

УДК 543.635.24:616.15-006

ИЗМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ СУБЛЕЙКЕМИЧЕСКОМ МИЕЛОЗЕ

Письменецкая И.Ю.¹, Баттерс Т.Д.²

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

²Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

E-mail: pirina2004@list.ru

Работа посвящена исследованию свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом, одним из видов хронических миелопролиферативных лейкозов. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы при этом заболевании. Было установлено существенное повышение общей концентрации гликанов плазмы и гетерогенности их ВЭЖХ-спектров. Во всех проанализированных образцах были выявлены 3 пика олигосахаридов, практически отсутствующие в норме. Эти олигосахариды состояли из 7-9 остатков моносахаридов.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, плазма крови человека, сублейкемический миелоз.

ВВЕДЕНИЕ

Трансформации клеток при раковых заболеваниях всегда включают структурно-функциональные изменения мембранных, внутриклеточных и секретируемых гликоконъюгатов, особенно их углеводной части – гликанов [1, 2]. Углеводы гликоконъюгатов принимают участие во множестве биологических процессов: клеточной адгезии и эндоцитозе, активации рецепторов и передаче сигналов, молекулярном транспорте и клиренсе, тем самым в значительной мере определяя поведение клеток в многоклеточном организме [3, 4]. Именно поэтому изменения в структуре гликанов вносят существенный вклад в аномальное поведение раковых клеток – неконтролируемый рост, экспансию окружающих тканей и метастазирование [5, 6].

К настоящему времени при онкотрансформациях обнаружены следующие абберации углеводной части гликоконъюгатов: 1) увеличение молекулярной массы N-гликанов за счет появления полиантенных структур; 2) укорачивание структуры O-гликанов; 3) появление β 1–6-разветвлений у N-гликанов; 4) добавление полилактозаминных цепей; 5) повышение фукозилирования антенн; 6) усиление сиалированности и появление полисиаловых структур; 7) изменение структуры сиаловых кислот, например, появление необычной гликолилнейраминовой кислоты. Эти изменения связаны с особенностями процессов гликозилирования в раковых клетках: 1) неполным синтезом и/или процессингом нормальных структур и

накоплением промежуточных форм; 2) синтезом новых гликанов в результате активации гликозилтрансфераз и гликозидаз, которые в норме отсутствуют или обладают низкой активностью; 3) включением в синтетические процессы необычных моносахаридов, например, гликолилнейраминовой кислоты [1, 6, 7].

При синтезе и распаде гликопротеинов, гликолипидов, протеогликанов и гликолилфосфотидилинозитольных якорей образуются разнообразные формы олигосахаридов, не связанные с полипептидными цепями или липидами, но имеющие строение, аналогичное углеводной части гликоконъюгатов или ее предшественников. Это так называемые свободные олигосахариды. Их образование в клетке и строение исследовано довольно подробно [8-12]. Однако мало что известно о свободных олигосахаридах биологических жидкостей, а тем более об их изменениях при патологических состояниях организма. Конечно, наибольший практический интерес представляют абберации при онкозаболеваниях. Поэтому целью данной работы и стало изучение свободных олигосахаридов плазмы крови при онкопролиферативных процессах на примере сублейкемического миелоза.

Сублейкемический миелоз (миелосклероз с миелоидной метаплазией, остеомиелопозитическая дисплазия, миелоидная спленомегалия, идиопатический миелофиброз и др.) относится к хроническим миелолиферативным лейкозам. Основными признаками являются специфическое, фиброзно-склерозированное поражение костей, в особенности, костного мозга и метаплазия внутренних органов, в частности селезенки. Нарушение кроветворения происходит на уровне полипотентной стволовой клетки с вовлечением в процесс гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков. Преобладает многолетнее доброкачественное течение болезни: в некоторых случаях до 20-30 лет. В начале заболевания в крови можно обнаружить гипертромбоцитоз, повышение содержания гемоглобина и эритроцитов (эритремическая фаза болезни). В дальнейшем показатели красной крови снижаются, возникает анемия. Примерно в 20% случаев сублейкемический миелоз может переходить в острую терминальную фазу с развитием бластного криза и угнетением нормальных ростков кроветворения. Отсутствие характерных хромосомных аномалий и сходство клинических проявлений с эритремией и хроническим миелолейкозом затрудняют диагностику сублейкемического миелоза [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазма крови пациентов с диагностированным сублейкемическим миелозом (n=10) и относительно здоровых доноров (n=10) была отобрана с согласия обеих групп и в соответствии с требованиями этического комитета в клинике ГУ«Днепропетровская медицинская академия». Возраст относительно здоровых доноров соответствовал возрастной категории больных исследуемой группы и составлял от 40 до 65 лет.

Для нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали реактивы фирмы VWR International, остальные химические реагенты были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Удаление белков плазмы. Депротеинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту [14]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуороэтиленовой мембраной (Millex-LN, 0.45 μm , Millipore Corp., США), в соответствии с опубликованной методикой [15].

Удаление глюкозы. Моносахариды из плазмы после депротеинизации удаляли адсорбционной хроматографией на пористом графите с использованием колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл), как описано в работе [15].

Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антралиловой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville D.C.A. et.al. [16]. Меченные гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [15].

Нормальнофазовая высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ). Олигосахариды разделяли методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville D.C.A. et.al. [16, 17]. Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville D.C.A. и др. [16].

Компьютерная обработка данных. Для сбора хроматографических данных и их обработки использовали компьютерные программы Waters Millennium, Waters Empower, Peak Time, Microsoft Office Excel 2003/2007, Microsoft Power Point 2003/2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров.

Исследовались олигосахариды, состоящие из 4 и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20 до 45 минут.

В предыдущих работах [18, 19] были изучены ВЭЖХ-спектры гликанов плазмы крови относительно здоровых доноров и показана их высокая стабильность (воспроизводимость), что может служить основанием для их использования в качестве контрольных спектров при анализе изменений, возникающих, например, при заболеваниях. Такой контрольный спектр приведен на рис.1 (А). Несколько спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом показаны на рис.1(В,С,Д). Нумерация пиков указана в соответствии с их нумерацией на контрольном спектре.

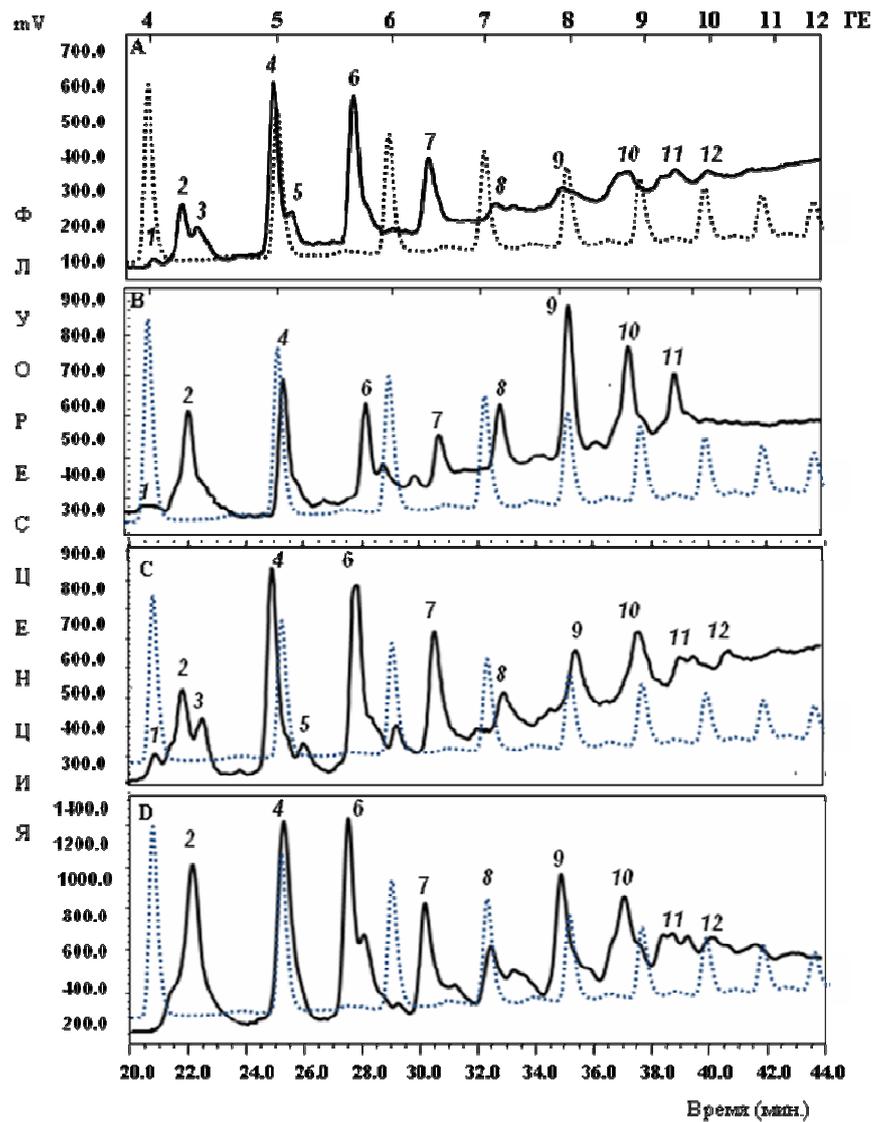


Рис.1. ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы крови:
 А – относительно здоровых доноров; В,С,Д – больных сублейкемическим миелозом
 Примечание: Пунктиром обозначены спектры частично гидролизованного декстрана.

Хроматографические профили исследованных образцов отличались как между собой, так и от контрольного спектра. Это свидетельствует о том, что, во-первых, изменения в соотношении свободных олигосахаридов разных структур данного диапазона имеют индивидуальные особенности, а во-вторых, что совокупность выбранных методов анализа и спектров сравнения адекватны поставленной задаче.

В ВЭЖХ-спектрах всех исследованных образцов присутствовали главные пики, соответствующие 2,4,6 и 7 пикам контрольного профиля. Пики 8, 9 и 10 в спектре гликанов плазмы крови больных были более выраженными, чем у относительно здоровых доноров. Значительное увеличение площади этих пиков (особенно 9 и 10) является главным отличием исследуемых спектров от контроля. Кроме того, в достаточно вариабельной зоне 1-3 пиков происходило перераспределение площади в пользу 2 пика. Характерной чертой анализируемых образцов являлось и то, что в зоне между 6 и 7 пиками, а в некоторых образцах и между 5-6, появлялись дополнительные мелкие пики. Перечисленные особенности свидетельствуют об общем повышении гетерогенности спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе.

В таблице 1 дана характеристика пронумерованных пиков в глюкозных единицах (ГЕ). Из таблицы следует, что константно сохраняемые 2 (4,28 ГЕ), 4 (5,01 ГЕ), 6 (5,69 ГЕ) и 7 (6,40 ГЕ) пики – это олигосахариды, состоящие из 4-6 моносахаридных остатков. Существенное увеличение площадей пиков 8-10 связано либо с существенным повышением концентрации, либо с появлением новых структур гликанов, состоящих из 7-9 остатков моносахаридов.

Таблица 1.
Характеристика пиков ВЭЖХ-спектров в глюкозных единицах (ГЕ)

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ГЕ	4,08	4,28	4,40	5,01	5,17	5,69	6,40	7,08	7,85	8,62	9,40	9,93

Индивидуальные отличия исследованных образцов наблюдались в зонах микрогетерогенности: 1) в диапазоне 1, 2, 3 пиков; 2) между 4 и 6, 6 и 7 пиками; 3) в диапазоне 11-12 пиков.

Как было показано ранее [18], образцы плазмы крови относительно здоровых доноров по общей концентрации свободных олигосахаридов разделялись на 2 группы: 1) с более низкой концентрацией – $626,02 \pm 45,12$ пмоль/мл и 2) с более высокой - $1457,65 \pm 190,71$ пмоль/мл. Концентрация гликанов в плазме крови больных сублейкемическим миелозом была значительно выше и составляла $3219,39 \pm 264,02$ пмоль/мл после исключения из общего ряда образца с самым высоким показателем - $13405,15$ пмоль/мл. Распределение концентраций по ранжированному ряду образцов представлено на рисунке 2.

Главным источником свободных олигосахаридов плазмы крови является цитозоль клеток, в котором появляются продукты начального этапа синтеза гликана-предшественника при N-гликозилировании и ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом деградации гликопротеинов, не прошедших клеточный контроль фолдинга [11].

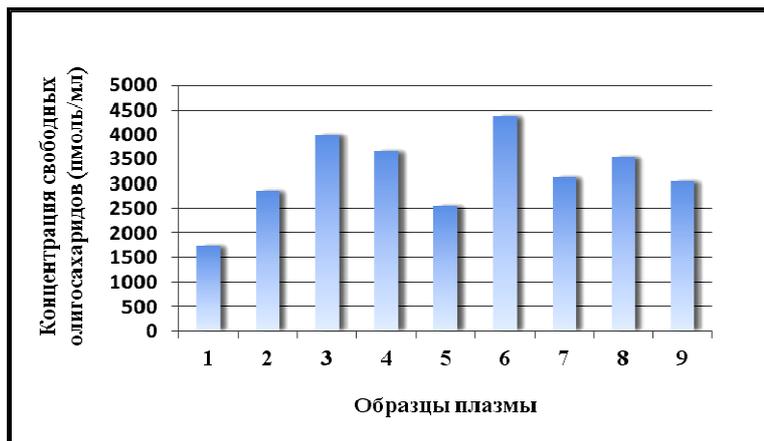


Рис.2. Концентрация свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом.

Повышение концентрации гликанов плазмы крови свидетельствует об усилении ЭР-ассоциированной деградации, что наблюдается на компенсаторном этапе развития стресса эндоплазматического ретикулума [20].

ВЫВОДЫ

1. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров.
2. Показано, что ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы больных отличаются от спектров гликанов плазмы относительно здоровых волонтеров. Основные отличия заключаются в повышении общей концентрации и гетерогенности свободных олигосахаридов при сублейкемическом миелозе.
3. Во всех проанализированных образцах были обнаружены 3 пика – 7,08 ГЕ, 7,85 ГЕ и 8,62 ГЕ, практически отсутствующие в норме.

БЛАГОДАРНОСТИ

Образцы крови больных были любезно предоставлены для анализа врачом ГУ «Городская многопрофильная клиническая больница» Т.П.Николаенко-Камышовой. Работа была выполнена при поддержке международных грантов International Union Against Cancer ICREET (ICR/09/044), EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (г.Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Терри Д. Баттерса (Terry D.Butters).

Список литературы

1. Kuzmanov U. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification / U. Kuzmanov, H. Kosanam, E.P. Diamandis // *BMC Med.* – 2013. – Vol. 11. – P.31–51.
2. Miyamoto S. Clinical applications of glycomic approaches for the detection of cancer and other diseases / S. Miyamoto // *Curr Opin Mol Ther.* – 2006. – Vol. 8. – P. 507–513.
3. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle/ S. Hakomori // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2002. – Vol.99. – P.10231–10233.
4. Ohtsubo K. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease/ K. Ohtsubo, J.D. Marth // *Cell* – 2006. –Vol. 126. – P. 855–867.
5. Kobata A. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours / A. Kobata, J. Amano // *Immunol Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83, No 4. – P. 429–439.
6. *Cancer Medicine* / D.W. Kufe, R.E. Pollock, R.P. Weichselbaum [et al.]. – Hamilton, Canada: BC Decker Inc., 2003. – P. 512.
7. *Essentials of Glycobiology* / A. Varki, R. Cummings, J.Esko [et al.]. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
8. Chantret I. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation / I. Chantret, S.E.H. Moore // *Glycobiology.* – 2008. – Vol.18, No 3. – P. 210–224.
9. Benyair R Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum / R Benyair, E Ron, G.Z. Lederkremer // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2011. – Vol. 292. – P.197–280.
10. Braakman I. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum / I. Braakman, N.J. Bulleid // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. –Vol. 80. – P.71–99.
11. Hoseki J. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation / J. Hoseki, R. Ushioda, K. Nagata // *J. Biochem.* – 2010. – Vol.147, № 1. – P.19–25.
12. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology.* – 2005. – Vol. 15, No 6. – P.1R–15R.
13. Глузман Д.Ф. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики) / Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, В.А. Надгорная. – Киев: ДИА, 2008. – С. 34–37.
14. Письменецька І. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів / І.Ю.Письменецька // *Вісник Київського національного університету. Біологія.* – 2012. – Вип. 60. – С. 27–29.
15. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi, D.C. Neville, R.H. Lachman [et al.] // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 409, №2. – P. 571–580.
16. Neville D.C. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville, V. Coquard, D.A. Priestman [et al.] // *Anal Biochem.* - 2004. – Vol. 331. – P.275–282.
17. Neville D.C. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides / D.C. Neville, R.A. Dwek, T.D. Butters // *J. Proteome Res.* – 2009. – Vol. 8. – P.681–687.
18. Письменецька І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия».* – 2012. – Т. 25 (64), №1. – С. 182–187.
19. Письменецька І.Ю. Прогнозування структур вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия».* – 2012. – Т.25 (64), №3. – С.158–164.
20. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: a novel mechanism of leukemic progression in mice / C.L. Kriss, J.A. Pinilla-Ibarz, A.W. Mailloux [et al.] // *Blood* – 2012. – Vol. 120. – P. 1027–1038.

Письменецка І.Ю. Зміна хроматографічних спектрів вільних олігосахаридів плазми крові при сублейкемічному мієлозі / **І.Ю. Письменецка, Т.Д. Баттерс** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С. 153-160.

Робота присвячена дослідженню вільних олігосахаридів плазми крові хворих на сублейкемічний мієлоз, що є одним з видів хронічних мієлопроліферативних лейкозів. Вперше було отримано ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми при цьому захворюванні. Було встановлено істотне підвищення загальної концентрації гліканів плазми і гетерогенності їх ВЕРХ-спектрів. У всіх проаналізованих зразках було виявлено 3 піки олігосахаридів, які в нормі практично не спостерігалися. Ці олігосахариди склалися з 7-9 залишків моносахаридів.

Ключові слова: вільні олігосахариди, ВЕРХ-спектри гліканів, плазма крові людини, сублейкемічний мієлоз.

Pismenetskaya I.U. Chromatographic profile changes of plasma free oligosaccharides in subleukemic myelosis / **I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters** // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 153-160.

The work is devoted to an investigation of plasma free oligosaccharides of patients with subleukemic myelosis, a type of myeloproliferative leukemia. For the first time HPLC-profiles of plasma free oligosaccharides have been obtained in this disease. A significant increase in total concentrations of plasma glycans and in heterogeneity of their HPLC-profiles have been revealed. In all the samples there were identified 3 peaks of oligosaccharides that were absent in control profiles. These oligosaccharides composed of 7-9 monosaccharide residues.

Keywords: free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, human blood plasma, subleukemic myelosis

Поступила в редакцію 16.02.2013 г.