



УДК 577.115.5+593.96-147.62.088

ГАНГЛИОЗИДЫ С 8-О-МЕТИЛ-N-ГЛИКОЛИЛНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНОМ ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *Asterias rathbuni*

© 1996 г. Н. В. Чекарева, Г. П. Смирнова[#], В. Л. Садовская*

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский просп., 47;

* ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва

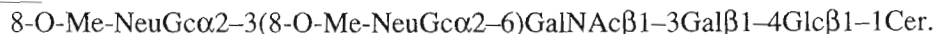
Поступила в редакцию 23.05.95 г.

Из печени морской звезды *Asterias rathbuni* выделены ганглиозиды, структура которых установлена с помощью химических методов, масс-спектрометрии и ферментализации нейраминидазой. Показано, что главным является дисиалоганглиозид, в котором два остатка 8-О-метил-N-гликолилнейрамино-вой кислоты присоединены к одному остатку N-ацетилгалактозамина: 8-О-Ме-NeuGcα2-3(8-О-Ме-NeuGcα2-6)GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer. В состав липидной части входят незамещенные высшие жирные кислоты (преимущественно пальмитиновая и стеариновая) и сфингозины (главным образом C₂₀ и C₂₂). Фракция минорных ганглиозидов включает два моносиалоганглиозиды, углеводные цепи которых различаются только местом присоединения концевой 8-О-метил-N-гликолилнейра-миновой кислоты к N-ацетилгалактозамину: 8-О-Ме-NeuGcα2-3GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer и 8-О-Ме-NeuGcα2-6GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer. Определен состав высших жирных кислот ми-норных ганглиозидов.

Ключевые слова: ганглиозиды, морские звезды, 8-О-метил-N-гликолилнейраминовая кислота, *Asterias rathbuni*.

Ранее мы показали, что олигосахаридные цепи ганглиозидов морских звезд разнообразны по структуре и в отличие от ганглиозидов морских ежей не имеют общего типа структуры, характерного для этого класса иглокожих [1 - 3]. Наибольшие отличия в структуре наблюдаются для ганглиозидов морских звезд разных отрядов, но даже близкие в таксономическом отношении морские звезды (представители одного семейства) могут содержать ганглиозиды, углеводные цепи которых различаются моносахаридным составом и местом присоединения сиаловых кислот. По-видимому,

только ганглиозиды морских звезд одного рода могут иметь углеводные цепи одинаковой структуры, характерной для этого рода. Так, мы обнаружили, что главные ганглиозиды двух видов морских звезд рода *Asterias*, *A. amurensis* [4] и *A. rubens* [5], имеют идентичные углеводные цепи необычной структуры: они включают в себя концевой трисахаридный фрагмент, содержащий два остатка 8-О-метил-N-гликолилнейраминовой кислоты, которые связаны с одним и тем же остатком N-ацетилгалактозамина. Этот фрагмент присоединен к О-3 галактозы лактозного остатка, лежащего в начале цепи:



Для того чтобы выяснить, характерна ли такая структура для углеводных цепей ганглиозидов морских звезд рода *Asterias*, мы продолжили исследование ганглиозидов морских звезд этого рода. В настоящей работе приведены данные по структуре ганглиозидов морской звезды *A. rathbuni*.

Морские звезды *A. rathbuni* были собраны у берегов Камчатки. Препарат полярных липидов, полученный из общего липидного экстракта печени морских звезд как описано ранее [6], по данным ТСХ, содержал два ганглиозиды – главный и минорный, а также фосфолипиды, нейтральные

липиды и пигменты. Дальнейшее выделение ганглиозидов проводили ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой, элюируя кислые гликолипиды растворами ацетата аммония в метаноле [7]. Минорный ганглиозид элюировали 0.025 М AcONH₄ в метаноле как моносиалоганглиозид, а главный – 0.1 М AcONH₄ как дисиалоганглиозид. Окончательную очистку ганглиозидов проводили препаративной ТСХ на силикагеле. В результате были получены препараты главного и минорного ганглиозидов в мольном соотношении 37.5 : 1 (по сиаловой кислоте).

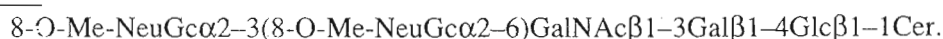
Структура олигосахаридной цепи ганглиозидов была изучена с помощью частичного и полного

[#] Автор для переписки.

кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного расщепления и окисления хромовым ангидридом. Для анализа липидной части использовали метанолит и окисление системой KIO_4 - $KMnO_4$.

Структура главного ганглиозида. По результатам полного кислотного гидролиза, ганглиозид содержит глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин в мольном соотношении 1 : 1 : 1. При частичном кислотном гидролизе отщепляется сиаловая кислота, количество которой вдвое больше, чем каждого из нейтральных моносахаридов, и образуется асиалоганглиозид, подвижность которого при ТСХ совпадает с подвижностью N-ацетилгалактозаминил-лактозилцерамида, выделенного нами ранее из ганглиозида морской звезды *A. amurensis* [4]. С помощью полного кислотного гидролиза показано, что этот асиалоганглиозид также содержит N-ацетилгалактозамин, глюкозу и галактозу. Сиаловая кислота, выделенная из гидролизата ионообменной хроматографией, при ТСХ на силикагеле имела подвижность, близкую к подвижности N-ацетилнейраминовой кислоты. Для определения структуры сиаловой кислоты использовали масс-спектрометрический анализ ациклического производного, полученного после обработки сиаловой кислоты KBH_4 и диазометаном и ацетилирования [8]. Было обнаружено одно производное сиаловой кислоты, масс-спектр которого соответствовал метиловому эфиру 5-(ацетоксиацетамидо)-2,4,6,7,9-пента-O-ацетил-8-O-метил-3,5-дидезоксиноновой кислоты [4]. Следовательно, в состав ганглиозида входит 8-O-метил-N-гликолилнейраминовая кислота.

Для определения последовательности моносахаридов в углеводной цепи и мест их замещения использовали тридейтерометилирование. Анализ тридейтерометилированного ганглиозида с помощью масс-спектрометрии (техника LSIMS) показал присутствие пиков ионов с m/z 424 и 1084, соответствующих концевой 8-O-метил-N-гликолилнейраминовой кислоте и трисахаридному фрагменту, содержащему два остатка 8-O-Me-NeuGc и один остаток HexNAc. В спектре отсутствует пик иона с m/z 830, который должен соответствовать дисиалильному фрагменту 8-O-Me-NeuGc-8-O-Me-NeuGc. Следовательно, в ганглиозиде остатки сиаловых кислот не связаны друг с другом, а присоединены к одному остатку N-ацетилгалактозамина. В спектре имеется также пик иона с m/z 1297, соответствующий тетрасахаридному фрагменту



Состав липидной части ганглиозида определен с помощью метанолиза и периодат-перманганатного окисления. В продуктах метанолиза были обнаружены метиловые эфиры незамещенных

(8-O-Me-NeuGc)₂HexNAcHex. Производное сиаловой кислоты, полученное после метанолиза тридейтерометилированного ганглиозида, по данным ГЖХ-масс-спектрометрии, имеет структуру метилового эфира метилкетозида 4,7,9-три-O-тридейтерометил-8-O-метил-5-N-тридейтерометил-N-(тридейтерометилгликолил)нейраминовой кислоты [4]. Эти данные подтвердили, что в состав ганглиозида входит 8-O-Me-NeuGc, оба остатка которой занимают концевое положение в цепи. Места замещения глюкозы, галактозы и N-ацетилгалактозамина определяли после ацетилизации тридейтерометилированного ганглиозида, последующего гидролиза, восстановления образовавшихся производных сахаров KBH_4 и ацетилирования. Полученные частично тридейтерометилированные ацетаты полиолов анализировали с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. Анализ показал, что остаток глюкозы замещен в положение 4, остаток галактозы – в положение 3, а остаток N-ацетилгалактозамина – в положения 3 и 6.

Для определения последовательности остатков глюкозы и галактозы в углеводной цепи ганглиозид подвергли мягкому метанолизу, при котором наряду с тригексозилцерамидом образуется дигексозилцерамид. Он был выделен из метанолизата с помощью диализа и препаративной ТСХ и метилирован. Анализ частично метилированных ацетатов гекситов, полученных после ацетилизации метилированного дигексозилцерамида, последующего гидролиза, восстановления KBH_4 и ацетилирования, показал, что остаток галактозы является концевым, а остаток глюкозы замещен в положение 4 и, следовательно, расположен в начале цепи.

Для определения конфигурации кетозидных связей сиаловых кислот ганглиозид инкубировали с нейраминидазой из *Vibrio cholerae*. Оба остатка сиаловой кислоты отщепились; следовательно, они соединены α -кетозидными связями. Для определения конфигурации гликозидных связей глюкозы, галактозы и N-ацетилгалактозамина тригексозилцерамид, полученный после частичного кислотного гидролиза ганглиозида, ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. Поскольку при окислении все три сахара разрушились практически полностью, сделан вывод, что они соединены β -гликозидными связями.

На основании полученных данных для главного ганглиозида морской звезды *A. rathbuni* предложена структура

высших жирных кислот и сфингозин. Анализ метиловых эфиров кислот с помощью ГЖХ показал, что около 90% кислот составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты (см. табл. 1). Для

Таблица 1. Состав высших жирных кислот ганглиозидов морской звезды *Asterias rathbuni*

Кислоты	Содержание, % от суммы кислот	
	Главный ганглиозид	Минорный ганглиозид
C _{14:0}	—	7.8
C _{15:0}	5.6	5.3
C _{16:0}	36.8	48.8
C _{17:0}	5.8	—
C _{18:0}	51.8	38.1

Таблица 2. Состав сфингозиновых оснований главного ганглиозида морской звезды *Asterias rathbuni*

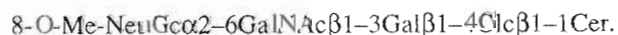
Кислоты*	Сфингозиновые основания	Содержание, % от суммы сфингозинов
C ₁₂	C _{16:1}	3.7
C ₁₄	C _{18:1}	10.3
C ₁₆	C _{20:1}	55.0
C ₁₈	C _{22:1}	31.0

* Получены при окислении сфингозинов смесью NaIO₄-KMnO₄ (см. "Экспер. часть").

определения состава сфингозинов они были выделены из метанолизата препаративной ТСХ и окислены смесью KIO₄-KMnO₄. Полученные при этом высшие жирные кислоты были подвергнуты метанолизу и анализированы ГЖХ. Анализ показал, что главными компонентами кислот являются пальмитиновая и стеариновая кислоты, т.е. главными компонентами сфингозиновых оснований являются сфингозины C₂₀ и C₂₂ (см. табл. 2).

Структура минорного ганглиозида. При частичном кислотном гидролизе минорного ганглиозида отщепляется сиаловая кислота и образуется асиалогликолипид, который при ТСХ на силикагеле имеет такую же подвижность, как и тригексозилцерамид, полученный при частичном кислотном гидролизе главного ганглиозида. Такой же результат получается при обработке минорного ганглиозида нейраминидазой из *Vibrio cholerae*, из чего следует, что сиаловая кислота является концевой в углеводной цепи и связана α-кетозидной связью. Сиаловая кислота была выделена из продуктов гидролиза ионообменной хроматографией; показано, что она имеет такую же подвижность при ТСХ, как и 8-О-метил-N-гликолилнейраминная кислота, полученная из главного ганглиозида. Тригексозилцерамид, выделенный из гидролизатов препаративной ТСХ, по данным полного кислотного гидролиза, содержит глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин. При обработке ацетилированного производного тригексозилцерамида CrO₃ все сахара разрушились практически полностью; следовательно, они соединены β-гликозидными связями.

Для определения мест замещения моносахаридов использовали тридейтерометилирование. В масс-спектре тридейтерометилированного ганглиозида имеются пики ионов с *m/z* 424 (соответствует концевому остатку N-гликолилнейраминной кислоты, имеющей одну O-метильную группу), *m/z* 388 (424-35) и *m/z* 678 (соответствует дисахаридному фрагменту, содержащему моно-O-метил-N-гликолилнейраминную кислоту и N-ацетилгексозамин). Следовательно, субтерминальное положение в углеводной цепи занимает N-ацетилгалактозамин. После метанолиза тридейтерометилированного ганглиозида производное сиаловой кислоты анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии. Обнаружено одно производное сиаловой кислоты, масс-спектр которого соответствовал метиловому эфиру метилкетозида 4,7,9-три-O-тридейтерометил-8-O-метил-N-тридейтерометил-N-(тридейтерометилгликолил)нейраминной кислоты. Следовательно, сиаловой кислотой минорного ганглиозида, как и главного, является 8-O-метил-N-гликолилнейраминная кислота. Анализ с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии частично тридейтерометилированных ацетатов полиолов, полученных после ацетолиза тридейтерометилированного ганглиозида, последующего гидролиза, восстановления образующихся производных сахаров KВH₄ и ацетилирования, показал, что остаток глюкозы замещен в положении 4, а остаток галактозы – в положении 3. Для N-ацетилгалактозамина были обнаружены два производных, присутствующих примерно в равных количествах. Одно из них соответствовало остатку GalNAc, замещенному в положении 3, а другое – остатку GalNAc, замещенному в положении 6. Следовательно, минорный ганглиозид на самом деле является смесью двух моносиалоганглиозидов, углеводные цепи которых различаются только местом присоединения концевого остатка 8-O-метил-N-гликолилнейраминной кислоты к N-ацетилгалактозамину:



По-видимому, эти моносиалоганглиозиды – биосинтетические предшественники главного дисиа-логанглиозида, в котором остатки 8-O-метил-N-гликолилнейраминной кислоты замещают остаток N-ацетилгалактозамина в положениях 3 и 6.

Высшие жирные кислоты, входящие в состав липидной части минорного ганглиозида, были выделены из продуктов полного кислотного гидролиза и после метанолиза охарактеризованы с помощью ТСХ и ГЖХ. Анализ показал, что минорный ганглиозид, как и главный, содержит только незамещенные высшие жирные кислоты, и около 90% смеси кислот составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты (см. табл. 1). К сожалению,

охарактеризовать сфингозиновые основания не удалось из-за недостатка материала.

Таким образом, проведенное исследование показало, что олигосахаридная цепь главного ганглиозида морской звезды *A. rathbuni* имеет такую же структуру, как и олигосахаридные цепи главных ганглиозидов двух других видов морских звезд рода *Asterias*, изученных ранее, *A. amurensis* [4] и *A. rubens* [5, 9], и отличается от олигосахаридных цепей ганглиозидов морских звезд, не относящихся к роду *Asterias*. Возможно, такая структура, включающая в себя необычный трисахаридный фрагмент, в котором два остатка 8-О-метил-N-гликолилнейраминового кислоты присоединены к одному и тому же остатку N-ацетилгалактозамина в положениях 3 и 6, характерна для ганглиозидов рода *Asterias*. Один из минорных ганглиозидов *A. rathbuni*, в котором 8-О-метил-N-гликолилнейраминового кислота связана с N-ацетилгалактозамином по положению 3, имеет такую же углеводную цепь, как и минорный ганглиозид из *A. rubens* [9], а второй, с 2-6-связью между 8-О-Me-NeuGc и GalNAc, обнаружен в морских звездах впервые.

Состав липидной части ганглиозидов *A. rathbuni* близок по составу липидной части ганглиозида *A. rubens*, где также преобладают незамещенные высшие жирные кислоты, а главным длинноцепочечным основанием является сфингозин, и отличается от более полярной липидной части ганглиозида *A. amurensis*, где около 50% высших жирных кислот составляют α -гидроксикислоты, а длинноцепочечным основанием является фитосфингозин.

Идентичность структур олигосахаридных цепей ганглиозидов морских звезд рода *Asterias* и различия в составе их липидных фрагментов, возможно, связаны с тем, что эти структурные части ганглиозидов выполняют в клетке разные функции. Олигосахаридные цепи, находясь на внешней поверхности мембраны, являются специфическими местами узнавания клеток и участвуют в процессах восприятия и переработки информации клеточными мембранами. Идентичность структур олигосахаридных цепей может быть связана с тем, что эти процессы в печени морских звезд рода *Asterias* обеспечиваются одинаковыми по структуре биоактивными соединениями, для которых ганглиозиды являются рецепторами. Липидные же части ганглиозидов, располагаясь внутри мембраны, взаимодействуют с другими липидными и белковыми компонентами мембраны и участвуют в создании определенных физико-химических свойств мембраны (ее прочности, вязкости, жидкости, проницаемости, подвижности компонентов мембраны и т.д.). Поэтому структура липидной части ганглиозидов должна в значительной степени зависеть от структур других компонентов мембраны и от конкретных условий, в которых мембрана функционирует, что в

свою очередь связано с условиями обитания животного. Возможно, различия в составе высших жирных кислот и сфингозиновых оснований ганглиозидов морских звезд в какой-то степени связаны с тем, что они собраны в различных районах Мирового океана (*A. amurensis* – в Японском море, *A. rubens* – в Белом, а *A. rathbuni* – в Тихом океане). Для того чтобы выяснить, является ли идентичность структур углеводных цепей ганглиозидов морских звезд одного рода общим правилом, необходимы дальнейшие исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Морские звезды *A. rathbuni* собраны в Авачинской губе вблизи Петропавловска-Камчатского в июле 1990 г. Липидный экстракт печени и препарат полярных липидов получали как описано ранее [6]. В работе использовали N-ацетилнейраминовою кислоту (Koch-Light, Англия), N-гликолилнейраминовою кислоту (Sigma, США), нейраминидазу из *Vibrio cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem). Хлороформ перед использованием перегоняли.

Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле 60 Н (Merck, Германия). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов – хлороформ-метанол-вода (6 : 4 : 1) и хлороформ-метанол-2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение резорциновым [10] и орциновым [11] реактивами; для нейтральных гликолипидов – хлороформ-метанол-вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот – пропанол-вода-2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5), обнаружение резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований – хлороформ-метанол-2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 0.2% раствором нингидрина в ацетоне; для метилированных и тридейтерометилированных производных гликолипидов – хлороформ-метанол (48 : 2), обнаружение орциновым реактивом; для метиловых эфиров высших жирных кислот – хлороформ, обнаружение раствором бромтимолового синего и конц. H_2SO_4 .

ГЖХ выполняли на приборе фирмы Hewlett Packard 5890A (США) на капиллярной колонке (15 м) Ultra-1 при 200 - 290°C (10°C/мин).

Масс-спектры [LSIMS] тридейтерометилированных ганглиозидов были получены на двухфокусном масс-спектрометре М-80А (Hitachi, Япония) при разрешающей способности прибора 1000, ускоряющем напряжении 3 кВ в диапазоне массовых чисел 0 – 1500 а. е. м. Сбор данных и их обработка проводились с помощью компьютерной системы М-003. В качестве жидкой матрицы использовали глицерин или глицерин с добавкой следовых количеств водного раствора NaCl. Мишень бомбардировали пучком ионов Xe^+ с энергией 8 кэВ.

ГХ-МС при ионизации электронным ударом получали на том же приборе при энергии электронов 70 эВ и температуре ионизационной камеры 200°C. Хроматографическое разделение проводили в насыпной колонке (3 × 1000 мм) со стационарной фазой OV-1 (на носителе Gas Chrom Q, 100 - 120 меш) при температуре колонки 280°C с предварительным нагревом от 240 до 280°C со скоростью 10°/мин, температуре инжектора 250°C и скорости потока He 25 мл/мин.

Аналитические методы: сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [12, 13], гексозы – в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит, аминсахара – на аминокислотном анализаторе Biotronic LC 2000 (Германия).

Колоночную хроматографию полярных липидов на DEAE-целлюлозе (ацетатная форма) проводили как описано ранее [7]. Минорный ганглиозид элюировали 0.025 М раствором ацетата аммония в метаноле, а главный – 0.1 М раствором. Фракции анализировали ТСХ. Одинаковые по составу фракции, содержащие сиаловые кислоты, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Остаток растворяли в смеси хлороформ–метанол (2 : 1), проводили хроматографию на колонке с DEAE-целлюлозой и затем очищали ганглиозиды препаративной ТСХ. Из 1 л сухой измельченной ткани получен препарат главного ганглиозиды, содержащий 31.5 мкмоль сиаловой кислоты, и препарат минорного ганглиозиды, содержащий 0.84 мкмоль сиаловой кислоты.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов проводили 2 М водной HCl при 100°C в течение 6 ч. Гидролизат промывали хлороформом, водный слой нейтрализовали смолой АВ 17 × 8 (HCO₃⁻), обрабатывали 12 ч KВН₄ при 20°C, избыток KВН₄ разрушали 2 н. СН₃COOH, смесь наносили на колонку со смолой IR-120 (H⁺) и элюировали водой. Элюат упаривали с добавлением метанола в конце упаривания, остаток обрабатывали 16 ч смесью пиридин–уксусный ангидрид (1 : 1) при 20°C и полученные ацетаты гекситов анализировали ГЖХ. Для анализа аминсахаров ганглиозиды гидролизировали 20 ч 4 н. HCl при 100°C.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов проводили 0.05 М H₂SO₄ (2 ч при 80°C). Реакционную смесь диализовали сутки против дистиллированной воды. Недиазируемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ, нейтральные гликолипиды выделяли препаративной ТСХ и определяли моносахаридный состав после их полного кислотного гидролиза. Внешний водный слой упаривали до 5 - 7 мл, пропускали через колонку, содержащую 6 мл дауэкса 2 × 8 (ацетатная форма), промывали 10 мл воды и затем элюировали сиаловые кислоты 10 мл Na-ацетатного буфера,

pH 4.6 [12]. Кислый элюат деионизировали на колонке с амберлитом IR-120 (H⁺), упаривали, лиофилизовали и анализировали ТСХ. Сиаловую кислоту главного ганглиозиды восстанавливали KВН₄ (4 ч при 20°C), пропускали через колонку со смолой IR-120 (H⁺), элюировали водой, упаривали в вакууме с добавлением метанола в конце упаривания. Остаток растворяли в метаноле и обрабатывали раствором диазометана в эфире 16 ч при 20°C, упаривали, остаток ацетилировали 1 ч смесью уксусный ангидрид–пиридин (1 : 1) при 100°C и анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии [8].

Частичный кислотный метанолиз главного ганглиозиды проводили 1 ч 0.3 М HCl в смеси хлороформ–метанол (2 : 1) при 60°C [14]. Реакционную смесь упаривали и анализировали ТСХ. Образовавшийся дигексозилцерамид выделяли препаративной ТСХ и метилировали. Метилированное производное подвергали ацетолузу – гидролизу, восстановлению KВН₄ и ацетилированию [15]. Частично метилированные ацетаты полиолов анализировали с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии.

Полный кислотный метанолиз главного ганглиозиды проводили 1 М HCl в метаноле при 80°C в течение 18 ч. Метилвые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном и анализировали ТСХ и ГЖХ. Оставшийся метанольный раствор подщелачивали 4 н. КОН в 90% метаноле, сфингозиновые основания экстрагировали эфиром, эфирный экстракт промывали водой до нейтральной реакции промывной воды и анализировали ТСХ. Сфингозиновые основания растворяли в 0.5 мл *трет*-бутанола, добавляли 1 мл 5 мМ раствора K₂CO₃, 0.5 мл 0.1 М раствора NaIO₄ и 0.5 мл 0.01 М раствора KMnO₄. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 20°C, затем добавляли твердый Na₂S₂O₅ до обесцвечивания раствора, подкисляли и извлекали высшие жирные кислоты 10 мл эфира [16]. Полученные продукты подвергали полному кислотному метанолизу, метилвые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном и анализировали ГЖХ.

Метилирование и тридегтерометилирование гликолипидов проводили в диметилсульфоксиде в присутствии порошкообразного NaOH при комнатной температуре [17]. Тридегтерометилированные производные ганглиозидов и метилированное производное дигексозилцерамида очищали препаративной ТСХ и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Для анализа производных сиаловых кислот тридегтерометилированные производные ганглиозидов подвергали метанолизу 0.5 М HCl в метаноле при 80°C в течение 16 ч. Метанолизат промывали гексаном для удаления метиловых эфиров жирных кислот, упаривали и анализировали с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии.

Нейтральные сахара и N-ацетилгалактозамин анализировали с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде частично метилированных или тридегтерометилированных ацетатов полиолов, полученных по методу [15].

Окисление хромовым ангидридом: тригексозилцерамиды, полученные при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1) при 20°C в течение 16 ч, упаривали с добавлением толуола, остаток растворяли в смеси $\text{CH}_3\text{COOH}-(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (9 : 1) и перемешивали с CrO_3 45 мин при 40°C, как описано ранее [18].

Ферментативный гидролиз ганглиозидов нейраминидазой из *V. cholerae* проводили в 0.05 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, по методу [19]. Реакционную смесь диализовали, внешнюю воду и содержимое диализного мешка упаривали и анализировали ТСХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N.K., Smirnova G.P. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1986. V. 44. P. 387 - 438.
2. Смирнова Г.П. // Прогресс химии углеводов / Ред. И.В. Торгов. М.: Наука, 1985. С. 126 - 148.
3. Смирнова Г.П. // Биология моря. 1987. С. 3 - 11.
4. Смирнова Г.П., Глуходед И.С., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 971 - 979.
5. Смирнова Г.П., Глуходед И.С., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 636 - 641.
6. Смирнова Г.П. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 830 - 838.
7. Winterbourn C.C. // J. Neurochem. 1971. V. 18. P. 1153 - 1155.
8. Smirnova G.P., Chekareva N.V., Chizhov O.S., Zolotarev B.M., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1977. V. 59. P. 235 - 239.
9. Muralikrishna G., Reuter G., Peter-Katalinic J., Egge H., Hanisch F.-G., Siebert H.-C., Schauer R. // Carbohydr. Res. 1992. V. 236. P. 321 - 326.
10. Svennerholm L. // Acta Chem. Scand. 1957. V. 24. P. 604 - 611.
11. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Svetashev V.I., Zhukova I.G., Smirnova G.P. // Comp. Biochem. Physiol. 1970. V. 34. P. 163 - 177.
12. Svennerholm L. // Acta Chem. Scand. 1958. V. 12. P. 547 - 554.
13. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. // Acta Chem. Scand. 1959. V. 13. P. 856 - 858.
14. Slomiany B.L., Slomiany A. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 90. P. 39 - 49.
15. Stellner K., Saito H., Hakomori S.-I. // Arch. Biochem. Biophys. 1973. V. 155. P. 464 - 472.
16. Weiss B. // Lipid Chromatographic Analysis. V. 2 / Ed. G.V. Marinetti. New York; Basel: Varcel Dekker, 1976. P. 701 - 712.
17. Larson G., Karlsson H., Hansson G.C., Pimlott W. // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. P. 281 - 290.
18. Laine R.A., Renkonen O.J. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. P. 102 - 106.
19. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 210. P. 299 - 305.

8-O-Methyl-N-Glycolylneuraminic Acid and N-Acetylgalactosamine Containing Gangliosides from Starfish *Asterias rathbuni*

N. V. Chekareva*, G. P. Smirnova*,¹ and V. L. Sadovskaya**

*Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

**All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, Russia

Abstract—The structure of gangliosides isolated from the liver of starfish *Asterias rathbuni* was established by chemical methods, mass spectrometry, and enzymic hydrolysis with a neuraminidase. The major ganglioside was found to be a disialoganglioside with two 8-O-methyl-N-glycolylneuraminic acid residues bound with an N-acetylgalactosamine residue: 8-O-Me-NeuGco2-3(8-O-Me-NeuGco2-6)GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer. Its lipid part contains unsubstituted higher fatty acids (mainly palmitic and stearic) and sphingosines (for the most part C₂₀ and C₂₂). The minor ganglioside fraction consists of two monosialogangliosides the carbohydrate chains of which differed only in the position of the terminal 8-O-methyl-N-glycolylneuraminic acid residue in the N-acetylgalactosamine moiety: 8-O-Me-NeuGco2-3GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer and 8-O-Me-NeuGco2-6GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer. The higher fatty acid composition of the minor gangliosides was determined too.

Key words: gangliosides, 8-O-methyl-N-glycolylneuraminic acid; starfish, *Asterias rathbuni*.

¹To whom correspondence should be addressed.