



УДК 547.95.02

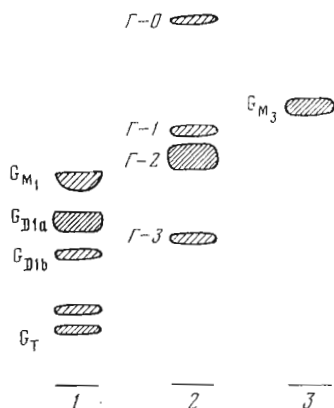
**СТРУКТУРА ГАНГЛИОЗИДОВ ЯЙЦЕКЛЕТОК МОРСКОГО ЕЖА  
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*****Проказова Н. В., Коцаров С. Л., Садовская В. Л.,  
Мошенский Ю. В., Бергельсон Л. Д.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва***Звездина Н. Д.***Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова  
Академии наук СССР, Москва*

Из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* выделено два ганглиозида необычной структуры, содержащие остаток сиаловой кислоты в середине олигосахаридной цепи. Масс-спектрометрией intactных метилированных ганглиозидов, а также анализом продуктов частичной деградации установлено, что один из ганглиозидов представляет собой N-гликолилнейраминозил-( $\alpha 2 \rightarrow 6$ )-глюкозил-(1  $\rightarrow$  8)-N-гликолилнейраминозил-(2  $\rightarrow$  6)-глюкозил-(1  $\rightarrow$  1)-церамид, а второй — 8-сульфо-N-гликолилнейраминозил-( $\alpha 2 \rightarrow 6$ )-глюкозил-(1  $\rightarrow$  8)-N-гликолилнейраминозил-(2  $\rightarrow$  6)-глюкозил-(1  $\rightarrow$  1)-церамид.

Ранее нами было показано, что ганглиозиды яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* способны защищать эти клетки от действия цитотоксических веществ — аналогов серотонина и ацетилхолина (серотонино- и ацетилхолинолитиков) [1]. Было установлено, что при повышении плотности клеток в единице объема среды один из эндогенных ганглиозидов накапливается в инкубационной среде, в результате чего клетки оказываются самозащищенными против серотонино- и ацетилхолинолитиков. В связи с этой биологической функцией ганглиозидов яйцеклеток представляло интерес установление их структуры. Ганглиозиды, выделенные из целых гонад этого организма, уже изучались ранее [2], однако их структура до конца не была выяснена. В настоящей работе сообщаются результаты установления структуры двух основных ганглиозидов яйцеклеток.

Как видно из хроматограммы, приведенной на рис. 1, суммарные ганглиозиды, выделенные из яйцеклеток, содержат два основных (Г-1 и Г-2) и два минорных (Г-3 и Г-0) компонента. Выделенные ганглиозиды, по данным ТСХ, были однородными веществами, они обнаруживались резорциновым [3], антроновым [4] реагентами и не обнаруживались нингидрином и реагентом на фосфолипиды [5]. ИК-спектры Г-1 и Г-2 содержали все характерные для гликолипидов полосы поглощения, а в спектре Г-2 присутствовали дополнительно две полосы при 800 и 1220  $\text{см}^{-1}$ , характерные для S—O-связи сульфата и S $\rightarrow$ O-связи ионизированного сульфата соответственно.

Рис. 1. Тонкослойная хроматография ганглиозидов яйцеклеток *S. intermedius*: 1 — ганглиозиды мозга быка, 2 — ганглиозиды яйцеклеток, 3 — гематозид печени быка. Силикагель КСК, хлороформ — метанол — 2,5 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60 : 35 : 8)



Количественное определение сфингозина [6], сиаловой кислоты [7] и сахаров [8] показало, что Г-1 и Г-2 содержат эти компоненты в соотношении 1 : 2 : 2. По данным ГЖХ ТМС-производных метилгликозидов, ганглиозиды Г-1 и Г-2 содержат только глюкозу и сиаловую кислоту и не содержат гексозаминов. Образец Г-2 содержит остаток серы в молярном отношении к сиаловой кислоте 1 : 2, в Г-1 сера отсутствует.

При анализе концевых сиаловых кислот, выделенных из продуктов частичного кислотного гидролиза [3] Г-1 и десульфатированного \* Г-2, с помощью ТСХ [9, 10] было показано, что оба ганглиозиды содержат в конце углеводной цепи только N-гликолилнейраминовою кислоту. Структура этих сиаловых кислот была подтверждена при изучении масс-спектров ТМС-производных их метиловых эфиров [11]. В масс-спектрах наблюдались пики ионов с  $m/e$  756 (9%), 712 (9%), 566 (26%), 388 (100%), 317 (31%), 261 (28%), 217 (67%), что находится в полном соответствии с масс-спектрометрическими данными, имеющимися в литературе для соответствующих производных N-гликолилнейраминовою кислоты [12]. Природа нейраминовых кислот, находящихся в середине углеводной цепи ганглиозидов Г-1 и Г-2, установлена масс-спектрометрией их сполна метилированных производных (см. ниже).

Анализ высших жирных кислот Г-1 и Г-2 в виде их метиловых эфиров, полученных метанолизом ганглиозидов, показал при ТСХ присутствие незамещенных и монооксикислот. Смесь кислот силилировали [13, 14] и анализировали с помощью комбинированного метода ГЖХ и масс-спектрометрии. Массовые числа характеристических фрагментов приведены в таблице.

Масс-спектрометрией сполна метилированных производных Г-1 и Г-2 (см. ниже) было показано, что сфингозиновые основания представлены в основном  $\text{C}_{18}$ -фитосфингозином. После периодат-перманганатного окисления [15] ганглиозидов Г-1 и Г-2 методом ГЖХ были обнаружены тридекановая (16%), тетрадекановая (11%) и пентадекановая (73%) кислоты. Поскольку содержание ненасыщенных жирных кислот в ганглиозиде невелико, можно полагать, что обнаруженные кислоты образовались из остатка фитосфингозина.

После периодатного окисления [16] ганглиозидов Г-1 и Г-2 с последующим восстановлением  $\text{NaBH}_4$  методом ГЖХ в виде ТМС-производных были идентифицированы тридеканол, тетрадеканол и пентадеканол. На основании этих данных можно заключить, что оба ганглиозиды содержат только  $\text{C}_{16}$ -,  $\text{C}_{17}$ - и  $\text{C}_{18}$ -фитосфингозины.

Дальнейшее изучение структуры ганглиозидов проводили методом масс-спектрометрии их сполна метилированных производных. Интерпре-

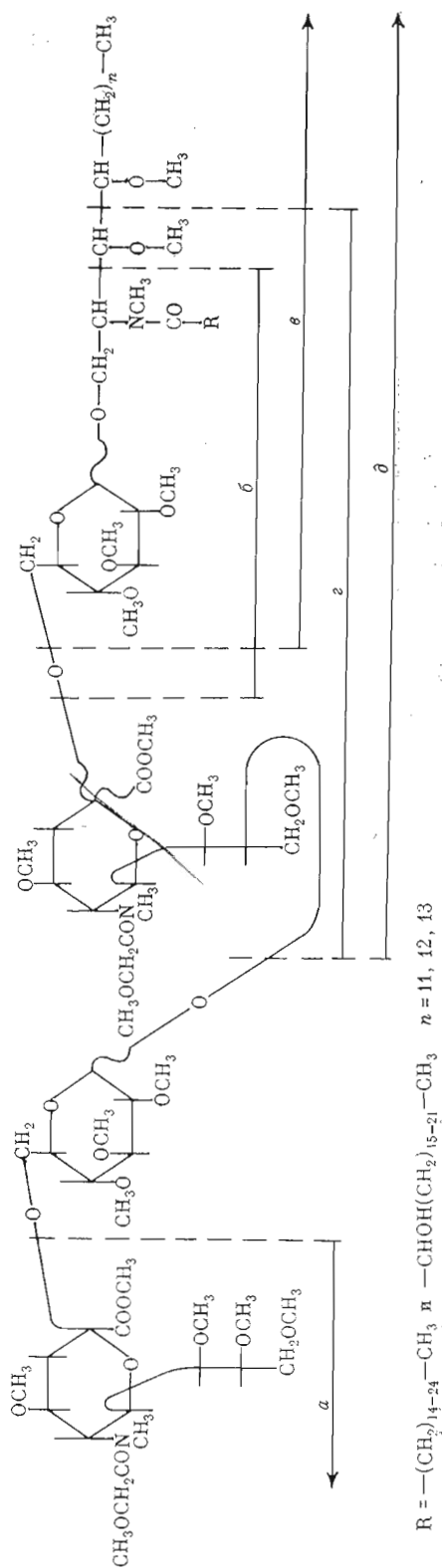
\* См. ниже.

тацию масс-спектров проводили на основании изученной ранее фрагментации производных ганглиозидов (см. схему и работу [17]). В масс-спектре метилированного Г-1 (рис. 2) присутствуют два интенсивных пика ионов  $a$  и  $a - \text{CH}_3\text{OH}$  ( $m/e$  406 и 374), соответствующих терминальному остатку N-гликолилнейраминовой кислоты; в масс-спектре метилированного Г-2 пики этих ионов имеют гораздо меньшую интенсивность. В масс-спектре метилированного, восстановленного и силилированного производного ганглиозида Г-1 фрагмент, отвечающий терминальной N-гликолилнейраминовой кислоте, имеет  $m/e$  436.

В масс-спектре сполна метилированных производных ганглиозидов Г-1 и Г-2 практически отсутствуют пики ионов с  $m/e$  219  $\rightarrow$  187, что указывает на отсутствие терминальной гексозы у обоих ганглиозидов. В дальнейшем это предположение подтвердилось при анализе гексоз в виде ацетатов полиолов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии (см. ниже).

В масс-спектре сполна метилированного производного ганглиозида Г-1 присутствуют пики, соответствующие фрагментам типа  $b$ , которые отражают жирнокислотный состав ганглиозида. Среди них имеются пики фрагментов, содержащие негидроксилированные высшие жирные кислоты  $\text{C}_{26:1}$  ( $m/e$  450 и 432),  $\text{C}_{25:0}$  ( $m/e$  438 и 424),  $\text{C}_{23:0}$  ( $m/e$  410 и 392),  $\text{C}_{18:0}$  ( $m/e$  340 и 322), и пики фрагментов, содержащих  $\alpha$ -оксикислоты  $\text{C}_{24:0}$  ( $m/e$  452, 434 и 403),  $\text{C}_{23:0}$  ( $m/e$  438, 420 и 389),  $\text{C}_{22:0}$  ( $m/e$  424, 406 и 375). В масс-спектре метилированного Г-2 присутствуют фрагменты типа  $b$  с  $m/e$  424 и 406, соответствующие  $\text{C}_{24:0}$ -жирной кислоте, и  $m/e$  438, 420 и 389, соответствующие  $\text{C}_{23:0}$ - $\alpha$ -оксикислоте [17].

О структуре сфингозиновых оснований можно судить по ионам типа  $e$ . В масс-спектре имеются два ряда пиков ионов, соответствующих комбинациям  $\text{C}_{18}$ -фитосфингозина с незамещенными ( $m/e$  719, 707, 693, 679, 609 для  $\text{C}_{26:1}$ ,  $\text{C}_{25:0}$ ,  $\text{C}_{24:0}$ ,  $\text{C}_{23:0}$ ,  $\text{C}_{18:0}$  соответственно) и моноокси- ( $m/e$  693, 707 и 721 для  $\text{C}_{20:0}$ ,  $\text{C}_{23:0}$ ,  $\text{C}_{24:0}$  соответственно) жирными кислотами. Диагностический фрагмент фитосфингози-



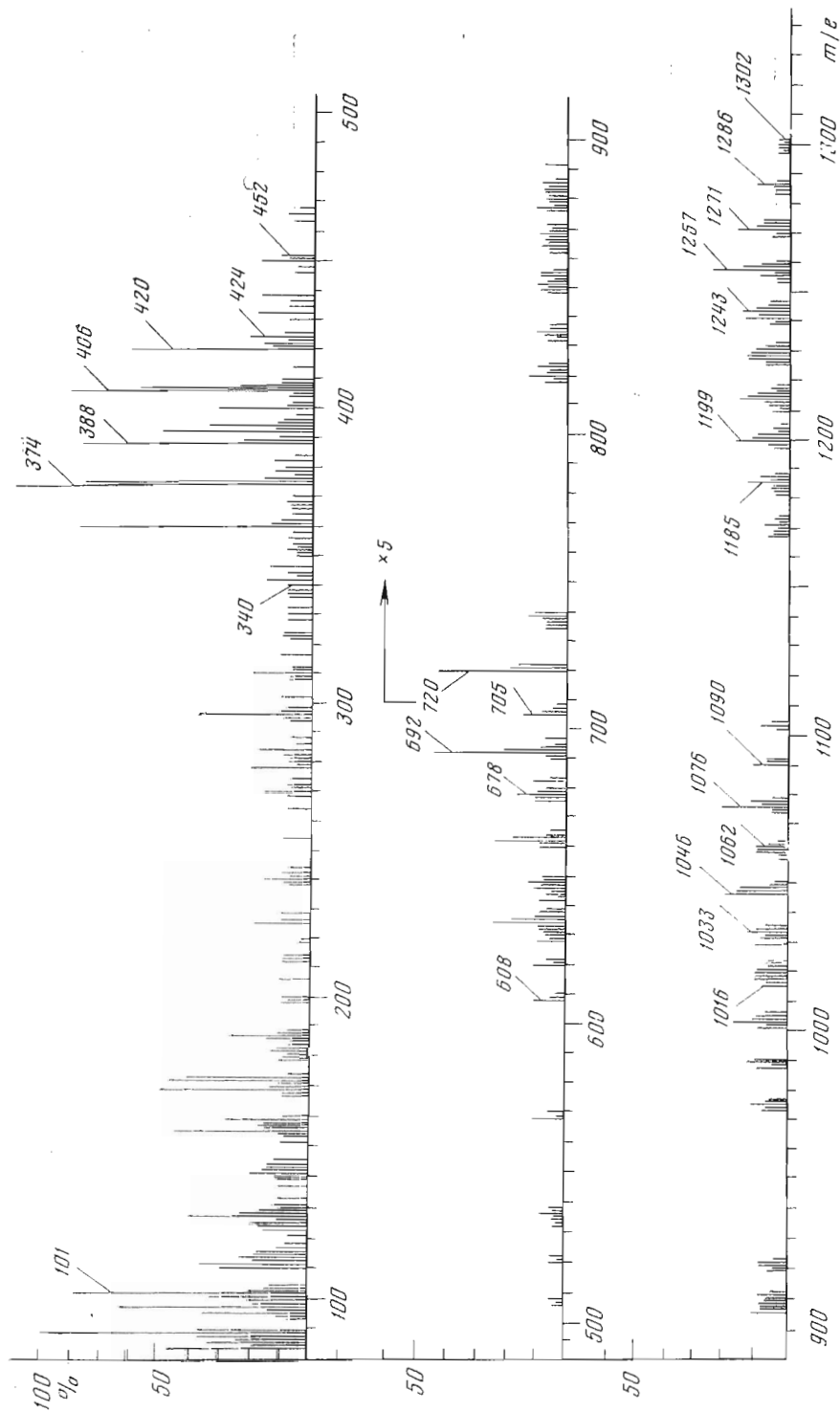


Рис. 2. Масс-спектр метилированного ганглиозида Г-1 (относительная интенсивность в % максимального пика)

**Хромато-масс-спектрометрическая идентификация жирных кислот и  
ТМС-производных  $\alpha$ -окси кислот ганглиозидов *S. intermedius*  
в виде их метиловых эфиров**

Жирные кислоты	Массовые числа основных фрагментов					
	M	M-29	M-32	M-43	m/e 87	$\text{CH}_3\text{OC}=\text{CH}_2$   OH
$\text{C}_{16}^*$ : 0	270	241	239	227	+	+
$\text{C}_{18}$ : 0	298	269	267	255	+	+
$\text{C}_{20}^*$ : 1	322	293	290	279	+	+
$\text{C}_{22}^*$ : 1	350	321	318	307	+	+
$\text{C}_{23}$ : 0	366	337	334	323	+	+
$\text{C}_{24}$ : 0	380	351	348	337	+	+
$\text{C}_{25}$ : 0	394	365	362	351	+	+
$\text{C}_{26}$ : 1	406	377	374	363	+	+
Триметил- силиловые производные $\alpha$ -окси кислот	M-15	M-43	M-59	$\text{CHCO}_2\text{CH}_3$    $+\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ m/e 159	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}$    $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+$ m/e 129	$(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+$    $\text{H}_2\text{C}$ m/e 103
$\text{C}_{18}^*$ : 0	371	343	323	+	+	+
$\text{C}_{19}^*$ : 1	385	355	339	+	+	+
$\text{C}_{20}$ : 0	399	369	353	+	+	+
$\text{C}_{22}^*$ : 1	425	397	381	+	+	+
$\text{C}_{22}$ : 0	427	401	383	+	+	+
$\text{C}_{23}$ : 0	441	413	397	+	+	+
$\text{C}_{24}$ : 0	455	427	411	+	+	+

\* Минорные компоненты.

на с *m/e* 396 имеет очень малую интенсивность, что отмечалось и для других ганглиозидов, содержащих фитосфингозин [18]. Характерные фрагменты, образуемые сфингозином, в масс-спектрах обоих ганглиозидов обнаружены не были.

В масс-спектрах метилированных ганглиозидов Г-1 и Г-2 в диапазоне *m/e* 1016—1076 присутствуют ионы типа  $\epsilon$ , в состав которых входят остатки церамида, глюкозы и N-гликолилнейраминовой кислоты. В масс-спектрах метилированных, восстановленных и силилированных производных ганглиозидов Г-1 и Г-2 пики ионов типа  $\epsilon$  сдвинуты на 18 массовых единиц и находятся в диапазоне *m/e* 1034—1092.

В области *m/e* 1182—1302 масс-спектров сплона метилированных ганглиозидов Г-1 и Г-2 находится группа гомологических ионов типа  $\delta$ , причем каждый ион имеет спутника с массой, меньшей на 59 массовых единиц, образующихся в результате отщепления фрагмента  $[\text{COOCH}_3]^+$ . Соответствующие пики присутствуют и в масс-спектрах метилированных, восстановленных и силилированных производных ганглиозидов Г-1 и Г-2.

Ввиду того что ионы с большими значениями *m/e* не удается регистрировать, на основании полученных данных можно судить о составе только части молекулы ганглиозида (фрагмент типа  $\delta$ ).

Расщепление ганглиозида Г-1 и десульфатированного Г-2 нейраминидазой *Vibrio cholerae* [19] не завершается даже после инкубации в течение:

7 сут. В результате освобождается около половины присутствующей в ганглиозидах сиаловой кислоты, при этом в обоих случаях образуется резорцинположительный продукт, имеющий большую хроматографическую подвижность, чем исходный ганглиозид. Поскольку «концевые» остатки сиаловой кислоты обычно легко отщепляются нейраминидазой, эти данные указывают на то, что в исследуемых ганглиозидах только один из остатков сиаловой кислоты находится в конце углеводной цепи и связан  $\alpha$ -кетозидной связью. Ганглиозид Г-2 был полностью резистентен к нейраминидазе, что можно объяснить присутствием заместителя по гидроксильной группе в терминальном остатке сиаловой кислоты [20]. Это подтверждается тем фактом, что в масс-спектре метилированного производного ганглиозида Г-2 пики фрагментов концевой сиаловой кислоты имеют значительно меньшую интенсивность, чем в масс-спектре сполна метилированного ганглиозида Г-1. Учитывая этот факт и то обстоятельство, что ганглиозид Г-2 содержит серу, мы предположили, что он может быть сульфоганглиозидом, в котором сульфогруппа связана с концевой сиаловой кислотой. Ганглиозид такого типа был выделен ранее из гонад другого вида морских ежей *Echinocardium cordatum* [20]. Для доказательства этого предположения был проведен сольволиз сульфогруппы ганглиозида Г-2 [20], в результате которого был получен продукт, совпадающий по хроматографической подвижности с ганглиозидом Г-1. Молярное отношение сиаловой кислоты и глюкозы в выделенном продукте составляло 1 : 1. Масс-спектр продукта метилирования десульфатированного Г-2 содержал интенсивные пики концевой N-гликолилнейраминовой кислоты при  $m/e$  406 и 374. Пики ионов остальных фрагментов совпали с пиками ионов соответствующих фрагментов в масс-спектрах метилированного Г-2. На основании сказанного выше можно заключить, что ганглиозиды Г-1 и Г-2 содержат один концевой остаток N-гликолилнейраминовой кислоты, которая у Г-2 замещена  $SO_3H$ -группой.

Углеводная последовательность ганглиозидов Г-1 и Г-2 была определена следующим образом. Мягкий кислотный гидролиз обоих ганглиозидов [2] приводил к освобождению цереброзидов (установлено ТСХ) и смеси водорастворимых компонентов. Последняя была разделена с помощью ТСХ на три фракции, одна из которых (наименее полярная) представляла собой глюкозу, вторая — сиаловую кислоту.

Таким образом, из приведенных данных следует, что углеводная цепь ганглиозидов линейна и церамид связан с остатком глюкозы, замещенной дисахаридом N-гликолилнейраминовая кислота — глюкоза, на невозстанавливаемом конце которого находится N-гликолилнейраминовая кислота (для Г-1) и сульфатированная N-гликолилнейраминовая кислота (для Г-2).

Для установления мест замещения в остатках глюкозы оба метилированных ганглиозида были подвергнуты кислотному гидролизу и полученные частично метилированные сахара были превращены в ацетаты соответствующих полиолов [21]. Анализ этих производных с помощью ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии показал, что оба ганглиозида образуют только 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилсорбит [22]. Отсюда можно заключить, что в молекулах Г-1 и Г-2 оба остатка глюкозы замещены в положении 6. При периодатном окислении Г-1 обнаружен формальдегид [23] в молярном отношении к сиаловой кислоте 1 : 2. Так как он может образоваться только в результате разрыва связи C8 — C9 в сиаловой кислоте, то, следовательно, один моль формальдегида выделился из концевой сиаловой кислоты, а остаток, находящийся внутри олигосахаридной цепи Г-1, замещен в положении 8 или 9. В случае Г-2 образование формальдегида не наблюдалось; следовательно, оба остатка сиаловой кислоты замещены в положении 8 или 9.

Для определения мест замещения остатков сиаловой кислоты ганглиозиды окисляли  $NaIO_4$ , продукты окисления восстанавливали  $NaNH_4$ ,

подвергали кислотному метанолизу и получившиеся метиловые эфиры метилкетозидов сиаловых кислот [24] анализировали ГЖХ в виде ТМС-производных. Таким образом при анализе Г-1 были обнаружены равные количества C<sub>7</sub>- и C<sub>9</sub>-сиаловых кислот, а в случае Г-2 — только C<sub>9</sub>-сиаловая кислота. Эти данные позволили заключить, что в ганглиозидах Г-1 и Г-2 сиаловая кислота, находящаяся в середине углеводной цепи, замещена в положении 8, а концевая сиаловая кислота в молекуле Г-2 имеет заместитель (сульфогруппу) при С8.

Совокупность изложенных выше данных позволяет приписать ганглиозиду Г-1 структуру N-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 8)-N-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 1)-церамида, а ганглиозиду Г-2 — структуру 8-сульфо-N-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 8)-N-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 1)-церамида. Конфигурация гликозидных связей Г-1 и Г-2 не исследована, за исключением кетозидной связи концевых остатков сиаловой кислоты, которые имеют α-конфигурацию.

Таким образом, неоплодотворенные яйцеклетки содержат два основных ганглиозида, имеющих одинаковый сфингозиновый жирнокислотный и углеводный состав и одинаковую последовательность углеводов. Они различаются только тем, что терминальный остаток сиаловой кислоты одного из них содержит сульфогруппу.

### Экспериментальная часть

Морские ежи были собраны в заливе Посьет Японского моря в августе-сентябре. Яйцеклетки извлекали из гонад введением животным хлористого калия, многократно отмывали отфильтрованной морской водой. Жизнеспособность яйцеклеток определяли по их способности к оплодотворению и дальнейшему нормальному развитию [25].

Липиды экстрагировали по методу Дятловицкой и сотр. [26]. Ганглиозиды отделяли от прочих липидов многократной промывкой липидного экстракта по методу Фолча и сотр. [27]. Водные промывки, содержащие ганглиозиды, подвергали диализу через целлофановую мембрану против дистиллированной воды при 2—3° в течение 3 сут, затем упаривали в вакууме при 40°. Остаток растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды и очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-50 [28]. Препаративную хроматографию ганглиозидов проводили на пластинках (18 × 24 см) с тонким слоем (0,5 мм) силикагеля КСК (150—200 меш) в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. NH<sub>4</sub>OH (60 : 35 : 8) [29]. Зоны обнаруживали опрыскиванием водой и резорциновым реагентом [3]. Ганглиозиды Г-1 и Г-2 элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол — вода (50 : 50 : 15). ИК-спектры Г-1 снимали в таблетке с KBr, Г-2 — в пленке.

Сиаловые кислоты определяли по методу Свеннерхольма [7]. Количественное содержание серы в ганглиозиде Г-2 определяли элементным анализом.

Качественный и количественный анализ углеводов в виде ТМС-эфиров метилгликозидов осуществляли методом ГЖХ на аргоновом хроматографе фирмы Pye с пламенно-ионизационным детектором на колонке с 5% SE-30 на хромосорбе W (60—80 меш) при программировании температуры от 150 до 300° (6 град/мин) [8]. В качестве внутреннего стандарта использовали маннит.

Количественный анализ сфингозиновых оснований осуществляли по методу Лаутера и Тремса [6] с той разницей, что гидролиз ганглиозидов проводили смесью конц. HCl — метанол (1 : 8).

Метиловые эфиры жирных кислот получали кислотным метанолизом ганглиозидов и выделяли экстракцией гексаном. Аналитическую хроматографию на силикагеле проводили в системе гексан — диэтиловый эфир—

уксусная кислота (85 : 15 : 1). Хроматограммы обнаруживали 10%  $H_2SO_4$  в метаноле. Метилловые эфиры незамещенных жирных кислот и ТМС-производные метилловых эфиров оксикислот анализировали на хромато-масс-спектрометре LKB-9000 (колонка (1500 × 3 мм) с 3% SE-30 на хромосорбе W (80—100 меш)) при программировании температуры от 140 до 300° (5 град/мин) [13, 14].

Концевые сиаловые кислоты Г-1 и десульфатированного Г-2 выделяли мягким кислотным гидролизом и хроматографией на дауэксе 2 × 8 по методу [3]. Анализ сиаловых кислот проводили с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем КСК (150—200 меш) в системе *n*-пропанол — вода — 2 н.  $NH_4OH$  (6 : 2 : 1) по методу [10] и на силикагеле, импрегнированном 0,2 М  $NaH_2PO_4$  в системе *n*-бутанол — этанол — вода (2 : 1 : 1) при трехкратном проявлении [9]. Хроматограммы обнаруживали резорциновым реагентом.

Сиаловые кислоты метилировали диазометаном по методу Камерлинга и сотр. [11] и полученные метилловые эфиры силилировали по методу [30]. Масс-спектр ТМС-производного метилового эфира сиаловой кислоты снимали на масс-спектрометре CH-5 (Varian MAT) при температуре испарения 100° и ионизационном напряжении 70 эВ.

Периодат-перманганатное окисление ганглиозидов проводили по методу [15], жирные кислоты, получившиеся из фитосфингозинов, анализировали в виде метилловых эфиров на хроматографе «Цвет-6» с пламенно-ионизационным детектором, на колонке (2500 × 4 мм) с 8% полидиэтиленгликольсукцината на хромосорбе W (60—80 меш) при 144°. В качестве внутреннего стандарта использовали метилловый эфир пальмитиновой кислоты.

Периодатное окисление 5 мг ганглиозидов и восстановление  $NaNH_4$  осуществляли методом [16]. Жирные спирты выделяли экстракцией хлороформом, силилировали и анализировали с помощью ГЖХ на хроматографе фирмы Руре, модель 104 с пламенно-ионизационным детектором на колонке (1500 × 4 мм) с 5% SE-30 на хроматоне N-AW (75—90 меш) при 159°. В качестве внутреннего стандарта использовали цетиловый спирт.

Метилловые эфиры метилгликозидов сиаловых кислот, полученные в результате кислотного метанолиза окисленных  $NaIO_4$  и восстановленных  $NaNH_4$  ганглиозидов (0,75 н. HCl в метаноле при 80° в течение 10 ч), анализировали в виде ТМС-производных, как описано выше. В качестве внутреннего стандарта использовали миоинозит. Стандартную  $C_7$ -N-ацетилнейраминовою кислоту получали по методу [24] из N-ацетилнейраминовою кислоты.

Десульфатирование 35 мг ганглиозида Г-2 проводили по методу Кочеткова и сотр. [20]. Десульфатированный продукт выделяли с помощью ТСХ на пластинках (13 × 18 см) со слоем (0,5 мм) силикагеля КСК в системе хлороформ — метанол — вода (60 : 35 : 8). Десульфатированный Г-2 элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол — вода (50 : 50 : 15).

Метилирование 10—30 мг ганглиозидов проводили по методу Хакомори [31]. Метилированные ганглиозиды выделяли по видоизмененному методу Штоффеля и Ханфланда [21]. Реакционную смесь разбавляли водой в 2 раза, следя за тем, чтобы температура смеси не превышала 25—30°, нейтрализовали уксусной кислотой и диализовали через целлофановую мембрану против дистиллированной воды в течение 24 ч при 4° с пятикратной сменой воды. Содержимое диализного мешка упаривали и примесь диметилсульфоксида удаляли хроматографией на колонке (25 × 1,4 см) с силикагелем (Chemapol, СССР, 100—160 мкм). Диметилсульфоксид вымывали хлороформом, а метилированные ганглиозиды — смесью хлороформа с метанолом (98 : 2). При метилировании 1—3 мг ганглиозидов эту очистку проводили с помощью ТСХ на пластинках (13 × 18 см) с силикагелем КСК 150—200 меш в системе хлороформ — ацетон (4 : 1). Зоны об-



наруживали иодом и антроновым реагентом [4], метилированные ганглиозиды элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол (1 : 1).

Сполна метилированные ганглиозиды (7—15 мг) восстанавливали по методу Карлссона [32] и силилировали по методу Картера [30]. Масс-спектры этих производных ганглиозидов получали на масс-спектрометре СН-5 (Varian MAT) при температуре испарения 300° и ионизирующем напряжении 2 кВ.

Энзиматическое расщепление 2,5 мг ганглиозидов Г-1 и Г-2 и десульфатированного Г-2 нейраминидазой *V. cholerae* проводили, как описано в работе [19]. Освободившуюся сиаловую кислоту определяли тиобарбитуровым методом [33]. Продукты частичного десилирования анализировали ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4 и 60 : 35 : 8) и обнаруживали резорциновым реагентом.

Мягкий кислотный гидролиз ганглиозидов проводили по методу [2], реакционную смесь нейтрализовали 0,03 М раствором  $K_2CO_3$ , добавляли четырехкратный объем смеси хлороформа с метанолом (2 : 1). Водный слой отделяли и упаривали, остаток растворяли в небольшом объеме метанола и наносили на пластинку (6 × 18 см) с кизельгелем G (Merck). Пластинку проявляли трижды в системе хлороформ — метанол — вода (60 : 35 : 8). Зоны обнаруживали резорциновым реагентом. Вещества элюировали 10%-ным водным метанолом. Углеводный состав полученных продуктов определяли, как описано выше. Анализ цереброзидов проводили ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) и обнаруживали антроновым реагентом. В качестве стандарта использовали цереброзиды мозга быка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Buznikov G. A., Zvezdina N. D., Prokazova N. V., Manukhin B. N., Bergelson L. D. (1974) *Experientia*, 31, 902—904.
2. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 326, 74—83.
3. Svennerholm L. (1963) *Methods in Enzymology*, 6, 459—462.
4. Morris D. L. (1948) *Science*, 107, 254—255.
5. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. L. (1968) *J. Lipid Res.*, 9, 396.
6. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) *J. Lipid Res.*, 3, 136—138.
7. Svennerholm L. (1963) *J. Neurochem.*, 10, 613—623.
8. Свилей Ч. К., Тао Р. В. П. (1975) *Методы исследования углеводов* (под ред. Хорлина А. Я.), с. 13—17, «Мир», М.
9. Hotta K., Hamazaki H., Kuzokawa M. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5434—5440.
10. Granzer E. (1962) *Z. Physiol. Chem.*, 328, 277—279.
11. Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G., Schauer R., Strecker G., Montreuil J. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 56, 253—258.
12. Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G., Vink J. (1974) *Carbohydr. Res.*, 33, 297—306.
13. Eglinton G., Hanneman D. H. (1968) *Organic Mass Spectrometry*, 1, 593—611.
14. Yano I., Furukawa I., Kusunose U. (1971) *Eur. J. Biochem.*, 23, 220—228.
15. Lamieux R. U., Rudloff E. V. (1955) *Can. J. Chem.*, 33, 1701.
16. Ando S., Yu R. K. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 6247—6250.
17. Karlsson K. A. (1976) *Ganglioside Function. Biochemical and Pharmacological Implication* (Porcellati G., Coccarelli B., Tettamanti G., eds.), p. 15—25, New York.
18. Karlsson K. A., Pascher I., Pimolott W., Samuelsson B. E. (1974) *Biomedical Mass Spectrometry*, 1, 49—56.
19. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 210, 299—305.
20. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, 424, 274—283.
21. Stoffel W., Hanfland P. (1973) *J. Physiol. Chem.*, 354, 21—31.
22. Björndal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) *Carbohydr. Res.*, 5, 433—440.
23. Vaskovsky V. E., Isay S. V. (1969) *Analyt. Biochem.*, 30, 25—31.
24. Kuhn R., Gauhe A. (1965) *Chem. Berichte*, 98, 395—413.
25. Бузников Г. А., Подмарев В. К. (1975) *Объекты биологии развития* (Детлаф Т. А., ред.), с. 188—212, «Наука», М.
26. Дятловская Э. В., Новиков А. М., Бергельсон Л. Д. (1974) *Биохимия*, 39, 552—556.

27. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497—509.
28. Вейнберг А. Я., Манухин Б. Н., Решетникова Н. А., Чуприянова Н. Е., Самохвалов Г. И. (1972) *Вопр. мед. химии*, **18**, 477—482.
29. Penick R. J., Meisler M. H., McCluer R. H. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **116**, 279—287.
30. Carter H. E., Gaver R. C. (1967) *J. Lip. Res.*, **8**, 391—395.
31. Nakomori S. I. (1964) *J. Biochem.*, **55**, 205—208.
32. Karlsson K. A. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3643—3647.
33. Warren L. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971—1975.

Поступила в редакцию  
14.VIII.1978

**STRUCTURE OF GANGLIOSIDES FROM SEA URCHIN  
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* EGGS**

**PROKAZOVA N. V., KOSHAROV S. L., SADOVSKAYA V. L.,  
MOSHENSKI J. V., BERGELSON L. D., ZVEZDINA N. D.**

*M. M. Shchyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow; Kolzov Institute of Developmental  
Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Two gangliosides of unusual structure, namely with the sialic acid residue in the middle of oligosaccharide chain, were obtained from the sea urchin eggs. They were identified by mass-spectrometry of methylated intact gangliosides and by analysis of partial degradation products. The chemical structure of one of them was found to be N-glycolylneuraminosyl-( $\alpha 2 \rightarrow 6$ )-glucosyl-(1  $\rightarrow$  8)-N-glycolylneuraminosyl-(2  $\rightarrow$  6)-glucosyl-(1  $\rightarrow$  1)-ceramide, and another was its sulfate.