

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 577.125

ГАНГЛИОЗИДЫ И ЦЕРАМИДЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКА

О.Г.СОМОВА, Г.О.АНДРЕАСЯН, Э.В.ДЯТЛОВИЦКАЯ

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

Изучены содержание церамидов и ганглиозидов и состав ганглиозидов в сыворотке крови пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями яичника и здоровых доноров. Содержание церамидов в сыворотке крови опухолевых пациентов (доброкачественных и злокачественных) аналогично контролю. Содержание липидносвязанных сиаловых кислот (ганглиозидов) отличалось: оно определенно увеличивалось у всех опухолевых пациентов, особенно со злокачественными опухолями, по сравнению с контролем. Молярное отношение церамиды/липидносвязанные сиаловые кислоты уменьшалось в сыворотке крови опухолевых пациентов по сравнению с контролем, но было одинаковым для пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями. Молярное отношение GM3/GD3 также значительно уменьшалось, особенно в сыворотке крови пациентов со злокачественными опухолями. Эти результаты показали, что в сыворотке крови пациентов с опухолями яичников содержание и состав ганглиозидов изменяются в большей степени, чем таковые церамидов.

Ключевые слова: сфинголипиды, ганглиозиды, церамиды, сыворотка крови.

Введение. Известно, что при наличии в организме человека или животного злокачественной опухоли в сыворотке крови значительно увеличивается количество ганглиозидов (сиалогликофинголипидов), поскольку опухолевые клетки обладают свойством "сбрасывания" (шеддинг) со своей поверхности в окружающую среду и в кровотоки мембранных фрагментов, в том числе ганглиозидов (см. обзор [1], а также [2, 3, 4]). О содержании церамидов (ацилсфингозинов) в сыворотке крови опухоленосителей данные отсутствуют. Между тем показано, что ганглиозиды и церамиды могут оказывать противоположный эффект на развитие опухолей. Установлено, что ганглиозиды ингибируют противоопухолевый иммунитет (угнетают цитотоксическую активность естественных киллеров и бласттрансформацию Т- и В-лимфоцитов, блокируют секрецию интерлейкина-1 моноцитами (см. обзор [5] и цитир. там литературу). Церамиды, напротив, являются супрессорами опухолевого роста, поскольку они участвуют в регуляции апоптоза клеток [6, 7, 8], в том числе Т-лимфоцитов [9] и обладают антипролиферативной активностью [10]. Поэтому изменение содержания как ганглиозидов, так и церамидов в сыворотке крови может повлиять на противоопухолевый иммунитет организма.

Ранее нами было показано, что в доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолях яичника человека уменьшается содержание церамидов и ганглиозидов по сравнению с гомологичной нормальной тканью [11]. Не исключено, что одной из причин этого уменьшения является "сбрасывание" этих сфинголипидов с поверхности опухолевых клеток в окружающую среду и кровотоки. Поэтому в настоящей работе проведено сравнительное исследование состава и содержания

ганглиозидов и керамидов сыворотки крови пациентов с опухолями яичника и здоровых доноров.

Методика. Для исследования использовали кровь пациентов с доброкачественными (кистомами) и злокачественными эпителиальными (серозными, муцинозными) опухолями яичников человека, а также кровь здоровых женщин. Образцы крови, взятые натощак, хранили при -70°C .

Липиды выделяли из сыворотки крови следующим образом: к 2-3 мл сыворотки добавляли 15 мл смеси хлороформ-метанол (1:2), встряхивали 5 мин и центрифугировали при 800 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отделяли, а осадок экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1) (2 x 15 мл) и (1:2) (5 x 15 мл) до полного извлечения ганглиозидов. Контроль проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Объединенные экстракты упаривали досуха, остаток растворяли в 15 мл смеси хлороформ-метанол (2:1) и встряхивали с 3 мл воды в течение 5 мин, нижний (органический) слой отделяли, упаривали досуха и операцию повторяли до полного перехода ганглиозидов из органической фазы в водную. После упаривания объединенного водного экстракта остаток, содержащий ганглиозиды, растворяли в 0,3 мл воды. Очистку ганглиозидов от нелипидных примесей проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (1,1 x 9 см). Собирали две фракции водного элюата: 5 мл (фракция 1) и 2 мл (фракция 2). Элюаты упаривали в ротормном испарителе и каждый остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-метанол (2:1).

Для определения абсолютного содержания ганглиозидов 3 мкл раствора наносили на НРТLC-пластинку (фирма "Merck") (5 x 5 см), хроматографировали в системе хлороформ-метанол-вода (60:40:9), содержащей 0,02% CaCl_2 , обрызгивали резорциновым реагентом [12], плотно накрывали покровным стеклом и нагревали при 110°C в течение 15 мин, после чего денситометрировали на сканиметре Cs-920 (Shimadzu, Япония). В качестве внутреннего стандарта использовали 1 нмоль ганглиозида GM1. Результаты, полученные для 1-ой и 2-ой фракций каждого образца, суммировали. Для определения относительного содержания индивидуальных ганглиозидов в сыворотке крови 3 мкл полученного раствора хроматографировали на пластинке (10 x 10 см) как указано выше. В качестве веществ-свидетелей использовали ганглиозиды мозга.

Ферментализ ганглиозидов проводили с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae* (фирма "Serva") при 37°C в течение 24 ч как указано ранее [13].

Церамиды, оставшиеся в органической фазе (после удаления из нее ганглиозидов), очищали от других липидов как указано в [13]. Количественное определение керамидов проводили как описано прежде [13] путем хроматографирования на НРТLC-пластинках (10 x 10 см), обнаружения раствором фосфорномолибденовой кислоты и денситометрирования на сканиметре CS-920.

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, содержание керамидов в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями яичников мало отличаются друг от друга. Большой разброс значения свидетельствует о том, что, видимо, содержание керамидов в крови человека зависит от состояния организма, но наличие опухоли мало влияет на этот параметр. Следует отметить, что возраст здоровых доноров также не оказывает влияния на количество керамидов в сыворотке крови (не показано), хотя их содержание в ткани яичника зависит от возраста [13].

Таблица 1

Содержание церамидов и ганглиозидов в сыворотке крови пациентов с опухолями яичников и здоровых доноров

Источник	Cer, мкг/мл	Sia, мкг/мл	Молярное отношение Cer-Sia
Доноры (12)	37,8±9,9	3,1±0,8	6,7±1,4
Пациенты с кистами (18)	28,9±9,8	4,6±0,7	3,4±1,2
Пациенты с раковыми опухолями (12)	33,8±6,2	5,1±1,2	3,5±1,4

Примечание: Цифры в скобках указывают на количество образцов

Содержание ганглиозидов (липидносвязанных сиаловых кислот, Sia) в сыворотке крови опухоленосителей возрастает по сравнению с таковым здоровых доноров (табл. 1), что совпадает с литературными данными (см. обзор [1] и цитир. там литературу). Следует отметить, что хотя в сыворотке пациентов со злокачественными опухолями количество ганглиозидов больше, чем у пациентов с доброкачественными опухолями, однако это различие не очень велико. По-видимому, известный факт шеддинга ганглиозидов с поверхности опухолевых клеток происходит не только в злокачественных, но и в доброкачественных опухолях яичников человека. Эти данные отличаются от обнаруженного ранее увеличения содержания липидносвязанных сиаловых кислот в сыворотке крови пациентов со злокачественными опухолями мозга, но не с доброкачественными [14]. Видимо, в случае доброкачественных опухолей шеддинг ганглиозидов зависит от структуры опухоли.

Результатом увеличения содержания ганглиозидов в сыворотке крови опухоленосителей является понижение молярного отношения церамиды/ганглиозиды (Cer/Sia) по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1).

Таблица 2

Относительное содержание ганглиозидов в сыворотке крови опухоленосителей и здоровых доноров

Источник	Содержание, %		Молярные отношения		
	GM3	GD3	GM3/GD3	Cer/GM3	Cer/GD3
Доноры (12)	83,0±3,8	6,2±1,4	26,6±4,9	7,8±1,9	223,3±22,0
Пациенты с кистами (18)	90,0±4,3	14,6±3,9	13,0±5,4	4,2±0,6	46,4±12,5
Пациенты с раковыми опухолями (12)	76,0±2,7	19,8±3,2	7,9±1,4	4,6±0,9	35,3±5,6

См. примечание к табл. 1.

Различий в этом отношении у пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями яичника практически не обнаружено.

С помощью тонкослойной хроматографии ганглиозидов было обнаружено, что основным ганглиозидом сыворотки крови как в норме, так и при патологии является сиалозиллактозилцерамид (GM3). Кроме того, были обнаружены ганглиозиды GM1, GD3, Gd1a и GT1b (табл. 2). В нормальной крови содержание сиалозиллактозилцерамида (GM3) и дисиалозиллактозилцерамида (GD3) составляет около 90%. Однако в сыворотке крови пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями яичников суммарное содержание этих ганглиозидов возрастает приблизительно до 95%. При этом значительно увеличивается количество

GD3, особенно при наличии злокачественных опухолей (табл. 2). Следует отметить, что существенных различий в содержании GM3 и GD3 в сыворотке крови между присутствием серозных или муцинозных опухолей (как доброкачественных, так и злокачественных) не обнаружено.

Увеличение содержания ганглиозида GD3 в сыворотке крови опухолевых пациентов коррелирует с уменьшением его содержания в самой опухоли яичника, причем было показано, что в доброкачественных опухолях падение уровня GD3 по сравнению с нормой происходит в значительно меньшей степени, чем в злокачественных [11].

Изменение содержания ганглиозидов GM3 и GD3 в сыворотке крови опухоленосителей приводит к значительному уменьшению молярного отношения Gm3/GD3 по сравнению с нормой. При этом в случае наличия доброкачественных опухолей это отношение уменьшается в два раза, а при наличии злокачественных — в три раза [табл. 2].

Особенно важным является факт изменения молярных отношений Cer/GM3 и Cer/Gd3. Как видно из табл. 2, отношение Cer/Gm3 уменьшается в сыворотке крови опухоленосителей по сравнению с контролем приблизительно в 1,7-1,8 раза, причем для пациентов с кистами и раковыми опухолями различия незначительны. Однако отношение Cer/GD3 в сыворотке крови раковых больных понижается почти в 6,5 раза (в случае кистом — приблизительно в 5 раз). Поскольку GD3 является ганглиозидом, специфичным для многих опухолей и блокирующим действие иммунокомпетентных клеток [5], резкое понижение молярного отношения Cer/GD3, видимо, способствует развитию опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Дятловицкая Э.В. // Биохимия. — 1992. — Т. 57. — С. 1004-1010.
- 2 Cotterchio M., Seyfried T.N. // J. Lipid Res. — 1994. — V. 35. — P. 10-14.
- 3 Merrit W.D., Derminassian V., Reaman G.H. // Leukemia. — 1994. — V. 8. — P. 816-822.
- 4 Portoukalian J., David M., Gain P., Richard M. // Int. J. Cancer. — 1993. — V. 53. — P. 948-951.
- 5 Bergelson L.D., Dyatlovitskaya E.V. // Sov. Med. Rev. D. Immunol. — 1991. — V. 3. — P. 107-150.
- 6 Kolesnick R., Fuks Z. // J. exp. Med. — 1995. — V. 181. — P. 1949-1952.
- 7 Obaid L.M., Hannun Y.A. // J. Cell Biochem. — 1995. — V. 58. — P. 191-198.
- 8 Pushkareva M., Obaid L.M., Hannun Y.A. // Immunology Today. — 1995. — V. 16. — P. 294-297.
- 9 Gill B.M., Nishikata H., Chan G., Delovitch T.L., Ochi A. // Immunol. Rev. — 1994. — V. 142. — P. 113-125.
- 10 Hannun Y.A. // J. Biol. Chem. — 1994. — V. 269. — P. 3125-3128.
- 11 Андреасян Г.О., Малых Я.Н., Дятловицкая Э.В. // Вопр. мед. химии. — 1996. — Т. 42, N . — С.
- 12 Svennerholm L. // Meth. Enzymol. — 1963. — V. 6. — P. 459-462.
- 13 Дятловицкая Э.В., Андреасян Г.О., Малых Я.Н. // Биохимия. — 1995. — Т. 60. — С. 1302-1306.
- 14 Попова Г.М., Промыслов М.Ш. / Вопр. мед. химии. — 1995. — Т. 41, N 1. — С. 43-45.

GANGLIOSIDES AND CERAMIDES IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH OVARY TUMORS

Somova O.G., Andreasyan G.O., Dyatlovitskaya E.V.

M.M.Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow.
Russian Academy of Medical Studies, Moscow

Content of ceramides and gangliosides and ganglioside composition were studied in blood serum of patients with benign and malignant ovary tumors and of healthy volunteers. Ceramide content in blood serum of tumor patients (benign and malignant) was similar to that of control. Content of lipid-bound sialic acids (gangliosides) was different: it was distinctly increased in all the tumor patients, especially with malignant tumors, in comparison with control. Ceramide/lipid-bound sialic acids molar ratio decreased in the blood serum of tumor patients in comparison with control, but it was similar both in malignant and benign tumor patients. GM3/GD3 ganglioside molar ratio decreased significantly also, especially in the blood serum of patients with malignant tumors. These results showed that in the blood serum of patients with ovary tumors the content and composition of gangliosides change to a great extent than that of the ceramides.