



УДК 577.115.083:577.152.321:577.24

## МОДИФІКАЦІЯ ГЛІКОСФІНГОЛІПІДІВ ГРАНУЛОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПІД ЧАС АПОПТОЗУ

**А. М. Томін<sup>1</sup>, Р. О. Білий<sup>1,2</sup>, Ю. Я. Кім<sup>1</sup>, І. Й. Криль<sup>2</sup>, Т. Д. Баттерс<sup>3</sup>, Р. С. Стойка<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

<sup>3</sup>Oxford Glycobiology Institute, Department of Biochemistry, University of Oxford  
South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom  
e-mail: [amtomyn@gmail.com](mailto:amtomyn@gmail.com)

Раніше було виявлено феномен запрограмованого десіалування глікопротеїнів поверхні клітини під час апоптозу. Проте невідомо, чи може даний процес поширюватися на сіаловані гліколіпіди клітини. Для з'ясування можливих змін спектра глікофінголіпідів за умов апоптозу було використано гранулоцити периферичної крові людини, з яких екстрагували мембранні фракції з подальшою двостадійною хроматографією гангліозидів на колонках із ДЕАЕ-фрактогелем і Сефадексом LH-20 та їхнім аналізом тонкошаровою і високоефективною рідинною хроматографією. Виявлено, що у процесі старіння гранулоцитів периферичної крові людини *in vitro* (протягом 24 год) відбувається зростання рівня гангліозидів GM2, GM1 та глобозиду Gb3 одночасно зі зменшенням рівня GM3 і Gb4 порівняно зі свіжовиділеними клітинами на тлі посилення ознак апоптозу (48–51% клітин проти 0,1–0,2%). Отримані дані свідчать, що гангліозиди, як і N-глікани, зазнають змін (десіалування) при апоптозі клітин людини і можуть слугувати важливими факторами патогенезу при розвитку аутоімунних захворювань.

**Ключові слова:** гангліозиди, апоптоз, десіалування, сіалідази.

### ВСТУП

Глікановий профіль визначає властивості поверхні тваринної клітини. Хоча у більшості клітин основу глікокаліксу формують глікопротеїни та протеоглікани, а гліколіпіди переважають лише у плазмалемі клітин нервової тканини, проте вони завжди присутні й у інших тканинах і є молекулами-посередниками міжклітинних взаємодій у різних тканинах [1]. Одними із ключових сполук у мережі міжклітинних взаємодій є глікофінголіпіди, серед яких вирізняється клас сіалованих гліколіпідів – гангліозиди. Останні можуть брати участь у багатьох міжклітинних взаємодіях. Зокрема, вони задіяні у модулюванні активності НК-лімфоцитів, взаємодіючи через

сіалозв'язуючий лектин І-типу сіглек 7 [2], беруть участь у регенерації мієлінового шару, взаємодіючи через мієлін-асоційований глікопротеїн [1, 3], можуть регулювати активність рецепторів інсуліну та ЕФР, взаємодіючи із тирозинкіназними доменами [3, 4], є лігандами, що розпізнаються різними токсинами прокаріот, а також можуть брати участь у розпізнаванні клітин макрофагами. Біосинтез гангліозидів [5], який у спрощеному вигляді представлено на рис.1, сприяє різноманітності можливих гліканових ланцюгів цих молекул. Синтез гангліозидів починається із загального попередника – лактозилцераміду.

Було встановлено, що під час апоптичної загибелі клітини має місце процес десіалування глікопротеїнів плазмалеми [6]. Проте на сьогодні немає даних про можливі зміни структури сіаловмісних гліколіпідів плазмалеми за умов апоптозу. Враховуючи, що рівень поверхневого сіалування як клітини загалом, так і окремих молекул плазмалеми має велике значення у її комунікації з оточенням (полісіалування трансформованих клітин для їхнього маскування, втрата термінальних сіалових залишків окремими гліканами при адгезії вірусів [7, 8]), повне або часткове десіалування гангліозидів активованими під час апоптозу сіалідазами може бути важливим для розпізнавання гинучої клітини. Нещодавно було показано, що один із гангліозидів – GD1a, – зазнаючи десіалування у процесі активації Т-ефекторних клітин, перетворюється на GM1 і може розпізнаватись галектином-1 інших імунних клітин, відкриваючи TRPC5 кальцієві канали, зупиняючи проліферацію та індукуючи анегію чи апоптоз [9].

Також відомо, що гангліозиди можуть брати участь у патогенезі багатьох захворювань, зокрема, антигангліозидні антитіла часто виявляють у хворих на синдром Гійєна-Барре та на системний червоний вовчак [10, 11]. Раніше було виявлено абзим із сіалідазною активністю, що з'являється у сироватці хворих на множинну мієлому [12], а згодом у хворих на системний червоний вовчак було описано аналогічної дії білок, здатний до *in vitro* відщеплення термінальної сіалової кислоти від молекул гангліозидів [13]. Ці дані свідчать про можливу роль гангліозидів у патогенезі аутоімунних захворювань, що зумовлює необхідність вивчати гангліозидний спектр клітин і його зміни при апоптозі.

Моделлю для вивчення змін глікофінголіпідного профілю клітин за умов апоптозу було вибрано гранулоцити людини, які за індукції запрограмованої загибелі за допомогою старіння дуже рідко зазнають некрозу, а отже, не забруднюють експериментальне середовище внутрішньоклітинними некротичними компонентами.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Усі досліди проводили на матеріалі, отриманому за добровільною згодою клінічно здорових донорів кваліфікованим медичним працівником, згідно з положеннями 4-ї Національної конвенції з біоетики (Київ, 2010). Відпрацьований матеріал знищували згідно з чинними санітарно-епідеміологічними нормами.

Високоєфективну рідинну хроматографію проводили на базі Інституту глікобіології при Оксфордському університеті (Великобританія).

**Виділення гранулоцитів** проводили за процедурою, описаною у [14, 15]. 20 мл крові здорового донора розводили у 10 мл фізіологічного розчину з 10 Од/мл гепарину. Суміш нашаровували на 15 мл фікол-діатризоат градієнта Lymphoflot (Biotest, Німеччина) і центрифугували упродовж 20 хв при 2 000 об/хв. Згодом верхній шар плазми та кільце лімфоцитів і моноцитів над рівнем фіколу відбирали в окремі

пробірки для інших експериментів, а тонкий поверхневий шар гранулоцитів над еритроцитарним осадом відбирали у 50 мл поліпропіленову пробірку. Гранулоцитарно-еритроцитарну суміш ресуспендували у 36 мл холодної стерильної дейонізованої води протягом 20 с для руйнування еритроцитів і додавали 4 мл 10-кратного ЗФР. Суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1800 об/хв. Надосадову рідину зливали, а осад суспендували у 45 мл охолодженої стерильної дейонізованої води протягом 20 с. Для припинення лізису додавали 5 мл 10-кратного ЗФР і знову осаджували протягом 5 хв при 1800 об/хв. Цей крок повторювали до зникнення видимого шару еритроцитів на поверхні гранулоцитарного осаду. Тоді гранулоцити ресуспендували у середовищі RPMI-1640, що містило 10% ембріональної телячої сироватки, підраховували у гемоцитометричній камері й використовували для подальших досліджень як „контроль” або залишали у CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> для зістарювання і перетворення на апоптичні клітини.

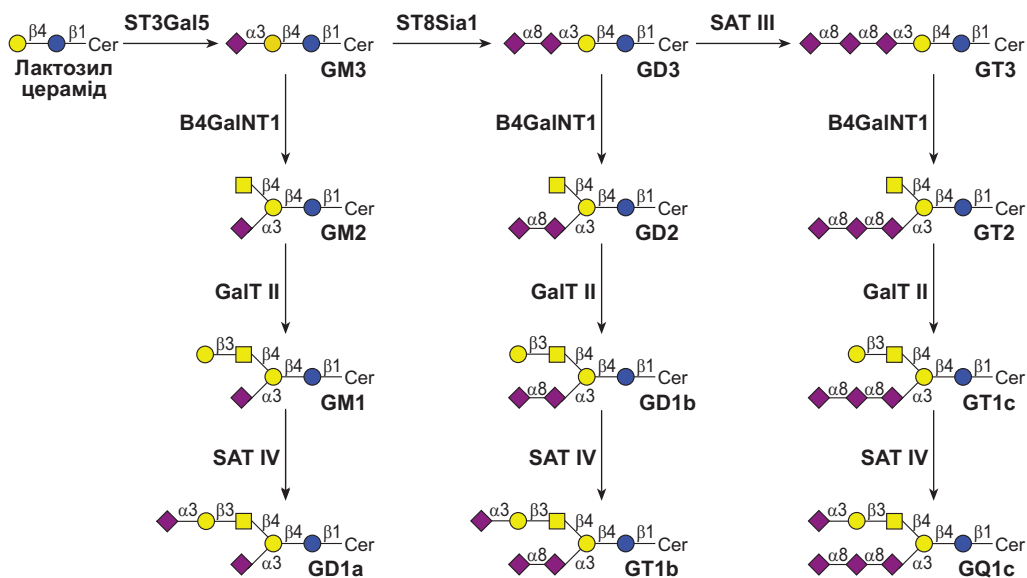


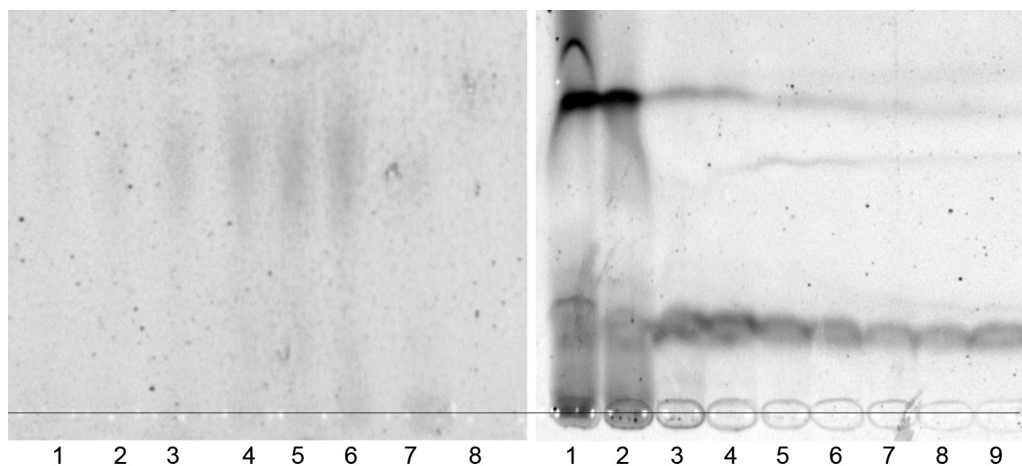
Рис.1. Біосинтез і різноманіття гангліозидів. Схему подано за *T. Kolter et al. JBC, 2002*

Fig. 1. Biosynthesis and diversity of gangliosides (according to *T. Kolter et al. JBC, 2002*)

Контроль вмісту апоптичних клітин у популяції свіжих і зістарених гранулоцитів здійснювали за допомогою методу подвійного фарбування зразка суспензії клітин FITC-міченим анексином V (AnV, для детекції екстерналізованого фосфатидилсерину як маркера апоптозу) та пропідію йодидом (PI). Для цього суспензію із 200 000 гранулоцитів, попередньо двічі відмиту в розчині Рінгера, обробляли 200 нг AnV-FITC і 500 нг PI у 500 мкл розчину Рінгера протягом 30 хв при 4°C. Кількість позитивно забарвлених клітин підраховували на проточному цитофлуориметрі FACS Scan (BD Biosciences) чи Beckot Coulter EpicxXL-MCL.

**Екстракцію та очищення гангліозидів** для аналізу методом тонкошарової хроматографії здійснювали методом, описаним у [16]. Суспензію гранулоцитів людини двічі відмивали ЗФР, після чого осад клітин (20–60 млн) гомогенізували

ультразвуковим диспенсером у 20 об'ємах суміші 2:1 хлороформ:метанол у скляній ємності й залишали на 45 хв при 37°C для екстракції. Згодом екстракт осаджували 10 хв при 5 000 g при 4°C, надосадову рідину відбирали у скляний резервуар і залишали при 4°C; осад повторно гомогенізували у такому ж об'ємі суміші 1:2 хлороформ:метанол, екстрагували при 37°C протягом 45 хв, і згодом центрифугували 10 хв при 5 000 g при 4°C. Надосадові рідини об'єднували, після чого доводили співвідношення хлороформ:метанол:вода до 30:60:8. Водночас готували колонку з DEAE-Fractogel і активували йонообмінний сорбент, промиваючи 5-ма об'ємами 2М оцтової кислоти. Далі сорбент промивали (попередньо) 10-ма об'ємами дистильованої води, метанолу та суміші хлороформ:метанол:вода 30:60:8. Зразок екстракту наносили на колонку й елюювали 15-ма об'ємами розчину хлороформ:метанол:вода 30:60:8 для вимивання нейтральних ліпідів, а згодом 10-кратним об'ємом хлороформ:метанол:0,8 М ацетат натрію. Послідовно зібрані фракції перевіряли на наявність гангліозидів тонкошаровою хроматографією (рис. 2). Вміст сфінголіпідів вирівнювали за поглинанням сфінгозину при 197 нм.



**Рис. 2.** Очищення гангліозидів гранулоцитів людини. Цифрами позначено порядкові номери фракцій елюату. Ліворуч – фракції після елюції із колонки з DEAE-фрактогелем. Праворуч – фракції, елюйовані зі сефадексу LH-20

**Fig. 2.** Purification of human granulocyte. Digits below the chromatogram designate the eluted fraction number. Left figure – elution fractions from DEAE-Fractogel column, right figure – eluates from LH-20 Sephadex

Для кращого вивчення можливого перетворення гангліозидів GD1a та GD2 у GM1 і GM2, відповідно, було використано вдосконалену методику виділення й очищення гангліозидів, описану у [17], яка дає змогу окремо елюювати моно-, ди- та полісіалові гангліози. Для цього сорбований на DEAE-колонку препарат після відмивання від фосфоліпідів і нейтральних сфінголіпідів промивали 20 мМ, 40 мМ та 100 мМ ацетатом амонію, збираючи відповідно елюати гангліозидів із одним, двома, трьома й більше залишками сілової кислоти.

**Тонкошарову хроматографію** проводили на алюмінієвих пластинах, вкритих силікагелем (Kieselgel 60/0,2, Roth, Німеччина) у таких системах розчинників 60:35:8 хлороформ:метанол:вода, 60:40:9 хлороформ:метанол:0,25% CaCl<sub>2</sub> або 7:3 пропанол : 2 М амоній гідроксид [18]. Зразки глікосфінголіпідів наносили на

стартову лінію плямами завширшки 1 мм і завдовжки до 4 мм. У камеру для хроматографії, попередньо насичену парами розчинника, вертикально поміщали пластинку з нанесеними пробами і, стежачи за перебігом просування рухомої фази, виймали її, коли фронт розчинника досягав відмітки за 5 мм від верхнього краю пластинки.

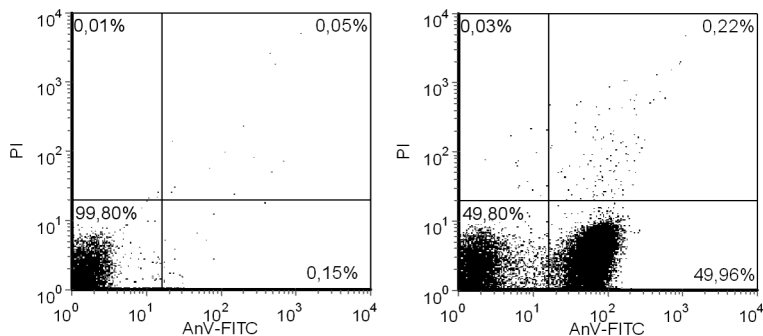
**Хроматограми проявляли** способом, описаним у [19]. Після проведення хроматографії пластинку підсушували до зникнення запаху метанолу і вміщували у камеру із нагрітими до 140°C парами HCl на 10 хв. Опісля хроматограму розглядали при УФ-світлі та сигнал реєстрували у цифровій формі за допомогою сканера флуоресценції Storm 840 (Molecular Dynamics, USA). Даний метод використовували як альтернативу класичному фарбуванню із резорциновим реагентом [20], що за однакових умов виявляв нижчу чутливість проявлення та втрату якості при реєструванні сигналу. Для обробки й аналізу хроматограм використовували програмне забезпечення GelPro.

**Високоєфективну рідинну хроматографію** проводили за методикою, описаною у [21–23]. Зразки для ВЕРХ-аналізу готували таким чином: клітини відмивали двічі у ЗФР, осад ресуспендували у 100 мкл ЗФР, додавали 200 мкл дейонізованої води і проводили три цикли заморожування/розтавання. Тритон X-100 у концентрації 0,1% додавали для покращення руйнування клітин. Додавали 800 мкл метанолу, змішували, додавали 400 мкл хлороформу і збовтували отриману суміш. Екстрагували за умов повільного помішування 30 хв при кімнатній температурі, а після цього осаджували 5 хв при 12 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали і зберігали, а осад розмішували у 100 мкл води, додавали 400 мкл суміші 1:2 хлороформ:метанол і повторювали вищеприписану процедуру екстракції. Екстракти об'єднували і додавали до них 0,5 мл хлороформу та 0,5 мл ЗФР, змішували і центрифугували до чіткого розділення фаз. Відбирали верхню водну фазу, а нижню – органічну – висушували під струменем азоту. Сухий залишок розчиняли у 150 мкл суміші 1:3 хлороформ:метанол і висушували.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

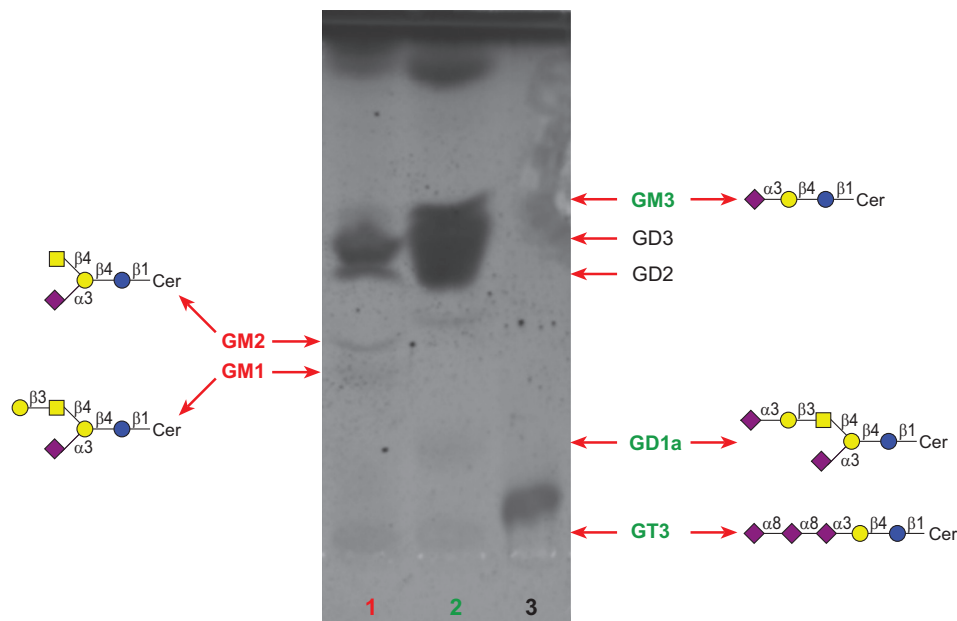
Препарати гангліозидів, виділені з нормальних і апоптичних (зістарених) гранулоцитів було проаналізовано тонкошаровою хроматографією. Вміст гинучих клітин у популяції свіжовиділених гранулоцитів становив 0,1–0,2% і зростав після зістарювання упродовж 24 годин до 48–51%, тоді як рівень некротичних клітин в обох популяціях не підвищувався більш ніж до 0,5% (рис. 3). Низький рівень некрозу робить дану модель ідеальною для вивчення змін у молекулярному складі клітин під час апоптозу, оскільки клітини, не зазнаючи некротичної загибелі, не забруднюють експериментальне середовище внутрішньоклітинними (некротичними) компонентами.

Виявлено, що під час апоптозу відбувається зміна спектра глікофінголіпідів апоптичних клітин. Зокрема, як видно із рис. 4, під час апоптозу знижується рівень гангліозидів GT3 та GM3, що може бути спричинене активацією специфічних клітинних ферментів. У тваринних клітинах міститься 4 різних типи сіалідаз, із котрих одна – Neu3 – відома здатністю до відщеплення сіалової кислоти від гангліозидів [24]. Оскільки раніше було показано, що інша сіалідаза – Neu 1 активується у процесі запрограмованої загибелі клітини і також перебуває на поверхні плазматичної мембрани клітини [6], можна припустити, що вона також здатна брати участь у десіалюванні гангліозидів під час апоптозу.



**Рис. 3.** Проточна цитофлуориметрія зразків свіжовиділених (ліворуч) та зістарених протягом 24 год (праворуч) гранулоцитів людини. За таких умов вміст клітин із екстерналізованим фосфатидилсерином зростає до половини загальної популяції, тоді як рівень некротичних клітин залишається низьким – не більше 0,5%

**Fig. 3.** Flow cytometry of fresh isolated (left) and aged for 24 h (right) human granulocytes. The level of PS-externalising cells increases to the half of total population, yet the necrosis level stays quite low – less than 0.5%

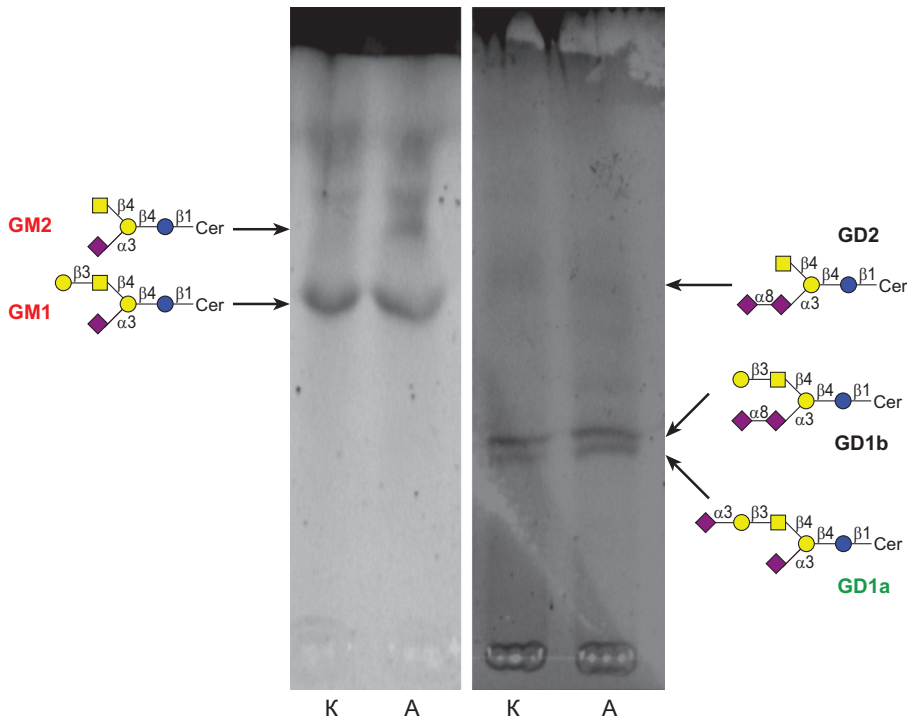


**Рис. 4.** Тонкошарова хроматографія гангліозидів гранулоцитів людини. Нерухома фаза: силікагель 60/0,2 мм. Рухома фаза – хлороформ : метанол : 0,25%  $\text{CaCl}_2$  (60:40:9). 1 – гангліозиди, виділені з апоптичних клітин; 2 – контроль (гангліозиди, виділені з інтактних клітин); 3 – N-ацетилнейрамінова кислота

**Fig. 4.** TLC of gangliosides from human granulocytes. Stationary phase: Silica gel 60/0.2 mm. Mobile phase: chloroform:methanol:0.25%  $\text{CaCl}_2$  (60:40:9). 1 – gangliosides from intact cells; 2 – gangliosides from aged (apoptotic) cells; 3 – N-acetylneuraminic acid

Також видно, що під час апоптозу має місце підвищення рівня гангліозидів GM1 та GM2. Після ізоляції індивідуальних фракцій моно- та дисіалових гангліозидів зі свіжовиділених і зістарених гранулоцитів окремо попарно було проаналізовано

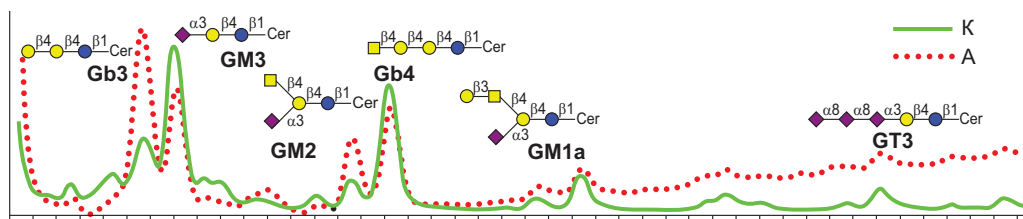
зразки аналогічних фракцій гангліозидів контрольних і апоптичних клітин. Даним методом підтверджено, що у апоптичних клітин зростає рівень GM2 і спадає рівень GD1a (рис. 5). Виявлене спадання рівня дисіалового гангліозиду підтверджує можливу причину зростання GM1 як наслідок безпосереднього десіалювання активованою за умов апоптозу сіалідазою.



**Рис. 5.** Тонкошарова хроматографія фракцій моносіалових (ліворуч) та дисіалових (праворуч) гангліозидів із гранулоцитів людини. Нерухома фаза: силікагель 60/0,2 мм. Рухома фаза – пропанол:2М амоній гідроксид (7:3). К – інтактні гранулоцити (контроль); А – зістарені гранулоцити. Очевидним є зменшення рівня гангліозиду GD1a та зростання рівня GM2 за умов апоптозу

**Fig. 5.** TLC of monosialic (left) and disialic (right) gangliosides from human granulocytes. Stationary phase: Silica gel 60/0,2 mm. Mobile phase: propanol:2M ammonia hydroxyde (7:3). K – intact (fresh) and A – apoptotic (aged) cells. Obviously, GD1a decreases and GM2 increases during apoptosis

Одержані методом тонкошарової хроматографії результати було підтверджено за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (рис. 6). Видно, що рівень вмісту гангліозидів GT3 та GM3 спадає водночас зі зростанням вмісту моносіалових гангліозидів GM1 та GM2. З огляду на схему синтезу гангліозидів (рис. 1), зростання рівня GM1 може бути пов'язане з інактивацією ензиму ST8Sia1, що перенаправляє мережу біосинтезу на  $\alpha$ -гілку, тобто на послідовне перетворення GM3→GM2→GM1→GD1a, як це описано для процесу взаємодії T-ефекторних (T-цитотоксичних) клітин із T-регуляторними (T-супресорами) [9]. У T-ефекторних клітин після активації зростає рівень експонування гангліозиду GM1, що, димеризуючись, у комплексі з інтегрином розпізнається галектином-1 активованої T-регуляторної клітини. Згадане зростання вмісту поверхневого GM1 забезпечується головно двома шляхами – синтезом *de novo* із GM3 та десіалюванням GD1a



**Рис. 6.** ВЕРХ-аналіз гангліозидів із інтактних і апоптичних гранулоцитів. Зверху – хроматограма стандартів глікофінголіпідів із позначеннями останніх. Нижче: К – гангліозиди свіжовиділених клітин; А – гангліозиди апоптичних клітин. Відповідні стандартам речовини, вміст яких змінюється під час апоптозу, позначено формулами

**Fig. 6.** HPLC analysis of gangliosides from human granulocytes. Upper – chromatogram of GSL standards, with their structures. Lower: K – gangliosides of intact cells; A – gangliosides of apoptotic cells. The substances, which level changes in apoptosis, marked with symbolic representation

сіалідазою. Проте наявні дані свідчать про відсутність біосинтетичних процесів [25], зокрема синтезу гліканів під час запрограмованої загибелі клітини [6], оскільки раніше було встановлено, що зміни у поверхневому глікозилюванні за умов апоптозу проявляються навіть за інгібування везикулярного транспорту. Водночас, зважаючи на описане явище активації поверхневих сіалідаз при апоптозі [6, 26], саме цим явищем можна пояснити зміну спектра гангліозидів (появу десіалованих форм) на апоптичних клітинах.

## ВИСНОВКИ

Під час апоптозу відбувається зміна гангліозидного спектра гранулоцитів людини, зокрема знижується рівень полісіалового гангліозиду GT3; також має місце підвищення вмісту GM1, ймовірно, як наслідок десіалювання гангліозиду GD2, рівень вмісту якого знижується під час апоптичної загибелі клітини. Отже, зміни гліколіпідного профілю гинучої клітини можуть бути пов'язані з десіалюванням вуглеводних частин гангліозидів.

1. Lopez P.H., Schnaar R.L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 2009; 19(5): 549–57.
2. Nicoll G., Avril T., Lock K. et al. Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. **Eur. J. Immunol.** 2003; 33(6): 1642–8.
3. Yoon S.J., Nakayama K., Hikita T. et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2006; 103(50): 18987–91.
4. Nojiri H., Stroud M., Hakomori S. A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. **J. Biol. Chem.** 1991; 266(7): 4531–7.
5. Kolter T., Proia R.L., Sandhoff K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. **J. Biol. Chem.** 2002; 277(29): 25859–62.
6. Bilyy R.O., Shkandina T., Tomin A. et al. Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. **J. Biol. Chem.** 2012; 287(1): 496–503.
7. Traving C., Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. **Cell Mol. Life Sci.** 1998; 54(12): 1330–49.
8. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 2009; 19(5): 507–14.



9. *Ledeer R.W., Wu G., Andre S.* et al. Beyond glycoproteins as galectin counterreceptors: effector T cell growth control of tumors via ganglioside GM1. **Ann. NY Acad. Sci.**, 2012; 1253: 206–21.
10. *Uncini A.* A common mechanism and a new categorization for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. **Exp. Neurol.**, 2012; 235(2): 513–6.
11. *Labrador-Horrillo M., Martinez-Valle F., Gallardo E.* et al. Anti-ganglioside antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and neurological manifestations. **Lupus**, 2012; 21(6): 611–5.
12. *Bilyy R., Tomin A., Mahorivska I.* et al. Antibody-mediated sialidase activity in blood serum of patients with multiple myeloma. **J. Mol. Recognit.**, 2011; 24(4): 576–84.
13. *Bilyy R., Tomin A., Tolstyak Ya.* et al. Cell Surface Glycans at SLE – Changes During Cells Death, Utilization for Disease Detection and Molecular Mechanism Underlying Their Modification. **Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects**, 2011: 89–110.  
<http://www.intechopen.com/books/autoimmune-disorders-pathogenetic-aspects/cell-surface-glycans-at-sle-changes-during-cells-death-utilization-for-disease-detection-and-molecul>
14. *Haslett C., Guthrie L.A., Kopaniak M.M.* et al. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. **Am. J. Pathol.**, 1985; 119(1): 101–10.
15. *Newman S.L., Henson J.E., Henson P.M.* Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, 1982; 156(2): 430–42.
16. *Suzuki K., Poduslo S.E., Norton W.T.* Gangliosides in the myelin fraction of developing rats. **Biochim. Biophys. Acta**, 1967; 144(2): 375–81.
17. *Yu R.K., Ariga T.* Ganglioside analysis by high-performance thin-layer chromatography. **Methods Enzymol.**, 2000; 312: 115–34.
18. *Svennerholm L.* Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. **J. Neurochem.**, 1963; 10: 613–23.
19. *Hayakawa T., Hirai M.* An assay of ganglioside using fluorescence image analysis on a thin-layer chromatography plate. **Anal. Chem.**, 2003; 75(23): 6728–31.
20. *Svennerholm L.* The Gangliosides. **J. Lipid Res.**, 1964; 5: 145–55.
21. *Fredman P., Nilsson O., Tayot J.L., Svennerholm L.* Separation of gangliosides on a new type of anion-exchange resin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1980; 618(1): 42–52.
22. *Norris-Cervetto E., Callaghan R., Platt F.M., Dwek R.A., Butters T.D.* Inhibition of glucosylceramide synthase does not reverse drug resistance in cancer cells. **J. Biol. Chem.**, 2004; 279(39): 40412–8.
23. *Bigge J.C., Patel T.P., Bruce J.A.* et al. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. **Anal. Biochem.**, 1995; 230(2): 229–38.
24. *Monti E., Bassi M.T., Papini N.* et al. Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane. **Biochem. J.**, 2000; 349(Pt 1): 343–51.
25. *Ullmannova V., Haskovec C.* The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. **Folia Biol. (Praha)**, 2003; 49(6): 211–6.
26. *Papini N., Anastasia L., Tringali C.* et al. The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions. **J. Biol. Chem.**, 2004; 279(17): 16989–95.

---

## APOPTOTIC MODIFICATION OF GLYCOSPHINGOLIPIDS OF HUMAN GRANULOCYTES

**A. M. Tomin<sup>1</sup>, R. O. Bilyy<sup>1,2</sup>, Yu. Ya. Kit<sup>1</sup>, I. J. Kriř<sup>2</sup>, T. D. Butters<sup>3</sup>, R. S. Stoika<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>2</sup>*Lviv National Medical University, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

<sup>3</sup>Oxford Glycobiology Institute, Department of Biochemistry,  
University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom  
e-mail: amtomyn@gmail.com

The phenomenon of programmed apoptotic desialylation of cell glycans was described previously. However, the possibility of this process application to the sialylated glycolipids of membranes stays unknown. Granulocytes of human peripheral blood were utilized as a model for studying glycosphingolipid spectra changes. Ganglioside fractions were extracted from the granulocytes and purified by two-stage column chromatography – DEAE-Fractogel and Sephadex LH-20 sorbents, with subsequent analysis by thin-layer and high-performance liquid chromatography. An increased level of GM2, GM1 ganglioside and Gb3 globoside in apoptotic cells, as well as a decrease of GM3, GT3 and Gb4 amount were detected. These results draw to a conclusion that gangliosides, as well as N-glycans, might be a target of apoptotic desialylation. According to available recent data, changes in gangliosides can serve as important pathogenesis factors in the autoimmune disorders.

**Keywords:** gangliosides, apoptosis, desialylation, sialidases.

## МОДИФИКАЦИЯ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДОВ ГРАНУЛОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ВО ВРЕМЯ АПОПТОЗА

А. М. Томин<sup>1</sup>, Р. О. Билый<sup>1,2</sup>, Ю. Я. Ким<sup>1</sup>,  
И. Й. Криль<sup>2</sup>, Т. Д. Баттэрс<sup>3</sup>, Р. С. Стойка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Львовский национальный медицинский университет  
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина

<sup>3</sup>Oxford Glycobiology Institute, Department of Biochemistry  
University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom  
e-mail: amtomyn@gmail.com

Ранее был установлен феномен запрограммированного десалирования гликопротеинов клетки во время апоптической гибели. Однако не установлено, распространяется ли данный процесс на салированные гликолипиды клетки. Для выяснения возможных изменений спектра гликофинголипидов во время апоптоза использовали гранулоциты периферической крови человека, из которых экстрагировали мембранные фракции, с последующей двустадийной хроматографией ганглиозидов на колонках с ДЭАЭ-фрактогелем и Сефадексом LH-20 и их анализом при помощи тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показано повышение уровня ганглиозидов GM2, GM1 и глобозида Gb3 в апоптических клетках одновременно с уменьшением содержания в них GM3, GT3 и Gb4 в сравнении с интактными клетками. Полученные данные свидетельствуют о том, что ганглиозиды, как и N-гликаны, претерпевают изменения (десалирование) при апоптозе клеток человека и могут служить важными факторами патогенеза при развитии аутоиммунных заболеваний.

**Ключевые слова:** ганглиозиды, апоптоз, десалирование, салидазы.

Одержано: 05.07.2012