

УДК 547.96:615.36
© Коллектив авторов

ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СОДЕРЖАНИЯ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В СТРУКТУРЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

И.А. Чернова, А.А. Демин, Л.К. Шатаева.

Институт высокомолекулярных соединений РАН
199004 С.-Петербург, Большой пр. 31; факс (7-812)328-6869;
эл. почта: chernova@mail.macro.ru

Методом ионообменной хроматографии выделены препараты хорионического гонадотропина (ХГ) из мочи беременных женщин с различными группами крови. Препараты ХГ, полученные от доноров с различными группами крови, отличаются по содержанию связанных сиаловых кислот (СК). Получены предварительные результаты о группоспецифичности препаратов ХГ, выделенных из мочи доноров с различными группами крови, что является следствием проявлений АВО-полиморфизма человека.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин (человеческий), сиаловые кислоты, группы крови, АВО-полиморфизм

ВВЕДЕНИЕ. К настоящему времени гонадотропины человека полностью охарактеризованы с точки зрения молекулярного строения, аминокислотной последовательности и углеводного состава [1-3]. Человеческий хорионический гонадотропин (ХГ) относится к классу гликопротеиновых гормонов, состоящих из двух цепей (α и β), каждая из которых содержит углеводный компонент. Пространственная структура макромолекулы ХГ установлена с разрешением 0,3 - 1,0 нм [3]. Гетеродимер стабилизирован фрагментом β -цепи, который "обернут" вокруг α -цепи и закреплен дисульфидной связью Cys 26 - Cys 110. Молекулярная масса человеческого ХГ составляет 38 кДа. В макромолекуле ХГ до 16 олигосахаридных звеньев могут иметь концевую сиаловую (N-ацетилнейраминную) кислоту [2]. Известно, что сиаловые кислоты, содержащиеся в гонадотропных гормонах, обеспечивают присутствие в углеводной части сильной карбоксильной группы с $pK_{\text{хар}}$ 2,6. С основной цепью белка сиаловые кислоты связаны N-гликозидной связью (с аспарагином Asn56 и Asn78 α -цепи и Asn13 и/или Asn30 β -цепи) или O-гликозидной связью (с серином Ser 121, 127, 132 и 138 основной цепи) [1]. В молекулах гликопротеиновых гормонов сиаловые кислоты связаны с углеводной частью связью $\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}$, в отличие от сывороточных гликопротеинов, в которых превалирует связь $\alpha 2 \rightarrow 6$.

Значительная роль сиаловых кислот в метаболизме гликопротеиновых гормонов была установлена Goettschalk и соавт. 40 лет назад [4]. Исследования последующих лет показали, что содержание сиаловых кислот влияет на физиологическую активность ХГ [5]. Обнаружена корреляция потери активности при поэтапном десиазировании ХГ [6].

В медицинской практике используют препараты гонадотропинов, полученные из мочи людей. В литературе отмечается гетерогенность высокоочищенных препаратов гонадотропинов по молекулярной массе и по

ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ГОНАДОТРОПИНА

специфической активности, определяемой иммуноферментным методом [7]. Причины гетерогенности лечебных препаратов гонадотропинов заключаются, прежде всего, в гетерогенности гормонов, секретируемых донорами в зависимости от их физиологического состояния: из организма выводятся не только нативные макромолекулы гонадотропинов, но и их отдельные α - и β -цепи, а также фрагменты этих цепей. Кроме того, гонадотропины в организме (и частично в собранном сырье) подвергаются действию различных гидролаз - пептидаз, протеиназ, нейраминидазы. Поэтому в исходном сырье всегда присутствуют частично гидролизованные или дезаилированные макромолекулы гонадотропинов, имеющие близкое молекулярное строение с интактным, но не обладающие биологической активностью из-за потери сиаловых кислот в углеводных звеньях [5,6].

Функциональное значение совершенно отчетливой гетерогенности, наблюдаемой в олигосахаридных структурах гликопротеиновых гормонов, еще не установлено и является предметом множества исследований. В работе [8] было изучено изменение гликозилирования ХГ в ходе беременности 5 доноров. С помощью аффинной хроматографии было обнаружено увеличение содержания фукозы в ХГ и его α -цепи к концу срока в моче всех доноров. Но до сих пор не было опубликовано ни одного исследования о зависимости содержания сиало- и асиало-ХГ в моче от группы крови беременных. Также не было проведено сравнения между эндогенной нейраминидазной активностью (и, следовательно, уровнем свободных сиаловых кислот) в моче беременных с разными группами крови, хотя известно, что сиалосодержащие группоспецифические рецепторы весьма существенны в процессах взаимодействия гликопротеинов с клеточными мембранами.

Настоящее исследование посвящено определению содержания связанных сиаловых кислот в высокоочищенных препаратах гонадотропинов, выделенных из мочи беременных с разными группами крови.

МЕТОДИКА. В работе использовали свежесобранные (не более 4 часов хранения) образцы донорской мочи беременных (22-28 лет) первого триместра беременности. Сбор проводили от 12 доноров каждой группы крови в утренние часы.

В предыдущих исследованиях [9] было установлено, что оптимальное значение pH для селективной сорбции гонадотропинов находится в области значений 3,6 - 4,0. Дегипментацию мочи проводили на азотсодержащем графитизированном углеродном материале - гемосорбенте СКН [10], благодаря амфолитным свойствам которого из мочи эффективно удаляется значительная часть низкомолекулярных балластных соединений. Осветленную мочу пропускали через колонку с карбоксильным катионитом Биокарб-Л (СГ-1м) на основе метакриловой кислоты, сшитой дивинильным кросс-агентом [11], со скоростью 60 мл/час/см². После окончания сорбции сорбент отмывали от молекулярно сорбированных компонентов дистиллированной водой со скоростью 100 мл/час/см² до оптической плотности промывных вод 0,1 на длине волны 280 нм. Десорбцию проводили 0,5 М ацетат-аммонийным буферным раствором (pH 9,5). На выходе из колонки собирали фракции, в которых измеряли pH, оптическую плотность раствора и содержание белка по методу Lowry. Характеристики суммарных элюатов приведены в табл.1. Для сравнения использовали препарат ХГ, обозначенный hCG, полученный тем же методом из мочи общего сбора [9]. Удельную активность препаратов ХГ определяли биологическим методом по привесу матки двухнедельных неполовозрелых крыс [12].

Содержание хорионического гонадотропина оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [9]. В работе использовали хроматограф Милихром (НПО "Научприбор") с колонками 2х62 мм; сорбент - Lichrosorb 5C18. В качестве стандарта ХГ использовали коммерческий препарат производства Московского завода эндокринных препаратов с удельной активностью 500 МЕ/мг белка. ВЭЖХ осуществляли в режиме градиентного элюирования при повышении концентрации ацетонитрила.

Препараты ХГ осаждали из полученных элюатов этанолом по общепринятой методике [9], затем их лиофильно высушивали и для дальнейших исследований растворяли в среде Рингера без добавления углеводов.

Для определения содержания свободных и связанных сиаловых кислот в полученных препаратах ХГ разных групп крови использовали модифицированный метод Uchida [13]. Концентрацию связанных сиаловых кислот измеряли после ферментативного гидролиза препаратом нейраминидазы (производства ГНИИ ЭМ, Н. Новгород) с активностью 9,1 МЕ/мг белка. Результаты представлены в табл.2.

Присутствие эндогенной нейраминидазной активности в выделенных препаратах ХГ оценивали, используя в качестве субстрата гликомакропептид к-казеина (ГМП) [14]. 0,2 мл препарата ХГ после добавления субстрата (0,4 мл раствора ГМП с концентрацией 2,8 мг/мл в Na-ацетатном буфере при pH 5.5) инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Результаты приведены в табл.3.

Гель-хроматографию на Сефадексе G-200 superfine проводили для отделения фракции иммуноглобулинов IgG, которые выделяются в мочу и могут быть связаны на карбоксильном катионите в условиях выделения ХГ; колонка 2,4 x 49 см; элюция 0,1 М ацетат-аммонийным буферным раствором при pH 6,85 с добавлением 10 (об.%) этанола. Для калибровки использовали стандартные препараты химотрипсина, сывороточного альбумина и ферритина фирмы "Sigma" (США) и цитохрома с производства завода медпрепаратов АО Самсон (С.-Петербург, Россия), а также универсальный агент антирезус Rho(D) и иммуноглобулины донорской плазмы.

Реакция гемагглютинации (РГА) человеческих эритроцитов групп А(II) и В(III) [15] была использована для характеристики группоспецифических свойств фракций после гель-хроматографии. В качестве контроля использовали группоспецифические антисыворотки с титром 1:16.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. До последнего времени роль сиаловых кислот в процессах межмолекулярного взаимодействия и гормонального регулирования на уровне макроорганизма изучена недостаточно.

Известно, что в мочу поступают из крови и с ней выделяются из организма многие белковые и небелковые вещества плазмы, в том числе ферменты, гормоны, регуляторы, иммуноактивные компоненты. Набор белков, присутствующих в моче, зависит от (патологического) состояния организма.

Использование ионообменной хроматографии на карбоксильном катионите позволяет выделять из мочи белковые и пептидные компоненты с целью их детального анализа.

В данной работе мы использовали современные типы карбоксильных катионитов, специально предназначенные для селективной и обратимой сорбции белков из солесодержащих растворов [9, 11], на которых можно осуществлять групповое разделение компонентов смеси по электрохимическим характеристикам макромолекул. В ранее проведенных исследованиях подобраны условия хроматографического разделения ХГ и его свободных α - и β -цепей с изoeлектрическими точками pI в интервале 4,8-7,0 [9, 15]. Для селективного связывания ХГ из мочи беременных использовали карбоксильный катионит СГ-1м, аналог катионита КМ-2п, позволяющий исключить сорбцию урокиназы и других протеиназ [9].

При использовании в качестве источника ХГ мочи беременных с разными группами крови были обнаружены значительные различия в содержании белковых и пептидных компонентов (рис.1). Наименьшее количество полученных по указанному методу белков при ступенчатой десорбции обнаружено в случае доноров группы АВ(IV), а максимальное - от доноров группы А(II). Степень очистки полученных препаратов ХГ в выбранном режиме оценивали по ВЭЖХ: для препаратов каждой группы крови на хроматограммах в градиенте ацетонитрила наблюдали только один пик (рис.2).

ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ГОНАДОТРОПИНА

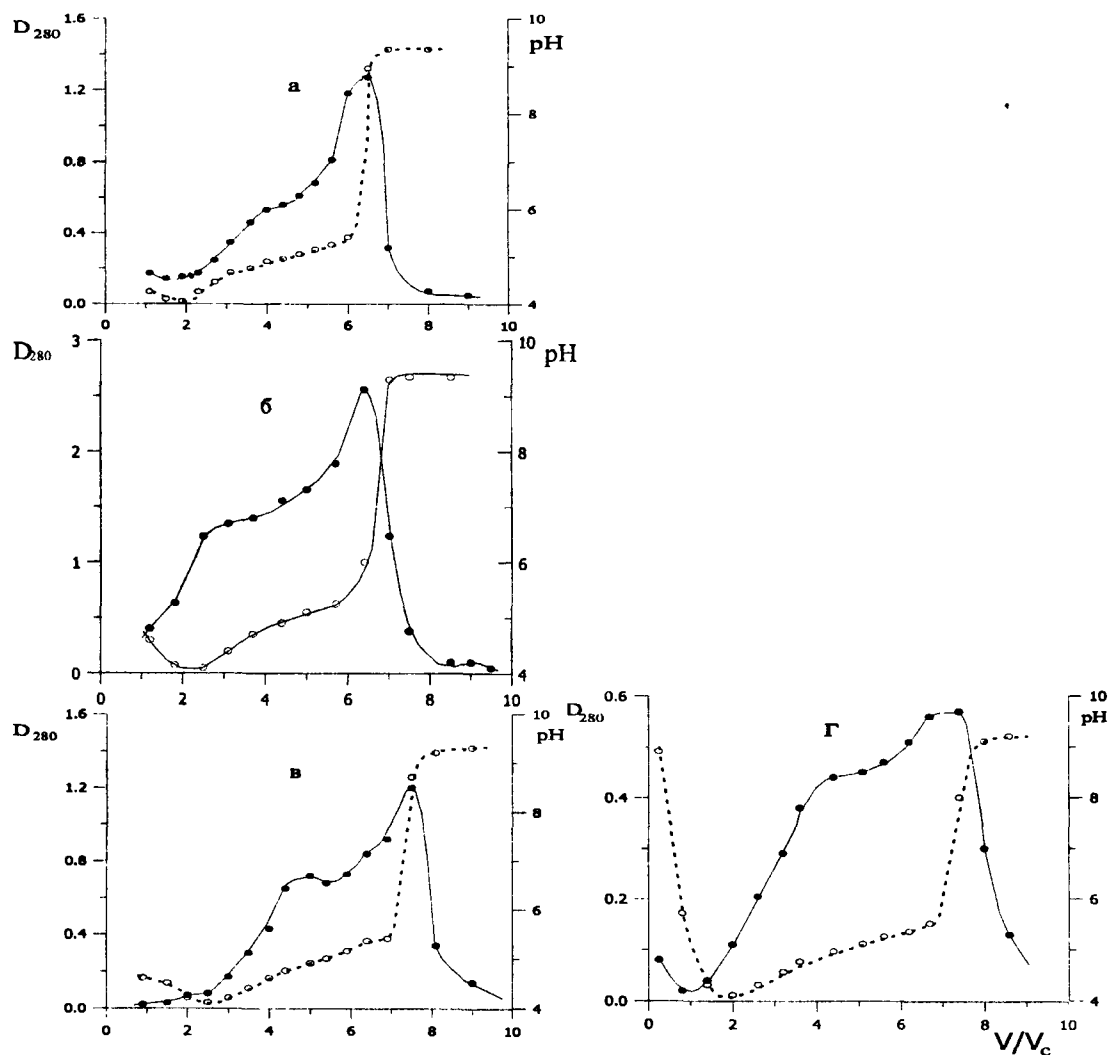


Рисунок 1.

Десорбция белковых компонентов мочи беременных женщин с разными группами крови с катионита Биокارب-Л; сорбция при pH 3.8; соотношение "объем сорбента : объем мочи" 1 : 100.

а) O(I); б) A(II); в) B(III); г) AB(IV) Сплошная линия - оптическая плотность на длине волны 280 нм; пунктир - pH

Содержание собственно ХГ в элюатах после ионообменной хроматографии оценивали по данным ВЭЖХ с калибровкой по стандартному коммерческому препарату. Данные по активности ХГ, измеренной в элюатах, и расчетные значения содержания ХГ в исходной моче доноров разных групп крови приведены в табл. 1. Сравнение показывает, что максимальное количество ХГ содержится моче в группы A(II), минимальное - группы AB(IV). В литературе отмечается присутствие в грубых экстрактах ХГ ингибиторов связывания с тироидными мембранами, что приводит к снижению удельной активности препаратов [7]. Обнаруженное для препарата hCG заниженное значение активности ХГ в 1 л мочи общего сбора вероятнее всего связано со специфическим ингибированием гонадотропинов группоспецифическими γ -глобулинами или α -макроглобулинами.

Для дальнейшей очистки ХГ проведено спиртовое осаждение элюатов ионообменной хроматографии, при котором происходит преципитация гликопротеинов, тогда как макромолекулы, утратившие углеводные части, остаются в растворе [9]. Как видно из сравнения данных табл. 1 и 2, удельная активность препаратов ХГ на этой стадии очистки увеличивается в 30 раз.

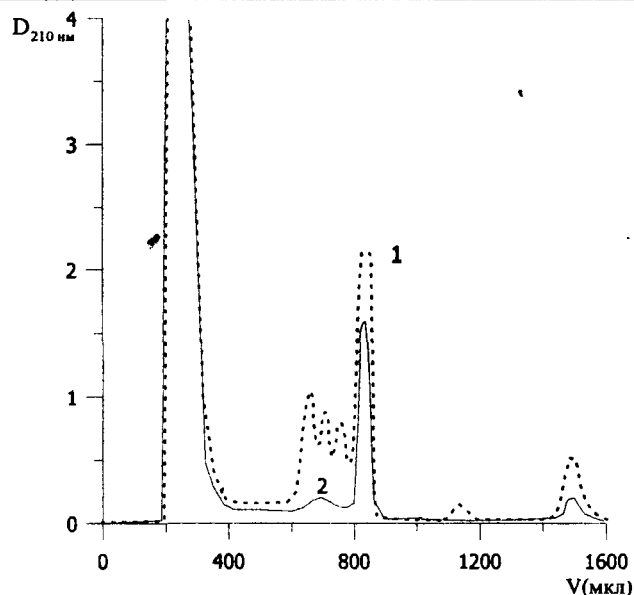


Рисунок 2.

ВЭЖХ элюата ионообменной хроматографии мочи беременных группы крови А(II)- (кривая 2) и суммарного препарата hCG из мочи общего сбора (кривая 1)

Таблица 1. Свойства элюатов, полученных с помощью ионообменной хроматографии мочи беременных разных групп крови на карбоксильном катионите СГ-1м

Группа крови доноров	Объем мочи, л	Объем элюата, мл	Активность ХГ в элюате,		Содержание ХГ в моче, мг/л
			МЕ/мл	МЕ/мг	
0(I)	6,0	96	218	375	1,76
A(II)	6,0	128	315	437	2,99
B(III)	4,7	113	215	286	2,16
AB(IV)	5,6	134	190	301	2,06
hCG*	10,0	192	174	341	1,42

Примечание: Препарат hCG* получен из мочи общего сбора

Таблица 2. Характеристики препаратов ХГ после спиртового осаждения

Группа крови доноров	Белок, мг/мл	Активность ХГ, МЕ/мг	Концентрация СКК, мкг/мг
0(I)	0,44	10560	15,2
A(II)	0,70	12800	19,3
B(III)	0,64	8420	7,4
AB(IV)	0,70	8080	6,4
hCG	0,62	11900	10,4

В полученных препаратах ХГ был проведен количественный анализ содержания сиалокомпонентов с использованием фермента нейраминидазы нехолерных вибрионов, отщепляющего концевые сиаловые кислоты от молекул гликопротеинов. Во фракциях элюатов после ионообменной хроматографии такой анализ был весьма затруднен из-за высокого фона свободных сиаловых кислот. После спиртового осаждения в препаратах ХГ значительно возрастает концентрация связанных сиаловых кислот, при этом обнаружена существенная разница между их содержанием в препаратах ХГ разных групп крови (табл.2). Максимальное количество связанных сиаловых кислот содержится в препарате группы крови А(II), минимальное для АВ(IV) и усредненное для hCG. Отметим, что такие различия коррелируют с активностью полученных препаратов.

ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ГОНАДОТРОПИНА

Тканевые нейраминидазы до настоящего времени изучены значительно хуже, чем микробные. Мы попытались оценить собственную нейраминидазную активность препаратов ХГ разных групп крови, измеряя количество свободных сиаловых кислот после действия данного препарата на сиалсодержащий субстрат ГМП [13]. Как видно из данных таблицы 3, этот диагностический параметр в максимальной степени чувствителен для групп крови О(І) и А(ІІ), в наименьшей мере для АВ(ІV). Этот вопрос требует дальнейшего более подробного изучения.

Таблица 3. Эндогенная нейраминидаза в препаратах ХГ доноров различных групп крови

Группа крови доноров	Активность, мМЕ/мг белка
О(І)	9,0
А(ІІ)	8,6
В(ІІІ)	5,2
АВ(ІV)	2,8
hCG	6,4

Состав и молекулярные массы препаратов ХГ после спиртового осаждения были охарактеризованы с помощью гель-хроматографии (рис. 3). Гель-хроматографию на Сефадексе G-200 проводили с целью отделения иммуноглобулинов плазмы. Как видно из рис. 3, на гель-хроматограмме, действительно, присутствуют 2 пика с молекулярными массами порядка 160 кДа и 40 кДа. Пик І, выходящий с объемом задержки, мы относим к примесным иммуноглобулинам, пик ІІ соответствует молекулярной массе ХГ.

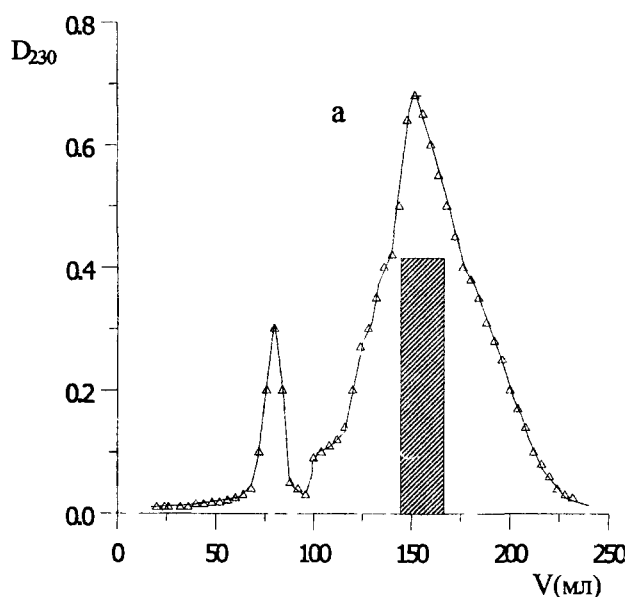


Рисунок 3.

Гель-хроматография препаратов ХГ (после спиртового осаждения) на Сефадексе G-200 Superfine; колонка 2.4x49 см, элюция 0.05 М ацетат аммиачным буфером pH 6,85 с добавлением 10 (об %) этанола. Заштрихованы фракции, проявляющие биологическую активность по методу [12] а) препарат от доноров группы крови А(ІІ); б) препарат от доноров группы крови В(ІІІ)

Пики ІІ препаратов после гель-хроматографии, выделенных от доноров с группами крови А(ІІ) и В(ІІІ), были исследованы в реакции гемагглютинации человеческих эритроцитов тех же групп крови с целью установления присутствия группоспецифических детерминант в макромолекулах гонадотропинов. Титры реакции гемагглютинации для препаратов ХГ в сравнении со стандартными

антисыворотками приведены в табл. 4. Видно, что высокоочищенные фракции ХГ доноров групп крови А(II) и В(III) в указанных концентрациях агглютинируют эритроциты групп В(III) и А(II), т.е. наблюдается гемагглютинация - аналогично группоспецифическим антисывороткам. Эти данные позволяют предполагать, что гонадотропины, полученные от доноров с группой крови, не совпадающей с группой крови реципиентов, будут связаны и частично ингибированы при взаимодействии с рецепторами эритроцитов реципиента.

Таблица 4. Титры реакции гемагглютинации гелехроматографических препаратов ХГ

Группа крови доноров мочи	Эритроциты А(II)	Эритроциты В(III)
АII (0,26 мг/мл)	0	1/4
ВIII (0,39 мг/мл)	1/4	0
стандартная сыворотка А(II)	0	1/16
стандартная сыворотка В(III)	1/16	0

При обсуждении механизма гормональной регуляции на молекулярном уровне к настоящему времени установлено, что углеводная часть макромолекулы ХГ связывается с лектиноподобным компонентом клеточной мембраны и является медиатором запуска дальнейших этапов процесса. Для передачи сигнала необходимо двойное взаимодействие пептидной части макромолекулы гормона и ее сialiрированных компонентов с соответствующими сайтами узнавания [16]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что лектиноподобный компонент клеточной мембраны, связывающий углеводную часть макромолекулы ХГ, имеет группоспецифическую природу, т.е. гормональная регуляция в организме осуществляется под контролем группоспецифических взаимодействий гликопротеинов плазмы крови. Такая гипотеза может частично объяснить широкий диапазон индивидуальной чувствительности (и переносимости) при использовании препаратов ХГ, экстрагированных из мочи, полученной от беременных с разными группами крови.

ВЫВОДЫ: Моча беременных женщин с разными группами крови содержит различное количество ХГ.

Препараты хорионического гонадотропина, выделенные от доноров с различными группами крови, различаются содержанием связанных сialiрированных кислот, что может приводить к "аффинной нестандартности" лечебных препаратов, полученных из мочи общего сбора.

Получены предварительные результаты о группоспецифичности препаратов ХГ, выделенных из мочи доноров с различными группами крови, которые проявляют активность по отношению к эритроцитам соответствующих групп аналогично антисывороткам: наблюдается выраженная агглютинация.

Представленные данные позволяют сделать однозначную рекомендацию для фирм-производителей лечебных препаратов ХГ: не следует смешивать мочу доноров с разными группами крови на стадии заготовки сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stockell A. Hartree and Renwick A.G.C. (1992) Biochem.J., **287**, pt.3, 665-679.
2. Gray C.J. (1988) Acta Endocrinol., **288**, 20-27.
3. Laphorn A.J., Harris D.C., Littlejohn A., Lustbader L.W., Canfield R.E., Machin K.J., Morgan F.J., Isaacs N.W. (1994) Nature, **369**, 455-461.
4. Gottschalk A., Witten W.K., Graham E.R.B. (1960), Biochim. Biophys. Acta, **38**, 183-184.
5. Wilson C.A., Leigh A.J. and Chapmann (1990) J. Endocrinol., **125**, 3-14.
6. Van Hall T.V., Vaitukaitis J.L., Ross G.T., Hickman J.W., Ashwell G. (1971)

ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ГОНАДОТРОПИНА

- J. Endocrinol., **88**, 456-464.
7. *Hoermann R., Amir S.M., Ingbar S.H.* (1988) *ibid.*, **123**, 1535-1543.
 8. *Scarulis M.C., Wehmann R.E., Nisula B.C., Blithe D.L.* (1992) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**, 91-96.
 9. *Демин А.А., Чернова И.А., Потапенко В.Е., Топоркова Е.Б., Шатаева Л.К.* (1999) *Прикл.биохимия и микробиол.* **35**, 382-387.
 10. *Шатаева Л.К., Чернова И.А., Сельцер А.В., Шашков Б.В., Дерябин И.И., Самсонов Г.В.* (1984) *Прикл.биохим. и микробиол.* **20**, 393-399.
 11. *Чернова И.А., Шатаева Л.К., Крылова В.В., Блега М. И др.* (1991) *Ж. прикл. химии*, **64**, 686-691.
 12. *Brown P.S., Wells M.* (1966) *J. Endocrinol.*, **35**, 199-206.
 13. *Чернова И.А., Лавровский С.Н., Абрашев И.Р., Велчева П.Г., Самсонов Г.В.* (1987) *Прикл.биох. и микробиол.* **23**, 843-847.
 14. *Чернова И.А., Шатаева Л.К., Абрашев И., Велчева П., Самсонов Г.В.* (1987) *Вопр.мед.химии*, **33**, 53-55.
 15. *Соловьев В.Д., Кобринский Г.Д., Домарадский И.В.* (1972) *Ж. микробиол.*, N 10, 2-11.
 16. *Amano J., Kobata A.* (1993) *Arch.Biochem.Biophys.*, **305**, 618-521.

Поступила 10.04.01

SIALIC ACIDS CONTENT IN HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN OF PREGNANCY URINE DEPENDS ON BLOOD GROUP

I.A.Chernova, A.A.Demin, L.K.Shataeva

Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy Sci., Bolshoi pr.31, St.-Petersburg,
199004 Russia; fax: (7-812)328-6869, e-mail: chernova@mail.macro.ru

Low-pressure ion-exchange chromatography was used for isolation of chorionic gonadotropin (hCG) from urine of pregnant women. The purified hCG-preparations from various blood group donors were shown to differ in their sialic acid content. The highly purified hCG-preparations after gel chromatography were analyzed in the reaction of hemagglutination and the preliminary results suggest their blood group specificity.

Key words: human chorionic gonadotropin (hCG), sialic acids, blood group specificity, ABO-polymorphism