

## A szarvasmarha vemhességhez társult fehérjéinek vizsgálata

A tanulmány első részében egy a szarvasmarhák vemhességének nyomonkövetésére alkalmas radioimmuno-assay (RIA) módszer kifejlesztéséről és validálásáról adunk számot. Az alkalmazott RIA módszerek hatékonyságát normális és abnormális vemhességekből, illetve különböző eredetű embriók átültetését követően a recipiensektől származó vérmintákon vizsgáljuk.

Az utóbbi két évtizedben számos glükoproteint sikerült izolálni a kérődzők placentájából: PSPB (Butler és mtsai, 1982); PAG (bPAG1, PAG I<sub>67</sub>, bovPAG 1) (Az alsó indexszámok a kDa-ban mért molekulatömegre utalnak) (Zoli és mtsai, 1991); PAG<sub>55</sub>, PAG<sub>59</sub>, PAG<sub>62</sub> (Garbayo és mtsai, 1998).

1982-ben Butler és munkatársai két vemhességhez társuló fehérjét állítottak elő, szarvasmarha placentából (Pregnancy Specific Protein A és B, PSPA és PSPB). A PSPA nevű fehérje a későbbi vizsgálatok során  $\alpha$ -fetoproteinnek bizonyult, míg a szintén ezen kutatócsoport által izolált PSPB alkalmas volt a vemhesség diagnosztizálására és nyomon követésére szarvasmarhában (Sasser és mtsai, 1986). Az 1991-ben Zoli és mtsai szarvasmarha placentából kindulva 67 kDa molekulatömegű, négy különböző izoelektromos ponttal (4.4, 4.6, 5.2 és 5.4) és Arg-Gly-Ser-x-Leu-Thr-Thr-His-Pro-Leu N-terminális aminosav szekvenciával rendelkező glükoproteineket állított elő, amelyeket vemhességhez társult glükoproteinek (Pregnancy Associated Glycoprotein, PAG) neveztek el. A vemhességhez társult fehérjék további, molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata során kiderült, hogy az aszpartikus proteinázok családjába sorolhatók, aminosav-sorrendjük nagy hasonlóságot mutat a pepszinhez (57%), pepszinogénhez (49.5%), katepszin D- (58%) és E-hez, kimozinhoz (42.5%), és reninhez (Xie és mtsai 1991, 1994, 1995). A bovPAG-1 molekula háromdimenziós szerkezete hasonlóságot mutat a pepszinéhez ill. kimozinéhoz. Ezen vegyület az enzimatikusan aktív aszpartikus proteinázokhoz hasonlóan képes a pepsztatin megkötésére (Guruprasad és mtsai, 1996). Molekuláris biológiai vizsgálatok révén további PAG szekvenciákat sikerült kimutatni kérődzők placentájában (Xie és mtsai, 1997; Green és mtsai 2000).

1998-ban Garbayo munkásságának köszönhetően három kecske placentából izolált PAG molekula N-terminális aminosavszekvenciája vált ismerté: PAG<sub>55</sub> (Ile-Ser-Ser-Pro-Val-Ser-x-Leu-Thr-Ile), PAG<sub>59</sub> (Arg-Gly-Ser-x-Leu-Thr-Thr-Leu-Pro-Leu) és PAG<sub>62</sub> (Arg-Asp-Ser-x-Val-Thr-Ile-Val-Pro-Leu).

Jelenleg több mint 100 PAG gén ismert a kérődzők genomjában, ezek többsége a placenta felületes rétegeiben expresszálódik. A szarvasmarha esetében kétféle expressziós mintázat ismert: néhány PAG mint a bovPAG-2, -8, -10 és -11 a placenta mono- és binukleáris sejtjeiben, míg a bovPAG-1, -4-7, és -9 kizárólag a binukleáris sejtekben expresszálódik (Green és mtsai, 2000). A vemhesség bizonyos stádiumaiban egyes PAG molekulák expresszálódnak, mások viszont nem. A vemhesség 25., 45., 60., 88., 150. és 250. napján eltávolított embriók/magzatok trophoctodermájában a PAG I<sub>67</sub> -t kódoló mRNS molekulák a 45. naptól kimutathatók, míg a bovPAG-4-et és bovPAG-9-et kódolókat már a 25. naptól detektálhatók. Egy fontos kérdés azonban továbbra is megválaszolatlan maradt: Kiválasztódnak-e PAG molekulák az anyai vérkeringésbe a vemhesség korai szakaszában, illetve detektálhatók-e ezek a molekulák az anyaállatból nyert vérmintákból.

Vizsgálatainkhoz három különböző radioimmuno-assay-t (RIA 1, RIA 2 és RIA 3) alkalmaztunk a PAG molekulák detektálása céljából. A felhasznált RIA rendszerekhez a következő antiszérumokat alkalmaztuk: anti- PAG I<sub>67</sub> (RIA 1), anti- PAG<sub>55+62</sub> (RIA 2) és anti- PAG<sub>55+59</sub> (RIA 3). Tudományos munkánk első részében e vizsgálati rendszerek érzékenysége, pontossága, a mérési eredmények reprodukálhatósága került meghatározásra, valamint az itt kapott értékeket összehasonlítottuk a RIA 1 rendszer esetében mértekkel. Az alkalmazott RIA rendszerek fajlagosságát (specifitását) az aszpartikus proteáz család kereskedelmileg hozzáférhető, enzimatikusan aktív enzimjeivel (pepszinogén, pepszin, kimozin, katepszin D és renin) szemben határoztuk meg a 10 ng/ml–1 mg/ml koncentrációs tartományban. A pepszinogén esetében keresztreakciót detektáltunk a RIA 1, RIA 2 és RIA 3 rendszerekben 1 mg/ml, 50 µg/ml, illetve 500 µg/ml koncentráció felett. Pepszin esetében a keresztreakció 500 µg/ml (RIA 2), illetve 1 mg/ml (RIA 1, RIA 3) koncentráció felett volt megfigyelhető. A kimozin a RIA 2 és RIA 3 rendszerekben, a rennet (borjú oltógyomor extraktum) a RIA 2 rendszerben keresztreakált. A renin és a katepszin D nem okozott észlelhető keresztreakciót. Az irodalmi adatok alapján a vizsgált aszpartikus proteáz enzimek biológiai mintákban mért koncentrációja nem érheti el azt a tartományt ahol vizsgálatainkban keresztreakciót találtunk. Ezek alapján kimondható, hogy a RIA 1, RIA 2 és RIA 3 rendszerek specifikusak PAG molekulák detektálására.

A három RIA rendszer felhasználásával meghatároztuk a PAG koncentrációt mesterséges termékenyítést követően tehenekből és üszökből származó vérplazmában. A termékenyítést követő 21. naptól a három RIA rendszer képes volt detektálni a PAG molekulákat (RIA 1: 0.43±0.24 ng/ml, mean±SD; RIA 2: 0.48±0.24 ng/ml; RIA 3: 0.64±0.37 ng/ml). A termékenyítést követő 32. és 42. napon nyert vérplazmában RIA 2 (4.30±1.32

ng/ml,  $5.56 \pm 1.95$  ng/ml) és RIA 3 ( $4.17 \pm 1.15$  ng/ml,  $5.60 \pm 1.89$  ng/ml) alkalmazásával szignifikánsan ( $p < 0.0001$ ) magasabb PAG koncentrációt mértünk, mint RIA 1 esetében ( $2.43 \pm 0.81$  ng/ml,  $4.01 \pm 1.48$  ng/ml). A termékenyítést követő 21. naptól a három RIA rendszer felhasználásával mért PAG koncentrációk között szignifikáns korreláció állt fenn ( $p < 0.0001$ ;  $r \geq 0.929$ ). Ezen vizsgálatok alátámasztják, hogy az antiszérum gondos kiválasztása révén fokozható a RIA teszt PAG molekulákat felismerő képessége. Eredményeink azt is valószínűsítik, hogy a három RIA rendszer képes a PAG I<sub>67</sub>-nél korábban expresszálandó és vele nem identikus PAG molekulák detektálására.

A PAG koncentráció vemhes üszöktől vett vérmintákból történő meghatározása szintén vizsgálataink célját képezte. A három RIA rendszer segítségével öt állat esetében teljes, két állatnál pedig részleges egyéni PAG profilokat határoztunk meg. Öt profilon normális, komplikációmentes vemhességre jellemző PAG koncentráció láthatók, míg két profil az embrionális mortalitásra, illetve a vetélésre utaló PAG lefutásokat mutatja. Az újonnan kifejlesztett RIA rendszerek (RIA 2 és RIA 3) és a klasszikus RIA 1 által mért PAG koncentrációk hányadosát meghatároztuk a vemhesség adott időszakában. Ezen hányadosok értéke a vemhesség első 60 napjáig csökkenést mutatott. A PAG profilok analízise révén világossá vált, hogy az anyai vérben a vemhesség 21. és 60. napja között jelenlevő PAG molekulákat a RIA 2 és RIA 3 rendszerek hatékonyabban képesek felismerni, mint a RIA 1.

Eredményeink arra utalnak, hogy a RIA 2 és RIA 3 rendszerek értékes eszközként szolgálhatnak, a vemhesség korai szakaszaiban megjelenő PAG molekulák kimutatásában, illetve előállításában. Az egyedi PAG profilok alapján erre a vemhesség első 60 napján gyűjtött magzatburkok lennének legalkalmasabbak.

Egy kollaboratív vizsgálat keretében 269 embrió beültetését követően a recipiensekből történt vérminta vétel (a referencia ivarzástól számított 7. és 35. nap között háromnaponta, ezután pedig a 119. napig hetente egyszer). A Progeszteron (P4) és PAG szintek pontos meghatározása révén előállítottuk az egyes vemhességekhez tartozó P4 és PAG profilokat. A sikertelen vemhességekhez tartozó P4 és PAG profilokat lefutásuk alapján három kategóriába soroltuk: A típus: a rendellenesség először a P4 profilon jelentkezik; B típus: a rendellenesség először a PAG profilon jelentkezik; C típus: a rendellenesség közel egy időben jelentkezik a P4 és PAG profilokon. Az A típusú embrionális/ fetális mortalitás esetén a kiváltó ok valószínűleg a recipiensben keresendő, míg a B típus esetében az embrionális/fetális mortalitás oka az embrióra/ magzatra vezethető vissza. C típusú embrionális/ fetális mortalitás esetében a kiváltó ok a recipiensben és/vagy az embrióban/ magzatban állt fenn. Vizsgálatunk

során a P4 és PAG profilok részletes analízise értékes információt szolgáltatott az embrionális/ fetális mortalitás eredetéről és annak kórfejlődésével kapcsolatban. Embriotranszplantációt követően a rendszeresen gyűjtött vérmintákban történő P4 és a PAG koncentrációk meghatározása a rektális palpációval, illetve az embrionális szívműködés ultrahangos detektálásával kiegészítve értékes módszerként szolgálhat a recipiensek vemhességének nyomonkövetésére. A módszer révén információ nyerhető, az in vitro előállított embriók esetében a kultúr mediumnak az embrióra illetve trophoblast fejlődésére gyakorolt hatásáról.

Tanulmányunkban két nagy pontosságú, jó reprodukálhatóságú, specifikus RIA rendszer kifejlesztéséről számoltunk be. Ezen RIA rendszerek alkalmasnak bizonyultak a szarvasmarha vemhesség korai detektálására, nyomonkövetésére, illetve értékes információt szolgáltatottak a sikertelen vemhesség okaival kapcsolatban.