



УДК 547.95.02

СТРУКТУРА СИАЛОГЛИКОЛИПИДОВ ИЗ ТКАНИ ГОНАД
МОРСКОГО ЕЖА *ECHINARACHNIUS PARMA*

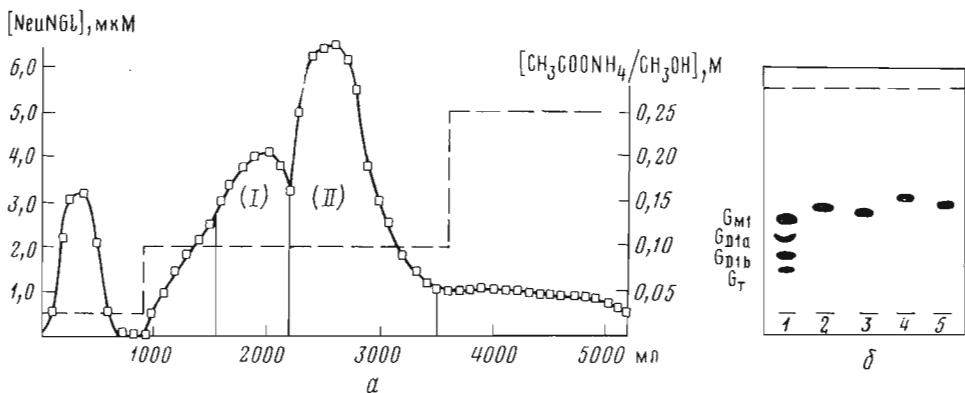
Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К.

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

Из липидного экстракта ткани гонад морского ежа *Echinarachnius parma* выделены два сialogликолипида. Показано, что они являются сфингогликолипидами. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, десульфатирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом для них предложены структуры: 8-сульфат N-ацетилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-D-глюкопиранозил ($\beta 1 \rightarrow 1$) церамид и 8-сульфат N-гликолилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 6$)-D-глюкопиранозил ($\beta 1 \rightarrow 1$) церамид. Сфингозиновое основание гликолипидов является смесью фитосфингозина и дигидросфингозина. Высшие жирные кислоты гликолипидов представлены незамещенными и монооксикислотами. Состав незамещенных кислот установлен с помощью ГЖХ.

Ранее мы сообщали о выделении и установлении структуры сульфатированного сialogликолипида из ткани гонад морского ежа *Echinocardium cordatum* [1]. Недавно Бергельсон и сопр. [2] также обнаружили сульфатированный ганглиозид в яйцеклетках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Оба гликолипида содержали глюкозу, гликозилированную по C₍₆₎ остатком 8-сульфата N-гликолилнейраминозой кислоты. В настоящем сообщении приводятся данные по изучению структуры двух сульфатированных сialogликолипидов из ткани гонад морского ежа *Echinarachnius parma*.

Сырой препарат полярных гликолипидов получали после диализа липидного экстракта гонад *E. parma*, как описано ранее [3]. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал три сialogликолипида, а также некоторое количество фосфолипидов и пигментов. Два главных сialogликолипида, (I) и (II), были выделены ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (рисунок а) [1]. Оба гликолипида элюировались 0,1 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в CH_3OH . Следовательно, они обладали одинаковыми кислотными свойствами, причем более сильными, чем моносialogанглиозиды. Для получения сialogликолипида (I) в индивидуальном состоянии требовалась дополнительная очистка в тонком слое силикагеля. Выделенные соединения содержали сialовые кислоты и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [4] и орциновым [5] реактивами) и не содержали фосфатной группы (отрицательная реакция с молибдатным реактивом [6]) и свободной аминогруппы (отсутствие окраски с нингидрином). В ИК-спектрах этих гликолипидов, как и в спектре сульфатированного сialogликолипида *E. cordatum* [1], имелись интенсивные полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550 см^{-1}), спиртовых гидроксильных (1040 и 1080 см^{-1}), ассоциированных гидроксильных (3300 и 3450 см^{-1}),



Хроматографический анализ сиакоглицолипидов морского ежа *E. parma*: а — элюция с DEAE-целлюлозы (CH₃COO⁻) липидного экстракта гонад; пики I и II соответствуют сиакоглицолипидам (I) и (II); б — ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 6:4:1, ганглиозидов мозга быка (1), выделенных сиакоглицолипидов (I) (2) и II (3), десульфатированных сиакоглицолипидов (I) (4) и II (5). NeuGl — N-гликозилнейраминавая кислота

понизированной карбоксильной группы (1405 см⁻¹), валентных колебаний C—H-связей алифатической цепи (2860 и 2930 см⁻¹), а также полоса поглощения 1235 см⁻¹, соответствующая колебаниям S→O-связи полного сульфата, и полоса 810 см⁻¹ —O—S-связи эфира серной кислоты [7]. Определение сульфата, основанное на реакции с Ba²⁺ [8], также подтверждало присутствие сульфатной группы в гликолипидах (I) и (II). На основании этих данных можно считать, что гликолипиды (I) и (II) являются сульфатированными сиакоглицолипидами.

Строение олигосахаридной цепи гликолипидов (I) и (II) было изучено методами полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом.

В продуктах полного кислотного гидролиза гликолипидов (I) и (II) обнаружена только глюкоза в качестве единственного нейтрального моносахарида. Она была выделена препаративной бумажной хроматографией, и ее принадлежность к D-ряду определена с помощью глюкозооксидазы [9]. Количественные измерения глюкозы с помощью ГЖХ в виде полного ацетата сорбита показали, что в каждом сиакоглицолипиде содержится по одному остатку глюкозы на 1 моль. Сиаловые кислоты, отщепляющиеся при мягком кислотном гидролизе сиакоглицолипидов (I) и (II), количественно определяли реакцией с резорциновым реактивом [4] без предварительного выделения на колонке с дауэксом 2×8 (CH₃COO⁻). Количество сульфата измеряли по методу [8] после полного кислотного гидролиза гликолипидов. Результаты определений показали, что 1 моль сиакоглицолипидов (I) и (II) содержит по одному остатку глюкозы, сиаловой кислоты и сульфата.

Характер замещения глюкозы определяли с помощью метилирования. После кислотного метанолиза метилированных гликолипидов методом ГЖХ обнаружены α- и β-метил-2,3,4-три-О-метилгликопиранозиды. Следовательно, остаток глюкозы в каждом гликолипиде замещен по C₍₆₎, что наблюдалось для сиакоглицолипидов морских ежей, изученных ранее [1–3, 10–12].

Сиаловые кислоты гликолипидов (I) и (II) имели такой же спектр поглощения продуктов конденсации с резорциновым реактивом, как и обычные сиаловые кислоты (λ_{макс} 585 нм), но не отщеплялись при действии на гликолипиды нейраминидазы из *Vibrio cholerae*. Сиаловые кислоты, полученные в результате частичного кислотного гидролиза гликоли-

пидов (I) и (II), не элюировались со смолы дауэкс 2×8 (CH₃COO⁻) 1 М ацетатным буфером, рН 4,6, в условиях, применяемых обычно для выделения сиаловых кислот [13]. Следовательно, они обладали более сильными кислотными свойствами, чем N-ацетил- и N-гликолилнейраминовые кислоты. Такое же поведение отмечалось ранее для сульфатированной сиаловой кислоты, обнаруженной в сиалогликолипиде *E. cordatum* [1]. На основании этих данных мы предположили, что в гликолипидах (I) и (II) сульфатная группа связана с остатком сиаловой кислоты.

Для подтверждения этого предположения было использовано сольво-литическое десульфатирование [14]. Как показал анализ с помощью ТСХ, десульфатирование прошло полностью, и образовались новые сиалогликолипиды, менее полярные, чем исходные (рисунок б). В ИК-спектрах полученных соединений отсутствовали полосы поглощения 1235 и 810 см⁻¹, характерные для сульфатной группы. При хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе (CH₃COO⁻) эти гликолипиды элюировались 0,025 М раствором CH₃COONH₄ в СН₃ОН, как моносиалоганглиозиды, не содержащие сульфатной группы [1]. Сиаловые кислоты, полученные мягким кислотным гидролизом десульфатированных гликолипидов, элюировались со смолы дауэкс 2×8 (CH₃COO⁻) в обычных условиях [13]. По данным ТСХ, сиаловая кислота десульфатированного гликолипида (I) являлась N-ацетилнейраминовой кислотой, а гликолипида (II) — N-гликолилнейраминовой кислотой. При действии нейраминидазы из *Vibrio cholerae* на десульфатированные гликолипиды сиаловые кислоты отщеплялись количественно. Полученные данные окончательно подтверждают, что в состав сиалогликолипидов (I) и (II) входят сульфатированные сиаловые кислоты, кетозидные связи которых имеют α-конфигурацию.

Положение сульфатной группы в молекуле сиаловой кислоты определяли из данных периодатного окисления сиалогликолипидов (I) и (II). Сиаловые кислоты, полученные после частичного кислотного гидролиза гликолипидов, окисленных периодатом и обработанных КВН₄, имели такой же спектр поглощения хромофоров с резорциновым реактивом, как и С₆-сиаловые кислоты исходных гликолипидов (λ_{max} 585 нм). При окислении гликолипидов не наблюдалось выделения формальдегида. Следовательно, периодатное окисление не затрагивает остатки сиаловых кислот, т. е. сиаловые кислоты сульфатированы по С₆(8). О присутствии 8-сульфата N-гликолилнейраминовой кислоты в гликолипидах морских ежей *E. cordatum* и *S. intermedius* сообщалось ранее [1, 2]; 8-сульфат N-ацетилнейраминовая кислота обнаружена впервые.

Для определения конфигурации гликозидной связи глюкозы глюкозил-церамиды, полученные частичным кислотным гидролизом гликолипидов (I) и (II), ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом [15]. В обоих случаях наблюдалось полное разрушение глюкозы. Следовательно, она связана с керамидом β-гликозидной связью.

Таким образом, гликолипид (I) имеет строение 8-сульфат N-ацетилнейраминозил (α2→6)-D-глюкопиранозил (β1→1)церамида, а гликолипид (II) — 8-сульфат N-гликолилнейраминозил (α2→6)-D-глюкопиранозил (β1→1)церамида.

Строение липидной части гликолипидов (I) и (II) устанавливали методами кислотного метанолиза и периодатного окисления.

В продуктах метанолиза обоих гликолипидов были обнаружены метиловые эфиры высших жирных незамещенных и монооксикислот, причем оксикислоты составили ~10% смеси кислот. В сульфатированных сиалогликолипидах морских ежей *E. cordatum* и *S. intermedius* оксикислоты присутствовали также в небольших количествах [1, 2]. Метиловые эфиры незамещенных кислот были выделены препаративной ТСХ на силикагеле, и их состав установлен с помощью ГЖХ (табл. 1). Как видно из таблицы, в обоих гликолипидах обнаружены только насыщенные кислоты. Для сульфатированных гликолипидов *E. cordatum* [1] и *S. interme-*

Таблица 1

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

Кислоты	(I)	(II)	Кислоты	(I)	(II)
C _{14:0}	1,3	—	C _{18:0}	25,3	33,9
C _{15:0}	15,4	—	C _{20:0}	12,7	21,1
C _{16:0}	25,3	17,0	C _{22:0}	10,4	21,1
C _{17:0}	1,3	1,3	C _{24:0}	8,3	5,6

dius [2] отмечалось присутствие небольших количеств ненасыщенных высших жирных кислот, а в несурфатированных гликолипидах *A. crassispina* [10] и *S. intermedius* [3] обнаружены значительные количества непредельных кислот (85 и 41% соответственно).

Сфингозиновые основания сиалогликолипидов (I) и (II), по данным ТСХ, являлись смесью фитосфингозина и дигидросфингозина, причем последний составлял не более 10% смеси. Для установления состава фитосфингозинов сиалогликолипида (II), который был выделен в большем количестве, провели периодатное окисление этого гликолипида. Получившиеся при окислении высшие жирные альдегиды восстановили КВН₄ до спиртов, состав которых анализировали с помощью ГЖХ (табл. 2). Как видно из таблицы, основным компонентом смеси сфингозиновых оснований является C₁₈-фитосфингозин. Среди продуктов метанолиза сиалогликолипида (II), предварительно окисленного периодатом и восстановленного затем КВН₄, методом ТСХ обнаружили дигидросфингозин. Из-за недостатка материала состав дигидросфингозинов не устанавливали. Интересно, что в сульфатированных гликолипидах *E. cordatum* и *S. intermedius* единственным сфингозиновым основанием является фитосфингозин (главный компонент — C₁₈-фитосфингозин) [1, 2]. C₁₈-Фитосфингозин обнаружен также в сиалогликолипидах *S. nudus* [12], в то время как в гликолипидах морского ежа *A. crassispina* присутствует главным образом C₁₈-сфингозин с небольшой примесью C₁₈-дигидросфингозина [10].

На основании полученных данных для сиалогликолипидов (I) и (II) предложены структуры:

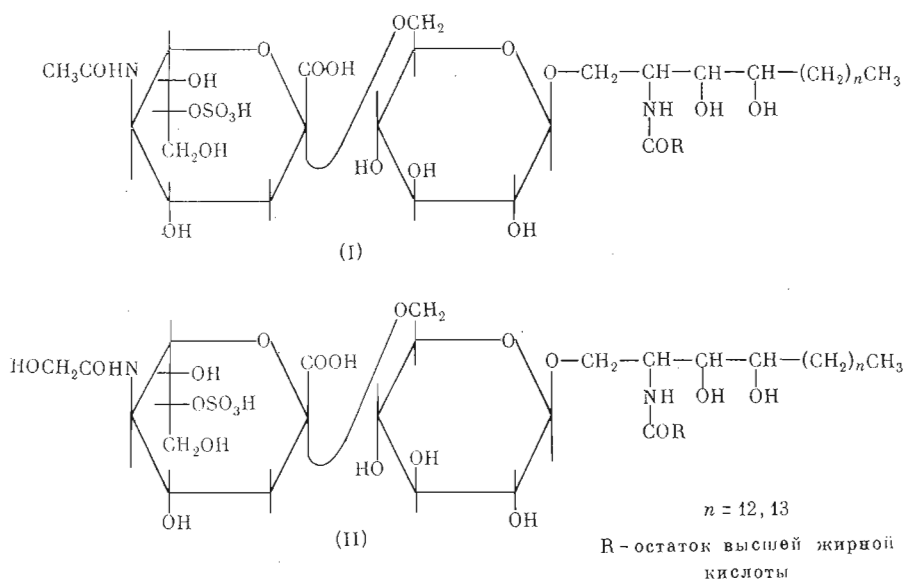


Таблица 2

Состав алифатических спиртов и соответствующих фитосфингозинов (% от суммы) сиалогликолипида (II) из ткани гонад морского ежа *E. parma*

Спирты	Фитосфингозины	%
C _{14:0}	C ₁₇	6,7
C _{15:0}	C ₁₈	93,3

Экспериментальная часть

Морские ежи *E. parma* собраны в сублиторальной зоне залива Посыет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт гонад и сырой препарат сиалогликолипидов получены по ранее описанной методике [3]. N-Ацетилнейраминовая кислота — препарат фирмы Koch-Light, нейраминидаза *Vibrio cholerae* (500 ед/мл) — препарат фирмы Calbiochem. Органические растворители перегоняли перед использованием.

Колоночная хроматография сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻). Колонку (30×380 мм) промывали последовательно 1200 мл смеси CHCl₃-CH₃OH (2:1), 600 мл CH₃OH, 950 мл 0,025 М CH₃COONH₄ в CH₃OH, 2650 мл 0,1 М CH₃COONH₄ в CH₃OH и 1450 мл 0,25 М CH₃COONH₄ в CH₃OH; объем фракций 50 мл. По 2 мл каждой фракции упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [4]. Фракции, содержащие сиалогликолипиды, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Из 1,5 г сырого препарата сиалогликолипидов *E. parma* получили 24 мг гликолипида (I) (после дополнительной очистки с помощью ТСХ) и 100 мг гликолипида (II), содержащих 20% сиаловых кислот.

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr.

ТСХ проводили на силикагеле марки КСК (150 меш), содержащем 5% гипса, с использованием тех же систем растворителей, как описано ранее [3].

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 фазой 3% ECNSS-M на диатомите С при 180° С, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155° С, алифатические спирты и метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот — на колонке с 3% SE-30 на диатомите С при 150–220 и 170–280° С соответственно со скоростью повышения температуры 2° С/мин.

Сфингозиновое основание количественно определяли по методу Лаутера и Тремса [16]; калибровочную кривую строили по френозину, выделенному по методу Картера [17] из мозга крупного рогатого скота.

Сульфатные группы количественно определяли по методу Доджсона [8].

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

Частичный кислотный гидролиз сиалогликолипидов (1–5 мг) проводили 0,1 н. H₂SO₄ (5 мл) при 80° С в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды (500 мл) при 20° С. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ в системе CHCl₃-CH₃OH-H₂O, 64:24:4. Внешний водный слой упаривали до 5–10 мл и сиаловые кислоты определяли количественно реакцией с резорциновым реактивом [4].

Кислотный метаноллиз сиалогликолипидов (2 мг) проводили 1 н. HCl в 82% водном CH₃OH [18] (1,5 мл) при 80°С в течение 18 ч. Из кислого метанолизата извлекали гексаном (2 мл) метиловые эфиры высших кислот, которые анализировали с помощью ТСХ в дихлорэтаноле. Метанольный слой подщелачивали 4 н. КОН в 90% водном CH₃OH, извлекали диэтиловым эфиром (10 мл) сфингозиновые основания, которые анализировали с помощью ТСХ в системе растворителей CHCl₃—CH₃OH—2 н. NH₄OH, 40 : 10 : 1.

Метилирование сиалогликолипидов (4 мг) проводили по методу Хакори [19]. Метилированное производное экстрагировали CHCl₃ (10 мл), диализовали против воды и очищали с помощью ТСХ в системе CHCl₃—CH₃OH, 30 : 1,5. Метилированный гликолипид элюировали с силикагеля смесью CHCl₃—CH₃OH, 4 : 1, подвергали кислотному метаноллизу 3 н. HCl в CH₃OH (1,5 мл) при 80°С в течение 18 ч и частично метилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ.

Окисление хромовым ангидридом нейтральных гликолипидов, полученных частичным кислотным гидролизом сиалогликолипидов, проводили по методу [15]. Моносахариды, образующиеся при гидролизе окисленного гликолипида, анализировали с помощью ГЖХ в виде ацетатов гекситов. В качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Периодатное окисление сиалогликолипидов (5 мг) проводили 0,02 н. NaIO₄ (5 мл) при 20°С в течение 18 ч в темноте. Избыток периодата разрушали добавлением 2—3 капель 10%-ного этиленгликоля. Через 30 мин к реакционной смеси добавляли КВН₄ до pH 8,0 и через 2 ч нейтрализовали 2 н. CH₃COOH. Высшие жирные спирты экстрагировали гексаном (2×2 мл), очищали с помощью ТСХ в системе CHCl₃—CH₃OH, 99 : 1, и анализировали ГЖХ. Водный раствор после экстракции диализовали против воды, недиализуемый продукт лиофилизовали и гидролизовали 0,1 н. H₂SO₄ (3 мл) при 80°С в течение 1,5 ч. Гидролизат диализовали против дистиллированной воды (500 мл), внешний водный слой упаривали до небольшого объема и спаловые кислоты охарактеризовывали спектром поглощения их продукта конденсации с резорциновым реактивом. Недиализуемый продукт подвергали кислотному метаноллизу 1 н. HCl в 82%-ном CH₃OH и выделенное сфингозиновое основание анализировали с помощью ТСХ.

Формальдегид количественно определяли по методу Васьковского и Исая [20], калибровочную кривую строили по манниту.

Десульфатирование сиалогликолипидов (5 мг) проводили в 5 мл абс. диоксиана в присутствии 1—2 кристаллов C₅H₅N·HCl при кипячении в течение 10 мин [14]. К охлажденной реакционной смеси добавляли Na₂CO₃ и диализовали против дистиллированной воды. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻) и с помощью ТСХ в системе CHCl₃—CH₃OH—H₂O, 6 : 4 : 1.

Ферментативный гидролиз сиалогликолипидов (2 мг) и десульфатированных сиалогликолипидов (1 мг) проводили обработкой нейраминидазой из *Vibrio cholerae* в ацетатном буфере, pH 5,5 [21]. Спаловую кислоту, устойчивую к действию нейраминидазы, количественно определяли с резорциновым реактивом после обработки аликвоты реакционной смеси КВН₄ [22]. Состав реакционной смеси после ферментативного гидролиза десульфатированных гликолипидов анализировали с помощью ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 н. NaH₂PO₄, в системе растворителей *n*-C₃H₇OH—H₂O—2 н. NH₄OH, 30 : 10 : 5.

Абсолютную конфигурацию глюкозы, полученной полным кислотным гидролизом гликолипидов (I) и (II), после выделения препаративной бумажной хроматографией в системе *n*-C₄H₉OH—C₃H₅N—H₂O, 6 : 4 : 3, определяли по методу [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **424**, 274–283.
2. Проказова Н. В., Кочаров С. Л., Садовская В. Л., Мошенский Ю. В., Бергельсон Л. Д., Звездица Н. Д. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 458–467.
3. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **326**, 74–83.
4. Svennerholm L. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 604–611.
5. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Compar. Biochem. and Physiol.*, **34**, 163–177.
6. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I. (1968) *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
7. Haines T. H. (1971) *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* (Holman R. T., ed.), vol. 11, Part 3, pp. 299–345, Pergamon Oxford.
8. Dodgson K. S., Price R. G. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 106–110.
9. Huggett A. S. G., Nixon D. A. (1957) *Biochem. J.*, **66**, 12p.
10. Hoshi M., Nagai Y. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **388**, 152–162.
11. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 937–942.
12. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глухоед И. С. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1093–1099.
13. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. (1959) *Acta chem. scand.*, **13**, 856–858.
14. Кочетков Н. К., Усов А. И., Адамьянц К. С. (1972) *Ж. общ. химии*, **42**, 1617–1622.
15. Laine R. A., Renkonen O. (1975) *J. Lipid Res.*, **16**, 102–106.
16. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) *J. Lipid Res.*, **3**, 136–138.
17. Carter H. E., Haines W. J., Ledyard W. E., Norris W. P. (1947) *J. Biol. Chem.*, **169**, 77–82.
18. Gaver R. C., Sweeley C. C. (1965) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294–298.
19. Nakomory S. I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205–208.
20. Vaskovsky V. E., Isay S. V. (1969) *Anal. Biochem.*, **30**, 25–31.
21. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **210**, 299–305.
22. Schneir M. L., Rafelson M. E. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **130**, 1–11.

Поступила в редакцию
20.III.1980

THE STRUCTURE OF SIALOGLYCOLIPIDS FROM THE GONAD TISSUE OF SEA URCHIN *ECHINARACHNIUS PARMA*

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

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

The structures of two sialoglycolipids from gonads of the sea urchin *Echinarachnius parma* have been established. On the basis of total and partial acid hydrolysis, methanolysis, methylation, desulfation, enzymatic hydrolysis with neuraminidase, periodate and chromium trioxide oxidation, these compounds were identified as 8-sulfate N-acetylneuraminozyl($\alpha 2 \rightarrow 6$)-D-glucopyranosyl($\beta 1 \rightarrow 1$)ceramide and 8-sulfate N-glycolylneuraminozyl($\alpha 2 \rightarrow 6$)-D-glucopyranosyl($\beta 1 \rightarrow 1$)ceramide. The long-chain bases of these sialoglycolipids were found to constitute a mixture of phytosphingosine and dihydro-sphingosine, and their fatty acids were a mixture of normal and monohydroxy acids.