



УДК 547.95.02

СТРУКТУРА МИНОРНОГО СИАЛОГЛИКОЛИПИДА ИЗ ТКАНИ  
ГОНАД МОРСКОГО ЕЖА *ECHINOCARDIUM CORDATUM*

Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

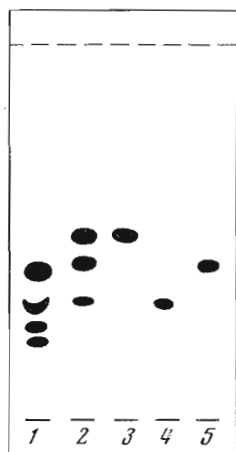
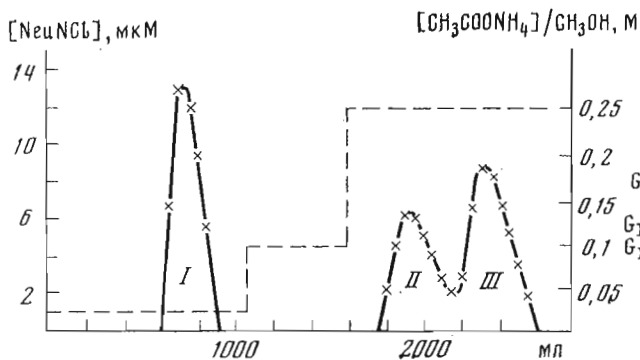
Из липидного экстракта ткани гонад морского ежа *Echinocardium cordatum* выделен минорный сialogликолипид. Показано, что он является сфингогликолипидом. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом для него предложена структура N-гликолилнейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  4)-N-гликолилнейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-глюкопиранозил- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  1)керамида. Сфингозиновое основание гликолипида является смесью фитосфингозинов, состав которой установлен с помощью РЖХ. Высшие жирные кислоты гликолипида представлены незамещенными и монооксикислотами.

Ранее была установлена структура сialogликолипидов, выделенных из гонад морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* [1] и *Anthocardiaris crassispina* [2]. Олигосахаридная цепь этих гликолипидов состоит из остатков глюкозы и сиаловой кислоты, замещающей глюкозу по C<sub>(6)</sub>. Такой же моносахаридный состав установлен для сialogликолипидов морских ежей *Pseudocentrotus depressus* [3] и *Hemicentrotus pulcherrimus* [4], относящихся, как и первые два представителя, к подклассу Regularia.

Недавно мы показали, что олигосахаридная цепь главного сialogликолипида морского ежа *Echinocardium cordatum*, относящегося к подклассу Irregularia, также состоит из глюкозы, замещенной по C<sub>(6)</sub> сиаловой кислотой. Однако в отличие от изученных ранее сialogликолипидов морских ежей остаток сиаловой кислоты сульфатирован [5]. В настоящей статье приводятся данные по изучению структуры минорного сialogликолипида из ткани гонад этого морского ежа *E. cordatum*. Три сialogликолипида, содержащиеся в гонадах, были выделены колоночной хроматографией сырого препарата на DEAE-целлюлозе (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) [5]. Для получения минорного гликолипида II (рисунок, а) в индивидуальном состоянии потребовалась дополнительная очистка в тонком слое силикагеля. Его содержание составило 10% от суммы сialogликолипидов.

Полученные соединения в тонком слое силикагеля дали характерное окрашивание с резорциновым [7] и орциновым [8] реактивами, что указывает на присутствие в веществах сиаловой кислоты и нейтральных моносахаридов, но не обнаруживались нингидрином и реактивом на фосфолипиды [9], что свидетельствует об отсутствии в выделенных гликолипидах свободной аминогруппы и фосфоэфирных связей.

Гликолипид II является наиболее полярным компонентом смеси сialogликолипидов *E. cordatum* (рисунок, б), с DEAE-целлюлозы он элюируется



а

б

Хроматографический анализ сиалогликолипидов морского ежа *E. cordatum*: а — элюция с DEAE-целлюлозы ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ -форма); б — ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (6 : 4 : 1) ганглезидов мозга быка (1), [6], исследуемого препарата (2), сиалогликолипидов I (3), II (4) и III (5). NeUNGI — N-гликолилнейраминная кислота

раствором соли той же концентрации, что и сиалогликолипид III, содержащий, как уже известно [5], один остаток сульфатированной сиаловой кислоты. Однако для элюции гликолипида II требуется меньший объем раствора соли; следовательно, он обладает несколько менее выраженными кислотными свойствами, чем сульфатированный гликолипид III. В ИК-спектре гликолипида II подобно спектрам других сиалогликолипидов имеются интенсивные полосы поглощения амидной группы ( $1640$  и  $1550 \text{ см}^{-1}$ ), спиртовых гидроксильных ( $1040$  и  $1080 \text{ см}^{-1}$ ), ассоциированных гидроксильных ( $3300$  и  $3450 \text{ см}^{-1}$ ), ионизированной карбоксильной группы ( $1225$  и  $1405 \text{ см}^{-1}$ ) и валентных колебаний C—H-связей алифатической цепи ( $2860$  и  $2930 \text{ см}^{-1}$ ). Полоса поглощения при  $1235 \text{ см}^{-1}$ , наблюдающаяся в ИК-спектре гликолипида III и обусловленная сульфатной группой, отсутствует; следовательно, гликолипид II не содержит сульфогруппы.

Для установления структуры углеводной цепи гликолипида II были изучены продукты его полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, окисления и ферментативного гидролиза.

В продуктах полного кислотного гидролиза гликолипида II методом ГЖХ была обнаружена глюкоза в качестве единственного нейтрального моносахарида. При частичном гидролизе его отщеплялась сиаловая кислота и образовывалась смесь двух нейтральных гликолипидов, обладающих в тонком слое силикагеля подвижностью цереброзидов мозга телят [10]. Исследование углеводного состава этих гликолипидов показало, что они являются глюкоцереброзидами и отличаются друг от друга, по-видимому, только характером высших жирных кислот. Следовательно, в гликолипиде II с первичным гидроксильным сфингозиновым основанием связан остаток глюкозы. Сиаловая кислота была выделена после частичного кислотного гидролиза гликолипида II ионообменной хроматографией на даэксе  $2 \times 8$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) [11] и дала характерные реакции с тиобарбитуровой кислотой [12] и с резорциновым реактивом [7]. По данным ТСХ, сиаловая кислота гликолипида II является N-гликолилнейраминной кислотой с небольшой примесью N-ацетилнейраминной кислоты, как и в гликолипиде III.

Количественные измерения показали, что углеводная цепь гликолипида II состоит из одного остатка глюкозы и двух остатков сиаловой кислоты.

Для определения места замещения глюкозы сиаловой кислотой проведено метилирование гликолипида II с последующим метанолизом. Среди частично метилированных метилглюкозидов обнаружены только  $\alpha$ - и  $\beta$ -метил-2,3,4-три-О-метилглюкопиранозиды. Следовательно, олигосахаридная цепь гликолипида II линейна и замещена по C<sub>(6)</sub> глюкозы остатком сиаловой кислоты, т. е. по своему составу и строению она похожа на углеводные цепи гликолипидов из других видов морских ежей [1, 2, 5]. По-видимому, такой простой набор нейтральных моносахаридов и единственный тип замещения остатка глюкозы характерны для строения сиалогликолипидов морских ежей, относящихся к различным видам.

Место замещения остатка сиаловой кислоты, находящейся внутри углеводной цепи, было определено из результатов периодатного окисления гликолипида II и последующего восстановления его KBH<sub>4</sub>. Сиаловые кислоты после мягкого кислотного гидролиза были выделены ионообменной хроматографией на дауэксе 2 × 8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), кетогруппа восстановлена в спиртовую действием KBH<sub>4</sub> и полученные полиоксикислоты анализировались с помощью хромато-масс-спектрометрии в виде триметилсилильных (TMS) производных. Анализ показал присутствие одного соединения, спектр которого полностью совпал с масс-спектром аналогичного производного, полученного из C<sub>(7)</sub>-N-гликолилнейраминовой кислоты. Следовательно, гидроксильные группы при C<sub>(7)</sub> и C<sub>(8)</sub> сиаловых кислот гликолипида II свободны. При действии периодата каждая молекула гликолипида окисляется с выделением 2 молекул формальдегида, т. е. оба остатка сиаловой кислоты разрушаются с разрывом связи C<sub>(8)</sub> — C<sub>(9)</sub>; следовательно, гидроксильные группы при C<sub>(9)</sub> также свободны. Таким образом, сиаловые кислоты в гликолипиде II могут быть связаны только по гидроксилу при C<sub>(4)</sub>.

Такой необычный тип связи сиаловых кислот обнаружен впервые. Во всех известных до сих пор случаях остатки сиаловых кислот связаны между собой либо по гидроксилу при C<sub>(8)</sub>, как в сиалогликолипидах из иглокожих [1, 2, 13], позвоночных [14] и в коломиновой кислоте [15], либо при C<sub>(9)</sub>, как в полимере сиаловой кислоты из *Neisseria meningitidis* [16].

Для определения конфигурации гликозидной связи глюкозы полный ацетат нейтрального глюкозилкерамида, полученного частичным гидролизом гликолипида II, был окислен хромовым ангидридом. При таком окислении избирательно разрушаются  $\beta$ -связанные остатки моносахаридов. Глюкоза в глюкозилкерamide полностью окислилась, т. е. она связана со сфингозиновым основанием  $\beta$ -гликозидной связью.

Конфигурация кетозидных связей сиаловых кислот была определена из данных ферментативного гидролиза гликолипида II нейраминидазой из *Vibrio cholerae*, которая избирательно расщепляет  $\alpha$ -кетозидные связи сиаловых кислот. Гликолипид II разрушился под действием нейраминидазы до глюкозилкерамида с выделением двух остатков сиаловой кислоты; следовательно, оба остатка связаны в гликолипиде  $\alpha$ -кетозидными связями.

Для установления структуры липидной части сиалогликолипида II были изучены продукты метанолиза и периодатного окисления.

Сфингозиновое основание, выделенное после метанолиза, в тонком слое силикагеля обладало подвижностью фитосфингозина пекарских дрожжей. Состав фитосфингозинов был определен на основании ГЖХ-анализа смеси высших алифатических альдегидов, получившихся при периодатном окислении гликолипида II и восстановленных KBH<sub>4</sub> до спиртов (таблица). Главным компонентом смеси оказался пентадеканол-1 (67,5%); следовательно, главным фитосфингозином гликолипида II является C<sub>(18)</sub>-фитосфингозин. Такое же сфингозиновое основание — фитосфингозин входит в состав сиалогликолипида морского ежа *S. intermedius* [1] и сульфатированного сиалогликолипида III *E. cordatum* [5], в то время как в сиалогликолипидах из сперматозоидов морского ежа *A. crassispina*

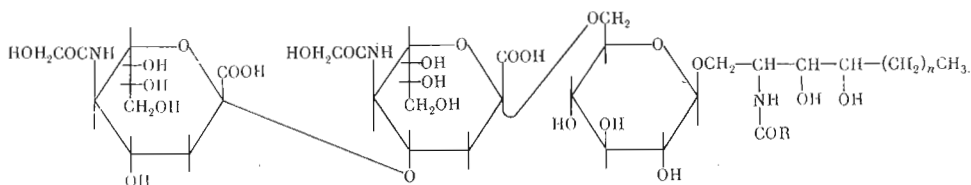
**Состав алифатических спиртов и соответствующих фитосфингозинов  
сиалогликолипида II из ткани гонад *E. cordatum***

Спирты	Содержание, % от суммы	Фитосфингозины	Спирты	Содержание, % от суммы	Фитосфингозины
C <sub>14:0</sub> C <sub>15:0</sub>	5,4 67,5	C <sub>17:0</sub> C <sub>18:0</sub>	C <sub>16:0</sub> C <sub>18:0</sub>	19,8 7,2	C <sub>19:0</sub> C <sub>21:0</sub>

обнаружен только C<sub>(18)</sub>-сфингозин с небольшой примесью C<sub>(18)</sub>-дигидро-сфингозина [2].

В продуктах метанолиза с помощью ТСХ были обнаружены метиловые эфиры незамещенных и моноокси- высших жирных кислот, причем монооксикислоты составляли не более 10% смеси. Незамещенные и монооксикислоты присутствуют также и в сиалогликолипидах некоторых других видов морских ежей [1, 5], однако в гликолипидах из *A. crassirina* монооксикислоты не обнаружены [2]. Состав высших жирных кислот гликолипида II далее не исследовался из-за недостатка материала.

Таким образом, на основании полученных данных для сиалогликолипида II из гонад *E. cordatum* предложена структура N-гликолилнейраминил- $\alpha$ -(2→4)-N-гликолилнейраминил- $\alpha$ -(2→6)-глюкопиранозил- $\beta$ -(1→4) керамида:



$n = 12, 13, 14, 16$

R — остаток незамещенной или моноокси- высшей жирной кислоты

Этот гликолипид обладает таким же набором моносахаридных единиц, как и все изученные до сих пор гликолипиды морских ежей; в нем наблюдается характерный тип замещения глюкозы сиаловой кислотой по первичному гидроксилу. Однако структура этого соединения отличается необычным (2→4) типом связи остатков сиаловых кислот друг с другом.

### Экспериментальная часть

Морские ежи *E. cordatum* собраны в сублиторальной зоне залива Посыет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт гонад и сырой препарат сиалогликолипидов получены по ранее описанной методике [1]. Френозин из мозга крупного рогатого скота выделен по методу Картера [10]. N-Ацетилнейраминановая кислота — препарат фирмы Koch-Light, нейраминидаза *Vibrio cholerae* (500 ед/мл) — фирмы Calbiochem. Все растворители перегоняли перед использованием.

Колоночная хроматография сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе ( $CH_3COO^-$ ) выполнялась как описано ранее [5]. После дополнительной очистки в тонком слое силикагеля в системе растворителей хлороформ — метанол — вода (6 : 4 : 1) из 1 г сырого продукта получено 15 мг сиалогликолипида II.

ТСХ проводили на силикагеле марки КСК (150 меш), содержащем 5% гипса, с использованием тех же систем растворителей, как описано ранее [1].

ГЖХ выполняли на приборе фирмы Pye Unicam, серия 104 (Англия), скорость газа-носителя 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на диатомите С при 180°, частично метилированные метилгли-

козиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155°, алифатические спирты — с 3% SE на диатомите С при 150—220° со скоростью повышения температуры 2° в 1 мин, сиаловые кислоты в виде TMS-эфиров 5-ациламино-3,5-дидезоксиноновых и гептоновых кислот — на колонке с 3% SE-30 при 240°.

*Хромато-масс-спектрометрия* TMS-производных 5-ациламино-3,5-дидезоксиноновых и гептоновых кислот выполнялась на приборе Varian MAT III (ФРГ) на колонке с 3% SE-30 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ.

*Сфингозиновое основание* количественно определяли по методу Лаутера и Тремса [17]; калибровочную кривую строили по френозину.

*Полный кислотный гидролиз* гликолипида (2 мг) проводили 2 н. HCl (1 мл) при 100° в течение 4 ч. Моносахариды анализировали ГЖХ в виде ацетатов соответствующих гекситов. В качестве внутреннего стандарта использовали маннозу.

*Частичный кислотный гидролиз* сиалогликолипида (5 мг) проводили 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 мл) при 80° в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды (500 мл) при 20°. Недализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ. Внешний водный слой упаривали до 10 мл, пропускали через колонку с дауэксом 2 × 8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), сиаловые кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером (рН 4,6).

*Кислотный метанолиз* сиалогликолипида (10 мг) проводили 3 М HCl в метаноле (2 мл) при 80° в течение 18 ч. Метилловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновое основание выделяли, как описано ранее [1], и анализировали с помощью ТСХ.

*Метилирование* сиалогликолипида проводили по Хакомори [18]. Метилированное производное экстрагировали хлороформом, диализовали против воды и очищали с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол (49 : 1). Выделенный метилированный сиалогликолипид подвергали кислотному метанолизу и частично метилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ.

*Окисление хромовым ангидридом* нейтрального гликолипида, полученного частичным кислотным гидролизом сиалогликолипида, проводили по методу [19]. В качестве внутреннего стандарта использовали инозит. Моносахариды, образующиеся при гидролизе окисленного гликолипида; анализировали с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

*Периодатное окисление* сиалогликолипида (10 мг) проводили 0,02 М NaIO<sub>4</sub>, как описано ранее [1]. Высшие жирные альдегиды экстрагировали гексаном, восстанавливали KBH<sub>4</sub> и анализировали ГЖХ. Деградируемый гликолипид восстанавливали KBH<sub>4</sub>, выделяли диализом и гидролизовали 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 80° в течение 1,5 ч. Гидролизат диализовали против дистиллированной воды (500 мл). Внешний водный слой упаривали до 10 мл, пропускали через колонку с дауэксом 2 × 8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) и деградированные сиаловые кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером (рН 4,6). Элюат деионизовали смолой IR-120 (H<sup>+</sup>) и лиофилизировали. Выделенные сиаловые кислоты восстанавливали KBH<sub>4</sub> и силилировали реагентом Картера [20]. TMS-производные восстановленных сиаловых кислот анализировали с помощью ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии.

*Формальдегид*, выделяющийся при периодатном окислении сиалогликолипида, количественно определяли по методу Васьковского и Исая [21], калибровочную кривую строили по манниту.

*Ферментативный гидролиз* сиалогликолипида (3 мг) проводили действием нейраминидазы из *Vibrio cholerae* по методу [22]. Отщепившуюся сиаловую кислоту анализировали реакцией с тиобарбитуровой кислотой [12], а неотщепившуюся — после восстановления KBH<sub>4</sub> с резорциновым реактивом как описано [23].

1. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **326**, 74—83.
2. Hoshi M., Nagai Y. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **388**, 152—162.
3. Isono Y., Nagai Y. (1966) *Jap. J. Exp. Med.*, **36**, 461—467.
4. Isono Y. (1967) *Jap. J. Exp. Med.*, **37**, 87—96.
5. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **424**, 274—283.
6. Svennerholm L. (1963) *J. Neurochem.*, **10**, 613.
7. Svennerholm L. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 604—611.
8. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Comp. Biochem. and Physiol.*, **34**, 163—177.
9. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I. (1968) *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
10. Carter H. E., Haines W. J., Ledyard W. E., Norris W. P. (1947) *J. Biol. Chem.*, **169**, 77—82.
11. Miettinen T., Takky-Luukkainen I. T. (1959) *Acta chem. scand.*, **13**, 856—858.
12. Warren L. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971—1975.
13. Жук ова И. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Ув. Н. К. (1973) Докл. АН СССР, **208**, 981—984.
14. L<sup>o</sup>deen R. (1966) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **43**, 57—66.
15. McGuire E. J., Binkley S. B. (1964) *Biochemistry*, **3**, 247—251.
16. Bhattacharjee A. K., Jennings H. J., Kenny C. P., Martin A., Smith I. C. P. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 1926—1932.
17. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) *J. Lipid Res.*, **3**, 136—138.
18. Nakomori S. I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205—208.
19. Laine R. A., Renkonen O. (1975) *J. Lipid Res.*, **16**, 102—106.
20. Carter H. E., Gaver R. C. (1967) *J. Lipid Res.*, **8**, 391.
21. Vaskovsky V. E., Isay S. V. (1969) *Anal. Biochem.*, **30**, 25—31.
22. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **210**, 299—305.
23. Schneir M. L., Rafelson M. E. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **130**, 1—11.

Поступила в редакцию  
25.XI.1977

После переработки  
16.I.1978

## STRUCTURE OF A MINOR SIALOGLYCOLIPID FROM THE SEA URCHIN *ECHINOCARDIUM CORDATUM*

SMIRNOVA G. P., CHEKAREVA N. V., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The structure of a minor sialoglycolipid from gonads of the sea urchin *Echinocardium cordatum* has been established. On the basis of total and partial acid hydrolysis, methanolysis, methylation, enzymatic hydrolysis with neuraminidase, periodate and chromium trioxide oxidation, this compound was identified as N-glycolylneuraminyl- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  4)-N-glycolylneuraminyl- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-glycopyranosyl- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  1)ceramide. The long-chain bases of the sialolipid were found to constitute a mixture of phytosphingosines, whose composition was determined by gas-liquid chromatography. The fatty acids of this sialoglycolipid were shown to be the mixture of normal and monohydroxy acids.