

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 577.125

ЦЕРАМИДЫ И ГАНГЛИОЗИДЫ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Г.О.АНДРЕАСЯН, Я.Н.МАЛЫХ, Э.В.ДЯТЛОВИЦКАЯ

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва
Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

Изучен состав и содержание церамидов и ганглиозидов в разных типах доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолей яичника человека. Показано, что в опухолях, особенно в злокачественных, существенно уменьшается содержание церамидов по сравнению с нормальной тканью. А в самих церамидах изменяется состав сфингозиновых оснований (наряду со сфингенином, характерным для церамидов нормальной ткани яичника, обнаружен сфинганин) и жирных кислот. Установлено, что основными ганглиозидами опухолей являются GM3 и GD3, их содержание в злокачественных опухолях уменьшается, особенно количество ганглиозида CD3. В результате изменений в количестве церамидов и ганглиозидов понижается молярное отношение Cer/Sia, что, видимо, может способствовать развитию опухоли.

Сфинголипиды — обязательные компоненты всех эукариотических клеток. Многолетними исследованиями установлено, что они участвуют в рецепции гормонов, токсинов, факторов роста, в регуляции роста и дифференцировки клеток, являются иммуномодуляторами и вторичными мессенджерами [см. обзоры 1-6]. При малигнизации клетки нарушается биосинтез и катаболизм сфинголипидов, особенно гликосфинголипидов, в результате чего изменяется их содержание и состав [2, 7, 8]. Ранее было установлено, что ганглиозиды (гликосфинголипиды, содержащие остатки сиаловых кислот) являются иммуносупрессорами и, понижая противоопухолевый иммунитет организма, способствуют развитию опухолевого процесса [7]. Однако в последние годы найдено, что такие сфинголипиды как церамиды (ацилсфингозины) наоборот, обладают антипролиферативной активностью и способствуют клеточной дифференцировке [9-12], на основании чего была высказана гипотеза, что они являются супрессорами опухолевого роста [5]. Было показано в опытах *in vivo*, что экзогенное введение церамидов препятствует развитию перевиваемых опухолей у мышей [13].

Все эти данные дают основание для предположения, что в организме существует определенное равновесие между двумя типами сфинголипидов — церамидами и ганглиозидами, оказывающими противоположное влияние на развитие опухоли. Сдвиг равновесия в сторону ганглиозидов может стимулировать опухолевый рост.

К настоящему времени о ганглиозидах опухолей в литературе имеются весьма обширные данные, в то время как о церамидах опухолей сведения практически отсутствуют. Для того чтобы выяснить, какие изменения в этих сфинголипидах происходят при опухолевом росте, в настоящей работе изучены содержание и состав церамидов и ганглиозидов в различных типах доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолей яичника человека,

Методика. Для исследования использовали ткани (1-4 г) злокачественных и доброкачественных эпителиальных (серозных, муцинозных, эндометриоидных) опухолей яичника человека, извлеченных при операции, а также нормального яичника женщин, погибших от несчастных случаев. Все образцы хранили при -70°C .

Липиды выделяли из тканей шестикратной экстракцией смесью $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2:1) и (1:2), после чего ганглиозиды извлекали из липидного экстракта многократной промывкой водой по методу Фолча и др. [14]. Объединенный водно-метанольный раствор упаривали досуха при 40°C в роторном испарителе. К полученному после упаривания остатку добавляли 50-100 мкл 0,2 М раствора NaOH в CH_3OH . Реакционную смесь выдерживали при 20°C в течение суток, после чего ее нейтрализовали 0,35 М AcOH в CH_3OH , упаривали, растворяли в смеси $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2:1) и определяли количество ганглиозидов в виде липидносвязанных сиаловых кислот (Sia) [15].

Разделение и идентификацию ганглиозидных фракций проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных НРТС-пластинках фирмы "Merck" (Германия) в системе $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (60:40:9), содержащей 0,02% CaCl_2 . Разделенные компоненты обнаруживали резорциновым реагентом [16]. Для сравнения использовали ганглиозиды мозга. Относительное содержание ганглиозидов определяли денситометрированием на сканиметре CS-920 (Shimadzu, Япония). Ферментолитиз ганглиозидов (5-10 нмоль) нейраминидазой из *Vibrio cholerae* (Serva) проводили при 37°C в течение 24 ч по методу [17], используя 5 мкл (10/мл) фермента. Полученные асиалопроизводные анализировали на НРТС-пластинках в указанной выше системе. Для их обнаружения использовали антроновый [18] и резорциновый реагенты.

Количественное содержание церамидов, присутствующих в органической фазе после удаления ганглиозидов водой из липидного экстракта, определяли после их хроматографирования на НРТС-пластинках денситометрированием как указано ранее [19]. Для сравнения использовали церамиды фирмы "Serva".

Для анализа жирных кислот и сфингозиновых оснований церамидов основную часть липидов, присутствующих в органической фазе, подвергали метанолизу (для расщепления глицеролипидов) 0,2 М раствором NaOH в CH_3OH при 20°C в течение суток, затем нейтрализовали 0,35 М AcOH в CH_3OH , церамиды очищали с помощью ТСХ на пластинках, покрытых тонким слоем силикагеля КСК (150-200 меш), как указано ранее [19]. Выделенные церамиды подвергали расщеплению при 80°C в течение 18 ч в присутствии 0,5 мл смеси $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ -конц. HCl (82:9,4:8,6), к охлажденной реакционной смеси добавляли 0,5 мл воды и экстрагировали гексаном (3 x 1 мл) для извлечения жирных кислот, а затем после подщелачивания водного слоя 1 М NaOH до pH II сфингозиновые основания экстрагировали эфиром (2 x 2 мл).

Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили в хроматографе Хром-5 (Чехословакия) на колонке (2500 x 3 мм) с 10% silar 10С на хромосорбе W-HP (100°-120 меш) при программировании температуры от 160° до 240° со скоростью 4° в 1 мин и скоростью газа-носителя (гелий) 40 мл/мин, а также на колонке (2500 x 3 мм) с 3% OV-1 на хромосорбе W=HP (80-100 меш) при программировании температуры 160° до 300° со скоростью 4° в 1 мин и скоростью газа-носителя 40 мл/мин. Сфингозиновые основания анализировали в виде триметилсилильных производных в том же хроматографе на колонке с 3% OV-1 (см. выше) при 230° . Белок определяли по методу Лоури и др. [20].

Результаты и обсуждение. Ганглиозиды. Как видно из табл. 1, как доброкачественные, так и злокачественные опухоли отличаются от нормальной ткани яичника уменьшением содержания ганглиозидов (общих липидносвязанных сиаловых кислот, Sia), причем в раковых опухолях количество Sia почти в 2 раза меньше, чем в норме. Разные типы доб-

рокачественных опухолей (серозные и муцинозные кистомы) по количеству ганглиозидов не отличаются друг от друга, близки между собой по абсолютному содержанию липидносвязанных сиаловых кислот и различные типы злокачественных опухолей,

По данным ТСХ во всех изученных опухолях яичника, как и в нормальной ткани, главными ганглиозидами являются сиалозиллактозилцерамид (GM3) и дисиалозиллактозилцерамид (GD3). Они составляют около 90% от суммы липидносвязанных сиаловых кислот. Кроме того, обнаружены ганглиозидные компоненты, подобные по хроматографической подвижности GM1, GD1a и GT1b. Для более точной их идентификации смеси ганглиозидов, выделенные из всех типов опухолей, были обработаны нейраминидазой из *Vibrio cholerae*. Последующая ТСХ показала, что основные ганглиозиды расщепились и в качестве единственного асиалопроизводного был идентифицирован лактозилцерамид. Единственным ганглиозидным компонентом оставался GM1, который не способен десилироваться этим ферментом, но в который превращаются более сложные ганглиозиды GD1a и GT1b. Полученные результаты совпадают с известными данными о составе ганглиозидов опухолей яичника человека [21].

Существенные различия между разными типами опухолей обнаружены при сравнении молярного отношения GM3/GD3. Как видно из табл.1, в некоторых злокачественных (муцинозных, эндометриодных) это отношение приблизительно в два раза выше, чем в норме, в то время как в серозных оно незначительно превышает норму. В кистах отношение GM3/GD3 зависит от типа опухоли: в серозных оно в 2 раза ниже, а в муцинозных в 1,5 раза выше, чем в норме (табл. 1). Конечно, в каждом типе опухолей колебания между образцами довольно значительны, о чем свидетельствуют величины среднего отклонения. Однако тенденция изменения величины молярного отношения GM3/GD3 в опухолях по сравнению с нормой достаточно определена: в большинстве злокачественных опухолей это отношение значительно выше, чем в нормальной ткани. Поскольку абсолютное содержание липидносвязанных сиаловых кислот в раковых опухолях намного ниже, чем в норме, а отношение GM3/GD3 выше, можно предположить, что в них нарушается биосинтез этих ганглиозидов и преимущественно синтезируется GM3, содержащий в молекуле один остаток сиаловой кислоты, (в молекулу GD3 входит два остатка сиаловой кислоты). Видимо, это является одной из причин изменения указанных параметров. Однако существует и другая возможная причина. Известно, что клетки злокачественных опухолей обладают свойством "сбрасывать" (шеддинг) со своей поверхности в окружающую среду мембранные фрагменты или молекулы, в том числе ганглиозиды (см. обзор [8] и цитируемую там литературу, а также [22-24]). Для злокачественной опухоли яичника это явление было отмечено ранее [21] и ганглиозид GD3 был обнаружен в крови пациентов с раком яичника [25]. По всей вероятности, изменение абсолютного содержания липидносвязанных сиаловых кислот и молярного отношения GM3/GD3 в опухолях по сравнению с нормальной тканью яичника человека обусловлено и нарушением биосинтеза ганглиозидов, и shedding их с поверхности опухолевой клетки.

Таблица 1

Содержание липидносвязанных сиаловых кислот и молярное отношение GM3/GD3 в доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолях яичника человека (приведены средние значения)

Ткань	Содержание (мкг/мг белка)	Молярное отношение GM3/GD3
Нормальный яичник (10)	1,9±0,4	3,2±0,9
Доброкачественные опухоли (кистомы):		
серозная (7)	1,3±0,4	1,6±0,5
муцинозная (5)	1,4±0,2	4,9±0,9
Злокачественные опухоли:		
серозная (6)	1,0±0,2	3,9±0,9
муцинозная (3)	1,0±0,1	6,2±0,9
эндометриодная (2)	1,1±0,1	6,9±1,2

Примечание: В скобках указано количество образцов

Таблица 2

Содержание церамидов и молярное отношение Cer/Sia в доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолях яичника человека (приведены средние значения)

Ткань	Содержание (мкг/мг белка)	Молярное отношение Cer/Sia
Нормальный яичник (10)	5,3±0,8	1,8±0,2
Доброкачественные опухоли (кистомы):		
серозная (7)	2,1±0,5	1,0±0,4
муцинозная (5)	2,8±0,8	1,0±0,3
Злокачественные опухоли:		
серозная (6)	1,5±0,3	0,9±0,3
муцинозная (3)	2,3±0,2	1,1±0,2
эндометриодная (2)	2,8±0,1	1,3±0,1

См. Примечание к табл. 1

Церамиды. Как видно из табл. 2, в опухолях по сравнению с нормальной тканью количество церамидов понижается. Правда, следует отметить, что внутри каждой группы опухолей содержание сильно варьируется, что видно из средних отклонений, но общая тенденция несомненно указывает на значительное уменьшение их количества в опухолях по сравнению с нормой. При этом следует отметить, что в серозных опухолях содержание церамидов меньше, чем в муцинозных.

Во всех изученных опухолях уменьшается молярное отношение Cer/Sia по сравнению с нормой. Хотя разброс значений довольно велик и в случае нормальной ткани, и в случае опухолей, однако общая тенденция четко указывает на то, что в опухолевых клетках это отношение сдвигается в сторону ганглиозидов. В этом смысле практически не обнаружены различия между доброкачественными и злокачественными опухолями.

Анализ жирных кислот и сфингозиновых оснований церамидов показал, что имеются существенные различия между опухолями и нормальной тканью. Как видно из табл.3, единственным сфингозиновым основанием церамида нормального яичника является сфингенин.

Таблица 3

Состав сфингозиновых церамидов опухолей яичника человека (в %)

Ткань	Основания	
	сфингенин	сфинганин
Нормы	100	—
Кистомы:		
серозная (1)	97,8	2,2
муцинозная (2)	96,0±0,2	4,0±0,25
Раковые опухоли:		
серозная (3)	33,0±9,7	67,0±10,0
муцинозная (1)	72,4	27,6
эндометриодная (2)	87,7±6,1	12,3±7,8

Во всех типах кистом наряду со сфингенином появляется его дигидропроизводное — сфинганин. Во всех злокачественных опухолях сфинганин присутствует в значительных количествах (в серозных опухолях его содержание достигает почти 70% от суммы сфингозинов). В доброкачественных опухолях по сравнению с нормой, как правило, увеличивается содержание 16:0 — кислоты (пальмитиновой), уменьшается 18:1 (олеиновой) и появляется небольшое количество кислот, содержащих более 22 С-атомов в цепи. В злокачественных серозных и муцинозных опухолях, наоборот, количество 16:0-кислоты уменьшается по сравнению с нормой. Что касается церамидов эндометриодного рака, то в них почти отсутствуют кислоты, содержащие 18 С-атомов в цепи и

появляется большое количество (почти 75%) кислот с 22 и 24 С-атомами в цепи. Приведенные данные свидетельствуют, что изменения жирнокислотного состава церамидов в доброкачественных и злокачественных опухолях происходят в разных направлениях и зависят от клеточного типа опухолей.

Учитывая значительные изменения жирнокислотного состава церамидов опухолей по сравнению с таковым нормального яичника, может возникнуть сомнение, не обусловлено ли снижение значений абсолютного содержания церамидов использованием для их окрашивания фосфорномолибденовой кислоты, поскольку в некоторой степени окраска зависит от структуры кислоты. Для проверки этого предположения мы определили оптическое поглощение двух коммерческих препаратов церамидов фирмы "Serva", отличавшихся друг от друга составом жирных кислот. Один из них содержал около 75% кислот с 22 и 24 С-атомами в цепи, во втором эти кислоты составляли около 40% от общей суммы. Также были обследованы сфингозиновые основания (в одном из них наряду со сфингенином присутствовало около 10% сфинганина, в другом их отношение составляло 1,5). Несмотря на указанные различия, величины оптического поглощения при денситометрировании были практически одинаковы. Это свидетельствует о том, что обнаруженное уменьшение количества церамидов в опухолях по сравнению с нормальной тканью не является артефактом, а, видимо, обусловлено изменением их метаболизма.

Как уже отмечалось выше, ганглиозиды способны оказывать иммуносупрессорный эффект и вследствие этого ингибируют противоопухолевый иммунитет организма [8]. Церамиды, напротив, обладают антипролиферативной активностью и стимулируют клеточную дифференцировку [9, 10, 11, 12] и, как полагают, являются супрессорами опухолевого роста [5]. Обнаруженное в нашем исследовании уменьшение абсолютного содержания ганглиозидов и церамидов в опухолях по сравнению с нормой несомненно может оказать влияние на возможность развития опухоли. Уменьшение молярного отношения Cer/Sia в опухолях по сравнению с нормальной тканью свидетельствует о том, что содержание церамидов падает в большей степени, чем содержание ганглиозидов, т.е. отношение сдвигается в сторону ганглиозидов.

Несколько странным выглядит одно обстоятельство: в доброкачественных и злокачественных опухолях значения отношения Cer/Sia очень близки, хотя способность раковых клеток к пролиферации намного превышает таковую у клеток доброкачественных опухолей. Однако известно, что антипролиферативная активность церамидов и их способность вызывать апоптоз (смерть клеток) зависит от структуры сфингозинового основания [9, 26] и что церамиды, содержащие дигидросфингозин (сфинганин), не способны ингибировать клеточный рост [9] и вызывать фрагментацию ДНК, приводящую к апоптозу [26]. Поскольку нами было установлено, что в церамидах злокачественных опухолей присутствует значительно большее количество сфинганина, чем в церамидах кистом, можно предположить, что их антипролиферативная активность и способность к апоптозу существенно меньше, чем таковые у церамидов доброкачественных опухолей. Таким образом, нами впервые установлено, что в доброкачественных и злокачественных опухолях яичника человека по сравнению с нормальной тканью уменьшается содержание церамидов и молярное отношение Cer/Sia, причем в церамидах злокачественных опухолей, появляется значительное количество сфинганина, отсутствующего в церамидах нормальной ткани, что может, видимо, способствовать развитию опухолевого процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Curratolo M. // Biochim. et biophys. acta. — 1987. — Vol. 906. — P. 137-160.
2. Hakomori S. // Ann. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 50. — P. 733-764.
3. Hakomori S. // Trends Biochem. Sci. — 1984. — Vol. 9. — P. 453-455.
4. Hannun Y.A., Bell R.M. // Science. — 1989. — Vol. 243. — P. 500-507.
5. Hannun Y.A. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 3125-3128.
6. Kolesnick R. // Trends Cell Biol. — 1992. — Vol. 2. — P. 232-236.
7. Дятловская Э.В. // Биохимия. — 1995. — Т. 60. — С. 843-850.
8. Dyatlovitskaya E.V., Bergelgon L.D. // Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 907. — P. 125-143.
9. Bielamska A., Crane H.M., Liotta D., Obaid L.M., Hannun Y.A. // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 26226-26232.
10. Borchardt R.A., Lee M.T., Kalen A., Buckley R.H., Peters C., Schiff S., Bell R.M. // Biochim. et biophys. acta. — 1994. — Vol. 1212. — P. 327-336.
11. Merrill A.H. // Nutrition Rev. — 1992. — Vol. 50. — P. 78-80.

12. Wakita H., Tokura Y., Yagi H., Nishimura K., Furukama F., Takigama M. // Arch. Dermatol. Res. — 1994. — Vol. 286. — P. 350-354.
13. Maru M., Haraguchi M., Higashi H., Kato S., Kurimura T., Naiki M., Wakamiya N. // Int. J. Cancer. — 1993. — Vol. 53. — P. 645-650.
14. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497-508.
15. Дятловицкая Э.В., Заблоцкая А.Е., Волгин Ю.В., Азизов Ю.М., Бергельсон Л.Д. // Биохимия. — 1979. — Т. 44. — С. 1623-1629.
16. Svennerholm L. // Meth. Enzymol. — 1963. — Vol. 6. — P. 459-462.
17. Dyatlovitskaya E.V., Zablotskaya A.E., Azizov Yu.M., Bergelson L.D. // Europ. J. Biochem. — 1980. — Vol. 110. — P. 475-483.
18. Van Gent C.H., Roseleur O.J., van der Bijl P. // J. Chromatog. — 1973. — Vol. 85. — P. 174-176.
19. Дятловицкая Э.В., Андреасян Г.О., Мальх Я.Н. // Биохимия. — 1995. — Т. 60. — С. 1302-1306.
20. Lomry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
21. Новиков А.М., Махова Е.Е., Травников М.Е., Бассалык Л.С. // Экспер. онкология. — 1989. — Т. 11, N 3. — С. 52-55.
22. Ladisch S., Becker H., Ulsh L. // Biochim. et biophys. acta. — 1992. — Vol. 1125. — P. 180-188.
23. Li R., Ladisch S. // Biochim. et biophys. acta. — 1991. — Vol. 1083. — P. 57-64.
24. Portoukalian J., David M.-J., Gain P., Richard M. // Int. J. Cancer. — 1993. — Vol. 53. — P. 948-951.
25. Дятловицкая Э.В., Сомова О.Г., Новиков А.М., Сорокин Е.Н., Бассалык Л.С., Бергельсон Л.Д. // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — С. 1933-1935.
26. Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A. // Science. — 1993. — Vol. 259. — P. 1769-1771.

CERAMIDES AND GANGLIOSIDES FROM BENIGN AND MALIGNANT TUMOURS OF HUMAN OVARY

G.O.Andreasyan, Ya.N.Malykh, E.V.Dyatlovskaya, M.M. Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov

Institute of Biorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Academy of Advanced Medical Studies, Moscow

Composition and content of ceramides and gangliosides from different kinds of human ovary benign and malignant epithelial tumours were studied. The ceramide content was shown to decrease significantly in the tumours, especially in malignant tumours, in comparison with the normal ovary tissue. In the tumour ceramides a sphingosine base composition changes: sphinganine was found along with sphingenine, which is characteristic for normal ceramides. The fatty acid composition changes also. Main tumour gangliosides were shown to be GM3 and GD3. Their content decreases in malignant ovary tumours, especially the amount of ganglioside GD3. As a result of these changes the molar ratio Cer/Sia decreases. It can appears stimulates a tumour growth.