

УДК 547.952

Член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ, Г. П. СМЕРНОВА, И. Г. ЖУКОВА
**СИАЛОГЛИКОЛИПИДЫ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS*
INTERMEDIUS. О СТРУКТУРЕ ОЛИГОСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ**

Ранее мы сообщали ⁽¹⁾ о выделении из гонад морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* смеси четырех сиалогликолипидов, в которых соотношения сфингозинового основания : глюкоза : сиаловая кислота для отдельных гликолипидов смеси составляли: гликолипид 1 1 : 2 : 2,5; гликолипид 2 1 : 3,3 : 2; гликолипид 3 1 : 2 : 2; гликолипид 4 1 : 2 : 1 ⁽²⁾. В предыдущей работе ⁽³⁾ приведена структура сфингозинового основания и жирнокислотный состав сиалогликолипидов и показано, что олигосахаридная цепь гликолипида связана гликозидной связью с первичной спиртовой группой фитосфингозина.

В настоящем сообщении обсуждаются данные по структуре олигосахаридной части молекулы, полученные при изучении гидролиза, деградации HJO_4 и метилирования сиалогликолипидов. Работа проведена на препарате сиалогликолипидов, в котором главный гликолипид — гликолипид 3 — составляет 70—80%, что вполне достаточно для решения поставленной задачи. Определенное для этого препарата соотношение сфингозинового основания : высшая жирная кислота : глюкоза : сиаловая кислота составляет 1 : 1 : 2 : 2.

Характерной чертой сиалогликолипидов *St. intermedius* является лабильность в условиях мягкого кислотного гидролиза. Нам не удалось получить асиалогликолипид в условиях, обычно применяемых для получения асиалоганглиозидов ($0,1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$, 80° , 1 час) ⁽⁴⁾. В нашем случае в этих условиях основными продуктами реакции являются керамидмоноглюкозид (цереброзид) и сиаловая кислота, некоторая часть исходного сиалогликолипида остается неизменной. В более мягких условиях гидролиза ($0,01 \text{ N H}_2\text{SO}_4$, 80° , 1 час) основным продуктом расщепления также является керамидмоноглюкозид, и значительное количество исходного сиалогликолипида остается неизменным. Получить керамиддисахарид не удастся. Очевидно, что гликозидная связь между глюкозой, непосредственно связанной с керамидом, и следующим моносахаридным остатком олигосахаридной цепи по своей лабильности в условиях кислотного гидролиза сравнима с лабильностью кетозидной связи сиаловой кислоты.

Периодатное окисление 10 мг сиалогликолипида проводили в стандартных условиях, применяемых для окисления водорастворимых гликолипидов ($0,01 \text{ M NaJO}_4$, в темноте, при $+4^\circ$ или при $+20^\circ \text{ C}$), количество поглощенного периодата контролировали спектрофотометрически (при 310 м μ). После восстановления NaBH_4 окисленного периодатом сиалогликолипида и последующего метанолиза ($0,5 \text{ N HCl}$ в метаноле, 80° , 24 час.) (для определения продуктов, получающихся из остатков глюкозы) или мягкого кислотного гидролиза (для определения продуктов, получающихся из сиаловых кислот сиалогликолипида) нейтральные продукты расщепления олигосахаридной цепи определяли при помощи хроматографии на бумаге (система: пиридин — *n*-бутанол — вода (6 : 4 : 3)) и в виде пер-О-(три-метилсилил)-производных при помощи газо-жидкостной хроматографии (г.ж.х.) (Ray Argon Chromatograph, колонка $120 \times 0,5 \text{ см}$, 5% полинеопентилгликольсукцината (ПНПГС) на хромосорбе W (60—80 меш) при 162/ и 107 C, скорость аргона 80 мл/мин).

Поглощение периодата прекращается через три часа и затем не изменяется в течение 72 час. По окончании окисления в продуктах реакции после восстановления NaBH_4 и метанолиза были обнаружены глицерин и глюкоза*. При этом, если в исходном сиалогликолипиде на 1 моль сфингозинового основания приходится 2 моля глюкозы, то после окисления остается только 0,5 моля неокисленной глюкозы на 1 моль сфингозинового основания.

Продукты окисления сиаловых кислот получали после восстановления NaBH_4 окисленного NaIO_4 сиалогликолипида и последующего мягкого

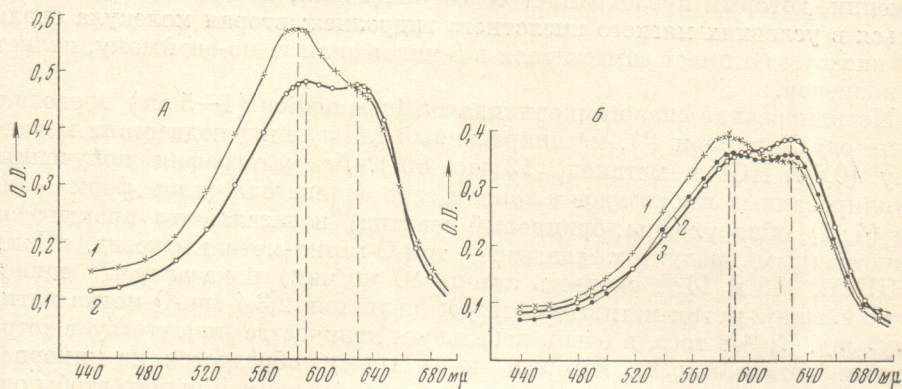


Рис. 1. Спектры поглощения хромофоров сиаловых кислот с резорцином. А: 1 — сиаловые кислоты, полученные из сиалогликолипида *St. intermedius*, 2 — сиаловые кислоты, полученные из продукта периодатной деградации сиалогликолипида *St. intermedius*, Б: 1 — N-ацетилнейраминавая кислота, полученная из 0,5 $\mu\text{мол}$. N-ацетилнейраминиллактозы, 2 — С₇-нейраминавая кислота, полученная из продукта периодатной деградации 0,5 $\mu\text{мол}$. N-ацетилнейраминиллактозы, 3 — смесь N-ацетилнейраминавой кислоты, полученной из 0,25 $\mu\text{мол}$. N-ацетилнейраминиллактозы, и С₇-нейраминавой кислоты, полученной из продукта периодатной деградации 0,25 $\mu\text{мол}$. N-ацетилнейраминиллактозы

кислотного гидролиза, характеризацию и идентификацию продуктов окисления проводили при помощи хроматографии на бумаге и сравнением спектров поглощения хромофоров после реакции с резорциновым реактивом⁽⁶⁾ с аналогичными спектрами свидетелей. Гидролизат делили на колонке с дауэксом 2×8 (ацетатная форма)⁽⁶⁾, для кислых продуктов, элюированных с колонки 1 M ацетатным буфером pH 4,6, снимали спектр поглощения хромофора после реакции с резорциновым реактивом (см. рис. 1А). В этом спектре кроме максимума при 585 мμ, характерного для N-ацетилнейраминавой кислоты, имеется второй максимум при 630 мμ такой же интенсивности. Кун и Гаухе⁽⁷⁾, а также Спиро⁽⁸⁾, сообщали, что максимум при 630 мμ характерен для так называемой С₇-нейраминавой кислоты, получающейся после периодатного окисления и восстановления NaBH_4 N-ацетилнейраминавой кислоты. Чтобы иметь возможность надежно интерпретировать спектры хромофоров кислых продуктов периодатной деградации сиалогликолипида, были для сравнения получены модельные смеси из N-ацетилнейраминиллактозы (см. рис. 1Б). Из такого сравнения можно сделать вывод, что в сиалогликолипиде *St. intermedius* одна молекула сиаловой кислоты окисляется, вторая — не окисляется. При окислении сиаловой кислоты должен образоваться формальдегид, что мы и наблюдали.

Этот вывод подтверждается также данными хроматографии на бумаге: в системах *n*-пропанол — *n*-бутанол — 0,1 N HCl (2 : 1 : 1) (А) и этилаце-

* В некоторых препаратах сиалогликолипидов *St. intermedius* мы обнаружили после окисления периодатом и восстановления ксилозу, что говорит о присутствии в этих препаратах глюкофуранозного остатка со свободными 5 и 6 положениями⁽⁵⁾.

тат — пиридин — вода — уксусная кислота (5:5:3:1) (Б) в смеси продуктов периодатной дегградации сиалогликолипида обнаружены два резорцин-положительных пятна — одно из них по хроматографической подвижности соответствует сиаловым кислотам исходного сиалогликолипида, второе — более подвижное ($R_{N\text{-ацетилнейраминовая к-та}}$ 1,29 и 1,37 в системах А и Б соответственно). По литературным данным (7) $C_7\text{-нейраминовая кислота}$ также имеет $R_{N\text{-ацетилнейраминовая к-та}}$ 1,4 (система Б).

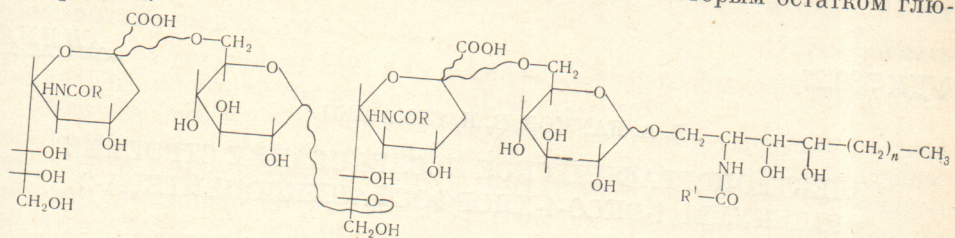
Следовательно, в исходном сиалогликолипиде одна молекула сиаловой кислоты обязательно имеет заместитель у гидроксильной группы в 8 положении, который предохраняет ее от окисления, однако может отщепляться в условиях мягкого кислотного гидролиза; вторая молекула сиаловой кислоты не имеет заместителя в 8 положении и, по-видимому, является концевой.

Метилирование сиалогликолипида *St. intermedius* (1–5 мг) проводили по методу Хакомори (9), метилированный гликолипид подвергали метанолизу (0,5 *N* HCl в метанол, 12 час., 80°). Хроматография полученных метилированных глюкозидов в тонком слое силикагеля (хлороформ — ацетон (4:1), обнаружение: орциновый реактив) показала, что практически единственным продуктом является три-О-метил-метилглюкозид. Г.ж.х. (ПНПГС, 148 и 162°, скорость аргона 80 мл/мин) показала, что единственным три-О-метил-метилглюкозидом является 2,3,4-три-О-метил-метилглюкозид. Кроме того, в очень небольшом количестве присутствует тетра-О-метил-метилглюкозид, который, по-видимому, образуется из минорного гликолипида, присутствующего в исходном препарате. Для того чтобы оценить количество образовавшегося 2,3,4-три-О-метил-метилглюкозида, мы метилировали смесь 1 моля сиалогликолипида (считая на сфингозиновое основание) и 1 моля галактозы, введенной в качестве внутреннего стандарта. Реакционную смесь подвергали метанолизу и далее анализировали с помощью г.ж.х. В результате такого эксперимента стало ясно, что количественное соотношение 2,3,4-три-О-метил-метилглюкозид : сфингозиновое основание равно 2 : 1, т. е., следовательно, в исходном гликолипиде практически вся глюкоза замещена по шестому положению и концевая глюкоза отсутствует. Таким образом, в олигосахаридной цепи сиалогликолипида нет разветвлений по остатку глюкозы, так как ди-О-метил-метилглюкозиды не обнаружены. Поэтому образование неокисленной глюкозы при действии периодата на сиалогликолипид можно объяснить затрудненным окислением способных к окислению остатков глюкозы, что связано, по-видимому, со способностью подобных гликолипидов образовывать мицеллы в водных растворах (ср. (4, 10)), кроме того, нельзя полностью исключить, что часть остатков глюкозы в исследуемом препарате сиалогликолипида имеет заместители, например, О-ацильные группы, которые защищают ее от окисления, однако снимаются в условиях метилирования по Хакомори.

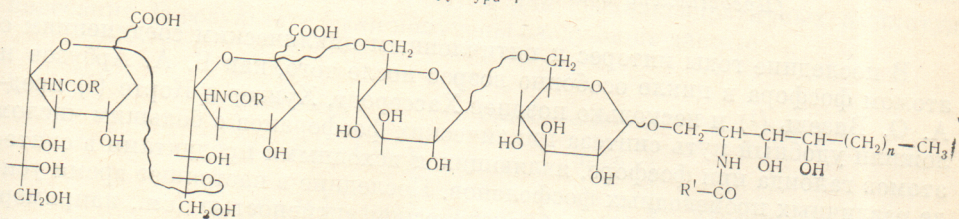
На основании данных метилирования, частичного кислотного гидролиза и периодатной дегградации можно сделать вывод, что олигосахаридная цепь главного сиалогликолипида морского ежа *St. intermedius* обладает линейной структурой, содержащей два остатка глюкопиранозы и два остатка сиаловой кислоты, оба глюкопиранозных остатка имеют гликозидную связь по 6 гидроксилу, один из остатков сиаловой кислоты имеет замещение в 8 положении, а другой, по-видимому, является концевым.

Олигосахаридная цепь связана гликозидной связью с первичным гидроксилом фитосфингозина. Моносахаридным остатком, связанным с фитосфингозином, является глюкопираноза. Гликозидная связь второго моносахаридного остатка с этой глюкозой более лабильна в условиях кислотного гидролиза, чем обычная гликозидная связь между двумя остатками глюкопиранозы. Исходя из моносахаридного состава и линейности олигосахаридной цепи, вторым моносахаридным остатком может быть либо сиаловая кислота (структура I), либо глюкопираноза (структура II). В первом случае становится понятной повышенная кислотоста-

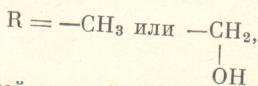
бильность связи. Во втором случае остается предположить, что гликозидная связь между двумя остатками глюкопиранозы ослаблена присутствием двух остатков сиаловой кислоты, связанных со вторым остатком глюкопиранозы.



Структура I



Структура II



R' — радикал высшей жирной кислоты, $n = 11, 13, 15$ или 19 .

Из двух приведенных структур сиалогликолипида более предпочтительной кажется структура I, однако для окончательного решения вопроса о структуре необходимы дополнительные эксперименты по частичному кислотному гидролизу с анализом получающихся фрагментов.

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

Поступило
18 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. К. Кочетков, И. Г. Жукова и др., ДАН, 177, 1472 (1967). ² Н. К. Кочетков, И. Г. Жукова, Г. П. Смирнова, ДАН, 180, 998 (1968). ³ И. Г. Жукова, Г. П. Смирнова, и др., ДАН, 192, № 3 (1970). ⁴ G. A. Johnson, R. H. McCluer, Biochim. et biophys. acta, 84, 587 (1964). ⁵ I. G. Zhukova, G. P. Sмирнова, Carbohydr. Res., 9, 366 (1969). ⁶ L. Svennerholm, Acta chem. scand., 12, 547 (1958). ⁷ R. Kuhn, A. Gauche, Chem. Ber., 98, 395 (1965). ⁸ R. G. Spiro, J. Biol. Chem., 239, 567 (1964). ⁹ S. Nakomori, J. Biochem., 55, 205 (1964). ¹⁰ R. Kuhn, H. Wiegand, Chem. Ber., 96, 866 (1963).