

ДЕТАЛІЗАЦІЯ ВЕРХ-СПЕКТРІВ ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

І. Письменецька

*Дніпропетровська державна медична академія
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49044, Україна
e-mail: pirina2004@list.ru*

Вільні олігосахариди (ВО) плазми крові здорових волонтерів розподіляли на фракції незаряджених (нейтральних) і заряджених (кислих) гліканів шляхом іонообмінної хроматографії на ЧАЕ-сефадексі. Глікани фракцій аналізували нормальнофазовою вискоєфективною рідинною хроматографією. Показано, що більша частина вільних олігосахаридів – це незаряджені глікани, які концентрувались у трьох головних піках ВЕРХ-спектра та склалися з 5–7 моносахаридних залишків. Спектр заряджених олігосахаридів характеризувався єдиним головним піком гліканів із 8–9 моносахаридних залишків і великою кількістю різноманітних за складом, але з низькою концентрацією, олігосахаридних структур, які включали від 5 до 12 моносахаридних залишків.

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

Глікозилювання, процес приєднання до біомолекул залишків вуглеводів (гліканів), є найпоширенішою модифікацією білків і ліпідів. Більш ніж 50% усіх білків ссавців – це глікопротеїни, у модифікації яких бере участь майже 600 ферментів і мембранних транспортерів [18]. У багатоступеневих і різноманітних процесах глікозилювання, наприклад, тільки білків задіяно більш ніж 1% усіх генів людини [13, 17], що свідчить про надзвичайну важливість цього процесу посттрансляційної модифікації.

Глікани глікокон'югатів виконують різноманітні функції, які не завжди можливо диференціювати від функції самого білка чи ліпиду. Але відомо, що саме залишки вуглеводів сприяють підвищенню розчинності глікопротеїнів, їхньому захисту від протеолізу, належному фолдингу, внутрішньоклітинному транспорту і секреції, а також взаємодії молекул між собою. Вони беруть участь у будові глікокаліксу, забезпечуючи специфічні взаємодії з лігандами, міжклітинні взаємодії та передачу сигналів усередину клітин. Глікани глікокон'югатів задіяні у формуванні імунної відповіді, зсіданні крові. Саме ці макромолекули забезпечують індивідуальність організмів і їхню пластичність [10, 17].

Глікокон'югати існують у вигляді багатьох глікоформ. Співвідношення та структура гліканів у їхньому складі в організмі людини суттєво змінюються в процесі розвитку, старіння чи при патологічних станах. Тому глікокон'югати інтенсивно вивчаються для встановлення закономірностей змін в організмі з метою покращення діагностики, моніторингу терапевтичних заходів, для пошуку мішеней застосування ліків і для розробки лікарських засобів [7, 14, 19].

Залежно від способу приєднання до білка чи ліпиду, глікани розподіляють на 6 класів: 1) N-глікани, що приєднуються через нітроген аспарагіну; 2) O-глікани, які зв'язуються через гідроксильну групу серину, треоніну, тирозину, гідроксипроліну чи гідроксилізіну; 3) C-глікани, які приєднуються до карбону триптофану; 4) фосфоглікани, які зв'язуються через фосфатний залишок фосфосерину; 5) глікани глікозилфосфотидилінозитольних якорів; 6) глікани глікозаміногліканів [11].

Вільні олігосахариди (ВО) – це не зв'язані з глікокон'югатами N- і O-глікани, продукти їх поетапного синтезу та розщеплення. Відомі три джерела утворення ВО у клітинах: 1) початкові етапи N-глікозилювання – формування глікана-попередника [9], 2) розщеплення глікопротеїнів із порушеною конформацією – асоційована з ендоплазматичним ретикулулом деградація [5, 6, 8, 12], 3) лізосомальний гідроліз нативних глікокон'югатів [20]. Цікавою особливістю цих молекул є те, що частина з них (із першого та другого джерела) з'являються раніше, ніж зрілі глікокон'югати. Завдяки існуванню у клітинах механізмів контролю якості третинної та четвертинної структури протеїнів і розщепленню молекул зі зміненою структурою поява аберантних ВО передуює появі аберантних глікокон'югатів у зоні їх функціональної дії.

Вільні олігосахариди інтенсивно вивчають усередині клітин, але мало що відомо про ВО біологічних рідин. Джерела та механізми проникнення їх у кров чи сечу невідомі, але була показана їхня автентичність внутрішньоклітинним олігосахаридам [4]. Виявлення таких структур і їх аналіз можуть надати цінну інформацію стосовно якомога ранішого початку порушення глікозилювання. Таким чином, серед ВО можуть бути ранні маркери захворювань і прогностичні маркери перебігу лікування.

Пошук змін ВО при патологічних станах потребує перш за все наявності інформації щодо їхньої структурної будови та співвідношення різних фракцій у нормі. У наших попередніх дослідженнях були отримані ВЕРХ-спектри загального пулу вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів [3]. Метою даної роботи було проаналізувати ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів за умов додаткового фракціонування гліканів на незаряджені (нейтральні) та заряджені (кислі).

Матеріали та методи

Плазма крові (n=10) здорових волонтерів (Британський Національний банк крові) була надана доктором Джоан Міллер з Інституту глікобіології Оксфордського університету. Для нормальнофазової ВЕРХ використовували реактиви фірми VWR International і Sigma-Aldrich.

Вільні олігосахариди аналізували шляхом нормальнофазової ВЕРХ після маркування флуоресцентним барвником – 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою (2-AA) 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. [15, 16]. Підготовку зразків плазми для хроматографічного аналізу проводили згідно з наведеними раніше методиками [1–3]. Депротейнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлороцтовою кислотою (ТХО) з подальшим центрифугуванням упродовж 10 хв при 3000 об/хв. Залишки білків із плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтра з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LN, 0.45 μm , Millipore Corp., США). 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 [4]. Марковані антраніловою кислотою глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на ЧАЕ-сефадексі (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивки Milli-Q™ H₂O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених – амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al. [16]. Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану як зовнішнього стандарту згідно з Neville D.C.A. et al.

[15]. Частково гідролізований декстран утворює хроматографічний спектр, у якому кожен наступний пік має на 1 залишок глюкози більше ніж попередній, і тому дає змогу охарактеризувати кожен пік хроматограми, що аналізується, у глюкозних одиницях (ГО) згідно з приблизною кількістю мономерних залишків у його складі. Для збору й обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

Результати і їхнє обговорення

Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізьку часу від 25 до 45 хв.

В усіх проаналізованих зразках у складі загальної фракції було ідентифіковано 4 головних піки, що мали такі характеристики: I – $27,33 \pm 0,01$ хв ($5,670 \pm 0,003$ ГО), II – $30,81 \pm 0,01$ хв ($6,640 \pm 0,004$ ГО), III – $33,66 \pm 0,01$ хв ($7,550 \pm 0,004$ ГО) та IV – $36,89 \pm 0,01$ хв ($8,710 \pm 0,004$ ГО). Результат розподілу загальних ВО на фракції залежно від заряду наведений на рис. 1.

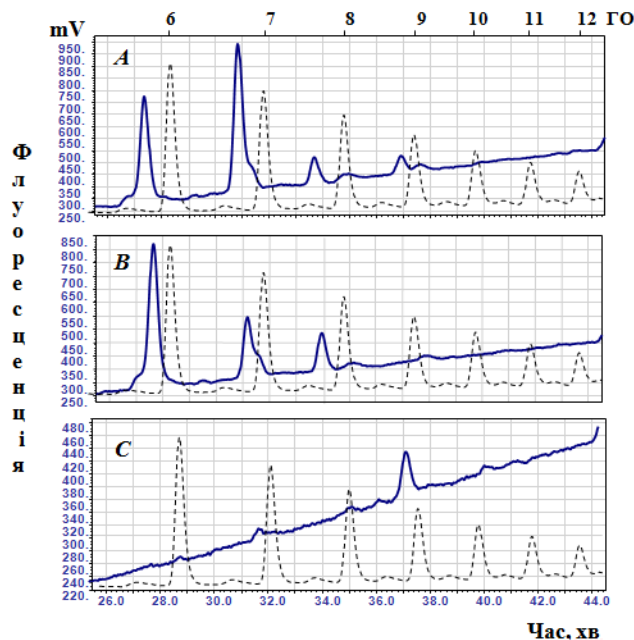


Рис. 1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів: *A* – загальний спектр; *B* – спектр незаряджених гліканів; *C* – спектр заряджених гліканів. Пунктиром показано спектр частково гідролізованого декстрину (зовнішній стандарт).

У фракції нейтральних ВО (рис. 1, *B*) було ідентифіковано і проаналізовано три головних піки – $5,670 \pm 0,003$ ГО, $6,640 \pm 0,004$ ГО та $7,550 \pm 0,004$ ГО, які відповідали I, II та III головним пікам загальної фракції (рис. 1, *A*). Фракція заряджених гліканів формувала тільки один головний пік (рис. 1, *C*), який відповідав IV піку ($8,710 \pm 0,004$ ГО) загальної фракції. Спектри заряджених ВО, крім головного піку, мали велику кількість малих піків на обраному відрізьку хроматограми. Відомо, що заряд гліканів може обумовлюватися наявністю в їхньому складі залишків органічних (сіалових) чи неорганічних (фосфатної, сульфатної) кислот. Потенційно джерелами сіалованих ВО плазми крові є: внутрішньоклітинні глікани (при розщепленні зрілих глікокон'югатів у лізомах, а також при гіпотетично

можливій деградації глікокон'югатів, що синтезуються в апараті Гольджі) та позаклітинні глікокон'югати (при відщепленні гліканів від глікопротеїнів чи гліколіпідів на поверхні клітин чи сіалоолігосахаридів у плазмі глікозидазами крові). Для фосфорильованих ВО існує специфічне джерело – початкові стадії N-глікозилювання.

Як і у випадку спектрів загальних ВО, спектри нейтральних і заряджених гліканів у різних зразках мали схожі профілі з відмінностями у мінорних компонентах. Результати хроматографічного розподілу кислих ВО у різних зразках наведені на рис. 2.

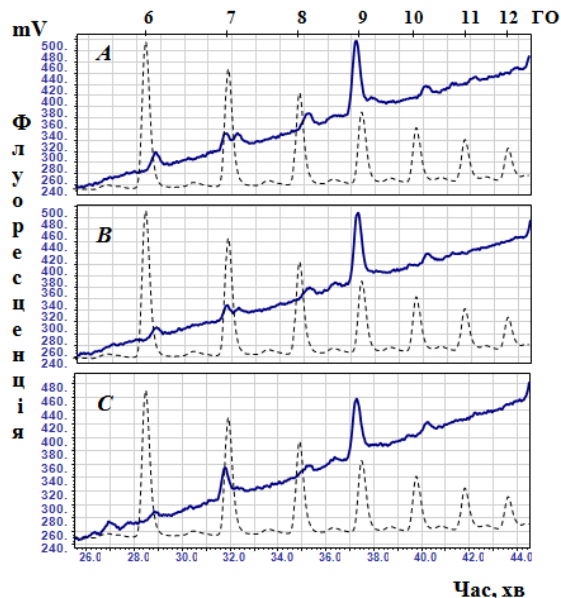


Рис. 2. ВЕРХ-спектри заряджених вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів: *A, B, C* – різні зразки. Пунктиром показано спектр частково гідролізованого декстрану (зовнішній стандарт).

Розподіл загального пулу ВО на фракції незаряджених і заряджених гліканів показав, що більша частина олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів – це незаряджені глікани, що складаються переважно з 5–7 моносахаридних залишків. Лише незначна частина гліканів цієї фракції має більше моносахаридних залишків у своєму складі. Єдиний головний пік фракції заряджених гліканів – це олігосахариди, які містили 8–9 моносахаридних залишків. У спектрі були присутні також кислі олігосахариди з низькою концентрацією, які містили від 5 до 12 моносахаридних залишків. Фракціонування вільних олігосахаридів на кислі та нейтральні підтверджує значну стабільність ВЕРХ-спектрів ВО плазми крові здорових донорів.

Експериментальну роботу було виконано при фінансовій підтримці міжнародного гранту International Union Against Cancer ICREET (ICR/09/044) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м. Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Письменецька І. Ю., Баттерс Т. Д. Хроматографічний аналіз іммобілізованих на паперових носіях модельних олігосахаридів // Ученые записки Тавричес. гос. ун-та. Сер. биол., хим. 2011. Т. 24 (63). № 4. С. 183–191.

2. Письменецька І. Ю. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів // Вісн. Київ. ун-ту. Сер. біол. 2012. № 60. С. 27–29.
3. Письменецька І. Ю. Хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 74–79.
4. Alonzi D. S., Neville D. C., Lachmann R. H. et al. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic reticulum alpha-glucosidase inhibition // *Biochem. J.* 2008. Vol. 409. P. 571–680.
5. Anelli T., Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway // *The EMBO J.* 2008. Vol. 27. P. 315–327.
6. Apaja P. M., Xu H., Lukacs G. L. Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane // *J. Cell Biol.* 2010. Vol. 191. N 3. P. 553–570.
7. Arnold J. N., Saldova R., Hamid U. M. et al. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation // *Proteomics.* 2008. Vol. 8. N 16. P. 3284–3293.
8. Braakman I., Bulleid N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 71–99.
9. Chantret I., Moore S. E. H. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18. N 3. P. 210–224.
10. Drickamer K., Taylor M. E. Introduction to Glycobiology (2nd ed.). Oxford University Press, USA, 2006. P. 97–111.
11. Glycosciences. Status and Perspectives. Edited by H.-J. Gabius, S. Gabius. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim. 2002. P. 25–26.
12. Hoseki J., Ushioda R., Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation // *J. Biochem.* 2010. Vol. 147. N 1. P. 19–25.
13. Lowe J. B., Marth J. D. A genetic approach to mammalian glycan function // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. Vol. 72. P. 643–691.
14. Narimatsu H., Sawaki H., Kuno A. et al. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics // *FEBS J.* 2010. Vol. 277. N 1. P. 95–105.
15. Neville D. C., Coquard V., Priestman D. A. et al. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling // *Anal Biochem.* 2004. Vol. 331. P. 275–282.
16. Neville D. C., Dwek R. A., Butters T. D. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides // *J. Proteome Res.* 2009. Vol. 8. P. 681–687.
17. Ohtsubo K., Marth J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease // *Cell* 2006. Vol. 126. P. 855–867.
18. Rudd P. M., Telford J., Byrne J. C. et al. Glycans as biomarkers of disease // Abstracts of EMBO NICE Meeting 2012, EuroGlycoScience Forum “Protein glycosylation in human disease” 22 September 2012. P. 53.
19. Saldova R., Huffman J. E., Adamczyk B. et al. Association of medication with the human plasma N-glycome // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11. N 3. P. 1821–1831.
20. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins // *Glycobiology.* 2005. Vol. 15. N 6. P. 1R–15R.

Стаття: надійшла до редакції 02.04.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 05.11.12

SPECTRA DETALIZATION OF BLOOD PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES OF HEALTHY VOLUNTEERS**I. Pismenetska**

*Dnipropetrovsk State Medical Academy
9, Dzerzhynskiy St., Dnipropetrovsk 49089, Ukraine
e-mail: pirina2004@list.ru*

Free oligosaccharides of blood plasma of healthy volunteers were separated into fractions of uncharged (neutral) and charged (acidic) glycans with ion-exchange chromatography on QAE-Sephadex. Glycans of the fractions were analyzed by normal-phase high performance liquid chromatography (HPLC). It has been shown that most of the free oligosaccharides are uncharged glycans concentrated in three main peaks of the HPLC-profiles and consisted of 5–7 monosaccharide residues. The spectrum of charged oligosaccharides has been characterized by one main peak of glycans with 8–9 monosaccharide residues and by the structures included from 5 to 12 monosaccharide residues, more diverse in composition, but with a low concentration.

Keywords: free oligosaccharides, human blood plasma, HPLC profiles.

ДЕТАЛИЗАЦИЯ ВЭЖХ-СПЕКТРОВ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**И. Письменецкая**

*Днепропетровская государственная медицинская академия
ул. Дзержинского, 9, Днепропетровск 49089, Украина
e-mail: pirina2004@list.ru*

Свободные олигосахариды плазмы крови здоровых волонтеров разделяли на фракции незаряженных (нейтральных) и заряженных (кислых) гликанов методом ионообменной хроматографии на КАЕ-сефадексе. Гликаны фракций анализировали нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Было показано, что большая часть свободных олигосахаридов – это незаряженные гликаны, которые концентрировались в трех главных пиках ВЭЖХ-спектра и состояли из 5–7 моносахаридных остатков. Спектр заряженных олигосахаридов характеризовался одним главным пиком гликанов из 8–9 моносахаридных остатков и большим количеством разнообразных по составу, но с низкой концентрацией, структур, которые включали от 5 до 12 моносахаридных остатков.

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