



УДК 546.41.3+547.952

**ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ СФИНГОГЛИКОЛИПИДОВ
ГЕТЕРОГЕННЫМ КАТАЛИТИЧЕСКИМ ИЗОТОПНЫМ ОБМЕНОМ
С ГАЗООБРАЗНЫМ ТРИТИЕМ В РАСТВОРЕ***Шевченко В. И., Мясоедов Н. Ф.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва**Прказова Н. В., Шапошникова Г. И., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Радиоактивные производные ганглиозидов и цереброзидов были получены обработкой в присутствии катализаторов соответствующих сфинголипидов газообразным тритием в диоксане с последующей очисткой хроматографическими методами. Количество включенной тритиевой метки уменьшалось с увеличением полярности гликолипидов мозга. Распределение метки в тритированных гликолипидах определялось после кислотного метанолиза и измерения радиоактивности образовавшихся фрагментов. Основная часть метки оказалась связанной с жирными кислотами и сфингозиновыми основаниями. Отношение метки, включенной в эти два фрагмента, зависит от природы катализатора.

Существуют различные методы введения тритиевой метки в молекулы гликофсфинголипидов. Биологические методы с использованием меченых N-ацетилнейраминовой кислоты и N-ацетилгалактозамина [1, 2] или других меченых предшественников приводят к соединениям низкой удельной активности. Более высокую удельную активность дают методы с использованием восстанавливающих агентов (NaB^3H_4 и KB^3H_4). При этом природные соединения предварительно окисляются галактооксидазой [3—5]. Однако этот путь применим лишь для соединений, являющихся субстратами галактооксидазы. Наиболее универсальный метод получения высокомеченых гликолипидов основан на реакциях тритиевого обмена, катализируемых металлами переходной группы [6—10]. Основным недостатком этого метода состоит в том, что наряду с тритиевым обменом происходит тритирование двойных связей сфингозиновых и жирнокислотных остатков. Образующиеся при этом соединения имеют физико-химические свойства, отличные от свойств исходных липидов. Поэтому полученные меченые аналоги необходимо исследовать на их применимость в каждом конкретном случае [2, 8, 11, 12]. Другой недостаток существующих каталитических методов [7—9] заключается в том, что для введения газообразного трития использовались гидроксилсодержащие растворители и гетерогенные катализаторы (палладий и платина). Известно, что при этих условиях происходит изотопный обмен между газообразным тритием и растворителем, что приводит к уменьшению содержания трития в газовой смеси и снижению в связи с этим удельной активности конечного продукта.

В настоящей работе для введения тритиевой метки в ганглиозиды и цереброзиды в качестве растворителя применялся диоксан, а в качестве катализатора наряду с палладиевыми использовался растворимый катализатор трис (трифенилфосфин) родийхлорид $[(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}]$.

Растворимые катализаторы, кроме тех особенностей, которые были обсуждены ранее [13], имеют то преимущество, что они менее подвержены действию каталитических ядов [14], в связи с чем $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ решено было использовать для введения тритиевой метки в серосодержащий ганглиозид.

Обработке газообразным тритием [13] подвергали ганглиозиды мозга: N-ацетилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 3$) галактозил ($\beta 1 \rightarrow 3$)-N-ацетилгалактозаминил ($\beta 1 \rightarrow 4$) галактозил [$(\alpha 2 \rightarrow 3)$ -N-ацетилнейраминозил] ($\beta 1 \rightarrow 4$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_{D1a}), галактозил ($\beta 1 \rightarrow 3$)-N-ацетилгалактозаминил ($\beta 1 \rightarrow 4$) [N-ацетилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 8$)-N-ацетилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 3$)]-галактозил ($\beta 1 \rightarrow 4$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_{D1b}), галактозил ($\beta 1 \rightarrow 3$)-N-ацетилгалактозаминил ($\beta 1 \rightarrow 4$) [N-ацетилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 3$) галактозил ($\beta 1 \rightarrow 4$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$)] церамид (G_{M1}), ганглиозиды морского сьика *Strongylocentrotus intermedius*: N-гликолилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глюкозил ($1 \rightarrow 8$)-N-гликолилнейраминозил ($2 \rightarrow 6$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_1) и 8-сульфо-N-гликолилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 6$) глюкозил ($1 \rightarrow 8$)-N-гликолилнейраминозил ($2 \rightarrow 6$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_2), ганглиозиды печени: N-ацетилгалактозаминил [$(2 \rightarrow 3)$ -N-гликолилнейраминозил] галактозил ($1 \rightarrow 4$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_{M2}) и N-гликолилнейраминозил ($\alpha 2 \rightarrow 3$)-галактозил ($\beta 1 \rightarrow 4$) глюкозил ($1 \rightarrow 1$) церамид (G_{M3}), а также галактозилцерамиды мозга (табл. 1).

После очистки полученных препаратов было определено распределение радиоактивной метки в молекулах сфинголипидов. С этой целью полученные меченые сфинголипиды подвергали кислотному метанолизу [15]. Образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном, а остаток упаривали и распределяли в системе хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (8:4:3). Метиловые эфиры кислот, сфингозиновые основания и полярные остатки разделяли препаративной ТСХ. Зоны, соответствующие по R_f вышеупомянутым соединениям, выделяли и определяли радиоактивность сцинтилляционным методом [16] (табл. 2 и 3).

При анализе полученных данных (табл. 1—3) можно отметить следующие закономерности: во-первых, основная часть тритиевой метки включается в липофильные части молекул сфингогликолипидов; во-вторых, при увеличении полярности молекул сфинголипидов, выделенных из мозга крупного рогатого скота (в ряду галактозилцерамид G_{M1} , G_{D1b} и G_{D1a}), удельная активность падает, что, по-видимому, связано с уменьшением адсорбции на поверхности катализатора липофильных частей сфинголипидов; в-третьих, при получении меченных тритием цереброзидов в присутствии катализатора Линдлара или 5% Pd/BaSO_4 суммарное включение метки в жирные кислоты и оксикислоты почти одинаково, в то время как включение трития в сфингозиновые основания в случае катализатора Линдлара уменьшается примерно на 75%. При этом меняется и распределение тритиевой метки между жирными кислотами и оксикислотами (см. табл. 2), что указывает на существенные различия в адсорбционных свойствах амидов негидроксилированных кислот и оксикислот. Различия становятся особенно заметными при проведении реакции изотопного обмена на катализаторе Линдлара, адсорбционные центры которого частично дезактивированы (табл. 2).

Таким образом, использование диоксана в качестве растворителя позволило в ряде случаев заметно повысить удельную активность и выход соединений, полученных ранее [7]. Предложенный метод применим для введения трития в липофильную часть ганглиозидов, в том числе и серосодержащих (катализ в присутствии $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$), и цереброзидов. Причем применение различных катализаторов при тритировании дает возмож-

Таблица 1

Введение трития в сфинголипиды обработкой газообразным тритием в растворе

Сфинголипид	Навеска, мг	Катализатор	Радиоактивность после очистки, мКи	Выход, %	Удельная активность, Ки/ммоль
G _{D1a}	6,4	5% Pd/BaSO ₄	3,99	36	3,1
G _{D1b}	0,75	5% Pd/BaSO ₄	0,48	31	3,7
G ₁	0,1	(Ph ₃ P) ₃ RhCl	0,15	51	4,3
G ₂	10,0	(Ph ₃ P) ₃ RhCl	13,9	72	2,9
Галактозилцерамид	20,0	5% Pd/BaSO ₄	1180	74	52,4
»	14,4	5% Pd/BaSO ₄ Линдлара	364	90	24,2
G _{M1}	2,5	5% Pd/BaSO ₄	8,1	92	5,3
G _{M2}	3,0	5% Pd/BaSO ₄	28,0	93	13,4
G _{M3}	2,0	5% Pd/BaSO ₄	0,27	40	0,38

Таблица 2

Распределение трития во фрагментах после кислотного метаолиза меченого галактозилцерамида

Соединение (катализатор)	Удельная активность фрагментов, Ки/ммоль *			
	метилвые эфиры жирных кислот	метилвые эфиры жирных оксикислот	сфингозиновые основания	метилгалактозид
Галактозилцерамид (5% Pd/BaSO ₄)	9,96 (49)	7,86 (15)	31,44 (60)	3,14 (6)
Галактозилцерамид (катализатор Линдлара)	7,02 (29)	9,20 (38)	7,99 (33)	—

* В скобках приведены доли удельной активности фрагментов в % от удельной активности галактозилцерамида.

Таблица 3

Распределение трития во фрагментах после кислотного метаолиза меченых ганглиозидов

Ганглиозид	Катализатор	Удельная активность фрагментов, Ки/ммоль *		
		метилвые эфиры жирных кислот	сфингозиновые основания	полярные фракции
G _{M1}	5% Pd/BaSO ₄	1,75 (33)	3,13 (59)	0,42 (8)
G _{M2}	5% Pd/BaSO ₄	8,04 (60)	4,56 (34)	0,8 (6)
G _{D1a}	5% Pd/BaSO ₄	0,25 (8)	2,54 (82)	0,31 (10)
G ₂	(Ph ₃ P) ₃ RhCl	2,32 (80)	0,55 (19)	0,03 (1)

* В скобках приведены доли удельной активности фрагментов в % от удельной активности ганглиозидов.

ность варьировать степень введения метки в жирнокислотную и сфингозиновую части молекул, что показано на примере цереброзидов мозга.

Экспериментальная часть

Ганглиозиды мозга G_{D1a} и G_{D1b} выделены по методу [17], цереброзиды мозга — по методу [18], ганглиозиды яйцеклеток морского ежа G₁ и G₂, а также ганглиозиды G_{M1}, G_{M2} и G_{M3} из мозга крупного рогатого скота,

мышинной печени и печени крупного рогатого скота соответственно были получены по методу [19]. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью регистрации препаратов ~12% в диоксановом сцинтилляторе [16]. Аналитическая ТСХ проводилась в системах хлороформ — метанол — вода, 65:25:4 (А), хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH , 60:35:8 (Б), гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота, 85:15:1 (В). Катализаторы и растворители готовили и очищали обычными методами.

Радиохимическую чистоту конечных продуктов определяли при помощи ТСХ по методу [20] в системах А и Б. Не менее 95% радиоактивности содержалось в зонах, соответствующих по хроматографической подвижности исходным соединениям. Полученные меченые сфинголипиды хранили при 0° С в системе хлороформ — метанол (2:1).

Реакцию изотопного обмена со 100% тритием проводили по методу [13]. В ампулу помещали раствор сфинголипида в диоксане, вносили катализатор (молярное соотношение металла и вещества 1:1), ампулу замораживали в жидком азоте, вакуумировали до давления $1 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст. и заполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст., нагревали до комнатной температуры и выдерживали 3 ч при перемешивании на магнитной мешалке (условия реакции и результаты приведены в табл. 1). Палладиевые катализаторы отфильтровывали и промывали системой хлороформ — метанол, 2:1 (4×10 мл). Фильтрат упаривали, вновь растворяли в той же системе и эту процедуру повторяли трижды для удаления лабильного трития.

Препаративную очистку ганглиозида G_2 (реакционная масса 30 мг) осуществляли на колонке (100×10 мм) с 4 г силикагеля Л (100–160 мкм) (ЧССР). Вещества элюировали последовательно 40 мл системы хлороформ — метанол (2:1), 40 мл раствора А и 40 мл раствора Б, отбирая фракции по 10 мл. Собранный элюат анализировали в системе Б на пластинках (6×6 см) с силикагелем КСК (150–200 меш). Фракции 2,3 и 10–12 были загрязнены, по-видимому, продуктами разложения родиевого катализатора. Поэтому эти фракции очищали дополнительно препаративной ТСХ на пластинках (18×24 см) с тонким слоем (0,5 мм) силикагеля КСК (150–200 меш) в системе Б. Аналогичным образом очищали ганглиозиды G_{M1} , G_{M2} и G_{M3} .

Очистку ганглиозидов G_{D1a} , G_{D1b} , G_1 и галактозилцерамидов проводили препаративной ТСХ в системах А (цереброзиды) и Б (ганглиозиды). Зоны обнаруживали опрыскиванием водой, а также специфическими реагентами: антроном [21] — цереброзиды, резорциновым реагентом [22] — ганглиозиды. Сфинголипиды элюировали с силикагеля системой хлороформ — метанол — вода (50:50:15). Элюаты, содержащие чистые липиды, объединяли и упаривали. Концентрацию очищенных соединений определяли по методу [23] и [24].

Кислотный метанолиз проводили по методу [15]. Аликвоты сфинголипидов (0,5 мг) растворяли в 4 мл 0,75 н. HCl в метаноле, выдерживали 24 ч при 80° С, охлаждали, экстрагировали гексаном (3×2 мл), упаривали и распределяли в системе хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (8:4:3). Аликвоты гексановых, хлороформных и водно-метанольных фракций анализировали в системах А и В. В системе В были выделены зоны, содержащие метиловые эфиры жирных кислот (R_f 0,6–0,8), метиловые эфиры жирных оксикислот (R_f 0,1–0,3); в системе А — зоны, содержащие метиловые эфиры жирных кислот и оксикислот ($R_f > 0,9$), сфингозиновых оснований (R_f 0,5–0,8) и полярные остатки ($R_f < 0,5$). Радиоактивность указанных зон измеряли по методу [19], добавляя в сцинтиллятор 0,2 мл 6 н. HCl . Полученные данные приведены в табл. 2 и 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tallman J. F., Kolodny E. H., Brady R. O. (1975) *Methods in Enzymol.*, vol. 35, Part B, pp. 541-548, Acad. Press, N. Y.
2. Kolodny E. H., Kanfer J., Qurk J. M., Brady R. O. (1970) *J. Lipid Res.* **11**, 144-149.
3. Veh R. W., Corfield A. P., Sander M., Schauer R. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **486**, 145-160.
4. Radin N. S., Hof L., Bradley R. M., Brady R. O. (1969) *Brain. Res.*, **14**, 497-505.
5. Gahmberg C. G., Anderson L. C. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 5888-5894.
6. Schwarzmann G. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **529**, 106-114.
7. Di Cesare J. L., Rapport M. M. (1974) *Chem. and Phys. Lipids*, **13**, 447-452.
8. Seyama Y., Yamakawa T., Komai T. (1968) *J. Biochem.*, **64**, 487-493.
9. Gatt S., Rapport M. M. (1966) *Biochem. J.*, **101**, 680-686.
10. Poubs A., Pollard A. C. (1978) *J. Labelled Compounds and Radiopharm.*, **14**, 17-26.
11. Suzuki Y., Suzuki K. (1972) *J. Lipids Res.*, **13**, 687-692.
12. King M. E., King D. W., Graf L., Rapport M. M. (1974) *Federat. Proc.*, **33**, 629 abs.
13. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Волгин Ю. В., Бергельсон Л. Д. (1980) *Биоорганическая химия*, **6**, 1338-1345.
14. Hörnfeldt A. B., Gronowitz J. S., Gronowitz S. (1968) *Chem. scand.*, **22**, 2725-2731.
15. Sweeley C. C., Walker B. (1964) *Anal. Chem.*, **36**, 1461-1466.
16. Kinard F. E. (1957) *Rev. Sci. Instrum.*, **28**, 293-295.
17. Дятловицкая Э. В., Новиков А. М., Бергельсон Л. Д. (1974) *Биохимия*, **39**, 552-556.
18. Симонова Т. Н., Вавер В. А. (1976) *Химия природн. соедин.*, **3**, 285-289.
19. Проказова Н. В., Кочаров С. Л., Садовская В. Л., Мошневский Ю. В., Бергельсон Л. Д., Звездина Н. Д. (1979) *Биоорганическая химия*, **5**, 458-467.
20. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. (1979) *Биоорганическая химия*, **5**, 906-911.
21. Morris D. L. (1948) *Science*, **107**, 254-255.
22. Svennerholm L. (1963) *Methods in Enzymol.*, vol. 6, pp. 459-462, Acad. Press, N. Y.
23. Svennerholm L. (1963) *J. Neurochem.*, **10**, 613-623.
24. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) *J. Lipid Res.*, **3**, 136-138.

Поступила в редакцию
26.II.1980

PREPARATION OF TRITIATED SPHINGOLYCOLIPIDS BY HETEROGENIC CATALYTIC ISOTOPE EXCHANGE WITH GASEOUS TRITIUM IN SOLUTION

SHEVCHENKO V. P., MYASOEDOV N. F., PROKAZOVA N. V.,
SHAPOSHNIKOVA G. I., BERGELSON L. D.

*Institute of Molecular Genetics and M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Radiolabeled gangliosides and cerebroside were prepared by catalytic tritiation of the corresponding unlabeled sphingoglycolipids isolated from mammalian brain and liver, or from sea urchin eggs and purified by preparative thin-layer chromatography. For brain glycolipids the amount of tritium incorporated decreased with increasing polarity of the glycolipids. The localization of the label was determined by degrading the sphingoglycolipids using acidic methanolysis and measuring the radioactivity of the liberated fragments. The main part of the radioactivity was found in the fatty acid and sphingosine moieties of the glycolipids. The ratio of label incorporated into the fatty acid and sphingosine residues varied considerably for different catalysts.