

Монгол гүүний эхсийн ханд бэлтгэж, өсөлтийн хүчин зүйл, 13-р уураг тодорхойлсон дүн

Д.Батсайхан¹, Н.Лхагвасүрэн¹, Б.Баяр-Энх¹, Ч.Цэвгэдорж¹, Т.Энх-Оюун¹, Э.Үен¹,
Г.Сайнбилэг², П.Чимгээ³ Ц.Долгорсүрэн^{1*}

¹-Мал эмнэлгийн хүрээлэн, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

²-Мал эмнэлгийн сургууль, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

³-Монгол-Хятадын хамтарсан молекул биологийн хэрэглээний лаборатори

*Холбоо барих хаяг: Dolgorsuren.ivm@gmail.com

ХУРААНГУЙ

Энэ судалгааны ажлын зорилго нь монгол гүүний эхсийн зарим уургийг ялган авч, ЭЛИЗА-ийн аргаар тодорхойлох явдал байв. Энэхүү зорилгын хүрээнд Монгол гүүний эхсийн эдийг нэрмэл ус, фосфатын буфер, трис-давсны хүчлээр хандлан гомогенжүүлэх 3 аргыг ашиглан, тэдгээрээс гарсан гомогенат тус бүрээс уураг ялгах туршилтыг сульфат аммоний давс, этанол, ацетоноор тундасжуулах, нэрмэл усанд хандлах 4 янзын аргаар уураг ялгасан нийт 12 хувилбарыг тус бүр 3 давталттай хийсэн юм. Дээрх хувилбаруудаар ялган авсан уургууд буюу нийт 36 дээжинд молекул жинг электрофорезийн аргаар тодорхойлоход ихэнх хувилбаруудад 1,060-26,600 дальтон жинтэй уургийн толбууд тод илэрч байсан ба уургийн хэмжээг Пьерсийн цомгоор тодорхойлоход 1083.9-5747.2 мкг/мл уураг илэрсэн юм. Эхсийн өвөрмөц 13-р уураг, эхсийн өсөлтийн хүчин зүйлийн хэмжээг тус тус ЭЛИЗА-ийн аргаар тодорхойлоход фосфатын буферт хандлан гомогенжүүлж, этанолаар тундасжуулсан болон нэрмэл усаар хандлан гомогенжүүлээд ацетоноор тундасжуулсан хувилбаруудад эхсийн 13-р уураг 34.4 ± 9.2 ба 34.9 ± 1.3 нг/мл, өсөлтийн хүчин зүйл 469.4 ± 46.9 ба 404.7 ± 153.9 нг/мл хэмжээтэй байгаа нь фосфатын буфер эсвэл нэрмэл усанд хандлан, гомогенжүүлж, органик уусгагчдаар тундасжуулах замаар биологийн идэвхт уураг илүү их агуулсан ханд бэлтгэх боломжтойг харуулж байна.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Адуу, судаслаг бүрхүүл, өсөлтийн хүчин зүйл, тунадасжуулалт

ОРШИЛ

Уургийн амин хүчлийн болон кодлогч генүүдийн дараалал, гүйцэтгэх үүргийн талаарх Юнипрот (UniProt) мэдээллийн санд адууны 22948 уураг бүртгэгдсэнээс зөвхөн эхэст нийлэгждэг 26 уургийн мэдээлэл орсон байдаг [1,2]. Харин бусад эдүүдэд нийлэгжихийн зэрэгцээ бас эхэст нийлэгждэг уургийг судалсан талаар олон арван мэдээлэл байдаг ч нэгтгэн тооцож тодорхойлсон мэдээллийг одоогоор олж чадаагүй байна. Адууны пептидын атласт 16 төрлийн эд,

биеийн 7 төрлийн шингэний нийт 51 дээжинд тодорхойлсон 24131 пептидын мэдээлэл оржээ [1,2,3]. Харин хүний биед нийлэгжих нийт 19,628 уургийн 70% нь эхэст ч мөн нэг адил нийлэгждэг ба тэдгээрээс 354 уураг бусад эрхтнүүдтэй харьцуулахад илүү ихээр нийлэгждэг болохыг хүний транскриптомын судалгаа харуулжээ [1,2,3,4]. Хүний эхэс нь 1000 дальтон молекул жинтэй хүний хорионы гонадотропин ялгаруулагч (рилизинг) даавраас эхлээд бүхэлдээ 1,300,000 дальтон,

тус бүр нь 74,000 дальтон молекул жин бүхий 18 дэд нэгжээс тогтсон жирэмсэн үеийн сийвэнгийн В уураг (РАРР-В) гэх мэт олон арван даавар, цитокинүүд, биоидэвхт пептид, өвөрмөц уургууд, ферментүүд, өсөлтийн факторууд гэх мэт уургуудын эх уурхай болж [1,2,3,4,5], хээл урагт шимт бодисууд, хүчилтөрөгч дамжуулан хэвийн өсөж хөгжих нөхцлийг бүрдүүлдэг. Хүний хорионы гонадотропин, гүүний хорионы гонадотропин, пролактин, релаксин гэх мэт уураг, пептид бүтэцтэй дааврууд, интерферонууд, өсөлтийн хүчин зүйлс, цитокинүүд гэх мэт олон арван уургийг хүн, амьтдын эхсээс ялган цэвэршүүлж авсан

талаар мэдээлсэн байдаг [4,5,6]. Хүний эхсийнхийг бодвол адууны эхсийн уургийн судалгаа харьцангуй бага хийгдэж, арай цөөн тооны уургийг гүүний эхсээс ялган авч судалсан байна. Эхэс нь эх ба ургийн цусны эргэлтийн хооронд бодис солилцооны болон хийн төлөвтэй бүтээгдэхүүнийг урагт дамжуулахаас гадна олон төрлийн даавар нийлэгжүүлэн ялгаруулдаг дотоод шүүрлийн нэг томоохон булчирхай юм [1, 2]. Энэхүү судалгааны гол зорилго монгол гүүний эхсийн зарим уургийг ялган авч, уургийн нийт хэмжээ, эхсийн 13-р уураг (РР13), өсөлтийн хүчин зүйлийг (РІGF) ЭЛИЗА-ийн аргаар тодорхойлох явдал байв.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд Улаанбаатар хотын Налайх дүүрэг, Төв аймгийн Угтаалцайдам, Алтанбулаг сумд, Хэнтий, Хөвсгөл, Архангай, Баянхонгор, Өмнөговь зэрэг аймгийн зарим сумдаас 2016 оны 4-р сарын эхнээс 8-р сарыг дуустал хугацаанд гүүний эхэс цуглуулж, -20°C -т хөлдөөж хадгалав. Гүүний эхсийг жижиглэн хэрчсэний дараа 3 тэнцүү хэсэгт хувааж дор дурдсан 3 аргаар гомогенжүүлсэн бөгөөд 3 хэсэг тус бүрийг ацетон, этанол, сульфат аммоний давсаар тунадасжуулах, мөн нэрмэл усанд хандлах гэсэн 4 аргаар тус тус уураг ялгахад ашигласан юм. Гомогенжүүлэхэд тус бүр 300 г эхэс авсан бөгөөд эдгээр туршилтыг 3 удаагийн давталттай хийв. Эхэсийн эдийг жигдрүүлэхдээ дараах 3 аргыг ашигласан юм. Үүнд: **Фосфатын буферт гомогенизаци хийх арга:** Эхэсийн эдийг махны машинаар (KAУE Grinder, KY/12, and China) жижиглэв. Дараа нь рН 7.6-тай 0.01 М фосфатын буферт (ФБ) эхэсийн таташ хийж, блендерээр (Philips, Hand blender, HR1672/90, Holland) жижиглэсэн юм. Гомогенатын рН-ийг 9.5-д хүргэж, 4 цаг хутгаад центрифугидэв. Шингэнийг авч, рН 4.5-д хүргээд хөдөлгөөнгүй 10-12 цаг байлгалаа. Шингэнийг уураг ялгахад ашиглав.

Трисийн буферт (Трис-НСІ) гомогенизаци хийх арга: Эхэсийн эдийг махны машинаар жижиглэсний дараа 500 г эхэсийн таташ дээр 7.8 рН-тай 0.01 М Трисийн буфер нэмж,

блендерээр жижиглэж жигдрүүлэв. Гомогенатын рН-ийг давсны хүчлээр 3.6-д хүргэж, 10 минут центрифугидсэн болно. Шингэнийг авч, NaOH-аар рН-ийг 7.5-д хүргэв.

Нэрмэл усанд гомогенизаци хийх арга: Эхэсийн эдийг махны машинаар жижиглээд эхэсийн таташийг 0.15 М хлорт натрийн хөргөсөн уусмалд 1 удаа угаасны дараа нэрмэл ус нэмж, блендерээр жижиглэв. Гомогенатыг 4°C -т 1 цаг хутгасны дараа 17000 жи-д 15 минут центрифугидэв.

Дээрх аргуудаар гомогенжүүлсний дараа дор өгүүлсэн аргуудаар уургуудыг тунадасжуулав. Үүнд:

Этанолоор тунадасжуулах арга: Гомогенатаас гарсан шингэн дээр 40%-д хүртэл этанолыг аажим гоожуулан хийж, хийх явцдаа 100 эрг/мин хурдтай 1 цаг хутгасны эцэст 6000 эрг/минутад 30 минут центрифугидэв. Гарсан шингэнийг авч дээр нь этанол нэмж концентрацыг нь 80-85%-д хүргэж, дээрх нөхцлөөр центрифугидэж, гарсан тунадасыг цуглуулан авлаа.

Ацетоноор тунадасжуулах арга: Эхэсийн материалаас 4 дахин их хэмжээний ацетон авч, -20°C -т хүртэл хөргөв. Хөргөсөн ацетоноо эхэсийн материал дээр аажим гоожуулан хийж 1 цаг сайтар хутгасны дараа -20°C -ийн температурт нэг цаг хөдөлгөөнгүй байлгаж, 13000-15000 жи-д 20 минут центрифугидэв. Шингэнийг соруулж асгаад,

үлдсэн тунадасыг татах шүүгээнд тавьж ацетоныг ууршууллаа.

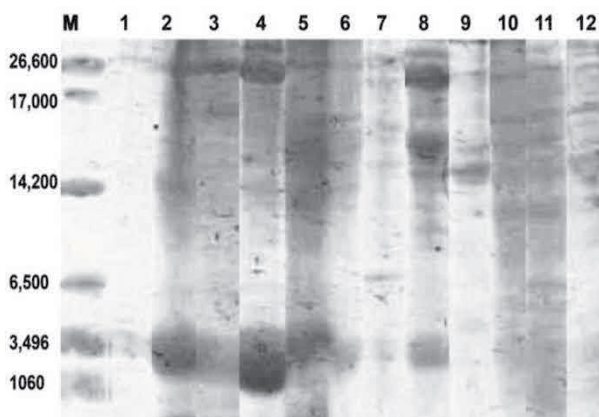
Сульфат аммоний давсаар тундасжуулах арга: Гомогенатын рН-ийг 7.5 болгож, дээр нь хуурай сульфат аммоний давс аажим хийж хутган 40%-д хүргэв. Уусмалыг 30 минут хутгасны дараа центрифугид 3000 эрг/минут хурдтай 30 минут эргүүлэв. Үүнээс гарсан тунадасыг асгаж шингэн дээр дахин сульфат аммони нэмж ханалтын зэргийг 75%-д хүргэхийн хамт 1 нормаль NaOH нэмж уусмалын рН-ийг 7.5 болгов. Холимог дахь давсыг сефадекс Жи-25 ашиглан шүүв. Усанд хандлан ялгах арга: Гомогенатаас гарсан шингэн дээр тодорхой харьцаагаар ус нэмж, 1 цаг хутгаад 12 цагийн дараа центрифугидэж шингэнийг авав. Цаашдын туршилтанд дээжүүдийг гомогенжүүлэх, уураг ялгахад ашигласан уусмал, уусгагчаар нь ялган, дараах байдлаар дугаарлав. 1-Нэрмэл ус-Нэрмэл ус (Гомогенжүүлэхэд нэрмэл усанд хандалж, уураг ялгахдаа бас нэрмэл усанд хандалсан гэсэн үг), 2-Нэрмэл ус-Этанол, 3-Нэрмэл ус-Ацетон, 4-Нэрмэл ус-Давс, 5-ФБ-Нэрмэл ус, 6-ФБ-Этанол, 7-ФБ-Ацетон, 8-ФБ-Давс, 9-Трис-Нэрмэл ус, 10-Трис-Этанол, 11-Трис-Ацетон, 12-Трис-Давс. Гүүний эхэсийн өсөлтийн хүчин зүйл тодорхойлох арга: Дээрх туршилтуудаас гарсан нийт 36 дээж, мөн гүүний эхэсийн гомогенатад

ЭЛИЗА-ийн цомгоор (MyBioSource Horse PIGF ELISA kit, San Diego, CA, USA) үйлдвэрлэгчийнх нь зааврыг баримтлан өсөлтийн хүчин зүйл тодорхойлов. Эхэсийн 13-р уураг тодорхойлох арга: Дээрх туршилтуудаас гарсан нийт 36 дээж, мөн гүүний эхэсийн гомогенатад ЭЛИЗА-ийн цомгоор (My Bio Source Horse PP13 ELISA kit, San Diego, CA, USA) үйлдвэрлэгчийнх нь зааврыг баримтлан эхэсийн 13-р уураг тодорхойлов. Гүүний эхэсийн уураг тодорхойлох арга: Хоёр дахь давталтаар гарсан хандны 12 дээжинд Пьерсийн уураг тодорхойлох цомгоор (Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay kit, Rockford, IL, USA) үйлдвэрлэгчийнх нь зааврыг баримтлан дээжүүдэд агуулагдах уургийн хэмжээг тодорхойллоо. Уургийн молекул жин тодорхойлох арга: Дээрх хувилбаруудаар хандлан, тундасжуулж гарган авсан дээжүүдэд агуулагдах уургуудын молекул жинг додедилсульфат натрит полиакриламид гель электрофорезийн аргаар Молекул жингийн маркер (SIGMA, Molecular Weight Marker, Saint Louis, Missouri, USA) ашиглан тодорхойлов. Судалгааны дүнд гарсан тоон материалд онлайн Graphpad Prism, компьютерийн Excel зэрэг программуудыг ашиглан статистикийн боловсруулалт хийлээ.

СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Арга зүйд заасны дагуу гүүний эхсийг 3 аргаар жигдрүүлж, гарсан 3 хэсэг тус бүрийг 4 өөр аргаар хандлан тунадасжуулж уураг

ялгах туршилтыг 3 давталттай хийхэд гарсан дээжүүдэд гель электрофорез явуулсан дүнг 1-р зургаар харуулав.



1-р зураг. Эхэсийн дээжүүд дэх уургуудын электрофореграм. М - маркер уургууд, 1-12- уураг ялгасан хувилбарууд.

Дээрх зургаас 1,060-3,496 дальтонтай ойролцоо молекул жинтэй уургууд 9-р хувилбараас бусдад нь их бага хэмжээтэй байгааг харж болох бол 1-р хувилбар буюу нэрмэл усаар хандлан жигдрүүлж, мөн нэрмэл усанд хандлан уураг ялгахад гарсан материалд 3,496 ба 26,600 дальтон жинтэй уургийн толбо бүдэг харагдаж байв. Харин бусад хувилбарын дээжүүдэд 14,200 дальтонтай ойролцоо болон түүнээс дээш жинтэй уургууд зонхилсон гэж болохоор

байна. Дөрөвдүгээр хувилбар буюу гомогенжүүлэхэд нэрмэл ус ашиглаж, сульфат аммоний давсаар тунадасжуулан гаргасан хандны дээжинд 1,060-3,496 ба 20,000 орчим дальтон жинтэй уургийн толбууд тод гарчээ. Мөн түүнчлэн 8-р хувилбарын 3 хэсэг газарт уургийн толбууд илт ялгарч байна. Түүнээс гадна 3, 5, 6, 8-р хувилбаруудад 20 орчим килодальтон жинтэй уургууд илэрчээ.

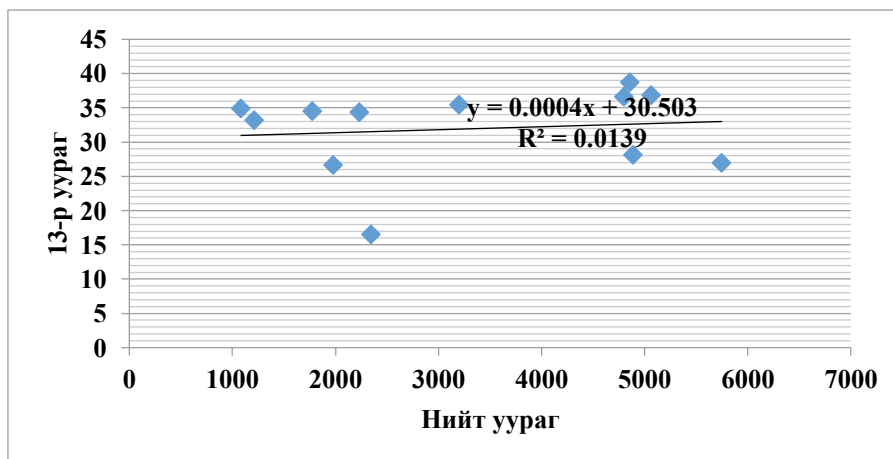
Хүснэгт 1

Гүүний эхэсийн уургуудыг ялгаж, нийт уураг, 13-р уураг, өсөлтийн хүчин зүйл тодорхойлсон дүн

Д/д	Хувилбарууд	Уураг (мкг/мл)	13-р уураг (пг/мл)	Өсөлтийн хүчин зүйл (пг/мл)
1	Нэрмэл ус-Нэрмэл ус	4856.5	38.75±9.9	350.97±66.95
2	Нэрмэл ус-этанол	5747.2	27.0±10.4	474.2±153.9
3	Нэрмэл ус-Ацетон	2230.8	34.4±9.2	469.4± 46.9
4	Нэрмэл ус-давс	1980.6	26.7±2.6	458.8±58.8
5	ФБ-Нэрмэл ус	2347.1	16.5±2.13	314.3±36.7
6	ФБ-Этанол	1083.9	34.9±1.3	404.7±22.6
7	ФБ-Ацетон	4802.1	36.6±8.7	503.5±44.4
8	ФБ-Давс	1210.6	33.2±1.1	331.65±85.7
9	Трис—Нэрмэл ус	5064.8	36.9±3.8	421.9±21.7
10	Трис-Этанол	4886.7	28.15±2.8	408.9±31.4
11	Трис-Ацетон	3203.6	35.5±8.4	401.5±36.9
12	Трис-Давс	1774.98	34.5±10.65	409.5±41.1

Дээрх хүснэгтээс үзэхэд уураг ялгасан бүх хувилбарт 1083.9-5747.2 мкг/мл хэмжээтэй уураг илэрчээ. Нэрмэл усанд хандлан жигдрүүлэлт хийсэн хувилбарт уургийн хэмжээ хамгийн их (5747.2 мкг/мл) байсан

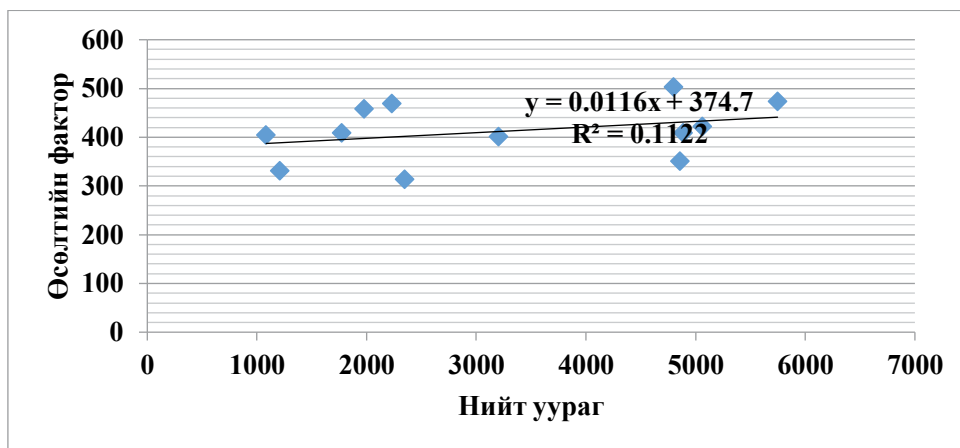
бол фосфатын буферээр хандлан жигдрүүлж, этанолаар уураг тунадасжуулахад хандан дахь уургийн хэмжээ бусдаасаа бага (1083.9 мкг/мл) байна.



2-р зураг . Нийт уураг ба 13-р уургийн хэмжээний хамаарал

Эхсийн 13-р уургийг ЭЛИЗА-ийн аргаар тодорхойлоход фосфатын буферт жигдрүүлж, нэрмэл усанд хандлан уураг ялгасан хувилбарт хамгийн бага буюу 16.5 ± 2.13 пг/мл, харин нэрмэл усанд хандлан жигдрүүлж, нэрмэл усанд хандлан уураг ялгасан хувилбарт бусдаасаа өндөр буюу

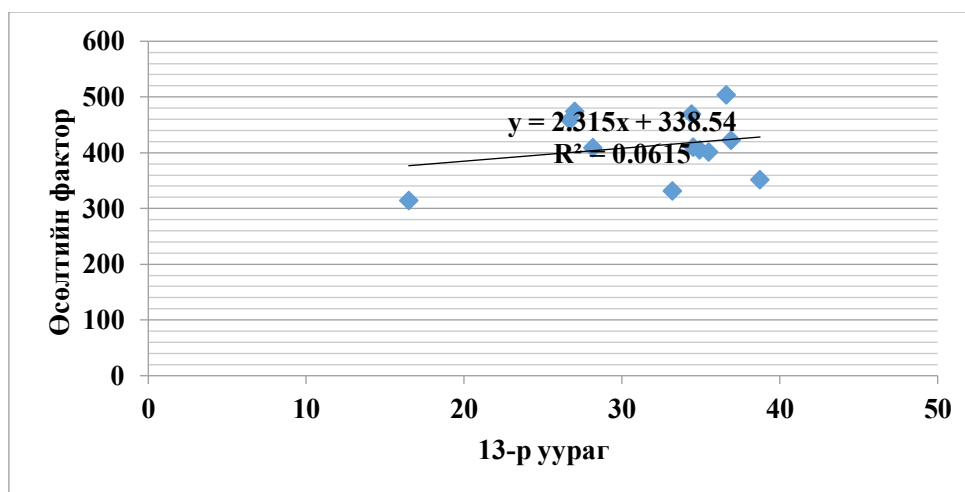
38.75 ± 9.9 пг/мл гарчээ. Уг уургийн хэмжээ болон нийт уургийн хэмжээний хооронд харилцан хамаарал байгаа эсэхийг тооцож үзэхэд корреляцийн түвшин 0.014 маш сул эерэг хамааралтай нь харагдаж байна (2-р зураг).



3-р зураг. Өсөлтийн фактор ба нийт уургийн хэмжээний хоорондох хамаарал

Өсөлтийн хүчин зүйлийн хувьд фосфатын буфертэй гомогенжүүлж, нэрмэл усаар хандлан уураг ялгасан хувилбарт хамгийн бага (314.3 ± 36.7 пг/мл), харин фосфатын буфертэй гомогенжүүлж, ацетаноор уураг

тундасжуулсан хувилбарт хамгийн их буюу 503.5 ± 44.4 пг/мл байсан ба нийт уурагтай хамаарах байдал нь 0.112 буюу сул эерэг корреляцтай байгааг 3-р зургаас харж болно



4-р зураг. Өсөлтийн хүчин зүйл ба 13-р уургийн хэмжээний хоорондох хамаарал

Дээрх хоёр тооцооноос үзэхэд 13-р уураг ба өсөлтийн фактор хоёрын нийт уурагт эзлэх хувь маш бага учраас хоорондын хамаарал нь сул байж болох талтай. Эцэст нь 13-р уураг ба өсөлтийн хүчин зүйл хоёр хоорондоо

шүтэлцээтэй эсэхийг тооцож үзэхэд бараг хамааралгүй эсвэл маш сулхан хамааралтай буюу корреляцийн коэффициент 0.061 байна (4-р зураг).

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Хүний эхэст нийлэгждэг уургуудыг хамгийн өргөн хүрээтэй судалсан бөгөөд 2003 онд нийт 56 уургийг ялган цэвэршүүлж, шинж чанарыг нь тодорхойлсон талаар мэдээлжээ [7,8,9]. Эдгээрийн дотор 30,000-38,000 дальтон молекул жинтэй, эхэсийн 13-р уураг буюу галектин-13 гэгддэг уургийг ялган, цэвэршүүлэх, түүний хими, физик, биологийн шинж чанарын талаарх судалгааг олон арван судлаач хийж гүйцэтгэсэн байна [6, 8, 10, 11, 12]. Энэ уургийн хэмжээ эмэгтэйчүүдэд тохиолддог жирэмсний хожуу үеийн хордлогын (преэклампси) үед багасдаг учраас түүнд үндэслэн уг эмгэгийг эрт оношлох, эмчлэх, сэргийлэхэд чиглэсэн судалгааны ажлууд хийгдсээр байна. Харин мал амьтад түүний дотор адуунд уг уургийн гүйцэтгэх үүрэг, ялган цэвэршүүлж авсан талаарх мэдээлэл олдоогүй байгаа боловч гүүний цусны ийлдэс, сийвэн, эдэд уг уургийг тодорхойлох ЭЛИЗА-ийн цомгийг АНУ-ын МайБиоСоурс компанид үйлдвэрлэн борлуулж байгааг бид худалдан авч өөрсдийн судалгаанд ашигласан юм. Энэ нь хэдийгээр нэг талаас ашиглах оношлуур, цомгийн олдоцын асуудал буюу бидний тодорхойлсон 2 уургаас бусад уургуудыг эхсийн эдэд тодорхойлох ЭЛИЗА-ийн цомог байдаггүйтэй холбоотой ч дээрх 2 уургийг мал амьтдын хувьд хөврөлийн цуцрал, хээл хаялттай холбон судлах нь чухал ач холбогдолтой байж болох юм гэж үзсэний үндсэн дээр сонгон авч эхэсээс уураг ялган авсан хувилбаруудын дээжүүдэд судалсан билээ. Сүү саам ихтэй гүүнд унагалсаных нь дараа эклампси илэрсэнийг мэдээлсэн байдаг [6, 8] ч энэ нь ихэвчлэн эрдэс бодисын солилцоо, орчны стресс нөлөөнөөс болдог бөгөөд түүний урьтал буюу преэклампси малд тохиолддог талаар мэдээлэл байхгүй байна. Зарим судлаачдын үзэж буйгаар преэклампси нь эхсийн хөгжил, түүнд явагдаж буй уургуудын нийлэгжил, бодисын солилцоотой холбогддог. Судлаачдын бичсэнээр гүү, мэгж гэх мэт эпители-хорион холбоо бүхий эхэстэй хээлтэгчдийн бие махбод дахь цусны урсгалын эсрэг эсэргүүцэл эхэс дотор их байдаг, харин

гемохорион холбоос бүхий эхэст мэрэгчид, сармагчний төрлийн амьтдын хувьд эхийн цусны урсгалын эсрэг эхэс дэх эсэргүүцэл бага харин эхийн бие дэх эсэргүүцэл илүү өндөр байдаг учраас [10, 11, 12-15] преэклампсийн хоёр дахь гол шинж тэмдэг болох цусны даралт нэмэгдэх шинж тэмдэг илэрдэг ажээ. Мөн түүнчлэн бидний судалсан хоёр дахь уураг буюу эхсийн өсөлтийн хүчин зүйл нь бие махбодод хуучин байсан цусны судсууд үргэлжлэн ургах, мөн шинээр судас үүсэх зэрэгт чухал үүрэгтэй байдаг байна. Энэ нь гэмтсэн эдүүдийг нөхөн төлжүүлэх зэрэгт энэ уургийг хэрэглэх боломжтой гэсэн үг юм. Мөн түүнчлэн малын үр хөврөл цуцрах, хээлийн хожуу үед хээл хаях, эхэсийн гаралтай элдэв эмгэгүүд, тухайлбал эхсийн үрэвсэл, эхсийн зарим уургийн нийлэгжил багасах зэрэгтэй холбоотой байж болох талтай. Электофорез ашиглан явуулсан судалгаанд бидний хэрэглэсэн маркер уургуудын молекул жингийн дээд тал нь 26,600 дальтон байсан болохоор электрофореграм дээр үүнээс их молекул жинтэй уургууд, тухайлбал 30,000-38,000 дальтон жинтэй эхсийн 13-р уураг байгаа эсэхийг мэдэх боломжгүй, харин 20 орчим килодальтон жинтэй өсөлтийн хүчин зүйл байгаа нь харагдаж болно. Бидний уураг ялгаж авсан аргуудын хувьд гарган авсан ханданд дээрх 2 уургийн хэмжээнд үндэслэн сонгон авсан юм. Уураг ялгах этанол, ацетон зэрэг органик уусгагч, давсаар тунадасжуулах уламжлалт аргууд нь орчин үед ч гэсэн өргөнөөр хэрэглэгдсэн хэвээр байгаа сонгодог аргууд гэж үздэг. Хүний эхсээр жишээлэн үзэхэд түүнд бусад эд эрхтнүүдийнхээс илүү ихээр нийлэгждэг 300 гаруй уураг, түүний дээр эхсийн бүтцэд ордог олон тооны уургуудаас аль нэг уургийг ялган авч, цэвэршүүлэх нь асар олон шат дамжлагатай нарийн төвөгтэй ажил гэдэг нь мэдээж. Иймээс бидний судалгаанд гүүний эхсээс молекул жингээр ойролцоо уургуудыг хамтад нь ялган авсан юм. Хувилбаруудаас нийт уураг, мөн дээрх 2 уургийн хэмжээг харгалзан нэрмэл ус ба фосфатын буферт хандлан жигдрүүлж, органик уусгагчаар

тунадасжуулах аргуудыг сонгож авав. Төрөл бүрийн амьтдын эхэсээс уураг ялган, цэвэршүүлсэн бусад судлаачдын ажлаас үзэхэд ч мөн адил эдгээр аргуудыг голлон ашигласан байдаг [21-26]. Монгол гүүний эхсийн хэлбэрзүйн гол үзүүлэлтүүд болох хүндийн жин, шугаман хэмжээсүүдийг тодорхойлох, тэдгээрийн бусад хүчин зүйлстэй холбогддог эсэхийг бид өмнө нь судалсан [27] бөгөөд энэ удаагийн судалгаагаараа бид хэмжээг нь тодорхойлох боломжтой зарим уураг, тухайлбал дээр дурдсан 13-р уураг, өсөлтийн хүчин зүйл хоёрыг эхэсээс ялгаж авсан дээжинд ЭЛИЗА-ийн аргаар судлах оролдлого хийсэн юм. Эхсийг маш олон талаас нь тухайлбал түүний үлэмж бүтэц, хэлбэрзүйн үзүүлэлтүүдээс эхлээд түүнд нийлэгжин ялгарч буй биологийн идэвхт маш олон

төрлийн бодисуудыг молекул биологийн түвшинд хүртэл судласаар [1, 6, 7-11, 13-21] байгаа билээ. Хүн, амьтны эхэсийг судлах явцад гарч ирсэн нэг чухал асуудал бол эхэсийн усан бүрхүүл, хүйн судасны цусанд агуулагдах үүдэл эс буюу стем эсийг ялган авч, ашиглах боломжтой байдагт оршино. Орчин үед үүдэл эсийг мал эмнэлэгт малын нүдний зарим өвчин, уралдааны адууны үе мөчний элдэв эмгэгүүд тухайлбал ясны хугарал, шөрмөс шандасны бэртэл гэх мэт олон эмгэгийг эмчлэхэд хэрэглэхтэй холбогдох асуудлуудыг эрчимтэй судлаж байгаа бөгөөд манай орны нөхцөлд адууны эхэс болон бусад эдүүдээс үүдэл эс гарган авч, мал эмнэлэгт хэрэглэхэд чиглэсэн судалгааны ажлыг эхлүүлэх үндэс суурь болж чадах юм.

ДҮГНЭЛТ

Гүүний эхсийн хандууд дахь нийт уураг, эхсийн 13-р уураг, өсөлтийн хүчин зүйлийн хэмжээнээс үзэхэд нэрмэл ус ба фосфатын

буферт хандлан жигдрүүлж, этанол, ацетоноор тунадасжуулах аргууд илүү үр дүнтэй байна.

ТАЛАРХАЛ

Энэхүү судалгааны ажлыг Шинжлэх Ухаан, Технологийн Сангийн санхүүжилтээр Монгол-Хятадын хамтарсан CHN_006/2015 төслийн хүрээнд гүйцэтгэв.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛ

- [1] Linzer D.I, and S.J. Fisher., The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy, *Molecular Endocrinology*, 1999; 13(6): 837–840
- [2] Reece W.O., *Physiology of Domestic Animals*, 2nd edition, Williams & Wilkins, 1997
- [3] Amorosa E.C., Placentation, In: *Marshall's Physiology of Reproduction*, ed. A.S.Parkes, Vol.2, London: Longmans, Green, 1952
- [4] Frandson R.D., Wilke W.L. and A.D. Fails, *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 7th edition, Wiley-Blackwell, 2009; p 443-445
- [5] Allen W.R., S.Gower, S.Wilsher, Fetal membrane differentiation, implantation and early placentation, In: *Equine Reproduction*, 2nd edition, A.O. Mckinnon,
- [6] E.L.Squires, W.E.Vada and D.D.Varner, Wiley-Blackwell, 2011; p 2187-2199 Leiser R., Kaufmann P., Placental structure: in a comparative aspect, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*; 102(3): 1994; p 122-134
- [7] Schlafer D.H., Postmortem examination of the equine placenta, fetus and neonate, methods and interpretation of findings, *AAEP Proceedings*, 2004
- [8] Knottenbelt D.C., *Equine Stud Farm Medicine*, Elsevier, 2003

- [9] Allen W. R., A. M. Carter, P. Chavatte-Palmer, V. Dantzer, A. C. Enders, C. Freyer, R. Leiser and M. A. Miglino, Comparative Placentation—A Workshop Report Placenta, 24, Supplement A, Trophoblast Research, 2003; Vol. 17, p 100–103
- [10] Antczak D.F., A.M.de Mestre, S.Wilsher and W.R.Allen, The Equine Endometrial Cup Reaction: A fetomaternal signal of significance. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013; 1: p 419–442
- [11] Samuel C.A., W.R.Allen and D.H.Steven, Studies on the equine placenta II. Ultrastructure of the placental barrier. *J.Reprod.Fert.* 1976; 48, p 257-264
- [12] Ginther, O.J. Reproductive biology of the mare, 2nd edn, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 1992
- [13] Redmer D.A., Wallace J.M. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004; V 27 (3), p 199–202
- [14] Benton S.J., L.M.McCowan, A.E.P.Heazell, D.Grynspan, J.A.Hutcheon, C.Senger, et al. Placental growth factor as a marker of fetal growth restriction caused by placental dysfunction, *Placenta*, 2016; 42: p 1-8
- [15] Griffiths S.K. and J.P.Kampbell. Placental structure, function and drug transfer. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain Advance Access*, 2014; 6 pp
- [16] Wester N., Associations between placental parameters, mare and foal body condition at birth and foal health in the first month of life. Doctoral Thesis, FVM, University of Utrecht, 2010
- [17] Whitwell, K.E. and Jeffcott, L.B. Morphological studies on the fetal membranes of the horse at term. *Res. Vet. Sci.* 1975; 19, p 44-55.
- [18] W. R. Allen, S. Wilsher, C. Turnbull, F. Stewart, J. Ousey, P. D. Rossdale and A. L. Fowden, Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero, *J.Reproduction*, 2002; 123, p 445–453
- [19] Allen, W.R., Wilsher, S., Stewart, F., Stewart, F., Ousey, J., Ousey, J. and Fowden, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse II. *Endocrinology of pregnancy. J. Endocrinol.* 2002; 172, 237-246.
- [20] Aiex L.D.F., Birth weight and growth of New Zealand Thoroughbred foals, MS Thesis, 2008; 118 p
- [21] Elliott C., J. Morton, J. Chopin, Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses, *Theriogenology* 71, 2009; p 683–689
- [22] Ts.Dolgorsuren, N.Lkhagvasuren, P.Enkhtuya, Biochemical and pharmacological study of biologically active placental preparation, *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 2015
- [23] Schlafer, D.H. Postmortem examination of the equine placenta, fetus and neonate, methods and interpretation of findings. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* 2004; 50, 144-161.
- [24] Meliani S., Benallou B., Abdelhadi S.A., Halbouche M., Naceri A., Environmental factors affecting gestation duration and time of foaling of pure bred Arabian mares in Algeria, 2011; *Asian Journal of animal and veterinary advances*, 6 (6): p 599-608
- [25] Pazinato F.M., B.R. Curcio, C.G. Fernandes, L.S. Feijó, R. A. Schmith and C.E.W. Nogueira, Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares, *Pesq. Vet. Bras.* 2016; 36(7): p 665-670
- [26] Pozor M., Equine placenta – A clinician’s perspective. Part 2: Abnormalities, Review Article, *Equine Vet. Educ.* 2015
- [27] Д.Батсайхан, Б.Баяр-Энх, Ч.Цэвгэдорж, Н.Лхагвасүрэн, Ц.Долгорсүрэн, Г.Сайнбилэг, Г.Мягмарсүрэн, Б.Мөнхтогтох, А.Энхжин, Л.Номин, С.Бямбацогт “Монгол гүүний эхэсийн хэлбэрзүй, зарим үзүүлэлтийг тодорхойлсон дүн” Монголын мал эмнэлгийн шинжлэх ухаан, технологийн сэтгүүл, Цуврал №2, Дугаар №2 ISBN 978-99962-3-978-6, хуудас 78-82, 2016.

Result of determination placental protein 13 (pp13) and placental growth factor in placental extract of mongolian mares

Batsaikhan D.¹, Lkhagvasuren N.¹, Bayar-Enkh B.¹, Tsevegдорж Ch.¹, Enkh-Oyun T.¹, Uyen E.¹, Sainbileg G.², Chimgee P.³, Dolgorsuren Ts.^{1*}

¹-Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

²-School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

³-Mongolia-China joint laboratory of molecular biology

*Corresponding author: Dolgorsuren.ivm@gmail.com

ABSTRACT

The present study aimed to isolate some proteins from placenta of Mongolian mares and measure their concentrations using ELISA test kits. In order to achieve this aim, a total of 12 variants of protein isolation experiments in triplicates were performed to isolate proteins from each homogenates, which were obtained with 3 methods of tissue homogenizations of placental tissue of Mongolian mare using distilled water, phosphate buffer saline and Tris-HCl, by use of 4 methods of protein extraction and precipitation with distilled water, sulfate ammonium salt and organic solvents such as ethanol and acetone. Molecular weights of proteins isolated using above variants of methods or a total of 36 samples determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated the bands of proteins with molecular weights ranging from 1,060 to 26,600 dalton were clearly detected on the electrophoregram, and 1083.9 to 5747.2 µg/ml total proteins in all samples were measured by Pierce BCA assay kit. Results of ELISA measurements of placental protein 13 (PP13) and placental growth factor (PIGF) in samples that PP13 and PIGF concentrations in both extracts, one of which were homogenized in PBS, followed by ethanol precipitation and another, homogenized in distilled water, followed by acetone precipitation were 34.4±9.2 and 34.9±1.3 pg/ml and 469.4±46.9 and 404.7±153.9 pg/ml respectively demonstrated extracts containing higher amounts of biologically active proteins can be obtained by using methods of homogenization of tissues extracted in PBS or distilled water and precipitation with organic solvents.

KEY WORDS: horse, chorionic membrane, growth factor, precipitation