

УДК 616.13-004.6-612.112.94.95-611.018.74

© Коллектив авторов

### **АКТИВАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ГАНГЛИОЗИДА GM3 В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

***Е.В. Грачева, Н.Н. Самовилова, Н.К. Голованова, Г.Ф. Пиксина,  
В.С. Шишкина, Н.В. Проказова\****

Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического  
научно-производственного комплекса Минздравсоцразвития;  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А. тел.: (495)414-67-14;  
факс: (495)414-67-12; эл. почта: prokazova@cardio.ru

На моноцитах и лимфоцитах крови пациентов с атеросклерозом и здоровых доноров проведено изучение роли GM3 в адгезии моноцитов к культивируемым эндотелиальным клеткам пупочной вены человека (HUVEC). Полученные результаты показали, что в мононуклеарных клетках крови пациентов с атеросклерозом активность GM3-синтазы и содержание ганглиозида GM3 были в несколько раз выше, чем в мононуклеарных клетках доноров. В моноцитах активность GM3-синтазы была на порядок выше, чем в лимфоцитах обеих исследованных групп субъектов, что свидетельствует об основном вкладе моноцитов в повышение биосинтеза и содержания ганглиозида GM3 в мононуклеарных клетках при атеросклерозе. Обогащение моноцитов здоровых доноров ганглиозидом GM3 путем инкубации клеток в среде, содержащей этот ганглиозид, повышало адгезию этих моноцитов к HUVEC до уровня адгезии моноцитов пациентов с атеросклерозом. При этом наблюдалось увеличение экспрессии интегрина CD11b, которое было сравнимо с экспрессией на моноцитах, активированных липополисахаридом. Таким образом, увеличение содержания GM3 в моноцитах и лимфоцитах при атеросклерозе, вероятно, является элементом активации, который может способствовать их прикреплению к эндотелию и проникновению в интиму.

**Ключевые слова:** ганглиозид GM3, GM3-синтаза, мононуклеарные клетки крови, моноциты и лимфоциты, атеросклероз.

---

**Принятые сокращения:** ФСБ-0,5% БСА – фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина; CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc – цитидин-5'-монофосфо[<sup>14</sup>C]N-ацетилнейраминаовая кислота; FCS – фетальная сыворотка теленка; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; HBSS - сбалансированный солевой раствор Хэнкса; РС5 – фикоэритрин-цианин 5; PE – фикоэритрин.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Активация и дифференцировка моноцитов в макрофаги после их хемотаксического рекрутирования в сосудистую стенку протекают на всех стадиях развития атеросклеротической бляшки и являются ключевыми процессами атеросклероза. Прикрепление моноцитов к эндотелиальным клеткам обусловлено активацией интегриновых рецепторов, в результате которой инициируется передача внутриклеточного сигнала через каскад киназ, завершается дифференцировкой в макрофаги [1].

Было установлено, что при атеросклерозе многие рецепторы моноцитов активированы, в частности, интегриновый рецептор CD11/CD18 для межклеточной молекулы адгезии (ICAM) эндотелия, что играет ключевую роль в первичном развитии и прогрессировании атеросклеротических поражений [2].

Изучение механизма адгезии лимфоцитов показало, что при активации клеток интегриновые молекулы перемещаются из внутриклеточных депо в мембранные микродомены (рафты), обогащенные холестерином и гликосфинголипидами [3]. Последующая сегрегация отдельных рафтов необходима для поддержания активного состояния лимфоцитов и их адгезии, которая предшествует эффективному распознаванию антигенов. Авторы заключают, что эти процессы формируют фокусы адгезии и сигнальной передачи клетки, что может быть основным механизмом эффективного функционирования Т-лимфоцитов [3-5]. Таким образом, основная функция рафтов в процессах адгезии лимфоцитов заключается в концентрировании интегриновых рецепторов для взаимодействия с лигандами [6]. При разрушении мембранных рафтов удалением холестерина из клеточных мембран происходит снижение адгезивности моноцитов [7].

Ганглиозиды – обязательные компоненты мембранных рафтов образуют связи с такими молекулами, как рецепторы и нерецепторные тирозинкиназы, клеточные антигены, молекулы адгезии и др., поэтому экспрессия и пространственная организация ганглиозидов в клеточной мембране находятся в тесной взаимосвязи с такими процессами как пролиферация, адгезия, подвижность, дифференцировка, трансформация и т.д. [8]. Например, показано, что в мембранах лимфоцитов рафты содержат почти все поверхностные антигены и в 20 раз по сравнению с суммарной мембраной обогащены ганглиозидом GM3 [9]. В мембранах моноцитов также установлено присутствие рафтов [10].

В предварительных исследованиях *in vitro* мы показали, что повышенное по сравнению с исходными моноцитами содержание GM3 и активация синтезирующего его фермента является характерным признаком дифференцированных макрофагов человека. Подавление биосинтеза ганглиозидов специфическим ингибитором глюкозилцерамидсинтазы D-1-трео-1-фенил-2-пальмитоиламино-3-пирролидино-1-пропанолом приводит к нарушению процесса макрофагальной дифференцировки [11].

Так как в настоящее время установлено, что уже в периферической крови пациентов с атеросклерозом моноциты преактивированы [5, 12] и их адгезия к эндотелию в 1,5 раза выше, чем у моноцитов здоровых субъектов [13, 14] мы задались целью изучить, связана ли преактивация моноцитов и лимфоцитов в периферической крови пациентов с атеросклерозом с повышенным уровнем биосинтеза и накоплением ганглиозидов GM3, доля которого в этих клетках составляет 72% от всех ганглиозидов [15].

**МЕТОДИКА.** В работе использовали реактивы фирм “Sigma” (США), “Serva” (Германия), а также отечественного производства квалификации ч.д.а. CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc (287 мКи/ммоль) был получен от “Amersham” (Великобритания).

Ганглиозид GM3 печени человека был выделен по методу, описанному ранее [16]. В экспериментах по изучению клеточной экспрессии использованы коммерческие мышиные моноклональные антитела: CD11b-PE (BD Pharmingen, США), CD14-FITC, CD14-PC5, CD206-PE (BeckmanCoulter, Франция), CD86-PE (R&D, США).

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из цельной крови здоровых доноров или больных атеросклерозом, которые дали информированное согласие на участие в исследованиях, или из лейкомассы, полученной лейкоферезом крови здоровых доноров, центрифугированием на градиенте плотности Ficoll-Paque Plus ("Amersham Biosciences", Швеция) согласно протоколу производителя. Моноциты выделяли из мононуклеарной фракции с помощью набора для негативной магнитной селекции моноцитов Dynal® Monocyte Negative Isolation Kit ("Dynal Biotech LLC", США), согласно протоколу производителя. Лимфоциты выделяли из мононуклеарной фракции с помощью набора для положительной магнитной селекции моноцитов (human CD14 MicroBeads, "Milenyi Biotec", Германия), согласно протоколу производителя. Содержание моноцитов и лимфоцитов в выделенных клеточных популяциях определяли методом проточной цитометрии после окрашивания клеток FITC/PE-конъюгированными моноклональными антителами к CD45/CD14 ("BD Pharmingen", США) и изотипическими мышиными IgG ("BD Pharmingen").

Свежевыделенные из крови здоровых доноров мононуклеарные клетки или моноциты (1-3 млн/мл) инкубировали в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) при комнатной температуре в присутствии возрастающих концентраций GM3 (0-40 мкМ) или фиксированной концентрации GM3 (40 мкМ) в течение 30 мин. По окончании инкубации клетки дважды отмывали в HBSS. Часть клеток использовали для определения клеточного GM3, остальные клетки в HBSS (1 млн/мл) окрашивали 0,5 мкМ BCECF AM ("Invitrogen", США) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки дважды отмывали в HBSS, ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10% FCS, и использовали в экспериментах по прикреплению к культуре HUVEC.

Для получения HUVEC использовали метод Gimbrone и соавт. в модификации Антонова и соавт. [17]. Клетки культивировали на культуральном пластике, предварительно покрытом 0,2% раствором желатина. Суспензию клеток 2-го пассажа разливали по пробиркам (по 1-2 мл), замораживали и хранили в жидком азоте.

Эксперименты по прикреплению моноцитов проводили с использованием конфлюентной культуры HUVEC в 24-луночных плашках. Конфлюентную культуру HUVEC дважды отмывали средой DMEM, добавляли флуоресцентно меченые моноциты в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл и инкубировали 30 мин при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации промеряли интенсивность флуоресценции на ридере Victor X3 ("Perkin Elmer", США) при  $\lambda_{возб.}/\text{эм.}$  485/535 нм. Далее плашки дважды отмывали средой от неадгезированных моноцитов и опять промеряли интенсивность флуоресценции. Прикрепление моноцитов выражали в процентах как отношение интенсивности флуоресценции после отмывки моноцитов (прикрепившиеся моноциты) к интенсивности флуоресценции до их отмывки (все добавленные моноциты). В ряде экспериментов клетки фиксировали холодным метанолом и окрашивали по Гимза. В этом случае подсчёт количества прикрепившихся моноцитов производили на фотографиях, сделанных на фазово-контрастном микроскопе (Nikon Diaphot, 20×), в 10 полях зрения.

## ГАНГЛИОЗИД GM3 В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Содержание ганглиозида GM3 и активность GM3-синтазы определяли в лизатах моноклеарных клеток или моноцитов, полученных из  $2-3 \times 10^6$  клеток согласно методу, описанному ранее [18]. Содержание ганглиозида выражали в мкг GM3 на мг клеточного белка. Активность GM3-синтазы выражали как количество NeuAc, перенесенной на лактозилцерамид, в течение 1 ч на 1 мг белка клеточного лизата.

Анализ экспрессии поверхностных антигенов на моноцитах проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur ("Becton Dickinson", США) после двойного окрашивания флуоресцентно мечеными антителами. К моноклеарным клеткам или моноцитам добавляли по 10 мкл раствора специфических антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой (FITC, PE или PC5), или изотипических антител и инкубировали на льду в течение 30-45 мин. После окончания инкубации клетки трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА). В качестве изотипического контроля использовали IgG, конъюгированные с FITC, PE или PC5 того же подкласса, что и специфические антитела.

Концентрацию белка определяли по модифицированной методике Лоури [19], используя БСА в качестве стандарта.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel 2002 с использованием двухвыборочного t-теста с различными дисперсиями. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Изменение содержания и состава ганглиозидов в клетках и тканях характерно для ряда патологических процессов, связанных с клеточной трансформацией, миграцией, дифференцировкой и пролиферацией [8]. Ранее мы показали, что содержание основного ганглиозида GM3 в интима артерий при атеросклерозе резко возрастает по сравнению с непораженной интимой, и установили, что это связано с миграцией моноцитов крови в интиму и их последующей дифференцировкой в макрофаги [20].

Для того чтобы установить, сопровождается ли преактивация моноклеарных клеток при атеросклерозе количественными изменениями ганглиозидов и активацией их биосинтеза, был проведен анализ содержания ганглиозида GM3 (основного ганглиозида моноклеарных клеток) и активности фермента его биосинтеза GM3-синтазы в моноклеарных клетках периферической крови у больных атеросклерозом и здоровых доноров.

Данные таблицы 1 показывают, что по сравнению со здоровыми донорами в моноклеарных клетках больных атеросклерозом наблюдается активация биосинтеза ганглиозида GM3, которая проявляется в повышении его клеточного содержания (2,9 раз) и активности фермента его биосинтеза (в 4,6 раз).

Таблица 1. Содержание ганглиозида GM3 и активность GM3-синтазы в моноклеарных клетках крови здоровых доноров и пациентов с атеросклерозом.

	Моноклеарные клетки	
	Здоровые доноры	Пациенты
GM3, мкг/мг белка	$1,5 \pm 0,68$ (n=7)	$28 \pm 17,5^*$ (n=4)
GM3-синтаза, пкмоль/(ч мг белка)	$4,3 \pm 2,1$ (n=4)	$130 \pm 31,6^{**}$ (n=6)

Примечание: \* -  $p < 0,01$  в сравнении со здоровыми донорами; \*\* -  $p < 0,0001$  в сравнении со здоровыми донорами.

Чтобы выяснить, с какими клетками моноклеарной фракции связана повышенная активность GM3-синтазы, было проведено разделение моноклеарных клеток на моноциты и лимфоциты. Поскольку объём периферической крови, который мы могли получить от больных атеросклерозом, ограничивался 10 мл, то выделенное количество моноцитов от одного больного не позволяло нам достоверно определить в них содержание GM3 и активность GM3-синтазы. В связи с этим для определения активности GM3-синтазы объединяли лизаты моноцитов от двух пациентов. Как показывают данные таблицы 2, повышенная активность фермента в моноклеарных клетках пациентов обусловлена, главным образом, увеличением активности фермента в моноцитах. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что повышение содержания GM3 – один из признаков активации моноцитов и лимфоцитов в крови пациентов с атеросклерозом. Так как этот признак характерен для дифференцированных макрофагов в культуре [11], можно предположить, что моноциты периферической крови пациентов с атеросклерозом приобретают некоторые свойства макрофагов.

Таблица 2. Активность GM3-синтазы в моноцитах и лимфоцитах здоровых доноров и пациентов с атеросклерозом.

Активность GM3-синтазы, пкмоль/(чмг белка)			
Здоровые доноры		Пациенты с атеросклерозом	
Моноциты (n=4)	Лимфоциты(n=4)	Моноциты* (n=2)	Лимфоциты (n=4)
43,2	5,3	176*	7,7
			7,0
50,0	Не определяется	256*	26,1
78,0	Не определяется		Не определяется
72,9	Не определяется		
61,0±17	5,3	216±57**	13,6±10,7

Примечание: \* - данные получены на объединенных лизатах моноцитов от двух больных; \*\* -  $p < 0,01$  в сравнении со здоровыми донорами.

В ряде работ было показано, что моноциты крови пациентов с атеросклерозом обладают повышенными адгезивными свойствами по сравнению с моноцитами здоровых доноров. Например, адгезия моноцитов к эндотелиальным клеткам у пациентов с гиперхолестеринемией в 1,5 раза выше, чем у здоровых доноров [13, 14]. Адгезивные свойства ряда клеток связаны с содержанием ганглиозида GM3, о чем свидетельствуют данные работ многих авторов, некоторые из которых приведены ниже. Так, известно, что ганглиозид GM3 играет ключевую роль в адгезии лимфоцитов [9]. Из мембран клеток меланомы B16 были выделены субфракции липидных рафтов, обогащенные GM3 и содержащие интегриновые рецепторы вместе со многими киназами. Поскольку инкубация клеток меланомы с синтетическими аналогами GM3, разрушающими липидные рафты, приводила к снижению адгезивности опухолевых клеток, авторы заключили, что адгезия происходит за счет мембранных рафтов [21]. Было установлено также, что GM3, взаимодействуя с интегринами и тетраспанинами, модулирует их функцию, что приводит к повышению клеточной адгезии к внеклеточному

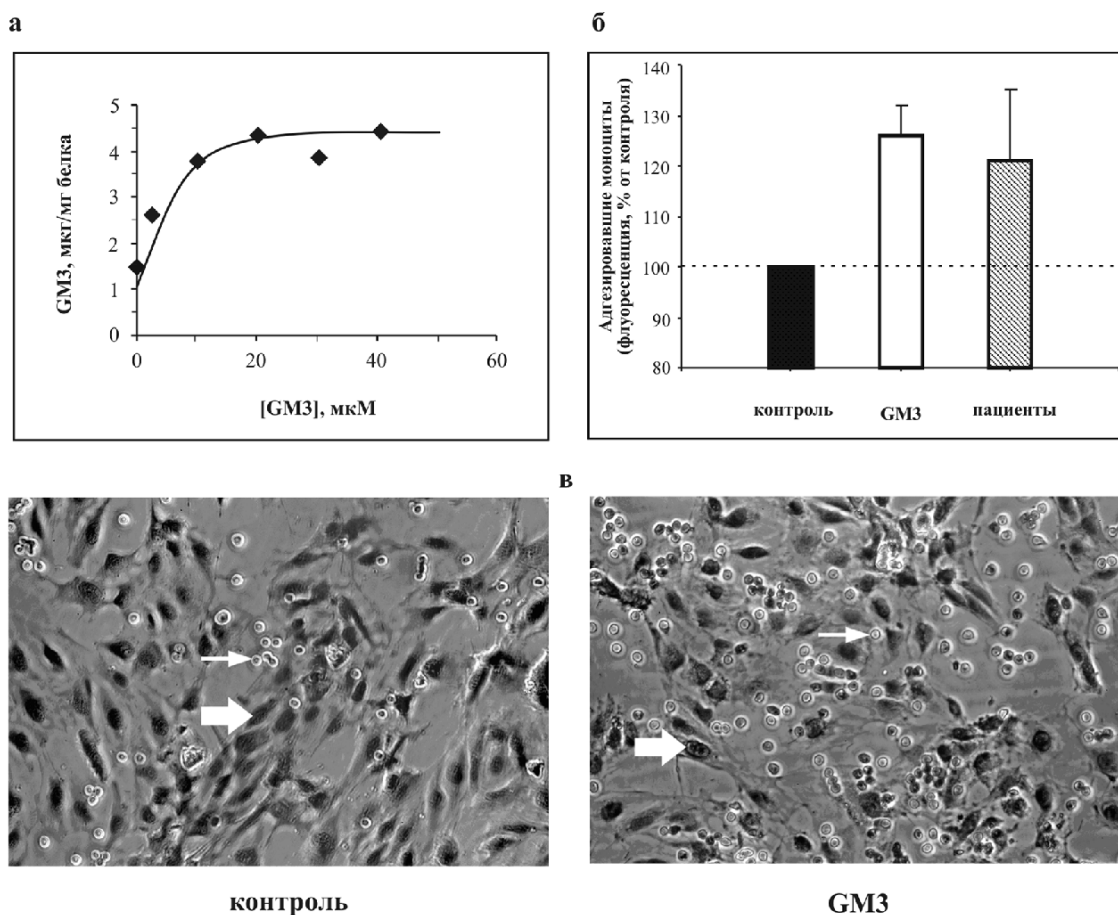


матриксу, снижению подвижности и метастатического потенциала опухоли [8]. Повышение содержания GM3 как насыщением клеток экзогенным ганглиозидом, так и транскрипционной активацией GM3-синтазы в HL-60 клетках, приводило к повышению экспрессии интегрин CD11b и адгезии клеток к культуральным чашкам [22]. Кроме того, накопление холестерина в клетках сопровождалось повышением содержания гликофинголипидов, что необходимо для формирования и стабилизации мембранных рафтов [23].

Для выяснения роли накопления GM3 в активации моноцитов мы проверили, влияет ли повышение клеточного содержания этого ганглиозида в моноцитах на их адгезию к эндотелиальным клеткам человека. Данные, представленные на рисунке 1а, показывают, что инкубация мононуклеаров в среде с возрастающими концентрациями GM3 приводит к увеличению клеточного содержания GM3. При концентрации GM3 в среде инкубации 40 мкМ содержание GM3 в мононуклеарных клетках достигает значений, близких к тем, которые наблюдаются у пациентов с атеросклерозом (см. табл. 1). Обработка клеток ганглиозидами с целью повышения их клеточного содержания используется для изучения биологических функций ганглиозидов [24]. Для того чтобы проверить, сопровождается ли увеличение клеточного содержания GM3 повышением адгезивных свойств моноцитов, свежесыведенные моноциты доноров инкубировали с 40 мкМ GM3, при этом клеточное содержание GM3 повышалось с 1,5 до 5,2 мкг на мг клеточного белка. Эксперименты по прикреплению необработанных моноцитов и моноцитов, обработанных ганглиозидом GM3, к культуре HUVEC показали, что повышение клеточного содержания GM3 приводит к увеличению адгезии моноцитов к культуре HUVEC (рис. 1б и 1в). Адгезивная способность моноцитов с повышенным содержанием ганглиозида GM3 была сходна с адгезивностью моноцитов пациентов с атеросклерозом (рис. 1б), которая находилась в соответствии с данными, приведенными в литературе [13, 14]. Фотографии, приведенные на рисунке 1в, демонстрируют явные различия в адгезивной способности моноцитов донора (контроль) и этих же моноцитов, обработанных GM3 (GM3).

Сравнительный анализ проточной цитометрией экспрессии интегрин CD11b на моноцитах показал, что обработка цельной крови доноров ганглиозидом GM3 в течение 15 мин приводит к повышению экспрессии этой молекулы адгезии на 16% от исходного уровня (рис. 2). Через 20 ч инкубации с ганглиозидом экспрессия CD11b практически не изменяется (18% от исходного уровня). Для сравнения, стимуляция моноцитов липополисахаридом в течение 15 мин повышает экспрессию CD11b на моноцитах на 26% от исходного уровня, и экспрессия этого интегрин возрастает по мере увеличения времени инкубации (до 64% от исходного уровня через 20 ч). Ранее было показано, что моноциты пациентов с атеросклерозом, обладая повышенной (в 1,5 раза) адгезивностью к эндотелию, не отличались по экспрессии маркеров дифференцировки и интегринов от моноцитов здоровых доноров [13, 14]. Наблюдаемое нами небольшое повышение экспрессии молекул адгезии CD11b при обогащении ганглиозидом GM3 моноцитов доноров может быть связано с изменением их состояния в мембранных доменах [3]. По мнению некоторых авторов [5, 25], регуляция адгезии, обусловленной интегринами, является более сложным процессом, чем просто изменение экспрессии молекул адгезии на клеточной поверхности. Считается, что изменение конформации интегриновых молекул, приводящее к повышению их сродства к лигандам, играет более

значительную роль в клеточной адгезивности. Поскольку количественные изменения ганглиозидов в плазматической мембране прямо связаны с конформационными перестройками белковых молекул, то повышающая регуляция биосинтеза GM3 в лимфоцитах и моноцитах пациентов с атеросклерозом может быть одним из инструментов активации мембранных рецепторов, что, по существу, и представляет собой преактивация лейкоцитов крови пациентов с атеросклерозом.



**Рисунок 1.**

Влияние обработки моноцитов ганглиозидом GM3 на их прикрепление к культуре HUVEC.

**а** - Накопление экзогенного ганглиозида GM3 в моноклеарных клетках.

Моноклеарные клетки, выделенные из крови здоровых доноров, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в HBSS, содержащем ганглиозид GM3 (0-40 мкМ).

Количественное определение клеточного GM3 см. в разделе "Методика".

**б** - Адгезия моноцитов к монослойной культуре HUVEC.

Контроль - необработанные моноциты, GM3 - моноциты, обработанные ганглиозидом GM3 (40 мкМ), пациенты - моноциты крови пациентов с атеросклерозом.

К культуре HUVEC добавляли моноциты в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Количественное определение адгезировавших моноцитов см. в разделе "Методика".

**в** - Фазово-контрастная микроскопия моноцитов, адгезировавших к монослойной культуре HUVEC. Контроль - прикрепление необработанных моноцитов донора, GM3 - прикрепление тех же моноцитов, обработанных ганглиозидом GM3. Клетки фиксировали холодным метанолом и окрашивали по Гимза. Стрелками указаны моноциты (маленькие стрелки) и эндотелиальные клетки (большие стрелки). 20х.

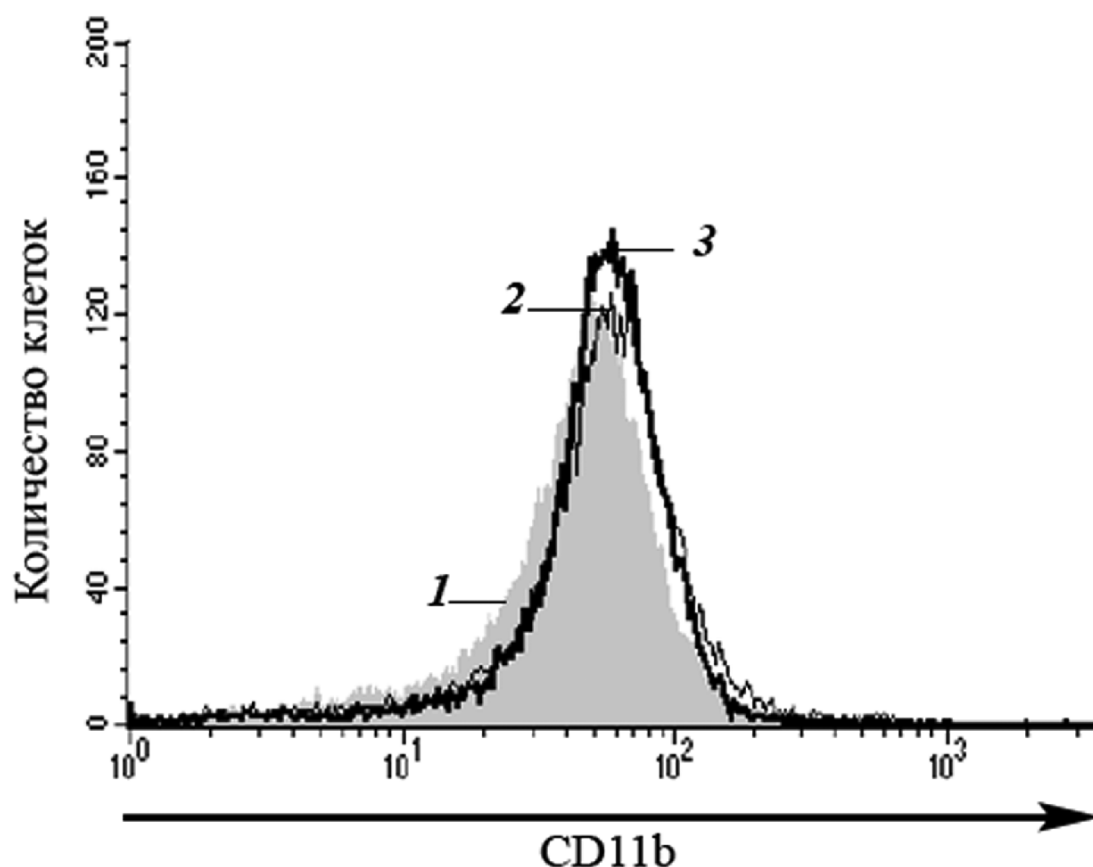


Рисунок 2.

Влияние повышения клеточного содержания GM3 на экспрессию интегрина CD11b на моноцитах доноров. 1 - Необработанные моноциты, 2 - моноциты, обработанные ганглиозидом GM3, 3 - моноциты, обработанные липополисахаридом.

Цельную кровь донора инкубировали с ганглиозидом GM3 (40 мкМ) или липополисахаридом (1 мкг/мл) в течение 15 мин при 37°C, а затем окрашивали анти-CD11b антителами, меченными PE, согласно протоколу производителя. Экспрессию CD11b на моноцитах измеряли с помощью проточной цитометрии.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Таким образом, увеличение содержания GM3 в моноцитах и лимфоцитах при атеросклерозе, вероятно, является элементом активации, который может способствовать их прикреплению к эндотелию и проникновению в интиму – основным процессам формирования атеросклеротических поражений сосудов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 10-04-00888а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bobryshev Y.V. (2006) *Micron*, **37**, 208-222.
2. Gleissner C.A., Leitinger N., Ley K. (2007) *Hypertension*, **50**, 276-283.
3. Leitinger B., Hogg N. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 963-972
4. Diamond M.S., Springer T.A. (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 545-556.
5. Jongkind J.F., Verkerk A., Hoogerbrugge N. (1995) *Metabolism*, **44**, 374-378.



6. Kovacic N., Muthing J., Marusic A.J. (2000) *Histochem. Cytochem.*, **48**, 1677-1690.
7. Murphy A.J., Woollard K.J., Hoang A., Mukhamedova N., Stirzaker R.A., McCormick S.P., Remaley A.T., Sviridov D., Chin-Dusting J. (2008) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 2071-2077.
8. Hakomori S. (2000) *Glycoconjugate J.*, **17**, 627-647.
9. Sorice M., Longo A., Garofalo T., Mattei V., Misasi R., Pavan A. (2004) *Glycoconjugate J.*, **20**, 63-70.
10. Moreno-Altamirano M.M., Aguilar-Carmona I., Sánchez-García F.J. (2007) *Immunology*, **120**, 536-543.
11. Gracheva E.V., Samovilova N.N., Golovanova N.K., Kashirina S.V., Shevelev A., Rybalkin I., Gurskaya T., Vlasik T.N., Andreeva E.R., Prokazova N.V. (2009) *Mol. Cell Biochem.*, **330**, 121-129.
12. Биленко М.В., Хильченко А.В., Никитина Н.А., Аксенов Д.В. (2008) *Биомед. химия*, **54**, 322-340.
13. De Gruijter M., Hoogerbrugge N., van Rijn M.A., Koster J.F., Sluiter W., Jongkind J.F. (1991) *Metabolism*, **40**, 1119-1121.
14. Luu N.T., Madden J., Calder P.C., Grimble R.F., Shearman C.P., Chan T., Tull S.P., Dastur N., Rainger G.E., Nash G.B. (2007) *Atherosclerosis*, **193**, 259-268.
15. Kiguchi K., Henning-Chubb C., Huberman E. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1176**, 27-36.
16. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Батраков С.Г., Барсуков Л.И., Проказова Н.В. (1981) В кн. *Препаративная биохимия липидов* (Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., ред.), Наука, Москва, с. 208-209.
17. Антонов А.С., Крушинский А.В., Николаева М., Флегель Х.Г., Репин В.С. (1981) *Цитология*, **10**, 1154-1160.
18. Грачева Е.В., Самовилова Н.Н., Голованова Н.К., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Тарарак Э.М., Проказова Н.В. (2007) *Биохимия*, **72**, 772-777.
19. Peterson G.L. (1977) *Analyt. Biochem.*, **83**, 346-356.
20. Bobryshev Y.V., Golovanova N.K., Tran D., Samovilova N.N., Gracheva E.V., Efremov E.E., Sobolev A.Y., Yurchenko Y.V., Lord R.S., Cao W., Lu J., Saito M., Prokazova N.V. (2006) *Atherosclerosis*, **184**, 63-71.
21. Iwabuchi K., Handa K., Hakomori S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33766-33773.
22. Chung T.W., Choi H.J., Lee Y.C., Kim C.H. (2005) *Glycobiology*, **15**, 233-244.
23. Glaros E.N., Kim W.S., Quinn C.M., Wong J., Gelissen I., Jessup W., Garner B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24515-24523.
24. Schwarzmann G. (2001) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **12**, 163-171.
25. Beekhuizen H., van Furth R. (1993) *J. Leukoc. Biol.*, **54**, 363-378.

Поступила: 20. 09. 2011.

**ACTIVATION OF GANGLIOSIDE GM3 BIOSYNTHESIS IN HUMAN BLOOD  
MONONUCLEAR CELLS IN ATHEROSCLEROSIS**

*E.V. Gracheva, N.N. Samoilova, N.K. Golovanova, G.F. Piksina, V.S. Shishkina, N.V. Prokazova*

Research Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center of the Ministry of Public Health and Social Development, ul. 3ya Cherepkovskaya, 15A, Moscow, 121552 Russia; tel.: 7(495)414-67-14; fax: 7(495)414-67-12; e-mail: prokazova@cardio.ru

Using blood monocytes and lymphocytes from atherosclerotic patients and healthy subjects we have investigated activity of GM3 synthase, cellular levels of ganglioside GM3 and its role in monocyte adhesion to cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The results showed that activity of GM3 synthase and cellular levels of ganglioside GM3 in blood mononuclear cells from atherosclerotic patients were several-fold higher than those from healthy subjects. In monocytes the activity of GM3 synthase was one an order of magnitude higher than in lymphocytes from both groups studied; this suggests the major contribution of monocytes to enhanced biosynthesis and levels of GM3 in mononuclear cells in atherosclerosis. Enrichment of monocytes from healthy subjects with ganglioside GM3 by incubation in medium containing this ganglioside increased adherence of these monocytes to HUVEC up to the values typical for monocytes from atherosclerotic patients. In addition, an increase in CD11b integrin expression was observed that was comparable to that seen in lipopolysaccharide-activated monocytes. It is suggested that in atherosclerosis the enhanced cellular levels of GM3 in monocytes and lymphocytes may be an important element of cell activation that facilitates their adhesion to endothelial cells and penetration into intima.

**Key words:** ganglioside GM3, GM3 synthase, blood mononuclear cells, monocytes and lymphocytes, atherosclerosis.