

УДК 543.635.24:616.15-006

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ НЕЙТРАЛЬНОЙ И ЗАРЯЖЕННОЙ ФРАКЦИЙ 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

Статья посвящена исследованию нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом. Показано, что нейтральная фракция свободных олигосахаридов плазмы крови больных вероятнее всего представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами, а главные пики заряженной фракции – двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот. Установлено повышение гетерогенности ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при данном заболевании. Во всех проанализированных образцах были обнаружены 3 отличительных пика, два из которых имеют значительно меньшую площадь в норме, а третий вообще отсутствует в спектре гликанов практически здоровых доноров. Наибольшие отличия наблюдались во фракции заряженных гликанов, в которой был обнаружен основной маркерный пик, полностью отсутствующий в норме.

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

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточные свободные олигосахариды – гетерогенная по структуре группа гликанов, которая появляется в процессе синтеза и деградации гликоконъюгатов [1]. Эту группу олигосахаридов можно разделить на 2 подгруппы в зависимости от заряда молекул – незаряженные (нейтральные) гликаны и заряженные (кислые). Заряд гликанов обусловлен присоединением остатков разнообразных кислот, как органических, так и неорганических. Среди органических кислот преобладают сиаловые, а среди неорганических – фосфорная и серная.

Наиболее изученные процессы, в ходе которых в клетке появляются свободные олигосахариды, – это синтез гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме и их лизосомальный распад. Гликозилирование гликопротеинов в аппарате Гольджи, а также обмен других гликоконъюгатов с этой точки зрения изучен слабо.

Особенности синтеза гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме обеспечивают появление свободных гликанов с четко определенным строением молекул [2]. Это могут быть полиманнозные двух- или трехантенные гликаны с

различной длиной антенн. Такой тип олигосахаридов может дополнительно содержать от одного до трех остатков глюкозы. Полиманнозные свободные олигосахариды, образующиеся внутри эндоплазматического ретикулума, не имеют заряда и относятся к группе нейтральных гликанов. На ранних этапах синтеза гликопротеинов на цитозольной стороне мембраны эндоплазматического ретикулума образуются фосфорилированные, т.е. заряженные, полиманнозные гликаны [3].

В ходе лизосомальной деградации гликопротеинов также образуются свободные олигосахариды определенной структуры [4]. Строение их отличается от гликанов эндоплазматического ретикулума, т.к. полностью определяется структурой гликоконъюгатов, углеводная часть которых чаще бывает комплексного или гибридного типа, нежели полиманнозного. Поэтому в данном случае отличаются и заряженные олигосахариды. Их заряд обусловлен наличием остатков сиаловых кислот, реже – серной кислоты, но не фосфорной.

Предыдущие работы авторов показали, что свободные олигосахариды присутствуют и в плазме крови [5]. Анализ строения гликанов плазмы здоровых и относительно здоровых доноров выявил аналогию с внутриклеточными свободными олигосахаридами [6, 7]. Следовательно, они могут отражать состояние внутриклеточных органелл – эндоплазматического ретикулума и лизосом.

Многие заболевания и патологические состояния живого организма связаны со стрессом тех или иных органелл клеток, что приводит к нарушению их функций. Пролиферативные заболевания системы кроветворения – не исключение [8]. Поэтому свободные олигосахариды плазмы крови могут оказаться полезными для диагностики и их лечения этих заболеваний.

В предшествующих исследованиях были получены ВЭЖХ-спектры общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом [9]. Целью данной работы было разделение этого пула на отдельные фракции в зависимости от заряда и их сравнение с аналогичными фракциями в норме.

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 [10]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной

полифлуорэтиленовой мембраной (Millex-LH, 0.45 μm , Millipore Corp., США), в соответствии с опубликованной методикой [11].

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 [11].

Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антрапириловой) 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) [11].

Разделение олигосахаридов на фракции. Меченные антрапириловой кислотой гликаны разделяли на нейтральные и заряженные (кислые) ионообменной хроматографией на QAE- Сефадексе (Q25-120) после нанесения их на колонку и промывки водой путем элюции нейтральных гликанов уксусной кислотой, а заряженных – ацетатом аммония в соответствии с методикой Neville D.C.A. et.al. [12].

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. [12, 13]. 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. [12].

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 нейтральных и заряженных (кислых) 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 44 минут.

Результаты разделения общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом на 2 фракции, в зависимости от заряда гликанов (фракцию нейтральных олигосахаридов и фракцию отрицательно заряженных олигосахаридов), представлены на рисунке 1. В качестве контроля использовали спектр общей фракции свободных олигосахаридов плазмы крови относительно здоровых доноров (рис.1А), т.к. в предыдущих работах [5,7] была

показана его достаточная стабильность (воспроизводимость). Нумерация пиков на рисунке указана в соответствии с их нумерацией на контрольном спектре.

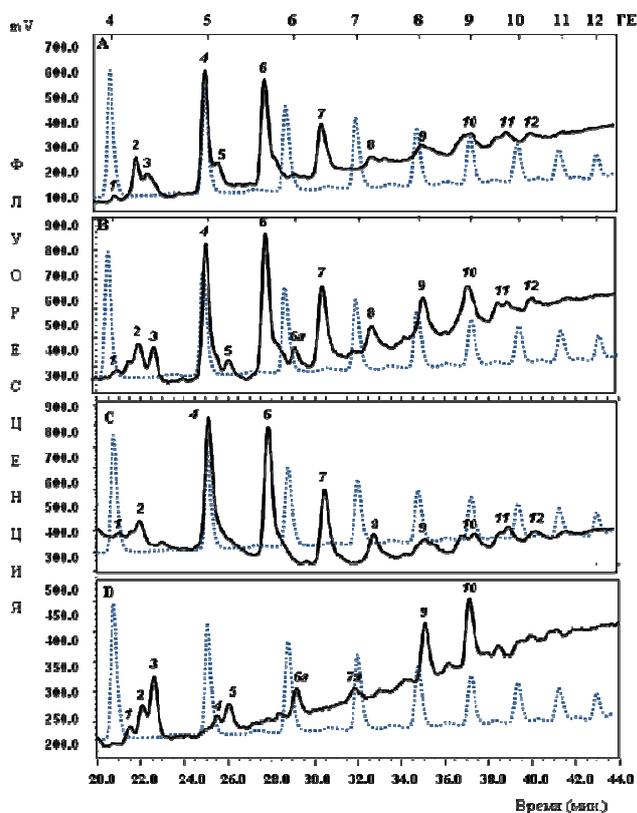


Рис.1. ВЭЖХ-спектры отдельных фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом: А – контроль; В – общая фракция, С – нейтральная фракция, D – заряженная фракция.

Примечание: Пунктиром обозначены спектры внешнего стандарта - частично гидролизованного декстрана.

Анализ полученных фракций показал, что большая часть свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе представлена фракцией нейтральных гликанов (рис.1С), которая включала все олигосахариды самых больших пиков (4-го, 6-го и 7-го), подавляющую долю пиков 1,2 и 8, а также значительную часть пиков 11 и 12. Гликаны 3-го, 5-го, 9-го и 10-го пиков также присутствовали в этой фракции, но в очень малых количествах.

Фракция заряженных (кислых) гликанов была менее гетерогенна и, т.к. она включала малые пики, то составляла по концентрации лишь небольшую долю от общего пула свободных олигосахаридов. В нее входили почти все гликаны 3-го, 5-го, 9-го и 10-го пиков, часть 1-го, 2-го и 4-го. Кроме того, только эта фракция

содержала пики ба и 7а, которые полностью отсутствовали во фракции нейтральных олигосахаридов.

Было проведено сравнение нейтральных и заряженных (кислых) свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом с аналогичными фракциями плазмы крови относительно здоровых доноров. На рисунке 2 показаны ВЭЖХ-спектры этих фракций в норме и при патологии.

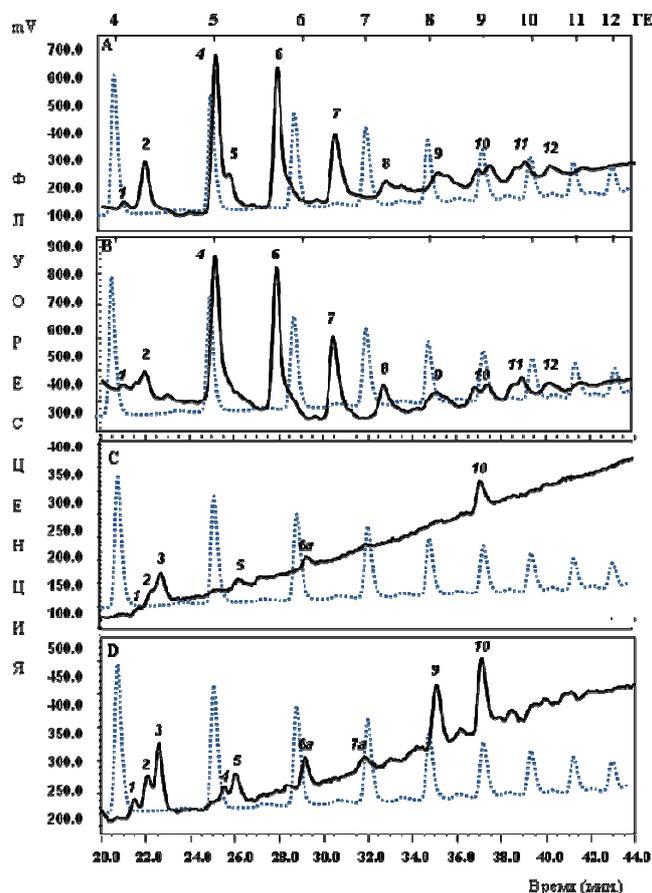


Рис.2. Сравнение ВЭЖХ-спектров нейтральных и заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом с нормой:

А – нейтральная фракция в норме; В – нейтральная фракция при сублейкемическом миелозе; С – заряженная фракция в норме; D – заряженная фракция при сублейкемическом миелозе.

Примечание: Пунктиром обозначены спектры внешнего стандарта - частично гидролизованного декстрана.

Различия между хроматографическими профилями нейтральных фракций (рис.2 А и В) минимальны и заключаются в изменении концентраций минорных пиков 5-

го и 8-го. Первый практически исчезает из спектра данной фракции, а второй, наоборот, увеличивается при исследуемом заболевании. Кроме того, намечаются новые пики – между 1-ым и 2-ым, а также за позицией 3-го пика, который в данной фракции отсутствует как в образцах, так и в контроле.

Значительно больше изменений при сублейкемическом миелозе происходит во фракции заряженных (кислых) олигосахаридов. Во-первых, наблюдается повышение концентрации всех без исключения выявляемых компонентов спектра. Во-вторых, появляются новые пики, отсутствующие в норме – 7а и 9. Особый интерес представляет 9-й пик, так как он четко прописывается в спектре анализируемых образцов, имеет достаточную для его идентификации концентрацию и полностью отсутствует в контроле.

В таблице 1 дана характеристика пронумерованных пиков в глюкозных единицах (ГЕ), а также показаны основные возможные структуры гликанов. Выбор этих структур был обоснован в предыдущей работе авторов [7] и опирался на анализ литературных данных и соответствующих электронных баз.

Таблица 1.
Характеристика основных пиков ВЭЖХ-спектров в глюкозных единицах (ГЕ)
с основными предполагаемыми структурами гликанов

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ГЕ	4,08± 0,01	4,28± 0,01	4,40± 0,01	5,01± 0,01	5,17± 0,03	5,69± 0,01	6,40± 0,01	7,08± 0,01	7,85± 0,01	8,62± 0,02	9,40± 0,02	9,93± 0,03
Н Е Й Т Р А Л Ь Н Ы Е												
К И С Л Ы Е												

Нейтральная фракция вероятнее всего представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами с остатками глюкозы или без них, с одним или двумя остатками N- ацетилгалактозамина. Следовательно, как и в норме, главным источником нейтральной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе является эндоплазматический ретикулум и цитозоль клеток.

Значительно сложнее оказалось предсказать возможные структуры фракции заряженных гликанов. Наиболее вероятно, что 9-й и 10-й пики представлены двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот, соответственно. Источниками гликанов такого типа могут быть лизосомы. Однако для уточнения строения олигосахаридов заряженной фракции требуется более глубокий анализ.

В предыдущей работе [9] было показано, что характерной чертой ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов при сублейкемическом миелозе является существенное увеличение 8-го (7,08 ГЕ), 9-го (7,85 ГЕ) и 10-го (8,62 ГЕ) пиков. Разделение олигосахаридов на фракции позволило установить, что 8-й пик вероятнее всего представлен полиманнозными структурами, т.к. относится к нейтральной фракции, а два остальных (9-й и 10-й) – сиалированными двухантенными комплексными гликанами, т.к. они идентифицируются во фракции заряженных олигосахаридов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных сублейкемическим миелозом и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров..
2. Показано, что нейтральная фракция свободных олигосахаридов плазмы крови больных вероятнее всего представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами, а главные пики заряженной фракции – двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот.
3. Установлено повышение гетерогенности ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при данном заболевании. Наибольшие отличия от нормы наблюдались во фракции заряженных гликанов.
4. Во всех проанализированных образцах были обнаружены 3 отличительных пика, два из которых имеют значительно меньшую площадь в норме (8-й и 10-й), а третий вообще отсутствует в спектре гликанов практически здоровых доноров (9-й). Этот маркерный пик представлен двухантенными комплексными N-гликанами с одним остатком сиаловой кислоты.

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. Varki A. Essentials of Glycobiology / A. Varki, R. Cummings, J.Esko [et al.]. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
2. Suzuki T. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation / T. Suzuki, Y. Funakoshi // *Glycoconj J.* – 2006. – Vol.23, № 5– 6. – P.291– 302.
3. Chantret I. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation / I. Chantret, S.E.H. Moore // *Glycobiology.* – 2008. – Vol.18, № 3. – P. 210–224.
4. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology.* – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R – 15R.
5. Письменецка І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів/І.Ю. Письменецка, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. –Т.25 (64), №1. – С.182–187.
6. Письменецка І.Ю. Хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів /І.Ю.Письменецка// Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 58. – С. 74–79.
7. Письменецка І.Ю. Прогнозування структур вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів/І.Ю. Письменецка, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012.–Т.25 (64) , №3. – С.158–164.
8. Liu Y. Proteostasis regulation at the endoplasmic reticulum: a new perturbation site for targeted cancer therapy / Y. Liu, Y. Ye // *Cell Res.* – 2011.– V.21, № 6. – P.867– 883.
9. Письменецкая И.Ю., Баттерс Т.Д. Изменение хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе / І.Ю. Письменецка, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013.–Т.26 (65), №1. – С.153–160.
10. Письменецка І. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів/І.Ю.Письменецка// Вісник Київського національного університету. Біологія. – 2012, Вип. 60. – С. 27–29.
11. Alonzi D.S. 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.
12. 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.
13. 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.

Письменецька І.Ю. Динаміка змін нейтральної та зарядженої фракцій вільних олігосахаридів плазми крові на тлі сублейкемічного мієлозу / **І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С. 159-167.

Стаття присвячена дослідженню нейтральною і зарядженою фракцій вільних олігосахаридів плазми крові хворих на сублейкемічний мієлоз. Показано, що нейтральна фракція вільних олігосахаридів плазми крові хворих найімовірніше представлена двоохантеними і трьохантеними поліманозними N-гліканами, а головні піки зарядженої фракції - двоохантеними комплексними N-гліканами з одним або двома залишками сіалових кислот. Встановлено підвищення гетерогенності ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові при даному захворюванні. У всіх проаналізованих зразках було виявлено 3 маркерних піки, два з яких мали значно меншу площу в нормі, а третій взагалі був відсутній в спектрі гліканів практично здорових донорів. Найбільші відмінності спостерігалися у фракції заряджених гліканів, в якій був виявлений основний маркерний пік, повністю відсутній у нормі.

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

Pisnenskaya I.U. Dynamics of neutral and charged fractions of plasma free oligosaccharides in subleukemic myelosis / **I.U. Pisenetskaya, T.D. Butters** // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 2. – P. 159-167.

The article is devoted to a study of neutral and charged fractions of blood plasma free oligosaccharides of patients with subleukemic myelosis. The neutral oligosaccharide fraction of plasma free oligosaccharides of the patients is shown to be more likely represented by bi- and tri-antennary high mannose type N-glycans, and the main peaks of the charged fraction – by bi-antennary complex N-glycans with one or two sialic acid residues. The increasing heterogeneity of plasma free oligosaccharide HPLC-profiles was observed in this disease. In all the samples there were identified 3 distinctive peaks, two of which had a much smaller area in norm, and the third was absent in the control profiles. The greatest differences were revealed in the fraction of charged glycans, in which the main marker peak, completely absent in norm, was discovered.

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

Поступила в редакцію 26.04.2013 г.