

## АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МИКРОГЕТЕРОГЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНОГО СИАЛИДОЗОМ 1.

Е.Т. ЗАХАРОВА, Л.В. ПУЧКОВА, М.М. ШАВЛОВСКИЙ, М.В. НЕУЙМИНА, Е.Р.  
РУЖДИЙ, В.С. ГАЙЦХОКИ.

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН  
( Санкт-Петербург, Россия)

Методом двумерного иммуноэлектрофореза с помощью специфических поликлональных моновалентных антител произведен анализ молекулярной микрогетерогенности белков острой фазы: орозомукоида, альфа<sub>1</sub>-антитрипсина и церулоплазмينا, циркулирующих в периферической крови здорового донора и больного с наследственным дефектом лизосомальной нейраминидазы (сиалидоз I или синдром вишневой косточки). Специфические отличия, обусловленные дефицитом лизосомальной нейраминидазы, обнаружены в популяции молекул церулоплазмينا, но не альфа<sub>1</sub>-антитрипсина и орозомукоида (альфа<sub>1</sub>-кислый гликопротеин). Обсуждаются молекулярно-генетические основы молекулярной микрогетерогенности некоторых гликопротеинов крови и возможность использования природных моделей для изучения функциональной роли ЦП и путей переноса его после интернализации в клетки негепатоцитарных рядов.

**Ключевые слова:** гликопротеины, сиалидоз I, церулоплазмин, орозомукоид, альфа<sub>1</sub>-антитрипсин

**ВЕДЕНИЕ.** Церулоплазмин ( ЦП; ферро-0<sub>2</sub>-оксиредуктаза, КФ 1.16.3.1 ), медьсодержащий гликопротеин альфа<sub>2</sub>-глобулиновой фракции сыворотки крови позвоночных, относится к большим голубым оксидазам [1]. ЦП впервые был выделен из сыворотки крови человека в 1948 [2], и с этого времени к нему не ослабевает интерес исследователей, так как вскоре было показано, что при тяжелом моногенном наследственном заболевании, передающемся по аутосомно-рецессивному типу (болезнь Вильсона или гепатолентикулярная дегенерация), главной биохимической манифестацией является низкий уровень ЦП в крови [3]. В последние годы в изучении ЦП были достигнуты значительные успехи. Установлена первичная структура полипептидной части ЦП [4], которая полностью совпала с выведенной из последовательности нуклеотидов клонированного и секвенированного кДНК-гена ЦП [5]. Молекула ЦП состоит из единственной полипептидной цепи, содержащей 1046 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу 132 кДа. Углеводная часть в молекуле ЦП составляет примерно 8%, общее количество теоретических мест N-гликозилирования равно пяти, из них только три содержат сложные углеводные цепи [5]. Изучена тонкая структура природного гена ЦП [6]. Показано, что он содержит 19 экзонов, определены их границы. Выделена и охарактеризована ЦП мРНК [7], изучены этапы ко- и посттрансляционной внутриклеточной ковалентной модификации полипептидной цепи [8]. Воспроизведена пространственная организация молекулы ЦП и его активных центров на основе рентгеноструктурных исследований с разрешением 3,1 ангстрем [9]. При значительной полноте знаний о структуре ЦП остается невыясненной его роль в организме млекопитающих.

Во многочисленных исследованиях, посвященных выяснению функции ЦП, однозначно установлено, что ЦП является полифункциональным белком. К главным функциям ЦП принято относить, во-первых, его способность окислять ферри-ионы в ферро-ионы при встраивании их в молекулу трансферрина [10]. У больных с наследственным гемосидерозом в кровотоке циркулирует ЦП, не содержащий С-концевой области молекулы и вследствие этого, не обеспечивающий утилизации ионов железа из клеточных депо. Причиной образования дефектного ЦП являются различные мутации гена ЦП [11,12]. К тому же, строение медьсодержащих центров ЦП, полностью сходных с таковыми у аскорбатоксидазы, дополнительно свидетельствует об оксидазной роли ЦП в плазме крови [10]. Во-вторых, ЦП осуществляет перенос ионов меди к клеткам негепатоцитарных рядов [13]. Существование медьтранспортной функции у ЦП доказаны в опытах *in vivo* [14] и *in vitro* [13], а недавно. И в прямых опытах на модельной системе из пузырьков плазматической мембраны ворсиночных клеток плаценты человека [15]. *In vitro* у ЦП обнаружены также свойства супероксиддисмутазы [16]. В опытах на клеточных культурах продемонстрирована способность ЦП стимулировать развитие кровеносных сосудов [17]. ЦП *in vitro* повышает устойчивость мембраны эритроцитов к лизирующему действию тяжелых металлов [18]. Общеизвестно, что ЦП, вместе с альфа<sub>1</sub>-антитрипсином и орозомукоидом, входит в группу белков острой фазы. Повышение содержания ЦП в крови при воспалении пропорционально увеличению уровня экспрессии гена ЦП [19].

Анализ молекулярной микрогетерогенности ЦП в сыворотке крови здоровых людей, больных раковыми заболеваниями и больных с воспалениями различной этиологии, методом двумерного афинного иммуноэлектрофореза показал, что при воспалениях в крови увеличивается количество молекул ЦП, содержащих углеводные цепи, афинно связывающиеся с лектином из проростков пшеницы. Напротив, при раковых заболеваниях в составе пула молекул ЦП преобладают молекулы ЦП, содержащие легко диссоциируемые в присутствии ЭДТА ионы меди [20]. Эти исследования демонстрируют, что молекулярная микрогетерогенность ЦП в кровотоке отражает физиологический статус организма. Изменения в уровне гликозилирования в составе углеводных цепей известно и для других гликопротеинов. Так, показано, что у альфа-фетопротейна человека уровень гликозилирования зависит от периода эмбрионального развития и изменяется при некоторых врожденных дефектах плода [21,22]. Эти исследования позволяют предположить, что изучение молекулярной микрогетерогенности ЦП у людей с различными, точно установленными генетическими дефектами, связанными с метаболизмом гликопротеинов, могут дать сведения о физиологической роли ЦП и его метаболических путях в организме человека.

Данная работа посвящена сравнительному изучению молекулярной микрогетерогенности трех гликопротеинов плазмы крови, входящих в группу белков острой фазы, у здорового человека и больного сиалидозом I. Цель работы состояла в установлении роли лизосомальной нейраминидазы [КФ 3.2.1.18] в катаболизме углеводных цепей ЦП, альфа I-антитрипсина и орозомукоида.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали сыворотку крови здорового донора и больного Г-ва сиалидозом I, впервые описанного Цветковой и др. [23]; ДЭАЭ-сефадекс А 50, конканавалин А из *Canavalia ensiformis*, лектин из проростков пшеницы, конъюгированный с сефарозой, и агарозу тип V и N-ацетил-D глюкозамин - фирмы Sigma, неорганические соли фирмы Merck. Источником нейраминидазы служила "Вакцина гриппозная", хроматографическая, инактивированная, изготовленная Институтом эпидемиологии и

микробиологии им. Луи Пастера МЗМПРФ. Для иммунизации использовали кроликов породы Шиншила.

Орозомукоид, альфа 1-антитрипсин и ЦП выделены из крови доноров с помощью комплекса хроматографических методов, разработанных в отделе молекулярной генетики НИИЭМ РАМН и описанных ранее [24-26, соответственно].

Кроликов иммунизировали ресуспендированными в полном адьюванде Фройнда зонами полиакриламидного геля, содержащими после электрофореза в нативных условиях высокоочищенные препараты белков.

Для обработки нейраминидазой к 100 мкл сыворотки крови добавляли 2 мл вакцины и 0,2 мл 4,0 М Na-ацетатного буфера, pH 5,5 и инкубировали при 37° С в течение ночи.

Сравнительный анализ углеводных цепей гликопротеинов осуществляли с помощью набора аффинных лектинов. Аликвоты сыворотки крови инкубировали с 1 мг конканавалина А в солевом буфере (0,15 М NaCl, содержащий 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,4). После инкубации при 4°С в течение ночи образовавшийся комплекс подвергали двумерному иммуноэлектрофорезу. Аликвоты сыворотки крови (по 20 мкл) инкубировали с 20 мг сефарозы 6МВ, с которой ковалентно связан лектин из проростков пшеницы (ЛПП) в том же буфере. Инкубацию проводили в течение ночи при 4°С. После окончания связывания смесь центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Супернатант обозначали: фракция (ЛПП). Осадок дважды промывали буфером связывания и инкубировали в этом же буфере с 1 мкг N-ацетилглюкозамин при комнатной температуре в течение часа. Элюат отбирали после центрифугирования смеси при 2000 об/мин в течение 5 мин и обозначали: фракция (ЛПП)+. Каждую фракцию анализировали методом двумерного электрофореза.

Для двумерного электрофореза вначале образцы фракционировали в 1,5% агарозном геле в течение двух часов при 10 V на 1 см пробега в буфере для иммуноэлектрофореза. Разделившиеся белки подвергали иммуноэлектрофорезу в перпендикулярном направлении в 1% агарозном геле, содержащем 100 мкг в мл геля антител к альфа 1 антитрипсину, орозомукоиду и ЦП, соответственно [27]. После электрофореза гели отжимали, высушивали и окрашивали на общий белок.

Содержание ЦП определяли по методу Рэвина [28], альфа 1-антитрипсина - методом ракетного иммуноэлектрофореза [27].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В работе использовали сыворотку больного сиалидозом I, аутосомно-рецессивным моногенным наследственным заболеванием, характеризующимся врожденным дефицитом лизосомальной нейраминидазы [29]. Больной описан в 1987 г., как первый, среди русской популяции [23]. Клинический диагноз подтвержден с помощью биохимических исследований. Было показано, что в лейкоцитах и фибробластах кожи больного практически отсутствует активность сиалидазы, а количество сиалилиполисахаридов в моче повышено. У родителей активность лизосомальной нейраминидазы составляла 50% от уровня активности этого фермента у здоровых людей, что дает основание сделать заключение о гетерозиготном носительстве гена сиалидоза у родителей.

Рутинные исследования (клинический анализ крови, мочи, кислотно-щелочной баланс) не обнаружили отклонения от нормы у больного Г-ва. Холестерин и липопротеиды были повышены (6,23 и 6,38 ммоль/л, соответственно). Содержание ЦП по данным оксидазной активности и уровень альфа1-антитрипсина по данным ракетного иммуноэлектрофореза соответствовали нормальным (38 мг% и 350 мг%, соответственно).

Для изучения были выбраны три гликопротеина плазмы крови, входящие в группу белков острой фазы, синтезирующиеся в гепатоцитах и содержащие в составе углеводных цепей концевые остатки сиаловых кислот:

1. Альфа<sub>1</sub>-антитрипсин, природный ингибитор эластазы, который ковалентно связывается с ней в соотношении 1:1 и, затем, образовавшийся комплекс утилизируется клетками иммунной системы [30];

2. Орозомукоид, белок плазмы крови, функция которого неизвестна. Показано, что орозомукоид связывается с группо-специфическим рецептором для асиаловых гликопротеинов, который локализован на клеточной поверхности гепатоцитов, и через лиганд-рецепторный механизм с помощью трансцитоза переносится из кровотока в желчь [31]. Возможно, что при этом орозомукоид осуществляет перенос определенных веществ из крови в желчь;

3. ЦП, медьтранспортный гликопротеин, который при доставке ионов меди к клеткам негепатоцитарных рядов, связывается с их поверхностью через специфический рецептор [13], интернализуется вместе с рецептором, а затем освобождается в кровоток [32]. После связывания с рецептором и во время пребывания в клетке ЦП теряет ионы меди и модифицируется таким образом, что становится узнаваемым для общего с орозомукоидом рецептора асилогликопротеинов, локализованного на поверхности гепатоцитов [33]. Известно, что нативный ЦП не связывается с поверхностью гепатоцитов [34], а *in vitro* десиалированный ЦП эффективно поглощается ими [33]. В желчи здоровых людей обнаружены две молекулярные формы ЦП, одна из которых соответствует сывороточному ЦП [35,36]. Косвенно эти данные показывают, что во время пребывания ЦП в клетках негепатоцитарных рядов от его углеводных цепей с помощью лизосомальной нейраминидазы отщепляются концевые остатки сиаловых кислот. Асиало-ЦП секретируется в кровоток, а затем поглощается гепатоцитами и трансцитозом выводится в желчь.

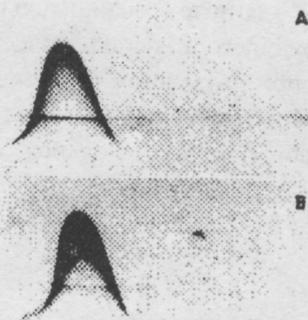


Рисунок 1.

Двумерный иммуноэлектрофорез образцов сыворотки здорового донора (А) и больного сиалидозом I (В) с антителами к альфа<sub>1</sub>-антитрипсину.

Сравнительный анализ альфа<sub>1</sub>-антитрипсина, циркулирующего в периферической крови здорового донора и больного сиалидозом I, методом двумерного иммуноэлектрофореза показал, что в обоих случаях альфа<sub>1</sub>-антитрипсин образует гомогенный иммунопреципитационный пик с четкими границами (рис. 1). Альфа<sub>1</sub>-антитрипсин из сыворотки как здорового донора, так и больного сиалидозом I, одинаково взаимодействовал с конканавалином А и с (ЛПП)-сефарозой (данные не приводятся). Таким образом, как и можно было ожидать, дефицит лизосомальной нейраминидазы не влияет на композитный состав молекулярного пула альфа<sub>1</sub>-антитрипсина в крови.

Орозомукоид из крови обоих пациентов при двумерном иммуноэлектрофорезе (рис. 2) распределяется в виде двух преципитационных пиков, идентичных по антигенным свойствам (лидирующее плечо у отстающего пика в зоне истощения отсутствует). Преимущественным является обгоняющий пик. Обработка нейраминидазой полностью устраняет минорный отстающий пик. Никаких различий в связывании орозомукоида с конканавалином А и (ЛПП)-сефарозой не выявлено (результаты не приводятся). Вместе с тем данные исследования показывают, что в кровотоке как здорового донора, так и больного сиалидозом I, орозомукоид представлен двумя молекулярными формами, отличающимися друг от друга по содержанию остатков сиаловых кислот в углеводных цепях. Преимущественной является десиалированная форма орозомукоида. По-видимому, отщепление сиаловых остатков у орозомукоида осуществляет не клеточная форма нейраминидазы, которая при сиалидозе I не изменяется.

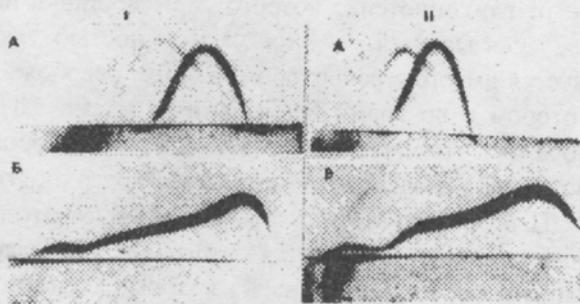


Рисунок 2

Двумерный иммуноэлектрофорез образцов сыворотки здорового донора (I) и больного сиалидозом I (II) с антителами к орозомукоиду.

А-до обработки нейраминидазой. В- после обработки нейраминидазой

На рис. 3 представлены данные сравнительного изучения молекулярной микрогетерогенности ЦП, циркулирующего в периферической крови здорового донора и больного сиалидозом I. Видно, что при двумерном иммуноэлектрофорезе ЦП из сыворотки здорового донора распределяется в виде гомогенного равноплечного пика X (рис. 3, A1), а у больного сиалидозом I обнаруживается дополнительная, обгоняющая преципитационная

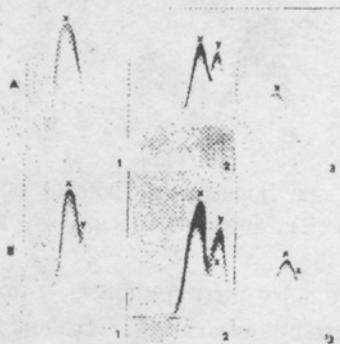


Рисунок 3.

Двумерный иммуноэлектрофорез образцов сыворотки крови здорового донора (A) и больного сиалидозом I (B) с антителами к ЦП.

1. Без обработки; 2. После диализа против буфера, содержащего ЭДТА;  
3 (ЛПП)± фракция ЦП

зона Y (рис. 3, B1) по антигенным свойствам лишь частично идентичная ЦП из пика X (в зоне истощения пика Y видно плечо пика) X. Известно, что апо-ЦП при двумерном иммуноэлектрофорезе в агарозном геле обгоняет холо-ЦП [20]. Данные указывают на увеличение содержания апо-ЦП в кровотоке больного сиалидозом I, что может свидетельствовать о затруднении выведения из кровотока апо-ЦП. При обработке ЭДТА наблюдается пропорциональное для здорового и больного человека нарастание пика Y. Это означает, что нативный ЦП у здорового и больного испытуемых не имеет различий. В то же время, у больного в зоне истощения пика Y в виде плеча пика X четко проявляется пик Z, которого нет у здорового донора (рис. 3, 2 и B2). С конканавалином А ЦП из обеих сывороток реагировал как гомогенный препарат (данные не приводятся). Фракция ЦП-(ЛПП)- при двумерном иммуноэлектрофорезе также не отличалась у здорового донора и больного сиалидозом I (данные не приводятся), но во фракции ЦП-у больного выявляется зона Z, отсутствующая во фракции ЦП-(ЛПП)+ из крови здорового донора (рис. 3, A3 и B3). Данные показывают, что апо-ЦП, циркулирующий в кровотоке больного сиалидозом I, содержит остатки сиаловых кислот. Сходной молекулярной формы ЦП в сыворотке здорового не обнаружено. По-видимому, у больного сиалидозом I, вследствие генетического дефицита лизосомальной нейраминидазы, отщепления остатков сиаловых кислот от интернализированных молекул ЦП не происходит. В результате в кровотоке больного циркулирует, наряду с нативным ЦП, сиало-апоЦП, не поглощаемый печеночным рецептором для асиалогликопротеинов. Полученные результаты указывают на участие лизосомальной нейраминидазы в метаболизме ЦП. Возможно, это является частью механизма, обеспечивающего выведение из организма меди, прочно связанной с ЦП.

Больной Г-в дважды лечился в клинике неврологии НИИЭМ РМН. Несмотря на тяжесть состояния, адекватно подобранная терапия на основе точного диагноза, позволила получить временное улучшение неврологического статуса. Это дает основание надеяться, что дальнейшее изучение разносторонних последствий дефицита лизосомальной нейраминидазы на молекулярном уровне позволит подобрать точно адресованные лекарственные препараты, и приведет к более устойчивому клиническому результату.

Работа поддержана грантом РФФИ 95-04-13179а и грантом № 7 96 ГНТП «Приоритетные направления генетики»

## ЛИТЕРАТУРА

1. Messerschmidt A., Huber R. (1990). *Eur. J. Biochem.* **187**. 341-352.
2. Holmberg C.G., Laurell C.B. (1948). *Acta Chem. Scand.* **2**. 550-556.
3. Owen O.H.A. (1981). in: *Wilson's Disease: The Etiology, Clinical Aspects, and Treatment of Inherited Copper Toxicosis*. N.Y.: Royes.
4. Takahashi N., Ortel T.L. and Putnam E.W. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**. 390-394.
5. Koschinsky M.L., Funk W.D., Van Oost B.A., McGillivray R.T. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**. 5086-5090.
6. Daimon M., Yamatani K., Igarashi M., Fukase N., Rawanami T., Kato T., Tominaga M., and Sasaki H. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**. 1028-1035.
7. Gaitskhoki V.S., L'vov V.M., Puchkova L.V., Schwartzman A.L., Neifakh S.A. (1981). *Mol. Cell. Biochem.* **35**. 171-182.
8. Puchkova L.V., Gaitskhoki V.S., L'vov V.M., Monakhov N.K., Schwartzman A.L., Timchenko L.T., Vakharlovski V.G., Neifakh S.A. (1984). Intracellular stages in biosynthesis and maturation of ceruloplasmin in: *Macromolekular [??] in Function Cell. M., Nauka*, 209-227.
9. Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. (1996). *IBIC.* **1**. 15-23.
10. Frieden E. (1980). in: *Biological Roles of Copper*. Ciba Found. Symp. 79. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-New York. **81**. 93-124
11. Yoshida K., Furihata K., Takeda S. *Nature Genet.*, (1995). **9**. 267-271.
12. Harris Z.L., Takahashi Y., Miyajajima H., Serizawa M., McGillivaray R.T.A., Gitlin J.D. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**. 2539-2543.
13. Harris E.D. (1991). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196**. 130-140.
14. Linder M.C., Moor J.R. (1997). *Biochim. Biophys. Acta.* **499**. 329-336.
15. Hilton M., Spenser D.C., Ross P., Ramsey A., McArdle H.J. (1995). *Biochim. Biophys. Acta.* **1245**. 153-160.
16. Ptovnka A., Metodiewa D., Zgirski A. et al. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**. 978-984.
17. Mather J.P. (1980). *In Vitro.* **18**. 990-996.
18. Barnes G., Frieden E. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**. 157-162.
19. Fleming R.E., Whitman I.P., Gitlin J.D. (1991). *Am. J. Physiol.* **260**. L68-L74.
20. Hansen J.-E.S., Hugard P.M.H., Jensen S.P., Norgafrd-Pedersen B., and Boghansen T.C. (1988). *Electrophoresis.* **9**. 273-278.
21. Smith C.J., Kelleher P.C., Belanger L., Dallaire L. (1979). *British Med. J.* **1**. 920-921.
22. Ruoslahti E., Engvall E., Pekkola ...?, Seppala M. (1978). *Int. J. Cancer.* **22**. 515-520.
23. Tsvetkova I.V., Petushkova N.A., Zolotukhina T.V., Kucharenko V.I., Rosenfeld E.L. (1987). *Inher. Metab. Dis.* **10**. 18-23.
24. Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Шавловский М.М. (1983). *Биохимия.* **48**. 1709-1720.
25. Гембицкая Т.Е., Монахов Н.К., Игнатъев В.А., Алейникова Т.Д., Шавловский М.М. (1989). *Терап. Архив.* **61**. 88-90.
26. Быстрова Н.К., Беленький Д.М. (1985). *Лаб. дело.* 209-210
27. Laurell C.B. (1966) *Analyt. Biochem.* **15**. 42-52.

28. *Ravin H.A.* (1956) *Lancet*. **207**. 726-727.
29. *McKusick V.A.* (1987). *Mendelian Inheritance in Man*. Baltimore.
30. *Kueppers F.* (1975). In: *Humangenetik, ein kurzes Handbuch*. 1/3, Thieme, Stuttgart, 35-49
31. *Mullock B.M., Minton R.H.* *Trends Biochem. Sci.* (1981). **6**. 188-191.
32. *Пучкова Л.В., Сасина Л.К., Алейникова Т.Д., Гайцхоки В.С.* (1995). *Бюлл. exper. биол. мед.* **117**. 417-420.
33. *Gregoriadis G., Morell A.G., Sternlieb I., Scheinberg I.H.* (1970). *J. Biol. Chem.* **245**. 5833-5837.
34. *Kataoka M., Tavassoli M.* (1984). *Exper. Cell Res.* **155**. 232-240.
35. *Iyengar V., Brewer G.J., Dick R.D., Owyang C.* (1988). *J. Lab. Med.* **111**. 267-274.
36. *Verbina I.A., Puchkova L.V., Gaitskhoki V.S., Neifakh S.A.* (1992). *FEBS Letters*. **298**. 105-108.

#### ANALYSIS OF MOLECULAR MICROHETEROGENEITY OF THE GLYCOPROTEINS FROM PLASMA OF A PATIENT WITH SYALIDOSIS .

E.T. ZAKHAROVA, L.V. PUCHKOVA, M.M. SHAVLOVSKY, M.V. NEUIMINA,  
E.P. RUJDI, V.S. GAITSKHOKI

Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, Russia

Using specific polyclonal monovalent antibodies, the molecular microheterogeneity of acute phase proteins: orosomucoid, alpha<sub>1</sub>-antitrypsin and ceruloplasmin, circulating in peripheral blood of a healthy donor and a patient with a hereditary deficiency of lysosomal neuraminidase (syalidosis I or the cherry stone syndrome), was analyzed by use of 2D electrophoresis. The specific distinctions due to a deficiency [caused by a deficiency] of lysosomal neuraminidase were revealed in the population of ceruloplasmin molecules, but not in the molecules of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin and orosomucoid (alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein). The molecular genetic bases of molecular microheterogeneity of some plasma glycoproteins and the possible use of natural models in studies of GP's functional role and the pathways of its transfer after internalization into non-hepatocytic (?) cells are discussed.

**Key words:** glycoproteins, sialidosis I, ceruloplasmin, acid alpha<sub>1</sub>-glycoprotein, alpha<sub>1</sub>-antitrypsin.