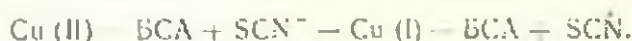
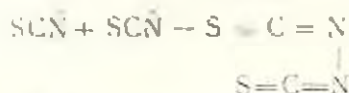


взгляд, утверждать, что происходит перенос электрона с SCN^- на металл в основном для комплексов типа I по схеме:



Образовавшиеся радикалы SCN как реакционноспособные должны рекомбинировать. Возможно, что схема их рекомбинации такова:



Данные о высокой электроотрицательности меди (II) ($\chi=2.1$) [3] и малой величине ее окислительного потенциала ($E^\circ=153$ мВ) [4] подтверждают, что процесс переноса электрона должен иметь место.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатуриян Р. А. Биол. ж. Армении 36, 570—574 (1983).
2. Асатуриян Р. А., Лусарарян К. С. Биол. ж. Армении, 39, 208—212, 1986.
3. Бацаков С. С. Экспериментальные основы структурной химии. М., 1986.
4. Коттон Ф., Уилкинсон Д. Основы неорганической химии. М., 1979.
5. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 716 (31)—84.
6. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 717 (32)—84.
7. Asaturian R. A. Gen. Physiol. Biophys., 5, 105—118, 1986.
8. Asaturian R. A., Avakian Ts. M., Ershov N. V., Azev A. L., Kozlov M. A. J. Physique, 47, C5—1205—1209, 1986.
9. Falk R.—E., Freeman H. C., Jansson T., Mainstream B. G., Vanngard T. J. Amer. Chem. Soc., 89, 6071—6077, 1967.
10. Hiltnerbrand M., Lohmann W., Penka V., Ehling U. Z. Naturforsch., 30C, 33—36, 1975.
11. Katz S., Crissman J. K., Roberson J. C. J. Biol. Chem., 249, 7892—7895, 1974.
12. Katz S., Shinaberry R. G., Heck E. L., Square W. Biochemistry, 19, 3805—3813, 1980.
13. Katz S., Shaw M. E., Chittag S., Miller J. E. J. Biol. Chem., 247, 5228—5233, 1972.

Поступило 22.VII 1987 г.

Биол. ж. Армении, № 1, (42), 1989

УДК 547.992:547.392.52:547.475.53:577.171.5

ГАНГЛИОЗИД GD_3 —МОДУЛЯТОР БИОСИНТЕЗА ЭИКОЗАНОИДОВ И ИНГИБИТОР ДЕЙСТВИЯ ИОНОФОРА A-23187 В ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА*

А. Г. ПАНОСЯН, М. Э. БАРИКЯН

Институт медицинской радиологии МЗ АрмССР, Ереван

Показано, что предварительная обработка гранулоцитов ганглиозидом GD_3 резко снижает влияние ионофора A 23187 на эйкозаноидный каскад (высвобождение из клеточных липидов [$1-^{14}\text{C}$] арахидоновой кислоты и ее трансформацию в продукты липоксигеназы) путей окисления 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 8-HETE, LTB $_4$, 20-OH-LTB $_4$.

* Часть материалов статьи была представлена на Всесоюзной конференции по биохимии липидов, ИБ, Алма-Ата, 1987.

Сокращения: НК—натуральные киллеры, ПМЯЛЧ—полиморфноядерные лейкоциты человека, GD_3 — 11β (NauAc) $_2$ LacCer, GM_3 — 11β NeuAcLacCer, АК—арахидоновая

ծույց 1 արձան, որ հանդիսանում է ԳԴ₃-ով զրահված թերթիկի նախնական մշակման հստակ ինքնուրույն և հոկտեմբեր 1987-ի ապրիլի 1-ին ընդունված լիպիդների [1-¹⁴C] — արտադրության և նրա լիպոօքսիգենազային օրգանական պրոդուկտների՝ 5-²⁶SD, 12-²⁶SD, 15-²⁶SD, D²⁶SD, LTB₄, 20-OH-LTB₄, արանհատարարի վրա:

Ganglioside GD₃ sharply reduces ionophore A-23187 stimulated release of [1-¹⁴C] — arachidonic acid from cellular lipid and subsequent transformation into the products of lipoxygenase pathways of oxidation: 5- HETE, 12- HETE, 15- HETE, D¹⁵HETE, LTB₄, 20- OH-LTB₄.

Лейкоциты человека поликорпорноядерные — эйкозаноиды — ганглиозиды.

Известно, что структура и состав ганглиозидов меняются при злокачественном росте и что в плазме опухоленосителей резко увеличивается содержание опухолеассоциированных ганглиозидов, в особенности GD₃ и GM₃ [1, 10]. По-видимому, опухолевые ганглиозиды поступают в плазму путем усиленного «сбрасывания» с поверхности опухолевых клеток [2, 13, 15]. Показано, что *in vitro* ганглиозиды GD₃ и GM₃ подавляют цитотоксическую активность НК-клеток и повышают Т-супрессорную активность [3-5], тогда как ганглиозиды иной структуры таким свойством не обладают. На этом основании высказано предположение, что повышение содержания ганглиозидов GD₃ и GM₃ в крови опухоленосителей является фактором, способствующим подавлению резистентности [1]. Один из возможных механизмов иммуносупрессорного действия ганглиозидов состоит в активации липоксигеназ и биосинтезе эйкозаноидов, которые, как известно, в значительной степени влияют на цитотоксичность НК-клеток (см. напр., [8, 9, 11, 12, 14]). В связи с этим мы изучили влияние ганглиозида GD₃ на метаболизм арахидоновой кислоты в ПМЯЛЧ.

Материал и методика. Получение суспензии ПМЯЛЧ (нейтрофилы-эозинофилы-базофилы, 96:3:1) и примесь тромбоцитов, и также включение [1-¹⁴C]-АК (60 Ки/ммоль, Amersham) в ПМЯЛЧ проводили по описанным методикам [7]. К 6,5 мл суспензии отмытых от свободной [1-¹⁴C]-АК ПМЯЛЧ (40×10⁶ клеток/мл) в буферном растворе (50 мМ трие HCl, 0,1 М NaCl), содержащем АТФ (1 мМ), СаCl₂ (0,5 мМ) и диэтилэтиловую соль ЭДТА (1 мМ), прибавляли 30 мкл 2×10⁻³ М ганглиозида GD₃ в ДМСО. Смесь инкубировали при интенсивном встряхивании 10 мин и добавляли 65 мкл этанольного раствора ионофора А-23187 (Calbiochem Behring). Конечная концентрация ионофора в инкубационной среде составляла 2 мкМ. В контрольных опытах вместо раствора ганглиозида GD₃ и ионофора добавляли такие же количества соответствующих растворителей. Общая продолжительность инкубации во всех опытах составляла 15 мин. Через 5 мин после добавления ионофора реакцию останавливали прибавлением 15 мл метанола, смесь центрифугировали 10 мин при 4000×g, супернатант отделяли и прибавляли 5 мкл простагландин 13₂ (Institute of Chemistry AN Эст. ССР) в качестве внутреннего стандарта. Раствор фильтровали, выпаривали до объема 6 мл, разбавляли водой до 10 мл (рН 8,0) и пропускали через мембрану с диаметром поров 0,45 мкм с сорбентом Sep-Pac C18 (Waters), предварительно промытым метанолом и водой (по 20 мл). Вещества элюировали 20 мл воды, 5 мл смеси метанол—

вода, LTB₄ — лейкотриен В₄, HHT — (12 S)-12-гидроксис-5 Z, 8 E, 10 E — гидрокси-кетовая кислота, 5-HETE — (5 S)-5-гидроксис-6 E, 8 Z, 11 Z, 14 Z-эйкозатетраеновая кислота, 12-HETE — (12 S)-12-гидроксис-5 Z, 8 Z, 10 E, 14 Z-эйкозатетраеновая кислота, 15-HETE — (15 S)-гидроксис-5 Z, 8 Z, 11 Z, 13 E-эйкозатетраеновая кислота, 14 R, 15 S-14, 15-дигидроксис-5 Z, 8 Z, 10 E-эйкозатетраеновая кислота.

вода—уксусная кислота в соотношении 85:15:0,0; (рН 3,5) и 10 мл метанола. Водно-метанольный раствор упаривали до объема 2 мл, подкисляли 1н HCl до pH 3 и экстрагировали 10 мл хлороформа. Хлороформный слой промывали водой, уцаривали досуха, остаток растворяли в 100 мкл этанола и анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (LKB-Biochrom) на колонке с гидрофобным сорбентом Lichrosorb-RP18 (5 мкм), используя в качестве подвижной фазы систему метанол—вода—уксусная кислота, 75:25:0,01, рН 3,5. Скорость потока—1 мл/мин, детекция при 280 (12 мин) и 235 нм (20 мин). Собирали фракции по 1 мл, из каждой фракции отбирали пробы по 100 мкл и измеряли в них количество ^{14}C с помощью β -сцинтилляционного счетчика SL-4221 (Rozhke-Bioelectronic). Контроль дробирования метаболитов АК с Sep-Pak проводили с помощью ТСХ на сорбенте в системе хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода, 60:8:1:0,8. Пики радиоактивности обнаруживали с помощью радиоавтограмм.

Ганглиозид GD_3 , выделенный из порошкового молока [6], был любезно предоставлен Н. В. Прокопюк (ВКИЦ АМН СССР), метастабильным ганглиозид—В. П. Шевченко (Институт молекулярной генетики АН СССР). Динамику включения ганглиозида в лейкоциты изучали путем добавления к 10 мл суспензии ПМЯЛЧ 100 мкл раствора $[^3\text{H}]\text{-GD}_3$ (0,1 мКи, 120 Ки/моль—конечная концентрация ганглиозида 10^{-7}M) и отбора на инкубационной среде проб (по 1 мл). Пробы центрифугировали 5 мин при 4000Xg, осадок отмывали буферным раствором (ресуспендирование и повторное центрифугирование) и измеряли в нем радиоактивность.

Результаты и обсуждение. Инкубирование ганглиозида GD_3 с ПМЯЛЧ показало, что его связывание с клетками достигает максимального значения уже через 5 мин после добавления к клеточной суспензии.

При стимуляции ПМЯЛЧ ионофором А-23187 наблюдается резкое увеличение высвобождения АК и усиление биосинтеза эйкозаноидов (табл.). Этот эффект ионофора почти полностью снимается, если

Образование метаболитов $[1\text{--}^{14}\text{C}]\text{-AK}$ (в % к контролю) при стимуляции гранулоцитов ионофором А-23187 в присутствии ганглиозида GD_3 и без него**

Метаболит	Контроль	А-23187	+А-23187
5-НЕТЕ	100	1125 $\pm$ 80	129 $\pm$ 15
12-НЕТЕ	100	750 $\pm$ 4	59 $\pm$ 18
15-НЕТЕ	100	162 $\pm$ 120	225 $\pm$ 31
ННТ	100	200 $\pm$ 20	110 $\pm$ 15
1,13,15-ОНЕТЕ	100	540 $\pm$ 24	260 $\pm$ 21
20-Н-1-ГР ₁	100	259 $\pm$ 43	65 $\pm$ 17
Σ АК	100	519 $\pm$ 22	92 $\pm$ 7

* Количество образовавшегося метаболита оценивали по радиоактивности в образце (вычисленном при ВЭЖХ) и пересчете на 10^6 клеток (внутренний стандарт—простагландин B_2).

** Приведены усредненные результаты трех параллелей.

*** Суммарная радиоактивность всех метаболитов $[1\text{--}^{14}\text{C}]\text{-AK}$ на 10^6 клеток (в % к контролю).

клетки предварительно обработать ганглиозидом GD_3 . Особенно сильно GD_3 подавляет влияние ионофора на синтез монооксигенослов. Активность циклооксигеназы, о которой судили по количеству образовавшейся ННТ, также значительно ниже того уровня, который наблюдался в отсутствие ганглиозида. Внимания заслуживает также следующее обстоятельство: несмотря на то, что 12-НЕТЕ образуется и при-

сутствии GD_3 приблизительно в таком же количестве (2 пмоль/ 10^5 клеток), как и в среде без ганглиозидов, радиоактивной метки во фракции 12-НЕТЕ в несколько сотен раз меньше. Этот любопытный факт приводит к выводу, что ганглиозид GD_3 блокирует действие ионифора А-23187 на внутриклеточные источники $[1-^{14}C]$ АК в значительно большей степени, чем высвобождение АК из эндогенных источников, не содержащих радиоактивной метки.

Таким образом, в присутствии ганглиозидов GD_3 подавляется стимулированное ионифором образование монооксикислот, в частности, 5-НЕТЕ, предшественник которой—5-НРЕТЕ является стимулятором НК-клеток [8]. Возможно, что эффект GD_3 и лежит в основе его супрессорного действия на неспецифический иммунитет.

Авторы выражают глубокую признательность чл.-корр. АН СССР Л. Д. Бергельсону за плодотворное обсуждение работы и ценные замечания при подготовке статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дятловицкая Э. В., Бергельсон Л. Д. Успехи совр. биол., 102, 5, 763—784, 1986.
2. Дятловицкая Э. В., Фомина-Агеева Е. В., Бергельсон Л. Д. ДАН СССР, 271, 1511—1513, 1983.
3. Дятловицкая Э. В., Синицина Е. В., Лемновская А. Ф., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 49, 432—436, 1984.
4. Дятловицкая Э. В., Ключарева Т. Е., Матвеева В. А., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 50, 1514—1516, 1985.
5. Дятловицкая Э. В., Сускова В. С., Емец В. И., Бергельсон Л. Д. ДАН СССР, 288, 1497—1499, 1986.
6. Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А. Прием биол. и микробол., 14, 399—401, 1983.
7. Пакосян А. Г. Биоорг. химия, 11, 264—269, 1985.
8. Bray R. A., Brahm Z. J. Immunol., 139, 1783—1790, 1985.
9. Goodwin J. S., Ceuppens J. J. Clin. Immunol., 3, 297—315, 1983.
10. Nakomori S. Ann. Rev. Biochem., 50, 733—764, 1981.
11. Ramstedt U., He J., Wigzell H., Sjöberg C. N., Samuelsson E. J. Immunol., 135, 3134—3138, 1985.
12. Rola-Pleszczyński M., Dargatzis I., Ström P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 531—537, 1983.
13. Shaposhnikova G. I., Pechasova N. V., Buznikov G. A., Zvezdina N. P., Topilina N. A., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem., 149, 567—570, 1985.
14. Webb D. R., Nowowiejski L., Healy C., Rogers I. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 1617—1624, 1982.
15. Young W. W., Bergman C. A., Wollock D. M. J. Biol. Chem., 261, 2279—2284.

Поступило 29.VI 1988 г.