

Изменение гликофинголипидов в костномозговых предшественниках лимфоцитов, тимоцитах и зрелых лимфоцитах у крыс-опухоленосителей

А.В. Закарян, К.Г. Карагезян, Л.В. Карабашян, Л.М. Овсепян, Г.М. Степанян

Институт молекулярной биологии НАН РА

375014 Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: лимфоцит, гликофинголипид, опухолевый рост

Гликофинголипиды как постоянные компоненты клеточной мембраны в значительной степени определяют ее структурные особенности, участвуют в процессах дифференцировки, апоптоза, клеточного узнавания и проявляют иммуномодулирующие свойства [15,16,18]. Согласно литературным данным, гликофинголипиды и продукты их гидролитического расщепления – сфингозин и керамид обладают способностью изменять активность протеинкиназы С [7] и некоторых видов фосфатаз [4], оказывая тем самым регулирующее воздействие на уровень фосфорилирования рецепторных белков.

Процесс дифференцировки лимфоцитов обеспечивается за счет ростовых факторов в сопровождении последовательной экспрессии на их поверхности гликопротеинов, обозначаемых как CD-антигены. Участие гликофинголипидов в изменении экспрессии гликопротеинов CD3, CD4, CD8 со сдвигом баланса между субпопуляциями является ответственным звеном в регуляторном механизме процесса созревания лимфоцитов [2].

Примечательно отсутствие до настоящего времени определенной научной информации об изученности состава галактозилцерамидов (ГалЦер) и сульфатгалактозилцерамидов (С-ГалЦер) в костномозговых предшественниках лимфоцитов, тимоцитах и зрелых лимфоцитах в норме и при опухолевом росте, что и стало предметом наших специальных поисков в настоящем исследовании.

Материал и методы

Исследования проводили на беспородных белых крысах массой 120–150 г с привитыми клетками саркомы-45 с ярко выраженной опухолью подкожной

клетчатки грудной клетки. В опыт брали животных на 14-е сутки после прививки. В качестве контроля использовали интактных животных. Выделение и очистку костного мозга осуществляли промыванием полостей бедренных и большеберцовых костей охлажденным раствором Хенкса (Sigma). Ткань костного мозга и тимуса гомогенизировали в том же растворе. Костномозговые предшественники лимфоцитов и тимоциты разделяли центрифугированием (40 мин, 1500 об/мин) на градиенте плотности (1.07) фикколл-верографина. Зрелые лимфоциты получали центрифугированием (40 мин, 1500 об/мин) смеси крови с раствором Хенкса (1:1) на градиенте плотности (1.087) фикколл-верографина [11]. Осевшие на градиенте предшественники лимфоцитов, тимоциты и зрелые лимфоциты отделяли и дважды промывали раствором Хенкса. От макрофагов освобождались по их адгезивным свойствам на пластиковых чашках [11].

Из клеток экстрагировали липиды метанол - хлороформной смесью в соотношении 1:2 по методу Фолча. Осадок отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), несколько раз резэкстрагировали, промывали холодной дистиллированной водой и удаляли верхнюю водно-метанольную фазу, содержащую ганглиозиды. Хлороформ-метаноловый экстракт липидов охлаждали и добавляли 4% трихлоруксусную кислоту, оставляли в бане со льдом на 2 часа, периодически встряхивая. После центрифугирования (3000 об/мин, 15 мин) образуется трехфазная система, состоящая из верхнего водного слоя, пленки ГалЦер и С-ГалЦер и нижнего хлороформного слоя. Не разрушая гликофинголипидной пленки, удаляли верхний и нижний слои. Полученные гликофинголипиды подвергали диализу в течение 2 суток, после чего осадок ГалЦер и С-ГалЦер растворяли в 2 мл смеси метанол: хлороформ (1:1), выпаривали при 60°C и проводили двукратную экстракцию кипящим ацетоном. Суммарные гли-

косфинголипиды, растворенные в горячем ацетоне, фильтровали и оставляли на ночь. Выпавший осадок очищенных гликосфинголипидов отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин). Разделение ГалЦер и С-ГалЦер осуществляли методом тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах НРТС (Merck) в системе растворителей: хлороформ : метанол : аммиак (80:20:0,4). Идентификацию проводили с использованием свидетелей (Sigma). Полученные на пластинах пятна элюировали, выпаривали и определяли в них содержание ГалЦер по углеводному компоненту с использованием орцинового реактива при длине волны 505 нм и С-ГалЦер по сульфатной группе в цветной реакции с азуром при длине волны 640 нм [3]. Количество ГалЦер и С-ГалЦер рассчитывали в мкг на 1 мг белка, определяемого по методу Lowry [12]. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и обсуждение

Гликосфинголипиды в костномозговых предшественниках лимфоцитов, тимоцитах и зрелых лимфоцитах представлены пятью фракциями, из которых три фракции соответствуют ГалЦер и две – С-ГалЦер. Из результатов следует, что у здоровых животных (рис.) количественное содержание исследуемых веществ довольно постоянно: только в тимоцитах наблюдали понижение уровня одной фракции ГалЦер и двух С-ГалЦер. В отличие от описанной картины, у крыс-опухоленосителей происходит выраженное снижение гликосфинголипидов в лимфоцитах на всех этапах их дифференцировки по сравнению с теми же клетками интактных животных. В незрелых клетках-предшественниках из костного мозга изменения минимальны и включают только одну фракцию

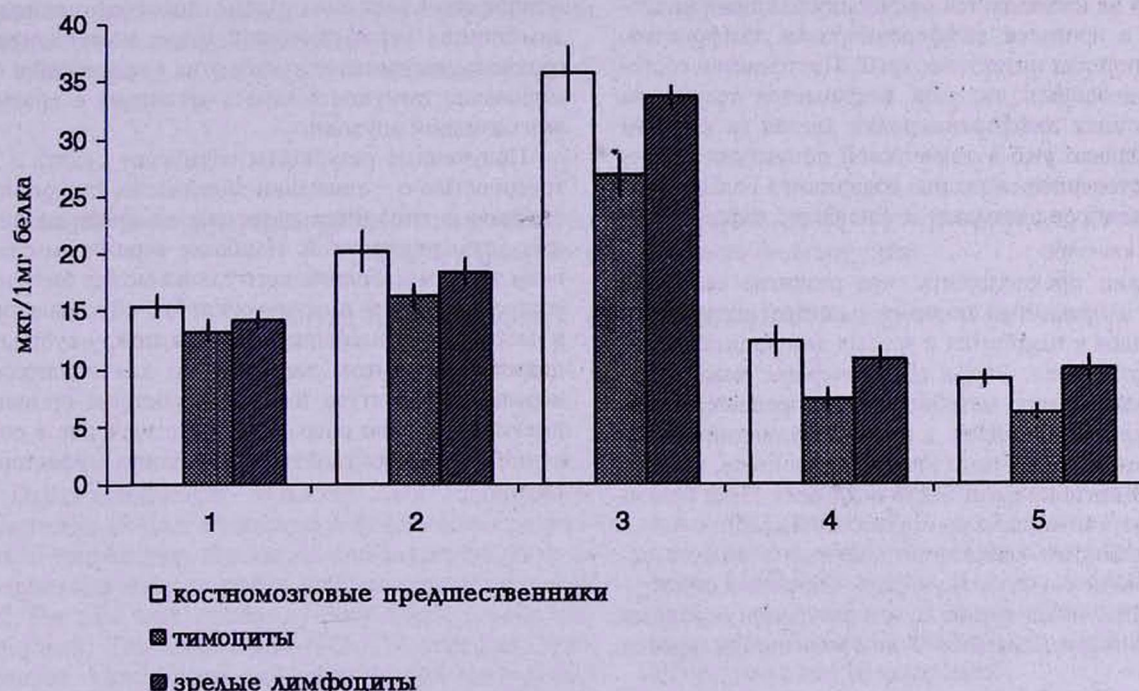


Рис. Содержание гликосфинголипидов в норме (n=8); 1-2 –сульфатгалактозилцерамиды; 3,4,5, –галактозилцерамиды

С-ГалЦер. Однако уже в тимоцитах падение содержания исследованных веществ происходит в четырех фракциях из пяти (статистически недостоверно различие только для ГалЦер-3). В зрелых лимфоцитах периферической крови обнаруживается общее снижение содержания всех фракций гликофинголипидов.

В лимфоцитах здоровых животных на всем протяжении процесса дифференцировки уровень гликофинголипидов весьма стабилен. Исключением является только некоторое падение их содержания в тимоцитах, что, по всей видимости, связано с характерной для тимуса повышенной активностью сфингомилиназы [1], которая расщепляет ГалЦер и С-ГалЦер с образованием сфингозина и церамида [14]. Как известно, в тимусе протекает интенсивный процесс селекции клеток, и 80–85% тимоцитов погибает по пути апоптоза вследствие несовместимости по МНС [8]. В этом процессе участвуют в качестве индукторов апоптоза [9] сфингозин и церамид, с чем, возможно, и связано описанное нами уменьшение уровня гликофинголипидов в тимоцитах.

Напротив, у животных с привитыми клетками саркомы - 45 не наблюдается стабильности гликофинголипидов в процессе дифференцировки лимфоцитов, характерной для интактных крыс. Постоянство состава исследованных липидов сохраняется только на ранних этапах дифференцировки клеток (в костном мозге). Однако уже в тимической популяции происходит достоверное снижение содержания ГалЦер и С-ГалЦер, которое оказывается еще более выраженным в зрелых клетках.

Можно предположить, что развитие солидной опухоли в организме подавляет синтез исследованных липидов в тимоцитах и зрелых лимфоцитах периферической крови. Это, в свою очередь, может привести к накоплению метаболических предшественников гликофинголипидов, а именно сфингозина и церамида, которые, помимо индукции апоптоза, способны также ингибировать клеточный рост [5] и блокировать клеточный цикл на стадии G0/G1 [10].

Метаболизм гликофинголипидов в тимусе играет исключительно важную роль, определяя структуру пула иммунных клеток путем регуляции основных этапов дифференцировки Т-лимфоцитов на уровне

вторичных сфинголипидных мессенджеров [2]. Воздействие на эти процессы ведет к изменению баланса между субпопуляциями лимфоцитов. Так, экзогенный сфингозин *in vivo* снижает число CD3-клеток, блокирует экспрессию CD4 и повышает число клеток CD8. Сходным эффектом обладает и церамид [13]. Не исключено, что обнаруженное нами уменьшение нормального содержания гликофинголипидов в тимоцитах животных-опухоленосителей также будет иметь в результате сдвиг баланса между субпопуляциями лимфоцитов.

Относительно зрелых лимфоцитов известно, что гликофинголипиды способны регулировать их противоопухолевую активность. Было показано [19], что инкубация *in vitro* НТК-киллеров с α -ГалЦером повышает экспрессию γ -ИФН в клетках, в результате чего возрастала их цитотоксическая активность. Инъекция α -ГалЦер мышам-опухоленосителям индуцировала синтез ИЛ-4 и γ -ИФН в натуральных клетках-киллерах [17]. Кроме того, происходило вовлечение в противоопухолевый иммунитет CD8 Т- и В-клеток, что способствовало отторжению опухоли [6]. Обнаруженное нами снижение уровня гликофинголипидов в лимфоцитах периферической крови может косвенно отражать уменьшение вклада этих соединений в формирование иммунного ответа организма в присутствии солидной опухоли.

Полученные результаты позволяют судить с достоверностью о снижении содержания гликофинголипидов в тимоцитах и зрелых лимфоцитах животных-опухоленосителей. Наиболее вероятным следствием этого метаболического сдвига может быть нарушение гомеостаза иммунных клеток, обусловленного, в частности, изменением баланса между субпопуляциями лимфоцитов, характерного для поддержания нормального статуса иммунной системы организма, имеющей, в свою очередь, важное значение в подавлении противоопухолевой активности эффекторных клеток.

Поступила 29.08.02

Ուռուցքակիր առնետների ոսկրածուծի բնային բջիջներում, թիմոցիտներում և հասուն լիմֆոցիտներում գլիկոսֆինգոլիպիդների փոփոխությունը

Գ.Վ. Զաքարյան, Կ.Գ. Կարազյան, Լ.Վ. Կարաբաշյան,
Լ.Ս. Նովոսիլյան, Գ.Ս. Սյրեխանյան

Առողջ և սարկոմա-45 ուռուցքակիր առնետների ոսկրածուծի բնային բջիջներում, թիմոցիտներում և ծայրամասյին արյան հասուն լիմֆոցիտներում հետազոտվել է գալակտոզիլցերամիդների (ԳալՅեր) և սուլֆոգալակտոզիլցերամիդների (Ս-ԳալՅեր) պարունակությունը: Յուրյե է առվել, որ առողջ կենդանիների մոտ լիմֆոցիտների հասունացման ընթացքում ուսումնասիրվող նյութերի քանակը բավականաչափ հաստատուն է, բացառությամբ թիմոցիտների, որոնցում դիտվում է ԳալՅերի՝ մեկ և Ս-ԳալՅերի՝ երկու ֆրակցիաների պարունակության նվազում: Ուռուցքակիր առնետների մոտ քաղցանիկով է վերահիշյալ գլիկոսֆինգոլիպիդների քանակական մակարդակի կտրուկ անկում: Անկման պրոցեսը սկսվում է թիմոցիտար բջիջներում և ավելի զարգանում հասուն լիմֆոցիտներում:

Ենթադրվում է, որ չարորակ նորագոյացության

սլայմաններում այս լիպիդների պարունակության նվազումը նրանց սինթեզի ընկճման հետևանք է: Վերջինս պատճառ է հանդիսանում թիմոցիտների ենթապոպուլյացիաների հավասարակշռության խաթարմանը, և հակաուռուցքային ակտիվությամբ օժտված էֆեկտոր լիմֆոցիտների տարբերակման պրոցեսի խանգարմանը:

Ենթադրվում է, որ չարորակ նորագոյացության սլայմաններում այս լիպիդների պարունակության նվազումը նրանց սինթեզի ընկճման հետևանք է: Վերջինս պատճառ է հանդիսանում թիմոցիտների ենթապոպուլյացիաների հավասարակշռության խաթարմանը, և հակաուռուցքային ակտիվությամբ օժտված էֆեկտոր լիմֆոցիտների տարբերակման պրոցեսի խանգարմանը:

Alterations in glycosphingolipid composition in bone marrow lymphocyte progenitors, thymocytes and mature lymphocytes in cancer-bearing rats

G.V. Zakaryan, K.G. Karagezyan, L.V. Karabashyan, L.M. Hovsepyan, G.M. Stepanyan

Galactosylceramide (GalCer) and sulfagalactosylceramide (S-GalCer) contents in bone marrow progenitors of lymphocytes, thymocytes and mature lymphocytes of intact rats and rats grafted with sarcoma45 were studied. The cells were isolated by Ficoll-Paque density centrifugation. The GalCer and S-GalCer extraction, fractionation, identification and quantification were carried out by thin-layer chromatography. It was shown that the quantity of lipids investigated during lymphocyte differentiation in healthy animals was rather constant. Only in thymocytes a decrease in one fraction of GalCer and two fractions of S-GalCer was observed. In rats grafted with tumor cells a pronounced decrease in glycosphingolipids

took place. It began in thymic population and elevated in mature lymphocytes. It is suggested that the observed in tumor-bearing animals drop of the contents of investigated lipids is a result of their synthesis inhibition. As a sequence, the normal balance between lymphocyte subpopulations may be disturbed and the antineoplastic activity of effector cells may be suppressed.

Литература

1. Мартынова Е. А., Соловьев А. С., Хренов А. В. и др. Биохимия, 1995, 60, с. 618.
2. Мартынова Е. А. Биохимия, 1998, 63, с. 122.
3. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований. Л., 1982.
4. Blobe G. C., Stribling D. S., Fabbro D., Stabel S., Hannun Y. A. J. Biol. Chem., 1996, 271, p. 15823.
5. Borchardt R. A., Lee W. T., Kalen A. et al. Biochim Biophys Acta., 1994, 1212, p. 327.
6. Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H. et al. J. Immunol., 1999, 163, p. 4647.
7. Dekker L. V., Parker P. J. Trends Biochem Sci., 1994, 19, p. 73. Review.
8. Eisen H. N. General Immunology, 1990, IRL press Oxford.
9. Hartfield P. J., Mayne G. C., Murray A. W. FEBS Lett., 1997, 401, p. 148.
10. Jayadev S., Liu B., Bielawska A. E., Lee J. Y. et al. J. Biol Chem., 1995, 270, p. 2047.
11. Klaus G. G. B. Lymphocytes. A practical approach. 1987, IRL press, Oxford.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265
13. Martinova E. A. In: Animal Cell Technology (Carondo M. J. T. Griffiths B. and Moreira J. L. P. eds), 1997, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 625.
14. Mayor S., Presley J. F., Maxfilki F. R. J. Cell Biol., 1993, 121, p. 1257.
15. Merrill A. H. Jr., Hannun Y. A., Bell R. M. Adv Lipid Res., (Review) 1993, 25, p. 1.
16. Shayman J. A. J. Am. Soc. Nephrol., (Review) 1996, 7, p. 171.
17. Singh N., Hong S., Scherer D. C., Serizawa I. et al. J. Immunol., 1999, 163, p. 2373.
18. Spiegel S., Merrill A. H. Jr. FASEB J., (Review) 1996, 10, p. 1388.
19. Van Der Vliet H. J., Nishi N., Koezuka Y., Peyrat M. A. et al. J. Immunology, 1999, 98, p. 557.