тканеспецифичны, но не видоспецифичны[132]. Каждый из ПГ выполняет свою обусловленную особенностью структуры функцию. Поэтому профили протеогликанов одних и тех же тканей имеют больше сходства у различных видов, чем протеогликаны различных органов одного вида. Это дает право считать исследования структуры ПГ уникальным критерием в

токсикологических экспериментах, позволяющим, выявленные на животных изменения, 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 влияния серусодержащего 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 природного газа АГКМ.
3. Изучить изменение моносахаридного состава гликозаминогликанов органов репродуктивной системы самцов крыс под влиянием природного газа АГКМ.
4. Выделить, очистить и охарактеризовать один из основных коровых белков протеогликанов семенников и придатков крыс.
5. Исследовать возможность разработки иммуноферментной тест-системы для контроля уровня протеогликана семенников и придатков крыс под влиянием природного газа АГКМ.
6. Определить пути коррекции токсического влияния серусодержащего газа 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 вовремя и после хронического воздействия серусодержащего газа АГКМ.

Впервые проведен анализ углеводного компонента протеогликанов и гликозаминогликанов репродуктивных органов самцов крыс и показано, что под влиянием хронического воздействия серусодержащего газа уменьшается

доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата в ткани семенников и придатков крыс.

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

Научно-практическая значимость работы.

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

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

Разработан способ выделения и очистки 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 проведённого исследования, расширяют знания о функциональной активности протеогликанов 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 природного газа АГКМ, отмечено ухудшение генеративных показателей вплоть до инфертильности.

2. Хроническая интоксикация сероводородсодержащим газом вызывает нарушение синтеза ПГ эпидидимисов и семенников крыс, отраженном 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 природного газа АГКМ значительно увеличивается доля низкомолекулярных фракций. Суммарная доля фракций с молекулярно массой около 14 KDa 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. Разработан способ выделения и очистки гепаринсвязывающего белка семенников и придатков крыс, который представляет собой коровый белок хондроитинсульфатпротеогликана (62KD) с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов, основанный на преципитации сульфатом аммония, гельфильтрации и аффинной хроматографии на иммобилизованном гепарине.

5. разработана иммуноферментная тест-система на ПГА-2, позволившая выявить достоверное снижение уровня этого протеогликана под влиянием интоксикации серусодержащим газом.

Апробация работы, публикации.

Основные положения диссертации были представлены на: XXIV международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» октябрь 2011 – Париж – Франция; на 10 международной конференции 10-MEN'S HEALTH and LONGEVITY-февраль 2012-Москва; на XVI международной конференции FAMILY HEALTH IN XXI CENTURY апрель 2012 –Будапешт-Венгрия; Российском конгрессе с международным

участием «Молекулярные основы клинической медицины июнь 2012 - Санкт-Петербург .

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

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 6 статей в центральной медицинской печати, рекомендованной Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Объём и структура диссертации.

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

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

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ПРОТЕОГЛИКАНОВ.

Значительная группа многофункциональных соединений внеклеточного матрикса, состоящих из центрального белка, чаще всего связанного ковалентно с одной или несколькими полисахаридными цепями - гликозаминогликанами(ГАГ) называется Протеогликаны (ПГ). Их углеводные цепи в максимально сульфированы и имеют максимальный отрицательный заряд. Это обстоятельство служит причиной связывания большого количества молекул воды [23,104]. В протеогликанах цепи полисахаридные ковалентно связаны с протеином, расположенному в центре молекулы.

Таблица 1. Углевод - белковая связь в молекулах различных ПГ

Протеогликан	Связь-углевод-белок	источник
протеохондроитинсульфаты	$\beta 1 \rightarrow 4$ глюкокуроновая $\beta 1 \rightarrow 3$ галакто $\beta 1 \rightarrow$ $\rightarrow 4$ ксило $\beta 1 \rightarrow 3$ серин	104,161
Протеодерматан сульфаты	$\alpha 1 \rightarrow 3$ галакто NAc $\beta 1 \rightarrow 4$ глюкокуроновая $\beta 1 \rightarrow 3$ галакто $\beta 1 \rightarrow 4$ ксило $\beta 1 \rightarrow 3$ серин	2,23,33
Протеогепарансульфаты и протеогепарин	$\beta 1 \rightarrow 4$ глюко NAc $\alpha 1 \rightarrow 4$ глюкокуроновая $\beta 1 \rightarrow (3$ галакто $\beta 1)_2 \rightarrow 4$ ксилоза $\beta 1 \rightarrow 3$ серин	2,31,104
протеокератансульфат	$\beta 1 \rightarrow 3$ галакто $\beta 1 \rightarrow 4$ глюко NAc $\beta 1 \rightarrow 2$ манно $\alpha 1 \rightarrow 3$ галакто NAc $\alpha 1 \rightarrow O(N) \rightarrow$ аспарагина (O - или N-гликозилирование	208,178

Углеводы в молекулах ПГ, в отличие от гликопротеинов, представлены мукополисахаридами (хондроитинсульфатами, дерматансульфатом, кератансульфатом, гепарансульфатом и гепарином). Последовательности

основных ГАГ соединены с остатком серина ядерного белка через тетрасахаридный спейсер: - ксилоза-галактоза-галактоза-глюкуроновая кислота-, далее следуют соответствующие перемежающиеся дисахаридные единицы. ГАГ-нити связываются с остатком серина специальных ГАГ-акцепторных сайтов на центральном протеине: "-А-сер-гли-Х-гли-", где А - кислая аминокислота, а Х – любая другая [178]. Дипептид Ser-Gly, в последовательности связывающего сайта протеина является основным условием для узнавания ферментом ксилзилтрансферазой, транспортирующим ксилозу на аминокислоту серин [160,161.]. (см. табл.1). В этом отношении сходны с гликопротеинами, протеокератан-сульфаты, т.к. их углеводные последовательности синтезируются на основе N-связанных олигосахаридов гликопротеинов (протеокератансульфат роговицы), либо O-связанных олигосахаридов муцинового типа (протеокератансульфат хряща). Линкерный район у кератансульфата ПГ иногда имеет разветвленное строение. Цепи ГАГ присоединяются к центральному протеину через аспарагин (N-гликозилирование), либо через сер/тре (O-гликозилирование) [33]. К ПГ иногда относят углевод-белковые устойчивые комплексы, связанные нековалентными связями, образующиеся без участия ферментов. Эти комплексы имеют стандартное для ПГ соотношение углевод-белок и центральное расположение белка. Такие комплексы как правило, располагаются на экзотических клеточных поверхностях (например, ооциты и сперматозоиды) [155].

Протеиновая часть молекул ПГ может иметь упрощенный аминокислотный состав. В цепях ПГ чаще встречается сочетание остатков серина и глицина. Наряду с аналогичными участками, в других белковых частях ПГ несущих углеводные цепи, имеются участки с довольно разнородным аминокислотным составом. Эти домены осуществляют координирование с другими белками или «укоренение» ПГ в клеточной мембране. Вследствие серьезных экспериментальных трудностей, публикации о первичной структуре белковой части ПГ до настоящего времени немногочисленны.[169, 151,190]

ПГ могут значительно размером белковой части молекулы отличаться, а также расположением углеводных цепей числом, природой их. В состав макромолекулы ПГ могут одновременно входить ГАГ цепи неск. типов, а также О- и N-олигосахариды, присущие гликопротеинам. Создание всеобъемлющей классификации и номенклатуры этих соединений затрудняет многообразие ПГ. Обычно указывают тип ткани, из которой получен ПГ, общий размер молекулы (условно различают "большие" и "малые" ПГ), преобладающую форму углеводных цепей т.к. возможны гибридные структуры, и способность к межмолекулярным связям с гиалуроновой кислотой ("агрегирующие" и "неагрегирующие" ПГ). В соединительной ткани животных содержатся наибольшее количество ПГ, где эти вещества, в первую очередь протехондроитинсульфаты и протедерматансульфаты, в комплексе с гиалуроновой кислотой, коллагеном и некоторыми другими протеинами обеспечивают необходимые механические свойства таких структур, как кожа, кости, сухожилия, хрящи, роговица, стекловидное тело глаза, железистые структуры[155].

ПГ классифицируют по типу доминантных цепей ГАГ, присоединенных к центральному белку. ГАГ это линейные сложные полисахариды, собранные из множества дисахаридов, каждый из которых включает D-глюкозамин - или D-галактозамин, соединенного с D-глюкуроновой или L-идуроновой - кислотами, присутствующими во всех ГАГ, кроме кератансульфата, в котором глюкоза заменена остатками галактозы. Дисахаридные звенья N - и O-сульфаированы или ацетилированы.

ГАГ-класс углеводосодержащих соединений был известен ранее под названием "мукополисахариды", которое предложил Карл Мейер в 1936 году. Он же в основном расшифровал химическую структуру и состав этих гетерополисахаридов. Термин "гликозаминогликаны" был введен в 1960 году Винлоном Р.В.

ГАГ представляют собой неразветвленные последовательности сложных полисахаридов. Они состоят из многочисленных повторов дисахаридных

звеньев. Первым мономером этого дисахарида является D-глюкуроновая кислота либо L-идуроновою кислоты, вторым мономером - производное аминсахарида - глюкозамина или галактозамина. Аминогруппа их ацетилирована, и это нивелирует, присущий им положительный заряд. За исключением гиалуроновою кислоты, все ГАГ имеют в своем составе сульфатные группы в виде O-эфиров или N-сульфата.

Известна структура шести основных классов гликозаминогликанов к настоящему времени. Степень сульфирования ГАГ значительно больше других биополимеров и превышает 3-5 сульфатных группы на 1 звено. Присутствие сульфатных и карбоксильных групп в ГАГ создает большую концентрацию отрицательного заряда, что решающим образом влияет на их биологические функции и координирует их взаимодействие с другими биомолекулами [76,79,184,188].

Все ГАГ разделяют на несколько классов по структуре дисахаридного звена и степени сульфатирования: хондроитинсульфаты (ХС), гепарансульфаты (ГС), гиалуроновою кислота (ГК), дерматансульфаты (ДС), кератансульфаты (КС), гепарин (Ге) (таб.№ 2). Часто на одном центральном белке находятся разные типы ГАГ-последовательностей. [182,183].

Хондроитинсульфат протеогликаны Полимеры, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев ацетилгалактозамин—глюкуроновою кислота названы - хондроитинсульфаты. В составе этих цепей присутствуют также идуроновою кислота в различных соотношениях. Количество дисахаридных звеньев в составе хондроитинсульфата варьирует от 35 до 120 и более единиц.

Выделяют 6 классов хондроитинсульфата (ХС), в соответствии со структурой дисахаридных единиц: ХС А, ХС В (ДС), ХС С, ХС D, ХС Е и ХС iЕ (i-идуроновою кислота). Огромное структурное разнообразие хондроитинсульфата определяется наличием в составе ГАГ-цепей дисахаридных звеньев разного состава и степени сульфатирования.

Таблица № 2. Классы гликозаминогликанов (ГАГ)

Класс ГАГ	Молекулярная масса, кД	Повторяющаяся единица	Сульфогруппа О-,N-связанная	Количество сульфогрупп на 1 дисахарид	Другие сахара, встречающиеся в связующем участке
Гиалуроновая кислота, ГК	1-8000	D-глюкуроновая кислота, D-глюкозамин	-	-	-
Хондроитин-сульфат ХС	10-50	D-глюкуроновая кислота, D-галактозамин	O-	0,1-1,3	галактоза, ксилоза
Дерматан-сульфат, ДС	10-40	D-глюкуроновая кислота /L-идуруновая кислота, D-галактозамин	O-	1-2,5	галактоза, ксилоза
Гепаран-сульфат, ГС	10-40	D- глюкуроновая кислота / L-идуруновая кислота, D- галактозамин	O-, N-	0,4-2,0	галактоза, ксилоза
Гепарин, Ге	5-25	D- глюкуроновая кислота / L-идуруновая кислота, D- галактозамин	O-, N-	1,5-3,0	D-галактоза, D- ксилоза
Кератан - сульфат I, КС I	5-25	D-галактоза, D- глюкозамин	O-	0,9-1,8	D-Манноза, L- фукоза,
Кератан - сульфат II, КС II	5-15	D-галактоза, D- глюкозамин	N-	0,9-1,8	D- галактозамин,

Наличие структурного разнообразия приводит и к чрезвычайному функциональному разнообразию хондроитинсульфатов. Они принимают участие в регуляции роста, развития, клеточной пролиферации, регулируют активность факторов роста. Наиболее изучены среди них агрекан и версикан. [37,77]. Широко распространены в разных видах соединительной ткани и

многочисленные «малые» или «минорные» протеогликаны, выполняющие многочисленные и, порой, противоположно направленные функции.

Агрекан – это основной ПГ хрящевого матрикса [37] он составляет 12% от веса хрящевой ткани и 23% от сухого остатка.

Таблица 3. Примеры хондроитинсульфат PG [цитируются по121,155]

Протеогликан	Коровый белок, KD	Количество цепей	Ткань
Агрекан	208-220	~100	хрящ
Версикан	265	12-15	фибробласты
Нейрокан	145	1-2	мозг
Бревикан	96	0-4	мозг
Бамакан	138	1-3	базальные мембраны
А-коллаген (IX)	68	1	хрящ, стекловидное тело
Тромбымодулин	58	1	эндотелий
CD44	37	1-4	мембранна лимфоцитов
NG2	251	2-3	нейральные клетки,
Инвариантная цепь	31	1	антиген-презентирующие клетки
Сериноглицин	10-19	10-15	миелоидные клетки, гранулы

Трудно найти другую такую большую молекулу, в которой к одной белковой цепи прикреплено до 100 цепей хондроитинсульфатов и около 30 цепей кератансульфатов. [37]

Молекула агрекана по форме похожа на "ёршик" для посуды. В хрящевой ткани молекулы агрекана объединяются в межмолекулярные комплексы с гиалуроновой кислотой и связывающим белком. Гиалуроновая кислота и белок связываются с агреканом ионными связями в области домена G₁ корового пептида. Домен G₁ соединен примерно с 5-6 дисахаридными звеньями гиалуроновой кислоты, все это образование удерживается линкер-протеином;

домен G_1 и линкер-протеин ограничивают 24-27 дисахаридных звеньев гиалуроновой кислоты. Весь комплекс молекулярной массой более 200×10^3 КД содержит одну молекулу гиалуроновой кислоты, 110 молекул агрекана и 110 молекул связывающего белка. [129,130]. Управление сборкой этих комплексов - основная функция ферментов хондроцитов. Агрекан и связывающий белок синтезируются в этих клетках по мере необходимости в их секрети или для внутриклеточного строительства. Эти компоненты начинают взаимодействовать внутри клетки, но полностью завершается процесс образования комплекса в межклеточном пространстве. Методами радиоизотопной метки и флюоресцентного анализа доказано, что гиалуроновая кислота строится на мембране хондроцитов специфической синтетазой и выводится в межклеточное пространство, где связаться с агреканом и линкерным белком. Созревание функционально активного тройного агрегата составляет около 24 ч [136].

Недостаточно изучен в настоящее время катаболизм агрекана. Есть разрозненные данные о присутствии в хрящевом межклеточном матриксе гидролитического фермента агреканазы [117] Авторы считают, что субстратом этой гидролазы является деспирализованный участок между доменами G_1 и G_2 . Дополнительно, в зоне присоединения цепей хондроитинсульфата в центральном пептиде имеются ещё 3-4 участка протеолиза агрекана. Комплекс домена G_1 , связывающего белка и гиалуроновой кислоты является конечным продуктом гидролиза агрекана. Он поглощается хондроцитом эндоцитозом и разрушается лизосомальными гидролазами.

Гиалуроновая кислота Повторяющаяся дисахаридная единица гиалуроновой кислоты - глюкозацетиламин-глюкуроновая кислота. Гиалуроновая кислота (ГК) широко распространена в природе, начиная с капсул стрептококков кончая тканями высших позвоночных организмов [78]. ГК присутствует у млекопитающих в коже, кости, стекловидном теле и т.п. структурах [125].

Полимер состоит из десятков тысяч дисахаридов (от 10^2 до 10^5 КД) [59,60.]. ГК в растворе обладает вытянутой структурой - будучи растянутым, полимер 110

КД имеет длину 2,5 мкм. Благодаря своим размерам, молекулы ГК образует сетевидную конструкцию. Гиалуроновая кислота имеет вязкость (η) 4500 пуаз при концентрации 10 мг/мл (т.е. в 4500 раз превышает вязкость воды). Это создает упругость тканей, содержащих гиалуроновую кислоту в высокой концентрации (стекловидное тело пупочный канатик, и др.). ГК является биологической природной смазкой - обеспечивает упругость в статических условиях и снижает трение при движении, поддерживает осмотическое давление тканей, является природным катионитом и регулирует распределение белков плазмы по зарядам [77,78].

Несмотря на то, что ГК имеет однородную структуру, она принимает участие в специфических взаимодействиях. Описаны белки (гиаладгерины), распознающих структуру ГК. Эти специфические взаимодействия соединяют ГК с протеогликанами, организуя структуру внеклеточного пространства. ГК взаимодействует также с клеточными поверхностями, изменяя поведение клеток [77,188].

Протеогликаны соединяются с гиалуроновой кислотой коротким протеином-спейсером, конденсируясь в высокомолекулярные агрегаты [20,21]. Это надмолекулярное образование содержит 5 - 10% белка, связанного гликозидными связями с полисахаридами, при этом 100 цепей хондро сульфата и 60 цепей кератан сульфата прикреплены в поперечном направлении к продольной оси полипептидного стержня, образуя щеткообразную структуру данного НГ. Около 70 - 200 единиц протеогликана, присоединены ионными связями спейсер-пептидом к вытянутой в длину молекуле гиалуроновой кислоты [1,2,95]. Спейсер-пептид укрепляет связь между протеогликаном и гиалуроновой кислотой. Конформация участка белкового стержня, необходимая для соединения протеогликана с гиалуроновой кислотой, поддерживается дисульфидными группами [221.]. При разрыве этих связей образуются продукты, препятствующего агрегированию протеогликана и гиалуроновой кислоты. Биосинтез ГК представляет собой сополимеризацию ацетилглюкозамина с и глюкуроновой кислоты, источником которых становятся

макроэргические нуклеотидные предшественники: уридиндифосфо-ацетилглюкозамин и уридиндифосфо-глюкуроновая кислота, соответственно. В отличие от остальных ГАГ, ГК не образует ковалентных связей с коровым протеином. Гиалуроновая кислота синтезируется на плазматической мембране, представляя собой редкое исключение из процессов гликозилирования которые в подавляющем большинстве случаев осуществляются в аппарате Гольджи [60,67, 69].

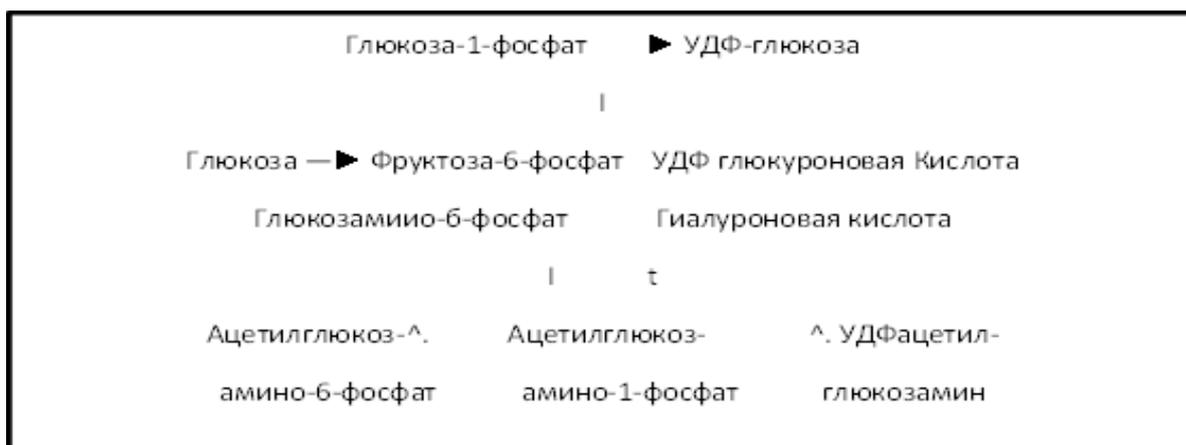


Рис. 1. Схема синтеза гиалуроновой кислоты [цитируется по 69].

Для всех макромолекул процесс синтеза сопряжен с участием мономеров в макроэргической форме. В сборке цепей ГАГ, и других полисахаридов, исходными соединениями являются уридиндифосфонуклеотид-моносахариды, которые предварительно образуются из D-глюкозы или УДФ-глюкозы.

Фосфорилирование D-глюкозы служит первым этапом, после чего начинается взаимодействие с нуклеозидтрифосфатом: УТФ + глюкоза-1-фосфат > УФД-глюкоза+пирофосфат. В зависимости от того, какой из ГАГ будет синтезироваться, зависит путь последующего превращения УДФ-глюкозы. При участии НАД уридин-дифосфо-глюкоза превращается в глюкуроновую кислоту. Глюкоза превращается в глюкозамин до соединения с нуклеотидом. Синтез ГК показан на рисунке 1.

Необходимо отметить, что гиалуроновая кислота синтезируется только в присутствии ионов Mg. Реакция ацетилирования происходит с участием

ацетил-коэнзимаА. Биосинтез ГК был детально изучен на стрептококках, но он не отличается от такового у высших животных [78].

В лизосомах происходит катаболизм ГК после рецептор-опосредованного эндоцитоза, в тех же тканях где и синтезируется или же, в лимфатических узлах, где деполимеризуется основная часть тиалуруновой кислоты [77].

Дерматансульфат протеогликаны(ДС), называемые также хондроитинсульфатами В. (ХС-В), состоят из звеньев дисахаридов глюконовая кислота(или идуроновая) - D-ацетилгалактозамин. ДС относят к хондроитинсульфатам из за наличия в них галактозацетиламина, но благодаря присутствию остатка идуроновой кислоты выделяются в отдельный класс [113,153] .

Дерматансульфат считают изомером хондроитинсульфатов, в котором D-глюконовая кислота перешла в L-идуроновую. Все остатки глюконовой кислоты, не эпимеризуются и, по существу, цепи дерматансульфата являются гибридными молекулами, состоящими из разных последовательностей [205].

Образование L-идуроновой кислоты происходит путем C5-эпимеризации глюконовой кислоты, уже встроенной в растущий полимер. Количество L-идуроновой кислоты в цепи может колебаться в широких пределах - от нескольких процентов до 90%. Среднее количество сульфатных групп на одно звено в дерматансульфате выше, чем в хондроитинсульфате, и это связывают с наличием двух сульфатных групп у некоторых остатков L-идуроновой кислоты[113].

L-идуроновая кислота имеет определяющее значение в формировании на ГАГ участков связывания различных ГАГ-офильных белков. Доказывает это то, что ГАГ-цепи, несущие большое количество звеньев идуроновой кислоты, подавляют пролиферативную активность фибробластов. ГАГ с высоким содержанием остатков глюконовой кислоты такой активности не проявляют [152]

Дерматансульфаты изучены хуже других типов гликозаминогликанов. ДС впервые выделены из кожи, откуда и получили свое название. Позднее

дерматансульфаты обнаружены и в других тканях. В больших концентрациях они содержатся в волокнистой соединительной ткани (в стенке кровеносных сосудов, сухожилиях, коже). Обнаружено, что ДС продуцируются в высоких концентрациях в процессе заживления ран и их уровень коррелирует со скоростью регенерации[149,152].

Значительное разнообразие и сложность строения дерматансульфатов и дерматансульфат-протеогликанов обеспечивается различием в длине ГАГ-цепи ДС, вариантами положения остатков идуроновой кислоты, особенностями сульфатирования и существованием десятков альтернативных форм центральных протеинов.

Обнаружены доказательства того, что изменение длины ГАГ-цепей, состава дисахаридов и варианты сульфатирования влияют на силу связывания ростовых факторов и регулируют функциональные взаимодействия ДС с биологически активными белковыми молекулами [111,204].

Путем сульфатирования ДС модифицируются по четвертому и шестому углеродным атомам гексозамина (как и ХС А и ХС С) и пространственной модификации у С2-атома уроновой кислоты. Контролируются эти оба процесса определенными ферментативными системами и в итоге структура ГАГ служит кодом информации о функции этих полимеров.

Показано, что для ДС характерно три варианта структуры уроновой кислоты (глукуроновая, идуроновая или 2-О-сульфатированная идуроновая кислоты) и четырех вариантов структуры гексозамина (галактозацетиламин, 4-О-сульфатированный галактозацетиламин, 6-О-сульфатированный галактозацетиламин, 4-О - и 6-О-дисульфатированный галактозацетиламин). При образовании протеогликана на информационную последовательность ДС влияет тип центрального белка. Обнаружена закономерность изменения структуры коровых протеинов на определенных стадиях развития и при изменении физиологических условий[113,205].

Два наиболее изученных дерматансульфат протеогликана – небольшие богатые лейцином ПГ декорин и бигликан. Оба протеогликана содержат

короткое белковое ядро, оба секретируются во внеклеточное пространство. Декорин и бигликан несут одну или две дерматансульфатных цепи. Декорин и бигликан содержатся в хрящах, связках, сухожилиях, менисках, коже и других видах соединительной ткани. Наиболее изучены декорин, бигликан, фибромодулин. Коровые протеины бигликана и декорина сходны по массе и строению (молекулярная масса 36 КД и 38 КД)[149,152]. Они содержат 7-9 участков, содержащих преимущественно лейцин и образующих спирализованные и складчатые структуры. Каждый из этих белков имеют по 2 S-S-связи. N-концевые участки белковой части бигликана и декорина значительно отличаются по первичной структуре, определяя различия в присоединении гликозаминогликанов. Бигликан несет серин в положении 5 и 11, обеспечивая присоединение двух полисахаридных цепей. В декорине имеется один серин в 4 положении, и соответственно прикреплена одна полисахаридная нить. У этих протеогликанов полисахаридные последовательности представлены дерматансульфатом с мол. массой 30КД [106,107]. Малые протеогликаны являются полифункциональными макромолекулами. Известно, что они связываются с другими компонентами соединительной ткани и участвуют в регуляции их функций. Имеется наблюдение, что декорин и фибромодулин присоединяются к фибриллам коллагена II типа и, препятствуя образованию нестандартных фибрилл, ограничивают их диаметр. Присоединяясь к фибронектину, декорин и бигликан, подавляют клеточную адгезию, а связывая фактор роста опухолей 3, ингибируют его митогенную активность[133]. Достоверно доказано, что бигликан и декорин выполняют роль активатора в процессах развития и регенерации соединительной ткани. [133,134].

Гепарансульфат протеогликаны и гепарин ГС и Ге – родственные по структуре ГАГ с повторяющимися дисахаридными единицами ацетилглюкозамин- α 1-4-глюконовая(альдоновая)кислота- β 1-4[54].

Таблица 4. Отличие гепарансульфатов от гепарина

Характеристика	Гепарансульфат	Гепарин
Растворимость в 2 М ацетате калия (рН 5.7, 4°C)	да	нет
Размер	10-70 КДа	10-12 КДа
сульфат/гексозамин	0.8-1.8	1.8-2.4
ацетилглюкозамин-сульфаты	40-60%	≥85%
Содержание идуроновой кислоты	30-50%	≥70%
Связывание с антитромбином	0-0.3%	~30%
Место синтеза	Практически любые клетки	тучные клетки

Различия физико-химических свойств между ними существуют, важнейшие из которых приведены в таблице 3.

Гепарин образуется в тучных клетках и накапливается в цитоплазматических гранулах. Обладает мощным провосвертывающим действием. Гепарансульфат, синтезирующийся почти всеми типами клеток, также обладают антикоагуляционной активностью, но по сравнению с гепарином в значительно меньшей степени. Гепарин, в ходе биосинтеза значительно сильнее сульфатируется, в результате более 85% остатков ацетилглюкозамина оказываются N-деацетилированными и N-сульфатированными. В гепарине 70 % остатков уроновой кислоты подвергаются эпимерному переходу [54].

Гепарин имеет наивысшую величину отрицательного заряда среди известных биологических макромолекул на единицу массы. Возможность ионных взаимодействий гепарина со множеством белковых молекул, таких как ферменты, регуляторы ферментов, белки внеклеточных структур, цитокины определяется именно этим обстоятельством. При очистке гепарин-связывающих белков, ионные взаимодействия широко используются. Имобилизованный гепарин служит своего рода специфическим

катионообменником. Протокол связывания и элюции гепаринофильных молекул очень схож с протоколом ионообменной хроматографии. [21, 50].

Гепарансульфаты (ГС) постоянные компоненты поверхности всех типов клеток, а также внеклеточного матрикса. Взаимодействуя с различными белками, гепарансульфаты, участвуют в разнообразных физиологических процессах, таких как адгезия клеток, регуляция, действие цитокинов и др. [168.]

Кератансульфат протеогликаны Повторяющаяся дисахаридная единица КС - Галактоза-ацетилглюкозамин. Существует два типа кератансульфатов, отличающихся по типу присоединения ГАГ-цепи к центральному протеину. Первый тип кератансульфатов находятся в роговице. Второй тип - в скелетной ткани. [40,41,80,196].

Фибромодулин - наиболее изученный ПГ из кератансульфат протеогликанов. Ядерный белок фибромодулина (МВ около 40 КД) имеет области двоичных повторов, богатых лейцином. N-концевая область фибромодулина содержит сульфатированные остатки тирозина, но не содержит серина. Цепи кератансульфата связываются с центральным протеином фибромодулина в области, богатой лейцином, через NH₂-группу аспарагина не на N-конце, как у других ПГ [53,133]. Кератансульфатпротеогликаны выполняют чрезвычайно важную функцию в роговице – удерживают четко одинаковое расстояние между фибриллами коллагена I типа, создавая „прозрачную ткань“. Нарушения в сульфатировании (макулярная роговичная дистрофия) или формировании кератансульфатной цепи-цепи (кератоконус) ведут к изменениям в структуре фибрилл, а это приводит к непрозрачности роговицы [80, 196.].

Кератансульфат первого типа имеет длинную цепь (более 50 дисахаридных единиц, 20-25 КД). Она включает смесь несulfатированных, monosulfатированных (галактоза-ацетилглюкозамин6S) и disulfатированных дисахаридов (галактоза6S- ацетилглюкозамин6S). Две sulfотрансферазы - ацетилгалактозамин6-O-sulfотрансфераза и галактоза 6-O- sulfотрансфераза – ферментируют процессы переноса sulfо группы

на моносахаридные остатки КС[12, 13]. Детерминированность сульфатных групп КС для биологической функции данных молекул, подтверждается тем, что уровень содержания сульфо групп кератансульфата увеличивается во время развития роговицы в эмбриогенезе, а синтез нессульфатированных КС приводит к дистрофии роговицы[80,40,41.].

Расщепляются КС в лизосомах путем поэтапного действия экзогликозидаз (β -галактозидаз и β -гексозаминидаз), но предварительно они десульфатируются с концевых остатков сульфатазами [40,41].

Биосинтез протеогликанов Синтез гликозаминогликанов осуществляется катализируется гликозилтрансферазами, гликозидазами и сульфатазами в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и аппарате Гольджи. Начинается этот процесс с биосинтеза тетрасахаридного линкера, далее осуществляется полимеризация ГАГ-цепи.

Синтез тетрасахарида- линкера начинается в эндоплазматическом ретикулуме с переноса ферментом О-ксилозилтрансферазой остатка ксилозы с уридиндифосфо-ксилозы на серин центрального протеина [218.]. В начальных отделах аппарата Гольджи происходит присоединение двух молекул галактозы, осуществляемое двумя разными галактозилтрансферазами.

Источником остатков галактозы служит уридиндифосфо-галактоза. Первая гликозилтрансфераза образует β -1,3-, а вторая - β -1,4-гликозидную связь [156.]. Затем фермент глюкуронилтрансфераза-1 заканчивает синтез тетрасахарида, присоединяя глюкуроновую кислоту [156].

После синтеза этот тетрасахарид в некоторых тканях модифицируется: сульфатируется по остаткам галактозы и фосфорилируется по С-2 ксилозы [160,161,178]. Затем происходит поэтапное присоединение гексуроновой кислоты и гексозамина [182,183,185].

По окончании синтеза связующего фрагмента путь образования протеогликанов идет различными путями. Возможно 3 альтернативных типа реакций:

1.присоединение β -ацетилгалактозамина (инициация синтеза хондроитинсульфата)

2.присоединение α -ацетилглюкозамина (инициация синтеза гепарансульфата)

3. присоединение α - ацетилгалактозамина.

Эти реакции проводят три специфические трансферазы. Реакция присоединения α -ацетилгалактозамина к связующему тетрасахариду нехарактерна для эукариот и дает в результате пента- или гептасахариды содержащие один дисахарид из хондроитинсульфата, который не встречается в природных протеогликанах. Перечисленные трансферазы являются контрольными точками биосинтеза ПГ, т.к. они определяют тип формирующейся ГАГ-цепи [161].

Тотальная распространенность ПГ в животном мире на фоне конечного числа вариантов их углеводной структуры говорит о многообразии и универсальности функций, которые выполняют эти молекулы на клеточном и организменном уровнях. Они участвуют в коммуникаций клеток, контактном торможении, в «экранировании» рецепторов на клеточной поверхности, транспорте других молекул в клетку, модификации эффекторных функций биомолекул [25, 26, 28, 93, 101,148, 55, 95].

Для протеогликанов базальных мембран характерна гетерогенность.[9]. Эти гепарансульфатсодержащие протеогликаны (ГСПГ), представлены двумя разновидностями: высокой и низкой плотности. Показана роль ПГ в межклеточном взаимодействии и в формировании не менее двух видов эпителиальных слоев. В этой работе Sanderson R D. and Bernfield M выделили и охарактеризовали две различные молекулы ПГ[169]. Первый ПГ поверхности клеток, ведет себя как трансмембранный белок, который имеет две гепарансульфатные цепи и цепь хондроитинсульфата на его внеклеточной области. Он участвует в формировании многослойного эпителия. ПГобеспечивающий формирование монослоя эпителиальных клеток изучен недостаточно.[8,180].

Во внеклеточном матриксе и на поверхности клеток сосредоточена значительная масса протеогликанов, они содержатся также в цитоскелете [75,76], ядре [114], и секреторных гранулах [118]. Усредненные данные показывают, что из общего количества протеогликанов, содержащихся в мембранах культуральных фибробластов человека, гиалуроновая кислота составляет 40%, хондроитинсульфат-35% и гепарансульфат - 25% [49].

Сходные протеогликаны содержатся в тканях, гомологичных по своему происхождению и подчиняются закону "биохимической гомологии". Они, как правило, тканеспецифичны, но не видоспецифичны [132]. Каждый из ПГ выполняет свою обусловленную особенностью структуры функцию. Поэтому профили протеогликанов одних и тех же тканей имеют больше сходства у различных видов, чем протеогликаны различных органов одного вида [137].

Функции ПГ в тканях определяются наличием в структуре молекулы ПГ большого числа анионных групп, расположенных регулярно по ходу цепей ГАГ. В матриксе хрящевой ткани гиалуроновая кислота образует комплексы ПГ смешанного строения, содержащие цепи хондроитинсульфатов, и кератансульфатов. Они взаимодействуют с заряженными ионами металлов, метаболитами, витаминами, ксенобиотиками и регулируют их транспорт в клетку. Сеть протеогликанов придает хрящевой ткани специфические биохимические свойства. Связывая сотни молекул воды молекулы ПГ хряща сильно набухают, но увеличение объема ограничивается сетью фибриллярных белков. Возникающее при этом давление, обеспечивает упругость и эластичность хряща, что позволяет ему выдерживать большие механические нагрузки [119]. В хрящевых и соединительных тканях ПГ выполняют не только структурно-механическую функцию. Высокий отрицательный заряд ГАГ играет важную роль в обеспечении трофики ткани, в транспорте солей, липидов, аминокислот в бессосудистых зонах [38,25,43,215]. С возрастом количество ПГ уменьшается, их качественный состав меняется, агрегационная способность и взаимодействие с коллагеном снижается, и в результате меняется трофика и механические свойства тканей [34, 28,84,128].

В ядре клетки ПГ участвуют в организации матрикса и в регуляции активности хроматина [47,93]. Все ГАГ являются полианионами имея в своем составе сульфаты и карбоксильные группы. Они создают ионные связи и захватывают огромное количество воды. Ионные взаимодействия ПГ с противоположно заряженными группами пептидов и низкомолекулярных соединений (гистамин и другие биоамины, ксенобиотики и т.д.) приводят к образованию функционально не значимых соединений. Связывание биоаминов протеогликанами подавляет их специфическую активность. Связывание лекарственных веществ и антибиотиков с ПГ тканей лежит в основе механизма накопления их в соединительно-тканых структурах. Подобный механизм приводит к отложению в тканях различных метаболитов [2,26, 199,175]. Есть мнение, что взаимодействие ПГ с факторами роста имеет регуляторное значение. ПГ рассматривают как активаторы факторов роста [158,159,197,198, 148]. ПГ связываются с факторами роста своими углеводными цепями. Гепарин и гепарансульфат ПГ наиболее активны в этих процессах [116, 39, 83]. С ними связываются фактор роста фибробластов (1,9,19), трансформирующие факторы роста, фактор роста сосудистого эндотелия, тромбоцитарные факторы роста, фактор роста гепатоцитов [148,81]. Добавление в среду культивирования фибробластов гепарансульфат протеогликанов синдекана, перлекана и глипикана стимулирует активность фактора роста фибробластов b [39,103,107]. Функциональное значение этих взаимодействий не нашло ни экспериментального, ни теоретического объяснения.

Дерматансульфат ПГ может связывать факторы роста как за счет своих полисахаридных цепей, так и за счет центральных протеинов. Стал известен спектр регуляторных молекул, взаимодействующих с дерматансульфатом [205,206,207], среди которых факторы роста фибробластов (1,2) и фактор роста гепатоцитов. Дерматансульфат стимулирует активность фактора роста фибробластов -2 более продуктивно, чем гепарансульфат [212]. Коровые белки декорина и бигликана связываются с трансформирующим фактором роста-р

[213,197]. Эти ПГ выступают в роли ингибиторов трансформирующего фактора роста.

Функция хондроитинсульфат ПГ, модулирующая активность факторов роста, менее изучена, по сравнению с гепарансульфат и дерматансульфат ПГ. В публикациях 80-90 годов прошлого века бытовало мнение, что хондроитинсульфат вообще не способен связывать факторы роста. Считалось, что аффинность ГАГ к факторам роста обусловлена L-идуроновой кислотой, присутствующей только в гепарансульфате и дерматансульфате, но не в структуре хондроитинсульфата [103,104,]. К сегодняшнему дню показано, что факторы роста фибробластов FGF-3, FGF-6, FGF-8, FGF-22, имеют повышенную аффинность к хондроитинсульфату [25,69,107]. Синдеканы 1 и 4, после удалении цепей хондроитинсульфата, не связывают фактор роста фибробластов b (FGF) [61, 86].

Исследователи из группы Iozzo R. V считают, что синдеканы служат корцепторами фактора роста bFGF, способствуют димеризации фактора и стабилизируют лиганд-рецепторный комплекс [105,107].

Адгезия клетки - это процесс, который начинается с взаимодействия интегринов — со специфическими участками белков внутриклеточного матрикса, например таких, как фибронектин и ламинины [43,]. Затем происходит переформатирование цитоскелета, образование контактов, в которых интегрины связаны с актиновым цитоскелетом, и это приводит к упрочнению взаимодействия клетки с субстратом. Большинство интегринов состоит из 2 нековалентно связанных субединиц [164, 176, 177, 194]. ПГ, могут быть одновременно лигандами рецепторов клетки, и сами выступать в качестве рецепторов клеточной адгезии для других лигандов. Guidetti G., et all показали, что тромбоциты адгезируются на декорине [90]. Доля прикрепившихся клеток увеличивается при использовании в качестве субстрата центрального протеина декорина, что объясняется устранением экранирующего действия углеводной цепи декорина. Иммунохимическими методами доказано что интегрин $\alpha 2 \beta 1$ служит рецептором декорина [90].

Представляют интерес рецепторы макрофагов, взаимодействующие с широким спектром лигандов, включая декстрансульфат и модифицированные липопротеины. Из-за своей широкой специфичности и способности связывать модифицированные фрагменты липопротеинов и др. макромолекул они получили название «мусорных» рецепторов [171,172]. Клетки, экспрессирующие «мусорные»-рецепторы, связывают в 5-6 раз больше декорина и бигликана, меченных иодом-125, чем контрольные клетки. Наиболее эффективно связывается агрекан, содержащий большое количество ГАГ и обладающий высоким отрицательным зарядом. Это противоречит данным о том, что цепи ГАГ снижают адгезивные свойства ПГ. Обнаруженный в атеросклеротических бляшках декорин связывается с макрофагами. Авторы предполагают, что ПГ играют патогенетическую роль в развитии атеросклероза, за счет удержания макрофагов, поддержания степени воспалительного процесса и накопления липидов [172]. Была изучена адгезия макрофагов и на другом классе ПГ - кератансульфат ПГ. Лумикан - представитель этого класса ПГ выделен из эндотелиальных клеток. Он способствует прикреплению и распластыванию макрофагов на субстрате. Макрофаги адгезировали на лумикане в течение 30 мин, а адгезия на ламинине и коллагене заканчивалась только через 3-15 ч [82]. Удаление углеводного компонента люмикана не приводило к значительному усилению адгезии макрофагов на этом ПГ. Люмикан роговицы, выделенный в сульфатированной форме, ингибировал адгезию макрофагов. Хелатирование ионов кальция с помощью ЭДТА блокировало связывание макрофагов на несульфатированном люмикане или его бклковом компоненте. К такому же результату приводило использование декстрансульфата — лиганда «мусорных»-рецепторов. Сделан вывод, что рецептор люмикана у макрофагов не относится ни к интегринам, ни к «мусорным»-рецепторам.

Рецепторные функции ПГ выявлены для трансмембранного хондроитинсульфат ПГ - CD44 [85,102,211,]. Протеогликан CD44 служит не только рецептором гиалуроновой кислоты, но выполняет функцию рецептора

других лигандов (ламинин, фибронектин, серглицин, коллагены). Известны пептидные участки фибронектина, с которыми взаимодействует CD44. Применение ингибиторов биосинтеза хондроитинсульфат ПГ, или обработка клеток хондроитиназой ABC приводят к подавлению адгезии клеток на фрагментах фибронектина, синтезированных химическим путем [211,102]. CD44 выполняет функции регуляции адгезии клеток и межклеточного узнавания. В активации и хоминге лимфоцитов при воспалении CD 44 также принимает непосредственное участие [85,223].

Более того, предобработка клеток гепариназой III приводит к тому, что клетки (в данном случае ооциты) перестают адгезировать на гепарин-связывающем фрагменте фибронектина - FN-C/H II [219]. Таким образом доказана рецепторная функция у трансмембранных гепарансульфат ПГ - синдеканов. Фибробласты, эпителиальные, гладкомышечные, эндотелиальные клетки образуя фокальные контакты, в качестве обязательного компонента содержат синдекан-4 [106,107]. Все вышеизложенное свидетельствует о важной роли протеогликанов в организме.

1.2. ПРОТЕОГЛИКАНЫ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ В МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЕ

ПГ, как теперь известно, кроме структурных и гидродинамических функций в тканях, являются активными участниками многочисленных процессов регуляции и координации метаболических реакций [158,159]. Перитубулярные клетки и клетки Сертоли в яичке, способны синтезировать в культуре ткани компоненты внеклеточного матрикса [186]. In vitro он направляет формирование тестикулярного шнура и развитие половых клеток. Очевидно что синтез протеогликанов, как одного из основных компонентов внеклеточного матрикса, занимает важное место в сперматогенезе. Соматическая клетка яичка крысы синтезирует два типа ПГ: один гепарансульфат, / хондроитин, другой хондроитин/ дерматосульфат как ГАГ цепи [181,185]. Частично охарактеризованы ПГ перитубулярных клеток и клеток Сертоли крысы, но более детально исследованы цепи ГАГ. Высокие

концентрации протеогликанов содержит семенная плазма, в среднем 0,77-0,82 мг/мл. Протеогликаны семенной плазмы примерно на 70% состоят из хондроитинсульфат ПГ, и на 30% гепаранхондроитинсульфат ПГ. Между числом патологических форм сперматозоидов и хондроитинсульфат протеогликанами ($r = -0.43$), и гиалуроновой кислотой ($r = -0,56$) рядом исследователей выявлена отрицательная корреляция. Доля оплодотворённых ооцитов, *in vitro*, была достоверно больше при концентрациях протеогликанов от 0,65 мг/мл. и выше [71,72]. Практически нет исследований, посвященных исследованию корового белка ПГ, присутствующих в семенной плазме. Только одна публикация посвящена вопросу синтеза и продукции ПГ в семенной плазме, в которой исследовали один из ключевых ферментов синтеза гликозаминогликанов (EC2.4.2.26.ксилозилтрансфераза) [87]. Для большинства тканей активность ксилозилтрансферазы является показателем интенсивности синтеза ПГ. И принципиально важно, что этот фермент обнаружен в семенной плазме. Это констатирует факт самостоятельного синтеза ПГ в репродуктивной системе самцов. Высокая активность ксилозилтрансферазы обнаружена в секрете *vesiculæ seminales*. Активность ксилозилтрансферазы снижается у инфертильных мужчин более чем в 2,35 раза. Это подтверждает роль ПГ семенной плазмы в обеспечении функции оплодотворения [87].

Chandonnet, L, et all [52] и Miller et all [140,141] впервые описали существование в семенной плазме быка белка, связанного с гепарином. Позднее они подробно описали способы его выделения [46,157]. Изучен его аминокислотный состав, точки дисульфидных связей, места O-гликозилирования и N-концевая последовательность (Глицин-аспартат-изолейцин). Этот, гепаринсодержащий белок (получивший название - BSP-30К) состоит из 157 аминокислот и 6 остатков треонина с O-гликозилированием. BSP-30К - кислый протеогликан бычьей семенной плазмы. BSP-30К сорбируется на сперматозоиды после эякуляции и участвует в реакции капацитации. Позднее этот белок получил название спермадгезин. Гепаринсвязывающие специфические полипептиды семенной плазмы борова

pB1 и жеребцов HSP-1 и HSP-2 [45] гомологичны спермадгезину. В протеогликане борова pB1 определена последовательность аминокислот и посттрансляционные модификации. Он содержит 105 аминокислот, имеет 18 участков O-гликозилирования, и содержит область подобную 45 аминокислотных остатков фибронектина. pB1 имеет гомологию последовательности аминокислот 60-65 % со своими конскими и бычьими аналогами. pB1 формирует комплекс 35-40KD с гепарином в отличие от BSP и HSP, формирующих надмолекулярные конгломераты в 900-1500-KD. Это подтверждает теорию Mathews M.[132], что ПГ одних и тех же тканей разных видов млекопитающих показывают большую гомологию и сходные функции, чем ПГ разных тканей одного вида животных.

Спермадгезины группа секреторных белков синтезируется в мужских репродуктивных органах свиньи, лошади и быка. Они относятся к мажорным белковым компонентам семенной плазмы и, при определенных условиях, адгезируются на поверхности сперматозоидов. Строение спермадгезинов тщательно исследовано и содержит Галактозил- бета(1-3)-ацетилгалактозамин и Галактозил-бета (1-4) - ацетилгалактозамин последовательности в O-связи, и N-связи с ГАГ. Это полифункциональные протеины, содержат сульфатированные ГАГ и способны связывать фосфолипиды и ингибиторы протеаз. На различных этапах оплодотворения зарегистрировано участие спермадгезинов. Во-первых эти ПГ создают защитный слой вокруг головки сперматозоида, ингибируя преждевременную акросомальную реакцию [199,200]. Во-вторых, они участвуют в первоначальном связывании и узнавании сперматозоидом яйцеклетки. Первичная структура спермадгезинов не имеет сходства с ранее расшифрованными коровыми полипептидами ПГ[202].

Выделен и затем изучен, методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле [199], белок группы спермадгезинов, состоящей из двух 13-KD субъединиц, соединенных S-S связями. Белок назван Z13 и секвенирована последовательность его аминокислот и определена локализация

дисульфидной связи. Z13 имеет 85% гомологию N-концевой аминокислотной последовательности с ПГ - фибромодулином.

В яичках быка был обнаружен ПГ [22], получивший название тестикан. Очищен и охарактеризован его белковый кор. Он содержит несколько доменов, которые встречаются в биоактивных пептидах (фактор роста нервов, остеоонектин, фибромодулин, фактор миграции Б). Но, в отличие от перечисленных макромолекул, тестикан содержит уникальную аминокислотную последовательность из 46 аминокислот, в которой каждая 3-я аминокислота триптофан. Тестикан, по мнению авторов, является предшественником, ПГ семенной плазмы быка спермадгезина.

Sajzeiras J.V. et al методом генной инженерии [44a] получили рекомбинантные клоны клеток для синтеза спермадгезина козла и синтезировали полипептид с мол. массой 15,5 KD, идентичный иммунохимически спермадгезину.

Из семенной жидкости крупного рогатого скота выделен протеогликан [166]. После расщепления углеводной составляющей получена белковая фракция кислого характера с мол. массой 12,9 KD, получившей название aSFP. Этот белок, исследователи относят к семейству спермадгезинов по той причине, что последовательность аминокислот aSFP содержит участки повторяющие последовательности аминокислот в ранее описанном коровом протеине BSP 30. Наивысшая гомология характерна для гидрофобного ядра aSFP.

Методом аффинной хроматографии из бычьей семенной плазмы выделили группу гепаринсвязывающих протеинов [65], которые при электрофорезе в SDS-полиакриламидном геле разделились на 9 компонентов с мол. массой от 18 до 75 KD. В тесте пенетрации слизи шеечной пробки отмечено достоверное увеличение активности отмытых сперматозоидов. После их инкубации с выделенными белками.[139,140,194] . В своей первой публикации Miller et al. по исследованию функциональной роли гепаринсвязывающих белков установили способность этих белков (фракции 18 и 24 kDa) связываться с бычьими сперматозоидами, и что характерно только с

эякулированными. Сперматозоиды, полученные из придатка яичка, не проявляли способности к связыванию гепаринсвязывающих белков. [139]. Miller et al. [139,140] показали способность гепаринсвязывающих белков (фракции 24 и 31 кДа) инициировать капацитацию.

Из семенной плазмы мужчин выделены гомологи спермаадгезина [120]. Гепаринсвязывающие протеины спермоплазмы мужчин очищены на иммобилизованном гепарине и с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии разделены на 12 фракций (НВ1-НВ12) [65,68] Во фракции НВ2 с молекулярной массой 14 КД обнаружен полипептид N-концевая последовательность которого Глицин-аспартат-изолейцин совпадала с спермадгезином. Известные белки спермоплазмы иммунохимически идентифицированы среди других фракций, например, специфическая кислая фосфатаза простаты (НВ7) и лактоферрин (НВ11). Специфичность центра связывания с гепарином исследована для высокомолекулярных гепаринсвязывающих белков и установлено, что гепаринсвязывающая активность ингибируется инулином, гликогеном, D-фруктозой, D-глюкозой. Декстран и маннан не влияли на связывание гепарина. Эксперименты с бычьей спермой [135,143] дали возможность авторам очистить и исследовать два гепаринсвязывающих белка. Первый, с мол. массой 31 КД, идентифицирован как ДНК-аза. Второй с мол.массой 24 КД, проявляет свойства ингибитора тканевой нейтральной металлопротеиназы. С помощью антител к этим белкам, авторы установили места их синтеза и секреции в сперму. Ингибитор металлопротеиназы синтезируется в предстательной железе и секретруется в семенную плазму. ДНК-аза продуцируется в яичках. McCauley TC et al, обнаружили, что антитела к ингибитору металлопротеиназы выявляют этот белок и в семенной плазме человека [135].

Много исследований было посвящено потенциальной физиологической роли спермадгезинов на различных стадиях оплодотворения [220]. Однако знаний о функциях, выполняемых различными спермадгезинами явно недостаточно. Нет информации об их точном механизме действия и путях

реализации функционального результата. Всестороннее изучение спермадгезинов и их роли в оплодотворении имеет фундаментальное значение, чтобы выяснить биологические пути и белковые взаимодействия на молекулярном уровне. Последующий анализ рассматривает некоторые релевантные результаты исследования, подтверждающие потенциальную роль гепарина и спермадгезинов в репродукции.

Спермадгезины, связавшись с головкой сперматозоидов, ингибируют капацитацию. «Капацитация - это приобретение сперматозоидами млекопитающих способности к проникновению через яйцевую оболочку в яйцеклетку» [12]. Капацитация инициируется в половых путях самки веществами, выделяемыми эндотелием яйцеводов. Капацитация сперматозоидов кролика осуществляется за 5—6 ч, крысы за 2—3 ч, коровы за 5—8 ч. Капацитацию можно вызвать и *in vitro*. Биохимические процессы капацитации состоят в удалении с поверхности сперматозоидов ингибиторов ферментов акросомы.[141].

Мы далее рассмотрим ряд исследований, содержащих аргументы в пользу активной роли спермадгезинов в процессе капацитации и пенетрации. В области перешейка маточных труб сперматозоиды сохраняют жизнеспособность в условиях, которые тормозят начало капацитации, до наступления овуляции. Первый контакт между овидуктальным эпителием и спермой опосредуется углевод-белковыми взаимодействиями [70]. Показано, что спермадгезин способствует привязке сперматозоидов к овидуктальному эпителию. У свиньи, углеводная система распознавания сперматозоидов представлена олигоманнозными структурами (манноза- α 1-3(Манноза- α 1-6)). Участки связывания маннозы расположены в роstralном секторе головки сперматозоида. Свиной спермадгезин менее специфичен и взаимодействует как с олигоманнозными, так и галактозными производными. С овидуктальным эпителием свиньи оптимально связываются только сперматозоиды покрытые спермадгезином и, этот протеогликан формирует «якорную» базу овидуктального хранилища спермы[70].

Одна из самых успешных стратегий размножения в животном мире это хранение спермы в специализированных участках женских половых путей. В ходе эволюции позвоночных, разработаны различные органы хранения сперматозоидов, чтобы гарантировать наличие фертильной спермы, когда наступает овуляция яйцеклетки. Сперматозоиды хранятся в репродуктивном тракте самок в течение длительного времени, у низших позвоночных, создавая условия оплодотворения на протяжении нескольких последовательных овуляций без дополнительных спариваний [146]. Общий принцип хранилища спермы также существует и у более развитых видов, несмотря на то что у млекопитающих сперматозоиды находятся в активном состоянии в женских половых путях только несколько часов или, максимум несколько дней. Вместо специализированных органов, высшие млекопитающие используют тактику адгезии к эпителию в яйцеводе и контролируемое освобождение сперматозоидов. [30,31].

Большинство сперматозоидов, после эякуляции депонированные в женском репродуктивном тракте, утрачивают активность во время прохождения через женские половые пути и только небольшое число связывается в дистальной части цервикального канала. Этот участок, служащий местом хранения, создает для сперматозоидов защищенные условия до наступления овуляции [96,97,98]. Место хранения сперматозоидов обладает рядом функциональных свойств. Во-первых, происходит отбор наиболее пригодных для оплодотворения сперматозоидов. Во-вторых, инициируется процесс капацитации. В-третьих, регулируется транспорт сперматозоидов, сводящий к минимуму полиспермальное оплодотворение [88,97,122]. Недавние исследования на модели взаимодействия *in vitro* сперматозоидов и различных клеток женского полового тракта подтвердили, что жизнеспособные, некапацитированные сперматозоиды связываются овидуктальным эпителием [98,99]. После адгезии сперматозоидов на овидуктальном эпителии капацитация ингибируется. Процесс капацитации снижает продолжительность жизни сперматозоидов. Поддержание жизнеспособности сперматозоидов в

определенный период времени, и контроль емкости взаимно связанные события [99,209,224]. О факторах и механизмах, которые регулируют ингибирующие и активирующее действие на сперматозоиды в яйцеводах, еще очень мало известно. Например, «какие сигналы получают сперматозоиды с началом овуляции и открепляются от овидуктального эпителия, продолжая движение к яйцеклетке». [200]. В рамках женского репродуктивного тракта, эту цепь взаимодействий могут синхронизировать неизвестные пока молекулярные регуляторы, изменяющие активность сперматозоидов с наступлением и\или приближением овуляции для обеспечения успешного оплодотворения.[224].

Необходимым условием для взаимодействия между сперматозоидами и эпителием, выстилающим маточные трубы, является тесный контакт между ними. Сперматозоид-эпителиальные взаимодействия происходят по механизму лектин-углеводного узнавания [190]. Открытые и гибкие олигосахаридные цепи протеогликанов эпителиальных клеток могут, как якорь захватывать сперматозоиды и удерживать их в непосредственной близости от эпителия [191]. DeMott RP et al, исследуя *in vitro* подавление взаимодействия между сперматозоидами и овидуктальными клетками определили конкретные сигнальные сахара у различных видов. Концевые сиаловые кислоты от боковых цепей ГАГ, угнетали взаимодействие между сперматозоидами и овидуктальными клетками хомячка [62]. Сиаловые кислоты были вовлечены в систему распознавания у крыс [56]. Сперматозоиды крупного рогатого скота связываются на перешейке путем взаимодействия с Lewis-альфа-подобным трисахаридом (N-ацетил-4-O-альфа-L-фукозил-3-O-бета-D-галактозил-глюкозамин), содержащим фукозу на α -1,4 связи [101]. У свиньи, создание овидуктального пула сперматозоидов обеспечено их высоким сродством к маннозным олигосахаридам с N-типом гликозилирования [215].

Различные олигосахариды [115] и лектинодобные молекулы [32] экспрессируются на поверхности как эпителиальных клеток так и сперматозоидов. Они могут участвовать в межклеточные взаимодействия. Например, воздействие ферментом фукозидазой на овидуктальный эпителий

значительно снижает долю связанных сперматозоидов. Обнаружен, небольшой фукоза-связывающий, белок, способствующий взаимодействию сперматозоидов с овидуктальным эпителием. PDC-109 – такое название получил этот белок [91], после выделения, очистки и анализа он оказался частью большого гепаринсвязывающего белка семенной плазмы крупного рогатого скота (BSP), который непосредственно после эякуляции связывается с плазматической мембраной сперматозоидов и вызывает в бычьей сперме капацитацию [63, 145, 131].

Многочисленные секреторные протеины спермоплазмы свиней, входят в группу спермадгезина, представляющего собой, новый тип углевод-связывающих белков и составляет заметную долю белков спермоплазмы [202,203]. В работах исследователей из Германии и Испании детально исследовано действие гепаринасвязанного и свободного спермадгезина на подвижность, жизнеспособность, митохондриальную активность сперматозоидов борова. Содержание сперматозоидов в среде с гепаринасвязанным спермадгезином вызвало время- и дозозависимое снижение числа функциональных сперматозоидов. В среде с гепаринасвязанным спермадгезином доля жизнеспособных сперматозоидов, сократился с 75% (0,5 часа) до 4% (5 ч), в то время как число жизнеспособных сперматозоидов, выдержанном в физиологическом растворе, уменьшилось с 85% (0,5 часа) до 19% (5 часов). Содержание сперматозоидов в среде со свободным спермадгезином (PSP-I/PSP-II) повышало число жизнеспособных клеток (65% после 5-ти часовой инкубации). Эффект был дозозависимым с максимальным результатом при концентрации 1,5 мг/мл. Авторы считают, что гепаринсвязанный спермадгезин и свободный от гепарина, белковый фрагмент спермадгезина являются антагонистами по влиянию на функциональные характеристики сперматозоидов кабана. Полученные данные делают перспективным практическое применение белкового фрагмента спермадгезина в качестве спермапротектора [51,70].

Остается все меньше сомнений относительно того, что ПГ поверхности сперматозоидов играют решающую роль в качестве противорецепторов для олигосахаридных ветвей гликопротеинов zona pellucida ооцитов. В статье большой группы ученых из Мюнхена [173] приводятся основные структурные характеристики белка AQN-1. Это белок массой всего 12-KD из спермоплазмы хряка. Молекулярный вес AQN-1, определен методом масс-спектрометрии. Аминокислотная последовательность AQN-1 специфична. Но он может быть причислен в группу спермадгезинов, т. к. содержит полипептидные домены, гомологичные с белками спермоплазмы быков, жеребцов, мужчин. Меченный флюоресцеином белок специфически связывается с поверхностью ооцитов. К этой реакции способен свободный AQN-1. После инкубации со сперматозоидами этот белок сорбируется в апикальной зоне и также способен связываться с ооцитами, служа своеобразным спейсером между сперматозоидами и ооцитом.

Гетеродимер спермадгезина в низкой концентрации (0,15 мкг на миллион сперматозоидов) способен сохранить жизнеспособность предварительно замороженных сперматозоидов кабана. Сперматозоиды продолжали быть подвижными на 560 минут дольше чем в контроле, кроме того повышалась доля оплодотворенных яйцеклеток с 16% до 27%. [44]

Гепаринсвязывающий белок бычей спермы, теряет способность связывать гепарин после инкубации с целым рядом гексоз (фукоза, галактоза, манноза, глюкоза). Но при больших концентрациях этого белка, когда происходит самопроизвольная димеризация и тетрамеризация зоны связывания моносахаридов закрываются и присутствие моносахаров не препятствует связыванию гепарина [186,125,126].

Исследования белковых компонентов ПГ семенной плазмы и их участия на разных этапах оплодотворения, проводятся наряду с исследованиями роли углеводных компонентов ПГ, как в составе углевод-белковых комплексов, так и свободных олигосахаридов.

Изучение влияния ГАГ (хондроитинсульфата, гепарансульфата и гиалуроновой кислоты) на повышение эффективности сперматозоидов при искусственном оплодотворении свиней выявило наилучший результат при добавлении в сперму 0,05% хондроитинсульфата [147]. Сульфатирование ГАГ, а именно гепарансульфата входящего в состав ПГ семенной плазмы быка вызывает деконденсацию ядер сперматозоидов в 2,64 раза чаще контроля. Со степенью деконденсации количество сульфогрупп на единицу веса ГАГ коррелирует [163].

На сперматозоидах человека, проведена аналогичная работа. Сопоставлены различные ГАГ (гепарин, О-сульфат гепарина, N- и О-сульфат-гепарина) на способность к деконденсации хроматина [162]. Активность гепарина по деконденсации хроматина не зависила от его молекулярной массы. Она связана с плотностью сульфирования гепарина. *In vivo* сульфатированный аналог гепарина, способен стимулировать апоптоз сперматозоидов.

В другой статье [150] приводятся данные исследования влияния концентрации гепарина на традиционные показатели спермограммы: подвижность, осмотическую устойчивость сперматозоидов, акросомальную реакцию. Показано, что все использованные концентрации гепарина не влияют на скорость движения сперматозоидов и их устойчивость, но высокие концентрации (1мг/100мл) вызывают акросомальную реакцию, стимулируя диссоциацию ингибиторов с поверхности сперматозоидов.

Исследование связывания гепарина на поверхности сперматозоидов с применением [H3]-меченного гепарина показало [123], что на поверхности сперматозоидов инфертильных мужчин сорбируется на 47-49% гепарина меньше чем на сперматозоидах фертильных мужчин. Позднее, [124] эта же группа из Висконсина провела экспериментальное исследование на ооцитах хомяков и доказала, что сперматозоиды человека, связывающие больше гепарина, значительно активнее в процессе пенетрации (коэффициент корреляции $r+0,81$). Дальнейшее сравнение уровня деконденсации хроматина и традиционных параметров спермы (объем, подвижность и число

сперматозоидов) в зависимости от концентрации гепарина не выявило связи. Сорбция гепарина на сперматозоидах, достоверно ($P < 0,001$) коррелирует с числом пенетраций на 1,0 млн. сперматозоидов [48]. Эти данные и результаты собственных исследований [209] положены авторами работы в основу разработки гепарин-глутатионового теста, позволяющего оценивать количество молекул гепарина на единицу поверхности сперматозоида. Для экстракорпорального оплодотворения этот показатель может служить дополнительным условием отбора сперматозоидов

Некоторые ученые придерживаются другой точки зрения. В исследовании известной группы из Швеции [138] приводятся данные об отсутствии связи уровня гепарина на поверхности сперматозоидов и способностью сперматозоидов к оплодотворению. Авторы отрицают способность гепарина подавлять деконденсацию хроматина и влиять на подвижность сперматозоидов. В тестах капацитации и акросомальной реакции изучали влияние гепарансульфата на размороженные бычьи сперматозоиды [165,163] и показали снижение стабильности плазматической мембраны сперматозоидов под действием гепаран-сульфата ($p < 0.001$).

В подобном исследовании гиалуроновая кислота проявила протективный эффект на устойчивость мембран сперматозоидов к гиперосмолярному шоку. При хранении в повышенных концентрациях гиалуроната вдвое увеличивалось время сохранения подвижности сперматозоидов. Оба эти эффекта доза-зависимы [149,151].

В прямом эксперименте по оплодотворению изолированных коровьих ооцитов сперматозоидами быков [179] предварительно замороженных в стандартной среде (контроль) и в среде, содержащей 10,0 мг\мл гиалуроновой кислоты, гиалуроновая кислота показала достоверно ($P \leq 0,0001$) более высокие результаты по количеству оплодотворенных ооцитов.

Yoo YC, et all. [221] изолировали ГАГ из свиного яичка, и исследовали их иммуномодулирующую и антикоагулянтную активность. Методом ионообменной хроматографии было получено две фракции (PT-GAG-1.5 и PT-

GAG-16). Первая фракция (PT-GAG-1.5), значительно увеличивала рост крысиных брюшинных макрофагов. Кроме того, инкубация лимфоцитов с этой фракцией вызывает усиление продукции противовоспалительных цитокинов. Вторая фракция (PT-GAG-16) значительно снижает активность тромбоцитов. Sostaric E. et all [187] изучили аффинные свойства углеводов различных ГАГ эпителиальных. клеток маточных труб и показали, что высшей аффинностью к мембране спермиев обладают маннан и гепаран сульфаты.

Huszar G, et all [100] и доказали функциональную связь гиалуроновой кислоты семенной плазмы и плазматической мембраны сперматозоидов.. Гиалуроновая кислота в эксперименте вызывала реакцию капацитации только зрелых сперматозоидов. В отличие от гиалуроновой кислоты физические и химические факторы одинаково действуют на клетки сперматогенеза и на незрелые сперматозоиды. Исследователи продемонстрировали, что гиалуроновая кислота повышает скорость сперматозоидов и увеличивает сроки сохранения подвижности сперматозоидов.

В развитии вспомогательных репродуктивных технологий: во внутриматочном оплодотворении и в экстракорпоральном оплодотворении применение гиалуроновой кислоты может повысить эффективность. Сохранение подвижности спермы и увеличение доли активноподвижных сперматозоидов повысит процент оплодотворения. Повышенная подвижность облегчит отбор жизнеспособного сперматозоида. Так как гиалуроновая кислота содержится и в женских и мужских половых путях, ее использование не вызовет этических проблем [174]. В заключении отметим, что исследование строения и функции протеогликанов мужской репродуктивной системы, свидетельствует о разнообразной и мало изученной кооперации собственно ПГ, их белковых и углеводных компонентов со сперматозоидами и другими клетками репродуктивной системы. Эти исследования констатировали существование обширной группы белков, участников процесса воспроизводства потомства.. Более детально изучена одно семейство – спермагезины. Существование других протеогликанов лишь упоминается. Практически нет данных об изменении

уровня и спектра ПГ при патологии системы репродукции и об экзогенных факторах, подавления репродукции. Изучение ферментативных реакций и межмолекулярных взаимодействий в ходе регуляции сперматогенеза и оплодотворения необходимо для познания фундаментальных механизмов репродукции, расширения знаний о патогенезе infertility и решения демографических проблем.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментального изучения протеогликанов и гликозаминогликанов семенников и придатков крыс были выбраны наиболее адекватные методы их исследования.

2.1. Материалы.

Объекты нашей работы: эпидидимисы и семенники здоровых белых крыс и крыс, подвергнутых воздействию сероводородсодержащего газа Астраханского газового месторождения.

В эксперименте использовали лабораторных белых крыс (питомник «Пушино» сток SD). Все животные соответствовали биологической норме. Возраст крыс составлял 4,1-5,5 месяцев (половозрелые особи.). Масса тела крыс была 182-214 г.

Хирургическое изъятие яичек и придатков у крыс проводили с использованием обезболивания диэтиловым эфиром (эксперименты проводились в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным).

В таблице 5 представлен перечень использованных в работе экспериментальных животных.

Таблица 5.

Характеристика использованных в работе экспериментальных животных

<i>Наименование</i>	<i>Некоторые характеристики</i>		<i>Количество</i>
Лабораторные белые крысы	Контрольные	всего	157
		а) самки	42
		б) самцы	115
	Опытные	всего	320
		а) самки	46
		б) самцы	274
	Всего животных		435

2.2. Функциональные, морфологические, физико-химические и токсикологические методы исследования

Хроническому воздействию сероводородсодержащего газа животные из опытных групп подвергались в затравочной камере объемом 1,13 м³ (в соответствии с рекомендациями по проведению токсикологических исследований [5,24]).

На опытную группу воздействовали смесью сероводородсодержащего газа и воздуха в камере Курляндского. Концентрация серосодержащего газа в объеме камеры поддерживалась на уровне 10,0-10,3 мкг/м³ (доза 10 мкг/м³ выбрана как близкая к предельно допустимой концентрации по сероводороду) [4]. Концентрация сероводорода в камере определялась с помощью индикаторов фирмы «Auer», каждые 40 минут. Отработанная газо-воздушная смесь удалялась прокачиванием сквозь емкости с 40% раствором NaOH. Воздействию сероводородсодержащего газа животных подвергали ежедневно в течение 123 дней по 240 минут.

Во время эксперимента в камере поддерживался микроклимат: температура 22-25С, влажность 64% (в начале эксперимента) и 72-74% (в конце). Для сохранения требуемой влажности использовался силикагель. Контрольные группы помещались в ту же камеру, но без добавления сероводородсодержащего газа.

Суспензию эпидидимиса исследовали каждые 7 -14 дней в течение 115 дней после начала воздействия - учитывались общее количество, морфологические и кинетические характеристики, жизнеспособность эпидидимальных сперматозоидов. Анализ проводили по общепринятым методикам [7,112]. Определение числа клеток в счетной камере производилось с учетом свойств нормального распределения.

Микроскопические исследования проводили на световом микроскопе «Axioskop» фирмы «Karl Zeiss Jena GmbH». Полученные результаты обрабатывались на ПЭВМ методами статистического анализа.

Определение общего количества и отдельных типов сперматогенных клеток [27] в суспензии гомогенизированного семенника проводили у самцов крыс по методу В. П. Маминой и Д. И. Семенова. [10].

Для повышения дифференцировки сперматогенных клеток, проводили реакцию на гликоген [11].

Подсчитывают 100 клеток, учитывая клетки сперматогенеза, имеющие ШИК-положительные гранулы. Метод позволил оценить степень зрелости сперматозоидов и клеток сперматогенеза, более точно провести их дифференцировку.

Для определения живых сперматозоидов среди неподвижных использовали витальную окраску препарата по Морозову-Блону [11].

Для исследования морфологии эпидидимальных сперматозоидов использовали окраску по методу Монхе-Морголиной в модификации Кунина [11].

Применение ядерного и цитоплазматического красителей позволяло хорошо изучить морфологию сперматозоидов. Подсчитывали 200 клеток, количество патологических форм сперматозоидов выражали в процентах к общему количеству сосчитанных сперматозоидов.

Для оценки резистентности мембран эпидидимальных сперматозоидов использовали метод Милованова, основанный на снижении доли подвижных сперматозоидов по мере увеличения осмотического давления среды [11].

2.3. Методы выделения и фракционирования протеогликанов

2.3.1. Экстракция и осаждение из раствора [155,189,213]

Замороженный кусок яичка и эпидидимиса (120 - 900 мг) растирали до гомогенного состояния. Прибавляли буфер (Трис-НСl, рН 8,1). Смесь приливали по 1,5-2,0 мл в жидкий азот. Ледяной порошок тщательно растирали. Переносили массу в стеклянную посуду и к нему добавляли 29,5% N-лаурилсаркозин для солубилизации клеточных мембран, из расчета 12 мкл 29,5% N-лаурилсаркозина на 120 мг ткани. Экспонировали 75 мин при температуре 37⁰С. Затем полученную смесь разливали в пробирки и добавляли

фенол. После центрифугирования получалось 3 фракции: верхняя, средняя (интерфаза), нижняя - фенольная. Собирали водную фазу, содержащую нуклеиновые кислоты, протеогликаны и нейтральные сахара. Повторяли депротеинизацию. Затем осаждали нуклеиновые кислоты концентрированной хлорной кислотой. Выдерживали на ледяной бане 45,0 мин. Осадок отделяли, а надосадок, в котором содержались протеогликаны, подвергали диализу с помощью диализатора PF-110L против 55 мМ ацетата натрия. Протеогликаны осаждали обезвоженным этиловым спиртом и оставляли на ночь при температуре -24°C. После центрифугирования осадок еще раз промывали этанолом. Затем спирт удаляют, осадок высушивают и хранят в морозильной камере. Для исследования осадок солибилизируют в буфере (рН 8,1). Это готовый рабочий раствор протеогликанов. [155,189,213]

2.3.2. Определение фракционного состава гликозаминогликанов в органах.

1 грамм гомогената ткани подвергали гидролизу в 15 мл 10% NaOH на водяной бане при t° 65 C в течение 65 мин, после чего раствор нейтрализовали 31% HCl до рН 7,0 и отфильтровывали. Обессоливание образца проводили в миллипоровской ячейке Stirred Cell Model 8010[2].

Подготовленный образец для разделения на основные классы ГАГ: несulfатированные (гиалуроновая кислота) и sulfатированные (хондроитинсульфаты и гепарансульфаты) разделяли методом анионообменной хроматографии на DEAE-тойоперл. Образец наносили на колонку DEAE-тойоперл, уравновешенную трис-HCl буфером рН=7,1 объемом 200 мл. Фракции элюировали ступенчатым градиентом хлорида натрия от 0 до 1,2М. Шаг ступени 0,2М. Выход фракций регистрировали по $A=220\text{nm}$. 0,3 М фракция содержала Несulfатированные гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота) выходила с колонки при 0,2М хлорида натрия, а sulfатированные ГАГ выходили при 0,6М, 1,0М и 1,4 М концентрации хлорида натрия .

Фракции, содержащие несulfатированные и sulfатированные гликозаминогликаны собирали и упаривали. Осадок растворяли в воде, и

определяли ГАГ по содержанию уроновых кислот (реакция Дише)[66]. Концентрацию ГАГ (мкг/г ткани) находили по калибровочному графику, построенному по растворам глюконовой кислоты в растворе хлорида натрия.

2.3.3. Определение аminosахаров.

Определение аminosахаров проводили по методу Exley [89]. В исследуемый образец (2,0мл), вносят 2,0 мл 3% раствора ацетилацетона в 1,5 н. растворе карбоната натрия. Ацетилирование осуществляется 30 минут на кипящей водяной бане. Далее вносят этанол, реактива Эрлиха (2,5 г парадиметиламинобензальдегида в смеси с 30 мл концентрированной соляной кислоты и 30 мл этанола 96%) и через 30 минут фотометрируют при $A_{\lambda=530}$ нм.

2.3.4. Определение нейтральных Сахаров.

Нейтральные сахара (моносахариды в составе белково-полисахаридных комплексов) во фракциях определялись антроновым методом по Тревелиан и Харрисон [57]. В исследуемый образец вносят антроновый реактив (20 мг антрона на 100 мл 80% серной кислоты) и нагревают и фотометрировали при $A_{\lambda=630}$ нм. Концентрацию нейтральных Сахаров определяли по калибровочному графику, построенному с использованием смеси растворов галактозы и глюкозы.

2.3.5. Обнаружение ПГ с помощью красителей и цветных реакций

Методы обнаружения ПГ основаны на взаимодействии полианионных цепей ГАГ в составе ПГ с основными красителями или на взаимодействии продуктов кислотного гидролиза цепей ГАГ ПГ с различными реактивами. В обоих случаях меняется оптическая плотность растворов, которую можно измерить спектрофотометрически.

Применяются следующие органические красители, взаимодействующие с углеводными цепями ПГ: 1,9-диметилметиленовый синий (ДМС), альциановый синий, толуидиновый синий.

Краситель ДМС специфически связывается с сульфатированными полианионами с образованием комплекса, поглощающего свет при длине волны

525 нм [74]. Измерение интенсивности окраски проводят в течение 1 мин, чтобы не допустить агрегации ПГ и ДМС, которая приводит к уменьшению поглощения. Чувствительность анализа ГАГ с помощью этого красителя составляет 1-2 мкг ГАГ в образце[74].

Альциановый синий применяют для окрашивания электрофореграмм и тканевых срезов.. Чувствительность окраски этим красителем ГАГ в гелях составляет 5-10 мкг ГАГ[36].

- Метод Дише основан на способности давать синее окрашивание при нагревании с карбазолом в присутствии сильных кислот; [66]. Модификация метода Дише, разработанная Bitter, Muir[35] позволяет проводить специфическое определение уроновых кислот, входящих в состав ГАГ, при этом нейтральные сахара не вступают в цветную реакцию. Чувствительность данного метода составляет 4-40 мкг/мл уроновой кислоты. Для определения уроновых кислот, входящих в состав ГАГ, с помощью орцинола используют метод Брауна[40] .

2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), является одной из разновидностей зонального электрофореза и представляет собой метод анализа многокомпонентных систем макромолекул, выделения отдельных компонентов и анализа чистоты выделенных препаратов, с применением специальной поддерживающей среды.

Аналитический электрофорез белков в ПААГ проводили в приборе «omniPAGE mini.

Для проведения электрофоретического разделения использовали трис-глициновый буферный раствор (трис - 6,0 г, глицин - 28,8 г, дистиллированная вода - 1000 мл), рН - 8,9. Электрофорез проводили при силе тока 10-15 мА на 1 см² в течение 1,5-2 часов. По окончании опыта гель извлекали из камеры, окрашивали кумасси голубым, приготовленным на 10% уксусной кислоте (1-2 часа), отмывали от красителя и фотографировали[15].

2.5.Хроматографические методы.

Хроматография — наиболее эффективный метод выделения и очистки ПГ. Использование комбинации из 2-3 видов хроматографии позволяет не только очистить ПГ, разделить их на классы, но и получить индивидуальные ПГ с высокой степенью чистоты [219,216,207,127, 92].

2.5.1.Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация)

Метод фракционирования веществ по размеру молекулполучил название гель-проникающей хроматографии или гель-фильтрации. Мы использовали этот метод для препаративных целей на одном из этапов очистки протеогликанов и коровых белков и для аналитических задач -сравнение спектров протеогликанов в контрольной и опытной группах, а также для расчета молекулярной массы белков. Для очистки изучаемых белков методом гель-фильтрации использовали сефадекс G-200 («Pharmacia», Швеция) категории «Fine», а также Тоуоперл (Тоуо-Soda, Япония).

Мы использовали колонки размером 2x90см.3,5x100 см и другие заполненные сефадексом G-200, G-110,G-50 и аналогичными гелями Тоуоперл. Внешний объем колонок определяли с помощью декстрана голубого (M.V.=200000), который использовали для калибровки колонок. Для элюции использовали различные буферные системы фосфатную(pH=7,4), три-солянокислую (pH=7,0), борно-боратную (pH=9,4) и другие в зависимости от конкретных целей. Фракции собирали на коллекторе Мультирак 2111(LKB, швеция). Белки определяли во фракциях проточным спектрофотометром при A=280нм, углеводы при A=220нм.

При определении молекулярной массы через колонки пропускали смеси белков с известной молекулярной массой и по объемам их выхода строили калибровочную кривую[15].

2.5.2.Ионообменная хроматография

В основе разделения макромолекул методом ионообменной хроматографии лежит тот факт, что они содержат группы способные к

ионизации. Эти группы обуславливают суммарный положительный или отрицательный заряд молекулы. Величина заряда зависит от pH среды.

Разделение макромолекул с помощью ионообменной хроматографии проводят на колонках заполненных специальными дериватами сефадекса и тойоперла. Существует два типа ионообменников : катионообменники (СМ-сефадекс и СМ-тойоперл) и анионообменники (ДЕАЕ-сефадекс и ДЕАЕ-тойоперл). Катионообменники содержат отрицательно заряженные группы и притягивают положительно заряженные молекулы. Анионообменники содержат положительно заряженные группы и притягивают отрицательно заряженные молекулы. В сочетании с другими методами фракционирования ионообменная хроматография используется для выделения и очистки макромолекул. Конкретные условия разделения (состав буфера, pH, ионная сила, характер элюции) подбирались нами в ходе предварительных экспериментов и зависели от свойств конкретного исследуемого вещества. Сбор фракций осуществлялся на коллекторе Мультирак 2111(LKB, Швеция). Белки определяли во фракциях проточным спектрофотометром при $\lambda=280\text{nm}$, углеводы при $\lambda=220\text{nm}$. Ступенчатый градиент концентрации хлорида натрия позволяет разделить протеогликаны на классы, например, на хондроитин/дерматансульфат и гепарансульфат-протеогликан, которые элюируются раздельно в 2 соседних пиках [15,92].

Мы также использовали высокоэффективную жидкостную ионообменную хроматографию для анализа ПГ [72].

Хроматографический анализ полученной смеси моносахаридов провели методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на комплексе Gilson-analyzer. Была собрана система для совместного разделения аминсахаров и нейтральных сахаров из двух колонок. Использовали ионообменную хроматографию на анионообменнике Spherisorb SAX в градиенте от 0,05M до 1,0 M боратного буфера pH=9,2 для разделения аминсахаров (предколонка 25x0,4см) и колонка для нейтральных сахаров 16x0,4см с неподвижной фазой

DA-X-8-8-8, скорость 0,24мл/мин, объем пробы 2,0 мкл. Идентификацию проводили в автоматическом режиме при 420 нм орсин-кислотным методом.

2.6. Анализ углеводного состава протеогликанов

Перед исследованием осуществляли гидролиз ПГ с помощью ферментов хондроитиназы ABC, специфически расщепляющей хондроитин/дерматансульфаты, и гепариназы III, специфически расщепляющей гепарансульфаты.

Фракции, содержащие ПГ, оптимизировали для действия ферментов ТРИС-солянокислым буфером, рН 7.5.. Каждый образец делили на 3 части: первая - без фермента. Вторая-0.4 ед/мл гепариназы III (25 °С). Третья -0.5 ед/мл хондроитиназы ABC (37 °С).

Ферментация продолжалась 6 часов.

«Содержание ГАГ определяли по разнице оптической плотности образца ПГ, не содержащего ферменты, и образца, обработанного каждым из ферментов в отдельности в соответствии с формулой:

$$\text{ГАГ (\%)} = \frac{A^0_{525} - A^1_{525}}{A^0_{525}},$$

A^0_{525} - оптическая плотность исходного образца без фермента,

A^1_{525} - оптическая плотность образца после обработки одним из ферментов.»

[22]

2.6.1. Анализ гликозаминогликанов с алциановым голубым

Содержание ГАГ в препаратах определяли на ацетатцеллюлозных пластиках. На пластину вносили пробы (по 2 мкл), экспонировали 30 мин. и окрашивали 0.2% алциановым голубым. После окрашивания полоски промывали раствором, содержащим 30 мМ хлорида магния, 0.1% уксусной кислоты и 10% этанола, и высушивали. Окрашенные пятна гликозаминогликанов и неокрашенные участки пленки такого же размера (для контроля) вырезали и помещали в пробирки. В каждую пробирку добавляли по 2 мл

диметилсульфоксида на 30 мин. при 37°C. Измеряли оптическое поглощение при 677 нм против экстрагирующего раствора. Содержание ГАГ определяли по калибровочной кривой, построенной при измерении $A=677\text{нм}$ растворов смешанных ГАГ. [94]

2.6.2. Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных сахаров

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) триметилсилиловых эфиров (ТМС) углеводов - хорошо известный метод, в течение ряда лет используемый для анализа сложных смесей сахаров, например, гидролизаты полисахаридов. Свободные гидроксильные группы сахаров должны быть защищены перед проведением газожидкостной хроматографии и триметилсилирование является для этого протокольной процедурой. В настоящее время силилирующим агентом служит N-(триметилсилил)-имидазол.

Подготовка гидролизатов к анализу.

После гидролиза ГАГ семенников и придатков крыс ферментным комплексом отфильтровывают от нерастворенных примесей и определяют массовую долю редуцирующих веществ.

Синтез ТМС-производных моносахаридов

В колбу вносят пробу нейтрализованного гидролизата, содержащего около 20 мкг смеси сахаров и выпаривают раствор при температуре 40–42°C. Для удаления следов воды к упаренной пробе добавляют спирто-толуольной смеси (4:1), которую также удаляют упариванием. Сухой остаток растворяют в безводном пиридине, добавляют гексаметилдисилазан (Sigma) и триметилхлорсилан (Sigma) в соотношениях указанных производителем. Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 10-20 мин. Затем смесь вновь упаривают. Осадок растворяют в 2,0мл н-гексана и хранят в герметичной уаковке.

Хроматографическое разделение ТМС-производных.

Фракционирование производили на хроматографе Кристалл 5000.2. [6]. Исследования проводили при следующих условиях. Колонка из плавленного

кварца (размер 25м.х0,32см). жидкая фаза CPSil5 (производитель Chrompac), детекция осуществлялась плазменно-ионизационным детектором, при скорости потока азота 0,7 мл/мин. Температура ввода 22⁰С. градиент температуры от 135⁰С до 215⁰С, 1⁰С/мин [154].

2.7. Иммунохимические методы исследования

2.7.1. способы иммунизации животных.

Нами применено несколько схем иммунизации

1. кроликов иммунизировали многократными внутримышечными инъекциями в возрастающих дозах с интервалом в 3-4 дня. При этом антиген вводили в разные участки тела животного. Через 8 дней после последней инъекции, получали сыворотку и определяли наличие антител.

2-й способ основан на иммунизации кроликов антигеном с адьювантом Фрейнда для достижения в крови животных необходимого уровня антител к ПГ

3 При иммунизации кур антиген вводили под кожу крыла трехкратно с двухнедельными интервалами. Однократная доза иммуногена составила 1000 мкг (по белку) на животное. Через десять дней после последней инъекции проводили определение титров антител к ПГ.

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

2.5.2. Иммунодиффузия в агаровом геле.

Основа метода в образовании видимой линии преципитации между антигеном и антителами, диффундирующими один навстречу другому в пласте агарового геля. Мы использовали этот метод в модификации [12], т. е. со стандартной тест-системой. Для сравнения двух стандартных тест-систем применяли штампы «четверка» и «семерка».

2.5.3. Иммуноэлектрофорез в агаровом геле.

Принцип метода основан на комбинации электрофоретического разделения белков с иммунопреципитацией в геле. Особенность метода заключается в его большой разрешающей способности при определении

многочисленных макромолекул их подвижности, а также определения их химической природы, применением специальных методов окраски линий преципитации на белок, липо- и гликопротеиды, ферменты[7].

Иммуноэлектрофорез проводится в 1% агаровом геле на веронал-мединаловом буфера рН-8,6 с ионной силой 0,06 и при напряжении тока 155-210 В, в силе тока 44-51 мА. Длительность процедуры разделения равняется 92-126 минут после чего в траншеи параллельно оси миграции АГ заливают сыворотки, содержащие антитела. Пластинки выдерживают во влажной камере при комнатной температуре в течение 25-49 часов до появления дуг преципитации. Иммунофореграммы отмывают, сушат и окрашивают.

2.5.4. Иммуноферментный анализ

Суть иммуноферментного анализа заключается в использовании антител, ковалентно связанных с ферментом, способным вести легко обнаруживаемую реакцию, например, пероксидаза или щелочная фосфатаза. В настоящее время применяется твердофазный иммуноферментный анализ, когда на нерастворимый носитель сорбируется белок (антиген или антитело) и далее все иммунохимические взаимодействия происходят на этом носителе [121].

В качестве твердой фазы мы применяли микротитровальные 96-луночные планшеты (Linbro, Великобритания). В лунки вносят 200 мкл специфических антител (2-5 мкг), экспонируют в течении 16-20 часов. Затем отмывают, используя забуференный физраствор Рн=7,4, содержащий 0,05% twin-20. После промывки в лунки вносят по 200 мкл последовательных разведений стандартного антигена, обычно содержащего от 0.1 до 200мг\мл белка, исследуемые образцы и отмывающий раствор (контроль). После инкубации и промывки вносят 200 мкл антител к исследуемому антигену, ковалентно связанных с ферментом (конъюгат) в разведении, которое устанавливается экспериментально. После повторной инкубации и промывки проводят ферментативную реакцию и спектрофотометрию Калибровочную кривую строят в каждом опыте. конкретные условия проведения иммуноферментного

анализа на исследуемые антигены приведены в разделе «результаты исследований»

Конъюгацию антител ферментом проводили периодатным окислением. 5 мг пероксидазы-6 (Sigma) растворяли в 1 мл дистиллированной воды и прибавляли 2,0 мл свежеприготовленного 0,1М раствора периодата натрия. Смесь перемешивали в течении 30-40 минут при комнатной температуре. альдегидный раствор пероксидазы диализовали против 10 мМкарбонатного буфера рН=9,5 и добавляют 10 мг специфических антител, растворенных в том же буфере. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течении 4-5 часов и добавляют 0,1 мл 0,4 % раствора боргидрида натрия и оставляют на 20 часов при комнатной температуре. К конъюгату добавляют для стабилизации БСА до 0,5%, глицерин до 40 % и хранят при -35⁰С.

2.6. Методы структурного анализа белковых молекул.

Важнейшей задачей биохимии является выяснение структурно-функциональных связей биологически активных молекул. Наиболее сложна эта задача для белков. Изучение физико-химических свойств белка, разработка метода очистки являются по сути этапами на пути к структурному анализу белка, к определению аминокислотной последовательности существуют наиболее рациональные схемы определения первичной структуры белка [13]. Сначала определяют аминокислотный состав белка, N и C-концевые аминокислоты. На следующем этапе получают ферментативным или химическим путем пептидные фрагменты белка (расщепление трипсином или бромцианом) и проводят очистку этих фрагментов. Далее последовательность аминокислот определяют во фрагментах и рассчитывают всю структуру белка путем сопоставления перекрывающихся пептидов.

2.6.1. Аминокислотный анализ.

Аминокислотный состав определяли с помощью аминокислотного анализатора Biotronic (Германия) использовали двухколоночный вариант анализа.

В

двухколоночном варианте по длинной колонке (0,5x22 см) разделяли кислые и нейтральные аминокислоты, а на короткой (0,4x10 см) основные аминокислоты при этом использовали три натрий-цитратных буфера, рекомендованных производителем прибора. Хроматография проводилась по инструкции производителя, без особенностей. Гидролизат белка получали следующим образом. Предварительно обессоленный и лиофилизированный препарат белка в количестве от 1 до 50 наномолей помещали в ампулы, добавляли 250-400 мкл 5,7Н соляной кислоты. Ампулы вакуумировали, запаивали и выдерживали в сушильном шкафу при 110°C в течение 48 часов. После гидролиза ампулы вскрывали и высушивали над КОН в вакуумном эксикаторе при 80°C. Освобожденный от кислоты гидролизат, растворяют в стартовом растворе (0,2М хлористый натрий в 0,01н. соляной кислоты).

В использованной нами буферной системе глюкозамин углеводной части выходил самостоятельным пиком между лейцином и тирозином. Аминокислотный состав рассчитывали, вычисляя молярную долю каждой кислоты.

2.6.2. определение концевых аминокислот.

Метод основан на реакции альфа аминокислоты N-концевой аминокислоты диметиламинонафталинсульфонил хлорид (DNS-Cl). Модифицированный таким образом пептид гидролизуют соляной кислотой и образующиеся, флюоресцирующие в УФ-свете производное дансиламинокислоты определяют с помощью тонкослойной двумерной хроматографии на пластинах с полиамидным слоем [13,21,217]. 10-20 мкг белка растворяли в 20 мкл 0,1М раствора бикарбоната натрия и добавляли 20 мкл дансилхлоридного реактива (1 мг дансилхлорида в 1 мл ацетона). Пробирки герметизируют и оставляют при комнатной температуре в темноте. Через 4 часа пробы высушивали в вакуумном эксикаторе, добавляли 5,7н соляную кислоту и проводили гидролиз при 110°C в течение 10-16 часов. По истечении срока гидролиза, пробирки вскрывали, содержимое упаривали, растворяли в ацетоне и наносили точечным пятном в угол полиамидной пластины (Gallard-Schlesinger, USA) размером 4x4

см. В результате кислотного гидролиза дансированных белковых проб образуются ДНС-производные альфа-аминогрупп аминокислот, эпсилон ДНС-лизин и о=ДНС=тирозин. За счет избытка реактива в качестве побочного продукта образуются интенсивно флюоресцирующая ДНС-сульфо кислота, а в случае присутствия в препарате аммиака, образуется его производное ДНС-NH₂, которое не мешает идентификации аминокислот. Восходящую хроматографию проводили последовательно в трех системах растворителей, рекомендованных производителем пластин. По окончании хроматографии пластины высушивали, рассматривали под УФ-лампой регистрировали результаты.

2.7. Методы статистического анализа.

Количественные данные обрабатывали традиционными методами Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic», включая вычисление критерия t Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде $M \pm m$, достоверные различия обсуждались при $t < 0,001$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. ВЛИЯНИЕ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИРОДНЫМ ГАЗОМ

Воздействие токсичных компонентов окружающей среды в Астраханской области в первую очередь связано с влиянием сероводородсодержащего газа Астраханского газоконденсатного месторождения. При изучении действия токсического агента принято оценивать его канцерогенные свойства, мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенные эффекты и ряд других [14,17,19.]. Исследованию влияния поллютанта на морфо-функциональное состояние репродуктивной системы, на процесс сперматогенеза, на формирование оплодотворяющей способности эякулята экспериментальных животных не уделяется внимания [57]. При нарушении системы размножения самцов, их бесплодии, все прочие исследования могут потерять свою актуальность из-за отсутствия потомства. И в настоящее время мужское бесплодие приобретает все большие масштабы [11,13]. На первом этапе исследования нами даны морфо-функциональные характеристики семенников и эпидидимисов крыс и фертильности крыс в норме и после влияния малых доз серусодержащего газа АГКМ.

Лабораторные белые крысы (см.Материалы) разделены на две группы: контрольную (К) и опытную (О).

В группу-К вошло 92 животных (44 самки и 48 самцов).

В группу-О вошло 126 животных (49 самок и 77самцов).

Группа-О в течение 58 дней по 240 минут ежедневно подвергались влиянию природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения 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 природным газом 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 снизилось по сравнению с группой-1 и составила в среднем $66,8 \pm 4,77$ %.

Таблица 6 Показатели функции воспроизводства потомства крыс после хронического воздействия природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения

Показатели воспроизводства	Группы экспериментальных животных			
	Группа-1 (самки n=22, самцы n=12)	Группа-2 (самки n=24, самцы n=12)	Группа-3 (самки n=22, самцы n=12)	Группа-4 (самки n=25, самцы n=12)
Среднее число плодов	$8,7 \pm 0,91$	$7,75 \pm 0,82$	$4,16 \pm 0,38$	0
Мёртворожденные, %	$2,5 \pm 0,4$	$14,9 \pm 1,3$	$29,6 \pm 0,97$	0
Выжившие, %	$76,5 \pm 4,2$	$67,0 \pm 4,75$	$35,3 \pm 1,2$	0

Примечание: – значения в таблице 3 и во всех последующих таблицах имеют достоверные различия ($p \leq 0,05$).

В группе-3 снижение плодовитости усугубляется. Среднее число плодов снижается в 2 раза (до $4,16 \pm 0,38$) по сравнению с группой-1 ($8,7 \pm 0,91$), доля мертворожденных возросла в 10 раз (до $29,4 \pm 0,97$ %) по отношению к группе-1 и почти в 2 раза по отношению к группе-2. Доля выживших в течение первой декады после родов снизилось в 2 раза (до $36,3 \pm 1,3$ %) по сравнению с группой-

1, то есть число умерших в первые дни в группе-3 составило 68% от всего живого потомства.

В группе-4 беременностей не было, но сексуальное поведение животных сохранено (таблица 6). Результаты показывают, что больше пострадала репродуктивная функция самцов (группа-3) чем с репродуктивная функция самок (группа-2). Полученные нами данные свидетельствуют о неблагоприятном воздействии хронического вдыхания природного газа на функциональное состояние репродуктивной системы крыс, что иллюстрируется ухудшением показателей воспроизводства в группах-2, и 3 по сравнению с группой-1 и бесплодием в группе-4.

Цитологический анализ животных контрольной группы показал, что общее количество сперматогенных клеток в семеннике составляет в среднем $5332 \pm 510,0$ млн. Для сперматогенных клеток характерно устойчивое процентное распределение: сперматогонии составляют в среднем $22,6 \pm 2,1$ %, сперматоциты – $20,6 \pm 2,2$ %, сперматиды – $21,7 \pm 2,4$ %, сперматозоиды – $35,1 \pm 2,9$ %.

В контрольной группе эпидидимальные сперматозоиды характеризовались следующими показателями: общее число сперматозоидов $1438 \pm 161,0$ млн., морфологически дефективных сперматозоидов $1,2 \pm 0,3$ %, подвижных сперматозоидов $87,7 \pm 6,2$ %, мертвых сперматозоидов $4,96 \pm 0,89$ %. Средняя резистентность к хлориду натрия эпидидимальных сперматозоидов составила 4000 ед. Эти данные соответствуют литературным данным для крыс[29].

Состояние сперматогенеза у крыс на 7 день после начала воздействия природного газа. Стабильное содержание сперматогоний (21 %), оставались близкими к норме доли сперматоцитов (19 %) и сперматид (20 %), но на 5 % повысилось относительное содержание сперматозоидов (40 %). Общее число сперматогенных клеток практически не изменилось ($5406,0 \pm 488,0$).

На 21 день после начала воздействия природного газа, достоверно снижается общее число сперматогенных клеток ($3341,1 \pm 355,0$) и начинает

меняться профиль сперматогенных клеток. До 18,5% снижается относительное содержание сперматогоний. Доли сперматоцитов (14,0 %) и сперматид (19,0 %) снизились по отношению к норме. Доля сперматозоидов еще более возросла (47,1 %).

На 35 день число сперматогенных клеток снижается еще больше - до $1890,1 \pm 290,5$ млн клеток. На 35 день после начала затравки отмечен рост дискордантности соотношения сперматогенных клеток. Содержание сперматогоний (14,2 %) и сперматозоидов (21,1 %) снижено, преобладают сперматоциты и сперматиды, их суммарное содержание составляло 64,7 %

Таблица 7. Динамика изменений общего количества сперматогенных клеток семенника под воздействием природного газа

	контроль	Дни после начала затравки				
		7 день	21 день	35 день	56 день	21 день после окончания
Общее число сперматогенных клеток млн кл.	5236 ± 470	5406 ± 488	3340 ± 355	1890 ± 90	700 ± 220	5600 ± 510
сперматогонии%	$22,5 \pm 2,3$	$21 \pm 2,3$	18,5 $\pm 1,2$	$15 \pm 1,1$	13,5 $\pm 1,7$	$22,1 \pm 1,3$
сперматоциты%	$20,7 \pm 2,1$	19 $\pm 2,7$	14 $\pm 2,0$	$28,3 \pm 0,7$	22,9 $\pm 2,7$	$21,0 \pm 2,7$
Сперматиды%	$21,6 \pm 2,3$	$20,1 \pm 2,3$	$19 \pm 1,5$	$36,7 \pm 2,2$	42,6 $\pm 1,3$	$20,1 \pm 2,3$
Сперматозоиды %	$35,2 \pm 2,7$	$39,0 \pm 2,3$	$47 \pm 2,5$	$23,5 \pm 3,0$	21,3 $\pm 2,4$	$37,7 \pm 2,7$

На 56 день резко падает общее число сперматогенных клеток: более чем в 7 раз (до $701,6 \pm 194,1$ млн клеток) по сравнению с контрольной группой ($5332 \pm 510,0$ млн клеток). С 28 дня профиль сперматогенных клеток не меняется.

Как видно из таблицы 7 эти серьезные изменения носят обратимый характер и через 3 недели отмечается восстановление и даже реактивное увеличение общей численности сперматогенных клеток до $5600,8 \pm 508,9$ млн клеток при возвращении ановлении профиля сперматогенных клеток к норме.

На 56 день после начала затравки зарегистрировано падение общего числа эпидидимальных сперматозоидов более чем в 1,6 раза (до $854,1 \pm 76,8$ млн клеток) по сравнению с контролем ($1514,7 \pm 144,1$ млн клеток). Восстановление общего количества эпидидимальных сперматозоидов протекало быстро и окончилось к 15 дню после завершения воздействия сероводородсодержащего газа.

При анализе эпидидимальных сперматозоидов (табл.8) обнаружены серьёзные морфо-функциональные нарушения: рост доли дефектных сперматозоидов (преимущественно головки с обломанными хвостами), низкая подвижность, рост доли мертвых сперматозоидов.

Так, на 56 день после начала затравки отмечался рост доли сперматозоидов с морфологическими дефектами в 41 раз (до $48,5 \pm 2,7$ %) по отношению к контролю ($1,09 \pm 0,19$ %), подвижные сперматозоиды практически полностью исчезли ($0,36 \pm 0,09$ %) по отношению к контролю ($87,0 \pm 5,3$ %). Также почти в 12,4 раз увеличивалась доля мертвых сперматозоидов (до $55,2 \pm 4,4$ %) по отношению к контролю ($4,8 \pm 0,82$ %). Восстановление этих показателей происходило с разной скоростью.

Таблица 8 .Состояние эпидидимальных сперматозоидов у крыс в норме и после воздействия сероводородсодержащего газа.

Показатели состояния эпидидимальных сперматозоидов	Время прошедшее после начала затравки				
	Контр оль (n=15)	7 дней (n=9)	28 дней (n=9)	56 дней (n=11)	14 дней после окончани я (n=4)
Общее количество сперматозоидов, $\times 10^6$	1425 ± 155	1430 ± 210	1396 ± 188	866 ± 8 2	1465 ± 125
Дефективные сперматозоиды, %	1,1 $\pm 0,2$	3,9 $\pm 0,$ 7	5,2 $\pm 0,$ 8	44,4 $\pm 3,8$	1,1 $\pm 0,4$
Подвижные сперматозоиды, %	88,0 $\pm 6,2$	76,8 $\pm 8,4$	48,3 $\pm 5,1$	0,35 $\pm 0,1$	89,0 $\pm 11,2$
Мертвые сперматозоиды, %	4,8 $\pm 0,82$	5,5 $\pm 0,$ 9	6,2 $\pm 1,$ 2	55,2 $\pm 4,4$	3,8 $\pm 2,1$

3.2. СПЕКТР ПРОТЕОГЛИКАНОВ И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ЭПИДИДИМИСОВ И СЕМЕННИКОВ КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНОГО ГАЗА АСТРАХАНСКОГО ГАЗОКОНДЕНСАТНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ.

Дискриптивный биохимический анализ тканей придатков, яичка крыс, в норме и под воздействием отрицательного экологического фактора - природного газа Астраханского газового месторождения создаст условия для выяснения нарушений обмена веществ в репродуктивных органах. Это исследование поможет определить направления нарушения развития организма под влиянием неблагоприятных экологических факторов.

Изучение строения и состава ПГ эпидидимисов и семенников крыс, находящихся в условиях хронического воздействия серусодержащего газа представляется важной частью этой задачи. Экспериментальные данные позволят прояснить причины постоянного увеличения числа случаев идиопатического бесплодия в Астраханском регионе.

Мы изучили эпидидимисы и семенники здоровых белых крыс и крыс, подвергавшихся воздействию сероводородсодержащего газа Астраханского газоконденсатного месторождения. Опытная группа подвергалась воздействию смеси сероводородсодержащего газа Астраханского газового месторождения и воздуха в камере Курляндского (см. материалы и методы).

Для выделения протеогликанов использовали способ подробно описанный в разделе материалы и методы. На начальной стадии анализа измеряли общий белок в полученных образцах ПГ. Содержание белка в образцах ПГ эпидидимисов и семенников крыс контроля в среднем $20,1 \pm 0,64$ мкг/мг ткани. В ходе действия серусодержащего газа Астраханского газового комплекса виден тренд небольшого, но статистически значимого падения среднего содержания белка в образцах ПГ эпидидимисов и семенников крыс. Сначала (21-30-день), уровень белка не отличается от нормы - $20,4 \pm 0,75$ мкг/мг ткани, но на 56 день достоверно ниже нормы $17,7 \pm 0,88$ мкг/мг ($P \leq 0,005$). В конце срока затравки (110-114 день) доля белка снижается еще больше ($17,4 \pm 0,85$ мкг/мг

ткани). Снижение белка в изученных образцах ПГ, идет активнее всего на втором месяце затравки, что соответствует срокам синтеза ПГ в тканях крыс [167,189].

Методом электрофореза на ацетат-целлюлезных пластинах получено 9 фракций протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы (Рис.2). В опытной группе наблюдается изменение спектра ПГ. Сначала (21-30 день), появляется нехарактерная для контроля фракция 1, несущая максимальный положительный заряд. В конце срока воздействия токсиканта (110-114 день) фракции ПГ от 3-й до 8-й сливаются в единую фракцию с чуть заметным разделением на 3 крупные зоны. Резкое изменение электрофоретической картины, можно объяснить во-первых, увеличением гетерогенности внутри основных фракций протеогликанов, а во-вторых, индивидуальными различиями реакции отдельных животных на токсическое воздействие.

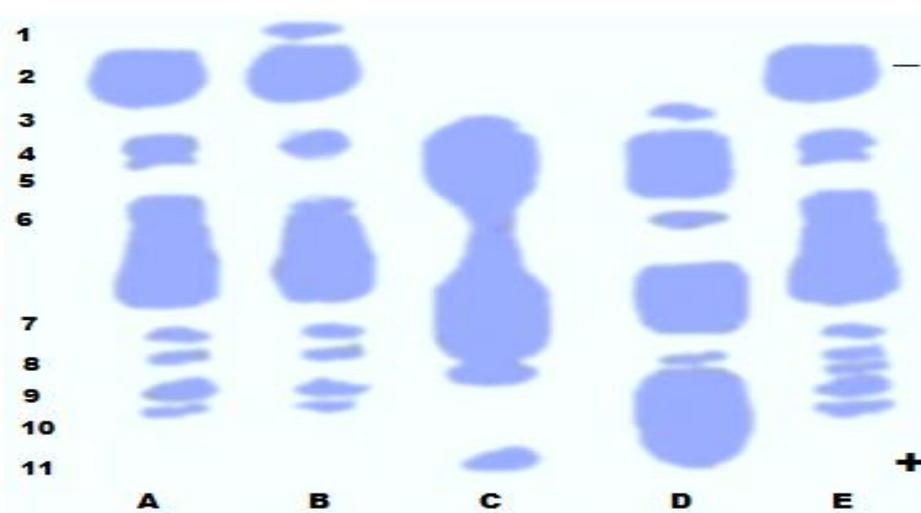


Рис 2. Электрофорез ПГ эпидидимисов и семенников крыс. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 - номера фракций. А - контроль, В - 28 день затравки, С- 56 день затравки, D - 114 день затравки, E - 28 день после окончания затравки.

Характерным признаком электрофоретического спектра протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс, опытной группы служит увеличение общего количества ПГ и снижение числа фракций. Появление фракции 1 с высоким положительным зарядом является транзиторным показателем первого месяца затравки. Анализ электрофоретической подвижности (табл.9.)

показывает - вопреки ожиданиям увеличения числа отрицательно заряженных фракций не наблюдается.

В опытной группе ближайшая к аноду фракция имеет $R_f = 0,94 \pm 0,01$, а наиболее отрицательно заряженная фракция протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс на 114 день затравки $0,92 \pm 0,01$. Однако объем катодных фракций даже при визуальной оценке значительно больше. При анализе электрофореграмм денситометрией это наблюдение получает количественное подтверждение. Денситометрию проводили после сканирования электрофореграмм путем конвертации полученного материала в цифровой формат на с последующей математической обработкой данных, используя специализированную компьютерную программу «ПН5108».

На денситограмме проводили нулевую линию, исходя из самой низкой точки между зубцами кривой и вычисляли площадь ограниченную отдельными кривыми .

Площадь отдельных пиков электрофореграммы рассчитывали, по Тодорову[18]: $F = 1,064 \cdot h \cdot a$,

где, F- площадь, выражаемая в условных единицах; h- высота; a- ширина, измеренная на уровне половины высоты. Далее площади всех пиков суммировали и принимали за 100%, а объем каждой фракции оценивали как отношение площади конкретной фракции к сумме площадей всех фракций данной электрофореграммы.(табл. 10.)

Результаты денситометрии свидетельствуют, что в норме распределение массы протеогликанов по фракциям достаточно однородно и, например, масса протеогликанов с электрофоретической подвижностью выше 0,5 (фракции 5-9) составляет 58,0% от общей массы фракций. Фракционное распределение протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс подвергшихся воздействию сероводородсодержащего газа АГМК показывает, что основная масса (72,75%) ПГ сосредоточены во фракциях с электрофоретической подвижностью выше 0,5.

Увеличение процента катионных фракций подтверждается определением во фракции ПГ эпидидимисов и семенников крыс, сульфатов, турбидиметрическим методом [4].

Как видно из таблицы 11 содержание сульфатов в норме составляет $3,5 \pm 0,28$ мкг/мл. Содержание сульфатов в протеогликанах эпидидимисов и семенников крыс подвергшихся воздействию сероводородсодержащего газа АГКМ значительно увеличивается после второго месяца затравки, если на 56 день составляет $5,1 \pm 0,47$ мкг/мл, не отличаясь от нормы ($P \geq 0,1$), то к концу эксперимента увеличивается до $18,9 \pm 0,19$ мкг/мл. что в 5,5 раз выше нормы.

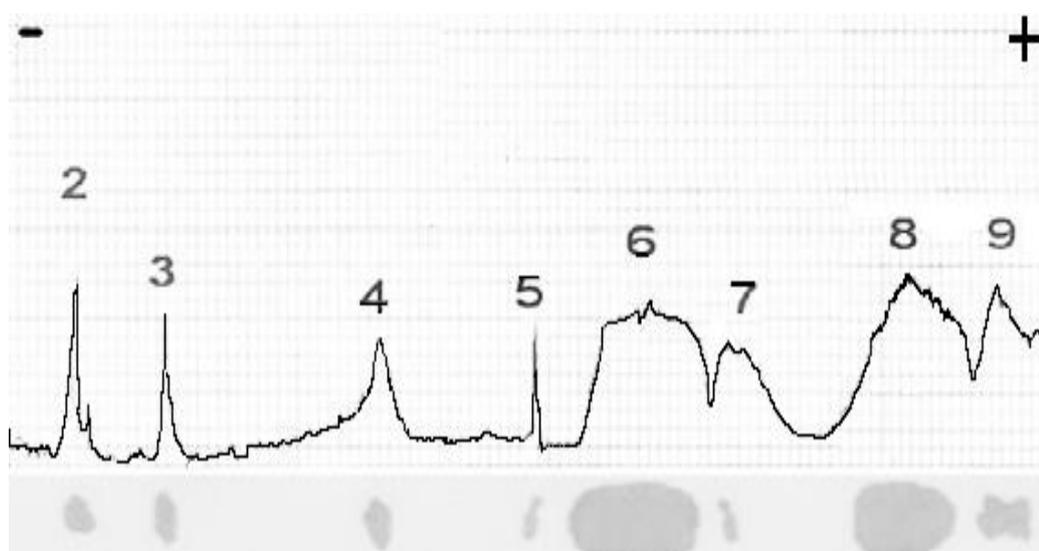


Рис 3. Денситограмма ПГ эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 - номера фракций.

Хроническое отравление сероводородом вызывает изменение синтеза ПГ эпидидимисов и семенников крыс. Это проявляется в нарушении соотношения основных электрофоретических фракций ПГ и характеризуется ростом доли анодных фракций, содержащих сульфатированные продукты. Спустя 30 дней воздействия серосодержащего газа, как видно из рис.2, спектр протеогликанов приближается к составу протеогликанов эпидидимисов и семенников контрольной группы. Идет на убыль концентрация сульфатов в ПГ (табл.3), оставаясь тем не менее в 2 раза выше контроля. ПГ эпидидимисов и семенников крыс через 4 месяца после окончания воздействия серосодержащего газа

исследованы у трех животных и определение сульфатов показало снижение, но не достижение нормы ($4,98 \pm 0,38$ мкг/мл).

Следовательно, влияние сероводородсодержащего газа АГКМ на образование ПГ эпидидимисов и семенников крыс достоверно и может привести к серьезному изменению функции воспроизводства. Скорость метаболизма и интенсивность деления клеток сперматогенеза ведет к восстановлению функции не ранее чем через 90 дней после завершения действия токсиканта, что соответствует примерно 2 циклам сперматогенеза у крыс [3].

Анализ гликозаминогликанов как углеводных компонентов протеогликанов стало следующим этапом исследования. Можно считать доказанным [73,167], что сперматогенный эпителий и клетки Сертоли продуцируют и секретируют в эякулят гликозаминогликаны. Выделение ГАГ проводили из эпидидимисов и семенников крыс (метод подробно описан в главе Материалы и методы). Для качественного и количественного анализа используют полученный препарат ГАГ.

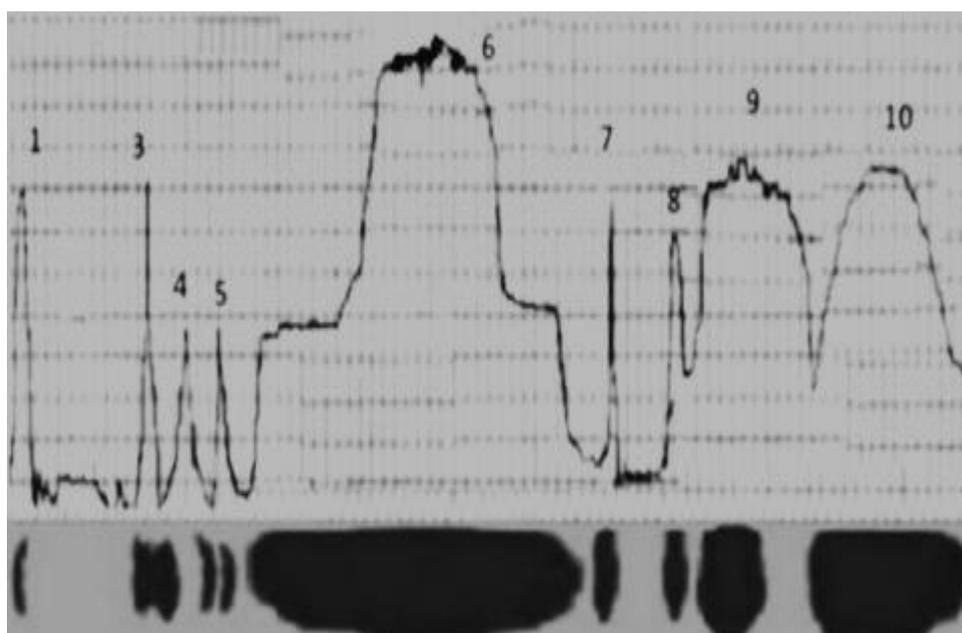


Рис 4. Денситограмма ПГ эпидидимисов и семенников крыс на 114 день затравки. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 - номера фракций.

Таблица 9. Относительная электрофоретическая подвижность (R_f) ПГ эпидидимисов и семенников крыс

Номера фракций	Относительная электрофоретическая подвижность (R_f) протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс.	
	Контроль(n=12)	114 день затравки(n=11)
1	-	0,02±0,01
2	0,07±0,01	-
3	0,14±0,02	0,13±0,02
4	0,35 ±0,02	0,18±0,02
5	0,5±0,02	0,22±0,04
6	0,61±0,1	0,45±0,15
7	0,69±0,05	0,625±0,02
8	0,87±0,02	0,69±0,02
9	0,94±0,01	0,78±0,02
10	-	0,92±0,02

Таблица 10. Фракционное распределение протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс

Номера фракций	Фракционное распределение ПГ эпидидимисов и семенников крыс(в %).	
	Контроль(n=12)	114 день затравки(n=11)
1	-	5,75±2,1
2	13,3±0,01	-
3	13,2±0,02	5,8±1,2
4	15,5 ±0,02	7,9±1,7
5	6,8±0,02	7,8±2,4
6	17,6±0,1	22,7±5,6
7	8,3±2,5	6,75±1,2
8	14,9±1,8	8,9±0,5
9	10,4±2,1	19,1±3,0
10	-	15,3±2,8

Таблица 11. Содержание сульфатов в ПГ эпидидимисов и семенников крыс(мкг\мл).

содержание сульфатов (мкг\мл).				
Контроль(n=12)	28 день затравки(n=9)	56 день затравки(n=10)	114 день затравки(n=11)	28день после окончания затравки(n=14)
3,5±0,28	3,4 ± 0,15	5,1 ±0,47	18,9±0,19	7,8 ±0,5

Таблица 12. Оценка содержания ГАГ в образцах тканей семенников и эпидидимисов крыс в пересчете на массу ткани.

Исследуемый материал(в скобках число наблюдений)	Суммарное количество ГАГ в ткани, мкг	Масса ткани, г	ГАГ, мкг/г ткани
Контрольные животные (5)	1.1	0.2	5,5
Затравка 21 день (6)	0,85	0,2	4,25
Затравка 56 день (4)	0,75	0,18	4,16
Затравка 114 день (8)	0.7	0,19	3,68
После Затравки 28 день (6)	1.0	0,21	4,77

Концентрацию ГАГ в препаратах измеряли на пластинах ацетатцеллюлозной пленки [109]. Относили количество ГАГ на грамм взятой на исследование ткани (таблица 12).

В образцах тканей семенников и эпидидимисов крыс происходит незначительное снижение количества ГАГ в расчете на единицу массы ткани.

Это снижение недостоверно, из-за малого числа наблюдений. Однако пересчет концентрации 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 отнесли концентрацию ГАГ на другой параметр: на концентрацию белка в пробе.

При таком расчете, происходит снижение содержания ГАГ в тканях семенников и эпидидимисов крыс по сравнению с контрольной тканью на первой стадии затравки. Далее содержание ГАГ в тканях семенников и эпидидимисов крыс повышается сначала до нормы, а затем и выше нормы.

Таблица 13. Оценка содержания ГАГ в тканях семенников и эпидидимисов крыс в пересчете на количество суммарного белка

Исследуемый материал(в скобках число наблюдений)	Суммарное количество ГАГ в ткани, мкг	Концентрация белка мкг/мг ткани	Масса ткани, г	ГАГ, % от общего белка
Контрольные животные (5)	1.1	19,5±0,76	0.2	5,6
Затравка 21 день (6)	0,85	19,8±0,85	0,2	5,5
Затравка 56 день (4)	0,75	14,9±0,9	0,18	6,7
Затравка 114 день (8)	0.7	13,4±0,85	0,19	7,8
После Затравки 28 день (6)	1.2	18,7±0,5	0,21	11,2

Возможно, это связано с большей лабильностью белок - синтезирующих систем к токсическому агенту чем систем синтеза гликозаминогликанов и, несмотря, на абсолютное снижение уровня гликозаминогликанов их относительное содержание на единицу веса белка растет. Причем, особенно заметно (почти в

2 раза по сравнению с нормой) в период восстановления после окончания действия токсического агента. Данный факт требует дальнейшего изучения.

Нарушение синтеза ГАГ под действием хронической интоксикации серусодержащим газом может проявляться не только снижением концентрации, но и изменением структуры полисахаридных цепей гликозаминогликанов. Изменением их молекулярной массы, заряда и других характеристик. Исследование этих изменений мы проводили при помощи хроматографических исследований. На первом этапе сравнивали спектр гликозаминогликановых цепей по молекулярной массе. Это исследование проводили методом гелепроникающей хроматографии (гель-фильтрации). Навеску гликозаминогликанов растворяли в 0,025 М трис-солянокислом буфере pH 7,6 на 1,0М NaCl и вносили на колонку Тойоперл HW- 50S. В каждом опыте мы использовали два белковых внутренних стандарта - чистые препараты лактоферрина и цитохрома С. Концентрацию лактоферрина определяли спектрофотометрически при 280 нм, а концентрацию цитохрома С определяли, измеряя оптические плотности раствора при 400 и 490 нм. Рассчитывают разность оптических плотностей, и по ее величине судят о содержании цитохрома С. Фракции собирали и для количественного определения ГАГ применяли спектрофотометрический метод Дише (см. мат. и методы). Глюкуроновая кислота, входящая в состав ГАГ, реагирует с карбазолом, образуется розовое окрашивание. Так как почти все во все виды ГАГ (гиалуроновая кислота, дерматансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат) входят уроновые кислоты, метод Дише не является избирательным, а регистрирует общее содержание ГАГ. Известно, что главными компонентами ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс является хондроитин-4- сульфат, хондроитин-6-сульфат, гепарансульфат, кератансульфат и гиалуроновая кислота.

Планиметрический анализ хроматограмм (рис 5.) ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, контрольной и опытной групп, показан в табл. 14 .

Как видно из табл.14 Большинство (около 65%) ГАГ эпидидимисов и семенников крыс независимо от влияния серусодержащего газа имеют молекулярную массу ниже 80 KDa (это молекулярная масса лактоферрина). Однако под токсическим действием серусодержащего 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 процесс дефрагментации ГАГ, либо нарушение их синтеза.

Главный критерий этого процесса - накопление кислых сульфатированных ГАГ мы исследовали методом ВЭЖХ в анионообменном варианте. На Рис.6 и 7 показано, что при сравнении ГАГ, выделенных из эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы и опытной группы, наблюдается рост числа отрицательно заряженных компонентов. В контрольной группе насчитывается до 15 фракций. Хроматограмма ГАГ нормальной ткани эпидидимисов и семенников (рис 6) содержит 10 фракций выходящих при ионной силе хлорида натрия до 0,2 М, причем, эти фракции содержат 77,6% от общего контента ГАГ. Хроматограмма ГАГ нормальной ткани эпидидимисов и семенников практически не содержит фракций, выходящих с колонки в зоне от 0,2 до 0,3 М NaCl, а наблюдается 2 фракции при 0,29 М NaCl, содержащие не более 16% от общего количества ГАГ и фракции 14 и 15 в зоне 0,4 и 0,48 М NaCl содержат 6,4 % ГАГ.

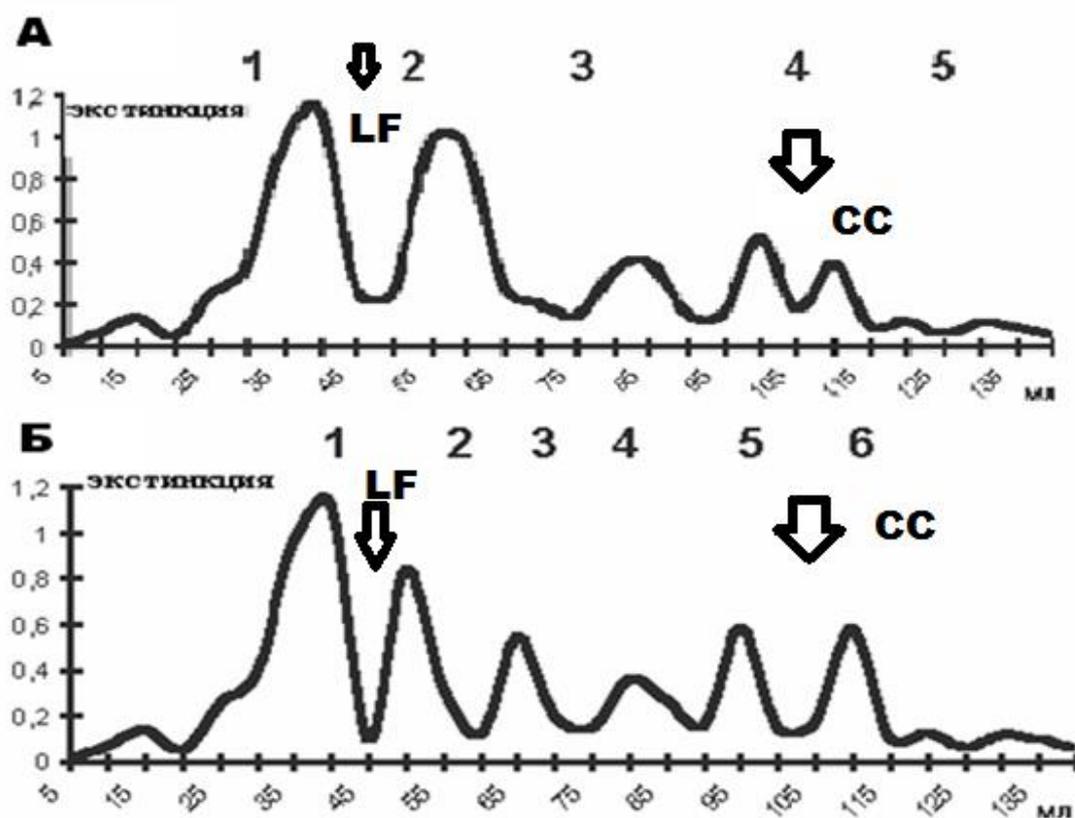


Рис 5. Гель-проникающая хроматография гликозаминогликанов эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа Колонка 75,0x1,5см Тойоперл HW-50S А-контрольная группа, Б - 96 день затравки. LF и СС- обозначают пиковые концентрации лактоферрина и цитохрома-С соответственно.

Таблица 14. Планиметрия хроматограмм ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа и контрольных животных.

Номера хроматографических пиков	Площадь Пика в контрольной группе*	Площадь Пика в опытной группе (96 день затравки).*	Молекулярная масса
1	35,7%	34,78%	≥ 80 KDa
2	32,94%	29,9%	≤80 KDa
3	13,87%	9,98%	60-20 KDa
4	11,79%	13,37%	≥14 KDa
5	5,7%	12,0%	≤14 KDa

*Площадь пика выражена в % от суммарной площади всех обозначенных пиков

Фракционный состав гликозаминогликанов эпидидимисов и семенников крыс опытной группы достоверно меняется (рис 7). Весь спектр содержит не более 12 фракций, Фракции №1,2,3,4 ГАГ эпидидимисов и семенников крыс содержат 7,2% контента и элюируются до 0,12 М NaCl. Фракции № 6-9, содержащие более 66,4% их общей массы, располагаются в зоне от 0,21 до 0,31М NaCl. На долю остальных (10,11,12) фракций приходится 26,4%. Причем это самые кислые ГАГ, элюируемые при 0,42-0.49М NaCl. Сравнивая долю кислых фракций (в нашем случае это граница 0,21МNaCl) видно (рис 6), что, в опытной группе содержится 92,8%кислых фракций против 22,4% контроля. Таким образом, спектр ГАГ эпидидимисов и семенников крыс подвергавшихся воздействию серусодержащего газа обеднен и содержит компоненты с отрицательным зарядом, значительно большим, чем в норме, а процент их в опытной группе резко возрастают к общей доле гликозаминогликанов более чем в 4 раза.

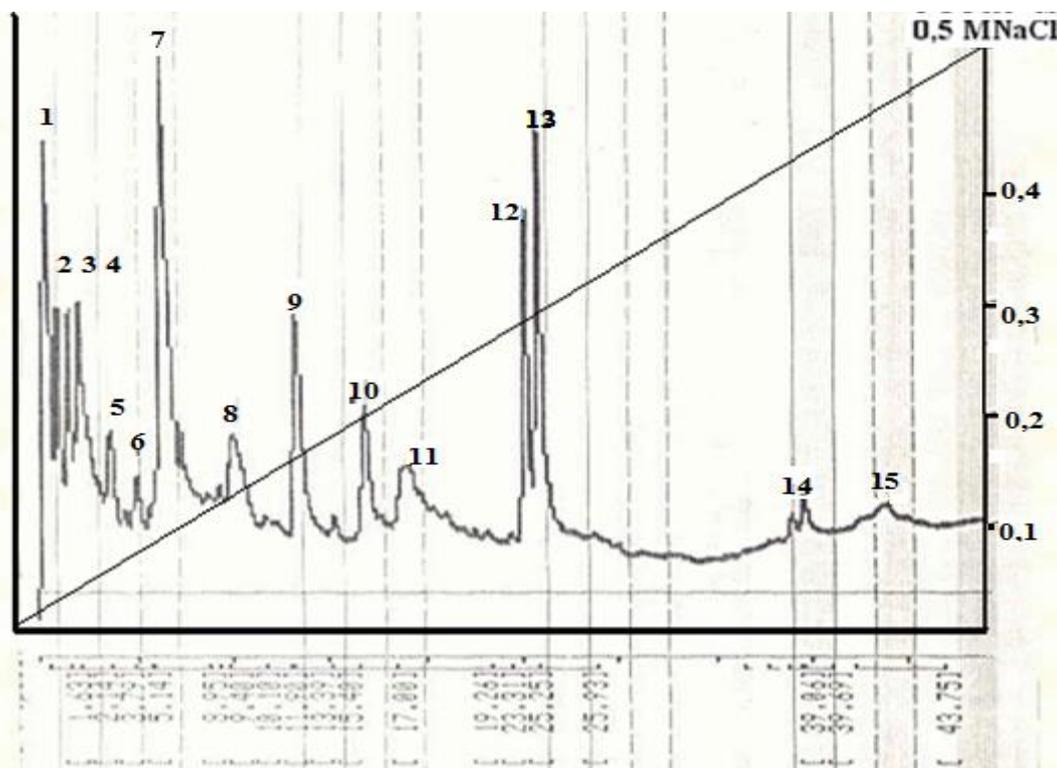


Рис 6 ВЭЖХ (ионообменная) ГАГ эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы Колонка 10 x 0,2 рН 7,4 градиент хлорида натрия от 0,015 до 0,55 М.

Результаты показывают, что хроническая интоксикация природным газом АГКМ вызывает нарушение синтеза ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс опытной группы. Это нарушение приводит к росту процента отрицательно заряженных фракций. Для того чтобы определить, какие именно ГАГ в составе протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс подвержены наибольшему изменению под действием хронической интоксикации природным газом АГКМ, нами была проведена идентификация моносахаров после гидролиза ГАГ, выделенных из семенников и эпидидимисов крыс контрольных и опытных групп.

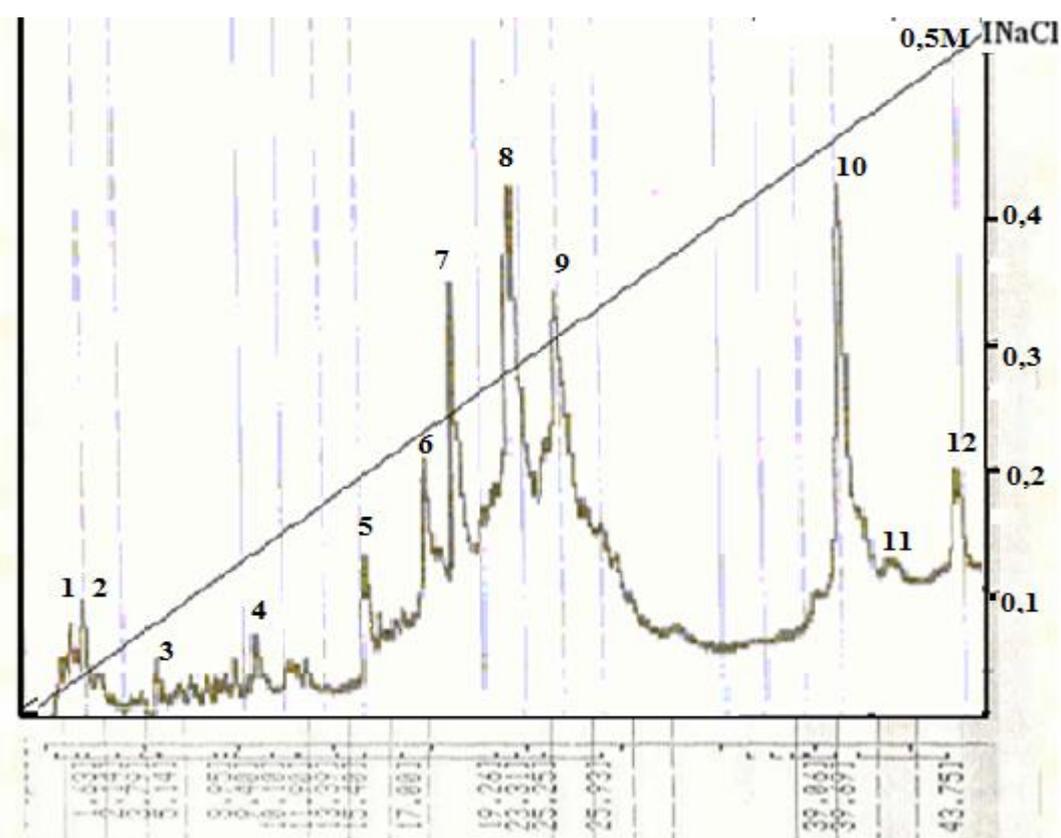


Рис 7 ВЭЖХ (ионообменная) ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа. Колонка 10x0,2 рН 7,4 градиент от 0,05М до 0,5 М хлорида натрия.

Гидролиз гликозаминогликанов проводили с использованием иммобилизованного на полимерных носителях гликолитического ферментного комплекса гриба *Trichoderma viride* (препарат любезно предоставлен доцентом Е.В. Ожимковой – Тверской государственной технической университет). Этот гликозидазный комплекс признан [110] одним из наиболее эффективных

инструментов для гидролиза гетерополисахаридов до моносахаридов. Гидролиз проходил в течении 300 минут при оптимальных условиях действия фермента ($t=40^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH } 4,8$).

Далее делали хроматографический анализ полученной смеси моносахаридов методом газожидкостной хроматографии. (См. Материалы и методы). На рис 8. Представлена хроматограмма гидролизата гликозаминогликанов ткани эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы.

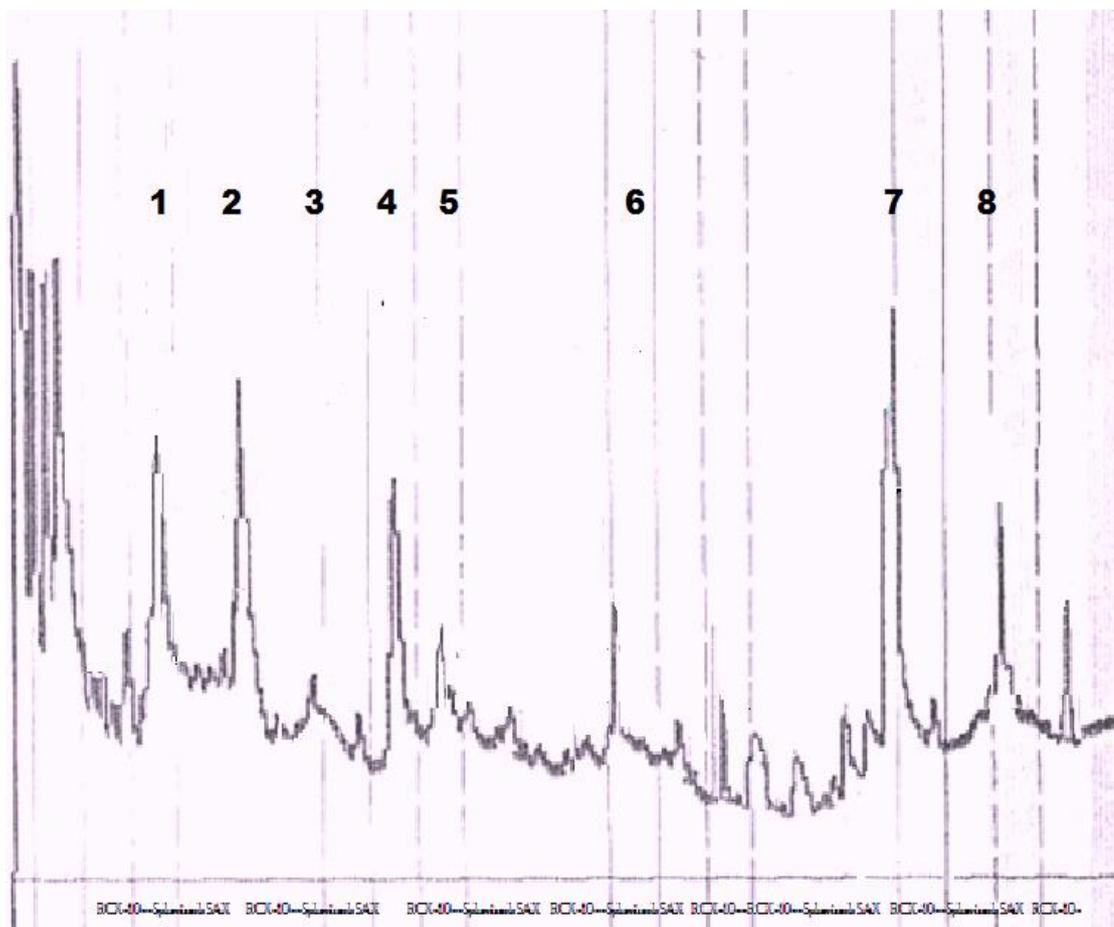


Рис.8. хроматограмма гидролизата ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы. Параметры хроматографии приведены в тексте. 1- Галактозамин; 2 - глюкозамин; 3-манноза; 4-галактоза; 5-ксилоза; 6-глюкоза; 7-идуоновая кислота; 8-глюкуроновая кислота.

Номинация обозначенных хроматографических пиков проводилась путем сравнения времени удержания фракций со временем удержания на хроматограмме стандартной смеси сахаров. Для сравнительного анализа

хроматограмм мы применили тот же планметрический метод [15]. Хроматограммы сканировали, переводили в цифровую форму и затем, площадь хроматографических пиков определяли по специальной программе, затем площади всех пиков суммировали и вычисляли относительную долю каждого пика. Сравнительные данные содержания моносахаридов в гидролизатах гликозаминогликанов семенников и придатков здоровых крыс и животных, находившихся в условиях хронической интоксикации серусодержащим газом, представлены в таблице 15. Анализ данных показал особенности синтеза ГАГ в условиях хронической интоксикации серусодержащим газом.

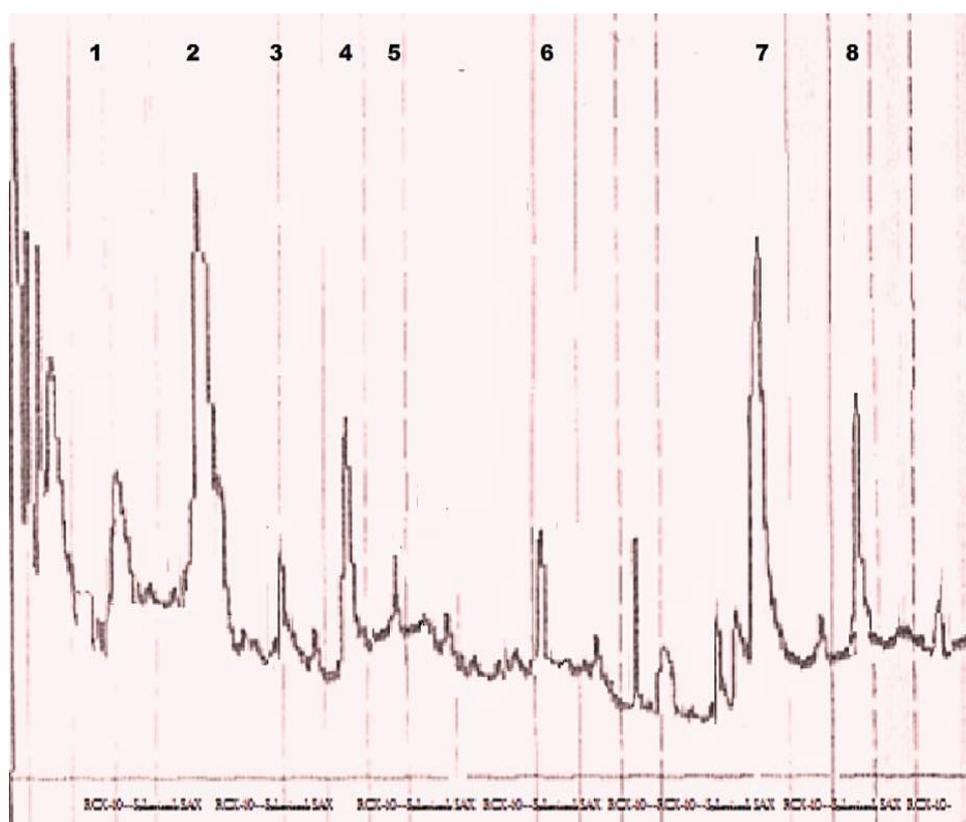


Рис.9. хроматограмма гидролизата гликозаминогликанов ткани эпидидимисов и семенников крыс опытной группы(104 день затравки). Параметры хроматографии приведены в тексте. 1- Галактозамин; 2 - глюкозамин; 3- манноза; 4-галактоза; 5-ксилоза; 6-глюкоза; 7-идурановая кислота; 8- глюкуроновая кислота.

В образцах от животных контрольной группы структура моносахаридных компонентов, свидетельствует о том, что в спектре гликозаминогликанов семенников и придатков крыс преобладает гепаринсульфат (димерные звенья

которого построены из идуроновой кислоты и глюкозамина и реже гиалуриновой кислоты и глюкозамина). Именно идуроновая кислота и глюкозамин в совокупности составляют более 47% моносахаридов гидролизата.

Вторым по частоте встречаемости, видимо, является хондроитинсульфат, так как входящие в него глюкуроновая кислота и галактозамин составляют по сумме 30,9%. Высокий уровень галактозы (почти 18%) доказывает присутствие в ПГ семенников и придатков крыс кератансульфата. Характерная черта этого ГАГ неэстерифицированная галактоза в качестве одного из компонентов дисахаридного звена полисахарида. Разумеется, это только частотный состав углеводного компонента ПГ, который не исключает присутствие других минорных ГАГ.

Таблица 15. Планметрический анализ хроматограмм моносахаридов в гидролизатах гликозаминогликанов семенников и придатков крыс, подвергавшихся воздействию природного газа и контрольных животных.

Номера хроматографических пиков	моносахарид	Площадь Пика в контрольной группе*	Площадь Пика в опытной группе (104 день затравки).*
1	галактозамин	17,2 ±0,4%	15,0±0,5%
2	глюкозамин	22,1±0,4%	29,2±0,7%
3	Манноза	1,1±0,2%	1,7%
4	галактоза	17,9±0,3%	16,7±0,3%
5	ксилоза	1,5±0,4%	1,2±0,4%
6	глюкоза	1,2±0,4%	3,1±0,6%
7	Идуриновая кислота	25,2±0,3%	24,0±0,3%
8	Глюкуроновая кислота	13,7±0,4%	9,1±0,5%

В образцах гидролизатов ГАГ семенников и придатков крыс, подвергавшихся воздействию серусодержащим газом достоверно повышается доля глюкозамина до 29%, что при неизменном уровне идуруновой кислоты оставляет за гепаринсульфатом первое место среди возможных гликозаминогликанов. 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 серусодержащего газа отмечается дискордантность трех основных гликозаминогликанов. Уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата.

Хроническая интоксикация серосодержащим газом извращает синтез и созревание сперматозоидов, что проявляется в дисбалансе электрофоретического профиля ПГ и сопровождается его деградацией и ростом процента кислых фракций. Это согласуется с хроматографическим анализом ГАГ, по результатам которого наблюдается рост числа и доли кислых ГАГ на фоне резкого сдвига в кислую сторону. Эти нарушения в созревании и синтезе ПГ и ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс, создают предпосылки для патологических процессов в сперматогенезе.

3.3 РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОРРЕКЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ С ПОМОЩЬЮ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩЕГО БИОКОМПЛЕКСА.

В данном исследовании был использован разработанный нами способ коррекции сперматогенеза в условиях хронической интоксикации природным газом заключающийся в применении селена в органической форме (селексена) в сочетании с аскорбиновой кислотой, которые вводили перорально самцам белых крыс соответственно в дозах 1,5 мг/кг и 500 мг/кг (или 0,15 и 50 мг/100 г) массы тела животного 1 раз в сутки в течение 50 дней, а параллельно с третьей недели введения селексена и аскорбиновой кислоты воздействовали сероводородсодержащим природным газом. Ранее для коррекции сперматогенеза у крыс был использован селенит натрия, который добавляли в пищевой рацион в условиях хронической интоксикации сероводородсодержащим газом АГКМ [12]. Однако указанный способ имел недостатки:

1. в качестве протектора предлагалась, неорганическая форма селена (селенит натрия), которая, в отличие от органической, является трудноусвояемой;

2. сам селеносодержащий протектор не дополнен никаким известным витамином-антиоксидантом (витамин Е, аскорбиновая кислота), способным усилить протекторные свойства селена.

В качестве корректора был выбран именно селексен, поскольку селен в нем находится в хорошо усвояемой органической форме и этот препарат является разрешенным и широкоиспользуется в качестве пищевой добавки. В органической форме селен малотоксичен [155]. Доказано наличие синергизма селена и аскорбиновой кислоты, а также способность последней выводить избыток селена [57]. Животным вводили селен из расчёта 350 мкг селена на 1 кг массы тела животного в сутки, что адекватно для половозрелых крыс с точки зрения уровня их метаболизма. Дозу аскорбиновой кислоты рассчитывали, опираясь на суточные дозы витамина С, демонстрирующие активность в регуляции физиологических процессов, в том числе, репродуктивных. Витамин С

улучшает «качество» спермы, благотворно влияет на андрогенез и увеличивает подвижность сперматозоидов [201]. Высокие дозы витамина С трансформируют селенит натрия (неорганический селен) в практически неусваиваемый элементарный селен, выводящийся с фекалиями, чего не наблюдается в случае селена в органической форме. Это также определило выбор именно селексена в качестве источника селена.

Селексен в сочетании с витамином С вводили один раз в сутки в указанных дозах, что полностью покрывало суточную потребность животных в данных нутриентах, которые равномерно распределялись в течение суток по всему организму. Учитывая, что сперматогенный цикл у крыс составляет 48 суток, животным была назначена 50-дневная диета, обогащённая селексеном и витамином С. Через 2 недели после начала введения аскорбиновой кислоты и селексена начали воздействовать сероводородсодержащим газом в концентрации 10 мг/м. Курс введения селексена и аскорбиновой кислоты осуществлялся «внутри», воздействие серосодержащего газа (со второй недели в течение 50 дней) что позволяло плавно вводить протектор в экспериментальную модель.

Таким образом, в качестве протектора был предложен селенсодержащий биокomплекс, включающий в себя селен в органической форме (селексен) и аскорбиновую кислоту, поскольку: 1) доказано наличие синергизма селена и аскорбиновой кислоты; 2) аскорбиновая кислота способна выводить избыток селена из организма; 3) селен входит в состав селенопептида, участвующего в сборке хвоста сперматозоидов; 4) селен является структурным элементом селенсодержащей глутатионпероксидазы (ГПО). Введение животным данного биокomплекса оправдало ожидаемые результаты. Результаты показали, что предлагаемый селенсодержащий биокomплекс (селексен + аскорбиновая кислота) способствовал заметному улучшению состояния тестикулярного сперматогенеза. Наблюдался прирост общего количества сперматогенных клеток, отмечался некоторый прирост исходных клеток сперматогенеза -

сперматогоний. Кроме того, отмечалось отчётливое изменение соотношения сперматогенных клеток на этапе превращения сперматид в сперматозоиды, что указывает на участие селена и аскорбиновой кислоты в регуляции сперматогенеза на конечных стадиях сперматогенного цикла. Вместе с тем, очевидна роль аскорбиновой кислоты как антиоксиданта в регулировании уровня стволовых клеток сперматогенеза - сперматогоний типа A_0 . В условиях воздействия серусодержащего газа наблюдалось резкое уменьшение общего количества сперматогенных клеток более чем в 7 раз. Вследствие интоксикации газом нарушались соотношения между различными сперматогенными клетками (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды). Преобладающими типами клеток были сперматоциты и сперматиды, относительное содержание сперматогоний и сперматозоидов было сниженным. Таким образом, сперматогонии оказались наиболее уязвимым звеном сперматогенеза в условиях интоксикации природным сероводородсодержащим газом АГКМ.

Хроническое воздействие газом на фоне вводимого селенсодержащего биокомплекса вызвало достоверно менее выраженные нарушения сперматогенеза, по сравнению с группой животных, подвергавшихся воздействию только сероводородсодержащим газом. Общее количество сперматогенных клеток возрастало в 3 раза, по сравнению с таковым в группе животных, подвергавшихся воздействию газом ($P < 0,001$). Селенсодержащий биокомплекс способствовал восстановлению пула незрелых половых клеток в условиях разрушительного действия сероводородсодержащего газа АГКМ. Доля сперматогоний и сперматоцитов возрастала сравнительно с таковой при воздействии газом. Наблюдалось некоторое восстановление соотношения сперматогенных клеток на стадии превращения сперматид в сперматозоиды, хотя количество сперматозоидов (абсолютное и относительное) оставалось несколько сниженным по отношению к контрольным показателям.

Для оценки протекторных свойств селексена в сочетании с аскорбиновой кислотой в условиях воздействия сероводородсодержащим токсикантом мы

исследовали эпидидимальные сперматозоиды белых крыс. Количество и морфо-функциональное состояние эпидидимальных сперматозоидов у белых крыс в норме и в условиях экспериментальных воздействий отражено в таблице 16.

У животных, подвергнутых воздействию газом, наблюдается уменьшение общего количества эпидидимальных сперматозоидов более чем в 1,7 раз, в сравнении с контролем ($P < 0,001$) (таблица 16). Происходит увеличение процентного содержания дефективных форм (44,4%), подвижные сперматозоиды почти отсутствуют (0,4%). Также почти в 11,4 раз увеличивается содержание мертвых сперматозоидов (55,2%) по сравнению с контролем (4,8%) ($P < 0,001$). Вместе с тем, предварительное введение животными селенсодержащего биокомплекса способствовало снижению токсических эффектов сероводородсодержащего газа. Достоверно значимых отклонений от контроля по количеству сперматозоидов у животных, подвергавшихся воздействию газом и получавших указанный биопротектор, нами не было зафиксировано.

Таблица 16. Состояние эпидидимальных сперматозоидов у крыс под действием сероводородсодержащего газа, селенсодержащего биокомплекса и их сочетания

Показатели	Контроль (n = 10)	Селенсодержащий биокомплекс (n = 10)	СВСГ АГКМ (n = 10)	Биокомплекс + СВСГ (n = 30)
Общее кол-во, млн	50,0 ± 6,51	54,3 ± 6,0	*** 28,4 ± 2,44	oo 41,0 ± 4,51
Дефективные, %	20,2 ± 2,22	*** 13,1 ± 0,62	*** 44,4 ± 3,83	oo 32,0 ± 2,52
Подвижные, %	81,0 ± 6,2	88,0 ± 6,11	*** 0,4 ± 0,12	ooo 54,5 ± 4,22
Мёртвые, %	4,8 ± 0,82	4,7 ± 0,72	*** 55,2 ± 4,11	45,4 ± 3,31

*** $P < 0,001$ - в сравнении с контролем; oo $P < 0,01$; ooo $P < 0,001$ - в сравнении с группой животных, подвергнутых воздействию газом

СВСГ АГКМ-сероводородсодержащий газ астраханского газоконденсатного месторождения

В группе животных, подвергавшихся воздействию газом и получавших селеносодержащий комплекс, наблюдалось некоторое улучшение соотношения между разными формами сперматогенных клеток в сравнении с группой животных, подвергавшихся воздействию только газом. До уровня нормы соотношение между разными формами сперматогенных клеток не успевало восстанавливаться на 7-й день после отмены токсического воздействия, что можно объяснить особенностями кинетики репаративных процессов. Эти данные свидетельствуют в пользу протекторных свойств селексена в сочетании с повышенными дозами аскорбиновой кислоты в отношении мужской репродуктивной функции в условиях экстремальных воздействий сероводородсодержащих поллютантов. Таким образом, предлагаемым способом коррекции сперматогенеза в условиях хронической интоксикации природным газом достигается снижение токсических эффектов газа в отношении репродуктивной функции самцов крыс, что выражается в улучшении морфофункциональных показателей эпидидимальных сперматозоидов и означает повышение качества спермы в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Анализ семенников и эпидидимисов животных из группы получавшей селеносодержащий комплекс на фоне воздействия серусодержащим газом, показал, что хроническая интоксикация природным газом АГКМ на фоне бипротектора практически не вызывает нарушение синтеза ГАГ ткани эпидидимисов и семенников крыс опытной группы. Это нарушение не приводит к достоверному росту процента отрицательно заряженных фракций (рис.10).

Хроматограмма ГАГ из группы получавшей селеносодержащий комплекс на фоне воздействия серусодержащим газом (рис 10) содержит 10 фракций выходящих при ионной силе хлорида натрия до 0,2 М, что характерно и для хроматограмм контрольной группы. Если в контроле (рис.6) эти фракции

содержат 77,6% от общего контента ГАГ, то в опытной группе с применением биопротектора доля этих фракций составляет 72,4%.

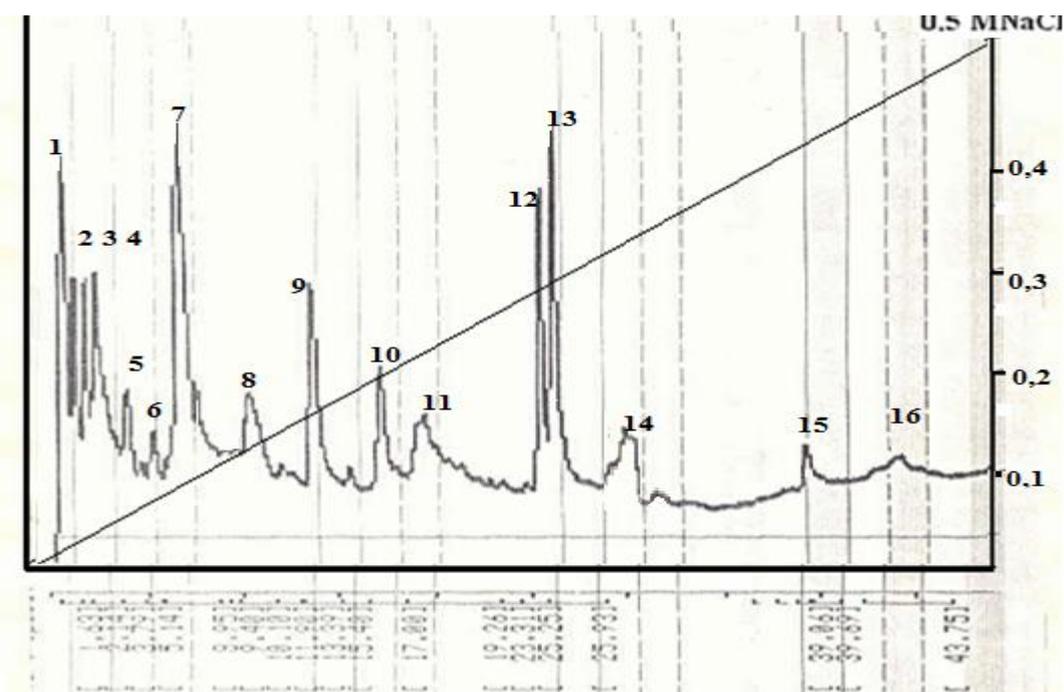


Рис.10 ВЭЖХ (ионообменная) ГАГ эпидидимисов и семенников крыс, подвергавшихся воздействию природного газа на фоне биопротекторного комплекса. Колонка 10x0,2 рН 7,4 градиент хлорида натрия от 0,05 до 0,5М. Хроматограмма ГАГ ткани эпидидимисов и семенников подвергавшихся воздействию природного газа на фоне биопротекторного комплекса также как и контрольная группа практически не содержит фракций, выходящих с колонки в зоне от 0,2 до 0,3 М NaCl, а наблюдается 2 фракции при 0,3 М NaCl, содержащие не более 14% от общего количества ГАГ. Заметное отличие составляют фракции фракции 14, 15 и 16 в зоне от 0,36 до 0,48 М NaCl содержат 13,6 % ГАГ. Таким образом, наблюдается незначительное смещение спектра ГАГ в сторону кислых фракций.

3.4. ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОГЛИКАНОВ СЕМЕННИКОВ КРЫС.

Протеогликаны это полифункциональный, разнообразный вид макромолекул. Строгая органная специфичность характерная черта этих сложных полимеров. Отсутствие видовой специфичности, делает ПГ почти удобным объектом исследования в токсикологических экспериментах (выявленные на животных изменения можно экстраполировать на человека). В текущем разделе работы приводятся данные иммунохимического анализа распространения и динамики ПГ эпидидимисов и семенников крыс.

Очитку ПГ проводили по методу В.И. Рыковой с соавт [2]. Далее выделенные ПГ подвергали ферментации для удаления углеводной части и открытия белковых детерминант (Материалы и методы). Зимолиз проводили в течении 5 часов при 37⁰С в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Далее фракции протеогликанов центрифугировали, диализовали и лиофилизировали.

Препарат белкового компонента ПГ использовали для иммунизации кроликов и кур. Отсутствие видовой специфичности у протеогликанов делает их низкоиммуногенными. Особенностью семенников является их нахождение за иммунологическим барьером и повышает вероятность получения выскоавидных антител [30,58].

Мы применили при иммунизации животных несколько схем иммунизации (см. раздел Материалы и методы). В качестве продуцентов антител к ПГ семенников и эпидидимисов крыс оптимально подходят куры. Далее в работе применялся полуочищенный препарат иммуноглобулинов, полученный из нескольких куриных антисывороток к ПГ семенников и эпидидимисов крыс.

ИЭФ анализ (рис.10) показал широкий спектр антигенов, в водносолевых экстрактах семенников и эпидидимисов крыс с антителами к сыворотке крови крыс. Антитела полученные к препарату корового белка ПГ не обнаруживают антигенной активности в водносолевых экстрактах репродуктивных органов крыс(рис 10). В препарате ПГ семенников и эпидидимисов крыс эти антитела

выявляют два антигена с электрофоретической подвижностью альфа-1 и альфа-2 глобулинов.

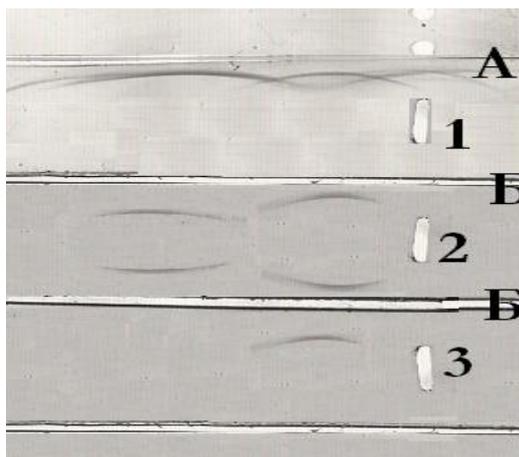


Рис. 10. Иммуноэлектрофорез протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс: 1 – водно-солевой экстракт семенников и эпидидимисов крыс; 2 – фракция протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс; 3 – очищенный препарат ПГА-2. А-антитела к сыворотке крови крыс; Б- антисыворотка к ПГ семенников и эпидидимисов крыс

Иммунохимическое титрование, показало, что содержание ПГ альфа-2 (ПГА-2) более чем в 156 раз превышает содержание ПГ альфа-1(ПГА-1). Концентрация ПГА-2 составляет 0,13мг/мл или 1,14% от общего белка препарата. Концентрация антигена ПГА-2 позволила провести очистку этого белка на основе сочетания различных методов хроматографии.

На первой стадии лиофильно высушенный после зимоллиза препарат ПГ семенников и эпидидимисов крыс растворяли в Трис-НСl буфере (рН=7,8). Раствор смешивали с равным объемом 3.8М раствора сульфата аммония и после 120 минут экспозиции центрифугировали.. На втором этапе осадок растворяли в 50% исходного объема буфера и подвергали гель-фильтрации (рис.11). Хроматографические фракции исследовали на содержание ПГА-2, методом ИЭФ. Иммунохимический анализ выявил что ПГА-2 выходит в свободном объеме колонки. Оценка молекулярной массы белков содержащихся в 1 пике показала ММ 245-260 КД. Дальнейшая очистка основана была на предположении о способности ПГА-2 связываться с гепарином. Во-первых, это

предположение подтверждает природу ПГА-2, как корового белка ПГ. Во-вторых, позволят провести эффективное выделение этого белка.

Способность гепарина преципитировать ПГА-2 обнаружена нами в реакции преципитации в агаре. Заключительный этап очистки ПГА-2 заключается в аффинной хроматографии ПГА-2 на гепарин-сефарозе. ПГА-2 обогащенные фракции объединяли и обессолили.

Хроматографическая колонка (1,1x19,5см) гепарин-сефарозы, уравновешенная трис-НС1 буфером, связывала весь объем, полученных на предшествующих стадиях фракций ПГА-2. Колонку промывали буфером (рН 7.5) содержащим 305 мМ NaCl. Элюцию осуществляли с помощью ступенчатого градиента (ступень по 0,3 М/л) NaCl до концентрации 1,8 М/л. Фракция, содержащая ПГА-2 собиралась, концентрировалась.

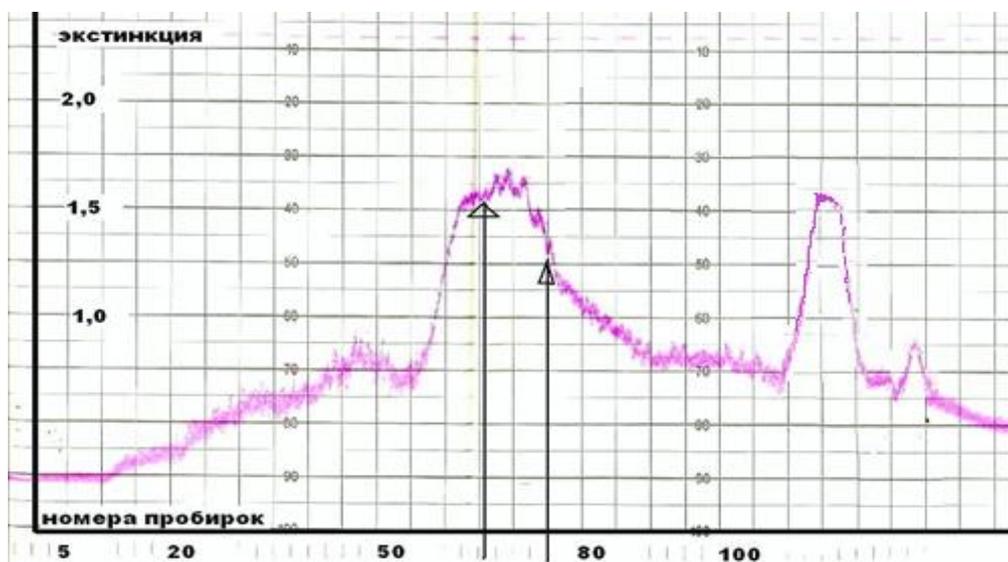


Рис. 11. Гель-проникающая хроматография протеогликанов семенников и эпидидимисов крыс на колонке сефадекса G-200. (Колонка 1,2x95 см, фракции по 1,5 мл). стрелками указана зона выхода ПГА-2 по данным иммунохимического анализа.

Иммунохимическая "чистота" препарата подтверждена с помощью метода ИЭФ (рис 10), а также электрофореза в ПААГ (рис 12).

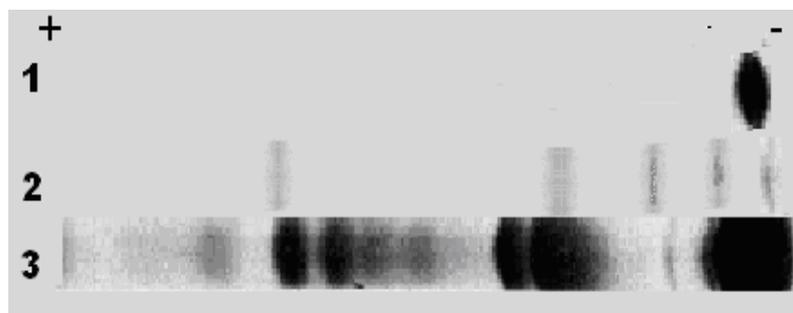


Рис. 12 Электрофорез в ПААГ.

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

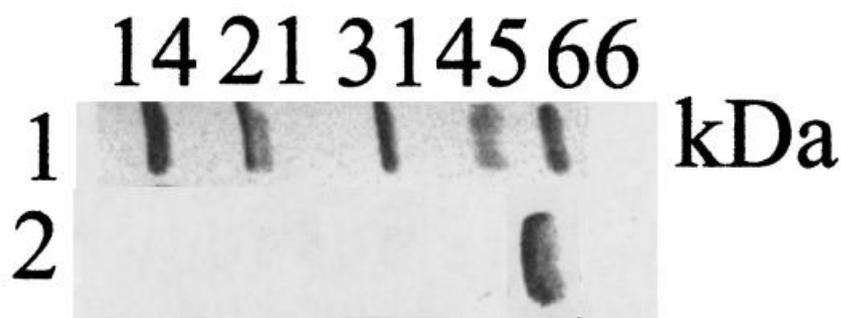


Рис. 13 Электрофорез в 15%SDS-ПААГ 1- маркер молекулярной массы.2- очищенный препарат ПГА-2

Контроль чистоты препарата ПГА-2 при электрофорезе в 15% ПААГ, содержащем додецил сульфат натрия (рис.13) показал результаты молекулярной массы ПГА-2 отличные от данных хроматографии на сефадексе G-200. Если мол.масса ПАГ-2 по данным хроматографии составила 245-260KD, то по данным электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия 62KD. Такое расхождение мы объясняем вероятностью существования тетрамеров ПАГ-2, диссоциирующих в присутствии додецил сульфата.

Методом ВЭЖХ также подтверждается чистота полученного препарата (рис14)

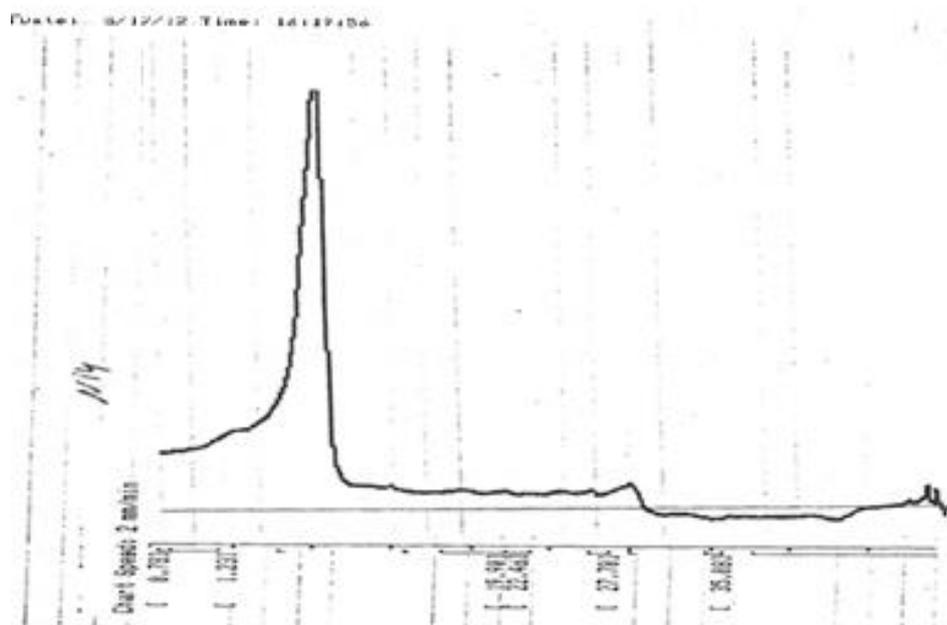


Рис.14. Высокоэффективная обращеннофазная жидкостная хроматография очищенного препарата ПГА-2 . колонка нуклеосил С-18 330А,125х4,6мм. Градиент концентрации 84% ацетонитрила в 0,1% ТФУ.

Таблица 17. Очистка ПГА-2 из ткани семенников и эпидидимисов крыс.

Стадия очистки	Общий объем содержащий ПГА-2	Общий белок мг	Количество ПГА-2 мг	Выход %	Степень очистки
Первичный экстракт	1090 мл	9245	76	100	1
Преципитация сульфатом аммония	145 мл	880	54	71,5	7,5
Гель-проникающая хроматография	115 мл	155	42	55,3	33,0
Аффинная хроматография	13 мл	19	17.5	22,4	109.1

В таблице 17. показаны этапы очистки ПГА-2 из семенников и эпидидимисов крыс. Предложенный нами метод повышает эффективность, сокращает время и упрощает очистку ПГА-2.

Получение очищенного препарата ПГА-2 позволило провести структурное исследование этой молекулы. В качестве N-концевой аминокислоты в препарате ПГА-2 методом двумерной тонкослойной хроматографии дансил производных аминокислот идентифицирован ЛЕЙЦИН (рис 15). В доступной нам литературе нет сообщений о коровых белках протеогликанов или других гепаринсвязывающих белках репродуктивной системы самцов животных с молекулярной массой 62 KD и N-концевой аминокислотой ЛЕЙЦИН. Таким образом, нами идентифицирован и очищен новый гепаринсвязывающий белок.

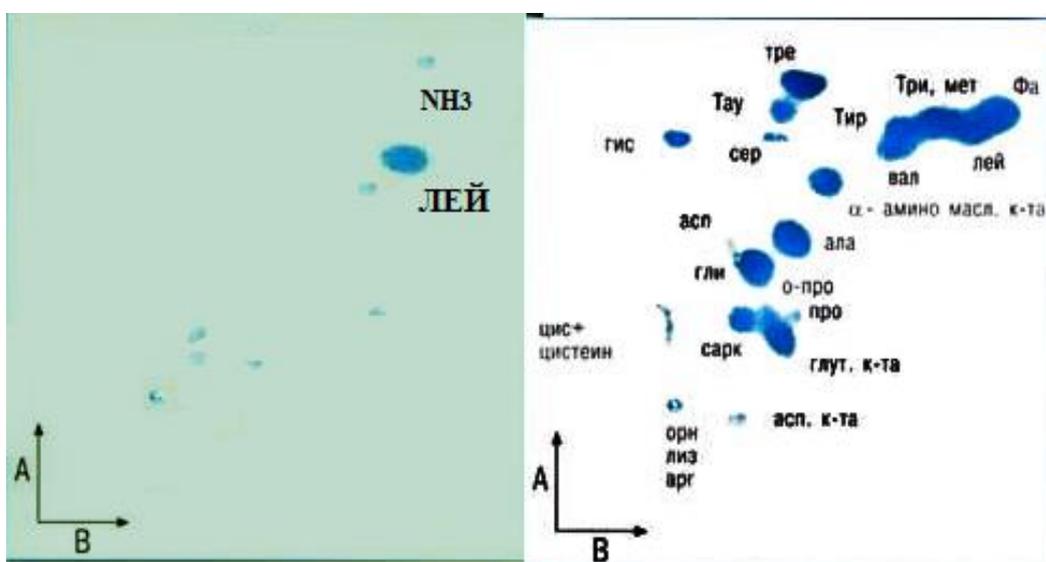


Рис 15. Тонкослойная хроматография дансил производных аминокислот. Слева – гидролизат ПГА-2, справа – схема расположения дансилпроизводных аминокислот при двумерной хроматографии.

ТАБЛИЦА 18. Аминокислотный состав ПАГ-2

НАЗВАНИЕ АМИНОКИСЛОТЫ	МОЛЬ%
Аспарагиновая кислота	3,8±0.2
треонин	5,6±0.1
серин	4,5±0.34
Глутаминовая кислота	3,9±0.34
пролин	4,6±0.2
глицин	7,4±0.15
аланин	9,3±1.04
Цистеин	1,9±0.8
валин	7,5±0.4
Метионин	1,7±0.25
изолейцин	7,6±0.42
лейцин	9,7±0.64
тирозин	2,1±0.52
фенилаланин	4,0±0.4
гистидин	4,4±0.8
лизин	9,3±0.3
аргинин	12,7±0.6
триптофан	Не определяли

Аминокислотный состав ПГА-2 приведен в таблице 18. 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.

3.3.3. Метод твердофазного иммуноферментного анализа ПГА-2

Иммунизируя животных очищенным препаратом ПГА-2, , получены гипериммунные антисыворотки к нему, позволившие разработать методы количественного определения ПГА-2 в экстрактах семенников и эпидидимисов крыс на различных стадиях токсического воздействия, используя минимальное количество биоматериала.

Для определения корового белка протеогликана альфа-2(ПГА-2) применяли классический вариант твердофазного иммуноферментного анализа в «сэндвич» модификации, описанной в разделе «материалы и методы»

Антитела для адсорбции на планшетах получали двойным переосаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией на ДЕАЕ сефадексе. Антитела. Предназначенные для конъюгации с пероксидазой получали на иммуносорбенте, содержащим чистый препарат ПГА-2, иммобилизованный на цианбромированной сефарозе CL-4B, из расчета 10мг/мл суспензии. Элюцию проводили 0,01М HCl в 0,1М трис-глициновом буфере pH=2,2. Фракции антител диализовали и лиофилизировали. Методика конъюгации антител с пероксидазой описана в разделе «Материалы и методы» Посадку антител на твердую фазу проводили без особенностей при +4°C в течении ночи. Для выбора оптимальной концентрации посадочных антител активировали по 4 планшеты при концентрациях антител к ПГА-2 40, 20, 10, 5,0, и 2,5 мкг/мл. концентрация антител существенно (рис.14) влияла наклон и рабочий диапазон калибровочной кривой . По нашим данным концентрация 20 мкг/мл позволила получить калибровочную кривую с максимально возможным

диапазоном A_{510} . Использование низких концентраций антител снижает точность определения из-за малого угла наклона кривой, особенно при больших концентрациях ПГА-2.

Для подбора концентрации конъюгата антител с ферментом активировали 5 плашек антителами к ПГА-2 в концентрациях 20 мкг/мл и проводили иммуноферментный анализ при различных разведениях конъюгата (от 1/100 до 1/1000). Исходная концентрация меченных антител составляла 3 мкг/мл (рис.15). Оптимальная по наклону и рабочему диапазону калибровочная кривая получена при разведении конъюгата 1/200 (концентрация антител 15 мкг/мл). При более высоких концентрациях конъюгата повышается чувствительность, но снижается рабочий диапазон калибровочной кривой. При больших разведениях снижается точность определения из-за малого прироста A_{510} . Предел чувствительности иммуноферментного определения ПГА-2 составил 15 нкг/мл. Данные определения приведены в таблице 19. 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.

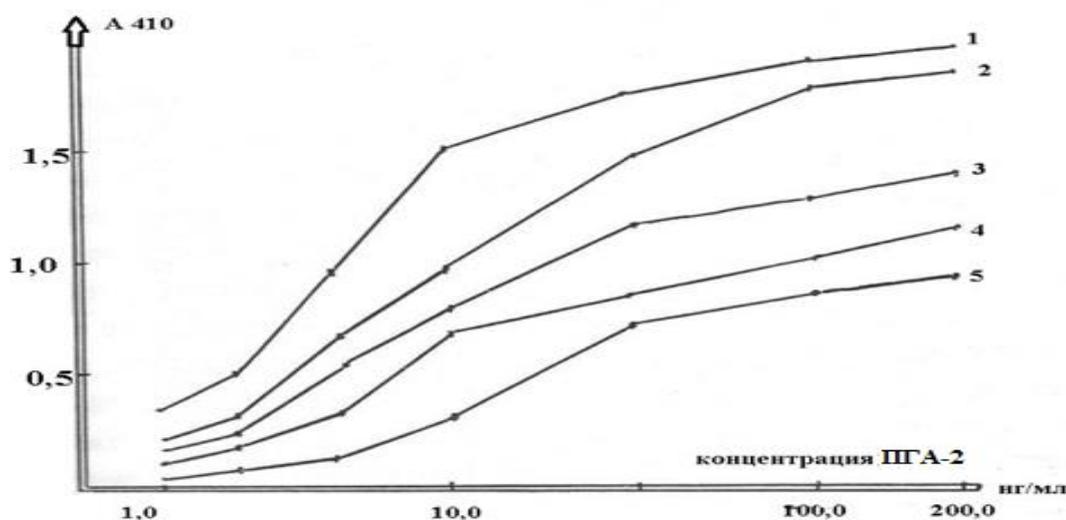


Рис 16. Влияние концентрации посадочных антител на калибровочную кривую иммуноферментного анализа на ПГА-2(объяснения в тексте).1-40,0 мкг/мл; 2-30,0 мкг/мл, 3-25,0 мкг/мл, 4-15,0 мкг/мл, 5- 5,0 мкг/мл.

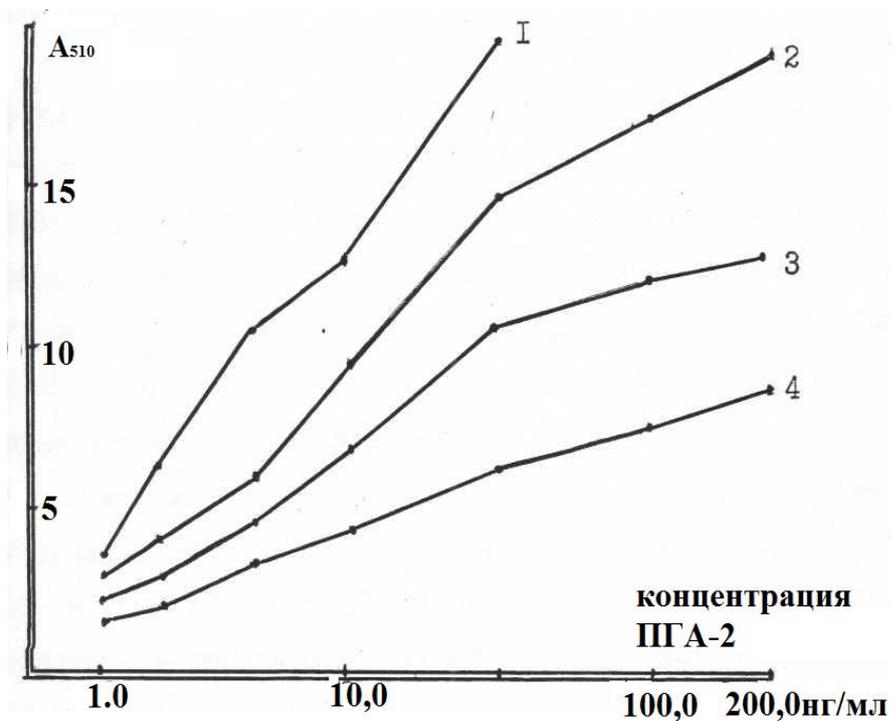


Рис 17. Влияние концентрации конъюгата на калибровочную кривую иммуноферментного анализа на ПГА-2. Разведения: I - 1/100; 2 - 1/200; 3 - 1/400; 4 - 1/600.

С 21 дня уровень ПГА-2 начинает снижаться. Несмотря на всплеск концентрации на 28 день тенденция, рассчитанная по методу наименьших квадратов от 14 дня до окончания затравки – направлена на падение. Интересно, что через 28 дней после окончания затравки уровень ПГА-2 оставался на достоверно низком уровне, а экстраполяция данных показывает, что восстановление уровня ПГА-2 возможно только после 70 дня с момента окончания затравки. К сожалению, в нашем эксперименте не удалось сохранить достаточное количество животных для исследования на этих сроках. Определение ПГА-2 в семенной плазме мужчин (любезно предоставленной из коллекции Центра планирования семьи г.Астрахань). показало высокую вариабильность уровня ПГА-2 и по предварительным данным эта вариабильность связана с различной фертильностью испытанных образцов, но эти данные требуют дополнительной проверки и анализа.

Таблица 19. Уровень ПГА-2 в экстрактах ткани семенников и придатков крыс на разных этапах интоксикации серусодержащим газом.

Характеристика образцов	Число наблюдений	Концентрация ПГА-2 M±m Мкг\мл	P
Контрольные животные	11	1,64±0,1	-
7-й день эксперимента	5	1,77±0,2	≥0,05
14-й день эксперимента	6	1,95±0,05	≥0,05
21-й день эксперимента	7	1,38±0,19	≤0,05
28-й день эксперимента	6	1,11±0,12	≥0,05
35-й день эксперимента	5	0,97±0,08	≤0,05
56-й день эксперимента	9	1,02±0,05	≤0,05
70-й день 3 эксперимента	9	0,76±0,02	≤0,01
94-й день эксперимента	6	0,72±0,03	≤0,01
114-й день эксперимента	17	0,33±0,05	≤0,001
28-й день после окончания эксперимента	9	0,47±0,07	≤0,01

Таблица 20. Обнаружение ПГА-2 в экстрактах тканей и биологических жидкостях некоторых животных и человека.(В скобках указано число наблюдений.)

	Яички и придатки нг\мл	Сыворотка крови нг\мл	почки нг\мл	Семенная плазма нг\мл
крыса	1720,0(17)	3,4 (12)	3,7(7)	Нет данных
собака	≤1,0 (8)	≥1,0 (12)	≥1,0 (5)	≤1,0 (11)
КРС	≤1,0 (6)	≥1,0 (18)	≥1,0 (11)	≤1,0 (8)
свиньи	≤1,0 (7)	≥1,0 (14)	≥1,0 (9)	≤1,0 (5)
человек	247,0 (8)	≥1,0 (21)	≥1,0 (11)	От 85,0 до 487,0 (97)

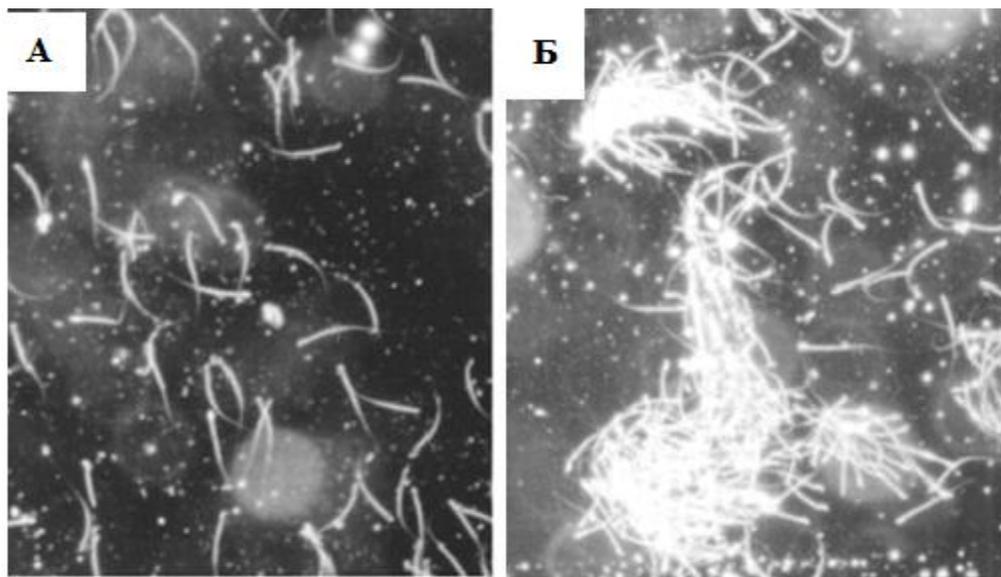


Рис 18.Агглютинация сперматозоидов самцов крыс.

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. Увеличение x100.

Таким образом, нами выделен и охарактеризован новый специфический белок репродуктивной системы самцов крыс. ПГА-2 скорее всего относится к семейству спермадгезинов, т.к. способен связываться с гепарином и вызывает агглютинацию сперматозоидов(рис.18). Сопоставление с другими известными белками этого семейства показывает, что ПГА-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. (табл.20)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩЕГО ГАЗА

Полученные результаты помогают выяснить механизмы действия серосодержащего газа на репродуктивную систему самцов.

Факторы, действующие на мужскую репродуктивную функцию, можно разделить на три группы[42].

1. химические (тяжелые металлы, поллютанты, алкоголь, табакокурение),
2. физические (ионизирующая радиация, микроволновое излучение, высокая температура тела),
3. влияние стиля жизни (сидячая работа, тесная одежда, хронический стресс, некоторые виды спорта, вегетарианство и другие строгие диеты).

Давно обсуждается предложение использовать состояние сперматогенеза, как индикатор общественного здоровья [42]. Региональные экологические особенности факторов риска при этом могут играть решающую роль [13,17,42].

В состав газа АГКМ входит сероводород (регистрационный номер CAS 7783-06-4). Он является промежуточным продуктом многочисленных технологических процессов. Сероводород применяется при синтезе неорганических и органических соединений серы.

Острые отравления сероводородсодержащим природным газом, изучены широко и успешно, а случаев острого отравления природным газом, к счастью, очень мало. В тоже время исследований, изучающих последствия хронического воздействия сероводородсодержащего газанепропорционально мало по сравнению с числом людей, подвергающихся такому воздействию ежедневно.

Хроническое воздействие природного газа, по нашим данным, крайне неблагоприятно сказывается на функциональном состоянии системы воспроизводства потомства крыс, что иллюстрируется ухудшением показателей воспроизводства в группах-2, -3 по сравнению с группой - 1 и бесплодием в группе - 4. Снижение числа плодов у крыс группы-3 вызвано

падением оплодотворяющей способности сперматозоидов в результате хронического воздействия природного газа. Субфертильность проявляется в нарушении нормального действия ферментных систем семенной плазмы и в расстройстве межмолекулярного взаимодействия белков [12,13], вызванном H_2S и его метаболитами (сульфатами, тиосульфатами), то есть нарушением биохимического гомеостаза спермы.

Снижение фертильности может быть вызвано повреждением генетического кода сперматозоидов сероводородсодержащим газом. Подтверждением служит увеличение количества мертворожденных и снижение числа выживших в течение 10 дней постнатального периода. Вероятно, имеются отдалённые последствия влияния серусодержащего газа на крыс-самцов.

Негативное влияние оказывает газ и его метаболиты на сперматогенез и на биохимические системы сперматозоидов. Во всех компонентах гонадной системы самцов белых крыс наблюдается усиление процессов свободнорадикального окисления (СРО) под действием сероводородсодержащего газа АГКМ. Ведущими нарушениями морфофункционального состояния семенников под влиянием газа АГКМ является сокращение количества сперматогенных клеток и эпидидимальных сперматозоидов и возрастает доля дефективных и неподвижных сперматозоидов.

Цитотоксическое действие серусодержащего 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.

Эта гипотеза находит подтверждение при использовании биопротекторного комплекса селексена с аскорбиновой кислотой. Общее количество сперматогенных клеток возрастает в 3 раза, по сравнению с таковым в группе животных, подвергавшихся воздействию газом ($P < 0,001$). Селенсодержащий биокомплекс способствует восстановлению пула незрелых половых клеток на фоне разрушительного действия сероводородсодержащего газа АГКМ. Доля сперматогоний и сперматоцитов возрастает в сравнении с таковой при воздействии газом без протективного применения селенсодержащего комплекса. Наблюдается некоторое восстановление соотношения сперматогенных клеток на стадии превращения сперматид в сперматозоиды, хотя количество сперматозоидов (абсолютное и относительное) остается сниженным по отношению к контрольным показателям. Селенсодержащий биокомплекс, состоящий из селексена и аскорбиновой кислоты проявляет себя эффективно в отношении тестикулярной ткани, обеспечивая защиту половых клеток, а также выполняя, вероятно, строительную функцию за счёт внедрения атомов селена в структуру пептида, участвующего в сборке хвоста сперматозоидов.

Изучение ПГ эпидидимисов и семенников крыс в условиях хронической интоксикации серосодержащим газом выявило дисбаланс электрофоретического профиля ПГ, проявляющийся ростом доли кислых фракций, содержащих большое количество сульфатов. Эти изменения носят обратимый характер и уже через месяц после окончания воздействия серосодержащего газа спектр ПГ приближается к составу ПГ эпидидимисов и семенников контрольной группы. Снижается и уровень сульфатов во фракции протеогликанов, оставаясь тем не менее практически в 2 раза больше чем в контроле. Нами исследованы ПГ эпидидимисов и семенников крыс спустя 4 месяца после окончания воздействия серосодержащего газа только у трех животных и уровень сульфатов снизился, но не достиг нормы ($5,1 \pm 0,4$ мкг/мл). Следовательно, влияние сероводородсодержащего газа Астраханского газового комплекса на

образование ПГ эпидидимисов и семенников крыс носит существенный характер и может (учитывая многостороннее биологическое действие этих полимеров) привести к значительному нарушению функции воспроизводства. Скорость обмена веществ и деления клеток сперматогенного эпителия определяет восстановление нормальной функции не раньше чем через 3 месяца после воздействия серосодержащего газа Астраханского газоконденсатного месторождения. Это соответствует 2 циклам сперматогенеза у крыс.

На первой стадии затравки снижается содержание ГАГ в ткани семенников и эпидидимисов крыс по сравнению с контрольной группой. Далее содержание ГАГ в тканях семенников и эпидидимисов крыс повышается сначала до нормы, а затем и выше нормы.

Возможно, это связано с большей чувствительностью белок - синтезирующих систем к токсическому агенту чем систем синтеза ГАГ и, несмотря, на абсолютное снижение уровня ГАГ их относительное содержание на единицу веса белка растет. Особенно заметно (почти в 2 раза по сравнению с нормой) этот процесс идет в период восстановления после окончания действия токсического агента

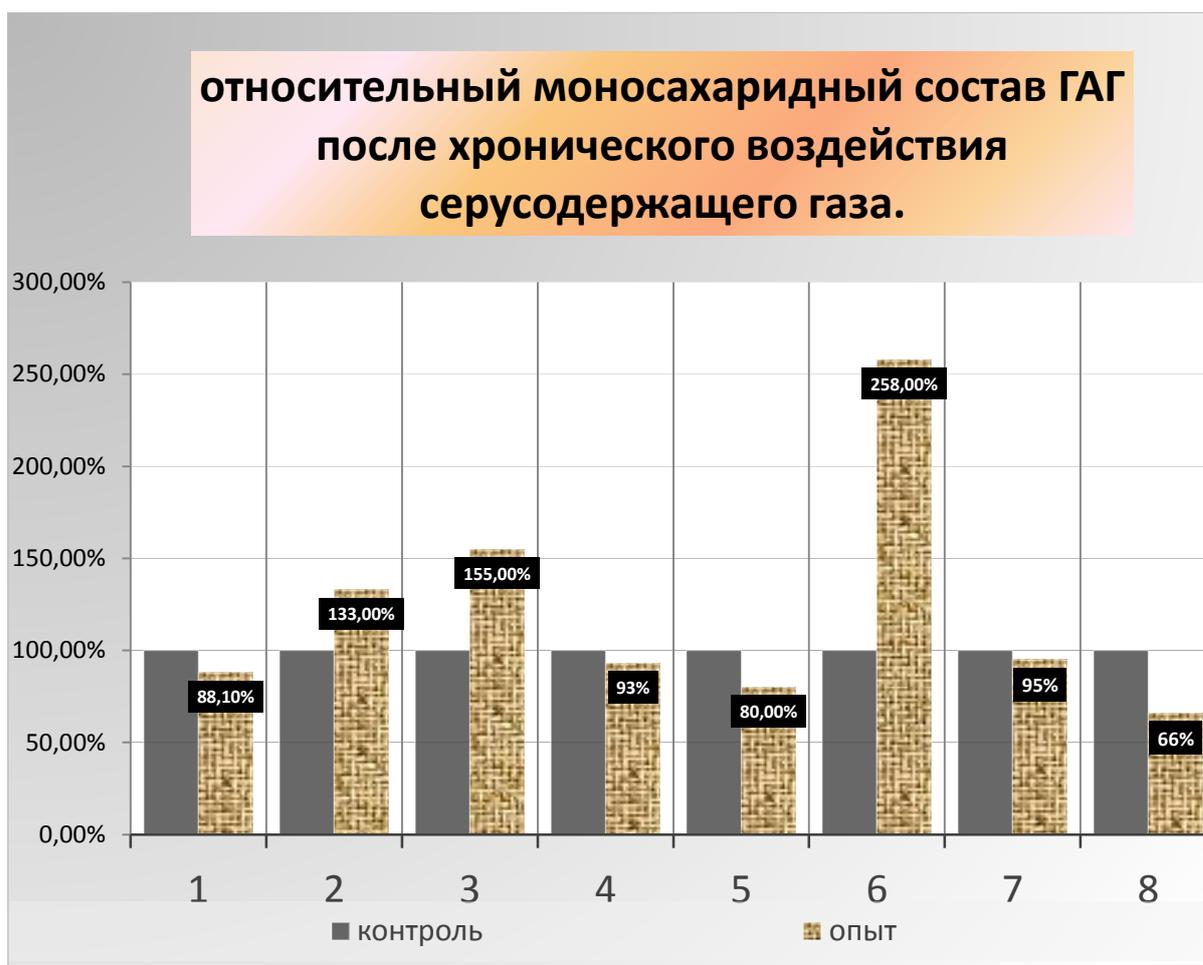
При ионообменной хроматографии ГАГ в контрольной группе всего насчитывается 15 фракций, Хроматограмма ГАГ нормальной ткани эпидидимисов и семенников содержит 10 фракций выходящих при ионной силе хлорида натрия до 0,2 М, причем, эти фракции содержат 77,6% от общего контента ГАГ. Фракционный состав ГАГ эпидидимисов и семенников крыс опытной группы достоверно меняется. Весь спектр содержит 12 фракций, Фракции №1,2,3,4 ГАГ эпидидимисов и семенников крыс содержат 7,2% контента и элюируются до 0,12 М NaCl. Фракции № 6-9, содержащие более 66,4% их общей массы, располагаются в зоне от 0,21 до 0,31М NaCl. На долю остальных фракций(10,11,12) приходится 26,4%. Причем это самые кислые ГАГ, элюируемые при 0,42-0,49М NaCl. Сравнивая долю кислых фракций показало, что, в опытной группе содержится 92,8%кислых фракций против

22,4% в контрольной группе. Таким образом, спектр ГАГ эпидидимисов и семенников крыс подвергавшихся воздействию сероводородсодержащего газа обеднен и содержит компоненты с отрицательным зарядом, значительно большим, чем в норме, а процент их в опытной группе резко возрастают к общей доле ГАГ более чем в 4 раза.

Сопоставление данных хроматографии и определения сульфатов однозначно свидетельствует в пользу повышения количества пересульфатированных ГАГ в протеогликанах семенников и придатков крыс, подвергшихся хроническому воздействию серосодержащего газа. Такой биохимический сдвиг может привести к заметным физиологическим последствиям. Известно, что сульфатированные протеогликаны, и в частности гепаран-сульфат протеогликан семенной плазмы [162] играет ключевую роль в процессе деконденсации хроматина сперматозоидов, связывая протамины и отделяя их от нитей ДНК. Коммуникация между спермой и яйцеклеткой во время оплодотворения - самый яркий пример межклеточной коммуникации, включающей систему распознавания протеогликанов. Прямые эксперименты показали [144], что малейшее изменение заряда этого протеогликана ведет к торможению деконденсации и нарушению оплодотворения. Хорошо известно [43], что межклеточные взаимодействия и адгезивная способность имеет существенное значение в процессе оплодотворения и не только на этапе взаимодействия ооцита со сперматозоидом но и на различных предшествующих этапах. Причем, различные протеогликаны имеют сродство к самым разным молекулам и, например, известна способность тромбоцитов адгезировать на хондроитин/дерматансульфат протеогликана [90]. Было показано, что клетки яичника китайского хомячка, сорбируют на себя в 5-6 раз больше добавленных кератансульфатпротеогликанов, чем хондроитинсульфатпротеогликанов [171].

Полученные нами данные о моносахаридном составе протеогликанов позволяет судить об изменении в качественном составе ГАГ. В образцах гидролизатов ГАГ семенников и придатков крыс, подвергавшихся воздействию

сероводородсодержащим газом достоверно повышается доля глюкозамина более чем в 2 раза, что при неизменном уровне идурановой кислоты оставляет за гепаринсульфатом первое место среди возможных гликозаминогликанов.



1

Рис. 18. Изменение моносахаридного состава ГАГ после хронического воздействия серусодержащего газа. Содержание моносахаридов в контрольной группе взято за 100%. 1-галактозамин, 2- глюкоза, 3-манноза, 4-галактоза, 5 - ксилоза, 6-глюкозамин. 7-идурановая кислота, 8- глюкуроновая кислота. Моносахаридный состав контрольной группы принят за 100%

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 серусодержащего газа происходит изменение соотношения трех основных гликозаминогликанов.

Уменьшается доля хондроитинсульфата и увеличивается доля кератансульфата.

Это может привести к нарушениям сперматогенеза еще и по причине нарушения регуляции этого клеточного каскада. Так как, например, выявлен широкий спектр регуляторных молекул (среди которых факторы роста фибробластов 1 и 2 и фактор роста нервов), взаимодействующих с дерматансульфатом [192,205,206], но не с кератансульфатом. Получены данные, показывающие роль хондроитинсульфата в активации процесса взаимодействия фактора ингибирования лейкемии(LIF) с его рецептором на поверхности сперматогенных клеток. В свою очередь, рецепция LIF стимулирует дифференцировку сперматогоний-В. Замена хондроитинсульфата на гепарансульфат останавливает узнавание рецептора.[198,175].

Природный сероводородсодержащий газ оказывает цитотоксическое действие, вызывающее гибель сперматогоний. Серусодержащий газ блокирует пополнение стабильного пула сперматогоний типа А, тормозит дифференцировку сперматид в сперматозоиды и процесс мейоза (скорее всего редукционное деление). Торможение мейоза, вероятно, связано с нарушением взаимодействия сперматогенного эпителия с регуляторными молекулами, неспособными взаимодействовать с измененными протеогликанами внутриклеточного матрикса.

Детальное исследование на уровне индивидуальных молекул позволяет сделать иммунохимический анализ. Нами выделена и исследована молекула корового белка протеогликана ПГА-2, который представляет собой высокомолекулярный гепаринсвязывающий тетрамерный белковый комплекс (245-260 KD) с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов. Учитывая динамику снижения уровня ПГА-2 в ткани семенников и придатков крыс, перенесших хроническое воздействие серусодержащего газа и данные газохроматографического исследования гидролизата ГАГ семенников и придатков крыс, перенесших хроническое воздействие серусодержащего газа можно предположить, что идентифицированный нами ПГА-2 представляет

собой коровий белок хондроитинсульфат-протеогликана. Это предположение основывается на следующем.

Во-первых, по данным газохроматографического исследования в ткани семенников и придатков крыс, содержится три основных типа гликозаминогликанов гепарансульфат, хондроитинсульфат и кератансульфат. Во-вторых, наиболее вероятно получение антител именно к мажорным протеогликанам.

В-третьих, иммунохимический анализ свидетельствует о снижении ПГА-2 в ткани семенников и придатков крыс, перенесших хроническое воздействие серусодержащего газа, а среди гликозаминогликанов снижается уровень только хондроитинсульфата.

Сравнительный анализ литературных данных показывает, что в репродуктивных органах сацов животных и человека описано большое количество сходных протеинов, так или иначе сопрягающихся с ГАГ и, соответственно, по этому признаку называемые протеогликанами. Chandonnet, L, et all [52] и Miller et all [140,141] впервые описали существование в семенной плазме быка белка, связанного с гепарином. Позднее изучен его аминокислотный состав, точки дисульфидных связей, места О-гликозилирования и N-концевая последовательность (Глицин-аспартат-изолейцин). Этот, гепаринсодержащий белок (получивший название - BSP-30K) состоит из 157 аминокислот и 6 остатков треонина с О-гликозилированием. Позднее этот белок получил название спермадгезин. Гепаринсвязывающие специфические полипептиды семенной плазмы борова pB1 и жеребцов HSP-1 и HSP-2 [45] гомологичны спермадгезину. Протеогликан борова pB1 содержит 105 аминокислот, N-концевая аминокислота Аспарагин. pB1 имеет гомологию последовательности аминокислот 60-65 % со своими конскими и бычьими аналогами. pB1 имеет мол.массу 14 KD, а в комплексе с гепарином 35-40 KD.

Таблица 21. Сравнительная характеристика корового белка ПГА-2

критерии	животное	Мол.масса	N-концевая АК	Электрофоретическая подвижность
ПГА-2	Крыса, человек	62KD	LEU	альфа-2
BSP 30	бык	30 KD	GLY	Альфа-1
pB1	боров	14 KD	ASP	преальбумин
Z13	бык	13 KD	ASN	преальбумин
тестикан	бык	15,5 KD	TRP	Нет данных
aSFP	бык	12,9 KD	GLY	Бета-глобулин
CRISP	Крыса, человек	32 KD	ALA	преальбумин

Выделен и затем изучен, методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле [199], белок группы спермадгезинов, состоящей из двух 13-KD субъединиц, соединенных S-S связями. Белок назван Z13 и секвенирована последовательность его аминокислот и определена локализация дисульфидной связи. Z13 имеет 85% гомологию N-концевая аминокислота Аспарагин, также как в pB1. В яичках быка был обнаружен ПГ [22], получивший название тестикан. Очищен и охарактеризован его белковый кор. Он содержит несколько доменов, которые встречаются в биоактивных пептидах (фактор роста нервов, остеонектин, фибромодулин, фактор миграции Б). Но, в отличие от перечисленных макромолекул, тестикан содержит уникальную аминокислотную последовательность из 46 аминокислот, в которой каждая 3-я аминокислота, включая N-концевую триптофан. Из семенной жидкости крупного рогатого скота выделен протеогликан [166]. После расщепления углеводной составляющей получена белковая фракция кислого характера с мол. массой 12,9 KD, получившая название aSFP. Этот белок, исследователи относят к семейству спермадгезинов по той причине, что последовательность

аминокислот α SFP содержит участки повторяющиеся последовательности аминокислот в ранее описанном коровом протеине BSP 30. Наивысшая гомология характерна для гидрофобного ядра α SFP.

Перечисленные протеогликаны и их коровые белки в сравнении с выделенным и охарактеризованным нами ПГА-2 сведены в таблицу 21, которая наглядно демонстрирует уникальность ПГА-2.

ВЫВОДЫ.

1. Хроническое воздействие природного газа приводит к снижению числа плодов у крыс и вызвано снижением оплодотворяющей способности эякулята.
2. Хроническая интоксикация серосодержащим газом приводит к снижению синтеза протеогликанов эпидидимисов и семенников крыс, проявляющееся 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 коровий белок протеогликана семенников и придатков крыс с электрофоретической подвижностью альфа-2 глобулинов, молекулярной массой 62 KD, 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сочетание способов обратимой преципитации и колоночной хроматографии на различных носителях дает возможность при минимальных экономических затратах получать коровий 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 СОКРАЩЕНИЙ.

АГКМ – Астраханское газоконденсатное месторождение

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАГ- гликозаминогликаны

ГЖХ - газожидкостная хроматография

ДМС - 1,9-диметилметиленовый синий

DNS-Cl -диметиламинонафталинсульфонил (дансил) хлорид

ИДА – иммунодиффузионный анализ в агаре

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭФ – иммуноэлектрофорез

КД - килодальтоны

МС - моносахариды

ПААГ – полиакриламидный гель

ПГ - протеогликианы

ТМС- триметилсилиловый эфир

СВСГ АГКМ-сероводородсодержащий газ астраханского газоконденсатного месторождения

УДФ- уридиндифосфат

УТФ-уридинтрифосфат

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Д. 1994. Молекулярная биология клетки. М., "Мир".
2. Башкатов С.А. Гликозаминогликаны в механизмах адаптации организма. - Уфа: БашГУ, 1996. -.144 С.
3. Бугаева Л. И., Спасов А. А., Кузубова Е. А.// Влияние бемитила на половое поведение и сперматогенез крыс /Экспериментальная и клиническая фармакология : — 2006. — Том 69,№ 1 . — С. 38-41.
4. Бусев И.И. Аналитическая химия серы //Изд МГУ 1999 г с. 176-179.
5. Воздействие на организм человека опасных и вредных экологических факторов. / Под ред. Л. К. Исаева. – М., 1997. – Т.1-2.
6. Вяхирев Д.А., Шушунова А.Ф. Руководство по газовой хроматографии. М.: Высш. шк., 1987.
7. Иммунологические методы. Фримель Г. (ред.)1987. 476с.
8. Кондашевская М.В. Современные представления о роли гепарина в гемостазе и регуляции ферментативной и гормональной активности//Вестник РАМН, 2010, № 7, С. 35–43.
9. Лукьянов П.А., Журавлева Н.В. Современная гликобиология и медицина //Вестник Дальневосточного отделения РАН. – 2004. – Вып.3. – С. 24-34.
10. Мамина В. П., Семенов Д. И. Метод определения количества сперматогенных клеток семенника в клеточной суспензии. // Цитология. – 1976. – №7. – С.913-915.
11. Николаев А. А. , Луцкий Д. Л. Морфологическое исследование эякулята: Методическое пособие. – Астрахань, 1999.
12. Николаев А. А., Бойко О.В.. Биохимические исследования в андрологии Методическое пособие. – Астрахань, 2013.280 с..
13. Николаев А. А., Луцкий Д. Л., Ложкина Л. В., Мичурин А. В. Репродуктивная функция мужчин, состоящих в бесплодном браке. // Сбор.

- науч. тр. «Актуальные вопросы дерматологии и венерологии». – Астрахань, 1998. – С.169-175.
14. Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны. / Под ред. Н. Ф. Измерова. – М., 1991.
 15. Рабек Я Экспериментальные методы в химии полимеров (Часть 2) изд. МГУ -1998-496с.
 16. Серов В.В., Шехтер В.Б. Соединительная ткань - М.: Медицина, 1981. - С.312.
 17. Сивочалова О. В. Репродуктивное здоровье семьи как проблема медицины труда. // Мед. труда и пром. экология. – 1995. – №9. – С.1-4.
 18. Годоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. //4-е изд. русское София «Медицина и физкультура», 1963.
 19. Трахтенберг И. М., Тимофиевская Л. А., Квятковская И. Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей. – Рига, 1987.
 20. Фукс Б.Б., Фукс Б.И. Очерки морфологии и гистохимии соединительной ткани.- Л.:Медицина,1968. - 216с.
 21. Хьюз Р. Гликопротеины.-М.: Мир.- 1985.-476с.
 22. Alliel P. M, Perin J-P., Jolles P., Bonnet F J. Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behavior// Eur. J. Biochem. - 2003-v.224,-p. 347-350.
 23. Arend P. ABO (histo) blood group phenotype development and human reproduction as they relate to ancestral IgM formation.\\ Immunobiology. 2015 1. pii: S0171-2985(15)30023-1. doi: 10.1016/j.imbio.2015.07.003
 24. Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarroel V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E.N. Sperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. \\Arch Androl_- 2012 –v.;55-№3-p.131-136..
 25. Asada M., Shinomiya M., Suzuki M., Honda E., Sugimoto R., Ikekita M., Imamura T. Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family. Biochim. Biophys. Acta. -2011-.v. 1790 -p 40—48.

26. Avci FY., Karst NA., Linhardt RJ. Synthetic oligosaccharides as heparinmimetics displaying anticoagulant properties. // *Curr Pharmac Design.*-2003.-№9.-p. 2323-2335.
27. Baccetti B., Burrini A. G., Collodel G. et al. Immunocytochemistry and sperm pathology. // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* – 1988. – №1. – P.209-224.
28. Bakala H., Delaval E., Hamelin M., Bismuth J., Borot-Laloi C, Corman B., Friguet B. Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N (epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. // *Eur. J. Biochem.* - 2003. - V.270. - N10. - P.2295-2302.
29. Bedford M. The implications of unusual sperm-female relationships in mammals. In: Gagnon C (ed.), *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications.* Vienna, IL, USA: Cache River Press;1999-p.81–922.
30. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. // *Nature.* 1995 –v.377-p.630–632.
31. Bernfield M., Gotte M., Park P. W., Reizes O., Fitzgerald M. L., Lincecum J., Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* \1999-v.68 -p.729—777.
32. Biermann L, Gabius HJ, Denker HW. Neoglycoprotein-binding sites (endogenous lectins) in the Fallopian tube, uterus and blastocyst of the rabbit during the preimplantation phase and implantation.// *Acta Anat* 1997-v.160-p.159–171.
33. *Biology of proteoglycans.* ed. by T N. Wight, R.P Mecham, San Diego [a.o.], 2007
34. Bird T.A., Schwartz N.B., Peterkofsky B. Mechanism for the decreased biosynthesis of cartilage proteoglycans in the age guinea pig // *J. Biol. Chem.*- 1996. - Vol.271. -№24. -P.11166-11172.
35. Bitter T., MuirH.M.. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* -1962-v.4-p.330—334.

36. Bjornsson S.. Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis.// *Anal. Biochem.*- 1998-v.256 –p. 229—237.
37. Bourin M-C, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation.// *Biochem J*- 1993-v.289 -n 2-p. 313–30.
38. Boyle J., Luan B., Cruz T.F., Kandel R.A. Characterization of proteoglycan accumulation during formation of cartilagenous tissue in vitro // *Osteoarthritis Cartilage*. - 1995. - Vol.3. - №2. -P.117-125.
39. Brandan E., Larrain J. Heparan sulfate proteoglycans during terminal skeletal muscle cell differentiation: possible functions and regulation of their expression.\\ *Basic Appl. Myol.*- 1998-v.8-p.107—113.
40. Brown G. M., Huckerby T. N., Morris H. G., Abram B. L. and Nieduszynski I. A. Oligosaccharides derived from bovine articular cartilage keratan sulfates after keratanase II digestion: Implications for keratan sulfate structural fingerprinting // *Biochemistry* 1994. V.33. P.4836-4846..
41. Brown G, Venter EH, Morley P, Annandale H.The effect of Rift Valley fever virus Clone 13 vaccine on semen quality in rams. *Onderstepoort J Vet Res*. 2015 –v.82-n.1p.919-926. doi: 10.4102/ojvr.v82i1.919
42. Bujan L, Sergerie M, Moinard N, Martinet S, Porte L, Massip P, Pasquier C, Daudin M.Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment. *J Androl.*- 2007 v.28--№3-p.:444-452.
43. Buckley C D., Rainger G. E., Bradfield P. F., Nash G. B., Simmons D. L. Cell adhesion: more than just glue. //*Mol. Membr. Biol.* -1998.-v.15 p 167—76.
44. Caballero I., Vazquez J. M., Gil M. A., Calvete J. J., Roca J., Sanz L., Parrilla I., Garcia E. M., Rodriguez-Martinez H., Martinez E.A. Does Seminal Plasma PSP-I/PSP-II Spermadhesin Modulate the Ability of Boar Spermatozoa to Penetrate Homologous Oocytes In Vitro.// *J. Andrology*, -2004-Vol. 25-No. 6,- p.352-361.

- 44a. Cajazeiras JB, Melo LM, Albuquerque ES, Rádis-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJ Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. *Genet Mol Res.* 2009 Sep 22;8(3):1147-57.
45. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. // *FEBS Lett.* 2007 –v.407-№2-p.201-206.
46. Calveteal J.J., Mannb K., Sanz L. The primary structure of BSP-30K, a major heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma // *FEBS Letters-* 1996- p.399 –p. 147-152
47. Canales A., Angulo J., Ojeda R., Bruix M., Fayos R., Lozano R., Gimnez-Gallego G., Martin-Lomas M., Nieto PM., Jimnez-Barbero J. Conformational flexibility of a synthetic glycosaminoglycan bound to a fibroblast growth factor. FGF-1 recognizes both the 1C1 and 2S 0 conformations of a bioactive heparin-like hexasaccharide // *Am Chem Soc-* 2005.- V. 127.-P.5778-5779.
48. Carrell DT, Emery BR, Peterson CM The correlation of sperm chromatin decondensation following in vitro exposure to heparin and sperm penetration rates. // *Assian J. Reprod Genet.* 2001-v17-№9-p.560-564.
49. Carrino D.A, Calabro A, Darr AB, Dours-Zimmermann MT, Sandy JD, Zimmermann DR, Sorrell JM, Hascall VC, Caplan AI. Age-related differences in human skin proteoglycans. \\ *Glycobiology.*-2011 –v.21-№2-p.257-278.
50. Casu B., Guerrini M., Guglieri S., Naggi A., Perez M., Torri G., Cassinelli G., Ribatti D., Carminati P., Giannini G., Penco S., Pisano C, Belleri M., Rusnati M., Presta M. Undersulfated and glycol-split heparin derivatives endowed with antiangiogenic activity // *Med Chem.*- 2004.- V.47.-P.838-848
51. Centurion F., Vazquez J. M., Calvete J. J., J. Roca, L. Sanz, I. Parrilla, E. M. Garcia, Martinez E.A. Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility

- of Boar Spermatozoa to High Dilution//Biology of Reproduction -2003 -v. 69 n.2-p. 640-646.
52. Chandonnet, L, Roberts, K.D., Chapdelaine, A. and Manjunath P. Biology of Reproduction // Mol. Repr. Dev. -1990-v.26,- p.313-318
 53. Culp L. A., Rollins B. J., Buniel J., Hitri S. J. Two functionally distinct pools of glycosaminoglycan in the substrate adhesion site of murine cells.// Cell Biol. 1998.- v.97 –p. 788—801.
 54. Conrad H. E. Heparin-binding proteins. Academic Press, San Diego. 2007.
 55. Cool S. M., Nurcombe V.. Heparan sulfate regulation of progenitor cell fate\\ J. Cell. Biochem.- 2006-v.99-n.4-p.1040—1051.
 56. Cortes PP, Orihuela PA, Zunigan LM, Velasquez LA, Corxatto HB. Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface// Biol Reprod-2004-v.71-p.1262–1269.
 57. Creasy D. M. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol.35, - №2. – P.119-131.
 58. Daniel C., Nolting J., von Boehmer H. Mechanisms of self-nonsel discrimination and possible clinical relevance //Immunotherapy. – 2009. – Vol. 1, №4. – P. 631–644.
 59. DeAngelis P. L. and Achyuthan A. M. Yeast-derived recombinant DG42 protein of *Xenopus* can synthesize hyaluronan in vitro // J. Biol. Chem. 1996. V.271. P.23657-23660.
 60. DeAngelis P. L., Methods for the Pasteurella glycosaminoglycan synthases: enzymes that polymerize hyaluronan, chondroitin, or heparosan chains. // Methods Mol Biol,- 2013-v.1022-p.215-227.
 61. Deepa S. S., Yamada S., Zako M., Goldberger O., Sugahara K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with

- heparan sulfate chains to bind growth factors. *J. Biol. Chem.* -2004-v.279 –p. 37368—37376.
62. DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. // *Biol Reprod*- 1995-v.;52-p.1395–1403.
 63. Desnoyer L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids.\\ *J Biol Chem* -1999-v.267-p.10149–10155..
 64. Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, Cox B, Nawrot TS, Van Larebeke N, D'Hooghe T. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients.\\ *EnvironInt.*-2015-v.84-p.154-160. doi: 10.1016/ j.envint. 2015.07.017.
 65. Ding Z., Qu F., Guo W., Ying X., WU M., Identification of Sperm Forward Motility-Related Proteins in Human Seminal Plasma *Molecular reproduction and development* -2007 -74:1124–1131.
 66. Dische Z.. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*- 1947-v.167 –p.189—192.
 67. Droguett R., Cabello-Verrugio C, Riquelme C, Brandan E. Extracellular proteoglycans modify TGF-P bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation.// *Matrix Biol.* -2009.v. 25 –p. 332—341.
 68. Dietrich MA, Arnold GJ, Fröhlich T, Ciereszko A In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa.\\ *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2014 Dec;12:10-5. doi: 10.1016/j.cbd.2014.09.003.
 69. Ercott RA, Panitch A. Glycosaminoglycans in biomedicine \\ *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013 –v.5-№4-p,388-98.
 70. Ekhlasi-Hundrieser M., Gohr K., Wagner A., Tsoleva M., Petrunkina A., Topfer-Petersen E. Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig1 // *Biology OF Reproduction* -2005-v.73-p.536–545.

71. Eriksen G. V., Carlstedt I., Morgelin M., Uldbjerg N., Malmstrom A. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. //Biochem. J.- 1999-p.340-p- 613—620.
72. Eriksen G. V., Malmström As, Uldbjerg N. Human seminal proteoglycans in relation to in vitro fertilization- J.Reprod-2007-v21-p.3241-3250.
73. Evanko S. P., Tammi M. 1., Tammi R. K, Wight T. N. Hyaluronan-dependent pericellular matrix.\\ Adv. Drug. Deliv. Rev -2007-v59 –p.1351—1365.
74. Farndale R. W., Buttle D. J., Barrett A. J.. Improved quantitaion and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.// Biochim. Biophys. Acta.- 1986- v. 883-p.173—177.
75. Fransson L. A., Belting M., Jonsson M., et al. Biosynthesis of decorin and glypican // Matrix Biol. 2000. V. 19. P.367-376.
76. Fransson LA. Structure and function of cell-associated proteoglycans// TIBS.- 1987.-V.12.-P.406-411.
77. Fraser J. R. E., Laurent T. C. and Laurent U. B. G. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover // J. Intern. Med. 2007. V.242. P.27-33.
78. Fraser R, Chen Y, Guptaroy B, Luderman KD, Stokes SL, Beg A, DeFelice LJ, Gnegy ME. An N-terminal threonine mutation produces an efflux-favorable, sodium-primed conformation of the human dopamine transporter. Mol Pharmacol.-2014 –v.86-n.1-p.76-85.
79. Fao Y, Zhao S, Wang P, Lu S, Li X, Chen J.Effect of seminal proteoglycans on the bonding properties of spermatozoa.\\ Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.- 2014 –v.49-n12-p.753-757.
80. Fukuta M., Inazawa J., Torii T., Tsuzuki K., Shimada E. and Habuchi O. Molecular cloning and characterization of human keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase // J. Biol. Chem. 1997. V.272. P.32321-32328.
81. Fulmus J, Capurro M.The role of glypicans in Hedgehog signaling.\\ Matrix Biol. 2014 v.35-№4-p248-252. doi: 10.1016/j.matbio.2013.12.007.
82. Funderburgh J.L, Kao WW, Xia Y, Liu CY, Conrad GW. Focus on molecules: lumican.\\Exp Eye Res.- 2006- v.82-№1-p.3-4.

83. Gallagher J. T.. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. //J. Clin. Invest. -2010-v.108-p/357-361.
84. Goder B., Halden Y., Rek A., Mosl R., Pye D., Gallagher J., Kungl AJ. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites // Biochemistry.-2002. - Vol. 41-#5 -p.1640-1646.
85. Goodison S., Urquidi V., Tarin D.. CD44 cell adhesion molecules. Mol. Pathol. -1999-v.52 -p.189—196.
86. Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P. Interstitial guidance of cancer invasion. // J Pathol. - 2012 -v.226-№2-p.185-199. doi: 10.1002/path.3031
87. Gotting C, Kuhn J, Brinkmann T, Kleesiek K. Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men (Clin Chim Acta. 2002- v317-№2-p.199-202.
88. Gualtieri R, Talevi R. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro.// Reproduction- 2008-v.130-p.12576–12584.
89. Girish C, Shweta O, Raj V, Balakrishnan S, Varghese RG Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. // Indian J Physiol Pharmacol. 2014 -v.58-№4-p.416-22..
90. Guidetti G., Bertoni A., Viola M., Tira E., Balduini G, Torti M.. The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. Blood.- 2002-v.100 -p. 1707—1714.
91. Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir.// Biol Reprod-2009-v.69-p.609–615.
92. Hascall V. C, Calabro A., Midura R. J., Yanagishita M. Isolation and characterization of proteoglycans. Methods Enzymol. 2001-v..245-p. 390—417.
93. Hassell J., Yamada Y., Arikawa-Hirasawa E. Role of perlecan in skeletal development and diseases // Glycoconjugate .- 2003.-V.19.-P.263-267.

94. Heremans A., Cassiman J. J., Berghe H. V. D., David G. Heparan sulfate proteoglycan from the extracellular matrix of human lung fibroblasts. //J. Biol. Chem.- 1988-v..263 –p. 4731—4739.
95. Harder A, Möller AK, Milz F, Neuhaus P, Walhorn V, Dierks T², Anselmetti D Catch bond interaction between cell-surface sulfatase Sulf1 and glycosaminoglycans\\Biophys J. 2015 –v.108-n.7-p.1709-1717. doi: 10.1016/j.bpj.2015.02.028.
96. Hunter R.H, Huang WT, Holtz W. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. //J Reprod Fertil 1998; 114:17–23.
97. Hunter R.H.F. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation.\\ J Reprod Fertil -1997-v. 63-p.109–117.
98. Hunter RH, Rodriguez-Martinez H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes.//Mol Reprod Dev – 2004-v.67-p.243–250.
99. Hunter RH. Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs.// Reprod Domest Anim- 2007-№37 –p.186–190
100. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa //Fertil Steril. 2002-v79-Suppl 3-p.1616-1624.
101. Ignatz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM, Suarez SS. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal spermreservoir. //Biol Reprod 2007-v.70-p.1608–1612.
102. Iida J., SkubitzA. E. N., Furcht L. T., Wayner E. A., McCarthy J. B.. Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and a4pi integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin.\\ J. Cell Biol-2011-v. 129 –p. 431—444.
103. Iozzo R. V.. Proteoglycans: structure, biology, and molecular interactions. N.Y. Marcel Dekker Inc.- 2000-442 p.

104. Iozzo R. V., Murdoch A. D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. \\ FASEBJ. 1996.-v.10-p.598—614.
105. Iozzo R. V.. Proteoglycan protocols. //Methods Mol. Biol. N.J. Humana Press.- 2004-v.171-p.576-579
106. Iozzo R. V.. The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans// J. Biol. Chemistry, 2002-v278- p.18843-18846.
107. Iozzo R.V, Schaefer L.Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans \\Matrix Biol.-2015-v.42n.3-p.11-55.
108. Kurilo LF [Testing system for factors damaging female and male gametes and gonads. \\ Gig Sanit. 2011 Sep-Oct;(5):72-78.
109. Kajazeiras B, Melo L M, E S Albuquerque, G Rádis-Baptista, B S Cavada, V J F Freitas Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat spermadhesin Bdh-2 cDNA// Genetics and molecular research GMR -2009- V. 8, Iss. 3- p. 1147-1157.
110. Kaiser K., Benner R. Determination of amino sugars in environmental samples with high salt content by high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. //Anal Chem. 2000 –v.72-№11-p.2566-2572.
111. Kaji T., Sakurai S., Yamamoto C, Fujiwara Y., Yamagishi S., Yamamoto H., Kinsella M., Wight T. N.. Characterization of chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans synthesized by retinal pericytes in culture.// Biol. Pharm. Bull. - 2004-v.27 –p.1763—1768.
112. Kaneto M., Kanamori S., Hishikawa A., Kishi K. Epididymal sperm motion as a parameter of male reproductive toxicity: sperm motion, fertility, and histopathology in ethinylestradiol-treated rats. // Reprod. Toxicol. – 1999. – Vol.13, -№4. – P.279-289.
113. Kazuyuki S., Tadahisa M., Toru U, Souhei Mizuguchiz, Kazuya N., Hiroshi K. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate // Current Opinion in Structural Biology. 2003. -V.13.- P.612-620.

114. Kinoshita S., Saiga H. The role of proteoglycan in the development of sea urchin embryos caused by the disturbance of proteoglycan synthesis// *Exp. Cell. Res.*- 1999.-V.143,--#2.-p.229-236.
115. Kirchhoff C, Schroter S. New insights into the origin, structure and role of CD52: a major component of the mammalian sperm glycocalyx.//*Cells Tissues Organs* 2011-v.168-№3-p.193–204.
116. Kirkpatrick C. A., Selleck S. B. J. Heparan sulfate proteoglycans at a glance.\\ *J. Cell Sci.*- 2007-v.120 –p.1829—1832.
117. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A et al. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc// Biol* 2002-v. 22-n.10-p.1642–1648
118. Kolset S.O., Gallanger J.T. Proteoglycans in haemopoetic cells// *Byophys.Acta.* - 1990.-V.1032.-P.191-211.
119. Kozma E. M., Olczyk K, Glowacki A., Bobinski R.. An accumulation of proteoglycans in scarred fascia. // *Mol. Cell. Biochem.* -2000-v..203 -p103—112.
120. Kraus M, Ticha M, Jonakova V. Heparin-binding proteins of human seminal plasma homologous with boar spermadhesins.// *J Reprod Immunol.* 2001 Aug;51(2):131-44. Bonnet F, Perin JP, Maillet P, Jolles P, Alliel PM Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide.//*Biochem J.*- 2007- v.288 № 4-p.565-569.
121. Kresse H., Schonherr E.. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control *J. Cell. Physiol*-2001v.189 –p. 266—274.
122. Lau M. *Reprod Sci.* Capacitation-Associated Glycocomponents of Mammalian Sperm .- 2015- v73-№6-p.479-482
123. Lalich RA, Vedantham S, McCormick N, Wagner C, Prins GS. Relationship between heparin binding characteristics and ability of human spermatozoa to penetrate hamster ova.//*J Reprod Fertil.*- 1994- v93-№3-p.179-182.
124. Lalich RA Penetration of sperm. Signaling molecules and male infertility.\\ *Wisconsin Medical J.* 2004-v. 103-№1-p.:21-34.

125. Lauer ME, Hascall VC, Green DE, DeAngelis PL, Calabro A. Irreversible heavy chain transfer to chondroitin. // *J Biol Chem*. 2014 -v 17-p29171-29179.
126. Liberda J, Kraus M, Ryslava H, Vlasakova M, Jonakova V, Ticha M D-fructose-binding proteins in bull seminal plasma: isolation and characterization. // *Folia Biol (Praha)*. - 2007-v.49-n.4-p.123-129.
127. Lilja H, Boström PJ, Bjartell AS, Catto JW, Eggener SE, Loeb S, Schalken J, Schlomm T, Cooperberg MR. Genomic Predictors of Outcome in male infertility. *Eur Urol*. 2015 v.23-№6-p110-113
128. Linster C.L., Van Schaftingen E. Rapid stimulation of free glucuronate formation by non-glucuronidable xenobiotics in isolated rat hepatocytes // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol.278. - N.38. - P.36328-36333.
129. Liu C, McFarland D. C, Nestor K. E., Velleman S. G Differential expression of membrane-associated heparan sulfate proteoglycans in the skeletal muscle of turkeys with different growth rates. // *Poult Sci*. 2006; 85 : 422—428.
130. Magdalou J, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M- Agrecan and articular cartilage: assessment of glycosyltransferases for the restoration of cartilage matrix in osteoarthritis. // *J Soc Biol*-2008-v202-n.4-p.281-288.
131. Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. // *J Reprod Immun* 2002-v.53 -p.109–119.
132. Mathews M. Macromolecular evolution of connective tissue // *Biol.Rev.*-1977.- V.42.-P.499-551.
133. Matsushima, N., Ohyanagi, T., Tanaka, T., Kretsinger, R. H. Super-motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans— fibromodulin, biglycan, decorin, lumican, , PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphygan, and osteoglycin // *Proteins* 2008-v.42-p.210–225.
134. Matsushima, N., Ohyanagi, T., Tanaka, T., Kretsinger, R. H. The small proteoglycans— fibromodulin, biglycan, decorin, lumican, , PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphygan, and osteoglycin(minireview) // *Proteins* 2012-v.45-p.245-259.

135. McCauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Mol Reprod Dev.* 2009-v.62--№3-p.433-438.
136. Melrose J., Smith S. M., Appleyard R. C, Little C. B. Aggrecan, versican and type VI collagen are components of annular translamellar crossbridges in the intervertebral disc. *Eur. Spine J.* -2008-v.17-p.314—324.
137. Melrose J., Smith MM. Proteoglycans in Normal and Healing Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)*- 2015 v.4-#3-p.152-173..
138. Merckies K, Larsson B, Kjellen L, Zhang BR, Buhr MM, Rodriguez-Martinez H. Relationship between heparin binding to spermatozoa and the fertility of dairy bulls. *Theriogenology.* 2007-V.57-№6-p.1249-1256.
139. Miller DJ, First NL, Ax RL Isolation and characterization of seminal fluid proteins that bind heparin. *Adv Exp Med Biol.* – 1987-v.219-№2-p.597-601
140. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod.* 1999- v.44-№9-p. 654-663.
141. Miller, A. F. Vandome, J. McBrewster An N-terminal threonine mutation produces an efflux-favorable, sodium-primed conformation of the human dopamine transporter. *Andrology. Mol Pharmacol.* 2014 Jul;86(1):76-85. doi: 10.1124/mol.114.091926.
142. Murray KS, James A, McGeady JB, Reed ML, Kuang WW, Nangia AK. The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. *Fertil Steril.* 2012-v.98-№6-p.1428-1431.
143. Moura A. A., Koc H., Chapman D. A., Killian G. J. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach *Journal of Andrology*, - 2006-Vol. 27,- No. 2-p.472-480.
144. Mukhopadhyay C.S., Verma A., Dubey P.P., Rupesh J, Nikhlesh S. Sperm nuclear chromatin decondensation : its Applicability to predict fertility of semen samples. *Indian J. Anim. Res.*, 2008-v.42 –n.4-p 285-287.
145. Muller P, Erlemann KR, Muller K, Calvete JJ, Topfer-Petersen E, Marienfeld K, Herrmann A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal

- plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J.* – 1998-v.27-p.33–41.
146. Neubaum DM, Wolfner MF. Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals. *Curr Top Dev Biol* 1999; 41:67–97.
147. Oancea A., Moldovan L., Flămânzeanu M., Mateescu M., Cojocaru F. A New Boar Sperm Dilution Medium for Artificial Insemination Technology// *Roum. Biothechnol* -2009-v.16-p.1275-1279.
148. Oehrl W., Panayotou G.. Modulation of growth factor action by the extracellular matrix. // *Connect. Tis. Res*-2008-v. 49 –p.145—148.
149. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation // *Theriogenology*. 2004-v.61-n.1-p.63-70.
150. Pereira RJ, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa.// *Theriogenology*.- 2006-v.54-n.2-p.185-192.
151. Perin J-P., Bonnet F., Maillet P. , Jolles P. Characterization and N-terminal sequence of human platelet Proteoglycan// *Biochem. J.* -2003-v. 255-p.1007-1013.
152. Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp J.H, van Kuppevelt T.H. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices:EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects.\\ *Biomaterials* 2006-v.21-n.2-p.581-593
153. Perin JP, Maillet P, Jolles P, Alliel PM. Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide.\\ *Biochem J.*- 1992 v. 288-n1-p.565-569.
154. *Practical protein chemistry*. Ed. by A.Darbrey- NY J&S-1997-789p.
155. *Proteoglycans. Structure, biology and molecular interaction*. edit.R.V.Iozzo- //Basel-Marsel Dekker Inc.-2007-440p.

156. Prydz K., Dalen K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans // Journal of Cell Science 2006. -V.119.- P. 193-205.
157. Psomashekar L, Selvaraju S, Parthipan S, Ravindra JP. Profiling of sperm proteins and association of sperm PDC-109 with bull fertility. // Syst Biol Reprod Med. 2015 –v. 20-p.1-12.
158. Ruoslahti E. Peptides and Proteoglycans as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. // Adv Mater-. 2012 –v. 24-№28-p.3747-3756.
159. Ruoslahti E., Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities Cell. -1991.- V. 64 – p. 867—869.
160. Rodén L., Koerner T., Olson C. and Schwartz N. B. Mechanisms of chain initiation in the biosynthesis of connective tissue polysaccharides // Fed. Proc. 1985. V.44. P.373-380.
161. Rodén L., Koerner T., Olson C. Mechanisms of the biosynthesis of polysaccharides // Proc. Biociens- 2005.- V.67-P.473-502.
162. Romanato M, Cameo MS, Bertolesi G, Baldini C, Calvo JC, Calvo L Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo // Hum Reprod. -2008 v.9-p.1868-1873.
163. Romanato M, Rigueira E, Cameo MS, Baldini C, Calvo L, Calvo JC Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. // Hum Reprod. -2005 v.20-n.10-p.2784-2789
164. Romanceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. Integrin traffic - the update // J Cell Sci. 2015 –v.128-№5-p.839-855.
165. Romanato M., Cameo M.Â. S., Baldini, C., Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo // Human Reproduction - 2003-V.18- No.9- pp. 1868-1873.
166. Romão MJ, Kölln I, Dias JM, Carvalho AL, Romero A, Varela PF, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ.J /Crystal structure of acidic seminal fluid protein

- (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. // *Mol Biol.* 2002 –v.274-№12 -650-660.
167. Sakamoto H., Y. Ogawa, H. Yoshida R. Relationship between testicular glycosaminoglycan and testicular function // *Asian Journal of Andrology*- 2006-v.7,-p. 319–324;
168. Salmivirta M., Lidholt K. and Lindahl U. Heparan sulfate: A piece of information // *FASEB J.* 2001. V.10. P.1270-1279.
169. Sanderson R D. and Bernfield M. Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: Distinct structures on simple and stratified epithelia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*-2008- Vol. 85- pp. 9562-9566.
170. Saiya PH, Girish BP, Reddy PS. Restraint stress exacerbates alcohol-induced reproductive toxicity in male rats. // *Alcohol.* -2014 v.48-n8-p.781-786. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.07.014.
171. Santiago-Garcia J., Kodama T., Pitas R. E. The class a scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix // *J. Biol. Chem*-2003-v. 278 -№7- p.6942—6946.
172. Sangla S, Hu C, Mizeracki A, Mehta JL Decorin in atherosclerosis. // *Ther Adv Cardiovasc Dis.*- 2011 –v. 5-№6-p.305-14..
173. Sanz B., Calvete J.J., Mann K., Schäfer N.N., Amselgruber W, Sinowatz F, Ehrhard M, Töpfer-Petersen E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. // *Bav. Biochem. Biotechn J.* -2011-v215, - p. 645–652.
174. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. // *Hum Reprod.* 1997 Sep;12(9):1949-54.
175. Shuang RC, Chen MH, Chen PY, Chen CY, Tsai SF, Cheng CK, Sun JS. A mutation of the Col2a1 gene (G1170S) alters the transgenic murine phenotype and cartilage matrix homeostasis. *J Formos Med Assoc.* 2014 vol;113(11):803-12
176. Schwartz M. A., DeSimone D. W. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008-v. 20-p. 551—556.

177. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Wiendl H. uses of anti- α 4-integrin (anti-VLA-4) antibodies in multiple sclerosis // *Int Immunol.* 2015 –v.27-№1-p.47-53.
178. Selleck S. B. Overgrowth syndromes and the regulation of signaling complexes by proteoglycans // *Am. J. Hum. Genet.* 1999.- V 64-. P.372-377.
179. Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium.// *Reprod Fertil Dev.* -2003-v.5-n.3-p.307-315.
180. Siegel G. Connective tissue: more than just a matrix for cells. *Comprehensive human physiology* (Greger R, Windhorst U, eds.) /G. Siegel – Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. –P. 173 – 224.
181. Sigman M., Glass S., Campagnone J., Jon L. Pryor, M Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial// *Fertility and Sterility*-2006-V.85-N 5, - P. 1409–1414
182. Silbert J. E. and Sugumaran G. Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V.1241. P.371-384.
183. Silbert J. E., Glycosaminoglycan metabolism before molecular biology: reminiscences of our early work.// *Glycoconj J.* 2010 –v.27-№2-p.201-219
184. Silbert J. E., Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate // *IUBMB Life.* Oct. 2002. V.54 (4). P.177-186.
185. Skinner MK. Structural Characterization of Proteoglycans Produced by Testicular Peritubular Cells and Sertoli Cells: Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability// *Epigenetics.* - 2011 V.6-№7-p.838-842.
186. Solis D, Romero A, Jimenez M, Diaz-Maurino T, Calvete JJ Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family// *FEBS Lett.* 1998 –v.431-n.2-p.273-278.
187. Sostaric E, van de Lest CH, Colenbrander B, Gadella BM Dynamics of carbohydrate affinities at the cell surface of capacitating bovine sperm cells // *Biol Reprod.* 2005-v.72-p.346-357.

188. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? // *Glycobiology* 2003-v. 13 -12-p 105–150.
189. Strugnell R., Handley C., Drummond L., Faine S. Characterisation of Proteoglycans Synthesized by Rabbit Testis – *Am.J. Pathol*- 1986-v.124-p.216-226.
190. Suarez SS. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals.\\ *Cells Tissues Organs* 2007-v.168-p.105–112.
191. Suarez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct.\\ *Reprod Domest Anim* -2012-v.45 -p.140–143.
192. Sutherland JM, Fraser BA, Sobinoff AP, Pye VJ, Davidson TL, Siddall NA, Koopman P, Hime GR, McLaughlin EA. Developmental Expression of Musashi-1 and Musashi-2 RNA-Binding Proteins During Spermatogenesis // *Biol Reprod* -2014-v. 90 -n5- 92-112
193. Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O., Huseby N. E., Winberg J. O.. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect. Tissue Res.* -2008-v.49 –p. 197—202.
194. Svingh M, Ghosh SK, Prasad JK, Kumar A, Tripathi RP, Bhure SK, Srivastava N. Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo spermatozoa.\\ *Anim Reprod Sci.* 2014 Jan 10;144(1-2):22-9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.10.016.
195. Tai G. H., Huckerby T. N. and Nieduszynski I. A. Multiple non-reducing chain termini isolated from bovine corneal keratan sulfates // *J. Biol. Chem.* 1996. V.271. P.23535-23546.
196. Taipale J. Epithelial stem cell and cancer.\\ *Duodecim.* 2004-v.120-#4-p.373-375.
197. Taipale J., Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix.// *FASEB J.* 1996.-v. 11 –p. 51—59.
198. Talusan P., Bedri S., Yang S., Kattapuram T., Silva N., Roughley P. J., Stone J. R. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and

- atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry.// Mol. Cell. Prots.- 2009.-v. 7 : 1420—1427.
199. Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, Maffeo G, Ronchi S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin.// Eur J Biochem. 2000 – v.267-№20-p.6175-6179.
200. Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Sperm capacitation in the porcine oviduct.\\ Anim Reprod Sci -2004-v.80-p.131–146.
201. Tecle E, Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx.\\ Mol Reprod Dev.-2015-v.82-№9-p.635-650.
202. Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. \\Andrologia-1998-V. 30-p.217-224.
203. Topfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions on the route spermatozoon to fertilization.// Hum Reprod Update- 2009-№5-p.14–29.
204. Trowbridge J. M. , Gallo R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan // Glycobiology. 2002.- V.12.- No.9.- P.117-125.
205. Trowbridge J. M., RudisillJ. A., Ron D., Gallo R. L. J.. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). J. Biol. Chem.- 2002-v.277 –p. 42815— 42820.
206. Trydz K.Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure.\\ Biomolecules. 2015 –v.5-№3-p.2003-2022. doi: 10.3390/biom5032003..
207. Tujvesson E., Malmstrom J., Marko-Varga G., Westergren-Thorsson G.. Biglycan isoforms with differences in polysaccharide substitution and core protein in human lung fibroblasts. //Eur. J. Biochem. 2008-v.269 –p. 3688— 3696.
208. Tung, P. S. & Fritz, I. B. Synthesis of components of extracellular matrix in the testicles Guinea pigs // J. Cell Biol. -2009 -V.123,-p.1914-1927.
209. Vendrell FJ, Rubio C, Tarin JJ. The heparin-glutathione test: an alternative to the hypo-osmotic swelling test to select viable sperm for intracytoplasmic sperm injection.Fertil Steril. 2008 –v.87--№6—p.1166-1171.

210. Vang H, Luo X, Leighton J. Extracellular Matrix and Integrins in Embryonic Stem Cell Differentiation. *Biochem Insights*-2015 –v.28-№8(Suppl 2)-p.15-21.
211. Villena J., Brandan E.. Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration. *J. Cell Physiol.* -2004-v.198 –p. 169— 178.
212. Valper J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv Exp Cel. Biol.*- 2014-v.802-№1-p,49-58
213. Vincourt J. B., Lionneton F., Kratassiouk G., Guillemin F., Netter P., Mainard D., Magdalou J.. Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol. Cell. Proteomics.*- 2006-v.5-p.1984—1995.
214. Wagers A. J., Conboy I. M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell.*- 2005-v.122 –p. 659— 667.
215. Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Topfer-Petersen E. //Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. *Mol Reprod Dev*-2006- v.64-№2-p.449–457.
216. Wendel M., Sommarin Y, Heinegard D. J.. Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteoaderin) from bovine bone. *Cell Biol.*- 1998-v.141 –p. 839—847.
217. Wilson I. B. The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. -V.64.- P.784-799.
218. Woods A., McCarthy J. B., Furcht L. T., Couchman J. R.. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell.* -1993-v.4-p. 605—613.
219. Yadav VK1, Saraswat M, Chhikara N, Singh S, Yadav S. Heparin and heparin binding proteins: potential relevance to reproductive physiology. *Curr Protein Pept Sci.*-2013 -v.14-№1-p.61-79.

220. Yamamoto C, Deng X, Fujiwara Y., Kaji T.. Proteoglycans predominantly synthesized by human brain microvascular endothelial cells in culture are perlecan and biglycan.// J. Health Sci. -2008-v.51-p. 576—583.
221. Yoneda M., Yamagata M., Suzuki S., Kimata K.. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. //J. Cell Sci.- 1988-v. 90 – p. 265—273.
222. Yoo YC, Kim YS, Song KS, Moon EH, Lee KB. Immunomodulating and anticoagulant activity of glycosaminoglycans derived from porcine testis. //Arch.Ind. Pharm Res. 2009 -v.25-p669-677.
223. Zöller M. CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells.\\ Front Immunol.- 2015-v.26-№5- p.235-257.
224. Zheon YP, Kim CH Impact of glycosylation on the unimpaired functions of the sperm.\\ Clin Exp Reprod Med.- 2015 –v.42-№3-p.77-85.