



УДК 612.822.1:547.952

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЦЕРЕБРОЗИДОВ МОЗГА

ТАРАНОВА Н. П.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В обзоре обобщены данные иммунохимического изучения цереброзидов и описаны основные методические приемы, используемые для этой цели. Подчеркивается, что для выявления иммунологической активности цереброзидов как гаптенов, необходимо присутствие вспомогательных липидов (лецитина и холестерина). Показана роль галактоцереброзидов как органо-специфических липидных антигенов нервной ткани, антитела к которым всегда присутствуют в противомозговых сыворотках. Охарактеризована структура антигенных детерминант цереброзидов и представлены доказательства иммунореактивности галактоцереброзидов, локализованных в нативных мембранах миелиновой оболочки и клеток—продуцентов миелина. Имеющиеся доказательства миелинотоксического действия противогалактоцереброзидных антител указывают на их важную роль в патогенезе аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний.

Благодаря успехам иммунохимии к настоящему времени установлено, что некоторые гликолипиды клеточной поверхности обладают антигенными свойствами: при введении в организм в соответствующих условиях они могут вызвать иммунную реакцию с образованием опсцифилов, а также вступать в иммунные реакции с антителами химических веществ и вступать в иммунные реакции с антителами. Однако гликолипиды являются неполными антигенами или гаптенами. Как и другие антигены с величиной M_r менее 1 кД, липиды приобретают иммуногенные свойства лишь после присоединения их к более крупным молекулам. Так, для получения антител к антигенам гликолипидной природы необходимо иммунизировать животных не очищенным антигеном, а смесью его с чужеродным белком-носителем, либо конъюгатом липид—белок.

Список липидных антигенов насчитывает уже около двух десятков соединений и включает цитолипины Н, К и R, гаптен Форссмана, некоторые виды ганглиозидов, цереброзиды, галактозил-диглицерид, некоторые липидные производные глюкуроновой кислоты, глобозиды и некоторые другие [1—3]. Среди липидных компонентов мозга самой высокой иммунологической активностью обладают цереброзиды, интерес к которым значительно возрос в последние годы в связи с тем, что появились веские доказательства в пользу

важной патогенетической роли противocereброзидных антител в развитии аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний, а также потому, что использование антител к cerebroзидам в качестве специфического реагента расширяет возможности иммуно-цитохимического исследования локализации и функции этих соединений в клеточных мембранах нервной ткани.

Галактоcereброзиды—органоспецифические липидные антигены нервной ткани

Cereброзиды принадлежат к числу гликоэффинголипидов и построены из аминокспирта сфингозина, соединенной с ним кислотнo-амидной связью жирной кислоты, преимущественно $C_{24:0}$ и $C_{24:1}$ нормальной или оксикислоты [4], и моносахарида галактозы или глюкозы, связанной со сфингозином β -гликозидной связью. Углеводным компонентом cerebroзидов нервной ткани является почти исключительно галактоза, поэтому их называют галактоcereброзидами (ГалЦ), в то время как содержание глюкоcereброзидов (ГлюЦ) в мозгу ничтожно мало [5, 6]. Cereброзиды, найденные в периферических тканях, содержат глюкозу [7]. Не менее 20—25% от общего количества ГалЦ нервной ткани составляют сульфocereброзиды [4], которые имеют эфирносвязанную с галактозой серниую кислоту, придающую полярный характер молекуле. Подавляющая часть (95%) ГалЦ мозга сконцентрирована в миелиновых оболочках [8, 9] и плазматических мембранах олигодендроцитов [10], из которых формируется миелин. Они обнаружены также в месте их синтеза—в микросомной фракции. В других органах—митохондриях, ядрах—cereброзиды содержатся в крайне малом количестве или отсутствуют вообще, а их небольшое количество, найденное в нейронах, оказалось ГлюЦ [8, 9]. Таким образом, ГалЦ являются специфическими структурными компонентами миелиновых оболочек и плазматических мембран олигодендроцитов.

Первые исследования органоспецифических липидных антигенов мозга, начатые в 60-х годах, обнаружили, что антисыворотки к ткани мозга способны активно реагировать только с липидным экстрактом нервной ткани, но не других органов [3, 11], что свидетельствовало о наличии в ткани ЦНС органоспецифических липидов. При этом было установлено, что антитела, содержащиеся в противомозговой сыворотке, активно реагируют с ГалЦ, но не дают реакций с другими липидами [11, 12]. В дальнейшем было неоднократно подтверждено, что при иммунизации кроликов гомогенатом ткани головного или спинного мозга, периферического нерва или миелином различных видов животных в антисыворотках обнаруживаются только антитела, направленные против ГалЦ, но не против других липидов [2, 3, 13]. При помощи различных иммунохимических методов были получены доказательства идентичности и одинаковой специфичности антител, содержащихся в

антисыворотках к ГалЦ и к нервной ткани (рис. 1, б), а также идентичности ГалЦ и липидных антигенов миелина, реагирующих с противомозговыми и противомиелиновыми сыворотками [3, 12—15]. Эти данные позволили сделать вывод, что именно ГалЦ являются антигеном, ответственным за ее органспецифичность миелинизированной нервной ткани. Этот вывод подтверждается утратой способности противомозговых и противомиелиновых сывороток реагировать с липидным экстрактом мозга после истощения их ГалЦ. Следует особо подчерк-

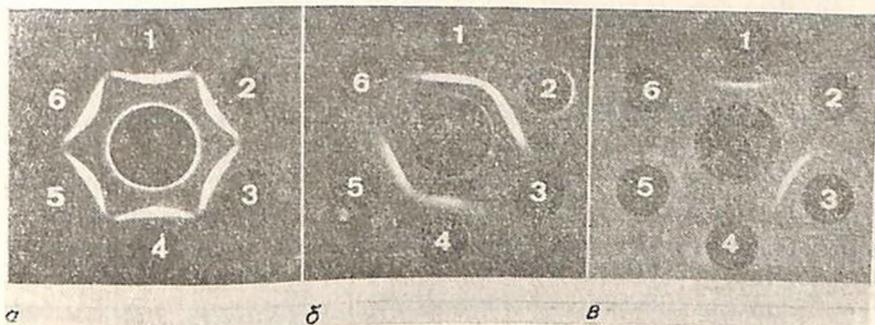


Рис. 1. Реакция иммунопреципитации в агаре [3]. а—центральная лунка: антисыворотка к ткани спинного мозга быка. Периферические лунки: 1, 2 и 5—суспензия липидов спинного мозга; 3, 4 и 6—суспензия цереброзид-холестерин-лецитин. б—центральная лунка: суспензия липидов спинного мозга быка. Периферические лунки: 1—антисыворотка к ткани спинного мозга быка; 2—анти-ГалЦ сыворотка; 4—антисыворотка к ткани спинного мозга в разведении 1:4; 5—анти-ГалЦ сыворотка в разведении 1:4. в—центральная лунка: антисыворотка к спинному мозгу быка в разведении 1:32. Периферические лунки содержат суспензию цереброзид-холестерин-лецитин: 1—неразведенную; 3—в разведении 1:8; 5—в разведении 1:32.

нуть высокую иммуногенность ГалЦ по сравнению с другими липидными антигенами. Несмотря на то, что в нервной ткани обнаружены другие гликолипиды, обладающие антигенными свойствами,—моногалактозил-диглицерид (МГД), ГлюЦ, ганглиозиды—они не вызывают образования специфических антител при иммунизации животных тканью мозга или миелином из-за очень слабой иммуногенности [2]. Так, для получения антисывороток с высоким уровнем антител достаточно бывает однократного введения 1—2 мг ГалЦ, в отличие от МГД и ГлюЦ, которые вводятся многократно и не всегда с успехом [6, 16].

Методы обнаружения и оценки иммунологических реакций цереброзидов с антителами

Для изучения иммунохимических свойств цереброзидов, как и других антигенов, обычно используют иммунизацию животных для получения моноспецифических антисывороток и исследуют поведение антигена в различных иммунологических реакциях антиген-антитело.

Лучшими продуцентами антител к гликофинголипидам оказались кролики, и все иммунохимические исследования цереброзидов выполнены при помощи кроличьей антисыворотки. В ответ на иммунизацию цереброзидами, как и любыми другими антигенами, обычно образуются антитела, которые могут быть обнаружены либо по образованию нерастворимых иммунных комплексов с антигенами, либо в случае образования растворимых комплексов,—по их агглютинирующей, комплекментфиксирующей, лизирующей активности. На основе использования этих основных феноменов разработано несколько методов обнаружения и оценки реакции антиген—антитело для цереброзидов.

Способность поливалентных антигенов, взаимодействуя с поливалентными антителами, образовывать крупные нерастворимые комплексы, выпадающие в осадок, использована для разработки двух методов.

1) *Реакция иммунопреципитации в геле (РИП) с использованием техники двойной иммунодиффузии по Ухтерлони.* Антиген и антисыворотку помещают в небольшие лунки в геле агара, в котором они диффундируют. В месте их встречи образуются иммунные комплексы, которые преципитируют и становятся видимыми как линии преципитации (рис. 1) [3, 12, 17].

2) *Реакция радио-иммунопреципитации (РРИП).* Липосомы, содержащие цереброзиды и меченый [^3H]-холестерин, при инкубации с противocereброзидной сывороткой кроликов образуют иммунные комплексы, которые преципитируют после добавления ослиной антисыворотки к γ -глобулинам кролика. Количество противocereброзидных антител определяют по остаточной радиоактивности в надосадочной жидкости [18].

Два других метода разработаны на основе способности антител агглютинировать клетки или другие крупные частицы, несущие на поверхности соответствующий антиген.

1) *Реакция агглютинации микрокристаллов холестерина, несущих на поверхности молекулы цереброзидов (РАХ).* При взаимодействии с противocereброзидными антителами микрокристаллы агглютинируют в крупные агрегаты. Реакцию с разведениями антисыворотки проводят на предметном стекле и наблюдают под микроскопом [19, 21].

2) *Реакция агглютинации липосом (РАЛ).* Липосомы, содержащие цереброзиды, инкубируют с антисывороткой. Агглютинацию образующихся иммунных комплексов липосом с антителами учитывают визуально [17].

Феномен комплементзависимого лизиса клеток использован для разработки нескольких модификаций реакции связывания комплемента для определения противocereброзидных антител и оценки иммунологической реактивности цереброзидов и их специфичности [11, 14, 17, 18, 20—22].

1) *Реакция связывания комплемента (РСК).* При инкубации цереброзидов с разведениями антисыворотки в присутствии ограниченного количества комплемента образующийся комплекс цереброзид-антице-

цереброзид полностью или частично фиксирует комплемент, остаток которого измеряют после добавления бараньих эритроцитов и антисыворотки против них по гемолизу эритроцитов. Отсутствие гемолиза расценивается как свидетельство наличия противocereброзидных антител в данном разведении антисыворотки.

2) *Реакция связывания комплемента с липосомами (РСКЛ)*. Метод основан на феномене иммунного лизиса искусственных безбелковых мембран липосом. Фиксация комплемента на комплексе противocereброзидных антител с содержащими цереброзиды липосомами приводит к лизису последних и высвобождению заключенного в их водных карманах маркера—либо глюкозы, которую определяют спектрофотометрически [16], либо ^{86}Rb , определяемого радиометрически [23].

Особенности поведения цереброзидов как гаптенов

Вспомогательные липиды. Иммунологические реакции антител к липидным гаптенам имеют ряд ограничений, обусловленных их гидрофобными свойствами. Необходимыми условиями для взаимодействия цереброзидов с антисывороткой является приготовление мелкодисперсной и стойкой эмульсии и присутствие так называемых вспомогательных липидов (*auxiliary lipids*)—холестерина и лецитина, добавленных в определенной пропорции в процессе приготовления суспензии цереброзидов [3, 12, 14, 24]. Реакция цереброзидов со специфической антисывороткой впервые была наглядно продемонстрирована в виде полосы преципитации в тесте иммунопреципитации в геле [12]. Это оказалось возможным благодаря способности липидов агрегировать в водной среде и образовывать мицеллы с упорядоченной структурой в суспензии цереброзид-холестерин-лецитин (ЦХЛ).

Роль вспомогательных липидов в реакциях липидных гаптенов с антителами до конца еще не выяснена, однако уже в первых исследованиях было убедительно показано, что ни холестерин, ни лецитин не взаимодействуют в РСК с антисывороткой к липидным гаптенам—к цитолипину Н, кардиолипину и другим [2, 20, 24, 25]. Это оказалось справедливым и для антиcereброзидных сывороток. Неспособность вспомогательных липидов реагировать с противocereброзидными антителами показана в различных иммунологических реакциях—в РИП [3], РСК [2, 24, 26] и РРИП [27]. Следовательно, ни лецитин, ни холестерин не участвуют непосредственно в реакции гликолипидного гаптена с антителами, но их присутствие необходимо. По-видимому, их роль заключается в том, что они влияют на степень дисперсности липидной суспензии, обеспечивают формирование мультивалентных агрегатов гаптена и определенную ориентацию молекул гаптена в мицелле таким образом, что антигенные детерминанты оказываются на поверхности и могут взаимодействовать с антителами.

Активирующее действие лецитина, по-видимому, обусловлено наличием гидрофильной полярной части, фосфорилхолина, в то время как

жирнокислотный состав не имеет решающего значения [16, 28]. Поэтому лецитин как вспомогательный липид в суспензии ЦХЛ может быть заменен другими полярными липидами или анионными детергентами (табл. 1), которые оказались даже более активными, чем лецитин [3, 29]. А это расширяет методические возможности для выявления и количественной оценки антител к цереброзидам и позволяет использовать методы ракетного и перекрестного иммуоэлектрофореза для иммунохимического изучения неполярных гликолипидных гаптенов—ГалЦ [30].

Таблица 1

Заменители лецитина в реакции иммуопреципитации галактоцереброзидов с антисывороткой в изотонической среде [29]

| Соединения-амфипатки | Оптимальная молярная концентрация | Минимальная эффективная концентрация |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | мкмоль/мл суспензии | |
| I. Липиды-цивтерионы | | |
| Лецитин | 0,2—0,1 | 0,05 |
| Лизолецитин | 0,2—0,1 | 0,05 |
| Сфингомиелин | 0,2—0,1 | 0,05 |
| II. Кислые липиды | | |
| Фосфатидил-серин | 0,2—0,05 | 0,05 |
| Фосфатидил-инозит | 0,2—0,05 | 0,05 |
| Фосфатидная кислота | 0,2—0,05 | 0,0125 |
| Кардиолин | 0,2—0,05 | 0,0063 |
| Сульфocereброзиды | 0,05—0,025 | 0,0125 |
| III. Жирные кислоты | | |
| Миристиновая | 0,2—0,025 | 0,0125 |
| Стеариновая | 0,2—0,025 | 0,0125 |
| Лигноперриновая | 0,2—0,025 | 0,0125 |
| Линоленовая | 0,2—0,025 | 0,0125 |
| IV. Анионные детергенты | | |
| Na-додецилсульфат | 0,2—0,05 | 0,0125 |
| Na-октадецилсульфат | 0,2—0,10 | 0,0125 |

*концентрация липидов в суспензии (цереброзиды-холестерин-амфипатки 0,4:0,8:0,2 М),—0,0063 мкмоль/мл суспензии.

Поиск заменителей другого вспомогательного липида—холестерина—среди 15-ти стероидов и некоторых других гидрофобных соединений (сквален, трилаурат) выявил только два стероида, сравнимых по эффективности с холестерином в реакции ГалЦ с антисывороткой—холестанол, аналог холестерина без двойной связи, и копростанол, L-форма холестерина [31].

Участие вспомогательных липидов или их заменителей необходимо для взаимодействия цереброзидов с антителами не только в реакциях преципитации в геле [3, 13, 17], но также и во всех других иммунологических реакциях, описанных выше. Но для каждого типа реакции оптимальное соотношение цереброзидов и вспомогательных липидов и их количество оказались разными и подбирались эмпирическим путем при обработке методик.

Зона эквивалентности. Известно, что иммунологические реакции максимально проявляются только в определенном диапазоне концентраций антител и антигена, в так называемой зоне эквивалентности [32]. В случае избытка антигена или антител феномен преципитации не развивается, так как образуется растворимый комплекс, не способный агрегировать в крупные конгломераты. В связи с этим в каждом конкретном случае для выявления реакции антиген-антитело эмпирически подбирают зону эквивалентности, тестируя серии разведений антисыворотки против серии разведений антигена. Такие исследования, выполненные с суспензией ЦХЛ и антисыворотками к спинному мозгу и к ГалЦ в РИП [3] и в РСК [2, 14], показали, что ни избыток антител, ни избыток антигена не тормозят реакцию цереброзидов с антителами (рис. 1). Это существенное отличие от белковых антигенов имеет важное практическое значение, так как отпадает необходимость поиска зоны эквивалентности для выявления реакции цереброзидов с антителами и, что еще важнее, повышается надежность выявления антител при любой их концентрации.

Иммунохимическое исследование цереброзидов

Для изучения иммунологической реактивности цереброзидов, определения их антигенной специфичности и антигенных детерминант обычно применяют три методических подхода: 1) исследование перекрестных реакций противocereброзидных сывороток с другими липидами, имеющими сходные черты строения, и реакции цереброзидов с антисыворотками против других липидов; 2) исследование способности различных липидов абсорбировать противocereброзидные антитела и снижать их титры; 3) исследование тормозящего действия различных лигандов на реакции цереброзидов с антисывороткой (гаптенная ингибция).

Перекрестные реакции. Соответствующие исследования, проведенные с антисыворотками против ГалЦ при помощи различных иммунологических реакций (табл. 2), однозначно показали, что все они реагируют только с ГалЦ и МГД [2, 11, 13, 16, 18, 22], очень слабо реагируют с галактозил-сфингозином или психозином [3] и совсем не реагируют ни с ближайшим структурным аналогом, ГлюЦ, ни с цитолипином. Н [2, 11, 13], ни со сфингомиелином, ганглиозидами, керамидом [18]. С другой стороны, показана способность ГалЦ давать перекрестные реакции с антисывороткой к МГД [22]. Отсутствие реактивности с антисыворотками против цитолипинов Н и R [18], сульфocereброзидов [33] и ГлюЦ [6]. Эти результаты свидетельствуют о том, что активность противocereброзидных антител направлена против углеводной части молекулы цереброзидов и о важности положения ОН-группы у С₄ углевода для антигенной специфичности ГалЦ и ГлюЦ и распознавания их антителами.

Не менее важным фактором для антигенной специфичности цере-

брозидов оказалась и конфигурация гликозидной связи. Антисыворотка к ГалЦ, активно реагирующая в РСКЛ с липосомами, содержащими β -D-галактозилцерамид (ГалЦ) и β -D-галактозил-диглицерид, не способна взаимодействовать с α -D-галактозил-диглицеридом [16]. При помощи аффинной хроматографии были выделены высокоочищенные антитела к ГалЦ и исследованы их специфичность и реактивность [26] в реакциях с различными гликофинголипидами, структурно связанными с ГалЦ и имеющими терминальную галактозу, с такими, как глюкозилцерамид; галактозил-церамид-3-сульфат (сульфоцереброзид); галактозил (β 1 \rightarrow 4) глюкозил-церамид (лактозил-церамид); галактозил (α 1 \rightarrow 4)-галактозил (β 1 \rightarrow 4)-глюкозил-церамид (церамид-тригексозил); галактозил (β 1 \rightarrow 3)-ацетилгалактозаминил (1 \rightarrow 4)-N-ацетилнейраминил (α 2 \rightarrow 3)-галактозил (β 1 \rightarrow 4)-глюкозил-церамид (ганглиозид GM 1).

Таблица 2

Перекрестные реакции галактоцереброзидов

| Антисыворотка | Гаптен | Реактивность | Метод выявления | Источник |
|--|------------------|--------------|-------------------------------|-----------------------------|
| К галактоцереброзидам | ГалЦ | ++++ | РСК, РСКЛ РАЛ, РРИП ИФ* | [2, 11, 13] [16, 18, 22] |
| | Сульфоцереброзид | — | РСКЛ | [26] |
| | ГлюЦ | — | РСК | [11, 13] |
| | Цитоплин Н | — | РСК | [2] |
| | ДГД | + | РСКЛ | [16] |
| | β -D-МГД | +++ | РСК, РСКЛ, ИФ | [13, 16, 22] |
| | α -D-МГД | — | РСКЛ | [16] |
| | Ганглиозиды | + | РСКЛ, РАЛ | [16, 18] |
| | Сфингомиелин | — | РАЛ, РРИП | [18] |
| | Церамид | — | РАЛ, РРИП | [18] |
| Психозин | + | РИП | [3] | |
| К глюкоцереброзидам | ГалЦ | — | РСК | [6] |
| | ГлюЦ | ++++ | | |
| К сульфоцереброзидам | ГалЦ | — | РСКЛ | [33] |
| | Сульфоцереброзид | ++++ | | |
| К цитоплину Н | ГалЦ | — | РАЛ, РРИП | [18] |
| | Цитоплин Н | ++++ | | |
| К цитоплину R | ГалЦ | — | РАЛ, РРИП | [18] |
| | Цитоплин R | ++++ | | |
| К дигалактозил-диглицериду | ГалЦ | — | РСКЛ | [16] |
| | ДГД | ++++ | | |
| К β -D-моноголактозилдиглицериду | ГалЦ | +++ | РСК | [22] |
| | МГД | ++++ | | |

*ИФ— метод не прямой иммуофлуоресценции микрокристаллов холестерина, несущих на поверхности ГалЦ.

Оказалось, что ни один из перечисленных гликофинголипидов не реагирует с этими антителами, кроме лактозил-церамида, с которым они дают слабые перекрестные реакции. Однако средство против-ГалЦ антител к лактозил-церамиду оказалось весьма слабым по сравнению с сильным средством к ГалЦ. Эти результаты свидетельствуют о том,

что антитела распознают не любую терминальную галактозу, а только связанную β -гликозидной связью. Кроме того, они распознают и углеводную последовательность, а возможно, что и полярную часть церамида, так как не взаимодействуют с теми гликофинголипидами, у которых терминальная β -галактоза расположена далеко от церамидной части молекулы, как в ганглиозиде G.M1. Иными словами, антигенной детерминантой цереброзидов мозга следует считать галактозу, связанную β -гликозидной связью с церамидом.

Абсорбция антител. В экспериментах с истощением антисывороток к ГалЦ различными липидами было показано, что инкубация сывороток с ГлюЦ, ганглиозидами, церамидом, сфингомиелином и вспомогательными липидами лецитином и холестерином не изменяет уровень специфических антител к ГалЦ, измеренных при помощи различных тестов (табл. 3). Только инкубация антисыворотки со своим гал-

Таблица 3

Истощение антисывороток* к галактоцереброзидам различными липидами

| Галтен | Абсорбция антител к ГалЦ | Метод определения титров антител к ГалЦ | Источник |
|---------------------------|--------------------------|---|----------------------|
| Галактоцереброзиды | ++++ | РА, РСК, РРИП | [15, 13, 20, 27, 34] |
| Глюкоцереброзиды | — | РА, РСК, РРИП | [15, 13, 27, 34] |
| Психозин | + | РАЛ, РРИП | [27, 35] |
| Ганглиозиды | — | РА, РРИП, РАЛ | [15, 27, 34, 35] |
| Лактозил-церамид | + | РАЛ, РРИП | [27, 34] |
| Моногалактозил-диглицерид | ++++ | РАЛ, РРИП | [27, 34] |
| Дигалактозил-диглицерид | + | РАЛ, РРИП | [27] |
| Церамид | — | РАЛ, РРИП | [27] |
| Сфингомиелин | — | РАЛ | [34] |
| Сульфocereброзиды | + | РАЛ, РРИП | [27, 34] |
| Сфингозин | — | РРИП | [27] |
| Холестерин — лецитин | — | | |

Примечание. *все антисыворотки кроличьи

теном, ГалЦ, полностью истощает активность против-ГалЦ антител, а инкубация с МГД резко снижает их титры. Другие липиды, содержащие β -галактозидную группу, — лактозил-церамид, дигалактозил-диглицерид, психозин и сульфocereброзиды — способны абсорбировать лишь очень небольшую часть против-ГалЦ антител и слабо снижают уровень их титров. Сульфocereброзиды не способны реагировать с антителами к ГалЦ [26, 33], и снижение их титров в экспериментах с абсорбцией, по-видимому, происходит в результате неспецифической преципитации сывороточных белков отрицательно заряженными сульфocereброзидами [36].

Галтеновое ингибирование. Способность различных лигандов тормозить реакции антиген-антитело за счет конкурентного связывания с детерминантами Fab-фрагментов антител определяют по снижению титра антител после преинкубации сыворотки с лигандом и оценивают как процент торможения реакции. Если используется реакция двойной

иммунодиффузии, то лиганды добавляют в агар. Исследование галтеновой ингибиции показало, что глюкоза, даже в высокой концентрации (1,0 М) не тормозит связывание против-ГалЦ антител со своим галтеном ни в РИП [3], ни в реакции агглютинации суспензии миелина [15], в то время как галактоза и лактоза проявляют сильное ингибирующее действие уже в сравнительно низкой концентрации 0,25 М, которое с повышением их концентрации усиливается [3]. Кроме того, при помощи теста микрофлуккуляции было показано, что самое сильное тормозящее действие оказывает метил- β -D-галактопиранозид, в то время как метил- α -D-галактопиранозид обладает весьма слабым тормозящим эффектом [3]. Аналогичное исследование выполнено и с антисывороткой к ГлюЦ, выделенным из селезенки быка [6]. Преприкубация разведенной сыворотки с различными концентрациями ксилозы и трех производных галактозы (галактоза, лактоза и метил- β -D-галактопиранозид) не тормозила ее взаимодействия с ГлюЦ. Но глюкоза, целлобиоза и метил- β -D-глюкопиранозид в концентрации свыше 50 мМ тормозили эту реакцию на 75—90%, причем метил- β -D-глюкопиранозид сильнее всех других лигандов. Эти данные подтверждают не только важную роль галактозы как антигенной детерминанты ГалЦ и глюкозы как антигенной детерминанты ГлюЦ, но и вклад β -конфигурации гликозидной связи в антигенную специфичность ГалЦ мозга и ГлюЦ селезенки.

Вопрос о том, как влияет изменение структуры гидрофобной части молекулы на иммунологическую активность цереброзидов, изучен еще недостаточно полно. Наличие жирной кислоты необходимо, так как после удаления ее из молекулы практически теряются антигенные свойства цереброзидов [2, 3]. Но строение жирной кислоты природных цереброзидов не оказывает существенного влияния на их специфичность. Так, найдена одинаковая реактивность препаратов очищенных цереброзидов, содержащих лигноцереновую и цереброновую кислоты, и смешанных цереброзидов из ткани спинного мозга, содержащих насыщенные и ненасыщенные нормальные и оксикислоты, сходная с активностью синтетического керазина при сравнении их в РСК с антисывороткой к ткани бычьего мозга [2, 11]. В реакции двойной иммунодиффузии цереброзиды, содержащие лигноцереновую, цереброновую, нервоновую и оксинервоновую кислоты, дают реакцию идентичности с антисывороткой к спинному мозгу: линии преципитации полностью сливаются, следовательно, ни наличие ОН-группы у C_2 , ни двойная связь не распознаются антителами [3]. Исследование, выполненное с высокоочищенными антителами к ГалЦ в РСК с липосомами, содержащими синтетические цереброзиды с различающимися по длине цепи жирными кислотами, показало, что все они реагируют с антителами, но их реактивность в образовании комплекса антиген-антитело-комплемент повышается с увеличением длины цепи. Однако эта зависимость имеет место лишь для короткоцепочечных (до C_{10}) жирных кислот [28]. Следовательно, жирнокислотная часть молекулы цереброзидов не входит в состав участка антигенных детерминант цереброзидов и ни длина цепи,

ни наличие двойной связи, ни присутствие ОН-группы у С₂ не имеют принципиальной важности для антигенной специфичности цереброзидов и проявления их иммунологической активности. Реактивность цереброзидов как гаптена, по-видимому, может изменяться в зависимости от длины цепи их жирнокислотного радикала [28] и липидного окружения в липосомах [16, 28], но антигенная специфичность цереброзидов определяется углеводным компонентом, β-конфигурацией гликозидной связи и углеводной последовательностью у церамидов, поскольку только эти структурные детали распознаются антителами.

Иммунологическая реактивность цереброзидов, локализованных в мембранных структурах мозга.

На основе реакций противцереброзидных антител с суспензией ЦХЛ *in vitro* нельзя еще ответить на вопрос, способны ли проявлять иммунологическую активность цереброзиды, включенные в естественные мембраны, где они связаны с белково-липидным окружением и определенным образом ориентированы в липидном бислое. Такие факты, как снижение титров противо-ГалЦ антител в РСК после инкубации сывороток с миелином [2], а также агглютинация суспензии миелина в присутствии антисывороток к ГалЦ [13, 15], указывают на возмож-



Рис. 2. Демонстрация иммунореактивности ГалЦ миелина (стрелки) иммунопероксидазным методом. Культура фетального спинного мозга мыши после инкубации с анти-ГалЦ сывороткой кролика и последующей обработки иммунопероксидазным методом [37]. × 500.

ность взаимодействия цереброзидов очищенного миелина со специфическими антителами. Однако иммунологическое поведение очищенного миелина может отличаться от поведения нативной миелиновой оболочки. Для исследования реактивности цереброзидов нативных биологических мембран потребовалась разработка новых методов с использованием приемов иммуноцитохимии, дающих прямые доказательства

иммунореактивности тех или иных компонентов клетки. Так, при помощи метода непрямой иммунофлуоресценции в жидкой среде было показано окрашивание миелинизированных аксонов из мозга мыши при инкубации их с антисывороткой к ГалЦ [22]. Фиксация противогалц-антител на миелиновой оболочке продемонстрирована также при по-

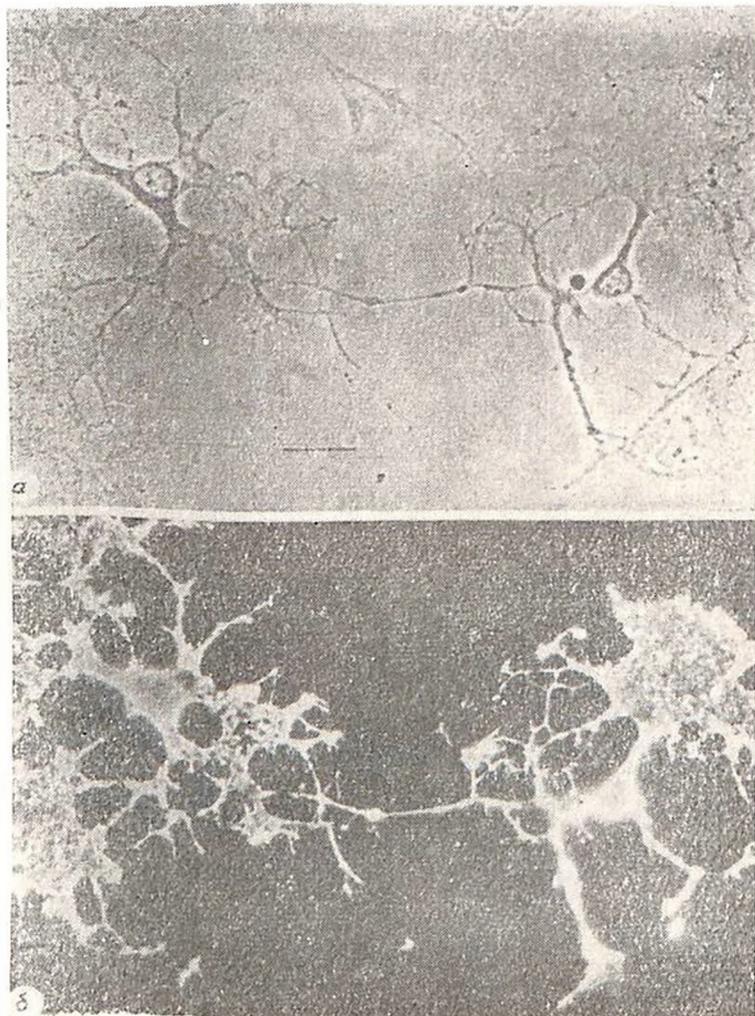


Рис. 3. Фиксация противогалц-антител на олигодендроцитах в культуре ткани мозжечка 5-дневной мыши. Непрямая иммунофлуоресценция (инкубация с кроличьей антисывороткой к ГалЦ, затем с козьей антисывороткой к Ig кролика, конъюгированной с родамином). *a*—фазово-контрастная микроскопия; *b*—флуоресцентная микроскопия того же препарата [39]. Масштаб: линия = 10 мкм.

мощи иммуно-пероксидазного метода (рис. 2) на живой миелинизированной культуре фетального спинного мозга мыши [37]. Поскольку антитела к ГалЦ распознают цереброзиды миелина и реагируют с ними *in situ*, можно сделать вывод, что галактозидная часть молекулы цере-

брозидов, ответственная за реактивность галтена (антигенная детерминанта), расположена на поверхности нативной миелиновой мембраны и доступна действию антител.

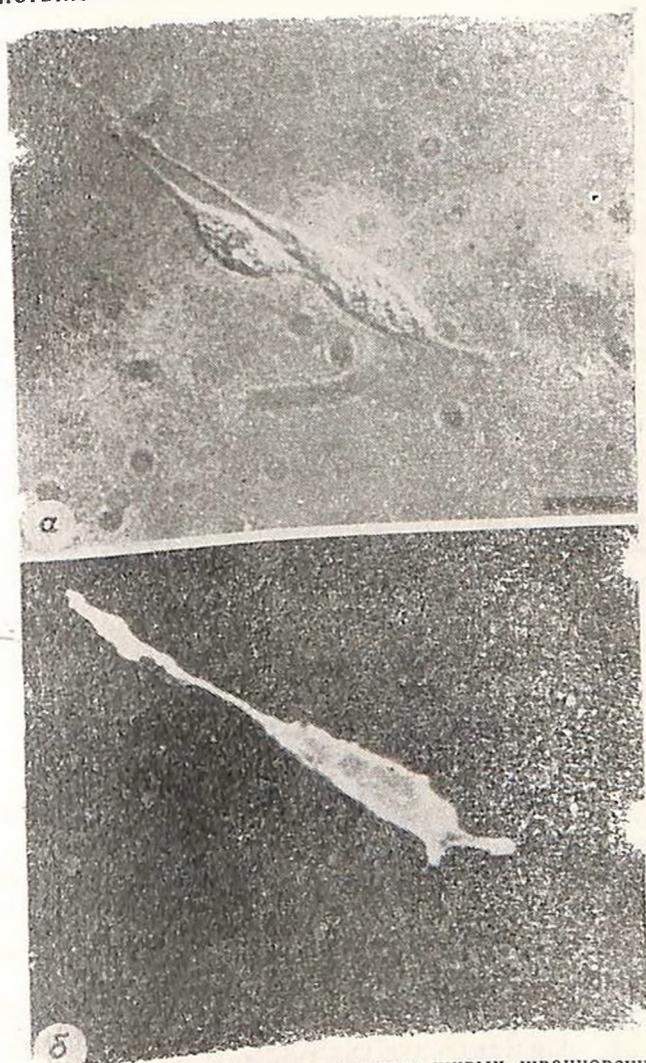


Рис. 4. Демонстрация ГалЦ на поверхности живых шванновских клеток методом непрямой иммунофлуоресценции. Клетки седлищного нерва по-
морожденных крыс в 16—20-часовой культуре после инкубации с
анти-ГалЦ сывороткой кролика, а затем—с конъюгатом козьей антисы-
воротки к IgG кролика с флуоресцентном. *a*—фазово-контрастная микро-
скопия, *с*—флуоресцентная микроскопия того же препарата. Масштаб:
линия = 10 мкм [40].

В связи с тем, что миелиновые оболочки формируются из плазматической мембраны олигодендроцитов (в ЦНС) и шванновских клеток (в периферической НС), несомненный интерес представляло изучение локализации и реактивности цереброзидов клеток-продуцентов миелина. Применение техники непрямой иммунофлуоресценции для исследо-

вания культуры дисперсных клеток нервной ткани позволило выявить фиксацию противогалЦ антител на поверхности олигодендроцитов (рис. 3) головного мозга быка [27], мышцы [38, 39] и крысы [35, 40], а также на поверхности шванновских клеток (рис. 4) бедренного нерва быка [35] и седалищного нерва крысы [40]. Следует подчеркнуть, что антисыворотка к ГалЦ избирательно реагирует только с клетками-продуцентами миелина и не взаимодействует с нейронами, фибробластами, астроцитами, менингеальными клетками. С другой стороны, олигодендроциты фиксируют только антитела к ГалЦ и не реагируют с антисыворотками к мембранным маркерам других клеток нервной ткани. В связи с этим предложено использовать ГалЦ в качестве специфических антигенных маркеров клеточной поверхности для идентификации олигодендроцитов в культуре нервной ткани по их способности фиксировать противогалЦ антитела [38—40].

Антисыворотка к ГалЦ, миелину, ткани спинного мозга, бедренного нерва после истощения галактоцереброзидами утрачивает способность связываться с миелином и клетками-продуцентами миелина. Это послужило решающим аргументом в пользу не раз высказывавшегося предположения, что ГалЦ являются главным, если не единственным поверхностным антигеном, с которым реагируют антисыворотки к нервной ткани.

В условиях *in vitro* и *in vivo* образование комплекса антиген-антитело на поверхности клеточной мембраны, сопровождающееся фиксацией комплемента и его активацией, приводит к цитотоксическому эффекту—повреждению мембраны и лизису клеток [32]. На культуре нервной ткани было неоднократно продемонстрировано миелинотоксическое действие противогалЦ антител: в присутствии комплемента они вызывают повреждение миелина и демиелинизацию вплоть до полного оголения аксона [37, 41—43]. ПротивогалЦ сыворотка приводит также к деградации миелина и *in vitro* при введении в седалищный нерв крысы [44]. Поскольку антитела к ГалЦ обнаруживаются в сыворотке больных рассеянным склерозом и у животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом, можно предположить, что в патогенезе повреждений миелина при аутоиммунных демиелинизирующих заболеваниях важную роль играет сенсибилизация организма к миелин-специфическим липидным антигенам—ГалЦ, приводящая к индукции синтеза противогалЦ аутоантител с выраженным миелинотоксическим действием.

ANTIGENIC PROPERTIES OF BRAIN CEREBROSIDES

TARANOVA N. P.

Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The review covers the immunochemical studies of brain cerebroside, and the methods used for this aim. The necessity of auxiliary lipids as haptens (lecithin and cholesterol) for revealing cerebroside im-

munological reactivity is emphasized. Galactocerebrosides proved to be organ-specific lipid antigens in nervous tissue and antibodies against them are always present in antibrain serum. The structure of cerebroside antigenic determinants is given and the evidence of immunoreactivity of cerebroside within native membranes of myelin sheath and myelin-producing cells are presented. Myelin-toxicity of antigalactocerebroside antibodies suggests their important role in the pathogenesis of autoimmune demyelinating diseases.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Coulton-Morelec M. J., Faure M., Marechal J. Ann. Inst. Pasteur, 114, 6, 775—785, 1968.
2. Rapport M. M., Graf L. Progr. Allergy, 13, 273—331, 1969.
3. Niedieck B. Progr. Allergy, 18, 353—422, 1975.
4. Леурона М. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 18, 6, 573—577, 1982.
5. Tamai Y., Yamakawa T. Japan J. Exp. Med., 33, 2, 143—144, 1968.
6. Zalc B., Dupouey P., Coulton-Morelec M. J., Baumann N. A. Mol. Immunol., 16, 5, 297—300, 1979.
7. Wiegandt H. Adv. Lipid Res., 9, 243—289, 1971.
8. Kishimoto Y.—In: Handbook of Neurochemistry, sec. ed., v. 3. Metabolism in the nervous system (Ed. A. Lajtha), p. 179—199, New York, Plenum Press, 1983.
9. Таранова Н. П. Успехи соврем. биол., 80, 6, 423—440, 1975.
10. Poduslo S. E. J. Neurochem., 24, 647—654, 1975.
11. Joffe S., Rapport M. M., Graf L. Nature (London), 197, 4862, 60—62, 1963.
12. Niedieck B., Lanken K. Klin. Wschr., 39, 22, 1161—1169, 1961.
13. Gregson N. A., Kennedy M., Leibowitz S. Immunology, 26, 4, 743—757, 1974.
14. Niedieck B., Kuwert E. Z. Immun. Forsch., 125, 5, 470—495, 1963.
15. Oxberry J. M., Gregson N. A. Brain Res., 73, 2, 303—313, 1974.
16. Alving C. R., Fowble J. W., Joseph K. C. Immunochimistry, 11, 8, 475—481, 1974.
17. Brady R. O. J. Amer. Oil Chemists Soc., 43, 2, 67—69, 1966.
18. Fry J. M., Lisak P. P., Manning M., Silberberg D. H. J. Immunol. Meth., 11, 2, 185—193, 1976.
19. Dupouey P. J. Immunol., 109, 1, 146—153, 1972.
20. Rapport M. M., Gavanna R., Graf L. J. Neurochem., 14, 1, 9—18, 1967.
21. Gregson N. A., Kennedy M., Leibowitz S. Immunology (London), 22, 4, 501—506, 1971.
22. Dupouey P., Billecocq A., Lefroit M. Immunochimistry, 13, 4, 289—294, 1976.
23. Slovick D. J., Saida T., Lisak R. P., Schreiber A. A. J. Immunol. Meth., 39, 1—2, 31—33, 1980.
24. Graf L., Rapport M. M. Cancer Res., 21, 4, 546—550, 1960.
25. Rapport M. M., Graf L., Yario J. Arch. Biochem., 92, 3, 438—440, 1951.
26. Lisak R. P., Abramsky O., Dorfman S. H., George J., Manning M. C., Pleasure D. E., Saida T., Silberberg D. H. J. Neurol. Sci., 49, 1, 65—73, 1979.
27. Uchida T., Nagai Y. J. Biochem. (Tokyo), 87, 6, 1829—1841, 1980.
28. Uchida T., Nagai Y. J. Biochem. (Tokyo), 87, 6, 1843—1849, 1980.
29. Niedieck B. Immunochimistry, 12, 10, 807—812, 1975.
30. Niedieck B. Immunochimistry, 15, 1, 11—12, 1978.
31. Niedieck B., Kuch U. 13, 9, 765—769, 1976.
32. Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика. М., Медицина, 1976.
33. Uemura K., Yuzawa-Watanabe M., Kitazawa T., Taketomi T. J. Biochem. (Tokyo), 87, 4, 1221—1227, 1980.

34. Saida T., Saida K., Dorfman S. H., Silberberg D. H., Summer A. J., Manning M. C., Lisak R. P., Brown M. J. *Science*, 204, 4397, 1103—1106, 1979.
35. Lisak R. P., Saida T., Kennedy P., Saida K., Silberberg D. H., Leibowitz S. *J. Neurol. Sci.*, 48, 2, 287—296, 1980.
36. Niedieck B. *Immun. Forsch.*, 132, 2, 139—146, 1967.
37. Johnson A. B., Bornstein M. B. *Brain Res.*, 159, 1, 173—182, 1978.
38. Raff M. C., Mirsky R., Fields K. L., Lisak R. P., Dorfman S. H., Silberberg D. H., Gregson N. A., Leibowitz S., Kennedy M. *Nature (London)*, 274, 5673, 813—816, 1978.
39. Raff M. C., Fields K. L., Hakomory S. I., Mirsky R., Pruss R., Winter R. *Brain Res.*, 174, 2, 283—308, 1979.
40. Mirsky R., Wieter J., Abney E. R., Pruss R. M., Garvirilovic J., Raff M. C. *J. Cell Biol.*, 84, 3, 483—494, 1980.
41. Dubois-Dalcq M., Niedieck B., Buyse M. *Path. Europ.*, 5, 3, 331—347, 1970.
42. Fry J. M., Weissbarth S., Lehrer G. M., Bornstein M. B. *Science (New York)*, 183, 4124, 540—542, 1974.
43. Saida T., Silberberg D. H., Fry J. M., Manning M. C. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 36, 3, 627, 1977.
44. Saida K., Saida T., Brown M. J., Silberberg D. H. *Amer. J. Pathol.*, 95, 1, 99—110, 1979.

Поступила 10. X 1983

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ АН АРМЯНСКОЙ ССР ГОТОВИТСЯ К ВЫПУСКУ В 1985 ГОДУ

МИРЗОЯН С. А., АКОПЯН В. П. Влияние гамма-аминомасляной кислоты на мозговое кровообращение. Изд-во АН АрмССР. (на русском языке).—8 л. Тираж 1000 экз. Цена 1 р. 25 к.

Представлены данные об обнаружении ГАМК и ферментов, участвующих в ее обмене в тканях стенок мозговых артерий. Приведены результаты опытов о способности ГАМК выражено усиливать мозговое кровообращение, повышать в нем напряжение кислорода. Рассмотрены особенности ее действия на объемную скорость кровотока и электрическую активность нормальной крови и в очаге судорожной активности. Установлены сравнительные эффекты ГАМК на кровообращение в коре, гипоталамусе и ретикулярной формации ствола мозга. Получены доказательства об участии системы ГАМК в компенсации нарушенной мозговой гемодинамики.

Рассчитана на фармакологов, биохимиков, физиологов, патофизиологов, неврологов.