

УДК 543.544.5.068.7:616.2

Хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью

И.Ю. Письменецкая¹, Т.Д. Баттерс²

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗУ», Днепропетровск, Украина

²Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Свободные олигосахариды – структурные аналоги гликанов гликоконъюгатов, которые возникают на ранних этапах процесса N-гликозилирования в ходе ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации aberrантных гликопротеинов и расщепления гликоконъюгатов в лизосомах. Ишемия и гипертензия вызывают стресс внутриклеточных органелл, что приводит к нарушению их функций. Данная работа посвящена анализу хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью. Показано, что ишемия и гипертензия вызывают изменения в спектрах свободных гликанов. Во фракции нейтральных олигосахаридов выявлены три маркерных пика, а во фракции заряженных (кислых) гликанов – характерное увеличение площади одного из двух главных пиков. Расшифровку структуры гликанов проводили с помощью ферментативной деградации, а также путем сравнения характеристик изучаемых спектров с хроматограммами внутриклеточных свободных олигосахаридов и со структурами гликанов гликоконъюгатов из электронных баз данных. Маркерные пики нейтральной фракции представлены полиманнозными гликанами с 5–7 остатками маннозы и 1–2 остатками N-ацетилглюкозамина, а один из главных пиков заряженной фракции – двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловой кислоты. Исследование свободных олигосахаридов плазмы крови – новая область изучения нарушений гликозилирования при сердечно-сосудистых заболеваниях, которая открывает широкие перспективы для поиска ранних диагностических и прогностических маркеров сердечной недостаточности.

Ключевые слова: свободные олигосахариды; ВЭЖХ-спектры; плазма крови человека; сердечная недостаточность

Chromatographic profiles of blood plasma free oligosaccharides in patients with cardiovascular disease

I.U. Pismenetskaya¹, T.D. Butters²

¹Dnepropetrovsk Medical Academy SI, Dnepropetrovsk, Ukraine

²Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK

Free oligosaccharides (FOS) are unbound structural analogs of glycans of glycoconjugates. There are several sources of them inside the cell: 1) multistep pathways of N-glycosylation, 2) the cell quality control and endoplasmic reticulum-associated degradation of misglycosylated and/or misfolded glycoproteins, 3) lysosomal degradation of mature glycoconjugates. Some of these FOS are the earliest indicators of potential glycosylation alterations that would be revealed in the course of the cell quality control and the endoplasmic reticulum-associated degradation. Ischemia and hypertension cause stress of intracellular organelles leading to disruption of their functions. The main objective of the work was the characterization of free oligosaccharides (FOS) in plasma obtained from patients with cardiovascular diseases compared to those from healthy subjects to evaluate the potential of these compounds for diagnostics. Chromatographic profiles of FOS composed of 4–12 monosaccharides were obtained and analyzed for quantitative and qualitative differences between the samples. After plasma deproteinization and FOS purification the oligosaccharides were labelled with anthranilic acid (2-AA), separated into the neutral and charged with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography and analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Glucose

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗУ», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина
SE “Dnepropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, OX13QU, Великобритания
Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK
Tel.: +38-068-732-51-21. E-mail: ip01589@gmail.com

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. The profiles obtained were compared with intracellular free oligosaccharides of known structures and with the glycan structures and their descriptions in the databases GlycoBase and EUROCarbDB. These approaches allowed predicting a range of glycan structures for each of the main peaks of HPLC profiles of plasma free oligosaccharides and managing ways for their future experimental analysis. In the case of cardiovascular disorders, HPLC profiles of FOS revealed a changing pattern of heterogeneity, depending on the severity of the disease. Three main enlarged glycan species in the neutral fraction and one peak in the charged fraction distinguished the FOS of the patients from those of the healthy volunteers. It has been revealed that the neutral marker peaks were represented by polymannose glycans with 5–7 mannose residues and 1–2 residues of N-acetylglucosamine, and one of the major peaks of the charged fraction – by two-antennary complex N-glycan with two sialic acid residues. The study of free oligosaccharides of blood plasma is a new field of glycobiology allowing an evaluation of an organism state at the level of the cell organelle functional status and opening up broad prospects for finding early diagnostic and prognostic markers of cardiac insufficiency.

Keywords: free oligosaccharides; HPLC-profiles; human plasma; cardiovascular diseases

Введение

Процессы синтеза и распада гликоконъюгатов сопровождаются появлением так называемых свободных олигосахаридов – не связанных с белками или липидами аналогов углеводной части гликопротеинов или гликолипидов, их биосинтетических предшественников и продуктов деградации. Внутри клетки существует несколько источников свободных олигосахаридов: 1) синтез гликана-предшественника в процессе N-гликозилирования белков в эндоплазматическом ретикулуме (Suzuki and Harada, 2014); 2) ассоциированная с эндоплазматическим ретикулумом деградация вновь синтезируемых гликопротеинов, которые не прошли клеточный контроль фолдинга (Hirayama et al., 2010); 3) распад зрелых гликоконъюгатов в лизосомах (Winchester, 2005).

Образование гликана-предшественника на ранних этапах N-гликозилирования приводит к появлению свободных фосфорилированных или нефосфорилированных олигосахаридов полиманнозного типа в результате их отщепления от долинхлорфосфата на любом этапе биосинтеза (Harada et al., 2013b), как полагают, из-за лимитированного количества этого липида-носителя в мембране эндоплазматического ретикулума и необходимости его участия в других биосинтетических процессах (Peric et al., 2010). Так как синтез гликана-предшественника происходит на обеих сторонах мембраны, свободные олигосахариды могут оказаться и в цитоплазме, и внутри эндоплазматического ретикулума. Вклад во внутриэндоплазматическую фракцию свободных олигосахаридов может вносить также олигосахарилтрансфераза (EC 2.4.1.119), катализирующая перенос гликана-предшественника на растущую полипептидную цепь, так как, согласно последним исследованиям (Harada et al., 2013), она обладает, кроме трансферазной, еще и гидролитической активностью.

Особый интерес представляют свободные олигосахариды, возникающие при ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом деградации, которая необходима для разрушения синтезируемых в эндоплазматическом ретикулуме aberrantных белков, не прошедших клеточный контроль из-за неправильного гликозилирования, нарушенного фолдинга или сборки в полимерные комплексы (Brodsky, 2012; Leitman, 2013). Такие дефектные белки переносятся через мембрану эндоплазматического ретикулума в цитозоль, где, после отщепления гликана, разрушаются протеасомой S26 (Nakatsukasa,

2013; Lemus, 2014). Эти белки могут содержать гликаны с измененной структурой и в клетке они появляются раньше, чем гликопротеин с таким aberrantным гликаном окажется в месте функциональной активности (на поверхности клеток, в межклеточном пространстве или в биологических жидкостях). В норме этому препятствуют механизмы клеточного контроля фолдинга (Ruggiano, 2014), которые нарушаются при стрессе эндоплазматического ретикулума (Sano, 2013).

Различные факторы, такие как оксидативный стресс, ишемия, сбой кальциевого гомеостаза, избыточный синтез нормальных белков или белков с нарушенной конформацией, приводят к изменению и нарушению функций эндоплазматического ретикулума (Minamino and Kitakaze, 2010). Это вызывает ответную реакцию клетки, направленную на восстановление функции ретикулума, так называемый отклик неструктурированных белков (unfolded protein response) (Chakrabarti, 2011). Если же воздействие стресса слишком велико и функции невозможно восстановить, запускаются процессы апоптоза клетки (Sun, 2015). Появляется все больше убедительных доказательств того, что адаптивные и проапоптозные пути ответной реакции клеток на стресс эндоплазматического ретикулума играют фундаментальную роль в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца и атеросклероза (Minamino et al., 2010; Guo, 2015; Li, 2015).

Лизосомы – главные участники аутофагии, эволюционно консервативного процесса деградации внутриклеточных компонентов, в том числе и растворимых макромолекул (белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот) (Mei, 2015). Аутофагия важна для поддержания сердечного гомеостаза и механизмов выживания кардиоцитов во время стресса или голодания. Результаты исследований, полученные в последнее время, свидетельствуют о том, что дерегуляция или замедление аутофагии связаны с сердечной недостаточностью и старением. Активация аутофагии, как правило, является кардиозащитным механизмом, хотя чрезмерная аутофагия может привести к гибели клеток и атрофии сердечной мышцы (Gatica, 2015; Orogo, 2015).

Таким образом, регуляция адаптивных путей ответной реакции клеток на стресс эндоплазматического ретикулума и модуляция аутофагии могут стать привлекательными терапевтическими подходами в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому несомненный интерес представляет поиск молекулярных марке-

ров, отражающих состояние эндоплазматического ретикула и эндосомно-лизосомной системы, в биологических жидкостях.

Основной задачей данной работы стала характеристика хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их сопоставление с нормой для оценки потенциала этих спектров в исследованиях поведения клеточных органелл в стрессовых условиях при ишемии и гипертензии с целью дальнейшего их использования в диагностике, мониторинге и поиске механизмов-мишеней для лекарственной терапии сердечной недостаточности.

Материал и методы исследований

Плазма крови пациентов с сердечной недостаточностью и практически здоровых доноров была отобрана с согласия всех групп в соответствии с требованиями этического комитета в КУ «Днепропетровская областная клиническая больница имени Мечникова» и любезно предоставлена для исследований врачом-кардиологом А.А. Мирошниченко. Пациенты были разбиты на две группы:

1) с сердечной недостаточностью с сохранением систолической функции левого желудочка (фракция выброса > 45%) первых двух функциональных классов – гипертоническая болезнь в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердечной недостаточности (n = 10);

2) с сердечной недостаточностью со сниженной систолической функцией левого желудочка (фракция выброса < 45%) третьего функционального класса – гипертоническая болезнь в сочетании с ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью (n = 12).

Возраст практически здоровых доноров (n = 15) соответствовал возрастной категории больных исследуемых групп – от 41 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. Депротенинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3 000 об./мин. (Pismenetska, 2012). Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуорэтиленовой мембраной (Millex-LH, 0.45 µm, Millipore Corp., США), в соответствии с методикой Alonzi et al. (2008).

Удаление глюкозы. Моносахариды из плазмы после депротенинизации 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 (*Artrobacter ureafaciens*, OGS, Великобритания) в соответствии с фирменной инструкцией к ферменту. 100 мкл 2-АА-маркированных 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™ H₂O, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. и переносили в чистую пробирку. К смеси гликанов с сиалидазой добавляли 90 мкл Milli-Q™ H₂O и полученный раствор переносили на колонку Microcon, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. На колонку Microcon наносили дополнительные 100 мл Milli-Q™ H₂O 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™ H₂O.

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, 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

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры общего пула, нейтральных и заряженных (кислых) свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и проведено их сравнение с нормой. Общая концентрация свободных олигосахаридов плазмы крови очень мала и составила в норме – $937,9 \pm 173,5$ пкмоль/мл, в группе больных с гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердеч-

ной недостаточности – $1\,245,1 \pm 191,7$ пкмоль/мл и в группе больных с гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца и хронической сердечной недостаточностью – $1\,360,8 \pm 187,8$ пкмоль/мл. Кажущаяся тенденция увеличения концентрации свободных гликанов в зависимости от тяжести развития сердечной недостаточности не нашла статистического подтверждения. Исследовались олигосахариды, состоящие из четырех и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20

до 44 минут (нижняя шкала на рисунках), что соответствует характеристикам пиков от 4 до 12 глюкозных единиц (верхняя шкала). Результаты разделения представлены на рисунке. В качестве контроля использовали спектр общей фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров, так как в предыдущих работах (Pismenetska and Butters, 2012) была показана его достаточная для такого сравнения воспроизводимость. Нумерация пиков на рисунках указана в соответствии с их нумерацией на контрольном спектре.

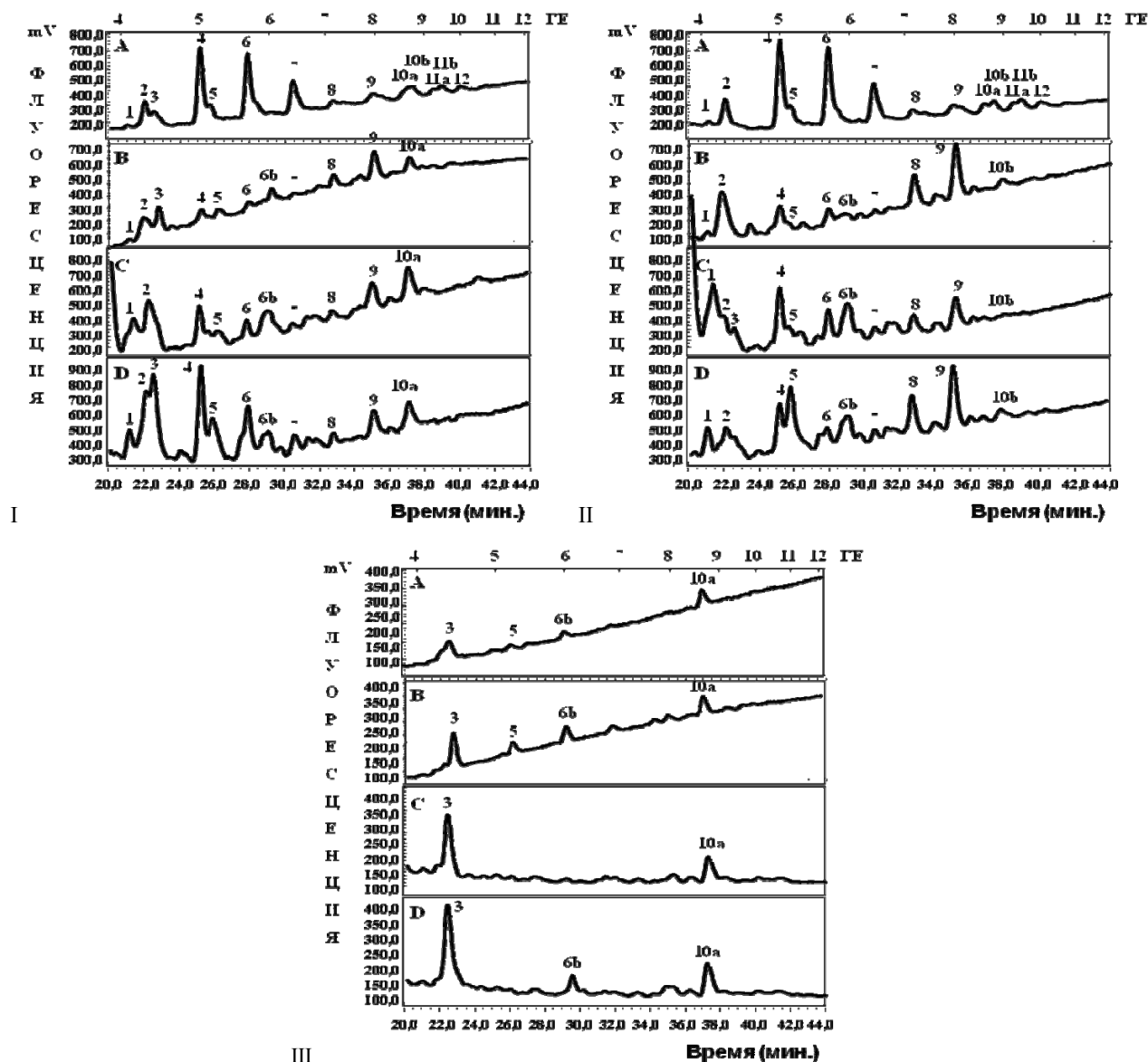


Рис. Сравнение ВЭЖХ-спектров общего пула (I), нейтральной (II) и заряженной (III) фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью (B, C, D) и практически здоровых доноров (A): А – контрольная группа; В, С – группы больных гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердечной недостаточности; D – группа больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической сердечной недостаточностью

Анализ результатов хроматографического разделения показал, что спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью отличаются от нормы (рис. I) повышенной степенью гетерогенности, ярко выраженной индивидуальностью и, в большинстве случаев, полной потерей основных законо-

мерностей контроля – четко выраженной структуры с подавляющим превалированием 4, 6 и 7-го пиков. Эта тенденция особенно усиливается в случае хронической сердечной недостаточности. Как и в контроле, большая часть свободных олигосахаридов плазмы пациентов представлена фракцией нейтральных гликанов (рис. II).

Именно эта фракция в наибольшей степени обеспечивает особенности хроматографических спектров общего пула – индивидуальное перераспределение гликанов всех пиков. Выделение фракции нейтральных гликанов позволило выявить общую закономерность в спектрах свободных олигосахаридов пациентов, отличающую их от нормы, – резкое увеличение концентрации 6b, 8 и 9-го пиков. Фракция заряженных (кислых) гликанов (рис. III) составляет по концентрации лишь небольшую долю от общего пула свободных олигосахаридов, как в норме, так и при исследуемых патологиях. Заряженные свободные олигосахариды представлены небольшим количеством пиков, основные из которых 3, 5, 6b и 10a. Существенным отличием этой фракции свободных олигосахаридов плазмы крови больных от нормы заключается в резком увеличении концентрации 3-го пика.

Для расшифровки строения гликанов сравнивали характеристики пиков изучаемых хроматограмм с пиками внутриклеточных свободных олигосахаридов. Для анализа использовали данные о внутриклеточных свободных олигосахаридах, которые были получены в аналогичных условиях разделения, а их детальное строение установлено дополнительными методами (Alonzi et al., 2008). Кроме того, использовали информацию о структурах гликанов гликоконъюгатов из электронных баз данных GlycoBase (www.glycobase.nibr.ie) и EURO-CarbDB (www.eurocarbdb.org) для пополнения структур гликанов нейтральной фракции и поиска олигосахаридных структур заряженной фракции.

Такой подход показал, что фракция нейтральных гликанов представлена полиманнозными структурами с одним или двумя остатками N-ацетилглюкозамина. Часть гликанов может содержать остатки глюкозы. Если в контроле преобладают олигосахариды с 4 и 5 остатками маннозы, то при сердечной недостаточности появляется изомер с 5 остатками маннозы, отсутствующий в норме (пик 6b), и гликаны с 6 и 7 остатками маннозы (пики 8 и 9). Не для всех пиков удалось найти структуры гликанов с соответствующим значением глюкозных единиц. Нет подходящей структуры для 2-го пика нейтральной фракции, а также для 3, 5 и 6-го пиков заряженной фракции.

Для детального анализа заряженной фракции ее обработали сиалидазой и сравнили с внешним стандартом известной структуры – углеводами трансферрина до и после такой же обработки. Это позволило выяснить, что пик 10a представлен двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловых кислот, что подтверждало правильность предсказания структуры этого пика с помощью баз данных. Маркерный для спектров гликанов плазмы больных с сердечной недостаточностью пик 3 не изменял положения на хроматограмме после обработки ферментом, что свидетельствовало о том, что он не содержит олигосахаридов с сиаловыми кислотами или же вклад таких гликанов в общую площадь пика не слишком велик.

Полиманнозные свободные олигосахариды образуются на ранних стадиях N-гликозилирования в результате отщепления от липидного носителя в мембране эндоплазматического ретикула. Поэтому изменение их спектра свидетельствует об изменении процессов, происходящих в эндоплазматическом ретикуле, и отражает его состояние и реакцию на стрессовые факто-

ры. Заряженные (кислые) свободные олигосахариды образуются в лизосомах, поэтому изменения в их спектрах отражают состояние эндосомно-лизосомной системы. При сердечной недостаточности (сочетании гипертонической болезни сердца с ишемической болезнью на фоне хронической сердечной недостаточности или без нее) изменения хроматографических спектров свободных гликанов плазмы свидетельствуют о более глубоких нарушениях процессов в эндоплазматическом ретикуле, чем в лизосомах. Так как одной из важных особенностей образования свободных олигосахаридов в эндоплазматическом ретикуле является то, что они появляются значительно раньше, чем синтезируемые aberrантные протеины оказываются в зоне своего функционального назначения, то именно среди этих молекул могут быть найдены самые ранние диагностические маркеры такого грозного заболевания как сердечная недостаточность.

Выводы

Впервые получены ВЭЖХ-спектры общих, нейтральных и заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью. Эти спектры отличались как от ВЭЖХ-спектров в норме, так и между собой. При сердечной недостаточности повышалась гетерогенность спектров, особенно нейтральной фракции. Среди нейтральных олигосахаридов выявлены три характерных для данной группы заболеваний пика: гликаны с $6,00 \pm 0,01$ ГЕ (полиманнозный тип с 5 остатками маннозы), $7,07 \pm 0,04$ ГЕ (полиманнозный тип с 6 остатками маннозы) и с $7,83 \pm 0,04$ ГЕ (полиманнозный тип с 7 остатками маннозы). Их концентрация значительно превышала норму. Во фракции заряженных гликанов доминировали два пика с $4,43 \pm 0,05$ ГЕ неизвестной структуры и с $8,62 \pm 0,02$ ГЕ – двухантенный комплексный N-гликан с двумя остатками сиаловых кислот, что соответствовало пикам в норме. Однако при сердечной недостаточности концентрация первого пика была значительно выше нормы.

Исследование свободных олигосахаридов плазмы крови – новая область изучения нарушений гликозилирования при сердечно-сосудистых заболеваниях, которая позволяет оценить состояние организма на уровне функционального статуса клеточных органелл (эндоплазматического ретикула и лизосом), их реакций на стрессы при данных заболеваниях и открывает широкие перспективы для поиска ранних диагностических и прогностических маркеров сердечной недостаточности.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке международного гранта EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (г. Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Terry D. Butters.

Библиографические ссылки

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.
- Brodsky, J.L., 2012. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 151(6), 1163–1167.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., Varner, J.D., 2011. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* 108(12), 2777–2793.
- Harada, Y., Buser, R., Ngwa, E.M., Hirayama, H., Aebi, M., Suzuki, T., 2013a. Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 288(45), 32673–32684.
- Harada, Y., Nakajima, K., Masahara-Negishi, Y., Freeze, H.H., Angata, T., Taniguchi, N., Suzuki, T., 2013b. Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(48), 19366–19371.
- 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.
- Gatica, D., Chiong, M., Lavandero, S., Klionsky, D.J., 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 116(3), 456–467.
- Guo, X.F., Yang, X.J., 2015. Endoplasmic reticulum stress response in spontaneously hypertensive rats is affected by myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp. Ther. Med.* 9(2), 319–326.
- Leitman, J., Ron, E., Ogen-Shtern, N., Lederkremer, G.Z., 2013. Compartmentalization of endoplasmic reticulum quality control and ER-associated degradation factors. *DNA Cell Biol.* 32(1), 2–7.
- Lemus, L., Goder, V., 2014. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by ubiquitin. *Cells* 3(3), 824–847.
- Li, M., Tang, Y.Q., Du, R.H., Shi, F.H., Hussein, H.K., Dai, Z., Dai, Y., 2015. CPUY11018, an azimilide derivative, ameliorates isoproterenol-induced cardiac insufficiency through relieving dysfunctional mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Pharm. Pharmacol.* doi: 10.1111/jphp.12401.
- Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A., Tong, X., 2015. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1852(2), 243–251.
- Minamino, T., Komuro, I., Kitakaze, M., 2010. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 107(9), 1071–1082.
- Minamino, T., Kitakaze, M., 2010. ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(6), 1105–1110.
- Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L., Kamura, T., 2013. A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 24(11), 1765–1775.
- 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.
- Orogo, A.M., Gustafsson, A.B., 2015. Therapeutic targeting of autophagy: Potential and concerns in treating cardiovascular disease. *Circ. Res.* 116(3), 489–503.
- Peric, D., Durrant-Arico, C., Delenda, C., Dupré, T., De Lonlay, P., de Baulny, H.O., Pelatan, C., Bader-Meunier, B., Danos, O., Chantret, I., Moore, S.E., 2010. The compartmentalisation of phosphorylated free oligosaccharides in cells from a CDG Ig patient reveals a novel ER-to-cytosol translocation process. *PLoS One* 5, e11675.
- 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. Vil'ni olihosakharydy plazmy krovi praktychno zdorovykh donoriv [Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series: Biology, Chemistry* 25(1), 182–187 (in Ukrainian).
- Ruggiano, A., Foresti, O., Carvalho, P., 2014. Quality control: ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* 204(6), 869–879.
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833(12), 3460–3470.
- Sun, Y., Zhang, T., Li, L., Wang, J., 2015. Induction of apoptosis by hypertension via endoplasmic reticulum stress. *Kidney Blood Press Res.* 40(1), 41–51.
- 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.

Надійшла до редколегії 26.03.2015