



УДК 547.963.1.02:577.11

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ  
УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ ГРУППОВЫХ ВЕЩЕСТВ КРОВИ  
ИЗ СЛИЗИСТОЙ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА И СВИНЬИ***Арбатский Н. П., Лихшерстсв Л. М., Деревицкая В. А.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Проведено отщепление углеводных цепей в пяти образцах группового вещества крови (ГВК) H, выделенных из индивидуальных слизистых желудка человека и свиньи. С помощью гель-хроматографии и анионообменной хроматографии установлено, что гетерогенность углеводных цепей ГВК как по размеру, так и по структуре является свойством, присущим каждому организму. При относительном постоянстве общей картины распределения углеводных цепей в различных образцах ГВК человека и свиньи имеются индивидуальные для каждого организма особенности в соотношении различных углеводных цепей. На примере двух олигосахаридов (три- и гексасахарид) показано, что в ГВК человека и свиньи имеются углеводные цепи с идентичной структурой.

Групповые вещества крови (ГВК), высокомолекулярные гликопротеины, играют важную роль в жизнедеятельности организма человека и животных, причем углеводные фрагменты этих гликопротеинов ответственны за их биологическую специфичность. Данные, полученные различными авторами на ГВК из жидкости кисты человека [1, 2], слизистой желудка человека [3], свиньи [4–6], лошади [7], показывают, что углеводные цепи ГВК весьма разнообразны по размеру и структуре. Причина такой гетерогенности углеводных цепей, ее значение и влияние на биологическую специфичность ГВК остаются неясными. Решению этих вопросов может помочь изучение гетерогенности углеводных цепей в ГВК из индивидуальных организмов одного вида и выяснение общности этого явления для ГВК организмов различных видов.

В настоящей работе приведены данные по сравнительному изучению гетерогенности углеводных цепей ГВК с групповой специфичностью H (O), выделенных из индивидуальных слизистых желудков человека (2 образца — ГВК<sub>ч</sub>-1, ГВК<sub>ч</sub>-2) и свиньи (3 образца — ГВК<sub>с</sub>-1, ГВК<sub>с</sub>-2, ГВК<sub>с</sub>-3).

Углеводные цепи отщеплялись от пептидного скелета ГВК путем их восстановительного элиминирования при действии щелочного раствора NaBH<sub>4</sub> [8]. В результате такой обработки и последующего отделения пептидной части ГВК на катионите образуется смесь восстановленных олигосахаридов, анализ которой может дать представление о характере и степени гетерогенности углеводных цепей ГВК. С помощью этого метода во всех случаях удалось отщепить около 80% углеводов как от ГВК<sub>ч</sub>, так и от ГВК<sub>с</sub> (таблица). Гель-хроматография на биогеле P-6 полученных суммарных углеводных фракций показала, что все они представляют собой сложные смеси. Каждая из этих смесей была разделена на пять фракций (рис. 1). На основании объемов выхода маркеров, в качестве которых использовались выделенные из ГВК<sub>с</sub> и охарактеризованные ранее восстановленные трисахарид ОС-2 [4], гексасахарид ОС-10.4 [5] и ундекасахарид ОС-17.3 [6], можно заключить, что фракция V содержит восстановленные ди-, три- и тетрасахариды, IV — пента- — гептасахариды, III — окта- — ундекасахариды, II — додека- — пентадекасахариды, I — олигосахариды, больше, чем гептадекасахариды.

В статье применены сокращенные обозначения моносахаридов и олигосахаридных цепей, рекомендованные комиссией по номенклатуре ИЮПАК — ИЮБ. GalN-ol — 2-амино-2-дезоксидульцит, GalNAc-ol — 2-ацетамидо-2-дезоксидульцит.

## Выход олигосахаридов после гель-хроматографии

Образец		Выход олигосахаридов, мг						
Шифр	Вес, мг	общий		фракции				
		мг	%	I	II	III	IV	V
ГВК <sub>ч</sub> -1	52	34	81	9,0	3,7	7,8	7,4	3,1
ГВК <sub>с</sub> -2	63	37	75	2,1	8,7	11,6	9,1	3,5
ГВК <sub>с</sub> -1	870	590	85	28,0	90,0	134,0	208,0	102,0
ГВК <sub>с</sub> -2	1100	672	78	70,0	51,0	96,0	351,0	71,0
ГВК <sub>с</sub> -3	105	61	73	6,2	7,3	10,1	19,6	12,9

\* За 100% принято количество углеводов в ГВК.

Как отмечалось рядом авторов [2, 7—9], отщепление углеводных цепей применявшимся в данной работе методом не сопровождается сколько-нибудь значительным их разрушением и, таким образом, можно считать, что полученные олигосахариды соответствуют углеводным цепям ГВК. Поэтому на основании выхода фракций I—V (таблица) и средней степени полимеризации входящих в нее олигосахаридов (20, 14, 10, 6 и 3 соответственно) было рассчитано относительное содержание углеводных цепей различного размера в каждом образце ГВК. Графически результаты такого расчета представлены на рис. 2. Как видно, имеется значительное сходство в распределении углеводных цепей по молекулярной массе во всех образцах ГВК<sub>ч</sub> и ГВК<sub>с</sub>: более 80% углеводных цепей в ГВК<sub>ч</sub> и в ГВК<sub>с</sub> содержит от 2 до 11 моносахаридных остатков. Вместе с тем наблюдаются заметные колебания в соотношении углеводных цепей различного размера в ГВК<sub>с</sub> и, в меньшей степени, в ГВК<sub>ч</sub>. Например, углеводные цепи с числом моносахаридных остатков 5—7 составляют в ГВК<sub>с</sub>-2 почти 60%, тогда как в ГВК<sub>с</sub>-1 и ГВК<sub>с</sub>-3 — лишь немногим более 30%; коротких углеводных цепей с числом моносахаридных остатков меньше пяти в ГВК<sub>с</sub>-3 45%, а в ГВК<sub>с</sub>-2 только 23%. В образцах ГВК<sub>ч</sub> заметное различие наблюдается в содержании углеводных цепей с числом остатков больше 11. Следует отметить также, что в ГВК<sub>ч</sub> по сравнению с ГВК<sub>с</sub> несколько больше углеводных цепей с числом моносахаридов более 7. Полученные результаты в целом подтверждают и значительно дополняют имеющиеся данные о гетерогенности и соотношении различных углеводных цепей в ГВК<sub>ч</sub> [3] и ГВК<sub>с</sub> [9, 10].

Дальнейшая характеристика фракций III—V (рис. 1) каждого образца ГВК была получена после анионообменной хроматографии, которая, как было показано [5, 6, 11], является эффективным методом разделения сложных смесей олигосахаридов. Каждая из этих фракций представляет собой очень сложную смесь (рис. 3). Фракции IV из ГВК<sub>ч</sub>-1 и ГВК<sub>ч</sub>-2, например, содержат более чем 10 олигосахаридов, и, поскольку они состоят в основном из пента-, гекса- и гептасахаридов, можно утверждать, что составляющие ее олигосахариды различаются не только по количеству моносахаридных остатков, но и по структуре. Следовательно, как в ГВК<sub>с</sub> [5, 6], так и в ГВК<sub>ч</sub> некоторые углеводные цепи представлены в виде двух, а возможно, и большего числа структурных изомеров. Таким образом, гетерогенность углеводных цепей как по размеру, так и по структуре характерна для каждого индивидуального организма и проявляется у организмов различных видов.

Кроме того, аналогичные фракции, полученные из трех образцов ГВК<sub>с</sub>, содержат одинаковый набор олигосахаридов, причем относительное содержание каждого олигосахаридов изменяется очень незначительно (рис. 3). По времени выхода большинство олигосахаридов ГВК<sub>с</sub> идентичны олигосахаридам, полученным из суммы нескольких десятков слизистых желудка свищей и описанным ранее [4—6]. Такая же картина наблюдается и для олигосахаридов из ГВК<sub>ч</sub>: аналогичные фракции из двух образцов ГВК<sub>ч</sub> содержат практически один и тот же набор олигосахаридов, а некоторые из них совпадают по времени выхода с олигосахаридами из ГВК<sub>с</sub>. Идеп-

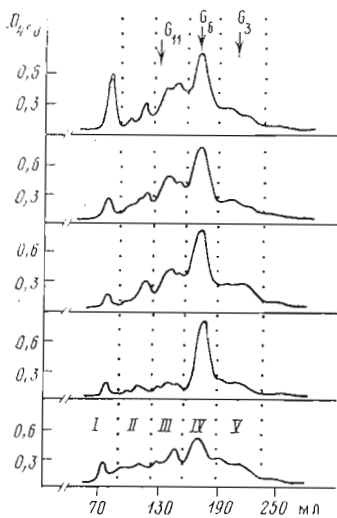


Рис. 1

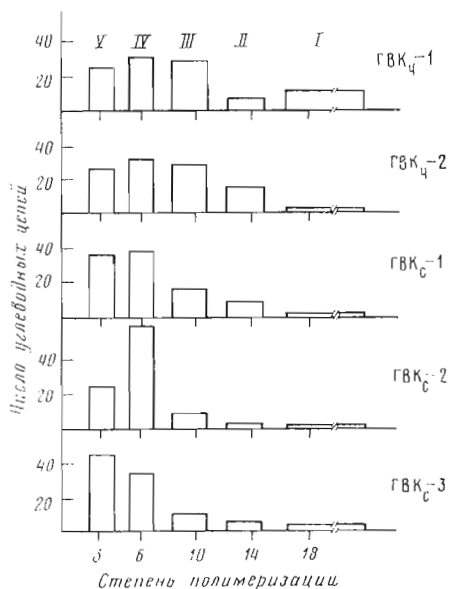


Рис. 2

Рис. 1. Гель-хроматография на биогеле Р-6 (колонка 2×90 см) суммарных углеводных фракций, полученных при деградации ГВК человека и свиньи. Контроль реакции с фенолом и  $H_2SO_4$ .  $G_{11}$ ,  $G_6$  и  $G_3$  — объемы выхода ундека-, гекса- и трисахаридов. Пунктиром показано деление элюата на фракции

Рис. 2. Число углеводных цепей различного размера в ГВК<sub>4</sub> и ГВК<sub>6</sub>. Общее количество углеводных цепей принято за 100

тичность строения таких олигосахаридов доказана нами на двух примерах. Во фракциях V всех пяти образцов ГВК имеется олигосахарид со временем выхода 150 мин (рис. 3в). Выделенный нами ранее из ГВК<sub>6</sub> олигосахарид (ОС-2) с таким же временем выхода имеет структуру  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc-ol$  [4]. Фракция V из ГВК<sub>4</sub>-2, содержащая практически только один олигосахарид со временем выхода 150 мин, и заведомый образец ОС-2 были подвергнуты кислотному гидролизу (1 н.  $CF_3COOH$ , 100°С, 4 ч) и с помощью анионообменной хроматографии в обоих случаях были идентифицированы фукоза и характерные фрагменты  $Gal\beta 1 \rightarrow 3GalNAc-ol$  и  $Gal\beta 1 \rightarrow 3GalN-ol$ , образующиеся за счет отщепления остатка фукозы и частичного N-деацетилирования. Этот результат однозначно доказывает идентичность структуры этих олигосахаридов из ГВК<sub>4</sub> и ГВК<sub>6</sub>.

Во фракциях IV олигосахаридов из ГВК<sub>4</sub> и ГВК<sub>6</sub> имеется олигосахарид со временем выхода 240 мин (рис. 3б). Показано, что олигосахарид (ОС-10.4) с таким временем выхода, ранее выделенный из ГВК<sub>6</sub>, имеет структуру  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 3(Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4GlcNAc\beta 1 \rightarrow 6)GalNAc-ol$  [5]. Выделенный нами из фракции IV (ГВК<sub>4</sub>-2) олигосахарид со временем выхода 240 мин содержал фукозу, галактозу, глюкозамин и аминодуглицит в соотношении 2 : 2 : 1 : 1, что соответствует моносакхаридному составу олигосахаридов ОС-10.4. После мягкого кислотного гидролиза исследуемого олигосахаридов и заведомого образца ОС-10.4, при котором расщепляются только фукозидные связи, с помощью анионообменной хроматографии в обоих случаях были идентифицированы фукоза и тетрасахарид (ОС-А) с доказанной ранее [5] структурой  $Gal\beta 1 \rightarrow 3(Gal\beta 1 \rightarrow 4GlcNAc\beta 1 \rightarrow 6)GalNAc-ol$ . Последующее периодатное окисление выделенных препаратов образцов ОС-А дало одинаковые результаты: в обоих олигосахаридов остаток глюкозамина сохранялся, оба остатка галактозы разрушались, а остаток аминодуглицита окислялся до 3-ацетамидотетрозы, идентифицированной в виде 2-аминобутантриола. На основании приведенных данных можно утверждать, что в ГВК<sub>4</sub> и ГВК<sub>6</sub> имеются углеводные цепи с идентичной структурой.

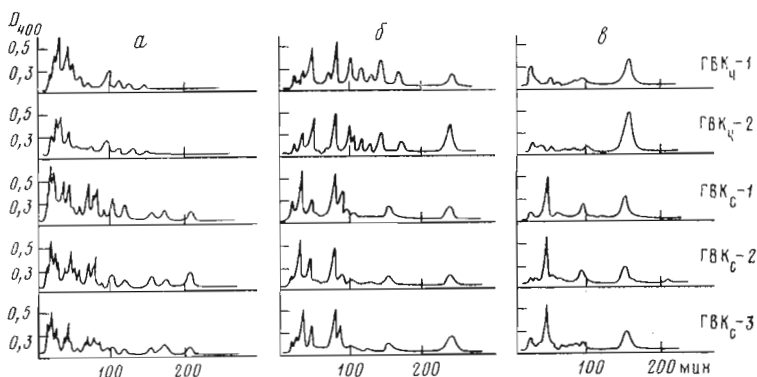


Рис. 3. Анионообменная хроматография олигосахаридных фракций III (а), IV (б) и V (в), полученных после геля-хроматографии на биогеле Р-6 (рис. 1)

Полученные результаты, а также имеющиеся в литературе данные позволяют сделать некоторые общие заключения об особенностях строения углеводных цепей группоспецифических гликопротеинов. Гетерогенность углеводных цепей ГВК как по молекулярной массе, так и по структуре является характерной особенностью этих гликопротеинов. Соотношение различных углеводных цепей в ГВК индивидуальных организмов одного вида, равно как и организмов различных видов, может значительно колебаться, однако во всех случаях преобладают углеводные цепи, содержащие от 2 до 11 моносахаридных остатков. Сходство в структуре некоторых углеводных цепей в ГВК, полученных из различных тканей человека и животных, позволяет заключить, что эти гликопротеины синтезируются в организмах различных видов по общей биохимической схеме.

### Экспериментальная часть

Образцы ГВК получены из слизистых индивидуальных желудков людей (2 образца) и свиней (3 образца) с групповой специфичностью Н (О) по методу [12]. Углеводные цепи отщепляли путем обработки ГВК 1 М раствором  $\text{NaBH}_4$  в 0,05 н.  $\text{NaOH}$  в течение 16 ч при  $50^\circ\text{C}$  [8]. Суммарную углеводную фракцию выделяли с помощью дауэкса 50 ( $\text{H}^+$ ), как описано ранее [9]. Гель-хроматографию суммы олигосахаридов проводили на колонке ( $2 \times 90$  см) с биогелем Р-6 в 0,1 н.  $\text{AcOH}$ . Разделение смесей олигосахаридов в полученных фракциях и препаративное выделение индивидуальных олигосахаридов осуществляли на жидкостном хроматографе (тип 71 100 А, ЧССР) на колонке ( $0,6 \times 30$  см) с аннионом  $\text{DA} \times 4$  (Dugum, США) при  $55^\circ\text{C}$  в 0,5 М боратном буфере, pH 8,5 [5, 6, 10]. Моносахаридный состав олигосахаридов определяли после гидролиза 4 н.  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (16 ч при  $100^\circ\text{C}$ ) с помощью жидкостного хроматографа (для Fuc, Gal) и анализатора аминокислот «Biotronik» (модель LC-4010, ФРГ) на колонке ( $0,6 \times 30$  см) с хромексом УА-8 в 0,35 М  $\text{Na}$ -цитратном буфере, pH 5,3 (для GlcN, GalN-ol, 2-аминобутантриола). Периодатное окисление олигосахаридов с последующим восстановлением  $\text{NaBH}_4$  проводили как описано ранее [4, 5].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Rovis L., Anderson B., Kabat E. A., Gruezo F., Liao J. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 26, p. 5340–5354.
2. Maisonneuve-McAnliffe F., Kabat E. A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1976, v. 175, № 1, p. 90–113.
3. Oates M. D., Rosbottom A. C., Schrager J. *Carbohydr. Res.*, 1974, v. 34, № 1, p. 115–137.
4. Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1975, № 6, с. 1411–1415.
5. Kochetkov N. K., Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P. *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 67, № 1, p. 129–136.

6. *Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 86, № 2, p. 423-437.
7. *Newman W., Kabat E. A.* Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 172, № 2, p. 535-550.
8. *Iyer R. N., Carlson D. M.* Arch. Biochem. and Biophys., 1971, v. 142, № 1, p. 101-105.
9. *Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 5, с. 1163-1167.
10. *Derevitskaya V. A.* Pure and Appl. Chem., 1981, v. 53, № 1, p. 89-106.
11. *Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К.* Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5, с. 1137-1139.
12. *Лихошерстов Л. М., Деревицкая В. А., Федорова В. И.* Биохимия, 1969, т. 34, № 1, с. 45-50.

Поступила в редакцию  
13.XI.1981

## A COMPARATIVE STUDY OF CARBOHYDRATE CHAIN HETEROGENEITY IN BLOOD GROUP SUBSTANCES FROM HUMAN AND PIG STOMACH LININGS

ARBATSKY N. P., LIKHOSHERSTOV L. M., DEREVITSKAYA V. A

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

The distribution of carbohydrate chains of blood group substances (BGS), isolated from human (two samples) and pig (three samples) individual stomach linings, according to their size and structure was investigated. BGS samples were subjected to alkaline-borohydride degradation and reduced oligosaccharides thus obtained were fractionated by means of gel- and anion-exchange chromatography. It was shown that heterogeneity of carbohydrate chains is a characteristic feature of BGS produced by every individual organism. The general pattern of carbohydrate chain distribution in BGS from human and pig linings is similar, but the relative amount of different chains changes from sample to sample. The identity of several carbohydrate chains of human and pig BGS was ascertained.