

**УДК 543.635.24:616.15:544.17**

## **ВІЛЬНІ ОЛІГОСАХАРИДИ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ**

*Письменецька І.Ю.<sup>1</sup>, Баттерс Т.Д.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна*

<sup>2</sup>*Інститут глікобіології Оксфордського університету, Оксфорд, Велика Британія*

*E-mail: pirina2004@list.ru*

Механізми клітинного контролю нативності глікокон'югатів, що синтезуються, та катаболізм мембранних та секретованих глікокон'югатів призводять до появи вільних олігосахаридів – незв'язаних аналогів гліканів глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та глікозилфосфотидилінозитольних якорів. Вперше були отримані хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів. Показано, що концентрація цих олігосахаридів у плазмі може суттєво коливатися, а ВЕРХ-спектри гліканів у зразках мають дуже схожі профілі. Стабільність спектрів плазми в нормі може бути надійною основою для вивчення змін спектру вільних олігосахаридів плазми крові при різноманітних захворюваннях. Застосування в якості контролю біоматеріалу практично здорових донорів потребує додаткового ранжування зразків всередині групи та її збільшення.

**Ключові слова:** вільні олігосахариди, плазма крові, ВЕРХ-спектри гліканів, практично здорові донори.

### **ВСТУП**

Вільні олігосахариди (незв'язані N- і O-глікани та продукти їх розщеплення) в цитозолі клітини мають кілька джерел і виникають як у процесі глікозилювання білків та ліпідів, так і під час деградації глікопротеїнів з порушенням фолдингу чи глікозилювання та різноманітних нативних глікокон'югатів (глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та глікозилфосфатидилінозитольних якорів) в процесі їх постійного обміну [1–4].

При глікозилюванні клітини жорстко контролюють синтез та приєднання до протеїнових ланцюгів гліканів з нативними структурами і, маючи механізми розпізнавання аберантних гліканів чи глікопротеїнів з порушенням фолдингу (клітинний контроль якості - CQC – cell quality control) [5, 6], намагаються їх розщеплювати ще до закінчення синтезу глікопротеїнів (асоційована з ендоплазматичним ретикуломом деградація – ERAD - endoplasmic reticulum associated degradation) [7]. При цьому з'являється велика кількість вільних олігосахаридів, серед яких повинні бути аберантні глікани. Доки клітини можуть впоратися з такими змінами, аберантні глікопротеїни не мають жодних шансів з'явитися в функціональних зонах (на поверхні клітинних мембран або в міжклітинному середовищі), але продукти їх деградації у вигляді вільних олігосахаридів вже існують.

Тому детальне вивчення вільних олігосахаридів, які з'являються в процесі клітинного контролю якості, відкриває абсолютно нові перспективи раннього виявлення змін у глікозилуванні, пов'язаних з різними захворюваннями, прогнозування їх перебігу та моніторингу лікування.

Інтенсивно вивчають вільні олігосахариди у середині клітин [8, 9], але нещодавно вони були виявлені і в біологічних рідинах [10]. Механізми їх попадання в кров чи сечу невідомі, але була показана їх автентичність внутрішньоклітинним олігосахаридам [11].

Пошук біомаркерів захворювань серед вільних олігосахаридів потребує перш за все володіння інформацією стосовно їх розподілу у нормі. Тому метою даної роботи було вивчення спектру вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів.

## **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Плазма крові практично здорових донорів (n=10) була зібрана у Дніпропетровській медичній академії. Донори були у віці від 46 до 52 років.

Реактиви для нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії були від VWR International, інші – від Sigma-Aldrich.

Депротейнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним центрифугуванням впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. [12]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45  $\mu$ m, Millipore Corp., США) згідно [10]. Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1мл (25мг/мл) згідно з методикою [10].

Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою - 2-АА (Sigma - Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [13]. Очищення 2-АА-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [10].

2-АА-марковані олігосахариди поділяли шляхом нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботах Neville D.C.A. et.al. [13, 14].

Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану в якості зовнішнього стандарту згідно з Neville D.C.A. et al.[13]. Частково гідролізований декстран утворює хроматографічний спектр з представництвом усіх полімерів глюкози у зростаючому порядку від мономеру до 10-14 мономерів в полімері і тому дозволяє пронумерувати кожний пік хроматограми у глюкозних одиницях (ГО) згідно з приблизною кількістю мономерів у його складі.

Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Зразки біоматеріалу практично здорових донорів найчастіше застосовують у якості контролю при різноманітних медико-біологічних дослідженнях, коли з тих чи інших причин неможливо чи недоцільно використовувати біоматеріал детально обстежених і жорстко відібраних здорових волонтерів.

В даних дослідженнях вперше були отримані хроматографічні ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів (рис.1). Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридів, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 20 до 45 хвилин.

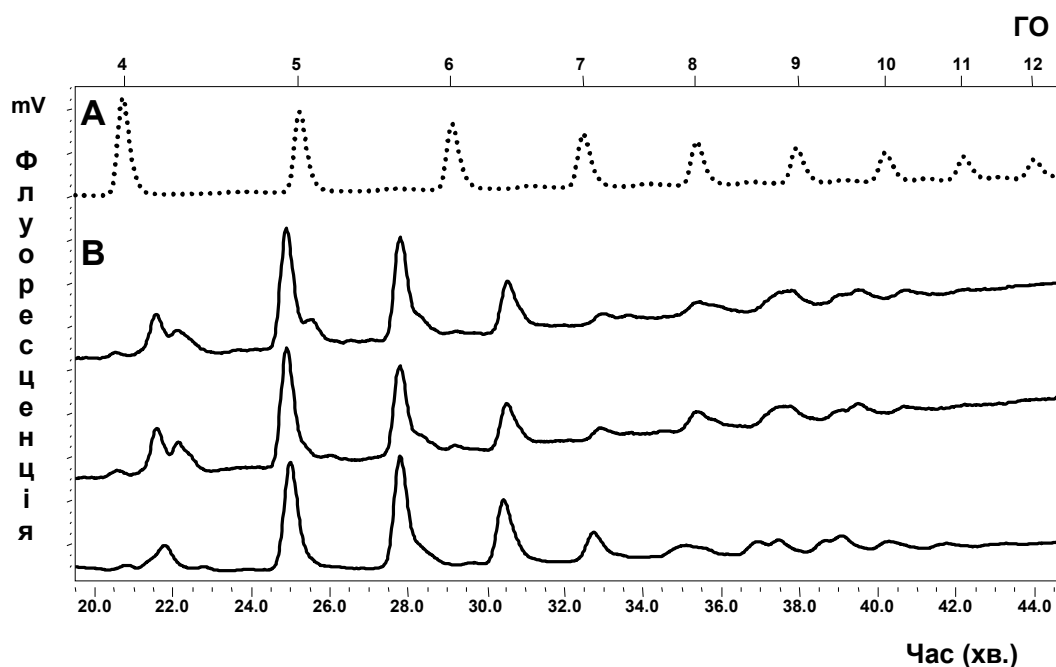


Рис.1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів

*Примітка:* А- зовнішній стандарт – частково гідролізований декстран, В – зразки плазми

З 10 проаналізованих зразків плазми 8 мали дуже близькі характеристики ВЕРХ-спектрів ВО, що відображено у наведеному рисунку на прикладі 3 зразків, а 2 суттєво відрізнялися. Тому їх довелося вилучити з подальшого аналізу. Встановлена стабільність ВЕРХ-спектрів плазми крові практично здорових донорів дозволяє використовувати їх в якості контролю, але треба враховувати можливу необхідність внутрішньо групового ранжування, що вимагає збільшення групи. В нашому випадку на 20%.

В обраному інтервалі хроматограм у відібраних зразках було ідентифіковано 9-11 піків. Головні з них – 9 (рис. 2), які в цілому майже повністю описують отримані спектри і мають такі характеристики: I –  $4,08 \pm 0,003$  ГО, II –  $4,28 \pm 0,006$  ГО, III –

**ВІЛЬНІ ОЛІГОСАХАРИДИ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ...**

4,40±0,009 ГО, IV – 5,01±0,003 ГО, V – 5,69±0,002 ГО, VI – 6,40±0,003 ГО, VII – 7,08±0,01 ГО, VIII – 7,85±0,008 ГО, IX – 8,62±0,02 ГО.

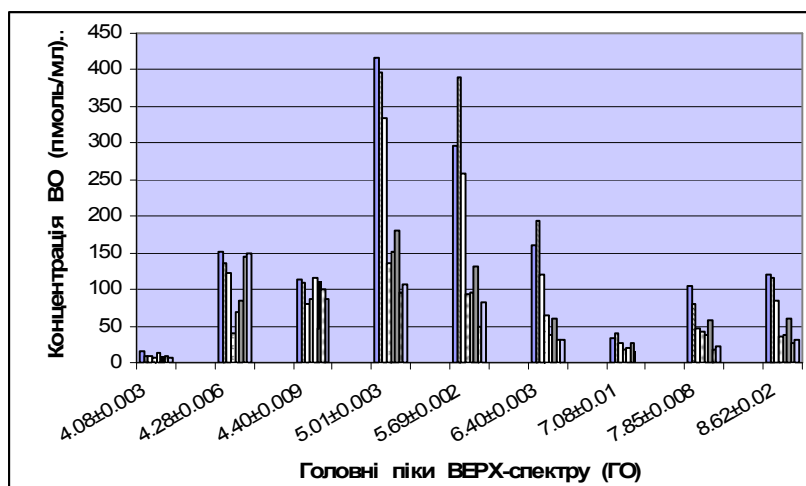


Рис.2. Концентрація вільних олігосахаридів плазми по головних піках ВЕРХ-спектрів у зразках

Найбільші площі 2-6 піків свідчать про те, що серед вільних олігосахаридів плазми превалюють глікани, структура яких складається з 5-7 моносахаридів.

Відібрані зразки відрізнялись по загальній концентрації олігосахаридів, яка коливалась від 515,08 до 1658,40 пмоль/мл (рис.3).



Рис.3. Концентрація вільних олігосахаридів в плазмі крові практично здорових донорів.

Зразки поділялися на 2 групи: з відносно низькою концентрацією ВО (1-5 на рисунку) та з більш високою (6-8). Середня концентрація ВО у першій групі складала  $626,02 \pm 45,12$  пмоль/мл, а у другій -  $1457,65 \pm 190,71$  пмоль/мл.

### ВИСНОВКИ

1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів мають дуже схожі профілі з 9 головними піками, найбільші з яких складаються з гліканів із 5-7 моносахаридів.
2. Концентрація вільних олігосахаридів плазми суттєво коливається в різних зразках – від 515,08 до 1658,40 пмоль/мл.
3. Отримані експериментальні дані показали можливість застосування ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів в якості контролю для дослідження їх змін при захворюваннях завдяки достатній стабільності спектрів в різних зразках.
4. Використання біоматеріалу практично здорових донорів в якості контрольного потребує додаткового ранжування зразків всередині групи і для валідності статистичних розрахунків збільшення її щонайменше на 20%.

### ПОДЯКИ

Роботу було виконано при підтримці міжнародного гранту EMBO (ASTF201-2010) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м. Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

### Список літератури

1. Anelli T. Protein quality control in the early secretory pathway / T. Anelli, R. Sitia // *The EMBO Journal*. – 2008. – Vol. 27. – P.315–327.
2. Chantret I. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation / I. Chantret, S.E.H. Moore // *Glycobiology*. – 2008. – Vol.18, № 3. – P. 210–224.
3. Suzuki T. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation / T. Suzuki, Y. Funakoshi // *Glycoconj J.* – 2006. – Vol.23, № 5-6. – P.291–302.
4. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology*. – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R–15R.
5. Apaja P.M. Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane / P.M. Apaja, H. Xu, G.L. Lukacs // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191, № 3. – P. 553–570.
6. Braakman I. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum / I. Braakman, N.J. Balleid // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – Vol. 80. – P.71–99.
7. 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.
8. Yanagida K. Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line, HepG2 / K. Yanagida, S. Natsuka, S. Hase // *Glycobiology*. – 2006. – Vol.16, № 4. – P. 294–304.
9. Quality control of glycoproteins bearing truncated glycans in an ALG9-defective (CDG-IL) patient / W. Vleugels, L. Keldermans, J. Jaeken [et al.] // *Glycobiology*. – 2009. – Vol. 19, № 8. – P. 910–917.
10. 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.
11. Alonzi D.S. Urinary glycan markers for disease / D.S. Alonzi, Y-H. Su, T.D. Butters // *Biochem Soc Trans.* – 2011. – Vol. 39, №1. – P. 393–398.

12. Письменецька І.Ю. Хроматографічний аналіз іммобілізованих на паперових носіях модельних олігосахаридів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т.24 (63), №4. – С.183–191.
13. 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.
14. 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.

**Письменецкая И.Ю. Свободные олигосахариды плазмы крови практически здоровых доноров / И.Ю. Письменецкая, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С.182-187**

Механизмы клеточного контроля нативности вновь синтезируемых и деградация мембранных и секретированных гликоконъюгатов приводят к появлению свободных олигосахаридов – несвязанных аналогов гликанов гликопротеинов, гликолипидов, протеогликанов и гликозилфосфотидилинозитольных якорей. Впервые были получены хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров. Показано, что концентрация этих олигосахаридов в плазме может существенно колебаться, а ВЭЖХ-спектры гликанов в образцах имеют очень схожие профили. Стабильность спектров в норме может быть надежной основой для изучения изменений спектра свободных олигосахаридов плазмы крови при различных заболеваниях. Применение биоматериала практически здоровых доноров в качестве контроля требует дополнительного ранжирования образцов внутри группы и ее расширения.

**Ключевые слова:** свободные олигосахариды, ВЭЖХ-анализ гликанов, плазма крови, практически здоровые доноры.

**Pismenetskaya I.U. Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers / I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 1. – P. 182-187.**

The mechanisms of cellular quality control of newly synthesized glycoconjugates and the degradation of membrane and secreted ones lead to the appearance of free oligosaccharides - unbound analogues of glycans of glycoproteins, glycolipids, proteoglycans and glycosylphosphatidylinositol anchors. HPLC spectra of plasma free oligosaccharides of practically healthy donors are obtained for the first time. It is shown that the concentration of these oligosaccharides in plasma can vary but HPLC spectra of the glycans in the samples have very similar profiles. The stability of the spectra in norm can be a reliable basis for studying the changes of plasma free oligosaccharides in various diseases. The use of biomaterial of practically healthy donors as a control requires further ranking within the group and its extensions.

**Keywords:** free oligosaccharides, HPLC analysis of glycans, blood plasma, practically healthy donors.

*Поступила в редакцию 21.02.2012 г.*