

УДК 577.112.853+616-079.4

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА ПРИ СЕПСИСЕ**Чикаловец И.В., Черников О.В., Кондрашина А.С., Горбач В.И., Вахрушева Н.М.,
Молчанова В.И., Лукьянов П.А.***Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, e-mail: ivchik6@mail.ru*

Методом твердофазного лектин-ферментного анализа изучено изменение гликозилирования гликопротеинов цельной сыворотки крови пациентов с сепсисом и здоровых доноров. Показано, что при сепсисе происходит уменьшение разветвленности углеводных структур гликоконъюгатов, увеличение доли O-гликозилированных цепей муцинового типа. Почти на 50% по сравнению с донорскими сыворотками уменьшается связывание с GlcNAc-специфичными лектинами. Это связано, скорее всего, с экранированием хитобиозного кора и уменьшением структур с бисектным GlcNAc. В образце СРБ, выделенного из сывороток больных сепсисом, методами ГЖХ и ГЖХ-МС определены моносахаридные остатки Man, Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, входящие в состав его углеводных цепей. Данные результаты могут существенно повысить значимость СРБ как потенциального клинического маркера в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: С-реактивный белок, сепсис, гликозилирование, лектины**GLYCOSYLATION OF C-REACTIVE PROTEIN IN SEPSIS****Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Kondrashina A.S., Gorbach V.I., Vakhrusheva N.M.,
Molchanova V.I., Lukyanov P.A.***G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, e-mail: ivchik6@mail.ru*

The change of glycoproteins glycosylation of whole blood serum of patients with sepsis and healthy donors was examined by the method of enzyme linked lectin assay. A reduction of carbohydrate structures branching and an increase of the content of O-glycosylated mucin type chains of glycoconjugates in sepsis patients are shown. The binding to GlcNAc-specific lectins is reduced by about 50% compared with donor sera. This is due to shielding of chitobiose core and reducing of bisecting GlcNAc structures. Monosaccharides Man, Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc were identified by GC and GC-MS as part of carbohydrate chains of CRP from sera of sepsis patients. These results may increase the importance of CRP as a potential marker in the clinical laboratory diagnosis.

Keywords: C-reactive protein, sepsis, glycosylation, lectins

Многие белки млекопитающих гликозилированы и являются гликопротеинами (ГП). Развитие ряда патологических состояний сопровождается нарушением процессов гликозилирования, изменением конфигурации углеводной части гликоконъюгатов [9]. Характер таких изменений зависит от типа и стадии конкретного заболевания. В связи с этим возникли принципиально новые подходы к дифференциальной диагностике заболеваний, которые основаны на выявлении гликоформ ГП. В настоящее время наметилось два пути для выявления углеводного профиля ГП – это использование моноклональных антител к углеводным детерминантам и углевод-связывающих белков – лектинов, способных обратимо и избирательно связываться с определенными углеводными структурами.

Воспалительный ответ представляет собой последовательность клеточных и молекулярных событий, которые происходят как реакция на различные стимулы, такие как инфекция и повреждение ткани. Воспаление сопровождается продукцией белков острой фазы, определение которых может говорить о наличии воспаления и степени его тяжести. Изменение гликозилирования ГП во время воспаления продемонстриро-

вано на животных моделях и в некоторых белках острой фазы человека [10].

С-реактивный белок (СРБ) – наиболее характерный представитель семейства острофазных белков. Известно, что концентрация СРБ в сыворотке крови резко возрастает при воспалительном ответе в 10–100 раз [1]. Долгое время считалось, что СРБ не гликозилирован, хотя показано, что у животных в отличие от человека этот острофазный белок содержит углеводные цепи [8]. В 2003 г. впервые появилась работа, в которой представлены данные о гликозилировании СРБ у людей с различным типом патологий, таких как туберкулез, лейкемия, саркома [11]. Позднее этими же авторами показано наличие углеводов в образцах СРБ пациентов с воспалительными заболеваниями, такими как менингит, острый аппендицит, ревматоидный артрит и некоторых других [6]. Нами было показано гликозилирование образцов СРБ в сыворотках крови пациентов с неспецифическим язвенным колитом [2] и ишемической болезнью сердца [4].

Вот уже несколько десятилетий сепсис и тяжелые инфекции остаются одной из актуальных проблем современной медицины в силу неуклонной тенденции к росту числа

больных и стабильно высокой летальности, несмотря на использование новых принципов и методов лечения. Целью данной работы является исследование степени гликозилирования суммарных ГП сыворотки крови, а также СРБ у пациентов с сепсисом.

Материал и методы исследования

Сыворотки крови были получены в Медицинском объединении ДВО РАН и Краевой клинической больнице № 1 г. Владивостока. В работе использовали лектины, выделенные нами из морских беспозвоночных: Gal/GalNAc-специфичный лектин из мидии *Crenomytilus grayanus* (CGL), GlcNAc-специфичный (DTL) и GlcNAc/GalNAc-специфичный (DTL-A) лектины из асцидии *Didemnum ternatanum* и муцин – специфичный лектин из красной водоросли *Tichocarpus crinitus* (TCL) [3, 14], а также коммерчески доступные лектины Glc/Man-специфичный из канавалии мечевидной *Canavalia ensiformis* (Con A) и GlcNAc-специфичный из бобовника альпийского *Laburnum alpinum* (LAA) (Sigma, USA). Концентрацию СРБ в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью наборов СРБ-ИФА-БЕСТ (высококочувствительный) (Вектор-Бест, Россия). Конъюгаты лектинов с ферментом получали периодатным методом Накане [13].

Гликозилирование ГП исследовали методом твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА). Вкратце, на планшет адсорбировали в трипликатах сыворотки больных и здоровых доноров, свободные места связывания блокировали альбумином, а затем в лунки планшета добавляли лектины, меченные пероксидазой хрена. После добавления субстрата определяли оптическую плотность каждого образца сыворотки на планшетном спектрофотометре μ Quant (Bio-Tek Instruments, USA). Результаты обсчитывали в программе Excel. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение (SD).

SDS-электрофорез образцов сыворотки крови проводили по методу Лэммли на установке Jim-X (Китай). В качестве стандартов использовали набор окрашенных рекомбинантных высокоочищенных белков фирмы Thermo Sscientific (США). По окончании электрофореза белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану, используя установку для полусухого переноса Jim-X (Китай). Для идентификации полос, соответствующих СРБ, мембрану обрабатывали иммуноглобулинами против СРБ, меченными пероксидазой хрена. Полосы, соответствующие СРБ (без добавления антител), вырезали. Для накопления достаточного для анализа количества СРБ эксперимент повторяли несколько раз. Образцы СРБ гидролизovali 2,5 М ТФУ. Определение нейтральных и аминокислот проводили методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов, как описано ранее [15].

Результаты исследования и их обсуждение

Для определения степени гликозилирования суммарных ГП сыворотки крови были исследованы образцы сывороток пациентов с острым сепсисом различной этиологии ($n = 14$). Уровень СРБ во всех образцах находился в пределах 133,20–235,02 мкг/мл, что в несколько раз превышало уровень

нормальных значений – 0,5 мкг/мл. Методом ТЛФА было изучено взаимодействие ГП с различными лектинами. В качестве контроля использовали сыворотки здоровых доноров ($n = 18$).

Как видно из рис. 1, связывание лектина Con A с сыворотками пациентов с сепсисом на 26,6% выше по сравнению с сыворотками доноров. Известно, что при воспалительных процессах в ГП возрастает количество 2-антенных структур по отношению к 3- и 4-антенным [10]. Очевидно, при сепсисе происходит уменьшение разветвленности углеводных структур гликоконъюгатов, что выражается в усилении связывания их с лектином Con A, который избирательно взаимодействует с биантенными структурами.

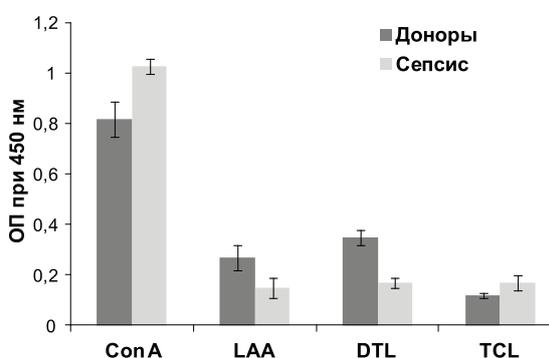


Рис. 1. Взаимодействие лектинов, меченных ферментной меткой, с сыворотками, адсорбированными на полистирольном планшете. Результаты представлены в виде среднего значения оптической плотности \pm SD

Известно, что при онкопатологии наблюдается увеличение доли O-гликозилированной структуры типа муцина [7]. Подобное перегликозилирование углеводных цепей, вероятно, происходит и при воспалительном процессе, чем и объясняется способность муцин-специфичного лектина TCL на 41,6% сильнее связываться с сыворотками больных по сравнению с сыворотками доноров. Заметное уменьшение связывания обнаружено при взаимодействии с GlcNAc-специфичными лектинами DTL и LAA. Показано, что углеводные структуры, в которых присутствует бисектный GlcNAc, составляют примерно 6% от общего числа гликанов при сепсисе, в то время как в пуле сывороток доноров их содержание достигает 10% [5]. Ранее было показано, что DTL проявляет сродство именно к бисектному GlcNAc [12], что, вероятно, и приводит к уменьшению связывания на 48,6% по сравнению с донорскими сыворотками. LAA проявляет сродство к хитобиозным структурам. При сепсисе увеличивается фукозилирование внешних

цепей олигосахаридов на 50% [5], при этом, вероятно, происходит экранирование хитобиозных цепей, что выражается в уменьшении связывания с LAA на 55,6%. При исследовании взаимодействия лектинов CGL и DTL-A с сыворотками доноров и больных существенного различия не было выявлено. Вероятно, при воспалительных процессах содержание концевых остатков Gal и GalNAc, к которым данные лектины проявляют сродство, в гликоконъюгатах изменяется незначительно.

Для определения степени гликозилирования СРБ у пациентов с сепсисом был использован оригинальный подход, который позволил, не выделяя СРБ в индивидуальном состоянии, определить содержание углеводов и провести их сравнительный анализ. Образцы сывороток больных разделяли электрофоретически, затем методом электроблоттинга белки переносили на PVDF мембрану. Для идентификации полос, соответствующих СРБ, мембрану обрабатывали иммуноглобулинами против СРБ (рис. 2). Определив местоположение полос, соответствующих СРБ, эти полосы вырезали и гидролизовали. Полученные гидролизаты анализировали методами ГЖХ на присутствие нейтральных сахаров и гексозаминов. Сыворотки здоровых доноров не могли быть исследованы в такой постановке, поскольку низкое содержание СРБ в них не позволило провести его идентификацию после электроблоттинга.

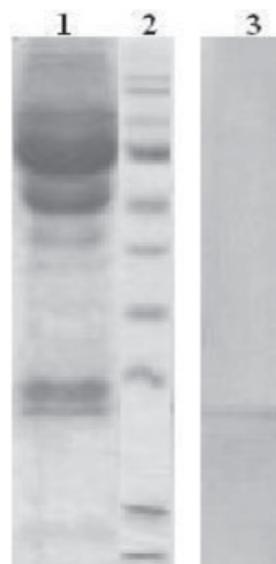


Рис. 2. Электрофоретическое разделение и электроблоттинг образцов сывороток крови: 1 – электрофорез сыворотки пациента с сепсисом; 2 – стандартные белки; 3 – электрофоретически разделенная сыворотка пациента с сепсисом после переноса на PVDF мембрану и идентификации полосы, соответствующей СРБ, с помощью иммуноглобулинов против СРБ, меченных ферментной меткой

Как видно из рис. 3, образцы СРБ, выделенные из сыворотки больных сепсисом, содержат моносахариды Man, Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc в соотношении 1:5:4:1:2.

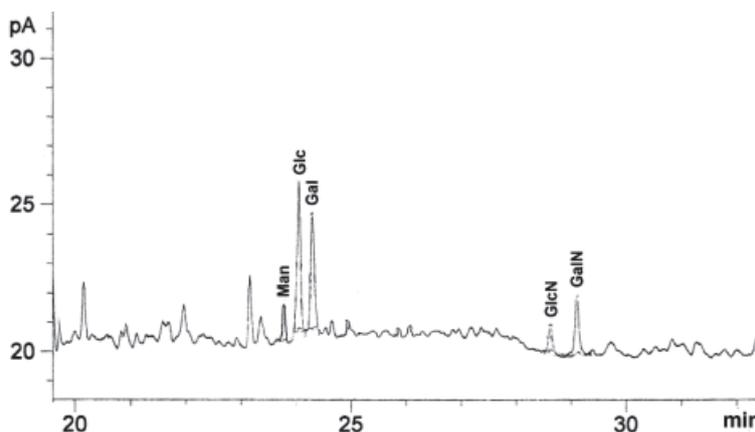


Рис. 3. Анализ углеводного состава СРБ методом ГЖХ

Ранее авторами было показано наличие трех нейтральных моносахаридов: Man, Glc, Gal в образце СРБ, полученном из сыворотки больного туберкулезом [11].

Заключение

Таким образом, в настоящей работе на примере СРБ, выделенного из сывороток больных сепсисом, 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 патологий. А опреде-

ление уровня перегликозилирования ГП целевой сыворотки позволит не только получить сведения об общем состоянии организма, но, возможно, и осуществить первичную дифференциальную диагностику.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

1. Вельков В.В. С-реактивный белок — структура, функция, методы определения, клиническая значимость // Лабораторная медицина. — 2006. — № 8. — С. 1–7.
2. Углеводсвязывающие белки морских беспозвоночных / П.А. Лукьянов, О.В. Черников, С.С. Кобелев, И.В. Чикаловец, В.И. Молчанова, В. Ли // Биоорганическая химия. — 2007. — Т. 33, № 1. — С. 172–181.
3. Чикаловец И.В. Гликозилирование С-реактивного белка у пациентов с ишемической болезнью сердца / И.В. Чикаловец, О.В. Черников, В.И. Молчанова // ТМЖ. — 2012. — № 1. — С. 87–90.
4. Определение гликоформ С-реактивного белка как маркера неспецифического язвенного колита / И.В. Чикаловец, М.А. Скиба, О.В. Черников, В.И. Молчанова, П.А. Лукьянов // Вестник Урал. мед. акад. науки. — 2009. — № 2/1 (24). — С. 184–185.
5. Altered glycosylation of alpha(1)-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus / K. Higai, Y. Azuma, Y. Aoki, K. Matsumoto // Clin. Chim. Acta. — 2003. — Vol. 329. — P. 117–125.
6. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis / O. Gornik, L. Royle, D.J. Harvey, C.M. Radcliffe, R. Saldova, R.A. Dwek, P. Rudd, G. Lauc // Glycobiology. — 2007. — Vol. 17, № 12. — P. 1321–1332.
7. Das T. Variations in binding characteristics of glycosylated human C-reactive proteins in different pathological conditions / T. Das, C. Mandal, C. Mandal // Glycoconj. J. — 2004. — Vol. 20. — P. 537–543.
8. Essentials of glycobiology / Edited by A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler. — 2nd edition. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. — 784 p.
9. Glycosylated molecular variants of C-reactive proteins from the major carp *Catla catla* in fresh and polluted aquatic environments / I. Paul, C. Mandal, A.K. Allen, C. Mandal, C. Mandal // Glycoconj. J. — 2001. — Vol. 18. — P. 547–556.
10. Glycosylation and the immune system / P.M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I.A. Wilson, R.A. Dwek // Science. — 2001. — Vol. 291. — P. 2370–2376.
11. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological condition / T. Das, A. Sen, T. Kempf, S.R. Pramanik, C. Mandal, C. Mandal // Biochem. J. — 2003. — Vol. 373. — P. 345–355.
12. N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* / N. Belogortseva, V. Molchanova, V. Glazunov, E. Evtushenko, P. Lukyanov // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — Vol. 1380. — P. 249–256.
13. Nakane P.K. Peroxidase-labeled antibody — new method of conjugation / P.K. Nakane, A. Lavoai // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 22, № 12. — P. 1084–1091.
14. Purification and partial characterization of a lectin from the red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr. (Rhodophyta) / V. Molchanova, O. Chernikov, I. Chikalovets, P. Lukyanov // Bot. Mar. — 2010. — Vol. 53, № 1. — P. 69–78.

15. Sloneker J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates / J.H. Sloneker // Methods in Carbohydrate Chemistry / Edited by R.L. Whistler, J.N. BeMiller. — Vol. VI. — Academic Press, 1972. — P. 20–24.

References

1. Velkov V.V. C-reaktivny belok — struktura, funkciya, metody opredeleniya, klinicheskaya znachimost // Laboratornaya medicina. 2006. no. 8. pp. 1–7.
2. Lukyanov P.A., Chernikov O.V., Kobleev S.S., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Li V. Uglevodsvyazyvayushhie belki morskikh bespozvonochnykh // Bioorgan. himiya. 2007. vol. 33, no. 1. pp. 172–181.
3. Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I. Glikozilirovanie C-reaktivnogo belka u pacientov s ishemicheskoi boleznью serdca // TMZh. 2012. no. 1. pp. 87–90.
4. Chikalovets I.V., Skiba M.A., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Lukyanov P.A. Opredelenie glikoform C-reaktivnogo belka kak markera nespecificheskogo yazvennogo kolita // Vestnik Ural. med. akad. nauki. 2009. no. 2/1 (24). pp. 184–185.
5. Higai K., Azuma Y., Aoki Y., Matsumoto K. Altered glycosylation of alpha(1)-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus // Clin. Chim. Acta. 2003. vol. 329. pp. 117–125.
6. Gornik O., Royle L., Harvey D.J., Radcliffe C.M., Saldova R., Dwek R.A., Rudd P., Lauc G. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis // Glycobiology. 2007. vol. 17, no. 12. pp. 1321–1332.
7. Das T., Mandal C., Mandal C. Protein A — a new ligand for human C-reactive protein // FEBS Letters. 2004. vol. 576. pp. 107–113.
8. Essentials of glycobiology (Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E., eds.) 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. 784 p.
9. Paul I., Mandal C., Allen A.K., Mandal C., Mandal C. Glycosylated molecular variants of C-reactive proteins from the major carp *Catla catla* in fresh and polluted aquatic environments // Glycoconj. J. 2001. vol. 18. pp. 547–556.
10. Rudd P.M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I.A., Dwek R.A. Glycosylation and the immune system // Science. 2001. vol. 291. pp. 2370–2376.
11. Das T., Sen A., Kempf T., Pramanik S.R., Mandal C., Mandal C. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological condition // Biochem. J. 2003. vol. 373. pp. 345–355.
12. Belogortseva N., Molchanova V., Glazunov V., Evtushenko E., Lukyanov P. N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. vol. 1380. pp. 249–256.
13. Nakane P.K., Lavoai A. Peroxidase-labeled antibody — new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. 1974. vol. 22, no. 12. pp. 1084–1091.
14. Molchanova V., Chernikov O., Chikalovets I., Lukyanov P. Purification and partial characterization of a lectin from the red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr. (Rhodophyta) // Bot. Mar. 2010. vol. 53, no. 1. pp. 69–78.
15. Sloneker J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. In Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R.L., BeMiller J.N., eds.) vol. VI. Academic Press, 1972. pp. 20–24.

Рецензенты:

Маркелова Е.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии, ГОУ ВПО «ТГМУ» Минздрава России, г. Владивосток;

Богданович Л.Н., д.б.н., зам. главного врача по научной работе, заведующая лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий, МО ДВО РАН, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 11.04.2013.