

УДК 543.635.24:616.15-006

ВЭЖХ-СПЕКТРЫ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Письменецкая И.Ю.¹, Баттерс Т.Д.²

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

²Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

E-mail: ip01589@gmail.com

Статья посвящена исследованию свободных олигосахаридов – аналогов гликанов гликоконъюгатов – плазмы крови больных острыми онкогематологическими заболеваниями. (острый лимфобластный лейкоз, острый миелолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) Показано, что свободные олигосахариды плазмы при этих заболеваниях содержат как нейтральную, так и заряженную фракции. Нейтральная фракция по сравнению с нормой или со свободными олигосахаридами плазмы при хронических миелолиферативных заболеваниях значительно редуцирована, что свидетельствует о резком нарушении протеостаза клеток крови. Спектр заряженной фракции похож на таковой при хронических миелолиферативных заболеваниях. Его основные пики представлены двухантными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот. Однако, минорные компоненты этой фракции, характерные для хронических состояний, в данном случае полностью отсутствуют. Присутствие двухантного комплексного N-гликана с одним остатком сиаловой кислоты является отличительной чертой хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы как при хронических, так и при острых онкогематологических заболеваниях.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, плазма крови человека, острые онкогематологические заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Многообразные процессы синтеза и распада гликоконъюгатов сопровождаются появлением не связанных с полипептидной цепью или липидной молекулой углеводных компонентов – структурных аналогов гликанов гликопротеинов или гликолипидов. Эти углеводные компоненты, которые называются свободными олигосахаридами, могут быть предшественниками углеводной части гликоконъюгатов, как например, в случае начальных этапов N-гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме [1]. Также к свободным олигосахаридам относятся продукты деградации вновь синтезируемых гликопротеинов, которые не прошли клеточный контроль фолдинга [2], и зрелых гликоконъюгатов в ходе их обновления [3]. Каждый этап появления свободных олигосахаридов характеризуется своим набором гликанов с четко выраженными структурами. Поэтому свободные олигосахариды, которые являются результатом функционирования эндоплазматического ретикулума, отражают его состояние, а те гликаны, которые появляются при деградации гликоконъюгатов в лизосомах, говорят о процессах, происходящих в этих органеллах.

Аберрантные (неправильно свернутые, с нарушенным гликозилированием или аномальной сборкой субъединиц) белки, возникающие в процессе синтеза, разрушаются путем ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации (ERAD - endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) [4], что позволяет клетке поддерживать протеостаз и защищает организм в целом от появления таких белков в зонах функционального действия. При нарушении протеостаза эндоплазматического ретикулома в клетке запускаются процессы его восстановления через усиление распада аберрантных белков путем активизации ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации [5]. Если же этот путь не дает результата, включаются механизмы «предупреждения об опасности», а потом и гибели клетки [6]. Каскад таких реакций на измененный протеостаз называется реакцией несвернутых белков (UPR-unfolded protein response). Очевидно, что стресс эндоплазматического ретикулома не может не отразиться на процессах гликозилирования и особенностях синтеза свободных олигосахаридов.

Одним из проявлений стресса другой органеллы клетки, связанной с появлением свободных олигосахаридов, лизосомы, является изменение проницаемости ее мембраны, в частности, для гликанов. Молекулярные механизмы ответа клетки и отдельных ее органелл на разнообразные стрессовые факторы находятся в стадии активного изучения, т.к. понимание этих механизмов не только позволяет разобраться в тончайших деталях различных заболеваний, но и предложить новые подходы к их лечению [7].

В предшествующих исследованиях авторов были получены ВЭЖХ-спектры гликанов плазмы крови практически здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями [8–10]. Целью данной работы было исследование свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми онкогематологическими заболеваниями – острым лимфобластным лейкозом, острым миеломонолейкозом, миелодиспластическим синдромом с избытком бластов.

Острые лейкозы – это гетерогенная группа клональных опухолевых заболеваний системы крови, возникающих в результате мутации и последующих структурных изменений в геноме гемопоэтических клеток-предшественников. Заболевания характеризуются вытеснением нормальных элементов морфологически незрелыми злокачественными кроветворными клетками и инфильтрацией ими различных тканей и органов [11].

Миелодиспластический синдром – это также клональное заболевание, связанное с поражением гемопоэтической стволовой клетки. Данный синдром сопровождается дисплазией и неэффективным гемопоэзом, который затрагивает клетки одной или нескольких линий миелопоэза. Количество миелобластов повышенное, но не достигает 20%, которые являются пороговыми для острых миелоидных лейкозов [12].

Исследования последних лет показали, что при острых лейкозах активируются реакции несвернутых белков [13, 14]. Поэтому было интересно посмотреть, отражается ли это на спектре свободных олигосахаридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазма крови пациентов с диагностированными острыми (острый лимфобластный лейкоз, n=2; острый миеломонолейкоз, n=2; миелодиспластический синдром с избытком бластов, n=2) и хроническими (сублейкемический миелоз, n=10; истинная полицитемия, n=10) онкогематологическими заболеваниями, а также плазма крови практически здоровых доноров (n=10) были отобраны с согласия всех групп и в соответствии с требованиями этического комитета в клинике ГУ «Днепропетровская медицинская академия». Возраст относительно здоровых доноров соответствовал возрастной категории больных исследуемых 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 [15]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуороэтиленовой мембраной (Millex-LN, 0.45 μm , Millipore Corp., США), в соответствии с опубликованной методикой [16].

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 [16].

Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антраниловой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville D.C.A. et.al. [17]. Меченные гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [16].

Разделение олигосахаридов на фракции. Меченные антраниловой 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. [17].

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. [17, 18]. 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. [17].

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 общей, нейтральной и заряженной (кислой) фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми (острый лимфобластный лейкоз, острый миеломонолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) онкогематологическими заболеваниями и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

Исследовались олигосахариды, состоящие из 4-5 и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20-26 до 44 минут. Нумерация пиков на всех рисунках идентична и соответствует их положению пика на хроматограмме, т.е. времени его удерживания.

При острых онкотрансформациях клеток красного костного мозга хроматографические спектры гликанов плазмы крови, имея индивидуальные особенности, обладали ярко выраженными общими характеристиками. Основу всех спектров общего пула олигосахаридов составляли пики 6, 7, 8, 9 и 10а. При этом первые два пика, 6-й и 7-й, были менее выраженными, а в некоторых образцах 7-й пик практически отсутствовал.

При разделении гликанов на фракции в зависимости от заряда 6-й, 7-й и 8-й пики были представлены нейтральными олигосахаридами, а 10а - кислыми. 9-й пик содержал представителей обеих фракций. Типичный ВЭЖХ-спектр общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми заболеваниями, а также результат его разделения на 2 фракции в зависимости от заряда (фракцию нейтральных олигосахаридов и фракцию отрицательно заряженных олигосахаридов) представлены на рисунке 1 (I).

В качестве контроля использовали спектры свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (рис.1, II). Сравнение с нормой выявило резкую редукцию ВЭЖХ-спектров гликанов плазмы крови больных – исчезновение пиков 1-5 и существенное сокращение пиков 6 и 7. В то же время наблюдалось перераспределение гликанов в пользу 8-го, 9-го и 10-го пиков, которые в норме в общем пуле представлены минорными компонентами. Пофракционный анализ показал, что наибольшей редукции и перераспределению подверглись гликаны нейтральной фракции, которые характеризуют состояние эндоплазматического ретикулума. Исчезновение свободных олигосахаридов в этой фракции отражает состояние стресса эндоплазматического ретикулума, в результате чего происходит снижение процессов ассоциированной с эндоплазматическим ретикулом деградации вновь синтезируемых белков. Это свидетельствует о том, что при острых онкогематологических заболеваниях подавлен синтез белков, т.е. нарушен протеостаз в клетках крови.

Сравнение изучаемых спектров с соответствующими хроматограммами гликанов при хронических миелопролиферативных заболеваниях (рис.1, III)

показало, что главное отличие спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при онкотрансформациях – наличие пика 9 во фракции заряженных гликанов – сохраняется и в данном случае.

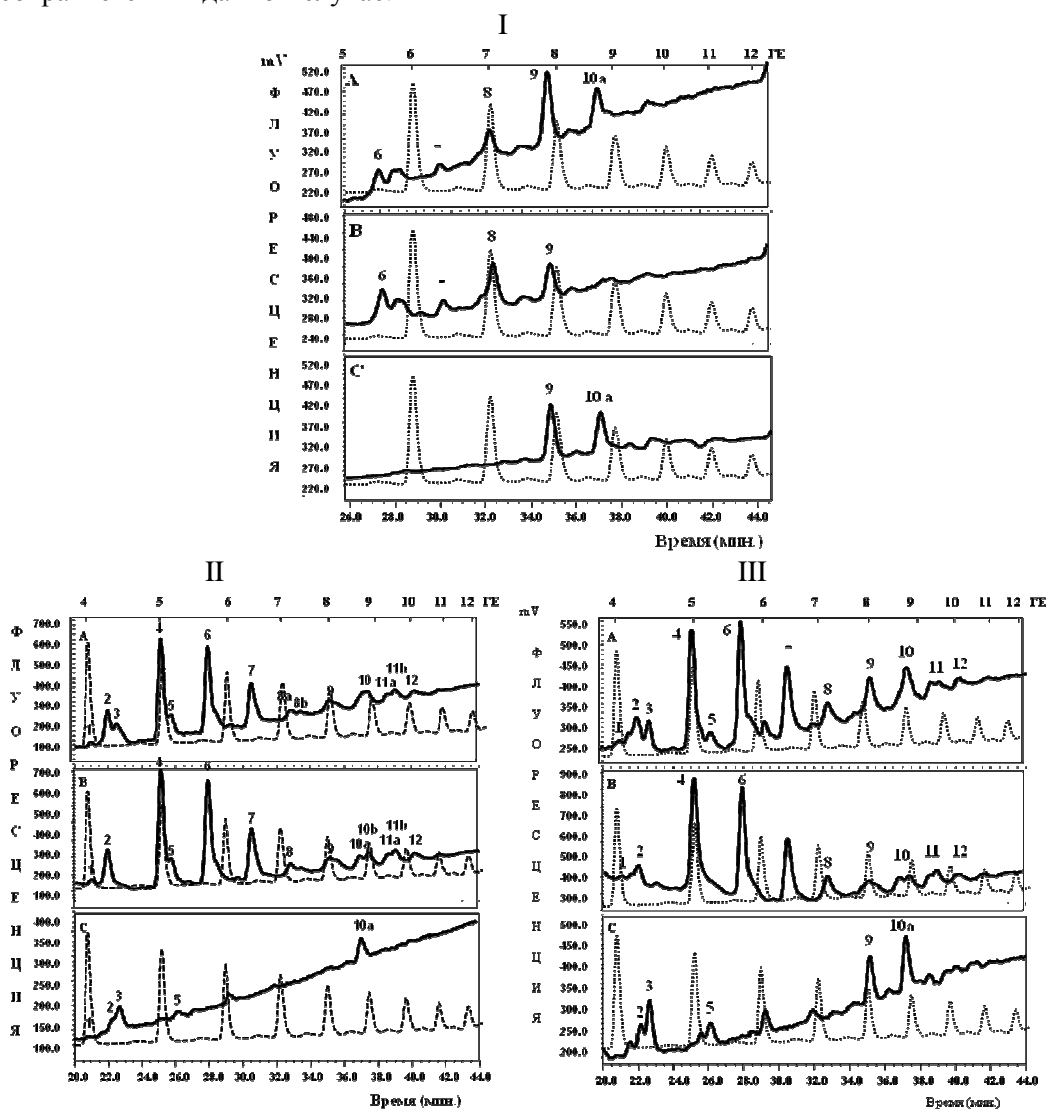


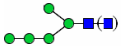
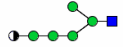



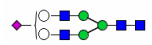
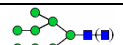
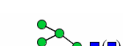
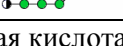
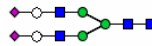

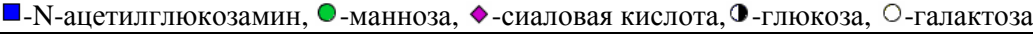
Рис.1. ВЭЖХ-спектры отдельных групп (А – общая фракция, В – нейтральная фракция, С – заряженная фракция) свободных олигосахаридов плазмы крови: I – больных острыми онкогематологическими заболеваниями; II – практически здоровых доноров; III – больных с хроническими онкологическими трансформациями.

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

Однако, общее снижение синтеза белка при острых заболеваниях приводит к полному исчезновению минорных компонентов заряженной фракции, которые характерны для хронических заболеваний.

В таблице 1 показаны основные возможные структуры гликанов каждого пика исследуемых ВЭЖХ-спектров. Выбор структур нейтральной и заряженной фракций был обоснован в предыдущей работе авторов [19] и опирался на анализ внутриклеточных свободных олигосахаридов и соответствующих электронных баз данных о гликанах гликопротеинов.

Таблица 1.
Характеристика пиков ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при острых онкогематологических заболеваниях

№ пика	ГЕ	Нейтральные	Заряженные
6	5,69±0,01		
7	6,40±0,01		
8	7,08±0,01	 	
9	7,85±0,01		
10	8,62±0,02	  	 
			

Анализ пиков нейтральной фракции свидетельствует, что она представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами с остатками глюкозы или без них, с одним или двумя остатками N- ацетилглюкозамина. В главных пиках – 8-м (7,08 ГЕ) и 9-м(7,85 ГЕ) – содержится 6-7 маннозных остатков. 5 маннозных остатков содержится в минорных пиках фракции.

9-й и 10-й пики заряженной фракции представлены двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот, соответственно. Таким образом, комплексные N-гликаны с одним остатком сиаловой кислоты являются маркерными как для изученных хронических, так и для острых онкогематологических состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры общего пула, нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми (острый

лимфобластный лейкоз, острый миеломонолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) онкогематологическими заболеваниями и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы практически здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

2. Показано, что нейтральная фракция свободных олигосахаридов плазмы крови исследуемых больных сильно редуцирована по сравнению с нормой и типичными спектрами при хронических миелопролиферативных заболеваниях (сублейкемический миелоз и истинная полицитемия). Эта фракция представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами с 5-7 остатками маннозы. Главные пики фракции содержат полиманнозные N-гликаны с 6-7 остатками маннозы.
3. Спектр заряженной фракции близок к спектру при хронических миелопролиферативных заболеваниях. Его основные пики представлены двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот, первый из которых отсутствует в спектре гликанов практически здоровых доноров. В случае острых состояний минорные компоненты, очень характерные для хронических заболеваний, не были выявлены.
4. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении протеостаза клеток крови при острых онкогематологических заболеваниях, что отражается в исчезновении большинства пиков спектра нейтральной фракции, очевидно, из-за резкого подавления связанной с эндоплазматическим ретикуломом деградации вновь синтезируемых белков.

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. Anelli T. Protein quality control in the pathway early secretory / T.Anelli, R.Sitia // The EMBO Journal. – 2008. – Vol.27. – P.315–327.
2. 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.
3. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins/ B.Winchester //Glycobiology. – 2005. – Vol.15, №6. – P.1R –15R.
4. 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.
5. Schroder M. ER stress and the unfolded protein response/ M.Schroder, R.J. Kaufman // Mutat Res. – 2005. –Vol.569. –P.29–63.
6. Kim R. Role of the unfolded protein response in cell death/ R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami // Apoptosis. – 2006. – Vol.11. – P.5–13.

7. Ma Y. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? / Y.Ma, L.M. Hendershot // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – Vol.4. –P.966–977.
8. 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.
9. Письменецька І.Ю. Свободные олигосахариды плазмы крови больных истинной полицитемией: характеристика общего спектра / І.Ю. Письменецька // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2013. – Т.1 (41). – С.45–49.
10. Письменецька І.Ю. Изменение хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2013.–Т.26 (65), №1. – С.153–160.
11. Менткевич Г.Л. Лейкозы у детей / Г.Л. Менткевич., С.А.Маякова – *Практическая медицина*, М., 2009. – 384 с.
12. Глузман Д.Ф. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики) / Глузман Д.Ф., Складенко Л.М., Надгорная В.А. – ДИА, Киев, 2008. – 196 с.
13. Tanimura A. Activation of the unfolded protein response in primary acute myeloid leukemia cells / A.Tanimura, T.Yujiri, Y.Tanaka [et al.] // *Int J Hematol*. – 2011. – Vol.94, №3. – P.300–302.
14. Schardt J.A. Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia / J.A.Schardt, B.U.Mueller, T.Pabst // *Meth. Enzymol*. – 2011. – Vol.489. – P.227–243.
15. Письменецька І.Ю. Вплив іммобілізації та депротеїнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів. / І.Ю. Письменецька // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія»* – 2012. –№60. – С.27–29.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
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.

HPLC-PROFILES OF PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES IN ACUTE HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

Pismenetskaya I.U.¹, Butters T.D.²

¹*SI «Dnipropetrovsk Medical Academy», Dnipropetrovsk, Ukraine*

²*Oxford Glycobiology Institute, Oxford University, Oxford, UK*

E-mail: ip01589@gmail.com

The article is devoted to a study of blood plasma free oligosaccharides of patients with acute haematological malignancies (acute lymphatic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute phase of myelodysplastic syndrome).

Plasma samples of healthy people and patients with leukemia were collected in Dnipropetrovsk Medical Academy in accordance with the requirements of the Ethics

Committee. Native plasma was precipitated with trichloroacetic acid for its deproteinization, partial sterilization and stabilization. The purification of free glycans comprised filtration through a syringe with a Millipore filter to take proteins away and porous graphitized carbon column chromatography to remove monosaccharides. Free oligosaccharides were analysed using high-performance liquid chromatography after anthranilic acid labelling. The labelled sugars were separated into neutral and charged oligosaccharides with QAE Sephadex chromatography.

For the first time we obtained HPLC-profiles of a total pool, neutral and charged fractions of blood plasma free oligosaccharides of patients with acute haematological malignancies (acute lymphatic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute phase of myelodysplastic syndrome) and compared them with HPLC-profiles of plasma glycans of practically healthy donors and patients with chronic myeloproliferative diseases (subleukemic myelosis and polycythaemia vera). The neutral fraction of the patients' plasma glycans was shown to be strongly reduced compared with the normal and typical HPLC-profiles in chronic myeloproliferative disorders. This fraction is represented by bi- and tri-antennary high mannose type N-glycans with 5-7 mannose residues. Main peaks of the fraction contained N-glycans with 6-7 mannose residues. The profiles of the charged fraction were very similar to those in chronic myeloproliferative disorders. Their main peaks were most likely represented by bi-antennary complex N-glycans with one or two sialic acid residues, the first of which were not found in norm. Thus, bi-antennary complex N-glycans with one sialic acid residue was a marker both for acute and chronic haematological malignancies.

The results obtained indicated proteostasis disruption in blood cells in acute hematologic malignancies, which was reflected in the disappearance of most of the peaks in the HPLC-profiles of neutral fraction, obviously, because of the sharp suppression of the endoplasmic reticulum-associated degradation of newly synthesized proteins.

Keywords: free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, human blood plasma, acute hematologic malignancies.

References

1. Anelli T. and Sitia R., Protein quality control in the early secretory pathway, *The EMBO Journal*, **27**, 315 (2008).
2. Braakman I. and Bulleid N.J., Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 71 (2011).
3. Winchester B., Lysosomal metabolism of glycoproteins, *Glycobiology*, **15**, **6**, 1R (2005).
4. Benyair R., Ron E. and Lederkremer G.Z., Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum, *Int Rev Cell Mol Biol.*, **292**, 197(2011).
5. Schroder M. and Kaufman R.J., ER stress and the unfolded protein response, *Mutat Res*, **569**, 29 (2005).
6. Kim R., Emi M., Tanabe K. and Murakami S., Role of the unfolded protein response in cell death, *Apoptosis*, **11**, 5 (2006).
7. Ma Y. and Hendershot L.M., The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*, **4**, 966 (2004).
8. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **25**, (64), **1**, 182 (2012).
9. Pismenetskaya I.U., Blood plasma free oligosaccharides of patients with polycythaemia vera (I. Characteristics of the whole spectra), *Journal of the Grodno State Medical University*, **1**, **41**, 45 (2013).

10. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., Chromatographic profile changes of plasma free oligosaccharides in Subleukemic myelosis, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **26**, (65), 1, 153 (2013).
11. Mentkevich G.L. and Mayakova S.A., Children's leukemia, 384 p. (Practical Medicine, Moskow, 2009.)
12. Gluzman D.F., Sklyarenko L.M. and Nagornaya V.A., Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Cytomorphology, Immunocytochemistry, Diagnostics Algorithms), 196 p. (DIA, Kyiv, 2008).
13. Tanimura A., Yujiri T., Tanaka Y., Tanaka M., Mitani N., Nakamura Y., Ariyoshi K. and Tanizawa Y., Activation of the unfolded protein response in primary acute myeloid leukemia cells, *Int J Hematol.*, **94**, 3, 300 (2011).
14. Schardt J.A., Mueller B.U. and Pabst T., Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia, *Meth. Enzymol.*, **489**, 227 (2011).
15. Pismenetska I.U., Influence of blood plasma immobilization and deproteinization on the spectrum of free oligosaccharides, *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Biology*, **60**, 27 (2012).
16. Alonzi D.S., Neville D.C., Lachman R.H., Dwek R.A. and Butters T.D., Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition, *Biochem J.*, **409**, 2, 571 (2008).
17. Neville D.C., Coquard V., Priestman D.A., te Vrugte D.J., Sillence D.J., Dwek R.A., Platt F.M. and Butters T.D., Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling, *Anal Biochem*, **331**, 275 (2004).
18. Neville D.C., Dwek R.A. and Butters T.D. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides, *J. Proteome Res.*, **8**, 681 (2009).
19. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **25**, (64), 3, 158 (2012).

Поступила в редакцию 27.10.2014 г.