

СВОБОДНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ (II. ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРОВ НЕЙТРАЛЬНОЙ И ЗАРЯЖЕННОЙ ФРАКЦИЙ)

Письменецкая И.Ю.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры нейтральных и заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов истинной полицитемией (эритремией) и проведено их сравнение с хроматографическими спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров. Гликаны анализировали методом нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии после предварительного разделения на фракции нейтральных и заряженных олигосахаридов. Основные отличия наблюдались во фракции отрицательно заряженных углеводов и заключались в появлении характерного пика 9 (7,85 ГЕ) и минорных пиков в начальном отрезке хроматограммы.

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

Введение. Гликозилирование – присоединение углеводного компонента – это самая распространенная модификация макромолекул живых организмов. Присоединяемый углеводный компонент называется гликаном, вариантов структуры которого существует бесчисленное множество. Такое разнообразие связано с существованием нескольких типов мономеров в составе гликанов, многообразием связей между мономерами и способностью гликанов к ветвлению. В качестве мономеров выступают основные моносахариды и их производные – глюкоза, манноза, фукоза, ксилоза, глюкозамин, галактозамин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловые кислоты, идуроновая, глюкуроновая, галактуроновая и маннуроновая кислоты. Гликан может присоединяться к двум семействам макромолекул – белкам и липидам. В результате образуется огромное разнообразие так называемых гликоконъюгатов – гликопротеинов, протеогликанов, гликолипидов и гликозилфосфатидилинозитольных якорей [9,10,18].

Обмен гликоконъюгатов сопровождается появлением не связанных с белками или липидами олигосахаридов, структура которых аналогична гликанам гликопротеинов и гликолипидов [11]. Такие свободные олигосахариды образуются на начальных этапах синтеза гликопротеинов и гликолипидов при сборке гликана-предшественника в эндоплазматическом ретикулуме [8]. Если в ходе синтеза гликоконъюгатов появляются aberrантные молекулы, клетка их обнаруживает и разрушает путем специального механизма – ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации. При этом также возникают свободные олигосахариды [12,15]. Гидролиз гликоконъюгатов в лизосомах – это еще один источник свободных олигосахаридов [19]. Каждый из перечисленных процессов характеризуется появлением групп гликанов со строго определенной структурой. При нарушении этих процессов изменяется химическая структура и/или соотношение углеводных компонентов в этих группах.

Онкотрансформация клеток приводит к радикальному изменению гликанов гликоконъюгатов, основные черты которых достаточно хорошо изучены. Однако многочисленные детали этих изменений и их связь с трансформацией функций все еще остаются загадкой [6,16,17]. Влияние же онкотрансформации на свободные олигосахариды практически не исследовано, что связано с методическими трудностями: очень низкой концентрацией изучаемых

молекул и общей трудоемкостью анализа гликанов.

В наших предыдущих работах было показано, что ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы относительно здоровых волонтеров достаточно стабильны и отличаются в различных образцах лишь минорными пиками [2, 3, 4]. ВЭЖХ-спектры гликанов плазмы пациентов с истинной полицитемией характеризуются более высокой гетерогенностью и появлением пиков, которые соответствуют олигосахаридам, состоящим из 7-9 моносахаридных остатков [5]. Целью данной работы является дальнейшая детализация хроматографического спектра свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с истинной полицитемией (эритремией) путем предварительного разделения общего пула на фракции нейтральных и заряженных гликанов. Такая детализация необходима для более глубокого понимания молекулярных механизмов данного заболевания и анализа перспективности использования свободных олигосахаридов для поиска новых биомаркеров с целью более ранней диагностики и индивидуального мониторинга эффективности лечения онкозаболеваний.

Материалы и методы. Плазма крови пациентов с первично диагностированной истинной полицитемией (n=10) и относительно здоровых доноров (n=10) была отобрана с согласия обеих групп и в соответствии с требованиями этического комитета в клинике ГУ «Днепропетровская медицинская академия». Возраст относительно здоровых доноров соответствовал возрастной категории пациентов исследуемой группы и составлял от 41 до 65 лет.

Для нормально-фазовой 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 [1]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуорэтиленовой мембраной (Millex-LH, 0.45 µm, Millipore Corp., США), в соответствии с методикой [7].

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 [7].

Маркирование олигосахаридов флуоресцент-

ной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антралиновой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville D.C.A. et.al. [13]. Меченные гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [7].

Разделение маркированных гликанов на фракции в зависимости от заряда. Пул меченных антралиновой 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 D.C.A. et.al. [13].

Нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Олигосахариды анализировали методом нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6x250-мм TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville D.C.A. et.al. [13, 14]. Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville D.C.A. et.al. [13].

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 были получены хроматографические спектры фракционированных по заряду свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с истинной полицитемией (эритремией) и проведено их сравнение с хроматографическими спектрами гликанов плазмы крови относительно здоровых доноров.

Типичные спектры свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов, содержащих от 4 до 12 остатков моносахаридов, показаны в левом блоке хроматограмм на рис.1 (А,В,С). Общий пул гликанов (рис.1А) был разделен на нейтральную (рис.1В) и заряженную (рис.1С) фракции. Правый блок хроматограмм показывает аналогичные фракции контроля - рис.1(А', В', С'). Использование частично гидролизованного декстрана в качестве внешнего стандарта, хроматографический спектр которого выделен на каждой хроматограмме пунктиром, дает возможность определить относительную массу углеводов каждого пика в глюкозных единицах. Шкала глюкозных единиц приведена в верхней части рисунка. Нумерация пиков на всех хроматограммах как левого, так и правого блоков идентична.

ВЭЖХ-спектр общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с истинной полицитемией (рис.1А) представлен 12 основными пиками и может быть условно разбит на 3 зоны. Первая зона (20-24 мин.) включает 1-й, 2-й и 3-й пики с невысокой концентрацией и относительной молекулярной массой 4,08-4,40 ГЕ. Вторая зона (24-32 мин.) состоит из самых больших пиков спектра - 4-го, 6-го и 7-го с относительной молекулярной массой от 5,01 до 6,40 ГЕ. Третья зона (32-44 мин.) складывается из большого количества слабо выраженных пиков с относитель-

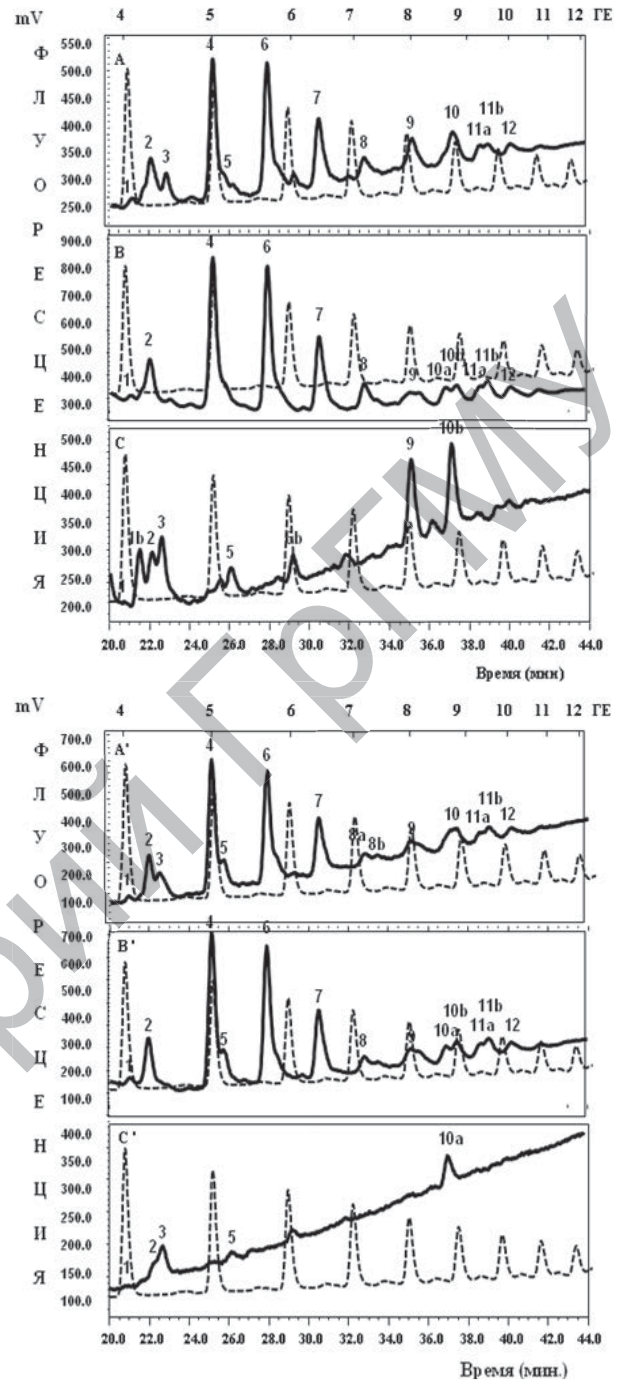


Рисунок 1 – ВЭЖХ-спектры общей, нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови:

А,В,С – пациентов истинной полицитемией; А',В',С' – относительно здоровых доноров; А, А' – общий пул; В, В' – нейтральная фракция; С, С' – заряженная фракция; пунктиром обозначены спектры внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана.

ной молекулярной массой 7,08–9,93 ГЕ, среди которых были идентифицированы пики от 8-го до 12-го.

Изменения спектра свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с эритремией по сравнению с контролем (рис.1А') наблюдаются в каждой из этих зон. Первая зона характеризуется появлением промежуточного пика с относительной молекулярной массой около 4,15 ГЕ между первым (4,08 ГЕ)

и вторым (4,28 ГЕ) пиками. Во второй зоне спектра между 5-м (5,17 ГЕ) и 6-м (5,69 ГЕ) пиками, а также между 6-м и 7-м (6,40 ГЕ) пиками намечается по одному дополнительному минорному пику. В третьей зоне ВЭЖХ-спектра резко возрастает концентрация 8-го (7,08 ГЕ), 9-го (7,85 ГЕ) и 10-го (8,62 ГЕ) пиков.

Фракция незаряженных (нейтральных) свободных олигосахаридов показана на рис.1В и включает все основные пики трех зон хроматограммы общего пула. Именно эта фракция составляет основную долю гликанов. Сравнение со спектром общего пула показывает, что в первой зоне остается 1-й пик (4,08 ГЕ), уменьшается 2-й (4,28 ГЕ) и практически исчезает 3-й (4,40 ГЕ) пик. Во второй зоне полностью сохраняются 4-й, 6-й и 7-й пики (ГЕ). Изменения в третьей зоне касаются 9-го и 10-го пиков, концентрация которых резко уменьшается. Сравнение с нейтральной фракцией контроля (рис.1 В') выявило, что главное отличие заключается в повышении концентрации 8-го пика.

Фракция заряженных свободных олигосахаридов показана на рис.1С. По сравнению с предыдущей фракцией она включает значительно меньшее количество пиков. Концентрация этих пиков ниже, чем пиков фракции нейтральных олигосахаридов. Большая часть заряженных олигосахаридов сосредоточена в 1-м, 2-м, 3-м, 5-м, 9-м и 10-м пиках. Сравнение с контрольным спектром показывает, что именно эта фракция подвергается наибольшим изменениям при истинной полицитемии. Эти изменения проявляются в общем повышении концентрации пиков и в появлении новых, не характерных для контрольных образцов, структур. Новый пик (4,15 ГЕ) наблюдается в первой зоне (между 1-м и 2-м пиками), а также в третьей зоне - 9-й (7,85 ГЕ) пик.

Таким образом, разделение общего пула свободных олигосахаридов на фракции нейтральных и заряженных гликанов, позволило более детально охарактеризовать отличия, возникающие в хроматографическом спектре исследуемых молекул при истинной полицитемии. Оказалось, что нейтральная фракция, включающая большую часть гликанов общего пула, не подвергается системным изменениям при данном заболевании, а отражает индивидуальные различия между образцами плазмы крови. Фракция же заряженных гликанов отражает системные изменения спектра, характерные для всех исследованных образцов. Поэтому именно она может быть использована для характеристики биомаркеров данного заболевания.

Кроме того, разделение общего пула гликанов на фракции по заряду позволяет выделить в отдельные группы свободные олигосахариды, имеющие разные источники в клетке. Полиманнозные нейтральные свободные олигосахариды, возникающие при ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации, характеризуют состояние эндоплазматического ретикула. Появление заряженных олигосахаридов связано с гидролитической функцией лизо-

сом, состояние которых они и отражают. Выявленные в данной работе особенности хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови и их фракций указывают на то, что при истинной полицитемии наибольшие системные изменения наблюдаются в состоянии лизосомного аппарата клеток, нежели в состоянии их эндоплазматического ретикула.

Выводы. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови у пациентов с истинной полицитемией (эритремией).

1. Показано, что ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы пациентов представлены как нейтральными, так и отрицательно заряженными гликанами. Фракция незаряженных полиманнозных гликанов составляет большую часть общего пула и включает почти все его основные пики. Фракция отрицательно заряженных свободных олигосахаридов включает небольшую часть общего спектра и в основном представлена минорными пиками.

2. Основные отличия хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с истинной полицитемией (эритремией) от контрольных спектров плазмы крови относительно здоровых доноров наблюдаются во фракции отрицательно заряженных углеводов и заключаются в появлении характерного пика 9 (7,85 ГЕ) и минорных пиков в начальном отрезке хроматограммы. Фракция незаряженных гликанов характеризует индивидуальные различия между образцами плазмы крови пациентов.

Заключение. Анализ полученных данных показывает, что при истинной полицитемии наблюдаются изменения в хроматографическом спектре фракций свободных олигосахаридов плазмы крови. Уровень этих изменений отражает состояние лизосом и эндоплазматического ретикула клеток большого организма. В лизосомах повышается проницаемость мембран, о чем свидетельствуют изменения во фракции отрицательно заряженных гликанов. Отсутствие существенных изменений спектра во фракции нейтральных олигосахаридов свидетельствует о том, что на данной стадии заболевания эндоплазматический ретикулум клеток пациентов еще сохраняет высокую устойчивость к стрессовым факторам. Разделение общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови на нейтральные и заряженные позволило установить характерные для данного заболевания системные изменения в хроматографических спектрах гликанов.

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

Литература

1. Письменецька, І.Ю. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів/І.Ю.Письменецька// Вісник Київського національного університету. Біологія. – 2012. – Вип. 60. – С. 27–29.
2. Письменецька, І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів /І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс //Ученые записки Таврического националь-

Literatura

1. Pys'menec'ka, I.Ju. Vplyv immobilizaciji ta deprotejinizaciji plazmy krovi na spektr vil'nyx olihosaxarydiv/I. Ju.Pys'menec'ka// Visnyk Kyjivs'koho nacional'noho unyversytetu. Biolohija. – 2012. – Vyp. 60. – S. 27–29.
2. Pys'menec'ka, I.Ju. Vil'ni olihosaxarydy plazmy krovi praktyčno zdorovyx donoriv /I.Ju. Pys'menec'ka, T.D. Batters //Učene zapysky Tavryčeskoho nacyonal'noho unyversyteta ym. V.Y.Vernadskoho. Seryja «Vyolohyja, xumuja». – 2012.

ного университета им. В.И.Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. –Т.25 (64), №1. – С.182–187.

3. 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.

4. Письменецька, І.Ю. Аналіз зарядженої фракції 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), №4. – С.159–165.

5. Письменецкая, И.Ю. Свободные олигосахариды плазмы крови больных истинной полицитемией / И.Ю. Письменецкая // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – Т.1 (41). С.45 – 49.

6. Adamczyk, B. Glycans as cancer biomarkers / B.Adamczyk, T.Tharmalingam, P.M. Rudd //Biochim Biophys Acta. –2012. –Vol.1820, №9. –P.1347–1353.

7. Alonzi, D.S. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi [et al.] // Biochem J. – 2008. – Vol.409, №2. – P.571–580.

8. Anelli, T. Protein quality control in the early secretory pathway / T.Anelli, R. Sitia //The EMBO Journal. –2008. – Vol.27. – P.315–327.

9. Cummings R.D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome/ R.D. Cummings // Molecular BioSystems. –2009. – Vol.5, №10. –P.1087–1104.

10. Gabius, H.J. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives / H.J.Gabius, K.Kayser //Diagn Pathol. –2014. – Vol.9. –P.1–14.

11. Harada, Y. Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation / Y.Harada [et al.] // J Biol Chem. 2013. – Vol. 288, №45. – P.32673 – 32684.

12. Hoseki, J. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation/ J.Hoseki, R.Ushioda, K.Nagata //J. Biochem.– 2010.– Vol.147, №1.– P.19–25.

13. Neville, D.C. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville [et al.] //Anal Biochem.–2004. – V.331. – P.275–282.

14. 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.

15. Olzmann, J.A. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system /J.A.Olzmann [et al.] // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – Vol. 5, № 9. – a013185.

16. Park, J.J. Increasing the α 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer/J.J. Park, M.Lee // Gut Liver. –2013. –Vol.7, №6. –P. 629–641.

17. Peracaula, R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis / R. Peracaula [et al.] // Dis Markers. –2008. –Vol.25, №4–5. –P.207–218.

18. Varki, A. Essentials of Glycobiology / A. Varki (ed.) // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2009. – 784 p.

19. Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester//Glycobiology.–2005.–Vol.15,№6.–P.1R–15R.

–Т.25 (64), №1. – S.182–187.

3. Pys'menec'ka, I.Ju. Prohnozuvannja struktur vil'nyx olihosaxarydiv plazmy krovi praktyčno zdorovyx donoriv / I.Ju. Pys'menec'ka, T.D. Batters // Učenyje zapysky Tavryčeskoho nacyonal'noho unyversyteta ym. V.Y. Vernadskoho. Seryja «Byolohyja, xymyja». – 2012.–Т.25 (64), №3. – S.158–164.

4. Pys'menec'ka, I.Ju. Analiz zarjadženoji frakciji vil'nyx olihosaxarydiv plazmy krovi praktyčno zdorovyx donoriv / I.Ju. Pys'menec'ka, T.D. Batters // Učenyje zapysky Tavryčeskoho nacyonal'noho unyversyteta ym. V.Y. Vernadskoho. Seryja «Byolohyja, xymyja». – 2012.–Т.25 (64), №4. – S.159–165.

5. Pis'meneckaja, I.Ju. Svobodnye oligosaharidy plazmy krovi bol'nyh istinnoj policitemiej / I.Ju. Pis'meneckaja// Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. – 2013. – Т.1 (41). S.45 – 49.

6. Adamczyk, B. Glycans as cancer biomarkers / B.Adamczyk, T.Tharmalingam, P.M. Rudd //Biochim Biophys Acta. –2012. –Vol.1820, №9. –P.1347–1353.

7. Alonzi, D.S. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi [et al.] // Biochem J. – 2008. – Vol.409, №2. – P.571–580.

8. Anelli, T. Protein quality control in the early secretory pathway / T.Anelli, R. Sitia //The EMBO Journal.–2008. – Vol.27. – P.315–327.

9. Cummings R.D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome/ R.D. Cummings // Molecular BioSystems. –2009. – Vol.5, №10. –P.1087–1104.

10. Gabius, H.J. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives / H.J.Gabius, K.Kayser //Diagn Pathol. –2014. – Vol.9. –P.1–14.

11. Harada, Y. Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation / Y.Harada [et al.] // J Biol Chem. 2013. – Vol. 288, №45. – P.32673 – 32684.

12. Hoseki, J. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation/ J.Hoseki, R.Ushioda, K.Nagata //J. Biochem.– 2010.– Vol.147, №1.– P.19–25.

13. Neville, D.C. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville [et al.] //Anal Biochem.–2004. – V.331. – P.275–282.

14. 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.

15. Olzmann, J.A. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system /J.A.Olzmann [et al.] // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – Vol. 5, № 9. – a013185.

16. Park, J.J. Increasing the α 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer/J.J. Park, M.Lee // Gut Liver. –2013. – Vol.7, №6. –P. 629–641.

17. Peracaula, R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis / R. Peracaula [et al.] // Dis Markers. –2008. –Vol.25, №4–5. –P.207–218.

18. Varki, A. Essentials of Glycobiology / A. Varki (ed.) // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2009. – 784 p.

19. Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester// Glycobiology. – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R – 15R.

BLOOD PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES OF PATIENTS WITH POLYCYTHAEMIA VERA (II. PROFILE CHARACTERISTICS OF NEUTRAL AND CHARGED FRACTIONS)

Pismenetskaya I.U.

Educational Establishment "Dnepropetrovsk Medical Academy", Dnepropetrovsk, Ukraine

In this work for the first time the chromatographic spectra of neutral and charged fractions of plasma free oligosaccharides of patients with polycythaemia vera (erythremia) were obtained and compared with those of practically healthy donors. The glycans were analysed with normal phase high-performance liquid chromatography after preliminary separation into fractions of neutral and charged oligosaccharides. The main differences were observed in the fraction of negatively charged carbohydrates in the appearance of a characteristic peak 9 (7.85 GU) and minor peaks in the initial segment of the chromatogram.

Key words: *free oligosaccharides, HPLC-profiles, human blood plasma, polycythaemia vera.*

Адрес для корреспонденции: ip01589@gmail.com

Поступила 05.06.2014