

УДК 543.635.24:616.15-006

## Молекулярно-клеточные механизмы изменения спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови при миелопролиферативных заболеваниях

И.Ю. Письменецкая<sup>1</sup>, Т.Д. Баттерс<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МОЗ Украины», Днепропетровск, Украина  
<sup>2</sup>Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Свободные олигосахариды, не связанные с белками или липидами аналоги гликанов гликопротеинов и гликолипидов, появляются как побочные продукты эндоплазматического синтеза, клеточного контроля фолдинга и лизосомально-эндосомального распада гликоконъюгатов. В зависимости от процесса образования они могут быть нейтральными или отрицательно заряженными. Заряженные олигосахариды появляются при распаде гликоконъюгатов в лизосомно-эндосомной системе и являются естественными субстратами лизосомальной сиалидазы-1. Образуются внутри клеток, часть из них попадает в межклеточное пространство, а затем в кровь и мочу. Ранее авторами было установлено, что ВЭЖХ-спектр заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови специфически изменяется при хронических и острых миелопролиферативных заболеваниях. Задачей данной работы стал анализ молекулярно-клеточных механизмов этих изменений. Показано, что они связаны с изменением активности лизосомальной нейраминидазы-1 и интенсивности экзоцитоза секретирующих лизосом. Анализ заряженной (кислой) фракции свободных олигосахаридов плазмы крови может стать чувствительным и надежным инструментом изучения состояния лизосом пациентов при внедрении персонализированного лечения и инновационной терапии.

*Ключевые слова:* свободные олигосахариды; ВЭЖХ-спектры; плазма крови человека; нейраминидаза-1

## Molecular and cellular mechanisms of profile changes of charged blood plasma free oligosaccharides in myeloproliferative disorders

I.U. Pismenetskaya<sup>1</sup>, T.D. Butters<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI Dnipropetrovsk Medical Academy, Dnipropetrovsk, Ukraine  
<sup>2</sup>Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, UK

Free oligosaccharides (FOS) are unbound to proteins or lipids structural analogs of their glycans. FOS appear as by-products of endoplasmic reticulum synthesis, cell control folding with endoplasmic reticulum-associated degradation and lysosomal/endosomal breakdown of glycoconjugates. They may be either neutral or negatively charged depending on the way of their formation. Charged FOS appear during degradation of glycoconjugates in the lysosomal/endosomal system and are natural substrates for lysosomal sialidase-1. FOS are formed inside the cell but some of them can get into the extracellular space, and then into the blood and urine, where both neutral and charged structures were found. Secretion of charged FOS outside of the cell is most likely to be caused by the lysosomal exocytosis. The activity of neuraminidase-1 is known to be connected with the intensity of the lysosomal exocytosis. In our previous studies, it was found that HPLC-profiles of charged FOS were specifically changed in acute and chronic myeloproliferative blood disorders. The objective of this work was to analyze the molecular and cellular mechanisms of these changes and to test the hypothesis of their association with the activity change of lysosomal neuraminidase-1. Plasma samples of patients with acute and chronic leukaemia – polycythaemia vera, chronic idiopathic myelofibrosis, hypoplastic anaemia, myelodysplastic syndrome with transformation, acute lymphatic and acute myelomonocytic

ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МОЗ Украины», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина  
SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine  
Tel.: +38-050-046-82-87. E-mail: ip01589@gmail.com

Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания  
Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK

leukaemia – were collected for investigation. Plasma samples of practically healthy volunteers were obtained and used for comparison. After plasma deproteinization and FOS purification the oligosaccharides were labelled with anthranilic acid (2-AA), separated into the neutral and charged fractions with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography and analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Glucose unit values were determined following comparison with a 2-AA-labelled glucose oligomer ladder derived from a partial hydrolysate of dextran as an external standard. The data were collected and processed using Empower software. The charged FOS were digested with the sialidase from *Arthrobacter ureafaciens*. 2-AA – labelled free oligosaccharides from transferrin were used as an external standard for the structure decoding. In this paper, the changes in neuraminidase-1 activity was first demonstrated on natural substrates, free oligosaccharides, *in vivo*. Chromatographic profiles of charged plasma FOS of patients with acute and chronic hematological malignancies revealed decreasing of neuraminidase-1 activity and increasing of the lysosomal exocytosis. Thus, chromatographic profiles of charged plasma FOS appeared to be a sensitive parameter of the lysosomal/endosomal status in normal or pathological states and to open up new prospects for their applications to the development of anti-cancer drugs designed to block the work of the lysosomal/endosomal system and monitoring of their action.

**Keywords:** free oligosaccharides; HPLC- profiles; human plasma; neuraminidase-1

## Введение

Свободные олигосахариды, не связанные с белками или липидами аналоги гликанов, гликопротеинов и гликолипидов, появляются как побочные продукты эндоплазматического синтеза, клеточного контроля фолдинга и лизосомально-эндосомального распада гликоконъюгатов. На каждом этапе образуются свободные олигосахариды со строго определенными структурами, характеризующими эти этапы. Все разнообразие гликановых структур можно объединить в две большие группы: нейтральные и отрицательно заряженные (Suzuki and Harada, 2014; Hirayama et al., 2010; Winchester, 2005). Свободные заряженные олигосахариды появляются при распаде гликоконъюгатов в лизосомно-эндосомной системе и являются естественными субстратами лизосомальной сиалидазы-1.

Лизосомальная сиалидаза или нейраминидаза 1 (ЕС 3.2.1.18) входит в состав мультиферментного комплекса с  $\beta$ -галактозидазой (ЕС 3.2.1.23) и так называемым защитным белком – сериновой карбоксипептидазой катепсином А (ЕС 3.4.16.5). Катепсин А обеспечивает молекулярный каркас, без которого комплекс не образуется, и защищает сиалидазу и  $\beta$ -галактозидазу от расщепления лизосомальными протеазами и, таким образом, играет роль шаперона по отношению к гликозидазам комплекса. Нейраминидаза активна в гетероолигомерной конфигурации, которую тоже обеспечивает катепсин А.  $\beta$ -Галактозидаза принимает участие в отщеплении остатков галактозы преимущественно от ганглиозидов и кератансульфатов. Мультиферментный комплекс имеет высокую нейраминидазную активность. Пептидазная и галактолидазная активности комплекса очень низкие (Bonten et al., 2014).

Свободные олигосахариды образуются внутри клеток, однако часть из них попадает в межклеточное пространство, а затем в кровь и мочу, где также обнаруживаются как нейтральные, так и заряженные структуры (Alonzi et al., 2008; Iwatsuka et al., 2013). Секреция заряженной фракции свободных олигосахаридов в кровь вероятнее всего обусловлена лизосомальным экзоцитозом.

Экзоцитоз секретирующих лизосом – сложный процесс, включающий несколько этапов: взаимодействие определенного пула лизосом с сетью микротрубочек цитоскелета, транспортировку их к плазматической мембране, освобождение от протеинов цитоскелета, стыковку, а затем слияние мембраны лизосомы с плазматической мембраной, что приводит к высвобождению лизосомального содержимого в межклеточное пространство (Stinchcombe and Griffiths, 2001). Лизосомы разных клеток содержат

секреторные белки, которые могут быть освобождены путем экзоцитоза в ответ на внешние стимулы, обеспечивая различные типы клеток широким диапазоном функциональных эффекторов (Stinchcombe et al., 2004). Кроме того, этот процесс играет фундаментальную роль как в физиологических, так и патологических процессах, включая восстановление и пополнение поврежденных плазматических мембран и ремоделирование внеклеточного матрикса (Bonten et al., 2014). Усиленный экзоцитоз обуславливает инвазию раковых клеток и их устойчивость к химиотерапии (Machado et al., 2015).

В предыдущих работах авторов (Pismenetska, 2012; Pismenetska and Butters, 2014a, 2014b) установлено, что ВЭЖХ-спектр заряженных свободных олигосахаридов специфически изменяется при хронических и острых миелопролиферативных заболеваниях крови. Задачей данной работы стал анализ молекулярно-клеточных механизмов этих изменений и проверка гипотезы о том, что они связаны с изменением активности лизосомальной нейраминидазы.

## Материал и методы исследований

Плазма крови пациентов с диагностированными хроническими (истинная полицитемия,  $n = 10$ ; идиопатический миелофиброз,  $n = 10$ ) и острыми (острый лимфобластный лейкоз,  $n = 2$ ; острый миеломонолейкоз,  $n = 2$ ; острая фаза предлейкемического синдрома,  $n = 2$ ) миелопролиферативными заболеваниями, а также практически здоровых доноров была отобрана с согласия всех групп в соответствии с требованиями приказа МОЗ Украины от 23.09.2009 г. № 690 о порядке проведения клинических испытаний в КП Днепропетровская городская многопрофильная клиническая больница № 4 и любезно предоставлена для исследований врачом Т.П. Николаенко-Камышовой. Средний возраст практически здоровых доноров ( $n = 15$ ) соответствовал возрастной категории больных исследуемых групп и составлял  $59,1 \pm 2,8$  года.

Для нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали реактивы фирмы VWR International, остальные химические реагенты 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 мин. при 3 000 об./мин. (Pismenetska, 2012). Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуороэтиленовой мем-

браной (Millex-LH, 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corp., США), в соответствии с методикой Alonzi et al. (2008).

**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 Alonzi et al. (2008).

**Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой.** Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антраниловой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville et al. (2004). Меченые гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2 (Applied Separations, США) (Alonzi et al., 2008).

**Разделение маркированных гликанов на фракции в зависимости от заряда.** Пул меченых антраниловой кислотой гликанов методом ионообменной хроматографии на QAE-Сефадексе (Q25-120) разделяли на нейтральные (незаряженные) и отрицательно заряженные свободные олигосахариды. Раствор гликанов наносили на колонку, промывали водой и элюировали нейтральные олигосахариды уксусной кислотой, а заряженные – ацетатом аммония в соответствии с методикой Neville et al. (2004).

**Ферментативное расщепление сиалидазой.** Для изучения структуры олигосахаридов заряженной фракции проводили обработку сиалидазой (*Arctobacter ureafaciens*, OGS, Великобритания) в соответствии с фирменной инструкцией к ферменту. 100 мкл 2-АА-маркованных гликанов высушивали в вакуумном концентраторе SPD SpeedVac (Thermo Scientific), ресуспендировали в 5 мкл фирменного буфера, добавляли 5 мкл сиалидазы и инкубировали при 37 °С не менее 18 часов. Очистку гликанов от сиалидазы проводили центрифугированием через колонку Microcon с фильтром Amicon® Ultra 0.5 ml Centrifugal Filter (Millipore). Колонку предварительно промывали 100 мл Milli-Q™ H<sub>2</sub>O, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. и переносили в чистую пробирку. К смеси гликанов с сиалидазой добавляли 90 мкл Milli-Q™ H<sub>2</sub>O и полученный раствор переносили на колонку Microcon, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. На колонку Microcon наносили дополнительные 100 мл Milli-Q™ H<sub>2</sub>O и вновь центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. Образец высушивали вакуумным концентратором SPD SpeedVac (Thermo Scientific), а потом ресуспендировали в 100 мкл Milli-Q™ H<sub>2</sub>O.

**Нормальнофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** Олигосахариды анализировали методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6 x 250 mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville et al. (2004) и Neville et al. (2009). Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville et al. (2004).

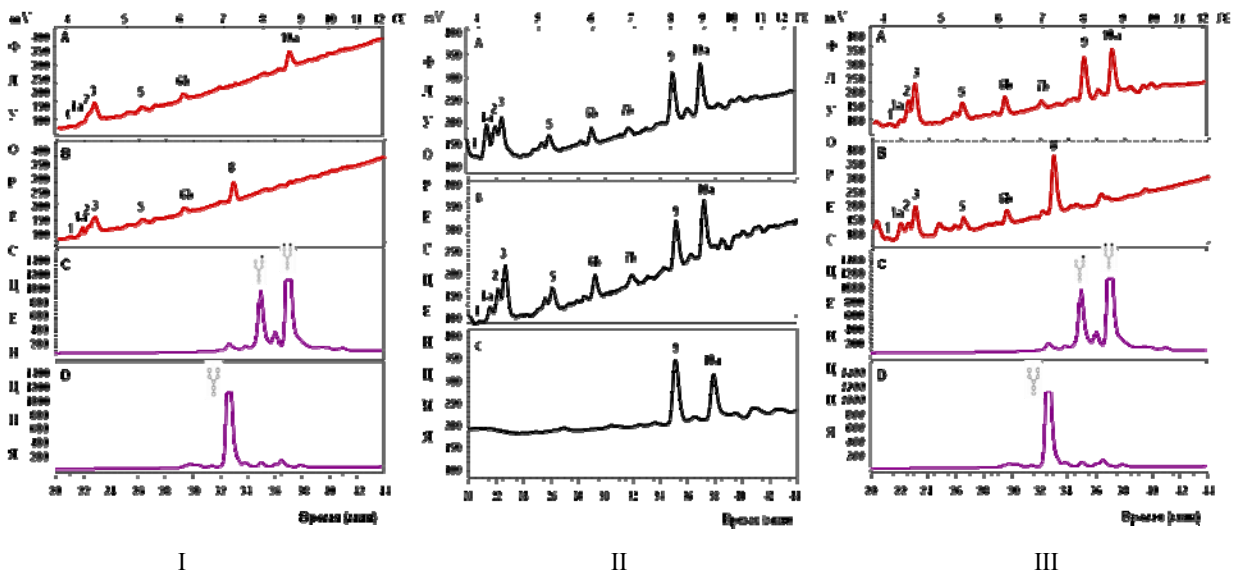
**Компьютерная обработка данных.** Для сбора хроматографических данных и их обработки использовали компьютерные программы Waters Millennium, Waters Empower, Peak Time.

## Результаты и их обсуждение

Исследовали олигосахариды, состоящие из четырех и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20 до 44 мин. (нижняя шкала на рисунках), что соответствует характеристикам пиков от 4 до 12 глюкозных единиц (верхняя шкала в ГЕ). ВЭЖХ-спектры заряженных свободных олигосахаридов в норме и при миелолипролиферативных процессах представлены на рисунке 1. В качестве контроля использовали спектр заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров. Нумерация пиков на рисунках указана в соответствии с нумерацией общего пула свободных олигосахаридов. В состав заряженной фракции входит только часть пиков общего пула, поэтому нумерация на рисунках не сплошная.

В составе спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (рис. 1, IA) выявлены семь пиков и подпиков: 1, 1a – 4,08 ± 0,02 ГЕ, 2 – 4,28 ± 0,02 ГЕ, 3 – 4,40 ± 0,02 ГЕ, 5 – 5,17 ± 0,03 ГЕ, 6b – 5,69 ± 0,03 ГЕ, 10a – 8,62 ± 0,04 ГЕ. Для более детального анализа гликаны фракции обрабатывали сиалидазой (рис. 1, IB). Оказалось, что остатки сиаловых кислот имели олигосахариды 3- и 10-го а пиков, так как после десилирования пик 10a полностью исчез, а площадь пика 3 уменьшилась, что позволило четче проявиться пикам 1a и 2. Вместо пика 10a появился пик 8. Для определения структуры пиков 10a и 8 полученные хроматограммы гликанов плазмы крови сравнивали с хроматограммами углеводов трансферрина до (рис. 1, IC) и после (рис. 1, ID) такой же обработки сиалидазой. Углеводы трансферрина представлены двумя главными структурами – двухантенными комплексными N-гликанами с одним и двумя остатками сиаловых кислот. После десилирования оба гликана превращаются в одну и ту же структуру – незаряженный двухантенный комплексный N-гликан. Полное совпадение позиций соответствующих пиков на хроматограммах гликанов сыворотки крови с реперными пиками внешнего стандарта позволило выяснить, что пик 10a представлен двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловых кислот, а пик 8 – продукт его десилирования, представляющий собой двухантенный комплексный N-гликан без сиаловых кислот.

ВЭЖХ-спектры заряженной фракции гликанов плазмы крови больных хроническими миелолипролиферативными заболеваниями (истинной полицитемией – рис. 1, ПА и идиопатическим миелофиброзом – рис. 1, ПБ) включали те же семь пиков и подпиков, что и спектры в норме, но, кроме того, к ним добавились два дополнительных пика – подпик 7b и ярко выраженный пик 9. Этот пик обнаруживался во всех без исключения изученных образцах. В случае острых лейкозов (рис. 1, ПС) заряженная фракция представлена исключительно пиками 9 и 10a. Десилирование сиалидазой (рис. 1, ПА, В) и сравнение с гликанами трансферрина (рис. 1, ПС, D) подтвердило, что в случае хронических и острых миелолипролиферативных заболеваний пик 9 – это двухантенный комплексный N-гликан с одним остатком сиаловой кислоты, а 10a, как и в норме, представляет собой такой же тип гликана, но с двумя остатками сиаловых кислот.



**Рис. 1.** ВЭЖХ-спектры заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови: относительно здоровых доноров (I), больных истинной полицитемией (IIА), идиопатическим миелофиброзом (IIВ), острым лимфобластным лейкозом (IIС) и результат деградации сиалидазой заряженной фракции гликанов при идиопатическом миелофиброзе (III)

Таким образом, при хронических и острых лейкозах в заряженной фракции свободных олигосахаридов появляется промежуточный продукт дегликозилирования комплексных гликанов – двухантенный комплексный N-гликан с одним остатком сиаловой кислоты. В норме лизосомальная нейраминидаза-1 обеспечивает полное десиалирование и промежуточный продукт не образуется. Это говорит о снижении аффинности фермента к промежуточному субстрату и понижении активности сиалидазы.

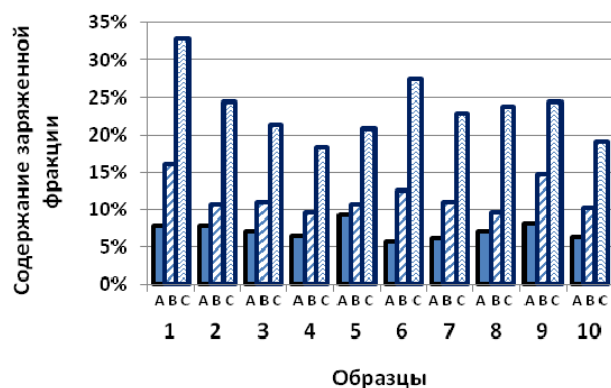
Лизосомальная сиалидаза стабильна и каталитически активна исключительно в составе мультиферментного комплекса (Bonten, 2014). Такой комплекс может динамически собираться и разбираться с целью эффективной адаптации к соответствующим субстратам и условиям катализа. Этот механизм добавляет дополнительные уровни для регуляции активности отдельных белковых компонентов комплекса. Поэтому причины снижения каталитической активности следует искать в изменении структуры данного комплекса.

Активность сиалидазы-1 связана с интенсивностью лизосомального эндоцитоза. Далеко не все детали процесса лизосомального эндоцитоза изучены, но известно, что одним из его ключевых участников является ассоциированный с мембраной лизосом протеин 1 (lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1). LAMP1 – трансмембранный белок, состоящий из люменальной N-концевой части, трансмембранного домена и короткой цитоплазматической C-последовательности из 12 аминокислот. Он отвечает за взаимодействие лизосом с цитоскелетом и стыковку лизосомальной мембраны с плазматической. Люменальная часть ассоциированного с мембраной лизосом протеина 1 сильно гликозилирована и содержит большое количество остатков сиаловых кислот. LAMP1 является субстратом лизосомальной нейраминидазы 1, которая отщепляет остатки сиаловых кислот и, таким образом, изменяет свойства ассоциированного с мембраной лизосом протеина 1, который в результате десиалирования теряет способность к участию в эндоцитозе. При низкой активности сиалидазы и гиперсиалиро-

вании LAMP1 эндоцитоз лизосом усиливается, а при повышении активности фермента и десиалировании LAMP1 эффективность эндоцитоза снижается. Таким образом, сиалидаза-1 является негативным регулятором лизосомального экзоцитоза за счет влияния на структуру углеводного компонента LAMP1 (Yogalingam et al., 2008).

Для оценки интенсивности экзоцитоза секретирующих лизосом проанализирован вклад заряженной фракции гликанов в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови и его изменение при миелопролиферативных заболеваниях.

Общая концентрация свободных олигосахаридов плазмы крови очень мала, составляла в норме  $1909 \pm 426$  пкмоль/мл, в группе больных с истинной полицитемией –  $2545 \pm 292$  пкмоль/мл, при идиопатическом миелофиброзе –  $3219 \pm 264$  пкмоль/мл.

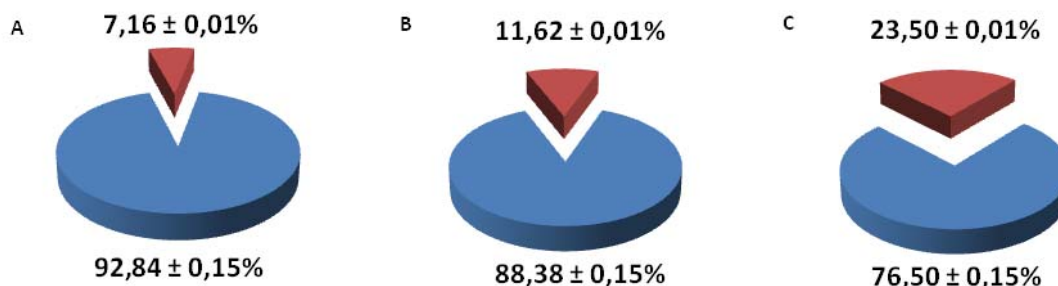


**Рис. 2.** Вклад (%) основных пиков заряженной фракции в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (А) и больных миелопролиферативными заболеваниями (В, С) по образцам: А – пик 10а в хроматограммах контрольной группы, В – пик 10а в хроматограммах группы больных миелопролиферативными заболеваниями, С – сумма пиков 9 и 10а в хроматограммах группы больных миелопролиферативными заболеваниями

В пике 10a сосредоточены почти все сиалирированные гликаны в норме. При миелолипролиферативных заболеваниях они распределены в основном в двух пиках: 9 и 10a. Поэтому измерялся вклад в общий пул свободных олигосахаридов именно этих пиков (рис. 2). Сравнение доли пика 10a в общем пуле свободных олигосахаридов сыворотки крови в контрольной группе и в группе больных миелолипролиферативными заболеваниями с высокой степенью достоверности ( $P < 0,0001$ ) указывает на увеличение доли двухантенного комплексного N-гликана с двумя

остатками сиаловых кислот в плазме больных, т. е. на активацию лизосомального эндоцитоза. Так как в контроле 9-й пик в хроматограмме заряженных гликанов отсутствует, то различия в совокупном вкладе пиков 9 и 10a еще выше ( $P < 1 \cdot 10^{-7}$ ).

Степень увеличения фракции заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови у больных с лейкомиями более наглядно отражается в изменении показателя средних значений вклада главных пиков (рис. 3).



**Рис. 3.** Средние значения вклада основных пиков заряженной фракции в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (А) и больных миелолипролиферативными заболеваниями (В, С):

А – пик 10a в хроматограммах контрольной группы, В – пик 10a в хроматограммах группы больных,

С – сумма пиков 9 и 10a в хроматограммах группы больных

Полученные и представленные на диаграммах результаты указывают на то, что вне зависимости от общей концентрации свободных олигосахаридов плазмы крови секреция основных компонентов заряженной фракции – двухантенных N-гликанов комплексного типа – при лейкомиях достоверно повышается. При этом усиление секреции хорошо прослеживается не только на сумме моно- и дисиалирированных компонентов (рис. 3С, пики 9 и 10a вместе), но и только на дисиалирированных углеводах (рис. 3В, пик 10a).

Таким образом, изменение спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови больных миелолипролиферативными заболеваниями происходит за счет понижения активности лизосомальной сиалидазы-1 и активации лизосомального эндоцитоза.

Исследования влияния нейраминидазы-1 на экзоцитоз секретирующих лизосом проводили на культурах клеток и нокаутированных животных. При этом использовали искусственные субстраты для определения активности фермента и искусственную модель (лизосомальная секреция частично гидролизованного декстрана) для измерения интенсивности экзоцитоза (Machado et al., 2015). Однако такие подходы не позволяют изучать реальные процессы *in vivo*. Для этого нужны естественные маркеры, которые отражают работу нейраминидазы-1 и одновременно вовлечены в процесс лизосомального экзоцитоза. В данной работе изменение активности фермента было впервые продемонстрировано на естественных субстратах *in vivo*.

Понимание физиологических процессов в биохимических и молекулярных деталях не только расширяет представление о патогенезе заболевания, но также позволяет выявить мишени для развития новых диагностических и прогностических инструментов, а также для создания новых терапевтических средств. Лизосомы являются ключевыми компонентами многих клеточных процессов,

которые делают их привлекательными в терапевтических целях. Современные экспериментальные стратегии воздействия на функции лизосом в ближайшее время позволят предложить практические протоколы мониторинга течения и лечения распространенных заболеваний, в том числе и онкологических (Appelqvist et al., 2013). Анализ заряженной (кислой) фракции свободных олигосахаридов плазмы крови может стать чувствительным и надежным инструментом изучения состояния лизосом пациентов при внедрении персонализированного лечения и инновационной терапии.

## Выводы

В данной работе впервые получены доказательства изменения действия лизосомальной нейраминидазы-1 на группу естественных субстратов – свободных олигосахаридов – *in vivo* при острых и хронических миелолипролиферативных заболеваниях крови. Хроматографические спектры заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с острыми и хроническими онкогематологическими заболеваниями выявили понижение активности лизосомальной фракции нейраминидазы-1 и усиление лизосомального экзоцитоза. Хроматографические спектры заряженной фракции плазмы крови являются чувствительным параметром состояния лизосом в норме и при патологиях, что открывает новые перспективы их использования при разработке и мониторинге действия антираковых препаратов, направленных на блокирование работы лизосомно-эндосомной системы.

## Благодарности

Работа выполнена при поддержке международных грантов International Union Against Cancer ICREET

(ICR/09/044), EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Терри Д. Баттерса (Terry D. Butters).

### Библіографічні посилання

- Alonzi, D.S., Neville, D.C., Lachman, R.H., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2008. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic-reticulum alpha-glucosidase inhibition. *Biochem J.* 409(2), 571–580.
- Appelqvist, H., Wäster, P., Kagedal, K., Öllinger, K., 2013. The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* 5(4), 214–226.
- Bonten, E.J., Annunziata, I., d'Azzo, A., 2014. Lysosomal multienzyme complex: Pros and cons of working together. *Cell Mol. Life Sci.* 71(11), 2017–2032.
- Hirayama, H., Seino, J., Kitajima, T., Jigami, Y., Suzuki, T., 2010. Free oligosaccharides to monitor glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285(16), 12390–12404.
- Machado, E., White-Gilbertson, S., van de Vlekkert, D., Janke, L., Moshiah, S., Campos, Y., Finkelstein, D., Gomero, E., Mosca, R., Qiu, X., Morton, C.L., Annunziata, I., d'Azzo, A., 2015. Regulated lysosomal exocytosis mediates cancer progression. *Sci. Adv.* 1(11), e1500603.
- Neville, D.C., Coquard, V., Priestman, D.A., te Vruchte, D.J., Sillence, D.J., Dwek, R.A., Platt, F.M., Butters, T.D., 2004. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling. *Anal. Biochem.* 331, 275–282.
- Neville, D.C., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2009. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 8, 681–687.
- Pismenetska, I.U., 2012. Vplyv immobilizatsii ta deproteinizatsii plazmy krovi na spectr vilnykh oligosakharydiv [Influence of blood plasma immobilization and deproteinization on the spectrum of free oligosaccharides]. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Biology* 60, 27–29 (in Ukrainian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2012. Analiz zariadzhenoї fraktsii vilnykh olihosakharydiv plazmy krovi praktychno zdorovykh donoriv [A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, Chemistry* 25, 159–165 (in Ukrainian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2014a. HPLC-spektry svobodnykh oligosaharidov plazmy krovi pri ostrykh onkogematologicheskikh zabolevaniyah [HPLC-profiles of plasma free oligosaccharides in acute hematologic malignancies]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, Chemistry* 27, 102–111 (in Russian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2014b. Dekodirovanie struktur svobodnykh oligosaharidov plazmy krovi bol'nykh hronicheskimi mieloproliferativnymi zabolevaniyami [Decoding the structures of plasma free oligosaccharides from patients with chronic myeloproliferative diseases]. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe* 27(3), 69–78 (in Russian).
- Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., 2004. Linking albinism and immunity: The secrets of secretory lysosome. *Science* 305(5680), 55–59.
- Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M., 2001. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology* 103(1), 10–16.
- Suzuki, T., Harada, Y., 2014. Non-lysosomal degradation pathway for N-linked glycans and dolichol-linked oligosaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453(2), 213–219.
- Winchester, B., 2005. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 15(6), 1R–15R.
- Yogalingam, G., Bonten, E.J., van de Vlekkert, D., Hu, H., Moshiah, S., Connell, S.A., d'Azzo, A., 2008. Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev. Cell.* 15(1), 74–86.

Надійшла до редколегії 12.03.2016