



УДК 593.93.088.5:547.995.1.02

ГАНГЛИОЗИД С СИАЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ВНУТРИ
УГЛЕВОДНОЙ ЦЕПИ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ
LUIDIA QUINARIA BISPINOSA

Смирнова Г. П., Кочетков Н. К.

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

Из морской звезды *Luidia quinaria bispinosa* выделены два ганглиозида, главный и минорный, и установлена структура олигосахаридной цепи главного компонента. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, окисления хромовым ангидридом и метанолиза для ганглиозида предложена структура галактопиранозил- β -(1 \rightarrow 4)-8-О-метил-N-ацетилгептаминозил-(2 \rightarrow 3)-галактопиранозил- β -(1 \rightarrow 4)-глюкопиранозил- β -(1 \rightarrow 1)-церамида. Сфингозиновым основанием ганглиозида является фитосфингозин, высшие жирные кислоты представлены главным образом монооксикислотами.

Ранее было показано, что ганглиозиды морских звезд, относящихся к разным отрядам, существенно различаются по структуре углеводных цепей. Так, в состав ганглиозидов морской звезды *Paliria (Asterina) pectinifera* из отряда Игольчатых наряду с глюкозой и галактозой входит арабиноза, занимающая концевое положение в олигосахаридной цепи, а сиаловая кислота расположена внутри цепи и гликозилирована остатком галактозы по положению 4 [1-4]. В ганглиозидах морских звезд *Distolasterias nipon* [5], *Evasterias retifera* [6, 7] и *Asterias amurensis* [7, 8] отряда Педигельяриевых, как и в ганглиозидах позвоночных, сиаловые кислоты расположены на конце цепи или гликозилированы другим остатком сиаловой кислоты и в состав цепи кроме глюкозы и галактозы может входить галактозамин. Ганглиозиды морских звезд третьего из существующих отрядов — Явнопластинчатых звезд — до сих пор изучены не были.

В настоящей работе из морской звезды *Luidia quinaria bispinosa* отряда Явнопластинчатых выделены два ганглиозида и установлена структура олигосахаридной цепи главного компонента.

Сырой препарат полярных гликолипидов получали из общего липидного экстракта целых морских звезд после диализа, последующего упаривания водного слоя, образующегося внутри диализного мешка, и лиофилизации. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал два сиалогликолипида, главный и минорный, а также некоторое количество нейтральных гликолипидов, фосфолипидов и пигментов. Дальнейшее выделение сиалогликолипидов проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой, элюируя ганглиозиды растворами ацетата аммония в метаноле [9]. Главный ганглиозид выходил с колонки при элюции 0,025 М раствором соли, что характерно для моносиалоганглиозидов, а минорный — при элюции 0,1 М раствором соли и, следовательно, обладал более кислым характером либо имел более длинную углеводную цепь [3]. Главный ганглиозид после дополнительной очистки с помощью препаративной ТСХ на силикагеле вел себя как индивидуальное соединение при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей. Он содержал сиаловую кислоту и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [10] и орциновым [11] реактивами соответственно). Фосфат и свободная аминогруппа в нем отсутствовали (нет окрашивания с молибденовым реактивом [12] и пингидрином).

Структура олигосахаридной цепи главного ганглиозида установлена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования и окисления хромовым ангидридом. После полного кислотного гидролиза ганглиозида обнаружены глюкоза и галактоза в соотношении 1:2. При частичном кислотном гидролизе ганглиозида в условиях, когда расщепляются кетозидные связи сиаловых кислот, а остальные гликозидные связи практически не затрагиваются, образуются нейтральный гликолипид и сиалосодержащий углеводный фрагмент, которые были разделены с помощью диализа. Недиализуемый нейтральный гликолипид, по данным ТСХ, имел такую же подвижность, как и лактозилцерамид, и после полного кислотного гидролиза давал глюкозу и галактозу в соотношении 1:1. Оба моносахарида разрушались при окислении ацетилированного производного гликолипида с помощью CrO_3 , что свидетельствует о β -конфигурации их гликозидных связей. В масс-спектре метилированного гликолипида имелись пики ионов с m/z 219 и 496, соответствующих концевой гексозе и фрагменту, содержащему дисахаридную цепь, связанную с первичным гидроксильным сфингозитового основания, и C-1—C-2-участок сфингозитового основания [13]. Анализ метилированных метилгликозидов, образующихся при метанолизе метилированного гликолипида, с помощью ГЖХ показал, что концевое положение в дисахариде занимает галактоза, которая связана с глюкозой по положению 4. Следовательно, нейтральный гликолипид, образующийся при частичном кислотном гидролизе сиалогликолипида, имеет структуру лактозилцерамида.

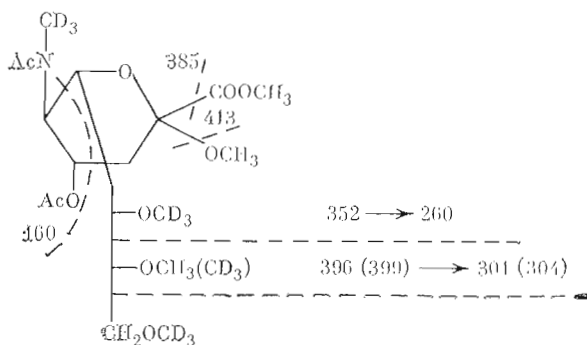
Отщепившийся сиалосодержащий углеводный фрагмент был выделен из висшей диализной воды с помощью ионообменной хроматографии на дауэксе 2×8 (ацетатная форма) и при анализе с помощью ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH_2PO_4 , показал присутствие одного главного соединения, которое располагалось на хроматограмме между N-ацетил- и N-гликолилнейраминовыми кислотами и имело такую же подвижность, как дисахарид галактозил-(1 \rightarrow 4)-8-O-метил-N-ацетилнейраминовая кислота, полученный нами ранее после частичного кислотного гидролиза дисиалоганглиозида из печени морской звезды *P. pectinifera* [4]. Как и дисахарид из ганглиозида печени *P. pectinifera*, сиалосодержащий углеводный фрагмент из ганглиозида *L. quinaria bispinosa* дает специфическое окрашивание при ТСХ с резорциновым и орциновым реактивами и после полного кислотного гидролиза показывает присутствие галактозы в количестве, равном содержанию сиаловой кислоты. Следовательно, при мягком кислотном гидролизе ганглиозида из *L. quinaria bispinosa* отщепляется дисахарид, содержащий галактозу и сиаловую кислоту.

Тип сиаловой кислоты и места замещения моносахаридов определяли с помощью тридегтерометилирования. В масс-спектре полностью тридегтерометилированного производного ганглиозида имеются интенсивные пики ионов с m/z 356 и 604; первый соответствует фрагменту N-ацетилнейраминовой кислоты, имеющей одну O-метильную группу вместо тридегтерометильной, который образуется при разрыве кетозидной связи и одновременном отщеплении заместителя из положения 4 и водорода из положения 3 с образованием двойной связи между C-3 и C-4 [4]; второй соответствует дисахаридному фрагменту, содержащему гексозу и моно-O-метильное производное N-ацетилнейраминовой кислоты. В спектре имеется пик иона с m/z 231, соответствующий концевой гексозе, хотя он имеет небольшую интенсивность. Пики, отвечающие концевому производному N-ацетилнейраминовой кислоты, а также фрагментам, содержащим N-гликолилнейраминовую кислоту, в спектре отсутствуют. Следовательно, в состав ганглиозида входит N-ацетилнейраминовая кислота в виде моно-O-метильного производного, которая расположена внутри углеводной цепи перед концевой галактозой.

Анализ с помощью ГЖХ тридегтерометилированных метилгликозидов, полученных после метанолиза тридегтерометилированного ганглиозида, показал, что один остаток галактозы является концевым, второй замещен по положению 3, а остаток глюкозы замещен по положению 4. Место замещения N-ацетилнейраминовой кислоты и положение O-метиль-

ной группы было определено в результате хроматомасс-спектрометрического анализа смеси тридейтерометилированных метилгликозидов после ацетилирования. Масс-спектры аналогичная фрагментация производного N-ацетилнейраминной кислоты аналогична фрагментации метилового эфира метилкетозида 4-O-ацетил-7,8,9-три-O-метил-N-ацетилнейраминной кислоты [3]. В масс-спектре имеются пики ионов с m/z 385 ($M^{+} - \text{COOCH}_3$) и 413 ($M^{+} - \text{OCH}_3$), соответствующие тридейтерометилированному производному N-ацетилнейраминной кислоты, имеющему одну O-метильную и одну O-ацетильную группу. Присутствие в спектре пиков ионов с m/z 396 ($M^{+} - \text{CH}_2\text{OCD}_3$) и 352 ($M^{+} - \text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{OCD}_3$), а также образующихся из них фрагментов с m/z 301 и 260 однозначно показывает, что O-метильная группа находится в положении 8 (схема 1).

Схема 1



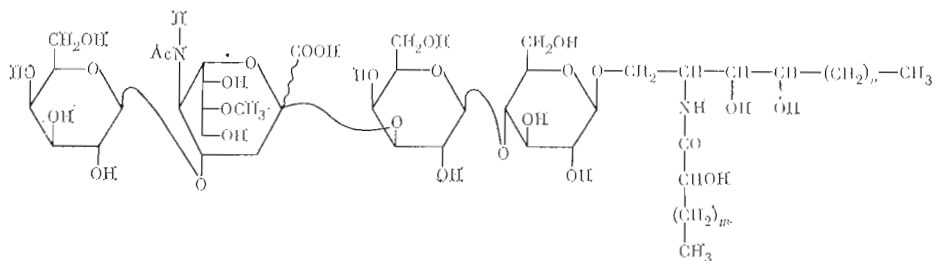
Положение O-ацетильной группы у C-4 следует из пиков ионов с m/z 160 (C-4—C-5-фрагмент) и 118 (160—42). Кроме рассмотренных выше пиков в спектре имеются пики ионов малой интенсивности с m/z 388, 416, 399 и 304, указывающие на присутствие небольшого количества производного N-ацетилнейраминной кислоты, гидроксильная группа которого при C-8 тридейтерометилирована.

Таким образом, в состав ганглиозида входит N-ацетилнейраминная кислота, главным образом в виде 8-O-метильного производного, которая замещена концевым остатком галактозы в положении 4 и связана с остатком галактозы лактозилцерамида по положению 3.

Конфигурация гликозидной связи концевой галактозы определена с помощью окисления хромовым ангидридом ацетилированного производного ганглиозида. При окислении практически вся галактоза, как и глюкоза, разрушаются; следовательно, концевой остаток галактозы соединен с 8-O-метил-N-ацетилнейраминной кислотой β -гликозидной связью.

К сожалению, вещества, имевшегося в нашем распоряжении, было недостаточно для определения состава высших жирных кислот и сфингозиновых оснований. Однако качественную характеристику липидной части ганглиозида можно получить при сравнении масс-спектров тридейтерометилированного ганглиозида и метилированного лактозилцерамида, полученного при частичном гидролизе ганглиозида и последующем метилировании нейтрального продукта. В спектре первого пики ионов, соответствующих липидной части молекулы (m/z 692, 706, 720, 734), сдвинуты на 12 единиц в сторону больших масс по сравнению с пиками аналогичных ионов в спектре второго (m/z 680, 694, 708, 722). Следовательно, в состав липидной части ганглиозида, вероятнее всего, входят монооксипроизводные высших жирных кислот и триоксисоединения (фитосфингозины). Фитосфингозины действительно были обнаружены с помощью ТСХ после метанолиза ганглиозида.

Таким образом, на основании изложенных данных для главного ганглиозида морской звезды *L. quinaria bispinosa*, относящейся к отряду Явнопластинчатых, предложена следующая структура (схема 2):



Этот ганглиозид отличается от ганглиозидов морских звезд отряда Педицелляриевых главным образом положением сialовой кислоты внутри олигосахаридной цепи, что характерно и для ганглиозидов из *P. (A.) pectinifera* отряда Игольчатых, однако последние содержат арабинозу и имеют более длинные углеводные цепи [1—4]. Для того чтобы выяснить, являются ли такие типы структур специфичными для каждого из отрядов морских звезд, необходимо более широкое исследование ганглиозидов этого класса иглокожих. Интересно, что сходство в расположении сialовых кислот в углеводных цепях обнаружено в ганглиозидах морских звезд, относящихся к отрядам, которые не очень резко отграничены друг от друга и имеют виды, обладающие признаками, переходными между Явнопластихатными и Игольчатыми звездами.

Следует упомянуть также, что метилированные производные сialовых кислот ранее были обнаружены только в ганглиозидах морских звезд: 8-О-метил-N-ацетилнейраминавая кислота в ганглиозидах из *D. nipon* [14] и *P. pectinifera* [4], а 8-О-метил-N-гликолилнейраминавая кислота — в ганглиозидах из *Asterias forbesi* [15], *A. amurensis* [7, 8] и *A. pectinifera* [2].

Экспериментальная часть

Морские звезды *L. quinaria bispinosa* собраны в бухте Посыет Японского моря в сентябре. В работе использовали N-ацетилнейраминавую кислоту (Koch-Light, Англия), N-гликолилнейраминавую кислоту (Sigma, США). Хлороформ перед использованием перегоняли, остальные растворители квалификации х.ч. использовали без предварительной очистки.

Общий липидный экстракт из звезд и сырой препарат полярных гликолипидов получали как описано ранее [16]. Из 50 морских звезд получено 1,29 г сырого препарата.

Колоночную хроматографию гликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH_3COO^-) проводили как описано ранее [16], главный сialогликолипид элюировали 0,025 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в CH_3OH , мипорный — 0,1 М раствором соли, фракции анализировали с помощью ТСХ. Фракции, содержащие главный ганглиозид, объединяли и очищали препаративной ТСХ. Из 1,29 г сырого препарата получено ~7 мг чистого образца ганглиозида.

Аналитическую ТСХ проводили на готовых пластинках с закрепленным слоем (Merck, ФРГ), препаративную — на силикагеле G-60 Н (Merck, ФРГ). Сialовые кислоты анализировали на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH_2PO_4 . Использовали системы растворителей: для ганглиозидов хлороформ — метанол — вода (60 : 40 : 10) и хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаруженные резорциновым [10] и орциновым [11] реактивами; для нейтральных гликолипидов хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сialовых кислот пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5) и пропанол — вода (7 : 3), обнаружение резорциновым и орциновым реактивами; для метилированных гликолипидов хлороформ — метанол (30 : 1,5); для сфингозиновых оснований хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 2% раствором шингидрина в ацетоне.

ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam 104 (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на газхроме Q при 180°C, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 160°C; ацетаты частично метилированных метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% OV-1 на диатомите С при 200–250°C (3°/мин).

Хроматомасс-спектрометрический анализ ацетата частично метилированного метилкетозида сиаловой кислоты проводили на приборе Varian MAT III (ФРГ), колонка с 3% OV-1, ионизирующее напряжение 70 эВ.

Масс-спектры метилированного лактозилцерамида и тридейторметилированного ганглиозида снимали на приборе Varian MAT CN-6 (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образцов 270 и 300°C соответственно.

Сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [17, 18].

Полный кислотный гидролиз гликолипидов проводили 2 н. HCl при 100°C в течение 4 ч, реакционную смесь нейтрализовали смолой IRA-410 (HCO₃⁻), обрабатывали K₂H₂O₄ 3 ч при 20°C, раствор пропускали через колонку, заполненную IR-120 (H⁺), промывали водой, элюат упаривали с добавлением метанола в конце упаривания, остаток обрабатывали 16 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1:1) при 20°C. Образовавшиеся ацетаты гекситов анализировали ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозида осуществляли в 0,1 н. H₂SO₄ при 80°C в течение 1,5 ч, реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды. Не диализуемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ. Нейтральный гликолипид выделяли с помощью ТСХ и определяли его моносахаридный состав после полного кислотного гидролиза. Внешний водный раствор, полученный после диализа, упаривали до ~5 мл, пропускали через колонку, содержащую 6 мл дауэкса 2×8 (CH₃COO⁻), колонку промывали водой (2×5 мл) и 1 М Na-ацетатным буфером, pH 4,6 (10 мл) [17]. Кислый элюат деионизировали на колонке с 10 мл смолы IR-120 (H⁺), лиофилизовали и анализировали ТСХ. Определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом и нейтральных сахаров после полного кислотного гидролиза с помощью ГЖХ.

Метилирование нейтрального гликолипида и тридейторметилирование ганглиозида проводили по Хакомори [19]. Полученные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды, очищали с помощью ТСХ и анализировали методом масс-спектрометрии. Метилированный лактозилцерамид и тридейторметилированный ганглиозид обрабатывали 0,5 н. HCl в CH₃OH при 80°C в течение 14 ч и анализировали частично метилированные и тридейторметилированные метилгликозиды с помощью ГЖХ. Далее продукты метанолиза тридейторметилированного ганглиозида ацетилировали 2 ч уксусным ангидридом в пиридине (1:1) при 100°C, раствор упаривали, остаток выдерживали в эксикаторе над KOH в течение 14 ч и анализировали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

Окисление ацетилированных производных лактозилцерамида и ганглиозида осуществляли по методу [20] в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9:1) при 40°C в течение 40 мин.

Метанолит ганглиозида проводили 1 н. HCl в метаноле при 80°C в течение 18 ч, сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [21] и анализировали с помощью ТСХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 2, p. 289–300.
2. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 3, p. 765–772.
3. Smirnova G. P., Kochetkov N. K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 618, № 3, p. 426–495.
4. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 759, № 1, p. 192–198.

5. Жукова Н. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 4, с. 984-984.
6. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 102-108.
7. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 712, № 3, p. 650-658.
8. Смирнова Г. П., Глухоед И. С., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 974-979.
9. Winterbourn C. C. J. Neurochem., 1971, v. 18, № 6, p. 1153-1155.
10. Svennerholm L. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 24, № 3, p. 604-611.
11. Vaskovsky V. E., Kostitsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. Comp. Biochem. and Physiol., 1970, v. 34, № 3, p. 163-177.
12. Vaskovsky V. E., Kostitsky E. Y. J. Lipid Res., 1968, v. 9, № 3, p. 396.
13. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1048-1054.
14. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Kadenisev V. I., Smirnova G. P., Zhukova I. G. Carbohydr. Res., 1973, v. 27, № 1, p. 5-10.
15. Warren L. Biochim. et biophys. acta, 1964, v. 83, № 1, p. 129-132.
16. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 326, № 1, p. 74-83.
17. Svennerholm L. Acta chem. scand., 1958, v. 12, № 3, p. 547-554.
18. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. Acta chem. scand., 1959, v. 13, № 4, p. 856-858.
19. Hakomori S. J. Biochem. (Tokyo), 1964, v. 55, № 2, p. 205-208.
20. Laine R. A., Renkonen O. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 102-106.
21. Lauter C. J., Trams E. G. J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 1, p. 126-138.

Поступила в редакцию
20.V.1985

**A GANGLIOSIDE WITH SIALIC ACID LOCATED IN THE INNER PART
OF THE CARBOHYDRATE CHAIN ISOLATED FROM THE STARFISH
*LUIDIA QUINARIA BISPINOSA***

SMIRNOVA G. P., KOCHETKOV N. K.

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

The main ganglioside, containing 8-O-methyl-N-acetylneuraminic acid located in the inner part of the carbohydrate chain, has been isolated from the total lipid extract of the starfish *Luidia quinaria bispinosa*. On the basis of results of total and partial acid hydrolysis, methanolysis, methylation analysis and chromium trioxide oxidation, this ganglioside was identified as galactosyl- β -(1 \rightarrow 4)-8-O-methyl-N-acetylneuraminosyl-(2 \rightarrow 3)-galactosyl- β -(1 \rightarrow 4)-glucosyl- β -(1 \rightarrow 1)-ceramide, containing phytosphingosines and monohydroxy fatty acids.