



УДК 577.112.85:612.115:616.15-006

ЗМІНА ГЕПАРИН- І ЛЕКТИН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ФІБРОНЕКТИНУ ПРИ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ КРОВІ

**А. О. Кулініч¹, А. І. Шевцова¹, І. Ю. Письменецька¹,
Г. С. Маслак¹, Т. П. Ніколаєнко-Камишова²**

¹Дніпропетровська державна медична академія
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49044, Україна

²КЗ „Міська багатопрофільна клінічна лікарня №4”
вул. Ближня, 31, Дніпропетровськ 49102, Україна
e-mail: kulan.85@mail.ru

Досліджували вміст фібронектину, його гепарин-зв'язуючу активність і взаємодію з лектином канавалії мечовидної (ConA), сочевиці (LCA), алеврії оранжевої (AAL) та кори золотого дощу звичайного (LABA) у хворих на еритремію та сублейкемічний мієлоз. Встановлено достовірне зниження концентрації та гепарин-зв'язуючої активності фібронектину плазми крові, зв'язок його функціональної активності з афінністю до лектинів. Визначено підвищення ступеня фукозильованості N-гліканів фібронектину за умов мієлопроліферативних захворювань крові. Доведено присутність фукози у складі O-гліканів фібронектину та залежність ступеня фукозильованості O-гліканів цього глікопротеїну від типу патологічного процесу.

Ключові слова: фібронектин, гепарин, лектин, фукоза, еритремія, сублейкемічний мієлоз.

ВСТУП

Фібронектин (ФН) – поліфункціональний глікопротеїн, який складається з двох субодиниць із молекулярною масою 220–250 кДа, що з'єднані на С-термінальному кінці двома дисульфідними зв'язками. Кожен мономер ФН містить домени, що можуть зв'язуватися з гепарином, фібрином, колагеном, бактеріями та іншими лігандами. Існує декілька ізоформ цього білка, серед яких найбільш розповсюдженими є плазмовий (пФН) і клітинний (кФН) фібронектини. Джерелом пФН є гепатоцити, які секретують його у кровообіг, кФН синтезується фібробластами, ендотеліоцитами й іншими клітинами та надходить у міжклітинний простір. Окрім спільних, означені форми ФН мають власні біологічні функції. Так, пФН, бере участь в елімінації циркулюючих імунних комплексів, а кФН утворює фібрилярні структури й обумовлює адгезію типу клітина-субстрат [8]. Різноманіття молекул ФН виникає внаслідок

альтернативного сплайсингу однієї мРНК [13] та гетерогенності його глікозилування [5]. Відомо, що загальний вміст вуглеводів у молекулі ФН за норми становить 4–6%, а структура його гліканив залежить від видової приналежності, місця синтезу та стану організму [14].

Останнім часом з'явилась інформація стосовно зміни здатності ФН взаємодіяти з лігандами при різних патологічних станах [1, 10], однак зв'язок між функціональною активністю цього глікопротеїну та його глікозилуваністю при проліферативних захворюваннях крові не визначений.

Метою даної роботи було вивчити гепарин- і лектин-зв'язувальну активність фібрoneктину плазми при мієлопроліферативних захворюваннях крові.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Вміст, гепарин- і лектин-зв'язуючу активність ФН плазми досліджували у здорових донорів (n=12), хворих на еритремію (n=8) та сублейкемічний мієлоз (n=8).

Концентрацію ФН у плазмі визначали методом імунодоту з використанням поліклональних кролячих антитіл до пФН. Отримані результати відцифровували за допомогою програми GelProAnalyser 32. Гепарин-зв'язувальну активність ФН плазми визначали методом холодової гепарин-преципітації [1]. Для цього до 50 мкл плазми крові додавали гепарин (Pharma Life, Україна) з активністю 1 МО й інкубували впродовж ночі при +4°C. Преципітат, що утворився, відділяли центрифугуванням при 2400 об./хв впродовж 10 хвилин. Вміст фібрoneктину в супернатанті визначали за допомогою імунодот-аналізу. Активність ФН оцінювали як відсоток фібрoneктину, що перейшов у гепариновий преципітат. Лектин-зв'язувальну активність ФН вивчали методом лектин-ферментного аналізу з використанням антитіл до цього білка, що були деглікозилувані за допомогою N-Glycosidase F (US Biological, США). Відсутність вуглеводів у складі деглікозилуваних імуноглобулінів, їхню афінність і специфічність перевіряли лектин- та імунодот-аналізом. Використовували лектини канавалії мечовидної – ConA (Sigma, США), сочевиці – LCA (Лектинотест, Україна), кори золотого дощу звичайного – LABA (Лектинотест, Україна) та алеврії оранжевої – AAL (US Biological, США), що були кон'юговані з пероксидазою хрому за методикою М. Д. Луцика [2]. Для контролю специфічності зв'язування лектинів із вуглеводними детермінантами ФН у реакційну суміш додавали відповідні моносахариди-інгібітори у концентрації 0,1 моль/л. Лектин-зв'язувальну активність оцінювали як відсоток зв'язування відповідного лектину з ФН плазми щодо норми у перерахунку на 1 мкг даного білка.

РЕЗУЛЬТАТИ

Згідно з отриманими результатами, як при еритремії, так і при сублейкемічному мієлозі порівняно з нормою вміст і гепарин-зв'язуюча активність ФН плазми достовірно знижувались і між цими параметрами був встановлений позитивний кореляційний зв'язок (табл. 1).

Лектин-зв'язувальна активність ФН залежала від типу патології та специфічності відповідного лектину. Так, при обох патологіях взаємодія ФН з ConA практично не змінювалась, але посилювалася його афінність до LCA та AAL. При цьому ступінь зв'язування з AAL при еритремії був на 52% вищим, ніж з LCA, а при сублейкемічному мієлозі ця різниця становила 112%.

Іншу картину спостерігали при дослідженні взаємодії ФН плазми з LBA. У хворих на еритремію ступінь зв'язування ФН з цим лектином підвищувався, а у хворих на сублейкемічний мієлоз, навпаки, знижувався і становив 65% норми (рис.1).

Таблиця 1. Вміст і гепарин-зв'язуюча активність фібронектину плазми при проліфера- тивних захворюваннях крові

Table 1. Content and heparin-binding activity of plasma fibronectin in proliferative disea- ses of blood

Група дослідження	Концентрація фібронектину, мкг/мл	Ступінь зв'язування з гепарином, %	Коефіцієнт кореляції, r
Здорові донори, n=12	328,21±16,97	100	0,322
Хворі на еритремію, n=8	239,01±11,96***	55,48±7,22*	0,577
Хворі на сублейкемічний мієлоз, n=8	237,85±10,99**	59,95±2,41*	0,746

Примітка: * – достовірна різниця порівняно з контролем при $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

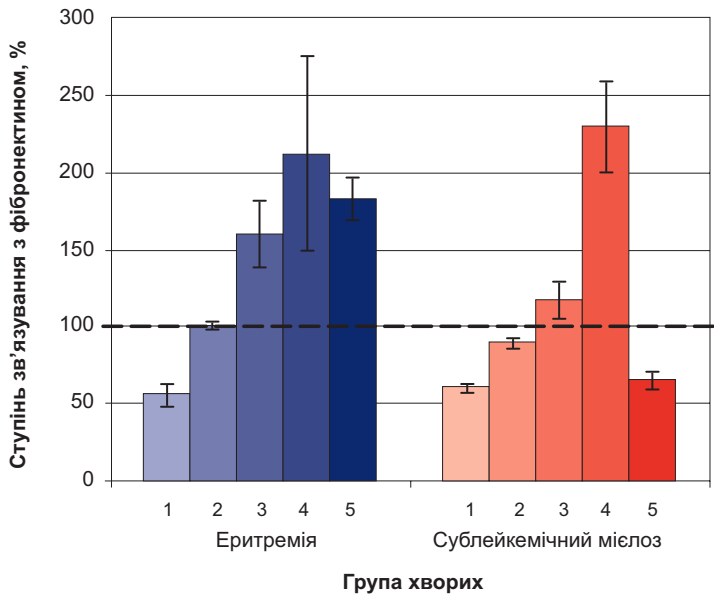


Рис. 1. Ступінь зв'язування (%) фібронектину плазми з гепарином (1), лектином канавалії мечовидної (2), лектином сочевиці (3), лектином алеврії оранжевої (4), лектином кори золотого дощу звичайного (5) при еритремії та сублейкемічному мієлозі щодо норми (штрихована лінія)

Fig. 1. Rate of plasma fibronectin binding (%) with heparin (1), *Canavalia ensiformis* lectin (2), *Lens culinaris* agglutinin (3), *Aleuria aurantia* lectin (4), *Laburnum anagyroides* lectin (5) in erythremia and subleukemic myelosis comparatively to norm (shaded line)

Кореляційний аналіз отриманих даних показав наявність негативного зв'язку між гепарин- і ConA-, а також LCA-зв'язувальною активністю ФН при обох патологічних станах. Щодо коефіцієнта кореляції між гепарин- і AAL-зв'язувальною активністю ФН, то він мав різну спрямованість залежно від патології і становив 0,921 при еритремії та -0,941 при сублейкемічному мієлозі, що практично відповідає функціональному зв'язку (табл.2).

Таблиця 2. Коефіцієнт кореляції (r) між гепарин- і лектин-зв'язувальною активністю фібронектину при проліферативних захворюваннях крові

Table 2. Correlation coefficient of heparin- and lectin-binding activity of fibronectin in proliferative diseases of blood

Група дослідження	Лектин			
	ConA	LCA	AAL	LABA
Хворі на еритремію, n=8	-0,692	-0,643	0,921	-0,882
Хворі на сублейкемічний мієлоз, n=8	-0,602	-0,817	-0,941	-0,222

ОБГОВОРЕННЯ

Кожна субодиниця молекули ФН містить по 3 домени, що можуть зв'язуватися з гепарином, тому вважають, що ступінь зв'язування ФН з гепарином відображає його функціональну активність [1]. Згідно з нашими дослідженнями, при еритремії та сублейкемічному мієлозі вміст і гепарин-зв'язувальна активність ФН знижувалися. Зменшення концентрації цього глікопротеїну в крові може бути пов'язане з підвищеним його використанням як опсоніну [4] та відкладенням у внутрішньосудинному тромбі [7]. Щодо зниження гепарин-зв'язуючої активності ФН, то це може бути наслідком зміни його вуглеводного компонента. Раніше Zheng та ін. показали, що вуглеводний компонент не тільки впливає на резистентність ФН до протеолізу, але й також на його колаген- і желатин-зв'язувальну активність [14].

За даними Tajiri M. та ін. [11], ФН має 7 потенційних сайтів N-глікозилування та 2 сайти приєднання O-гліканів. Сайти N-глікозилування є консервативними для всіх його ізоформ. У складі ФН людини перебувають переважно сіаловані бі- чи триантенні N-глікани комплексного типу, що можуть містити корову фукозу. Стосовно структури O-гліканів ФН відомо, що до їхнього складу входить кор першого типу (рис.2).

Для дослідження змін структури гліканів ФН плазми при проліферативних захворюваннях крові нами були обрані лектини різної специфічності: ConA, що реагує з коровою манозою біантенних гліканів (1), LCA, що за специфічністю схожий з ConA, але має більшу спорідненість до N-гліканів з коровою фукозою і може зв'язуватися з поліантенними гліканами (2), а також фукозоспецифічні лектини AAL (3) та LABA (4), що є чутливими до різних зв'язків між фукозою та глюкозаміном або фукозою та галактозою.

У результаті досліджень було показано, що ступінь зв'язування ФН плазми з лектином ConA при еритремії та сублейкемічному мієлозі перебуває в межах норми, тобто відносний вміст біантенних гліканів майже не змінюється.

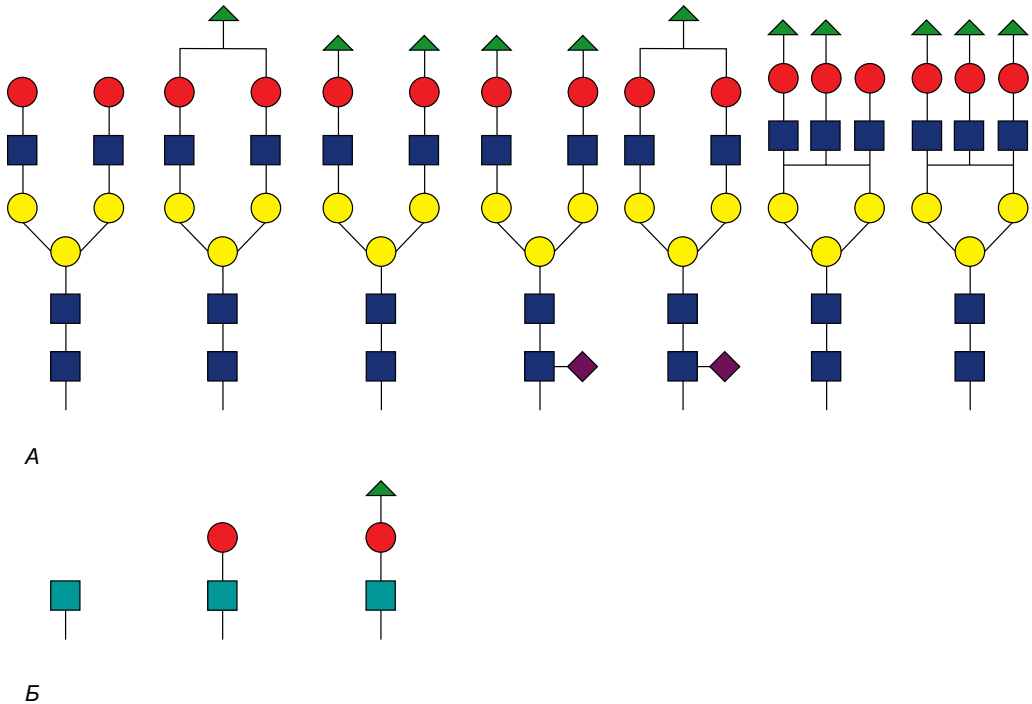


Рис. 2. Структура N-гліканів (А) та O-гліканів (Б) фібронектину (за Tajiri M., 2005), де:
 ■ – N-ацетилглюкозамін, ● – маноза, ● – галактоза, ▲ – N-ацетилнейрамінова кислота,
 ◆ – фукоза, ■ – N-ацетилгалактозамін

Fig. 2. Structure of N-glycans (A) and O-glycans (B) of fibronectin (according to Tajiri M., 2005):
 ■ – N-acetylglucosamine, ● – mannose, ● – galactose, ▲ – N-acetylneuraminic acid, ◆ – fucose,
 ■ – N-acetylgalactosamine

Зв'язування ФН із LCA підвищувалося при еритремії на 60%. Беручи до уваги значне посилення афінності цього лектину до корового триманозиду в присутності $\alpha(1\rightarrow6)$ фукози [12], можна припустити, що фукозилування кору зростає при даному проліферативному захворюванні крові.

Порівняння взаємодії ФН плазми з LCA і AAL показало, що перший лектин мав більшу афінність до ФН при еритремії, тоді як другий краще взаємодівав з ФН при сублейкемічному мієлозі. Враховуючи, що AAL має спорідненість не тільки до корової фукози, а й до кінцевої [6], посилення взаємодії лектину AAL з ФН при сублейкемічному мієлозі, на наш погляд, може бути пов'язано з появою $\alpha(1\rightarrow3)$ -зв'язної фукози у складі олігосахаридних ланцюгів ФН при даній патології. Високий коефіцієнт кореляції між гепарин-зв'язувальною активністю ФН та його спорідненістю до LCA й AAL, на наш погляд, свідчить про вплив залишків фукози на функціональну активність ФН.

Дослідження взаємодії ФН з LABA вперше дають змогу припустити, що O-глікани у складі цього глікопротеїну зазнають фукозилування. Літературні дані свідчать про відсутність фукози у складі O-гліканів ФН плазми крові у нормі [11]. За отриманими в роботі даними, ступінь зв'язування ФН з LABA підвищується на

82% при еритремії, а при сублейкемічному мієлозі, навпаки, знижується на 35%. Враховуючи, що цей лектин реагує переважно з $\alpha(1\rightarrow2)$ -зв'язаною фукозою О-гліканів [3,9], можна стверджувати, що ФН містить О-глікани з кінцевими залишками фукози і за норми, і при патології. Більш того, ступінь фукозильованості О-гліканів залежить від типу патологічного процесу. Отже, визначення взаємодії ФН з LABA може бути додатковим критерієм у діагностиці проліферативних захворювань крові.

ВИСНОВКИ

1. Вміст і гепарин-зв'язуюча активність фібронектину плазми знижуються при еритремії та сублейкемічному мієлозі.
2. Зв'язування фібронектину з лектинами сочевиці й алеврії оранжевої збільшується при еритремії та сублейкемічному мієлозі і свідчить про підвищення ступеня фукозильованості його N-гліканів. Підвищення фукозильованості N-гліканів даного глікопротеїну корелює зі зниженням його функціональної активності.
3. За результатами взаємодії фібронектину з лектином кори золотого дощу звичайного доведено присутність фукози у складі О-гліканів цього глікопротеїну.
4. Ступінь взаємодії фібронектину з лектином кори золотого дощу звичайного підвищується на 82% при еритремії та знижується на 35% при сублейкемічному мієлозі, що може бути використано як додатковий показник у діагностиці еритремії та сублейкемічного мієлозу.

-
1. Левитан Б.Н., Умерова А.Р., Астахин А.В. Плазменный фибронектин как маркер синдрома эндогенной интоксикации при хронических гепатитах и циррозах печени. **Кубанский национальный медицинский вестник**, 2009; 109(4): 116–120.
 2. Луцик М.Д., Детюк Е.С., Луцик Н.Д. **Лектины в гистохимии** / Под ред. Е.Н. Панасюка. – Львов: Вища школа, 1989. 144 с.
 3. Пискарев В.Е., Бушуева Т.Л., Ямсков И. А. Взаимодействие лектина бобовника *Laburnum anagyroides* с фукоантигенами. **Биоорганическая химия**, 2007; 33(1):182–186.
 4. Clemmensen I. Fibronectin and its role in connective tissue diseases. **Europ. Journ. Clin. Invest**, 2008; 11(3): 145–146.
 5. Janković M., Kosanović M. Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate. **Journal Disease Markers**, 2008; 25(1): 49–58.
 6. Matsumura K., Higashida K., Ishida H. et al. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose. **J. Biol. Chem**, 2007; 282(21): 15700–15708.
 7. Mosher D. Plasma fibronectin concentration. A risk factor for arterial thrombosis? **Arterioscler Thromb Vasc. Biol**, 2006; 26(6): 1193–1195.
 8. Pankov R., Yamada K. Fibronectin at a glance. **J. Cell Sci**, 2002; 15(115): 3861–3863.
 9. Piskarev V., Lutsik-Kordovskii M., Piskareva E., Iamskov I. Oligosaccharide specificity of the fucosyllectin from the bark of *laburnum Laburnum anagyroides*. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol**, 2003; 39(5): 581–7.
 10. Przybysz M., Maszczak D., Borysewicz K. et al. Relative sialylation and fucosylation of synovial and plasma fibronectins in relation to the progression and activity of rheumatoid arthritis. **Glycoconjugate Journal**, 2007; 24(9): 543–550.

11. *Tajiri M., Yoshida S., Wada Y.* Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. **Glycobiology**, 2005; 15(12): 1332–1340.
12. *Tamano K., Sugiura M., Natsuki J.* et al. Improvement of the lectin-antibody enzyme immunoassay of the alpha-fetoprotein carbohydrate chain for automation with the enzyme immunoassay robot. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, 2005; 69(8): 1616–1619.
13. *White E., Baralle F., Muro A.* New insights into form and function of fibronectin splice variants. **J. Pathol**, 2008; 216(1): 1.
14. *Zheng M., Hakomori S.* Soluble fibronectin interaction with cell surface and extracellular matrix is mediated by carbohydrate-to-carbohydrate interaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2000; 374(1): 93–99.

CHANGES IN HEPARIN- AND LECTIN-BINDING ACTIVITY OF FIBRONECTIN IN PROLIFERATIVE BLOOD DISEASES

**A. O. Kulinich¹, A. I. Shevtsova¹, I. U. Pismenetskaya¹,
A. S. Maslak¹, T. P. Nikolaenko-Kamyshova²**

¹*Dnipropetrovsk State Medical Academy, 9, Dzerzhynsky St., Dnipropetrovsk 49044, Ukraine*
²*MI „Urban Multidisciplinary Clinical Hospital N4”, 31, Blyzhnya St., Dnipropetrovsk, 49102, Ukraine*

Fibronectin concentration, its heparin-binding activity and interaction with Lens Culinaris Agglutinin (LCA), Aleuria Aurantia Lectin (AAL) and Laburnum Anagyroides Agglutinin (LABA) in patients with erythremia and subleukemic myelosis were investigated. Reliable decreasing of concentration and heparin-binding activity of plasma fibronectin as well as a connection between its functional activity and lectin-affinity were detected. Increasing of the level of core fucose in N-glycans of fibronectin in proliferative blood diseases was revealed. Presence of fucose in O-glycans of fibronectin and dependence of fucosylation level of O-glycans in the glycoprotein on the type of pathological processes were proved.

Key words: fibronectin, heparin, lectin, fucose, erythremia, subleukemic myelosis.

ИЗМЕНЕНИЕ ГЕПАРИН- И ЛЕКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФИБРОНЕКТИНА ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КРОВИ

**А. А. Кулинич¹, А. И. Шевцова¹, И. Ю. Письменецкая¹,
А. С. Маслак¹, Т. П. Николаенко-Камышова²**

¹*Днепропетровская государственная медицинская академия
ул. Дзержинского, 9, Днепропетровск 49044, Украина*

²*КУ „Городская многопрофильная клиническая больница №4”
ул. Ближняя, 31, Днепропетровск 49102, Украина*

Исследовали содержание фибронектина, его гепарин-связывающую активность и взаимодействие с лектином канавалии мечевидной (ConA), чечевицы (LCA), алеурии оранжевой (AAL) и коры золотого дождя обыкновенного (LABA) у больных с эритремией и сублейкемическим миелозом. Установлено достоверное снижение

концентрации и гепарин-связывающей активности фибронектина плазмы крови, связь его функциональной активности с афинностью к лектинам. Выявлено увеличение степени фукозилированности N-гликанов фибронектина при миелопролиферативных заболеваниях крови. Доказано присутствие фукозы в составе O-гликанов фибронектина и зависимость степени фукозилированности O-гликанов этого гликопротеина от типа патологического процесса.

Ключевые слова: фибронектин, гепарин, лектин, фукоза, эритремия, сублейкемический миелоз.

Одержано: 03.06.2010