



УДК 547.95.02:577.11

СТРУКТУРА ГАНГЛИОЗИДОВ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И ИЗМЕНЕНИЕ ИХ СОСТАВА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЛОТНОСТИ КЛЕТочНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Проказова Н. В., Гочаров С. Л., Фомина-Агеева Е. В.,
Садовская В. Л., Розынов Б. В., Волгин Ю. В.,
Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Предложены структуры основных ганглиозидов клеток асцитной карциномы Эрлиха. Главным компонентом (70%) является N-ацетилгалактозаминил (N-гликолил-нейраминиозил)лактозилцерамид (G_{M2}). Кроме него клетки содержат ганглиозиды G_{M3} , G_{M1} , G_{D1a} и незначительные примеси трисиалоганглиозидов. Все ганглиозиды, кроме G_{M2} , присутствуют в форме как N-ацетил-, так и N-гликолилнейраминозильных производных. Обнаружено, что состав ганглиозидов клеток асцитной карциномы Эрлиха претерпевает существенные изменения при снижении плотности клеточной популяции. В асцитных клетках, инкубированных в суспензии, разбавленной в 30 раз по сравнению с исходной, содержание суммарных ганглиозидов в пересчете на одну клетку возрастает вдвое, а содержание ганглиозидов G_{M1} и G_{D1a} увеличивается в 10 и 5 раз соответственно. Содержание остальных ганглиозидных компонентов не меняется. Предполагается, что снижение плотности клеточной популяции сопровождается индукцией гликозилтрансферазной активности, которая в неразбавленной суспензии подавлена.

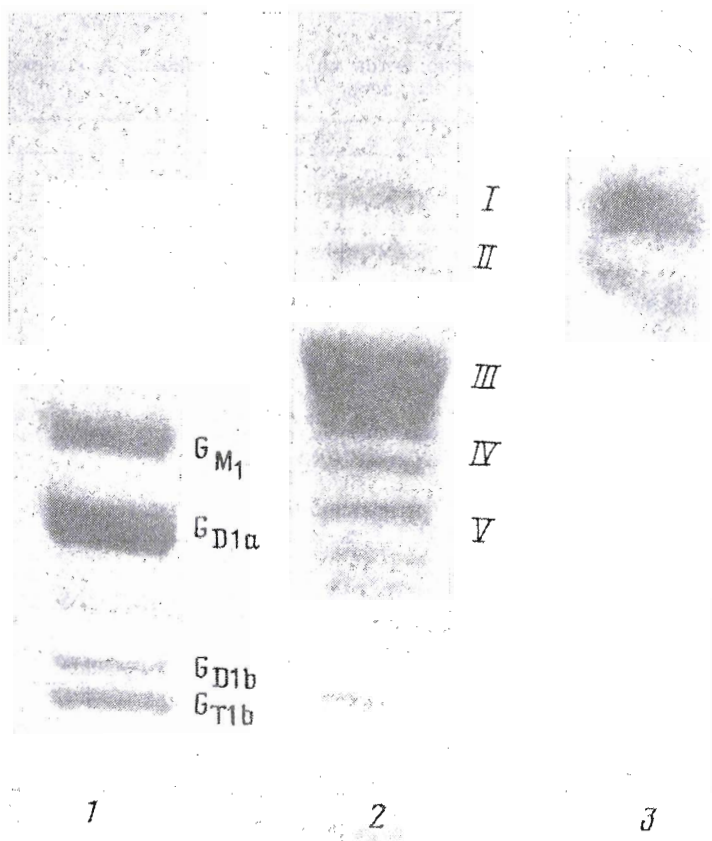
В последние годы интенсивно изучаются гликолипидные компоненты плазматических мембран, участвующие во взаимодействии между клетками, в частности в клеточной адгезии, клеточном узнавании, контакдном торможении и контроле роста клеточной популяции [1, 2]. Исследования, проведенные на монослойных культурах клеток, способных образовывать постоянные контакты, показали, что состав их гликолипидов меняется при возникновении контактов [3, 4]. Для отдельно живущих клеток данные о зависимости гликолипидного состава от плотности клеточной популяции отсутствуют.

Как установлено [5], чувствительность отдельно живущих клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) к нейрофармакологическим препаратам зависит от концентрации клеток в среде. Это позволяет рассматривать суспензионную культуру клеток АКЭ как коммуницирующую клеточную популяцию, которая является удобной моделью для изучения взаимного влияния клеток, не связанных постоянными контактами. В связи с этим нами было предпринято исследование ганглиозидного состава клеток АКЭ и изучение его изменения в зависимости от плотности клеточной популяции*.

Тонкослойная хроматография суммарных ганглиозидов показала, что клетки АКЭ содержат один основной и ряд минорных ганглиозидных компонентов (рисунок и табл. 1). С помощью препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) ганглиозиды АКЭ разделили на пять фракций (I — V), которые обнаруживались резорциновым и антроновым реагентами и не давали характерной окраски с реагентом на фосфор.

Основная из этих фракций (III) была хроматографически однородна. Этот ганглиозид содержит сфингозин, галактозу, глюкозу, галактозамин и сialовую кислоту в эквимольных соотношениях (табл. 1). Он резистентен к нейраминидазе из *Vibrio cholerae*, что характеризует ганглиозиды,

* Предварительное сообщение без полного структурного анализа ганглиозидов (см. [6]).



ТСХ ганглиозидов АКЭ (2), мозга крупного рогатого скота (1), гематозид печени крупного рогатого скота (3). Условия хроматографии: готовые пластинки с силикагелем G (Merck, ФРГ), система хлороформ – метанол – 5 М NH_4OH – 2% CaCl_2 – вода, 60 : 35 : 4 : 1 : 3

у которых сиаловая кислота присоединена к остатку галактозы, находящемуся в середине углеводной цепи. Мягкий кислотный гидролиз этого ганглиозида приводил к образованию нейтрального гликолипида и сиаловой кислоты. ГЖХ триметилсилильного производного метилового эфира метилгликозида сиаловой кислоты, освободившейся при мягком кислотном метанолизе, показал, что ганглиозид III содержит N-гликолилнейраминую кислоту. Дальнейшее изучение структуры этого ганглиозида проводили масс-спектрометрией его полностью метилированного производного (схема и табл. 2) [7].

В масс-спектре перметилированного производного ганглиозида III присутствуют интенсивные пики ионов с m/z 260 (ион a) и 228 (ион $a - \text{CH}_2\text{OH}$), свидетельствующие о наличии терминального остатка N-ацетилгалактозамина. Масс-спектр содержит также интенсивные пики ионов b и $b - \text{CH}_2\text{OH}$ с m/z 406 и 374, соответствующие терминальному остатку N-гликолилнейраминной кислоты. Масс-спектр перметилированного ганглиозида III содержит пики ионов, характерные только для сфингозина C_{18} с m/z 253 и 364 [7]. Кроме того, в масс-спектре перметилированного производного ганглиозида III содержатся пики следующих ионов: $\epsilon + 1$ с m/z 855, отражающий частичную последовательность углеводных остатков гексоза – сиаловая кислота – N-ацетилгексозамин; g с m/z 1059, представляющий всю углеводную часть ганглиозида; $\delta + 1$ с m/z 1132, образующийся в результате потери молекулярным ионом алифатической части сфингозинового основания и ацилирующих жирных кислот [7]; e с m/z 548, 632, 658 и 660, относящиеся к C_{18} -сфингозиновому основанию, ацилированному незамещенными жирными кислотами $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{22:0}$, $\text{C}_{24:1}$ и $\text{C}_{24:0}$ соот-

Молярные соотношения компонентов молекул ганглиозидов, выделенных из клеток АКЭ

Ганглиозидные фракции	Компоненты				
	сфингозин *	галактоза	глюкоза	N-ацетил-галактозамин	сиаловая кислота
I					
II	1,00	0,92	1,12	—	0,96
III	1,00	1,14	0,91	1,01	0,95
IV	1,00	2,06	1,01	1,03	0,98
V	1,00	2,04	1,20	1,05	1,70

* Определяли колориметрически с точностью $\pm 10\%$. Остальные компоненты определяли с помощью ГЖХ ТМС-производных метилгликозидов, точность метода $\pm 5\%$.

Таблица 2

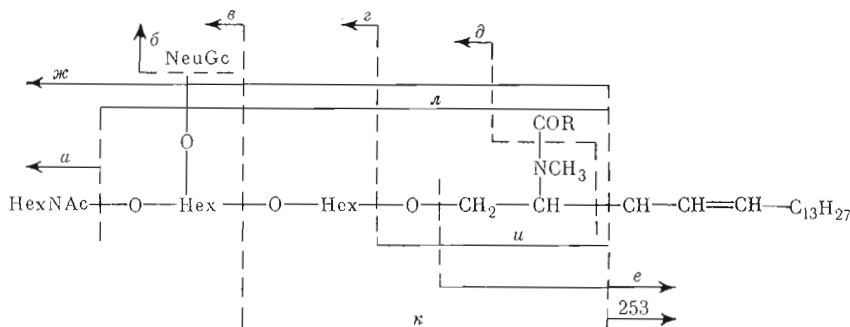
Масс-спектрометрическая идентификация ганглиозида III клеток АКЭ

Тип иона	Перметилированный ганглиозид III		Перметилированный восстановленный триметилсилилированный ганглиозид III	
	<i>m/z</i>	относительная интенсивность, %	<i>m/z</i>	относительная интенсивность, %
<i>a</i>	260	100	246	100
<i>a</i> -CH ₃ OH	228	71	214	45
<i>b</i>	406	32	436	48
<i>b</i> -CH ₃ OH	374	41	—	—
<i>v</i> +1	855	1	—	—
<i>z</i>	1059	0,5	1075	2
<i>z</i> +1	1132	0,5	—	—
<i>e</i>				
<i>C</i> _{16:0}	548	6	—	—
<i>C</i> _{22:0}	632	5	—	—
<i>C</i> _{24:0}	658	3	—	—
<i>C</i> _{24:1}	660	3	—	—
<i>ж</i>				
<i>C</i> _{16:0}	965	0,5	973	6
<i>C</i> _{22:0}	1049	0,5	1021	11
<i>C</i> _{24:1}	1075	0,5	1047	6
<i>C</i> _{24:0}	1077	0,5	1049	8
<i>и</i>				
<i>C</i> _{16:0}	312	9	—	—
<i>C</i> _{22:0}	396	9	—	—
<i>C</i> _{24:1}	422	4	—	—
<i>C</i> _{24:0}	424	4	—	—
<i>к</i> +1				
<i>C</i> _{16:0}	516	1	502	11
<i>C</i> _{22:0}	600	1	586	17
<i>C</i> _{24:1}	626	1	612	11
<i>C</i> _{24:0}	628	1	614	22
<i>л</i>				
<i>C</i> _{16:0}	—	—	619	8
<i>C</i> _{22:0}	—	—	776	7
<i>C</i> _{24:1}	—	—	802	3
<i>C</i> _{24:0}	—	—	804	5

ветственно; *ж* с *m/z* 965, 1049, 1077, 1075, включающие всю углеводную часть ганглиозида с фрагментом церамида; *и* с *m/z* 312, 396, 422 и 424, содержащие фрагмент церамида с теми же кислотами; *к*+1 с *m/z* 516, 600, 626, 628, подтверждающие связь церамида с гексозильным остатком.

Строение ганглиозида III, вытекающее из масс-спектра его перметилированного производного, подтверждается также при рассмотрении масс-спектра его перметилированного, восстановленного алюмогидридом лития и триметилсилилированного производного (см. табл. 2), фрагментация которого под электронным ударом аналогична распаду перметилированного

Схема фрагментации ганглиозида III



производного [8]. В масс-спектре этого производного пики фрагментов, содержащих остатки N-ацетилгексозамина или церамида (a , $a - \text{CH}_2\text{OH}$, $k + 1$) сдвинуты в область более низких масс на 14 единиц по сравнению с пиками тех же фрагментов перметилированного производного. Пики ионов, содержащих оба этих остатка ($ж$), сдвинуты на 28 единиц в область низких масс. Пик фрагмента, содержащего сialовую кислоту ($б$), сдвинут в область более высоких масс на 30 единиц, а пик иона $г$, содержащего остатки гексозамина и сialовой кислоты, — на 16 единиц в область высоких масс. В спектре этого производного имеются также пики ионов $л$ с m/z 692–804, содержащих фрагмент церамида, связанный с двумя остатками гексозы.

Для установления мест замещения в углеводных остатках перметилированный ганглиозид III был превращен в смесь ацетатов соответствующих полиолов, которую анализировали с помощью комбинированной ГЖХ и масс-спектрометрии. Таким путем были идентифицированы следующие ацетаты частично метилированных полиолов: 1,4,5-три-O-ацетил-2,3,6-три-O-метилгексит, 1,3,4,5-тетра-O-ацетил-2,6-ди-O-метилгексит и 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-1,5-ди-O-ацетил-3,4,6-три-O-метилгексит. Полученные аналитические данные свидетельствуют о том, что ганглиозид III представляет собой N-ацетилгалактозаминил(N-гликолилнейраминил)гексозил-гексозил-церамид. Остается невыясненным, к какому из двух гидроксильных групп трехзамещенной гексозы присоединены остатки сialовой кислоты и гексозамина и какова последовательность присоединения галактозы и глюкозы в цепи ганглиозида. Поскольку известно, что в ганглиозидах млекопитающих сialовая кислота всегда связана с галактозой в положении 3, гексозамин — в положении 4, а церамид — с глюкозой, вероятнее всего, что фракция III идентична ганглиозиду G_{M2} , выделенному ранее из мозга пациентов с болезнью Тей-Сакса [20]. Жирнокислотный состав этого ганглиозида приведен в табл. 3.

Ганглиозиды фракций I и II совпадали по хроматографическому поведению с гематозидами, выделенными из печени крупного рогатого скота (см. рисунок). Низкое содержание этих фракций в ганглиозидах АГЭ (табл. 4) не позволило полностью разделить их, поэтому мы исследовали их смесь. Количественное определение продуктов гидролитического расщепления показало, что они содержат сфингозин, глюкозу, галактозу и сialовую кислоту в соотношении 1 : 1 : 1 : 1 (табл. 1). Обработка ганглиозидов фракций I и II нейраминидазой из *Vibrio cholerae* привела к образованию нейтрального гликолипида, совпадающего по хроматографической подвижности с лактозилцерамидом, и сialовой кислоты. В результате мягкого кислотного гидролиза ганглиозидов фракций I и II образовались те же продукты, что и при обработке нейраминидазой. ГЖХ триметилсилиловых эфиров метиловых эфиров метилгексозидов сialовых кислот, освобожденных мягким кислотным метанализом исследуемых фракций, показало присутствие N-ацетил- и N-гликолилнейраминовых кислот в соотношении 7 : 3. Недостаточное количество этих ганглиозидов не дало возможности провести анализ продуктов их исчерпывающего метилирования и оконча-

Жирнокислотный состав ганглиозида III клеток АКЭ

Жирная кислота	%	Жирная кислота	%	Жирная кислота	%
C _{14:0}	3	C _{18:0}	6	C _{23:0}	5
C _{15:0}	1	C _{18:1}	4	C _{24:0}	15
C _{16:0}	20	C _{20:0}	3	C _{24:1}	16
C _{16:1}	3	C _{22:0}	24		

Примечание. Определено с помощью ГЖХ метиловых эфиров, точность метода $\pm 5\%$.

Таблица 4

Соотношение компонентов смесей ганглиозидов в клетках АКЭ*

Тип ганглиозида	Контрольные клетки, %	Суспензии клеток при инкубации			
		исходная		плотность 1 : 30	
		%	$n^{**} \cdot 10^{-5}$	%	$n^{**} \cdot 10^{-5}$
G _{M3}	8	7	25	4	27
G _{M2}	73	71	228	31	221
G _{M1}	11	11	35	46	311
G _{D1a}	8	10	32	19	130

* Соотношения ганглиозидов определяли в сериях из 10 опытов, разброс результатов не превышал $\pm 10\%$.

** n — число молекул на клетку.

тельно установить конфигурацию гликозидных связей в нейтральном гликолипиде, образующемся при кислотной и нейраминидазной обработке ганглиозидов I и II. Однако, поскольку известно, что в ганглиозидах млекопитающих сиаловая кислота связана с галактозой, можно предположить, что в ганглиозидах I и II присутствуют концевые группировки NeuGc ($\alpha 2 \rightarrow 3$) Gal- и NeuAc ($\alpha 2 \rightarrow 3$) Gal-. Таким образом, результаты тонкослойной и газожидкостной хроматографии, а также данные, полученные при действии нейраминидазы, позволяют заключить, что ганглиозиды I и II, вероятно, представляют собой N-ацетил- и И-гликолипиднейраминозиллактозилцерамиды соответственно.

Фракция IV содержала два близких по хроматографической подвижности компонента, менее полярный из которых совпадал по значению R_f с ганглиозидом G_{M1} мозга (см. рисунок). Так же как и G_{M1} мозга, эта фракция содержала сфингозин, глюкозу, галактозу, N-ацетилгалактозамин и сиаловую кислоту в соотношении 1 : 1 : 2 : 1 : 1 (табл. 1) и была резистентна к нейраминидазе из *Vibrio cholerae*. Мягкий кислотный гидролиз этой фракции приводил к образованию нейтрального гликолипида, совпадающего по хроматографическому поведению с асиало-G_{M1}. ГЖХ-анализ триметилсилиловых производных метиловых эфиров метилгликозидов сиаловых кислот, образовавшихся в результате мягкого кислотного метанолиза этой фракции, показал присутствие N-ацетилнейраминовой (66%) и N-гликолипиднейраминовой (34%) кислот. Незначительное содержание этой фракции не позволило выделить ее в количестве, достаточном для детального анализа ее полностью метилированного производного. Однако небольшое количество (0,5 мг) фракции IV было прометиловано и метилированные производные были превращены в ацетаты частично метилированных полиолов. Анализ их ацетатов с помощью комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии показал присутствие 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилгексита и 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилгексита, что свидетельствует о наличии в молекулах ганглиозидов фракции IV кощцевого и 4-О-замещенного остатков гексозы.

Содержание белка, суммарной и липидно-связанной сиаловой кислоты
в клетках АКЭ*

Плотность асцитных клеток при инкубации	Содержание белка, мг/г упакованных клеток	Сиаловая кислота, нмоль/мг белка	
		суммарная	липидно-связанная
Контроль	110	2,5	0,15
Исходная суспензия	100	2,2	0,17
Разбавленная 1 : 30	105	1,95	0,39
» 1 : 100	107	1,80	0,33

* Приведены средние величины из 5 опытов с разбросом $\pm 5\%$.

Таким образом, имеющихся в настоящее время аналитических данных недостаточно для установления полной структуры ганглиозидов фракции IV. Однако они позволяют заключить, что эти ганглиозиды имеют структуру, близкую к ганглиозиду G_{M1} мозга, и различаются между собой по составу сиаловых кислот.

Один из двух ганглиозидов, входящих во фракцию V, совпадал по хроматографической подвижности при ТСХ с ганглиозидом G_{D1a} мозга (см. рисунок). Так как содержание этой фракции в АКЭ очень мало, нам не удалось выделить достаточное количество для разделения ее на индивидуальные компоненты, и мы исследовали их смесь. Анализ продуктов гидролитического расщепления показал, что фракция V содержит сфингозин, глюкозу, галактозу, N-ацетилгалактозамин и сиаловую кислоту в соотношении 1 : 1 : 2 : 1 : 2 (табл. 1). При обработке нейраминидазой из *V. cholelae* ганглиозиды фракции V расщеплялись с образованием менее полярных ганглиозидов, один из которых по хроматографическому поведению соответствовал G_{M1} мозга. Мягкий кислотный гидролиз фракции V приводил к образованию гликолипида, совпадающего по хроматографическому поведению с асиало- G_{M1} мозга. ГЖХ триметилсилиловых эфиров метилгликозидов метиловых эфиров сиаловых кислот, полученных при мягком кислотном метанолизе этой фракции, показала наличие N-ацетил- и N-гликолилнейраминовых кислот в соотношении 4 : 6. Полученные данные позволяют предположить, что ганглиозиды фракции V имеют углеводную последовательность, аналогичную последовательности ганглиозидов G_{D1a} мозга. Кроме того, ганглиозиды АКЭ содержат в следовых количествах более полярные компоненты, соответствующие по хроматографическому поведению ганглиозидам G_{D1b} , G_{T1a} и G_{T1b} мозга (см. рисунок).

Определение количественного содержания ганглиозидов в клетках АКЭ в зависимости от концентрации клеток в инкубационной среде выявило существенные различия в их составе. При инкубации в течение 2 ч исходной суспензии клеток и суспензий, разбавленных в 30 и 100 раз, содержание суммарных сиаловых кислот (на 1 мг белка) несколько уменьшилось, а содержание липидно-связанных сиаловых кислот (на 1 мг белка) увеличилось при 30-кратном разбавлении более чем в 2 раза, дальнейшее разбавление картину существенно не изменяло (табл. 5).

При анализе соотношения ганглиозидных компонентов было показано (табл. 4), что в контроле и в исходной суспензии преобладает ганглиозид G_{M2} (70% суммы ганглиозидов), а при разбавлении суспензии в 30 раз сильно возрастает содержание ганглиозидов G_{M1} , который становится основным компонентом смеси ганглиозидов. Возрастает также содержание ганглиозидов G_{D1b} и высших ганглиозидов. Расчет показал, что число молекул ганглиозидов G_{M1} , приходящееся на одну клетку, возрастает при указанном разбавлении почти на порядок (с $35 \cdot 10^6$ до $311 \cdot 10^6$ молекул на клетку). Число молекул ганглиозидов G_{D1a} , приходящихся на одну клетку, увеличивается примерно в 5 раз, в то время как число молекул ганглиозидов G_{M2} остается постоянным.

Эти данные показывают, что при разведении клеточной суспензии в 30 раз стимулируется биосинтез ганглиозидов G_{M1} и G_{D1a} , который до этого, видимо, был подавлен. Возможно, изменение соотношения ганглиозидов связано с подавлением соответствующих гликозилтрансфераз в исходной суспензии и их активацией при разбавлении клеток. По-видимому, ингибирование активности этих ферментов в исходной суспензии осуществляется за счет прямого или опосредованного взаимодействия с компонентами поверхности соседних клеток. Описанное ранее изменение гликосфинголипидного состава, возникающее при установлении клеточных контактов, объясняли контактным гликозилированием [9]. По-видимому, усиление биосинтеза высших ганглиозидов при разбавлении клеток АКЭ основано на ином механизме межклеточных взаимодействий, природа которого остается невыясненной. Насколько нам известно, полученный в настоящей работе результат является первым доказательством межклеточных взаимодействий у отдельно живущих злокачественных клеток.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали клетки асцитной карциномы Эрлиха мышей-самцов гибридов СВА×С57 ВL/6F весом 18–22 г. Через 7 дней после перевивки АКЭ животных умерщвляли и из брюшной полости извлекали асцитную жидкость. Клетки осаждали центрифугированием (500 об/мин, 10 мин), трижды промывали физиологическим раствором и суспендировали в культуральной среде (синтетическая среда Игла и физиологический раствор, 1:1) таким образом, чтобы объем клеточной суспензии был равен объему исходного асцита. Полученную суспензию разделяли на 4 части, одна из которых служила контролем для исследования ганглиозидов асцитных клеток. Две другие части разбавляли культуральной средой в 30 и 100 раз, а последнюю, четвертую, часть оставляли без разбавления. Полученные суспензии, кроме контрольной, инкубировали 2 ч при 37° С при постоянном перемешивании. Жизнеспособность клеток проверяли по их способности к белковому синтезу. Включение [^{14}C]лейцина во фракции, нерастворимые в горячей трихлоруксусной кислоте, было одинаковым у инкубированных и исходных клеток. Затем клетки осаждали центрифугированием и промывали, как описано для нативных клеток. Для исследования структуры ганглиозидов использовали неинкубированные клетки, осажденные и промытые как описано выше.

Ганглиозиды экстрагировали по методу [10] и отделяли от других липидов многократной промывкой хлороформ-метанольного экстракта водой. Контроль полноты извлечения ганглиозидов из органического слоя проводили ТСХ в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), в качестве стандарта использовали гематозид печени крупного рогатого скота. Объединенные водно-метанольные экстракты упаривали досуха и подвергали щелочному дезацелированию, обрабатывая смесью хлороформ — 0,21 н. метанольный $NaOH$, 2 : 1 (4 ч при 20° С). Реакционную смесь нейтрализовали 0,35 н. уксусной кислотой в метаноле до pH 7, диализовали через целлофановую мембрану против дистиллированной воды при 4° С в течение 72 ч при шестикратной смене воды и упаривали досуха, остаток растворяли в системе хлороформ — метанол — 28% NH_4OH (32 : 8 : 1) и фильтровали. Раствор наносили на колонку (170×15 мм) со смесью 4 г силикагеля G (Serva, ФРГ) и 4 г Huflo Super Cel (Reanal, Венгрия). Ганглиозиды элюировали системами (по 150 мл): хлороформ — метанол — 28% NH_4OH (32 : 8 : 1) и хлороформ — метанол — вода (65 : 35 : 8) [11].

Гематозид, суммарные и индивидуальные (G_{M1} и G_{D1a}) ганглиозиды мозга выделяли по методу [10] из печени крупного рогатого скота и мозга крупного рогатого скота соответственно. Лактозилцерамид и аспало- G_{M1} получали мягким кислотным гидролизом гематозидов и G_{M1} и выделяли препаративной ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4), как описано ниже.

Аналитическую хроматографию ганглиозидов проводили на пластинках (6×6 см) с силикагелем КСК (5–7 мкм) в системе хлороформ — мета-

нол — 2,5 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), хроматограммы обнаруживали резорциновым реагентом [12]. В качестве стандартных веществ использовали ганглиозиды мозга и печени крупного рогатого скота.

Препаративную хроматографию ганглиозидов проводили на пластинках (13×18 см, толщина слоя 0,5 мм) силикагеля КСК (200 меш) в указанной выше системе при двукратном проявлении хроматограмм, зоны обнаруживали водой. Ганглиозиды элюировали смесью хлороформ — метанол — вода (50 : 50 : 15). Содержание сиаловой кислоты в ганглиозидах определяли по методу [13].

Количественное определение ганглиозидных фракций проводили по методу [14]: смесь ганглиозидов (0,15 мкмоль по сиаловой кислоте) разделяли ТСХ как указано выше. Высушенную пластинку обрабатывали резорциновым реагентом и нагревали 10—15 мин на песочной бане при 110°С. Зоны ганглиозидов удаляли с пластинки, помещали в центрифужные пробирки и добавляли по 0,4 мл смеси бутилацетат — бутанол (85 : 15). После энергичного встряхивания суспензию центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин, надсадочную жидкость отделяли и измеряли ее поглощение при 580 нм в микрокуветах ($l=1$ см). Содержание сиаловых кислот определяли по калибровочной кривой, построенной для N-ацетилнейраминной кислоты. Для ганглиозидов, содержащих N-гликолилнейраминную кислоту, использовали коэффициент 0,77 [12].

Мягкий кислотный гидролиз ганглиозидов проводили по методу [15]: ганглиозиды в количестве 1,5 мкмоль (по сиаловой кислоте) обрабатывали 1 ч 5 мл 0,1 н. HCl при 80°С, добавляли 4 объема смеси хлороформ — метанол (2 : 1). Нижнюю фазу отделяли, упаривали досуха, гликолипиды растворяли в небольшом количестве смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и анализировали ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4), используя в качестве стандартов лактозилцерамид и асиало- G_m1 .

Ферментативный гидролиз нейраминидазой из *V. cholerae* (Koch-Light; 500 ед/мл) проводили по методу [16]: к раствору 1,5 мкмоль ганглиозида (по сиаловой кислоте) в 0,1 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5, добавляли 0,01 мл 0,15% водного раствора альбумина и 0,05 мл нейраминидазы. Смесь инкубировали 24 ч при 37°С, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в небольшом количестве смеси хлороформ — метанол, 2 : 1, и продукты расщепления анализировали ТСХ на силикагеле в системах хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) и хлороформ — метанол — 2,5 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), используя в качестве стандартов ганглиозиды мозга и печени и лактозилцерамид.

Метилирование 0,5—3 мг ганглиозидов проводили по методу Хакомори [17]. Метилированные ганглиозиды выделяли по методу [18]. Полностью метилированные ганглиозиды восстанавливали по методу [8] и триметилсилилировали по методу [18]. Масс-спектры метилированных и последовательно метилированных, восстановленных, триметилсилилированных ганглиозидов получали на масс-спектрометре CH-5 «Varian MAT» при температуре испарения 300°С и ионизирующем напряжении 70 эВ.

Частично метилированные полиолы получали по методу [18] гидролизом полностью метилированных ганглиозидов с последующим восстановлением альдегидной группы. Полиолы ацетилировали и анализировали на хроматомасс-спектрометре «Varian MAT-44», оборудованном капиллярной колонкой с фазой SE-54 при программировании температуры от 200 до 250°С со скоростью 8°С/мин.

Мягкий кислотный метанолиз ганглиозидов проводили по методу [20]: ганглиозиды в количестве 1,5 мкмоль (по сиаловой кислоте) обрабатывали 0,2 мл 0,1 н. HCl в безводном метаноле (1 ч при 80°С). Смесь упаривали в вакууме до полного удаления HCl , остаток триметилсилилировали и анализировали ГЖХ по методу [21].

Количественный и качественный анализ углеводов в виде триметилсилиловых эфиров метилгликозидов проводили методом ГЖХ на хроматографе «Pye-Unicam 104» (Англия), оборудованном колонкой (1800×4 мм) с 1,5% OV-1 на хромосорбе G (80—100 меш), при программиро-

вани температуры от 150 до 300°С (6°С/мин). В качестве внутреннего стандарта использовали маннит [21].

Количественный анализ сфингозиновых оснований, образовавшихся при гидролизе ганглиозидов, проводили по методу [22]: к раствору комплекса сфингозина с метилоранжем в этилацетате добавляли 1 мл 1 н. H₂SO₄ и встряхивали. Измеряли оптическую плотность нижней (водной) фазы при 515 нм (*l*=1 см). Количество сфингозина определяли по калибровочной кривой, построенной по цереброзидам мозга крупного рогатого скота, выделенным по методу [23], средний молекулярный вес 854.

Метилловые эфиры жирных кислот получали кислотным метанолизом, выделяли экстракцией гексаном и апализировали ГЖХ на хроматографе «Varian 2100» (колошка 2000×2 мм с 5% SE-30 на хроматоне N-AW, 60—90 меш) с программированием температуры от 100 до 300°С (8°С/мин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes R. C. *Essays Biochemistry*, 1975, v. 11, № 1, p. 1—36.
2. Hakomori S.-I. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 417, № 1, p. 55—89.
3. Hakomori S.-I. *Tumor lipids: biochemistry and metabolism* / Ed. Wood R. Champaign Illinois: Amer. Oil Chem. Soc. Press, 1973, p. 269—284.
4. Hakomori S.-I. *Glycoconjugate Res.* / Eds Gregory I. D., Jelaog R. W. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 2, p. 965—983.
5. Маркова Л. П., Бузников Г. А. *Ж. общ. биол.*, 1976, т. 27, с. 290—295.
6. Проказова Н. В., Кочаров С. Л., Звездина Н. Д., Шапошникова Г. И., Бузников Г. А., Бергelson Л. Д. *Биохимия*, 1978, т. 43, № 10, с. 1805—1809.
7. Karlsson K. A., Pasher J., Samuelsson B. C. *Chem. and Phys. Lipids*, 1974, v. 12, № 2, p. 271—286.
8. Karlsson K. A. *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 12, p. 3643—3647.
9. Shur B. D., Roth S. *Biochem. et biophys. acta*, 1975, v. 425, № 3, p. 473—512.
10. Dyatlovitskaya E. V. *Lipid biochemical preparation* / Ed. Bergelson L. D. Amsterdam: Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 244.
11. Kawamura N., Taketomi T. *J. Biochem.*, 1977, v. 81, № 10, p. 1217—1225.
12. Svennerholm L. *Methods in Enzymol.* New York—London: Acad. Press, 1963, v. 6, p. 459—462.
13. Dyatlovitskaya E. V., Novikov A. M., Gorcova N. P., Bergelson L. D. *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 63, № 2, p. 357—364.
14. Jates A. J., Tompson D. J. *Lipid Res.*, 1977, v. 18, № 4, p. 660—663.
15. Rauvala H. *FEBS Letters*, 1976, v. 62, № 1, p. 161—164.
16. Balasubramanian A. S. *Ind. J. Biochem. and Biophys.*, 1971, v. 8, № 1, p. 77—82.
17. Hakomori S.-I. *J. Biochem.*, 1964, v. 55, № 1, p. 205—208.
18. Stoffel W., Hanfland P. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1973, v. 35, № 1, p. 21—31.
19. Carter H. E., Gaver R. C. *J. Lipid Res.*, 1967, v. 8, № 3, p. 391—395.
20. Yu R. K., Ledeen R. W. *J. Lipid Res.*, 1970, v. 11, № 5, p. 506—516.
21. Свилей Ч. К., Тао П. В. *Методы исследования углеводов* / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975, с. 13—17.
22. Onley J., Bodden E., Thiele O. W. *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 79, № 2, p. 265—267.
23. Dyatlovitskaya E. V., Bergelson L. D. *Lipid biochemical preparations* / Ed. Bergelson L. D. Amsterdam: Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 233—235.

Поступила в редакцию
24.VIII.1981

STRUCTURE OF GANGLIOSIDES OF EHRlich ASCITE CARCINOMA CELLS AND CELL DENSITY DEPENDENCE OF THEIR COMPOSITION

PROKAZOVA N. V., KOCHAROV S. L., FOMINA-AGEEVA E. V., SADOVSKAYA V. L., ROSYNOV B. V., VOLGIN Yu. V., BERGELSON L. D.

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

A structure for the gangliosides of Ehrlich ascite carcinoma cells was suggested. The main component, accounting for 70%, was identified as N-acetylgalactosaminyl(N-glycolylneuraminosyl)lactosylceramide (G_{M2}). The cell contains also minor amounts of G_{M3}, G_{M1}, G_{D1a}, and trisialogangliosides. With the exception of G_{M2}, all ganglioside components are present both as N-acetyl- and N-glycolylneuraminosyl derivatives. The ganglioside composition of Ehrlich ascite carcinoma cells was demonstrated to change drastically with changes in density of the cell population. Upon 30-fold dilution of the native cell suspension and subsequent 2 h incubation, the amount of total gangliosides per cell increased two-fold, whereas the quantities of G_{M1} and G_{D1a} increase ten- and five-fold, respectively. There was no alteration in the content of the other cell gangliosides. The reduction of cell density is supposed to be accompanied by induction on the cell surface of a glycosyltransferase activity which appears to be depressed in dense suspension.