



УДК 547.95.02

СТРУКТУРА СИАЛОГЛИКОЛИПИДОВ ИЗ ТКАНИ ГОНАД
МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS*

Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глухобед И. С.

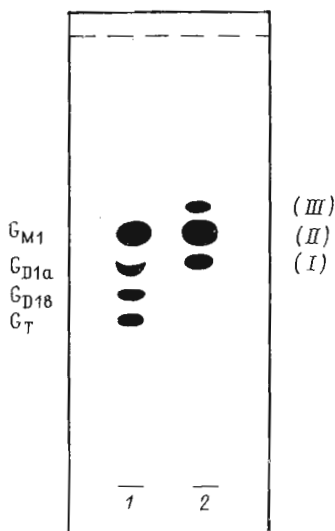
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Из липидного экстракта ткани гонад морского ежа *Strongylocentrotus nudus* выделены два сialogликолипида. Показано, что они представляют собой сфингогликолипиды, сфингозиновым основанием которых является фитосфингозин. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом для более полярного сialogликолипида I предложена структура N-гликолилнейраминил- α -(2 \rightarrow 4)-N-гликолилнейраминил- α -(2 \rightarrow 6)-глюкопиранозил- β -(1 \rightarrow 1)-керамида, а для менее полярного сialogликолипида II — структура N-гликолилнейраминил- α -(2 \rightarrow 6)-глюкопирозил- β -(1 \rightarrow 1)-керамида. Определен состав фитосфингозинов и высших жирных кислот сialogликолипидов.

В последнее время проводятся интенсивные исследования по установлению структуры сialogликолипидов, выделенных из тканей иглокожих [1—8]. Показано, что олигосахаридная цепь сialogликолипидов морских ежей состоит из одного или двух остатков глюкозы, замещенной по C₍₆₎ одним или двумя остатками сиаловой кислоты [5—8]. Недавно был обнаружен сialogликолипид, содержащий в олигосахаридной цепи сульфатированную сиаловую кислоту [7].

В настоящей статье приводятся данные по установлению структуры сialogликолипидов из ткани гонад морского ежа *Str. nudus*. Получение общего липидного экстракта и выделение фракции полярных липидов проводили по описанной ранее методике [7]. Полученный препарат, содержащий 4% сиаловой кислоты, по данным ТСХ состоял из трех сialogликолипидов (см. рисунок), которые по хроматографическому поведению подобны ганглиозидам мозга теленка, причем основным компонентом смеси являлся сialogликолипид II (60%), сialogликолипид I составлял ~ 30% от общей суммы и сialogликолипид III — 10%. Кроме того, в препарате были найдены нейтральные гликолипиды, фосфолипиды и пигменты.

Дальнейшее выделение сialogликолипидов проводили ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻) [7]. При этом удалось освободиться от всех примесей, но разделения сialogликолипидов достигнуто не было. Главные сialogликолипиды I и II были выделены в индивидуальном состоянии препаративной ТСХ, и было показано, что они содержат сиаловые кислоты и нейтральные моносахариды (обнаружение резорциновым [10] и орциновым [11] реактивами соответственно) и не содержат свободной аминогруппы и фосфоэфирных связей (отсутствует ок-



Хроматограмма в тонком слое силикагеля; 1 — ганглиозиды из ткани мозга крупного рогатого скота (номенклатура по Свеннерхолму [9]); 2 — сиалогликолипиды из ткани гонад морского ежа *Str. nudus*. Обнаружение резорциновым реактивом [10]

рашивание с нингидрином и с реактивом на фосфор [12]).

В продуктах метанолиза сиалогликолипидов I и II были обнаружены высшие жирные кислоты и сфингозиновые основания. Следовательно, эти липиды являются сфингогликолипидами. Для установления структуры углеводной цепи гликолипидов I и II были изучены продукты их полного и частичного кислотного гидролиза, ферментативного гидролиза нейраминидазой, окисления CrO_3 и периодатом.

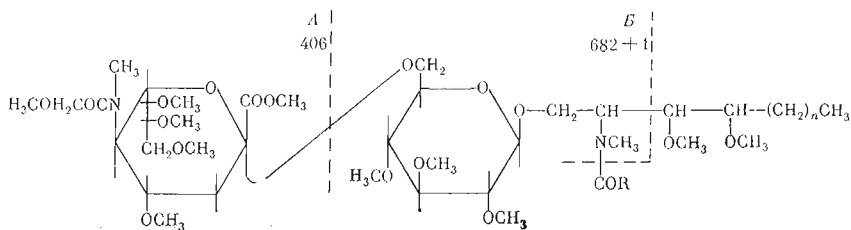
В продуктах полного кислотного гидролиза гликолипидов I и II методом ГЖХ была обнаружена глюкоза в качестве единственного нейтрального моносахарида. В результате частичного кислотного гидролиза этих гликолипидов были выделены сиаловая кислота и нейтральные гликолипиды, обладающие при ТСХ подвижностью цереброзидов мозга телят. Исследование состава нейтральных гликолипидов показало, что они являются глюкоцереброзидами и различаются только набором высших жирных кислот. Следовательно, в гликолипидах I и II с первичным гидроксильным сфингозиновым основанием связан остаток глюкозы.

Сиаловые кислоты гликолипидов I и II были выделены после частичного кислотного гидролиза ионообменной хроматографией на дауэксе 2×8 (CH_3COO^-) [13] и дали характерные цветные реакции с тиобарбитуровой кислотой [14] и с резорциновым реактивом [10]. По данным ТСХ, выделенные сиаловые кислоты представляют собой смесь N-гликолил (более 90%) и N-ацетилнейраминной кислоты. Такой же состав сиаловых кислот ранее был обнаружен в сиалогликолипидах морского ежа *Echinocardium cordatum* [7]. Характер сиаловой кислоты, а также концевое положение ее в олигосахаридной цепи было подтверждено масс-спектрометрией полностью метилированных гликолипидов I и II (пики ионов с m/e 406 и 374 (406—32) соответствуют отщеплению концевой N-гликолилнейраминной кислоты [15]).

Количественные измерения показали, что углеводная цепь более полярного гликолипида I состоит из одного остатка глюкозы и двух остатков сиаловой кислоты, а менее полярного гликолипида II — из одного остатка глюкозы и одного остатка сиаловой кислоты.

Для определения места замещения глюкозы сиаловой кислотой проведено метилирование гликолипидов I и II с последующим метанолизом. Среди частично метилированных метилглюкозидов обнаружены только α - и β -метил-2,3,4-три-O-метилглюкопиранозиды. Следовательно, в олигосахаридной цепи гликолипидов I и II глюкоза замещена остатком сиаловой кислоты по $\text{C}_{(6)}$, так же, как в сиалогликолипидах морских ежей, изученных ранее [5—8]. Возможно, такой тип построения углеводной цепи является общим для сиалогликолипидов морских ежей.

Таким образом, для гликолипида II может быть предложена структура N-гликолилнейраминил-(2 → 6)-глюкопиранозил-(1 → 1)-керамида. Этот вывод подтверждается данными масс-спектрометрии полностью метилированного соединения. В его масс-спектре наряду с пиком иона с m/e 406 (фрагмент А, см. схему) есть интенсивный пик иона с m/e 683 (фрагмент В). Образование аналогичного фрагмента, содержащего часть сфингозинового основания и углеводную цепь гликолипида, было обнаружено



ранее для метилированных производных цереброзидов [7, 16], лактозил-керамида [3] и гематозида [15, 17] (в последнем случае интенсивность соответствующего пика чрезвычайно мала).

Из результатов метилирования и частичного кислотного гидролиза гликолипида I следует, что его олигосахаридная цепь лишена, в начале ее находится глюкоза, к которой последовательно присоединены два остатка сиаловой кислоты. Место замещения остатка сиаловой кислоты, расположенной внутри углеводной цепи, было определено из результатов периодатного окисления. Соединения, образующиеся из сиаловых кислот после периодатного окисления и последующего восстановления KBH_4 , были выделены ионообменной хроматографией на дауксе 2×8 (CH_3COO^-). Спектр поглощения продуктов конденсации этих соединений с резорциновым реактивом имеет один максимум при 630 нм, который соответствует C_7 -сиаловой кислоте [18]. Образование C_7 -сиаловой кислоты было доказано также масс-спектрометрически: в масс-спектре полного ацетата метилового эфира выделенной кислоты, кетогруппа которой была предварительно восстановлена KBH_4 , есть интенсивный пик иона с m/e 274, характерный для C_7 -N-гликолилнейраминаовой кислоты, и практически отсутствует ион с m/e 418, характерный для C_9 -N-гликолилнейраминаовой кислоты [19]. Следовательно, в гликолипиде I оба остатка сиаловой кислоты окислились с разрывом $\text{C}_{(7)} - \text{C}_{(8)}$ -связи. При действии периодата каждая молекула гликолипида I окисляется с выделением двух молекул формальдегида, т. е. остатки сиаловой кислоты разрушаются также и с разрывом связи $\text{C}_{(8)} - \text{C}_{(9)}$. Значит, гидроксильные группы при $\text{C}_{(7)}$, $\text{C}_{(8)}$ и $\text{C}_{(9)}$ свободны, и сиаловые кислоты в гликолипиде I могут быть связаны только по гидроксиду при $\text{C}_{(4)}$. Такой необычный тип связи сиаловых кислот недавно был обнаружен в сиалогликолипиде из ткани гонад морского ежа *Echinocardium cordatum* [8].

Исходя из полученных данных, для гликолипида I может быть предложена структура N-гликолилнейраминил-(2 → 4)-N-гликолилнейраминил-(2 → 6)-глюкопиранозил-(1 → 1)-керамида.

Конфигурация кетозидных связей сиаловых кислот была определена из результатов ферментативного гидролиза гликолипидов I и II нейраминидазой из *Vibrio cholerae*. Оба гликолипида разрушаются под действием нейраминидазы до глюкозилкерамидов с выделением двух и одного остатков сиаловой кислоты соответственно. Следовательно, остатки сиаловой кислоты в изучаемых гликолипидах связаны α -кетозидными связями.

Для определения конфигурации гликозидной связи глюкозы глюкозилкерамида, полученные частичным кислотным гидролизом гликолипидов I и II, были ацетилированы и затем окислены хромовым ангидридом. Глюкоза в обоих препаратах при этом разрушилась полностью; следовательно, она связана со сфингозиновым основанием β -гликозидной связью [20].

Для установления структуры липидной части гликолипидов I и II были изучены продукты их метанолиза и периодатного окисления. Сфингозиновое основание, выделенное после метанолиза препаратов, в тонком слое силикагеля обладало подвижностью фитосфингозина пекарских дрожжей. Продукты периодатного окисления гликолипидов после распределения между водой и гексаном восстанавливали KBH_4 . Из водного слоя после метанолиза был выделен 2-амино-1,3-пропадиол, идентифици-

Таблица 1

Состав алифатических спиртов и соответствующих фитосфингозинов (% от суммы) сиалогликолипидов I и II из ткани гонад морского ежа *Str. nudus*

Спирты	Фитосфингозины	I	II	Спирты	Фитосфингозины	I	II
C _{13:0}	C ₁₆	28,2	11,9	C _{16:0}	C ₁₉	—	6,2
C _{14:0}	C ₁₇	2,2	5,8	C _{18:0}	C ₂₁	—	5,5
C _{15:0}	C ₁₈	69,5	68,3	Неидент.	—	0,1	—

Таблица 2

Состав высших жирных кислот (% от суммы) сиалогликолипидов I и II из ткани гонад морского ежа *Str. nudus*

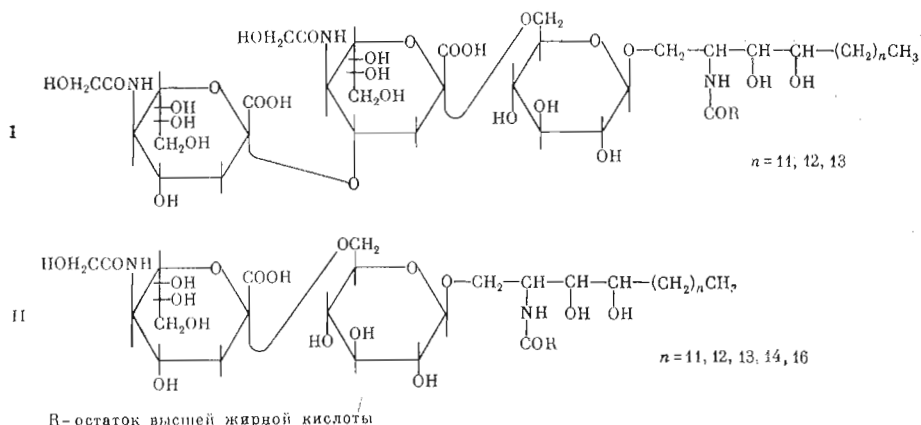
Кислоты	Нормальные кислоты		α-Оксикислоты		Кислоты	Нормальные кислоты		α-Оксикислоты	
	I	II	I	II		I	II	I	II
C _{12:0}	0,06	—	—	—	C _{20:0}	0,7	7,1	4,8	12,0
C _{13:0}	0,14	—	—	—	C _{21:0}	0,1	2,2	1,1	3,0
C _{14:0}	6,3	4,9	12,7	—	C _{22:0}	1,3	4,4	26,8	15,1
C _{15:0}	2,1	3,2	24,6	4,4	C _{23:0}	—	0,5	16,0	0,5
C _{16:0}	16,0	16,4	3,0	2,3	C _{24:0}	—	0,5	7,0	8,2
C _{17:0}	—	1,8	—	0,5	C _{26:0}	—	8,0	—	1,4
C _{18:0}	72,0	49,4	3,0	52,0	Неидент.	—	—	1,0	—
C _{19:0}	0,3	1,6	—	0,5					

рованный масс-спектрометрически в виде 2',4'-динитрофенильного производного [7]. В органическом слое были обнаружены высшие жирные спирты. Идентификация этих продуктов показывает, что гидроксильные группы сфингозинового основания находятся у C₍₁₎, C₍₃₎ и C₍₄₎, а аминогруппа — у C₍₂₎, т. е. занимает такое же положение, как и в фитосфингозине.

Состав фитосфингозинов гликолипидов I и II был определен в результате анализа спиртов методом ГЖХ (табл. 1). Как видно из таблицы, основным компонентом смеси сфингозиновых оснований является C₁₈-фитосфингозин. Подобный состав сфингозиновых оснований был обнаружен в сиалогликолипидах морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* [5] и *Echinocardium cordatum* [7]. Однако в сиалогликолипидах из сперматозоидов морского ежа *Anthocardaris crassispina* фитосфингозин отсутствует, а главными компонентами смеси сфингозиновых оснований являются C₁₈-сфингозин и C₁₈-дигидросфингозин [6].

В продуктах метанолиза гликолипидов I и II были обнаружены метиловые эфиры высших жирных незамещенных и α-монооксикислот, причем последние составляют не более 20% смеси кислот. В сиалогликолипидах других видов морских ежей оксикислоты также присутствуют в небольших количествах [7] или отсутствуют совсем [6]. Состав кислот определен методом ГЖХ, монооксикислоты анализировали в виде метиловых эфиров метоксикислот (табл. 2). Как видно из таблицы, в обоих гликолипидах обнаружены только насыщенные жирные кислоты. Интересно, что сиалогликолипиды других видов морских ежей [5—8] содержат как насыщенные, так и ненасыщенные высшие жирные кислоты, а в некоторых случаях последние составляют более половины смеси кислот [5,6].

На основании полученных данных для гликолипида I может быть предложена структура N-гликолилнейраминил-α-(2 → 4)-N-гликолилнейраминил-α-(2 → 6)-глюкопиранозил-β-(1 → 1)-керамида, а для гликолипида II — N-гликолилнейраминил-α-(2 → 6)-глюкопиранозил-β-(1 → 1)-керамида.



Экспериментальная часть

Морские ежи *Str. nudus* собраны в сублиторальной зоне залива Посет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт гонад и сырой препарат сиалогликолипидов получали как описано ранее [5]. Френозид из мозга крупного рогатого скота выделяли по методу [21]. N-Ацетилнейраминовая кислота — препарат фирмы Koch-Light; нейраминидаза *Vibrio cholerae* (500 ед/мл) — фирмы Calbiochem. Все растворители перегоняли перед использованием.

Колоночную хроматографию сиалогликолипидов на ДЕЛЕ-целлюлозе (CH_3COO^-) проводили как описано ранее [7].

Аналитическую и препаративную ТСХ осуществляли на силикагеле марки КСК (150 меш), содержащем 5% гипса в следующих системах растворителей: для сиалогликолипидов — хлороформ — метанол — 2 п. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение орциновым [11] и резорциновым [10] реактивами; для нейтральных гликолипидов — хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сфингозиновых оснований — хлороформ — метанол — 2 п. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 2% раствором нингидрина в бутаноле; для алифатических спиртов — хлороформ — метанол (49 : 1), обнаружение раствором бромтимолблеу или конц. H_2SO_4 ; для метиловых эфиров кислот — дихлорэтан, обнаружение бромтимолблеу или конц. H_2SO_4 . Из 630 г сырой ткани гонад было выделено 30 мг гликолипида I и 60 мг гликолипида II. 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% ЕС NSS-M на диатомите С при 180°; частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155°; алифатические спирты — на колонке с 3% SE на диатомите С при 150 → 220° (2 град/мин); высшие жирные кислоты в виде метиловых эфиров нормальных кислот и метиловых эфиров метоксикислот — на той же колонке при 170 → 270 и 200 → 280° (2 град/мин).

Масс-спектры сняты на приборе СМ-6 Varian MAT при 70 эВ; температура ионизационной камеры 180°, температура нагрева образцов для ацетилированных производных нейраминовой кислоты 200° и для метилированных гликолипидов 320°.

Сфингозиновые основания количественно определяли по методу [22], калибровочную кривую строили по френозину.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (2 мг) проводили в течение 6 ч 2 п. HCl (1 мл) при 100°. Моносахариды анализировали методом ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз гликолипидов (5 мг) проводили 1,5 ч 0,1 п. H_2SO_4 (5 мл) при 80°. Реакционную смесь анализировали против воды

(500 мл) при 20° в течение 24 ч. Недиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ на присутствие гликолипидов. Нейтральные гликолипиды выделяли препаративной ТСХ. Внешний водный слой упаривали до 10 мл, пропускали через колонку с дауэксом 2×8 (CH_3COO^-), сиаловые кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером [13], элюат деионизировали смолой IR-120 (H^+). Сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [10], реактивом NaIO_4 — тиобарбитуровая кислота [14] и анализировали ТСХ на пластинках, импрегнированных 0,2 М NaN_2PO_4 , в системе пропанол — вода — 2 п. NH_4OH (30 : 10 : 5) [23].

Кислый метанолиз гликолипидов (40 мг) осуществляли в течение 18 ч 3 М HCl в метаноле (2 мл) при 80°. Метилвые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли, как описано ранее [5], анализировали методом ТСХ. Метилвые эфиры нормальных и α -оксикислот разделяли препаративной ТСХ и анализировали методом ГЖХ. Метилвые эфиры α -оксикислот предварительно метилировали [24].

Гликолипиды (4 мг) метилировали по Хакомори [25], экстрагировали хлороформом, диализовали против воды, очищали препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (49 : 1) и анализировали методом масс-спектрометрии. Метилированные гликолипиды подвергали кислотному метанолизу и частично метилированные метилглюкозиды анализировали методом ГЖХ.

Окисление хромовым ангидридом нейтральных гликолипидов и последующий анализ моносахаридов проводили по методу [20]. В качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Периодатное окисление гликолипидов (5 мг) проводили 0,02 М NaIO_4 , как описано ранее [5]. Высшие жирные альдегиды экстрагировали гексаном, восстанавливали KBH_4 и анализировали методом ГЖХ. Дегрированный гликолипид I восстанавливали KBH_4 , подвергали частичному кислотному гидролизу и сиаловую кислоту выделяли и анализировали ТСХ, как описано выше. Далее сиаловую кислоту восстанавливали KBH_4 , обрабатывали диазометаном, ацетилировали в течение 12 ч смесью пиридин — уксусная кислота (1 : 1) при 20° и анализировали методом масс-спектрометрии [7].

Восстановленные дегрированные гликолипиды I и II подвергали метанолизу 3 п. HCl в метаноле, выделяли 2-амино-1,3-пропандиол, который анализировали методом масс-спектрометрии в виде 2', 4'-динитрофенильного производного [7].

Формальдегид, выделяющийся при периодатном окислении гликолипидов, количественно определяли по методу [26], калибровочную кривую строили по манниту.

Ферментативный гидролиз гликолипидов (4 мг) нейраминидазой из *Vibrio cholerae* осуществляли по методу [27]. Сиаловые кислоты анализировали реакцией с тиобарбитуровой кислотой [14] и с резорциновым реактивом [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова И. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. (1973) Докл. АН СССР, 208, 981—984.
2. Sugita M., Hori T. (1976) J. Biochem., 80, 637—640.
3. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. (1977) Биоорган. химия, 3, 1048—1054.
4. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. (1977) Биоорган. химия, 3, 1280—1282.
5. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) Biochim. et biophys. acta, 326, 74—83.
6. Hoshi M., Nagai Y. (1975) Biochim. et biophys. acta, 388, 152—162.
7. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) Biochim. et biophys. acta, 424, 274—283.
8. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. (1968) Биоорган. химия, 4, 937—942.
9. Svennerholm G. (1963) J. Neurochem., 10, 613.
10. Svennerholm G. (1957) Biochim. et biophys. acta, 24, 604—611.

11. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetachev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Comp. Biochem. Physiol.*, **34**, 163—177.
12. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I. (1968) *J. Lip. Res.*, **9**, 396.
13. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. (1959) *Acta chem. scand.*, **13**, 856—858.
14. Warren L. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971—1975.
15. Ohashi M., Yamakawa T. (1977) *J. Biochim.*, **81**, 1675—1690.
16. Karlsson K.-A., Samuelsson B. E., Steen G. O. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **306**, 307—316.
17. Karlsson K.-A., Pascher I., Samuelsson B. E. (1974) *Chem. and Phys. Lipids*, **12**, 271—286.
18. Kuhn R., Gauche A. (1965) *Chem. Ber.*, **98**, 395—413.
19. Smirnova G. P., Chekareva N. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. (1977) *Carbohydr. Res.*, **59**, 235—239.
20. Laine R. A., Renkonen O. (1975) *J. Lip. Res.*, **16**, 102—106.
21. Carter H. E., Haines W. J., Leduard W. E., Norris W. P. (1947) *J. Biol. Chem.*, **169**, 77—82.
22. Lauter C. G., Trams E. G. (1962) *J. Lip. Res.*, **3**, 136—138.
23. Hotta K., Hamazaki H., Kurokawa M. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 5434—5440.
24. Radin N. S., Kishimoto Y. (1959) *J. Lip. Res.*, **1**, 72—78.
25. Hakomori S. I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205—208.
26. Vaskovsky V. E., Isay S. V. (1969) *Anal. Biochem.*, **30**, 25—31.
27. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **210**, 229—303.
28. Schneir M. L., Rafelson M. E. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **130**, 1—11.

Поступила в редакцию
1.II.1978

THE STRUCTURE OF SIALOGLYCOLIPIDS FROM GONADS OF THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS*

KOCHETKOV N. K., SMIRNOVA G. P., GLUHKODED I. S.

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

A mixture of three sialoglycolipids was obtained from gonads of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Two of the constituents were isolated by preparative thin-layer chromatography and their structures was established. On the basis of total and partial acid hydrolyses, methanolysis, enzymatic cleavage with neuraminidase, as well as periodate and chromium trioxide oxidation, the structure of sialoglycolipid I was deduced to be N-glycolylneuraminyl- α -(2 \rightarrow 4)-N-glyconeuraminyl- α -(2 \rightarrow 6)-glucopyranosyl- β -(1 \rightarrow 1)-ceramide, whereas that of sialoglycolipid II was indentified as N-glycolylneuraminyl- α -(2 \rightarrow 6)-glucopyranosyl- β -(1 \rightarrow 1)-ceramide. In these sialoglycolipids, the long-chain bases were demonstrated to represent a mixture of phytosphingosines, and the fatty acid moiety was built up of the normal and monohydroxy fatty acid mixture.