

ХРОМАТОГРАФІЧНІ СПЕКТРИ ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

І. Письменецька

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

Уперше було отримано хроматографічні спектри вільних олігосахаридів – незв'язаних аналогів гліканів глікокон'югатів – плазми крові здорових донорів. Підтверджено високу чутливість застосованого методу високоефективної рідинної хроматографії для аналізу вільних олігосахаридів. Показано, що концентрація цих олігосахаридів у плазмі може суттєво коливатися, але ВЕРХ-спектри гліканів у різних зразках залишаються майже ідентичними і відрізняються лише у мінорних компонентах. Стабільність спектрів плазми в нормі може бути надійною основою для вивчення змін спектра вільних олігосахаридів плазми крові при різноманітних захворюваннях.

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

Вільні олігосахариди (ВО) – аналоги гліканів глікокон'югатів (глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів і глікозилфосфотидилінозитольних якорів), що не зв'язані з протеїнами чи ліпідами, – утворюються на різних етапах метаболізму глікокон'югатів: 1) при глікозилюванні протеїнів і ліпідів, 2) у процесі асоційованої з ендоплазматичним ретикулом деградації глікопротеїнів, які не пройшли клітинного контролю фолдингу, 3) при катаболізмі нативних глікокон'югатів [10, 12].

У глікозилюванні протеїнів і ліпідів найдетальніше з точки зору появи ВО вивчені етапи синтезу N-гліканів у ендоплазматичному ретикулумі. Як відомо, N-глікозилювання починається з утворення глікану-прекурсору на ліпідному носії – доліхолфосфаті – спочатку на цитоплазматичному боці мембрани ендоплазматичного ретикулуму, а потім з протилежного боку, всередині ретикулуму. На будь-якій стадії цього синтезу глікан може відщеплюватися від доліхолфосфату з утворенням вільного олігосахариду. Таким чином, початок N-глікозилювання – це джерело різноманітних вільних олігосахаридів у клітині [3, 6].

Важливим джерелом ВО є асоційована з ендоплазматичним ретикулумом деградація аберантних глікопротеїнів, що не пройшли клітинного контролю на наявність нативної конформації. Такі молекули транспортуються з ендоплазматичного ретикулуму до цитозолу, де розщеплюються на вуглеводну та білкову частини. Білки потрапляють на деградацію до протеосом, а вуглеводи поетапно деградують через стадії різних олігосахаридів у цитозолі, а потім у лізосомах до моносахаридів [4, 5, 7].

Невідомо, чи існують механізми появи ВО у апараті Гольджі та чи можуть таким шляхом утворюватися незв'язані аналоги O-гліканів.

Лізосомальна деградація зрілих глікокон'югатів [11] у процесі їхнього обміну й оновлення наповнює пул вільних олігосахаридів клітини найбільш різноманітними структурами – як аналогами N- та O-гліканів, так і продуктами розпаду протеогліканів та глікозилфосфотидилінозитольних якорів.

Вільні олігосахариди були ідентифіковані всередині клітин при дослідженні деградації глікокон'югатів, а потім виявлені у біологічних рідинах [1]. Так, при лікуванні

хворих на хворобу Гоше та Німана-Піка препаратом Zavesca (іміноцукром – інгібітором α -глюкозидази) були встановлено, що в їхню плазму та сечу потрапляють вільні олігосахариди зі структурами, які виникають у клітинах при застосуванні такого ж інгібітора [2]. Молекулярних механізмів транспортування ВО з клітини не знайдено, тому яким чином ВО потрапляють у плазму крові, а потім у сечу, – невідомо.

Метою даного дослідження було вивчення ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів для подальшого оцінювання перспективності застосування ВО як біомаркерів у діагностиці захворювань і терапії.

Матеріали та методи

Плазма крові здорових британських волонтерів з Національного банку крові була люб'язно надана доктором Джоан Міллер з Інституту глікобіології Оксфордського університету.

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

Вільні олігосахариди аналізували шляхом нормальнофазової вискоелективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) після маркування флуоресцентним барвником – 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою (2-АА). 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. [8]. Залишки білків із плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтра з гідрофільною поліфлуороетиленою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45 μ m, Millipore Corp., США) згідно з [1]. Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл) згідно з методикою [1]. 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. [8] з деякими модифікаціями стосовно очищення маркованих гліканів. Очищення 2-АА-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках **Spe-ed SPE Cartridges Amide-2 (Applied Separations, США)** [1, 9]. Очищені 2-АА-марковані олігосахариди поділяли шляхом нормальнофазової вискоелективної рідинної хроматографії 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 роботі Neville D.C.A. et al. [8]. Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium або Waters Empower.

Результати і їхнє обговорення

Уперше отримали хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів (рис. 1). Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридів, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 25 до 45 хвилин.

Усі отримані спектри мали подібні характеристики, проте не були повністю ідентичними, що відображають профілі трьох зразків на рис. 1.

В обраному інтервалі хроматограми в усіх зразках було ідентифіковано 13–14 піків. Головні з них – 4, які в цілому майже повністю описують отримані спектри і мають такі характеристики: I – 27.33 ± 0.01 хв (5.67 ± 0.003 ГО), II – 30.81 ± 0.01 хв (6.64 ± 0.004 ГО), III – 33.66 ± 0.01 хв (7.55 ± 0.004 ГО) та **IV – 36.89 ± 0.01 хв (8.71 ± 0.004 ГО)**. Найбільші площі першого та другого піків свідчать про те, що серед вільних олігосахаридів плазми превалюють глікани, структура яких складається з 5–7 моносахаридів.

Стабільність хроматографічних профілів вільних олігосахаридів, поява яких

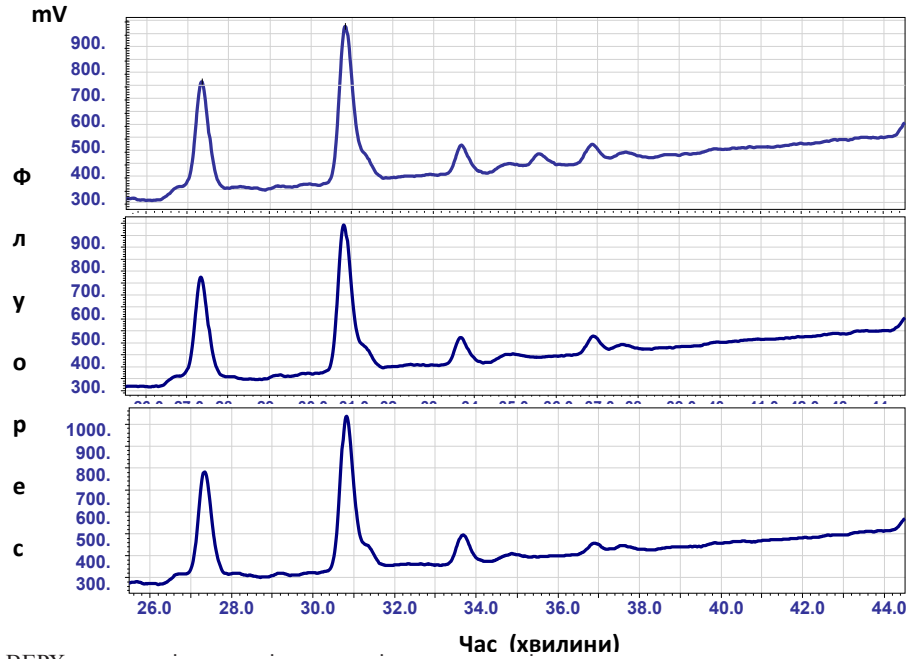


Рис. 1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові.

пов'язана щонайменше із дією трьох головних процесів обміну глікокон'югатів, свідчить про досить складну взаєморегуляцію цих процесів.

Зразки плазми суттєво відрізнялися загальною концентрацією олігосахаридів, яка коливалася від 1549,84 пмоль/мл до 2689,25 пмоль/мл (рис. 2).

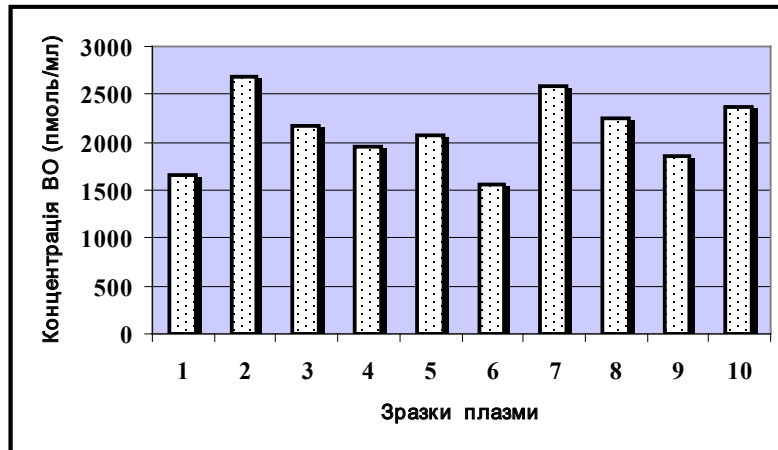


Рис. 2. Концентрація вільних олігосахаридів у плазмі крові здорових донорів (n=10).

При цьому середня концентрація становила $2118,51 \pm 118,38$ пмоль/мл при стандартному відхиленні (σ) – 374,36 пмоль/мл.

Середня концентрація гліканів по кожному з чотирьох головних піків у досліджуваних зразках указана на рис. 3 при стандартних відхиленнях (σ) по піках: I – $\pm 103,98$; II – $\pm 98,00$; III – $\pm 22,41$; IV – $\pm 35,50$ пмоль/мл.

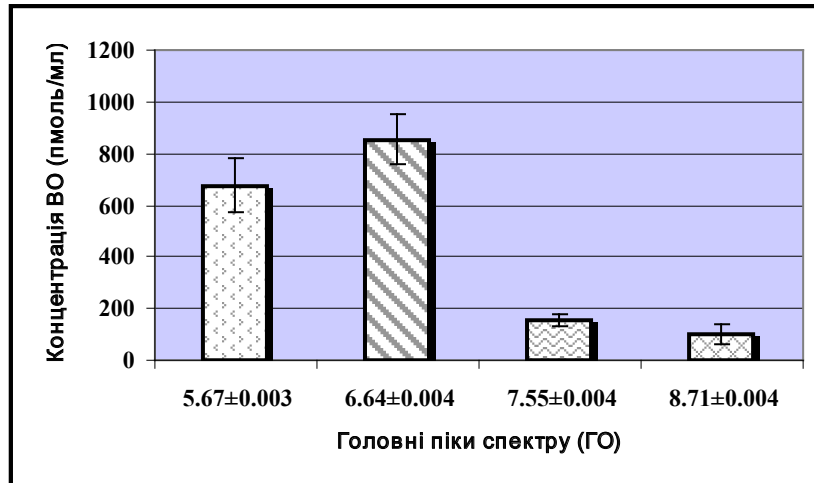


Рис. 3. Концентрація вільних олігосахаридів плазми крові по головних піках ВЕРХ-спектрів.

Таким чином, дані дослідження показали адекватність застосованих методів очищення та маркування, а також достатню чутливість методу аналізу для виявлення профілів вільних олігосахаридів плазми крові. Уперше було отримано ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів і показано, що концентрація гліканів може суттєво коливатися у різних зразках, але при цьому спектри залишаються майже ідентичними й відрізняються лише у мінорних компонентах. Це дає підстави зробити припущення щодо взаєморегуляції та контролю трьох головних процесів, які відповідають за появу вільних олігосахаридів, – глікозилювання, контролю фолдингу та деградації зрілих глікокон'югатів. Стабільність спектрів у нормі може слугувати надійною основою для пошуку структурних змін у вільних олігосахаридах плазми крові при різноманітних захворюваннях.

Оскільки молекулярний склад вільних олігосахаридів залежить від дії багатьох ферментів головних процесів обміну гліканів глікокон'югатів, то він може змінюватися в різних генетичних чи вікових групах. Тому для отримання повноти інформації необхідне подальше вивчення спектрів вільних гліканів плазми крові різних груп здорових донорів, а також проведення аналізу структури гліканів.

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. Alonzi D. S., Neville D. C., Lachmann R. H. et al. **Glucosylated free oligosaccharides are bio-markers of endoplasmic reticulum alpha-glucosidase inhibition** // Biochem J. 2008. Vol. 409. P. 571–680.
2. Alonzi D. S., Su Y-H., Butters T. D. () **Urinary glycan markers for disease** // Biochem Soc Trans. 2011. Vol. 39. N 1. P. 393-398.
3. Anelli T., Sitia R. **Protein quality control in the early secretory pathway** // The EMBO Journal. 2008. Vol. 27. P. 315–327.

4. *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.
5. *Braakman I., Bulleid N. J.* Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 71–99.
6. *Chantret I., Moore S. E. H.* Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18. N 3. P. 210–224.
7. *Hoseki J., Ushioda R., Nagata K.* Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation // *J. Biochem.* 2010. Vol. 147. N 1. P. 19–25.
8. *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.
9. *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.
10. *Suzuki T., Funakoshi Y.* Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation // *Glycoconj. J.* 2006. Vol. 23. N 5–6. P. 291–302.
11. *Winchester B.* Lysosomal metabolism of glycoproteins // *Glycobiology.* 2005. Vol. 15. N 6. P. 1R–15R.
12. *Yanagida K., Natsuka S., Hase S.* Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line, HepG2 // *Glycobiology.* 2006. Vol. 16. N 4. P. 294–304.

Стаття: надійшла до редакції 29.11.11

доопрацьована 07.02.12

прийнята до друку 08.02.12

CHROMATOGRAPHIC SPECTRA OF BLOOD PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES OF HEALTHY VOLUNTEERS

I. Pismenetskaya

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

Chromatographic spectra of plasma free oligosaccharides (unbound analogues of glycoconjugate glycans) of healthy volunteers were obtained for the first time. High sensitivity of the high-performance liquid chromatography technique used for the analysis of free oligosaccharides was confirmed. It was shown that the concentration of free oligosaccharides in plasma can vary significantly, but the HPLC profiles in different samples were almost identical and differ only in minor components. The stability of HPLC profiles of plasma free oligosaccharides in norm can be a reliable background of studying changes in the spectra of free oligosaccharides of blood plasma in various diseases.

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

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ СВОБОДНЫХ
ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

И. Письменецкая

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

Впервые были получены хроматографические спектры свободных олигосахаридов – несвязанных аналогов гликанов гликоконъюгатов – плазмы крови здоровых доноров. Подтверждена высокая чувствительность примененного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа свободных олигосахаридов. Показано, что концентрация этих олигосахаридов в плазме может существенно колебаться, но ВЭЖ-спектры гликанов в разных образцах почти идентичны и отличаются только в минорных компонентах. Стабильность спектров свободных олигосахаридов плазмы в норме может быть надежной основой для изучения изменения спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при различных заболеваниях.

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