



УДК 547.915.5:612.112.94

© 1990 г.

Э. В. Дятловицкая, А. В. Королева, Б. С. Сускова,
В. И. Емец, Л. В. Сутюшева, Л. Д. Бергельсон

ПРОИЗВОДНЫЕ ГАНГЛИОЗИДА GM₃ И ИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Получены производные ганглиозида GM₃ — NeuLacCer, NeuLacSph и NeuAcLacSphAc — и изучены их иммуномодулирующие свойства. Показано, что ингибирование бласттрансформации лимфоцитов этими соединениями не зависит от структуры церамида. Напротив, стимуляция Т-супрессорной активности, индуцированной Con A, значительно зависит от строения керамидного фрагмента этих соединений.

Как было показано нами ранее, ганглиозид GM₃ (NeuAcLacCer, * гематозид) значительно стимулирует активность индуцированных конканавалином А (Con A) Т-супрессоров человека [2]. Механизм этого иммуномодуляторного эффекта остается невыясненным. Одно из возможных предположений состоит в том, что гематозид ингибирует протеинкиназу С, так как активность этого фермента в ряде случаев снижается в присутствии ганглиозидов [3]. Недавно было показано, что сильными ингибиторами протеинкиназы С являются лизосфинголипиды, в том числе лизоганглиозиды [4]. Поэтому представляло интерес выяснить иммуномодулирующий эффект производных ганглиозида GM₃.

С этой целью в настоящей работе получены производные ганглиозида GM₃ — NeuLacCer, NeuLacSph, NeuAcLacSphAc — и изучено действие указанных веществ на бласттрансформацию и Т-супрессорную активность лимфоцитов человека.

Получение производных природного ганглиозида GM₃ проводилось путем его дезацетилирования сиаильного остатка (I), полного дезацилирования с образованием свободных аминогрупп в остатке сиаловой кислоты и сфингозина (II) и ацетилирования последнего (III) (схема).

Дезацетилирование и дезацилирование проводили в одну стадию гидролизом ганглиозида GM₃ с помощью гидроксида тетраметиламмония [5]. При тонкослойной хроматографии в реакционной смеси было обнаружено три вещества: исходный ганглиозид, продукт его дезацетилирования (I) и продукт полного дезацилирования (II) (рисунок). Разделение продуктов реакции удалось осуществить на патроне C₁₈-Sep-Pak, используя в качестве элюирующих систем смеси воды и метанола в различных соотношениях. Ацетилирование соединения (II) проводилось в водно-

Таблица 1
Молярные отношения углеводных фрагментов

Соединения	Glc	Gal	Sia
NeuAcLacCer	1	0,9	0,9
NeuLacCer	1	1,2	0,8
NeuLacSph	1	0,8	0,9
NeuAcLacSphAc	1	0,8	0,8

* Использована номенклатура ганглиозидов, рекомендованная комиссией IUPAC — IUB [1].

**Влияние ганглиозида NeuAcLacCer и его производных на
бласттрансформацию лимфоцитов**

Приведены средние значения из 3–5 экспериментов

Ганглиозиды, нмоль/мл	Включение ^3H -тимидина в лимфоциты, %	
	без стимуляции	стимуляция ФГА
Контроль 1	100	—
Контроль 2	—	100
NeuAcLacCer, 50	95±4	90±6
NeuLacCer (I), 25	89±8	77±5
50	48±5	63±5
NeuLacSph (II), 25	100±4	77±7
50	42±6	63±7
NeuAcLacSphAc (III), 25	85±5	103±9
50	88±8	81±10

ты, а также на их Т-супрессорную активность. Прежде всего с помощью трипанового синего была проверена жизнеспособность клеток в присутствии ганглиозидов в условиях инкубации. При этом было установлено, что после обработки лимфоцитов ганглиозидами процент живых клеток не отличался от контроля (92–97%). Исходный ганглиозид GM₃ и его производное (III), в котором остаток жирной кислоты заменен на ацетильную группу, оказывают лишь незначительный ингибирующий эффект на включение ^3H -тимидина в нестимулированные клетки (табл. 2). Однако дезацетилирование остатка сиаловой кислоты (соединение (I)) приводит к значительному угнетению включения ^3H -тимидина в нестимулированные клетки. Отщепление ацильного остатка от амидной группы, находящейся в керамидной части молекулы ганглиозида (соединение (II)), практически не изменяет ингибирующую активность по сравнению с соединением (I) (табл. 2). При действии ганглиозидов на стимулированные ФГА клетки ганглиозид GM₃ практически неактивен; соединение (III) не влияет на бласттрансформацию лимфоцитов под действием ФГА при концентрации 25 нмоль/мл и оказывает небольшой ингибирующий эффект в концентрации 50 нмоль/мл. В то же время соединения (I) и (II), в молекулах которых имеется одна или две свободные аминогруппы соответственно, проявляют значительное ингибирующее действие на индуцированную ФГА бласттрансформацию (табл. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что величина ацильного остатка в керамидном фрагменте молекулы ганглиозида не оказывает существенного влияния на ингибирующее действие на бласттрансформацию лимфоцитов. Не влияет на этот эффект также появление в сфингозиевом остатке свободной аминогруппы вместо амидной (ср. соединения (I) и (II), схема). Это свидетельствует о том, что угнетающее действие ганглиозида на бласттрансформацию мало зависит от структуры керамидной части молекулы. Ранее было показано, что ингибирование бласттрансформации стимулированных лимфоцитов ганглиозидами обусловлено их взаимодействием с интерлейкином 2 [8–10], которое зависит от структуры углеводных цепей. Полученные нами данные также указывают на то, что супрессорный эффект ганглиозидов зависит от строения углеводной цепи, но не гидрофобной части молекулы.

Что касается влияния изучаемых производных гематозида на Т-супрессорную активность лимфоцитов, то оно весьма существенно отличается от такового исходного ганглиозида. Как было показано нами ранее [2], а также в настоящей работе (табл. 3), гематозид практически не влияет на спонтанные Т-супрессоры (серия 1), но способствует стимуляции

Влияние ганглиозида NeuAcLacCer и его производных на Т-супрессорный эффект, индуцированный ConA

Температура 37° С; приведены средние значения из 3 экспериментов

№ серий опы-тов	Условия инкубации	Включение ³ H-тимидина в клетки, %			
		Конт-роль *	NeuAcLacCer	NeuAcLacSphAc (III)	NeuLacSph (II)
1	0,5·10 ⁶ клеток+гликоли- пиды (48 ч)+0,5·10 ⁶ ал- логенных клеток+ФГА (72 ч)	100	95±6	81±8	88±5
2	0,5·10 ⁶ клеток+ConA+ +гликолипиды (48 ч)+ +0,5·10 ⁶ аллогенных клеток+ФГА (72 ч)	100	54±4	82±1	48±5
3	0,5·10 ⁶ клеток+ConA (48 ч)+гликолипиды (60 мин)+0,5·10 ⁶ кле- ток+ФГА (72 ч)	100	69±4	90±10	60±4

* Контроль — те же условия инкубации без ганглиозидов.

Т-супрессорной активности, индуцированной Con A (серии 2 и 3). Соединение (III), в котором жирнокислотные остатки заменены на ацетильную группу, оказывает незначительный стимулирующий эффект как на спонтанные, так и на индуцированные Con A Т-супрессоры (табл. 3). Это говорит о том, что длина ацильной цепи в керамидной части молекулы может оказывать влияние на иммуномодулирующие свойства ганглиозидов. Вместе с тем полностью дезацилированное производное гематозида (II) стимулирует индуцированные Con A Т-супрессоры практически в той же степени, что и исходный гематозид (табл. 3). Хотя механизмы, лежащие в основе этих различий, пока неясны, результаты настоящей работы открывают возможность стимулировать Т-супрессорную активность лизо-ганглиозидами.

Экспериментальная часть

N-Ацетилнейраминозиллактозилцерамид (гематозид) был выделен из печени человека экстракцией смесью хлороформ — метанол (2 : 1 и 1 : 2) с последующей обработкой общего липидного экстракта 0,21 н. раствором NaOH в метаноле как указано в [11]. Полученную после нейтрализации 0,35 М уксусной кислотой в метаноле, диализа и упаривания смесь жирных кислот, сфинголипидов и холестерина паносили на колонку (2,5×50 см) с силикагелем Л (100—160 мкм) (ЧССР) и последовательно элюировали хлороформом и смесями хлороформ — метанол (9 : 1, 4 : 1, 2 : 1). Ганглиозид вместе со сфингомиелином вымывался последней смесью. Последующая очистка гематозида от сфингомиелина проводилась на колонке (2×30 см) с DEAE-сефадексом А-25 как указано ранее [11].

Нейраминозиллактозилцерамид (I) и нейраминозиллактозилсфингозин (II). Смесь раствора 24 мг *N*-ацетилнейраминозиллактозилцерамида в 2,9 мл *n*-бутанола и 0,32 мл 10 М водного раствора тетраметиламмоний-гидроксида нагревали в запаянной ампуле 8 ч при 120° С, затем упаривали досуха под вакуумом, остаток растворяли в метаноле, нейтрализовали 0,35 М раствором уксусной кислоты в метаноле, вновь упаривали и растворяли в 30 мл воды (концентрация ацетата тетраметиламмония не должна превышать 0,1 М). Половину объема водного раствора 15 мин пропускали через патрон C₁₈-Sep-Pak, после чего остаток солей вымывали 20 мл воды, нейраминозиллактозилсфингозин (II)—10 мл смеси вода — метанол (2 : 8), нейраминозиллактозилцерамид (I)—10 мл метанола. Таким же образом делили вторую часть реакционной смеси. Ход очистки

контролировали ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. аммиак (60 : 35 : 8). Выход нейраминозиллактозилцерамида (I) — 11,3% от суммы липидносвязанных сиаловых кислот, выход нейраминозиллактозилсфингозина (II) — 88,7%.

N-Ацетилнейраминозиллактозил-*N*-ацетилсфингозин (III). Ацетилирование нейраминозиллактозилсфингозина (II) проводили по модифицированному методу [6]. К 14 мг соединения (II), растворенного в 7,6 мл метанола, добавляли 7,6 мл 4% водного раствора NaHCO_3 , смесь охлаждали до 0° С и трижды через каждые 15 мин добавляли по 60 мкл уксусного ангидрида. Затем реакционную смесь выдерживали 30 мин при 20° С. Ход реакции контролировали ТСХ как указано выше. Далее реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 30 мл воды и раствор в течение 15 мин пропускали через патрон C_{18} -Sep-Pak. Оставшуюся соль вымывали 20 мл воды, затем патрон последовательно промывали по 20 мл смеси вода — метанол в разных отношениях. *N*-Ацетилнейраминозиллактозил-*N*-ацетилсфингозин (III) элюировался смесью вода — метанол (4 : 6). Непрореагировавшее соединение (II) и побочные продукты реакции вымывались смесью вода — метанол (2 : 8). Выход соединения (III) 7,5 мг (50% от теоретического).

Углеводные фрагменты полученных продуктов анализировали газожидкостной хроматографией триметилсилиловых эфиров продуктов метанолиза и последующего ацетилирования в хроматографе «Chrom-5» на колонке (2500×3 мм) с 3% OV-1 на хромосорбе W-HP (100/120 меш) при программировании температуры от 170 до 315° С со скоростью 6° С/мин, скорость газа-носителя (гелий) 40 мл/мин.

Изучение влияния ганглиозидов на реакцию бласттрансформации и Т-супрессорную активность лимфоцитов человека проводили описанными ранее методами [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The nomenclature of lipids // J. Lipid Res. 1978. V. 19. № 1. P. 114–128.
2. Дятловицкая Э. В., Сускова В. С., Емец В. И., Королева А. Б., Шальнев Б. И., Бергельсон Л. Д. // Иммунология. 1987. № 5. С. 69–72.
3. Kreutter D., Kim J. Y. H., Goldenring J. R., Rasmussen H., Ukomadu C., DeLorenzo R. J., Yu R. K. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 3. P. 1633–1637.
4. Hannun Y. A., Bell R. M. // Science. 1989. V. 243. № 4890. P. 500–507.
5. Sonnino S., Kirschner G., Ghidoni R., Acquotti D., Tettamanti G. // J. Lipid Res. 1985. V. 26. № 2. P. 248–257.
6. Михалева И. И., Тимофеева Н. Г., Козрев Л. С., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1262–1270.
7. Розынов Б. В., Меримсон В. Г., Королева А. Б., Дятловицкая Э. В. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 548–551.
8. Parker J., Caldini G., Krishnamurti C., Ahrens P. B., Ankel H. // FEBS Lett. 1984. V. 170. № 2. P. 391–395.
9. Merrit W. D., Bailey J. M., Pluznik D. H. // Cell. Immunol. 1984. V. 89. № 1. P. 1–10.
10. Robb R. J. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 3. P. 971–975.
11. Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А. // Прикладная биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. № 3. С. 399–402.

Поступила в редакцию
23.VI.1989

E. V. DYATLOVITSKAYA, A. B. KOROLEVA, V. S. SUSKOVA, V. I. EMEZ,
L. V. SUTYUSHEVA, L. D. BERGELSON

DERIVATIVES OF GANGLIOSIDE GM_3 AND THEIR IMMUNOMODULATING EFFECTS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The derivatives of ganglioside GM_3 — NeuLacCer, NeuLacSph and NeuAcLacSphAc — were obtained and their immunomodulating properties studied. These substances are shown to inhibit lymphocyte blasttransformation independently of their ceramide structure. On the contrary, the stimulation by the above GM_3 -derivatives of Con A-induced T-suppressor activity depends significantly on the structure of their ceramide moiety.