



УДК 577.115.5+593.96-147.62.088

ГАНГЛИОЗИДЫ ГОЛОТУРИЙ *Holothuria atra* И *Telenota ananas*

© 1996 г. Г. П. Смирнова

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

Поступила в редакцию 23.05.95 г.

Из двух видов голотурий, относящихся к разным семействам отряда *Aspidochirota*, *Holothuria atra* (сем. *Holothuriidae*) и *Telenota ananas* (сем. *Stichopodidae*), выделены ганглиозиды, структура которых определена с помощью реакций химической деградации, масс-спектрометрии и ферментативной обработки нейраминидазой. Показано, что главными ганглиозидами обоих видов голотурий являются моносиалоганглиозиды, имеющие одинаковую структуру углеводной цепи: NeuGc $\alpha$ 2-6Glc $\beta$ 1-1Cer. В состав неполярной части главных ганглиозидов входят незамещенные высшие жирные кислоты (главные компоненты – пальмитиновая и стеариновая кислоты) и сфингозины. Минорные ганглиозиды имеют такую же углеводную цепочку, незамещенные высшие жирные кислоты, сфингозин (в случае *H. atra*) или смесь сфингозина и дигидросфингозина (в случае *T. ananas*) и, по-видимому, представляют собой комплексы с пептидами.

Ключевые слова: ганглиозиды, голотурии, *Holothuria atra*, *Telenota ananas*.

Ранее мы показали, что ганглиозиды, являющиеся специфическими компонентами мембран клеток позвоночных, присутствуют в тканях одного типа морских беспозвоночных – иглокожих [1, 2]. Исследование структур ганглиозидов иглокожих, относящихся к разным классам (морские ежи, морские звезды, офиуры, голотурии), позволило выявить некоторые структурные особенности олигосахаридных цепей ганглиозидов, характерные для животных отдельных классов. Было показано, что олигосахаридные цепи ганглиозидов морских ежей построены однотипно: они содержат только глюкозу и сиаловую кислоту, которая присоединена к глюкозе в положении 6 [1, 2]. Сиаловая кислота может содержать сульфатную группу в положении 8 [3, 4]. Такой же тип структуры мы обнаружили в ганглиозидах трех видов офиур, исследованных к настоящему времени [5, 6]. Напротив, углеводные цепи морских звезд сложнее и разнообразнее и не имеют общего типа структуры, характерного для этого класса иглокожих [7]. Что касается ганглиозидов голотурий, то они практически не изучены. Были установлены структуры ганглиозидов только одного вида голотурии, *Cucumaria japonica*, относящейся к отряду *Dendrochirota*, и показано, что их олигосахаридные цепи построены так же, как и олигосахаридные цепи ганглиозидов морских ежей и офиур [8]. Чтобы выяснить, характерен ли этот тип структуры и для ганглиозидов голотурий, мы продолжили исследование этого класса иглокожих. В настоящей работе приведены данные по

выделению и установлению структуры ганглиозидов двух видов голотурий, *Holothuria atra* и *Telenota ananas*, относящихся к разным семействам отряда *Aspidochirota* (*Holothuriidae* и *Stichopodidae* соответственно).

**Выделение ганглиозидов.** Животных обезвоживали спиртом, измельчали и хранили в ацетоне. Общие липидные экстракты и препараты полярных липидов были получены как описано ранее [9]. По данным ТСХ, препарат полярных липидов *H. atra* содержал три резорцинположительных вещества (один главный и два минорных), некоторое количество нейтральных гликолипидов и фосфолипиды. Однако главным компонентом смеси было углеводсодержащее соединение, не имеющее сиаловой кислоты и дающее интенсивное малиново-красное окрашивание при обнаружении  $H_2SO_4$ , характерное для ряда ненасыщенных стероидов и тритерпеноидов [10]. Это соединение, по-видимому, является голотурином – тритерпеновым гликозидом, содержащим сульфатную группу [11]. Ганглиозиды были выделены из смеси ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой и последующей препаративной ТСХ. Главный, наименее полярный ганглиозид (1) элюировался с колонки 25 мМ ацетатом аммония в метаноле, минорный ганглиозид (2) – 0.1 М, а наиболее полярный минорный ганглиозид (3) – 0.25 М раствором. Ганглиозиды (1) – (3) были выделены в соотношении 3 : 1 : 1.2 (по сиаловой кислоте).



Фракция полярных липидов голотурии *T. ananas*, по данным ТСХ, содержала два резорцинположительных соединения – главное и минорное, нейтральные гликолипиды и фосфолипиды. Главный и минорный ганглиозиды выделили, как описано выше, в соотношении ~2 : 1 (по сиаловой кислоте).

Препараты ганглиозидов, выделенные из голотурий *H. atra* и *T. ananas*, вели себя при ТСХ как индивидуальные соединения, содержали сиаловые кислоты и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [12] и орциновым [13] реактивами) и не содержали фосфатных групп и свободных аминогрупп (отсутствие окраски с фосфорным реактивом [14] и с нингидрином).

### ГАНГЛИОЗИДЫ *Holothuria atra*

По данным хроматографии ганглиозидов на колонке с DEAE-целлюлозой можно было ожидать, что главный ганглиозид является моносиалоганглиозидом, а минорные имеют более кислый характер. В ИК-спектрах минорных ганглиозидов обнаружены только полосы поглощения, характерные для обычных ганглиозидов (1640 и 1550 (амидная группа), 1040, 1080 (спиртовые гидроксилы), 1405 (карбоксильная группа), 2860, 2930  $\text{см}^{-1}$  (C–H-связи алифатической цепи)), и отсутствуют полосы поглощения сульфатной группы (810 и 1240  $\text{см}^{-1}$ ), которая часто встречается в ганглиозидсах морских ежей и офиур.

По данным кислотного гидролиза, все ганглиозиды содержат глюкозу в качестве единственного нейтрального моносахарида. При частичном кислотном гидролизе ганглиозидов отщепляются сиаловая кислота и образуются моноглюкозилцерамиды. Сиаловые кислоты были выделены из гидролизатов ионообменной хроматографией на колонке с дауэксом 2 × 8 (ацетатная форма), и было показано, что во всех случаях они имели такую же подвижность при ТСХ на силикагеле, как и N-гликолилнейраминавая кислота. Количественные определения показали, что соотношение глюкоза – сиаловая кислота в главном ганглиозиде составляет 1 : 1, а в минорных – около 1 : 1.5.

Положение связи между моносахаридами определяли с помощью метилирования. Хромато-масс-спектрометрический анализ частично метилированных ацетатов полиолов, образующихся после ацетоллиза-гидролиза метилированных ганглиозидов, последующей обработки  $\text{KBH}_4$  и ацетилирования, показал присутствие 2,3,4-три-О-метил-1,5,6-три-О-ацетилсорбита. Следовательно, во всех ганглиозидсах остаток глюкозы замещен сиаловой кислотой по положению 6, как и в ганглиозидсах морских ежей, офиур и голотурии *Cucumaria japonica*. В продуктах метанолиза метилированных ганглиозидов *H. atra* с помощью

ГЖХ-масс-спектрометрии было обнаружено одно производное сиаловой кислоты, соответствующее метиловому эфиру метилкетозида 4,7,8,9-тетра-О-метил-N-метил-N-(О-метилгликолил)нейраминавой кислоты. Значит, в состав всех ганглиозидов *H. atra* входит N-гликолилнейраминавая кислота, которая во всех случаях занимает концевое положение в олигосахаридной цепи. Для главного ганглиозида такой результат метилирования согласуется с его поведением при ионообменной хроматографии и данными количественного определения сахаров, однако в случае минорных ганглиозидов, которые, по предварительным данным, обладают более кислым характером, мы ожидали обнаружить либо дополнительное производное сиаловой кислоты, соответствующее второму остатку, расположенному внутри цепи, либо ди-О-метильное производное глюкозы, которое должно было образоваться в том случае, если оба остатка сиаловой кислоты присоединены к глюкозе. Ранее, при исследовании ганглиозидов морской звезды *Acanthaster planci*, мы нашли, что ганглиозиды могут присутствовать в виде комплексов с белками или пептидами и такие комплексы при ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе элюируются более сильными растворами соли, чем свободные ганглиозиды той же кислотности [9]. Поэтому мы проверили, могут ли присутствовать белки или пептиды в препаратах минорных ганглиозидов *H. atra*. Ганглиозиды подвергали жесткому кислотному гидролизу и определяли присутствие в гидролизатах аминокислот. Оказалось, что оба препарата минорных ганглиозидов содержат аминокислоты: в ганглиозиде (2), который элюируется с DEAE-целлюлозы 0.1 М раствором  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , соотношение аминокислота-сиаловая кислота составляет 3 : 1, а в более полярном ганглиозиде (3) – 5 : 1. Главный ганглиозид практически не содержит аминокислот. По-видимому, минорные ганглиозиды *H. atra* также представляют собой комплексы моносиалоганглиозида с пептидами, которые элюируются при ионообменной хроматографии более сильными растворами соли, чем свободный моносиалоганглиозид. Возможно, что присутствие аминокислот также искажает результаты количественного определения сахаров в минорных ганглиозидсах.

Для определения конфигурации глюкозидной связи в ганглиозидсах глюкосилцерамиды, образующиеся при мягком кислотном гидролизе ганглиозидов, ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом [15]. Во всех случаях глюкоза разрушалась практически полностью. Следовательно, она соединена с церамидом  $\beta$ -глюкозидной связью. Конфигурации кетозидных связей N-гликолилнейраминавой кислоты в ганглиозидсах определяли ферментативным методом. При обработке ганглиозидов нейраминидазой из *Vibrio cholerae*

Таблица 1. Состав высших жирных кислот ганглиозидов голотурии *Holothuria atra*

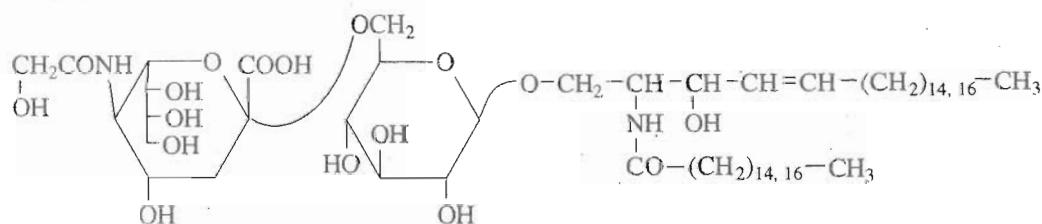
Кислоты	Содержание, % от суммы кислот		
	Ганглиозид (1)	Ганглиозид (2)	Ганглиозид (3)
C <sub>14:0</sub>	7.4	8.4	7.9
C <sub>15:0</sub>	4.6	4.7	6.4
C <sub>16:0</sub>	31.1	44.6	53.9
C <sub>17:0</sub>	3.9	4.9	4.0
C <sub>18:0</sub>	19.6	23.0	23.9
C <sub>20:0</sub>	9.1	8.0	3.9
C <sub>22:0</sub>	21.3	8.7	—
C <sub>24:0</sub>	—	3.1	—

Таблица 2. Состав сфингозинов ганглиозидов голотурии *H. atra*

Кислоты*	Соответствующие сфингозины	Содержание, % от суммы	
		Ганглиозид (1)	Ганглиозид (3)
C <sub>14:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	12.12	11.23
C <sub>15:0</sub>	C <sub>19:1</sub>	8.12	7.42
C <sub>16:0</sub>	C <sub>20:1</sub>	51.74	55.35
C <sub>17:0</sub>	C <sub>21:1</sub>	5.23	—
C <sub>18:0</sub>	C <sub>22:1</sub>	22.79	26.00

\* Получены при окислении сфингозинов NaIO<sub>4</sub>-KMnO<sub>4</sub> (см. "Экспер. часть").

во всех случаях сиаловые кислоты отщеплялись; значит, они соединены α-кетозидными связями. Нужно отметить, что для расщепления минорных ганглиозидов необходимо было присутствие де-



Минорные ганглиозиды имеют такую же структуру олигосахаридной цепи и сходный состав липидной части и, возможно, являются комплексами главного моносиалоганглиозида с пептидами.

### ГАНГЛИОЗИДЫ ГОЛОТУРИИ *Telenota ananas*

Как и в случае ганглиозидов *H. atra*, после полного кислотного гидролиза ганглиозидов *T. ananas* в качестве единственного нейтрального моносахарида обнаружена глюкоза, а после частичного кислотного гидролиза — N-гликолилнейраминная кислота и моноглюкозилцерамид. По данным количественного определения, соотношение глюко-

тергента (таурохолата натрия), а в случае минорного ганглиозида (2) понадобилась также предварительная его обработка щелочью в мягких условиях. По данным ТСХ, такая обработка не изменяет полярности ганглиозида; следовательно, сиаловая кислота находится в кислотной форме, а не в виде лактона или сложного эфира, что подтверждается также данными ИК-спектроскопии.

Строение неполярной части ганглиозидов определяли с помощью кислотного метанолиза и периодат-перманганатного окисления. В продуктах метанолиза всех ганглиозидов при ТСХ-анализе обнаружены метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот и сфингозиновые основания. Состав кислот определен с помощью ГЖХ. Как видно из табл. 1, во всех случаях главными компонентами смеси кислот являются пальмитиновая и стеариновая кислоты. Сфингозиновые основания главного (1) и минорного (3) ганглиозидов были выделены из метанолизатов препаративной ТСХ и подвергнуты окислению смесью NaIO<sub>4</sub>-KMnO<sub>4</sub> [16]. Образовавшиеся высшие жирные кислоты превращали в метиловые эфиры и анализировали ГЖХ. Состав кислот и соответствующих им сфингозиновых оснований приведен в табл. 2. В обоих случаях среди сфингозиновых оснований преобладают C<sub>20</sub>- и C<sub>22</sub>-сфингозины. К сожалению, состав сфингозинов минорного ганглиозида (2) определить не удалось из-за недостатка материала.

Таким образом, на основании приведенных выше данных для главного ганглиозида голотурии *H. atra* предложена структура

за-сиаловая кислота в главном ганглиозиде равно 1 : 1, а в минорном — 1 : 1.5.

Анализ с помощью метилирования показал, что в ганглиозиде *T. ananas*, как и в ганглиозиде *H. atra*, остаток глюкозы замещен в положении 6, а остаток N-гликолилнейраминной кислоты является концевым. Минорный ганглиозид *T. ananas*, который элюируется с колонки, заполненной DEAE-целлюлозой, 0.1 М раствором CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> в метаноле, как и минорные ганглиозиды *H. atra*, содержит аминокислоты. Соотношение NeuGc-аминокислота здесь составляет приблизительно 1 : 10.

При обработке ганглиозидов нейраминидазой из *V. cholerae* в присутствии таурохолата натрия

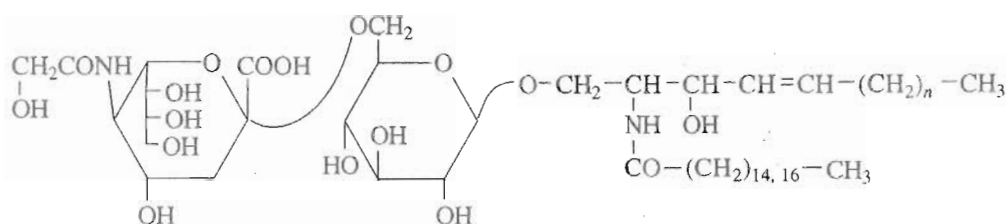


отщепляются сиаловые кислоты и образуются моногликозилцерамиды. При окислении ацетилированных производных цереброзидов хромовым ангидридом большая часть глюкозы разрушалась. Следовательно, в ганглиозидах гликозидная связь имеет β-конфигурацию, а кетозидная связь N-гликолилнейраминовой кислоты – α-конфигурацию.

Для анализа липидной части ганглиозидов мы использовали метанолиз. В продуктах метанолиза ганглиозидов с помощью ТСХ были обнаружены метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот и сфингозиновые основания. Состав кислот был определен с помощью ГЖХ (см.

табл. 3). Как и в случае ганглиозидов *H. atra*, главные компоненты высших жирных кислот ганглиозидов *T. ananas* – пальмитиновая и стеариновая кислоты. Длинноцепочечным основанием главного ганглиозида является сфингозин, а минорного – сфингозин и дигидросфингозин в соотношении приблизительно 3 : 1 (визуальная оценка интенсивности окрашивания зон на пластинках). Из-за недостатка материала состав сфингозинов определить не удалось.

Таким образом, на основании приведенных выше данных для главного ганглиозида голотурии *T. ananas* предложена структура



Минорный ганглиозид имеет такую же структуру углеводной цепочки и близкий состав высших жирных кислот, а в качестве длинноцепочечного основания наряду со сфингозином присутствует его дигидропроизводное. Этот ганглиозид, как и минорные ганглиозиды *H. atra*, по-видимому, представляет собой комплекс моносиалоганглиозида с пептидами.

Проведенное исследование показало, что ганглиозиды двух видов голотурий, относящихся к разным семействам отряда *Aspidochirota*, *H. atra* (сем. *Holothuriidae*) и *T. ananas* (сем. *Stichopodidae*), содержат одинаковые олигосахаридные цепи, которые имеют такой же тип структуры, как и олигосахаридные цепи исследованных ранее ганглиозидов голотурии *Cucumaria japonica*, относящейся к отряду *Dendrochirota* [8]. Ранее олигосахаридные цепи такого типа были обнаружены в ганглиозидах морских ежей [1, 2] и офиур [5, 6], но не найдены у других животных. Возможно, такой тип олигосахаридных структур характерен для этих трех классов иглокожих, хотя для окончательного вывода необходимы дальнейшие исследования ганглиозидов, особенно выделенных из голотурий и офиур разных семейств и отрядов. Следует отметить, что в голотуриях мы пока не обнаружили сульфатированных ганглиозидов, которые являются обычными компонентами ганглиозидных фракций, выделенных из офиур и морских ежей, хотя в них найдены сульфатированные полисахариды [17, 18] и тритерпеновые гликозиды с сульфатной группой у моносахаридного остатка [11]. Дальнейшие исследования позволят выяснить, является ли присутствие ганглиозидов, содержащих

сульфатированную сиаловую кислоту, отличительной особенностью только двух классов иглокожих, морских ежей и офиур.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Голотурии собраны в Индийском океане: *H. atra* у о. Родригес (Маскаренские острова), а *T. ananas* – у юго-западного побережья о. Мадагаскар. Собранных животных обезжировали спиртом, измельчали и хранили в ацетоне. Для выделения липидов ацетон сливали, ткань высушивали непродолжительное время на воздухе, гомогенизировали в метаноле и экстрагировали липиды смесями хлороформ–метанол (2 : 1 и 1 : 1). Полярные липиды выделяли как описано ранее [9]. В работе использовали N-ацетилнейраминовую кислоту (Koch-Light,

Таблица 3. Состав высших жирных кислот ганглиозидов голотурии *Telenota ananas*

Кислоты	Содержание, % от суммы кислот	
	Главный ганглиозид	Минорный ганглиозид
C <sub>14</sub> :0	4.3	7.2
C <sub>15</sub> :0	5.4	3.3
C <sub>16</sub> :0	43.8	43.1
C <sub>17</sub> :0	2.6	–
C <sub>18</sub> :1	–	7.9
C <sub>18</sub> :0	23.6	38.5
C <sub>19</sub> :0	1.0	–
C <sub>20</sub> :0	4.2	–
C <sub>22</sub> :0	5.7	–
C <sub>23</sub> :0	3.5	–
C <sub>24</sub> :0	5.9	–

Англия), N-гликолилнейраминовою кислоту (Sigma, США), нейраминидазу из *Vibrio cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem), DEAE-целлюлозу DE-23 (Whatman, Англия). 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.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60 : 35 : 8), обнаружение резорциновым [12] и орциновым [13] реактивами; для нейтральных гликолипидов – хлороформ–метанол–вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот – пропанол–вода–2 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30 : 10 : 5), обнаружение резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований – хлороформ–метанол–2 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (40 : 10 : 1), обнаружение 0.2% раствором нингидрина в ацетоне; для метилированных производных гликолипидов – хлороформ–метанол (48 : 2), обнаружение орциновым реактивом; для метиловых эфиров высших жирных кислот – хлороформ, обнаружение раствором бромтимолового синего и  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

**ГЖХ** выполняли на приборе фирмы Hewlett-Packard 5890 (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-1 и интегратором HP 3393A; условия: 200°C (1 мин) → 290°C, 10°/мин.

**ИК-спектры** снимали в таблетках с KBr на приборе UR-10 (Carl Zeiss, Германия).

**Хроматомасс-спектрометрический анализ** проводили на приборе Hitachi M-80A (Япония), снабженном колонкой с 2% OV-1 на газохроме Q.

**Аналитические методы:** сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [19, 20], глюкозу – в виде ацетата сорбита с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит; аминоксахара – на аминокислотном анализаторе Biotronic LC-2000 (Германия).

**Колоночную хроматографию** полярных липидов на DEAE-целлюлозе (ацетатная форма) осуществляли по описанной ранее методике [21]. Ганглиозиды элюировали 0.025, 0.1 и 0.25 М растворами ацетата аммония в метаноле. Фракции анализировали ТСХ. Сходные по составу фракции, элюированные солью одной концентрации, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. После дополнительной очистки препаративной ТСХ из 3.91 г полярных липидов *H. atra* получены препарат главного ганглиозида, содержащий 6.3 мкмоль сиаловой кислоты, препарат минорного ганглиозида (2) с 2.04 мкмоль сиаловой кислоты и препарат минорного ганглиозида (3) с 2.4 мкмоль сиаловой кислоты. Из 0.63 г полярных липидов *T. ananas* получены препараты главного и минорного ганглиозидов, содержащие 0.83 и 0.44 мкмоль сиаловой кислоты соответственно.

**Полный кислотный гидролиз** гликолипидов проводили 2 н. водной HCl при 100°C в течение 6 ч. Гидролизат промывали хлороформом для удаления высших жирных кислот, водный слой нейтрализовали смолой АВ 17 × 8 ( $\text{HCO}_3^-$ ), обрабатывали 12 ч  $\text{KBH}_4$  при 20°C (избыток  $\text{KBH}_4$  разрушали 2 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), пропускали через колонку со смолой IR-120 ( $\text{H}^+$ ) и элюировали водой. Элюат упаривали, остаток ацетиловали 16 ч при 20°C уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1) и анализировали ГЖХ. Для анализа аминоксахаров ганглиозиды гидролизовали 4 н. HCl 20 ч при 100°C, гидролизат упаривали и анализировали на аминокислотном анализаторе.

**Частичный кислотный гидролиз** ганглиозидов проводили 2 ч при 80°C 0.05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды. Содержимое диализного мешка анализировали ТСХ, цереброзиды выделяли препаративной ТСХ и анализировали моносахариды после полного кислотного гидролиза. Внешний водный слой упаривали до 5–7 мл и выделяли сиаловые кислоты на колонке с дауэксом 2 × 8 (ацетатная форма) [19].

**Мягкую щелочную обработку ганглиозидов** проводили 0.1 н. NaOH при 40°C в течение 4 ч. Реакционную смесь нейтрализовали 0.1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , диализовали, упаривали и анализировали ТСХ.

**Метилирование** ганглиозидов проводили в диметилсульфоксиде в присутствии порошкообразного NaOH по методу [22]. Метилированные производные подвергали метанолизу 0.5 н. HCl в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (16 ч при 80°C). Метиловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном, метанольный раствор упаривали, остаток растворяли в хлороформе и производные сиаловых кислот анализировали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Для определения места замещения глюкозы метилированные ганглиозиды подвергали ацетолузу 0.5 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в 95%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (16 ч при 80°C), добавляли к смеси равный объем воды и продолжали нагревание при 80°C еще в течение 5 ч [23]. Гидролизат пропускали через колонку с анионитом АВ 17 × 8, промывали метанолом, элюат упаривали, добавляли 0.5 мл воды и обрабатывали  $\text{KBH}_4$ . Полученный частично метилированный сорбит ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине (16 ч при 20°C) и анализировали с помощью ГЖХ.

**Кислотный метанолиз** ганглиозидов проводили 1 н. HCl в метаноле при 80°C в течение 16 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [24]. Метиловые эфиры кислот анализировали ГЖХ. Сфингозиновые основания окисляли смесью  $\text{NaIO}_4$ – $\text{KMnO}_4$  по методу [16]. Полученные высшие жирные кислоты нагревали с 0.5 М HCl в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (16 ч при 80°C), образовавшиеся

метиловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном и анализировали ГЖХ.

**Окисление хромовым ангидридом** осуществляли по описанному ранее методу [15]. Ацетилированные цереброзиды обрабатывали 45 мин при 40°C CrO<sub>3</sub> в смеси CH<sub>3</sub>COOH-(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (9 : 1), продукты реакции подвергали ацетолузу, гидролизу, последующему восстановлению KBH<sub>4</sub> и ацетилированию. Ацетат сорбита анализировали ГЖХ.

**Ферментативный гидролиз ганглиозидов** проводили нейраминидазой из *V. cholerae*. К образцу ганглиозида добавляли 1-мл раствора таурохолат натрия (2.4 мг в 10 мл воды), 0.33 мл 0.2 М Na-ацетатного буфера (pH 5.5), каплю ферментного препарата и выдерживали 1 сут при 37°C. Реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды, внешнюю воду упаривали до небольшого объема, сиаловые кислоты выделяли на колонке с дауэксом 2 × 8 (ацетатная форма) и анализировали ТСХ. Содержимое диализного мешка упаривали и анализировали ТСХ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N.K., Smirnova G.P. // Adv. Carbohydr. Chem. and 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. Kochetkov N.K., Smirnova G.P., Chekareva N.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 424. P. 274 - 283.
4. Смирнова Г.П., Чекарева Н.В., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 1667 - 1673.
5. Смирнова Г.П., Чекарева Н.В., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 507 - 513.
6. Смирнова Г.П., Чекарева Н.В., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 387 - 397.
7. Смирнова Г.П. // Биология моря. 1987. С. 3 - 11.
8. Чекарева Н.В., Смирнова Г.П., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 398 - 402.
9. Смирнова Г.П. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 830 - 838.
10. Овертон К.Г. // Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами. Т. 1 / Ред. А. Вайсбергер. М.: Химия, 1967. С. 61 - 63.
11. Еляков Г.Б., Стоник В.А. // Терпеноиды морских организмов / Ред. А.В. Камерницкий. М.: Наука, 1986. С. 196 - 220.
12. Svennerholm L. // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 24. P. 604 - 611.
13. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Svetashev V.I., Zhukova I.G., Smirnova G.P. // Comp. Biochem. Physiol. 1970. V. 34. P. 163 - 177.
14. Vaskovsky V.T., Kostetsky E.Y. // J. Lipid Res. 1968. V. 9. P. 396.
15. Laine R.A., Renkonen O.J. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. P. 102 - 108.
16. Weiss B. // Lipid Chromatographic Analysis. V. 2 / Ed. G.V. Marinetti. N.Y.: Marcel Dekker, 1976. P. 701 - 712.
17. Ribeiro A.-C., Vieira R.P., Mourao P.A.S., Mulloy B. // Carbohydr. Res. 1994. V. 225. P. 225 - 240.
18. Vieira R.P., Mulloy B., Mourao P.A.S. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 13530 - 13536.
19. Svennerholm L. // Acta Chem. Scand. 1959. V. 12. P. 547 - 554.
20. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. // Acta Chem. Scand. 1959. V. 13. P. 856 - 858.
21. Winterbourn C.C. // J. Neurochem. 1971. V. 18. P. 1153 - 1155.
22. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. P. 209 - 217.
23. Stellner K., Saito H., Hakomori S. // Arch. Biochem. Biophys. 1973. V. 155. P. 464 - 472.
24. Kochetkov N.K., Zhukova I.G., Smirnova G.P., Glukhoded I.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 326. P. 74 - 83.

## Gangliosides from *Holothuria atra* and *Telenota ananas*

G. P. Smirnova

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

**Abstract**—A number of gangliosides was isolated from two holothurian species belonging to the different families of the order Aspidochirota, *Holothuria atra* (Holothuriidae) and *Telenota ananas* (Stichopodidae). Their structures were established by chemical degradation reactions, mass spectrometry, and neuraminidase hydrolysis. The major gangliosides in both species were found to be monosialogangliosides with the same carbohydrate chain: NeuGcα2-6Glcβ1-1Cer. Lipid parts of the major gangliosides contain normal fatty acid residues (mainly palmitic and stearic) and sphingosines. The minor gangliosides contain the same carbohydrate chain, normal fatty acid residues, and sphingosine (*H. atra*), or the mixture of sphingosine and dihydrosphingosine (*T. ananas*) and are probably the complexes of the gangliosides with peptides.

*Key words:* gangliosides, holothuria, *Holothuria atra*, *Telenota ananas*.