

УДК 616.12-005.4-072:577.112.4

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

И.В. Чикаловец, О.В. Черников, В.И. Молчанова

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: С-реактивный белок, лектины, ишемическая болезнь сердца.

На основе нового аффинного сорбента разработана схема выделения С-реактивного белка (СРБ). В качестве источника для получения СРБ использовался пул сывороток больных с ишемической болезнью сердца. С использованием углеводсвязывающих белков-лектинов было показано, что углеводные цепи СРБ содержат моносахаридные остатки N-ацетилгалактозамина, галактозы, маннозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы. Интенсивность связывания лектинов с иммобилизованным на планшете СРБ уменьшалась в ряду «галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный – LAA – конканавалин А». Константы связывания для галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичного и N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичного лектинов составляли 1,17 и 0,72 мкМ⁻¹ соответственно.

С-реактивный белок (СРБ) – наиболее характерный представитель семейства острофазных белков человека. Уровень СРБ быстро и многократно увеличивается при воспалении различной природы и локализации, паразитарных инфекциях, травмах и опухолях. Выявлена положительная корреляция уровня СРБ с тяжестью и динамикой клинических проявлений воспаления, где этот белок является наиболее специфичным и чувствительным клинико-лабораторным индикатором патологического процесса [1].

Постоянный мониторинг уровня СРБ, проведенный в последнем десятилетии для целей клинической диагностики и контроля эффективности лечения ишемической болезни сердца, онкологических заболеваний, а также изучение его структуры и многочисленных функций, привели к новым представлениям как о диагностической ценности этого белка, так и о его возможном участии в возникновении и развитии ряда заболеваний. Особенно многообещающим представляется изучение механизмов модификации СРБ, в частности, его гликозилирование при различных патологических процессах.

До недавнего времени считалось, что субъединицы СРБ не гликозилированы, и только в 2003 г. факт модификации был установлен при туберкулезе, висцеральном лейшманиозе, синдроме Кушинга, остеогенной саркоме [8]. Возможно, что модифицированные формы СРБ имеют такие измененные функциональные характеристики, как, например, эффективность связывания с вирусами, бактериями и другими патогенами и, может быть, разную способность активировать комплемент. Функциональное значение гликозилирования субъединиц

СРБ, которое происходит при разных патологических процессах, пока не выяснено и представляет несомненный интерес. К настоящему времени показано, что структура углеводных цепей ряда гликоконъюгатов в значительной степени зависит от типа и тяжести патологического процесса [14]. В связи с этим возникли принципиально новые подходы к дифференциальной диагностике заболеваний, которые основаны на выявлении изменений в углеводных структурах гликоконъюгатов. Наметились два пути для выявления их углеводного профиля, которые могут быть полезным инструментом для изучения строения, свойств и функций гликоконъюгатов: использование моноклональных антител к углеводным детерминантам и использование лектинов [11]. Лектины – общее название белков, обладающих свойством избирательно и обратимо связывать углеводы. Было показано, что применение лектинов в сочетании с возможностями ранее разработанных методов, основанных на выявлении антигенных детерминант антителами, может существенно повысить чувствительность и специфичность различных диагностических тест-систем.

Целью данной работы был анализ гликозилирования СРБ в сыворотке крови пациентов с ишемической болезнью сердца.

Материал и методы. Сыворотки крови были получены в Медицинском объединении ДВО РАН и Приморской краевой клинической больницы № 1 (г. Владивосток). В работе использовались лектины, выделенные нами из морских беспозвоночных [3], а также коммерчески доступные лектины конканавалин А из канавалии мечевидной *Canavalia ensiformis* и LAA из бобовника альпийского *Laburnum alpinum* (Sigma, USA). Концентрацию СРБ в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов СРБ-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия). Электрофорез в 15% полиакриламидном геле выполняли по методу Лэммли [10] с использованием прибора MV-III (Jim-X Scientific Instruments, China). Вестерн-блоттинг осуществляли с помощью системы ST-I (Jim-X Scientific Instruments, China), проявляя гликоформы СРБ лектинами или иммуноглобулинами, полученными против СРБ и мечеными пероксидазой хрена. Конъюгаты иммуноглобулинов и лектинов с ферментом получали периодатным методом Накане [13]. Содержание углеводов определяли фенолосерноокислотным методом [9].

Получение аффинного сорбента на основе полихрома («Реахим», Россия) и 3-Sn-лизофосфатидилхолина

Чикаловец Ирина Владимировна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОУХ; e-mail: ivchik6@mail.ru

(Sigma, USA) проводили сорбцией 20 мг фосфолипида на 4 мл сорбента в градиенте концентрации этанола в воде от 96 % (20 мл) до 10 % (200 мл) в замкнутом цикле в течение ночи с дальнейшей отмывкой сорбента водой (40 мл) и блокировкой неспецифических сайтов связывания сорбента бычьим сывороточным альбумином (40 мг в 10 мл дистиллированной воды) в течение 2 часов. Для подготовки к работе сорбент отмывали цитратным буфером (0,05 М лимонно-кислый натрий, 0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, pH 7,8) и уравнивали Ca²⁺-содержащим буфером (0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, 0,002 М CaCl₂, pH 7,8). Сорбент готовили к работе перед каждым циклом выделения СРБ.

Для выделения СРБ пул сывороток пациентов с ишемической болезнью сердца с высоким содержанием этого белка (от 10 до 10⁹ мг/л) пропускали через колонку с аффинным сорбентом. После отмывания несвязанных белков Ca²⁺-содержащим буфером СРБ элюировали цитратным буфером, объединенные фракции подвергали гель-фильтрации на колонке с Superdex 75 10/30 в TBS (0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, pH 7,8). Дальнейшую очистку СРБ-содержащих фракций проводили ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50. Элюцию связанного с сорбентом белка осуществляли с помощью линейного градиента NaCl (0,14–0,75 М) в цитратном буфере.

Для твердофазного лектиноферментного анализа на 96-луночный планшет (Costar Corning Inc., USA) адсорбировали выделенный СРБ – по 0,1 мл в лунку в натриево-фосфатном буфере (0,01 М NaH₂PO₄, 0,15 М NaCl, pH 7,5) в концентрации 5 мкг/мл. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего планшет промывали три раза раствором натриево-фосфатного буфера, содержащим 0,05 % твин-20 (отмывочный буфер). Для забивки свободных мест связывания на планшете во все лунки добавляли по 0,25 мл раствора бычьего сывороточного альбумина в концентрации 3 мг/мл, инкубировали два часа при 37 °С с перемешиванием. Избыток альбумина удаляли отмывочным буфером. На планшет двойными разведениями добавляли по 0,1 мл конъюгатов лектинов или иммуноглобулинов в концентрации от 1:100 до 1:6400 в отмывочном буфере. Инкубировали 1 час при 37 °С. Отмывали планшет, как описано выше. Для определения ферментативной активности пероксидазы в каждую лунку добавляли по 0,1 мл субстрата тетраметилбензидина. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре 10 мин и останавливали реакцию добавлением 0,05 мл 5 % серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре μ Quant (Bio-Tek Instrument Inc., USA) при 450 нм.

Результаты исследования. При выделении СРБ в каждой фракции методом иммуноферментного анализа определяли его уровень. После аффинного сорбента, полученного на основе полихрома и 3-Sn-лизофосфатидилхолина, удалось получить фракцию, содержащую почти 90 % СРБ от его количества в исходном образце.

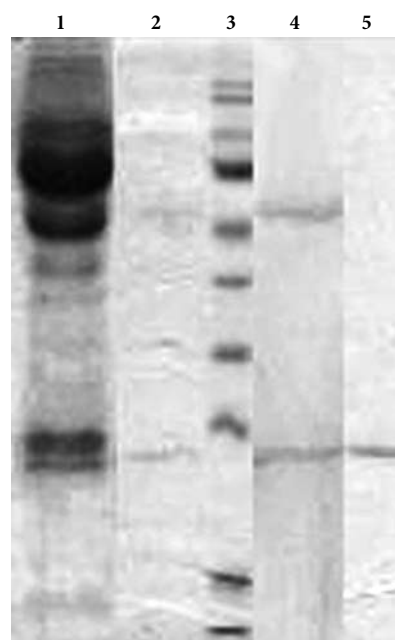


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия:

1 – суммарная сыворотка, 2 – СРБ после аффинной хроматографии, 3 – маркеры молекулярных масс (11, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 и 170 кДа), 4 – СРБ после гель-фильтрации, 5 – СРБ после ионообменной хроматографии.

Очисткой гель-фильтрацией с выходом СРБ до 77 % была получена фракция, в которой, по данным электрофореза, содержалось два белка (рис. 1), поэтому полученную фракцию подвергали дальнейшей очистке ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50. СРБ был выделен с выходом 69 % как гомогенный препарат.

Для определения взаимодействия СРБ с иммуноглобулинами и углеводсвязывающими белками использовались иммуноглобулины G_{СРБ} и лектины, выделенные нами из морских беспозвоночных (галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин из мидии *Crenomytilus grayanus*, N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин из асцидии *Didemnum ternatanum*) [7, 12], а также коммерческие глюкоза/маннозоспецифичный конканавалин А и фукозоспецифичный LAA лектины. Интенсивность связывания лектинов с иммобилизованным на планшете СРБ, определенная методом твердофазного лектиноферментного анализа, была различной и уменьшалась в ряду лектинов: «галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный – LAA – конканавалин А». Причем связывание с LAA и конканавалином А было незначительным (рис. 2). Константы связывания, рассчитанные по методу Чипмана [15], для галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичного и N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичного лектинов составляли 1,17 и 0,72 мкМ⁻¹ соответственно. Кроме того, методом вестерн-блоттинга с использованием этих же конъюгатов была проверена специфичность связывания лектинов с выделенным СРБ (рис. 3).

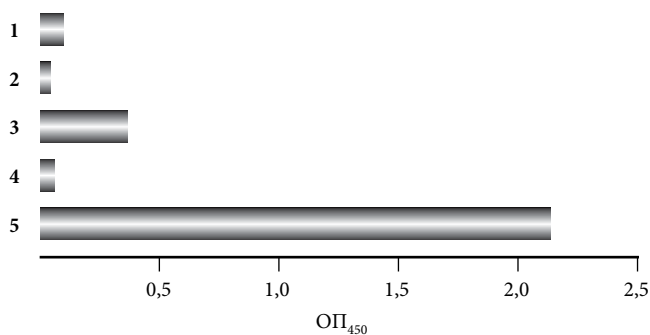


Рис. 2. Связывание СРБ, адсорбированного на полистирольной планшете, с лектинами и иммуноглобулином $G_{\text{СРБ}}$, мечеными ферментной меткой:

1 – иммуноглобулин $G_{\text{СРБ}}$, 2 – конканавалин А, 3 – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин, 4 – LAA, 5 – галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин.

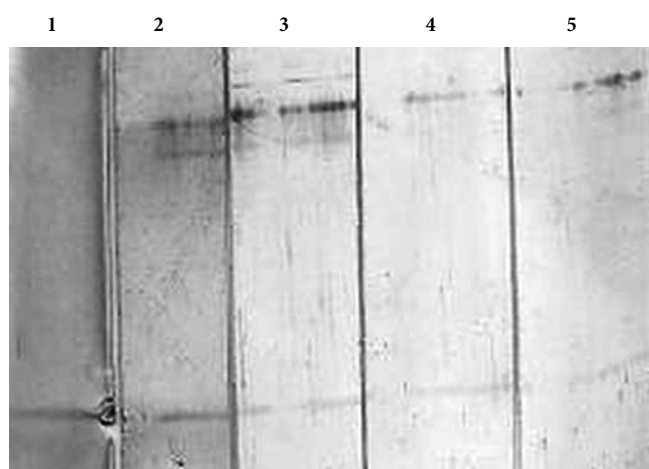


Рис. 3 Иммуноблоттинг:

частично очищенный СРБ после электрофореза и переноса на нитроцеллюлозную мембрану был обработан конъюгатами, содержащими ферментную метку, и проявлен субстратом диаминобензидином (1 – иммуноглобулин $G_{\text{СРБ}}$, 2 – галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин, 3 – конканавалин А, 4 – LAA, 5 – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин).

Обсуждение полученных данных. Известно несколько способов выделения СРБ в нативном состоянии [2]. Нами были опробованы некоторые из них, но ни один не позволил получить белок в чистом виде и с хорошим выходом. Для выделения СРБ была разработана новая схема с использованием лизолецитина на гидрофобном носителе «Полихром». В результате удалось получить гомогенный препарат, по молекулярной массе соответствующий мономерной форме СРБ. Методом фенолосернокислотного анализа было показано наличие углеводов в выделенном образце.

Поскольку количество выделенного белка не было достаточным для определения моносахаридного состава общепринятыми методами, нами был использован оригинальный подход, заключающийся в применении лектинов – углеводсвязывающих белков с различной углеводной специфичностью [4]. Методами твердофазного лектиноферментного анализа и вестерн-блоттинга была выявлена различная реактивность лектинов в отношении СРБ, что

свидетельствует о наличии в углеводной части этого белка моносахаридов, специфичных для данных лектинов. Из этого следует, что углеводные цепи СРБ содержат значительное количество концевых моносахаридных остатков N-ацетилгалактозамина и, возможно, галактозы. Остатки маннозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы находятся, скорее всего, в середине углеводной цепи, либо их содержание незначительно.

Ранее нами была показана микрогетерогенность СРБ в сыворотках крови здоровых лиц, а также пациентов с ишемической болезнью сердца, онкологическими заболеваниями и неязвенным колитом [5, 6]. Было установлено, что уровень лектин-реактивных гликоформ СРБ повышается с увеличением тяжести патологического процесса. В настоящей работе на примере СРБ, выделенного из сывороток больных ишемической болезнью сердца, убедительно показано не только наличие гликозилирования этого острофазного белка, но и определены моносахаридные остатки, входящие в состав его углеводных цепей. Данные результаты могут существенно повысить значимость СРБ как потенциального клинического маркера. Не исключено, что разные модифицированные формы СРБ удастся соотнести с конкретными формами патологии и/или с их количественными проявлениями, что позволит повысить прогностическую значимость тест-систем определения СРБ.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (09-1-П21-05) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. Вельков В.В. С-реактивный белок – структура, функция, методы определения, клиническая значимость // *Лабораторная медицина*. 2006. № 8. С. 1–7.
2. Зотова Е.Г., Мысякин Е.Б., Токсамбаева С.Ж. и др. С-реактивный белок: строение, свойства и способы его выделения // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21, № 10. С. 739–751.
3. Лукьянов П.А., Черников О.В., Кобелев С.С. и др. Углеводсвязывающие белки морских беспозвоночных // *Биоорганическая химия*. 2007. Т. 33, № 1. С. 172–181.
4. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Булгаков А.А. и др. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека // *Вестник ДВО РАН*. 2010. № 5. С. 125–130.
5. Чикаловец И.В., Скиба М.А., Черников О.В. и др. Определение гликоформ С-реактивного белка как маркера неспецифического язвенного колита // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009. № 2/1 (24). С. 184–185.
6. Чикаловец И.В., Черников О.В., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. Микрогетерогенность С-реактивного белка у пациентов с ишемической болезнью сердца // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2010. № 2/1 (29). С. 232.
7. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V. et al. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998. Vol. 119 (1). P. 45–50.
8. Das T., Sen A., Kempf T. et al. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological condition // *Biochem. J*. 2003. Vol. 373. P. 345–355.

9. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton I.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. Vol. 28. P. 350–358.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
11. Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition // *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. P. 637–674.
12. Molchanova V., Chikalovets I., Li W. et al. New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from ascidian *Didemnum ternatanum* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1723. P. 82–90.
13. Nakane P.K., Lavoie A. Peroxidase-labeled antibody – new method of conjugation // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. Vol. 22, No. 12. P. 1084–1091.
14. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease // *Cell.* 2006. Vol. 126, No. 5. P. 855–867.
15. Shoshan V., Shavit N., Chipman D.M. Kinetics of nucleotide binding to chloroplast coupling factor (CF1) // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. Vol. 504. P. 108–122.

Поступила в редакцию 18.03.2011.

GLYCOSYLATION IN C-REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

I.V. Chikalovets, O.V. Chernikov, V.I. Molchanova

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The new affine sorbent allowed to develop C-reactive protein excretion scheme. The pool of serum from patients with ischemic heart disease was used as source to obtain CRP. The carbohydrate-binding proteins – lectins – allowed to find out that the CRP carbohydrate chains contained the monosaccharide residues of N-acetylgalactosamine, galactose, mannose, N-acetylglucosamine, and fucose. The lectin binding intensity with immobilised on the CRP plate decreased in the line galactose/N-acetylgalactosamine-specific – N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine-specific – LAA – concanavallin A. The binding constants with respect to galactose/N-acetylgalactosamine-specific and N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine-specific lectins were 1.17 and 0.72 μm^{-1} , respectively.

Key words: C-reactive protein, lectins, ischemic heart disease.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 87–90.

УДК 616.24-007.271-036.12:612.127.2:616.747-009.1

РОЛЬ ГИПОКСЕМИИ В РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ МУСКУЛАТУРЫ ВЕРХНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Г.И. Суханова¹, М.Ф. Киняйкин¹, Н.Ю. Рассохина², А.В. Крамар³

¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ²Владивостокский филиал Дальневосточного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 73г), ³Дальневосточный окружной медицинский центр ФМБА России (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 161)

Ключевые слова: дисфункция скелетной мускулатуры, гипоксемия, хроническая обструктивная болезнь легких, сердечно-сосудистые заболевания.

У 68 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких 42–77 лет анализировалась сила мускулатуры верхних конечностей в зависимости от наличия гипоксемии и кардиальной патологии. Показано, что у лиц с гипоксемией дисфункция скелетной мускулатуры выраженнее, чем у больных без гипоксемии. Сопутствующая сердечно-сосудистая патология усугубляет эти изменения. Делается вывод, что своевременное назначение кислородной терапии имеет большое значение в устранении гипоксемии и предотвращении развития дисфункции скелетной мускулатуры у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Одним из внелегочных системных проявлений хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) являются дисфункция скелетных мышц и развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца и гипертонической болезни [5]. Дисфункция скелетных мышц характеризуется функциональными (снижение силы и выносливости) и анатомическими (атрофия, нарушение соотношения миофибрилл) изменениями, которые приводят к снижению физической работоспособности пациентов [3]. Патофизиологические механизмы, лежащие в основе этой дисфункции, изучены недостаточно, высказывались предположения о ведущей роли гипоксемии и системного воспаления [3,

6]. Кроме этого в качестве причин дисфункции скелетных мышц у больных ХОБЛ называют малоподвижный образ жизни, оксидативный стресс, низкий питательный статус, гиперкапнию, влияние лекарственных препаратов (кортикостероиды) и электролитных нарушений. О значении гипоксемии говорят результаты работ, выявивших тесную взаимосвязь между парциальным напряжением кислорода в артериальной крови и долей миофибрилл I типа в широчайшей мышце [9]. Гипоксемия ингибирует синтез протеинов в скелетных мышцах, приводит к Ca^{2+} -зависимому протеолизу миофибрилл [8]. Об участии системного воспаления в патогенезе дисфункции скелетной мускулатуры свидетельствуют исследования, выявившие взаимосвязь между степенью атрофии поперечно-полосатых мышц и уровнем маркеров воспаления (интерлейкинами 1 и 6, фактором некроза опухоли) [7].

Дисфункция скелетных мышц у больных ХОБЛ имеет важные медицинские и социальные последствия. Доказано, что она является причиной низкой толерантности пациентов к физическим нагрузкам и низкой повседневной активности, снижения качества жизни, значительного повышения затрат на лечение, а также снижения выживаемости [10, 11, 14, 15].

Показано, что сердечно-сосудистые заболевания обостряются не менее чем у 50% больных ХОБЛ [13].