



УДК 547.952:577.115.4

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДЫ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ  
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

*Ироказова Н. В., Кочаров С. Л., Исаев И. В.,  
Фомина-Агеева Е. В., Шапошникова Г. И., Садовская В. Л.,  
Розынов Б. В., Бергельсон Л. Д.*

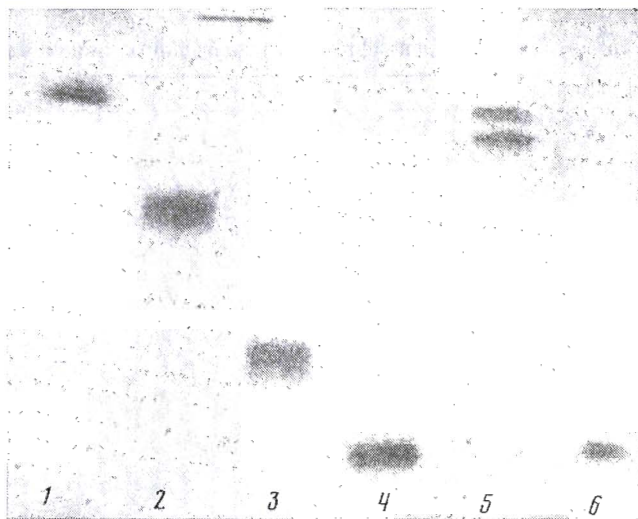
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Изучена структура основных нейтральных гликосфинголипидов клеток асцитной карциномы Эрлиха. Выяснено, что основными четырьмя компонентами являются глюкозилцерамид, лактозилцерамид, *N*-ацетилгалактозаминиллактозилцерамид и галактозил-*N*-ацетилгалактозаминиллактозилцерамид. Изучена зависимость содержания указанных гликосфинголипидов от плотности клеточной популяции. Высказаны предположения о связи зависящих от плотности изменений состава нейтральных гликофинголипидов и ганглиозидов.

Ранее нами был установлен ганглиозидный состав клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и его изменение в зависимости от плотности клеточной популяции при инкубации этих клеток в суспензиях с различной концентрацией клеток [1]. Поскольку найденные изменения состояли в усиленном биосинтезе высших ганглиозидов ( $G_{M1}$ ,  $G_{D1a}$ ) при постоянном содержании низших ( $G_{M2}$ ,  $G_{M3}$ ) при снижении плотности клеточной популяции, было интересно изучить структуру нейтральных гликофинголипидов клеток карциномы — возможных предшественников ганглиозидов.

Тонкослойная хроматография нейтральных гликофинголипидов показала, что клетки АКЭ содержат четыре компонента (см. рисунок). С помощью препаративной тонкослойной хроматографии гликофинголипиды были разделены на индивидуальные компоненты (I) — (IV). Гликофинголипиды обнаруживались антроновым реагентом, но не давали характерной окраски с резорциновым реагентом и реагентом на фосфор.

Результаты идентификации и количественного определения продуктов кислотного метанолиза показали, что гликофинголипиды (I) и (II) содержали только глюкозу и галактозу, а (III) и (IV) — наряду с этими сахарными остатками и галактозами (табл. 1). При установлении структуры нейтральных гликофинголипидов был использован масс-спектрометрический метод [2]. Масс-спектры перметилированных гликофинголипидов (табл. 2 и схема) содержали интенсивные пики ионов типа *a* с  $m/z$  219 и 187 для гликолипидов (I) и (II) и с  $m/z$  260 и 228 для гликолипида (III). Эти данные свидетельствуют о том, что гликофинголипиды (I) и (II) содержат концевую гексозу, а гликофинголипид (III) — концевой *N*-ацетилгексозамин. Кроме того, в масс-спектрах гликофинголипидов (II) и (III) имеются пики дисахаридных ионов типа *v*: в случае гликофинголипида (II) ион *v* соответствует дигексозильному остатку с  $m/z$  422, а в случае гликолипида (III) — гексозамингексозильному остатку с  $m/z$  464. В масс-спектре гликофинголипида (III) обнаружен также фрагмент типа *z* с  $m/z$  668, который соответствует трисахариду, построенному из остатка гексозамина и двух остатков гексоз. В масс-спектрах гликофинголипидов (I) — (III) наблюдаются ионы типа *d* и *e*, отражающие жирнокислотный состав этих гликофинголипидов, а также пики ионов с  $m/z$  364 и 253, характерные для  $C_{18}$ -сфингозина [2], и не обнаружены ионы, характерные для сфингозинов других типов. В масс-спектрах гликофинголипидов (I) и (II) имеются пики молекулярных ионов с  $m/z$  783, 895,



ТСХ нейтральных гликофинголипидов АКЭ (I) – (IV) (1–4 соответственно), цереброзидов мозга крупного рогатого скота (5) и асиало-G<sub>M1</sub> (6). Силикагель КСК (5 мкм), хлороформ – метанол – 2,5 н. NH<sub>4</sub>OH (65:35:8), проявление антроновым реагентом

893 и 987, 1015, 1071, 1096, 1098 соответственно. В масс-спектре гликофинголипида (III) пики молекулярных ионов отсутствуют.

Для установления мест замещения в углеводных остатках перметилированные гликолипиды (II) и (III) были превращены в ацетаты соответствующих полиолов, смесь которых анализировали с помощью комбинированного метода ГЖХ-масс-спектрометрии. Полученные масс-спектры позволили идентифицировать следующие ацетаты частично метилированных полиолов: 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилгексит и 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилгексит для гликофинголипида (II) и 2-(N-метилацетило)-2-дезоксид-1,5-ди-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилгексит и 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилгексит для гликолипида (III). Для гликофинголипида (IV) не удалось провести масс-спектрометрический анализ полностью метилированных производных ацетатов полиолов. О его структуре можно судить по соотношению компонентов (табл. 1) и хроматографическому поведению: при ТСХ на силикагеле (хроматографическая подвижность гликолипида (IV) совпадала с хроматографической подвижностью асиало-G<sub>M1</sub>, рисунок). При мягком кислотном гидролизе гликофинголипид (IV) наряду с другими продуктами деградации образовывал гликолипид, совпадающий по хроматографическому поведению с гликофинголипидом (III), т. е. с N-ацетилгалактозаминиллактозилцерамидом. Полученные данные позволяют заключить, что гликофинголипиды, выделенные из клеток АКЭ, представляют собой глюкозилцерамид (I), лактозилцерамид (II),

Таблица 1

Молярные соотношения компонентов молекул гликофинголипидов, выделенных из клеток АКЭ

Гликофинголипиды	Компоненты			
	сфингозин *	галактоза	глюкоза	N-ацетилгалактозамин
(I)	1,00	—	0,97	—
(II)	1,00	1,12	0,98	—
(III)	1,00	1,15	1,12	1,11
(IV)	1,00	1,82	0,95	1,29

\* Определяли колориметрически с точностью ±10%. Остальные компоненты определяли с помощью ГЖХ триметилсилильных производных метилгликозидов, точность метода ±5%.

## Масс-спектрометрическая идентификация гликофинголипидов клеток АКЭ

Тип иона	Гликофинголипиды					
	I		II		III	
	<i>m/z</i>	<i>J</i> <sub>отн</sub> , %	<i>m/z</i>	<i>J</i> <sub>отн</sub> , %	<i>m/z</i>	<i>J</i> <sub>отн</sub> , %
<i>a</i>	219	14	219	37	260	100
<i>a</i> - 32	187	100	187	100	228	57
<i>б</i>						
C <sub>16:0</sub>	530	20	734	23	—	—
C <sub>18:0</sub>	558	3	762	1	—	—
C <sub>22:0</sub>	614	14	818	3	—	—
C <sub>24:0</sub>	642	22	846	2	—	—
C <sub>24:1</sub>	640	17	844	2	—	—
C <sub>24:2</sub>	638	7	—	—	—	—
<i>в</i>	—	—	422	5	464	4
<i>з</i>	—	—	—	—	668	0,5
<i>з</i> - 32	—	—	—	—	636	0,5
<i>д</i> - 1						
C <sub>16:0</sub>	312	26	312	35	312	5
C <sub>18:0</sub>	340	2	340	2,5	340	0,5
C <sub>22:0</sub>	396	16	396	6	396	2
C <sub>24:0</sub>	424	28	424	5	424	1
C <sub>24:1</sub>	422	22	422	6	422	1
C <sub>24:2</sub>	420	8	—	—	—	—
<i>е</i>						
C <sub>16:0</sub>	548	8	548	50	548	8
C <sub>18:0</sub>	576	2	576	4	576	0,5
C <sub>22:0</sub>	632	4	632	5	632	2
C <sub>24:0</sub>	660	6	660	5	660	1
C <sub>24:1</sub>	658	6	658	5	658	1
C <sub>24:2</sub>	656	4	—	—	—	—
C <sub>18</sub> -сфингозин	364, 253	3, 10	364, 253	3, 12	364, 253	5, 11
<i>М</i>						
C <sub>16:0</sub>	783	0,1	987	0,1	—	—
C <sub>18:0</sub>	—	—	1015	0,01	—	—
C <sub>22:0</sub>	—	—	1071	0,05	—	—
C <sub>24:0</sub>	895	0,2	1096	0,05	—	—
C <sub>24:1</sub>	893	0,2	1098	0,04	—	—
C <sub>24:2</sub>	891	0,2	—	—	—	—

Таблица 3

## Соотношение компонентов нейтральных гликофинголипидов клеток АКЭ \*

Гликофинголипиды	Содержание гликофинголипида			
	% **	нмоль/мг белка **	% ***	нмоль/мг белка ***
Глюкозилцерамид (I)	17,4	0,129	20,7	0,139
Лактозилцерамид (II)	22,8	0,168	28,2	0,189
Асиало-G <sub>M2</sub> (III)	20,6	0,152	25,7	0,172
Асиало-G <sub>M1</sub> (IV)	39,1	0,289	25,2	0,169

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

\*\* Плотность суспензии клеток при инкубации —  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл.

\*\*\* Плотность суспензии клеток при инкубации —  $3 \cdot 10^6$  клеток/мл.

N-ацетилгалактозаминиллактозилцерамид (III), а гликофинголипид (IV) — вероятнее всего, галактозил-N-ацетилгалактозаминиллактозилцерамид. Все гликофинголипиды содержат C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>22:0</sub>, C<sub>24:0</sub>, C<sub>24:1</sub>-жирные кислоты.

Для выяснения зависимости состава нейтральных гликофинголипидов АКЭ от плотности клеточной популяции нами проведено изучение содер-

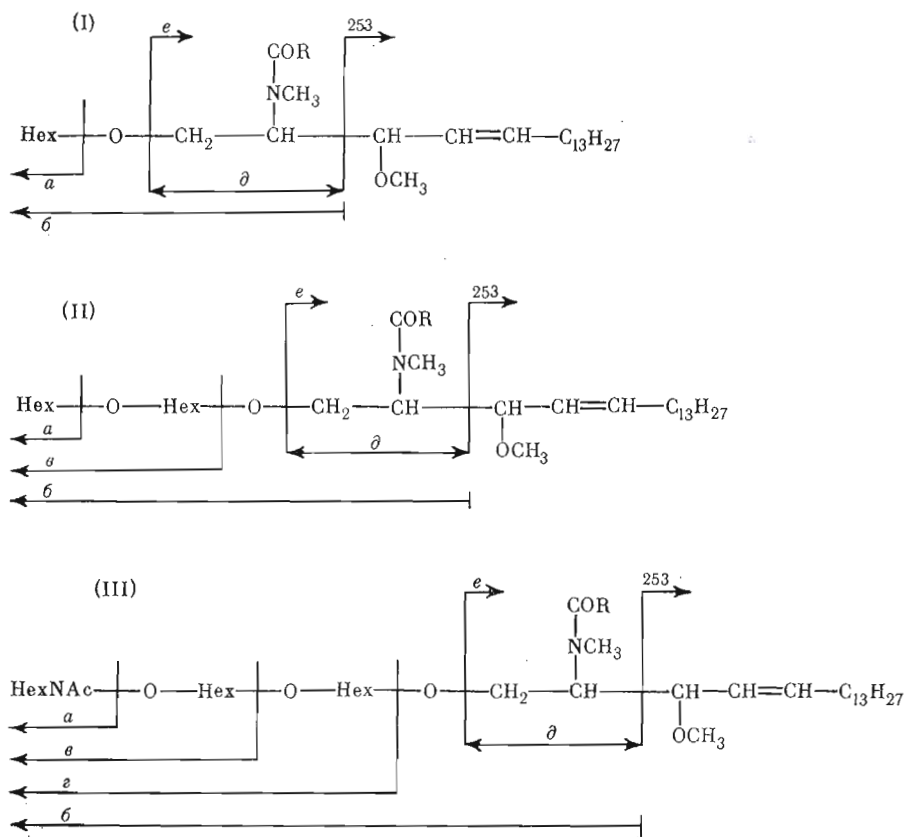


Схема фрагментации нейтральных гликоэфинголипидов (I) – (III). Нех – остаток гексозы

жания этих гликолипидов в клетках, инкубированных в течение 1 ч при нативной ( $10^8$  клеток/мл) и уменьшенной ( $10^6$  клеток/мл) концентрации. Полученные результаты (табл. 3) показали, что относительное содержание отдельных компонентов гликоэфинголипидов менялось существенным образом. Процентное содержание гликоэфинголипида (IV) снизилось в 1,5 раза, тогда как относительное содержание других компонентов практически не изменялось. Поскольку гликоэфинголипид (IV) является потенциальным предшественником  $G_{M1}$ , содержание которого сильно возрастает при инкубации клеток в суспензии с уменьшенной концентрацией по сравнению с клетками, инкубированными при нативной концентрации [1], можно предположить, что инкубация разведенных клеточных суспензий сопровождается увеличением активности салилтрансферазы, осуществляющей превращение гликоэфинголипида (IV) в ганглиозид  $G_{M1}$ .

### Экспериментальная часть

Для исследования использовали клетки АКЭ мышей-самцов гибридов СВАхС57 ВL/6F весом 18–22 г. Через 7 сут после перевивки АКЭ животных умерщвляли и из брюшной полости извлекали асцитную опухоль. Клетки осаждали центрифугированием при 500 об/мин в течение 10 мин, трижды промывали физиологическим раствором. Экстракцию проводили по методу [3]. Нейтральные гликоэфинголипиды выделяли по методу [4, 5]. Суммарные липиды подвергали щелочному дезацилированию 0,1 н. КОН в 98% метаноле при  $40^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, реакционную смесь нейтрализовали 0,35 н. уксусной кислотой, упаривали досуха, остаток растворяли в небольшом объеме смеси хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4) и диализовали через целлофановую мембрану против дистиллированной воды при  $4^\circ\text{C}$  в течение 1 сут. Содержимое диализного мешка упаривали до-



суха, ацетилювали и хроматографували на колонке с флоризилом (60–100 меш, Мерск, ФРГ) по методу [4]. Ацетилюваніе гликофінголіпиды дезацетилювали обробкою 0,1 н. метилом натрія в метанолі і виділяли по методу [4]. Нейтральніе гликофінголіпиды отделяли от гангліозидов хроматографіею на DEAE-сефадексе А-25 (40–100 меш, Pharmacia, Швеція) по методу [5].

Цереброзиды мозга крупного рогатого скота выделяли по методу [6]. Лактозилцерамид и асиало- $G_{M1}$  получали мягким кислотным гидролизом гематозида печени крупного рогатого скота и  $G_{M1}$  мозга крупного рогатого скота соответственно и очищали препаративной ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4).

Аналитическую хроматографию гликофінголіпидов проводили на пластинках (6×6 см) с силикагелем КСК (5–7 мкм) в системе хлороформ – метанол – 2,5 н.  $NH_4OH$  (60 : 35 : 8), хроматограммы проявляли антроновым реагентом. Препаративную хроматографию гликофінголіпидов проводили на пластинках (13×18 см, толщина слоя 0,5 мм) с силикагелем КСК (200 меш) в указанной выше системе при двукратном проявлении хроматограмм, зоны обнаруживали водой. Гликофінголіпиды элюировали смесью хлороформ – метанол – вода (50 : 50 : 15). Количественное определение гликофінголіпидов проводили по методу [7].

Количественный и качественный анализ углеводов в виде триметилсилиловых эфиров метилгликозидов осуществляли методом ГЖХ на хроматографе Pye-Uniscam (Англия), оборудованном колонкой (1800×4 мм) с 1,5% OV-1 на хромосорбе G (80–100 меш), при программировании температуры от 150 до 300°С (6°С/мин). В качестве внутреннего стандарта использовали маннит [8].

Количественный анализ сфингозиновых оснований, образовавшихся при гидролизе гликофінголіпидов, проводили по методу [9]: к раствору комплекса сфингозина с метилоранжем в этилацетате добавляли 1 мл 1 н. серной кислоты и встряхивали. Измеряли оптическую плотность нижней фазы при 515 нм ( $l$  1 см). Количество сфингозина определяли по калибровочной кривой, построенной по цереброзидам мозга крупного рогатого скота; средний молекулярный вес 854.

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

Мягкий кислотный гидролиз гликофінголіпида (IV) проводили по методу [10]: гликофінголіпид в количестве 1,5 мкмоль (по сфингозину) 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 цереброзиды мозга, лактозилцерамид и гликолипид (III).

Метилирование 0,5–3 мг гликофінголіпидов проводили по методу Хакомори [11]. Метилированные гликофінголіпиды выделяли по методу [12]. Масс-спектры метилированных гликофінголіпидов получали на масс-спектрометре CN-5 Varian MAT при температуре испарения 300°С и ионизирующем напряжении 70 эВ.

Частично метилированные полиолы получали по методу [12] гидролизом полностью метилированных гликофінголіпидов с последующим восстановлением альдегидной группы. Полиолы ацетилювали 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.

Для изучения изменения гликофінголіпидного состава в зависимости от плотности клеточной популяции клетки, промытые как описано выше, 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 две части, одну из которых разбавляли культуральной средой в 30 раз. Полученные суспензии инкубировали в течение 2 ч при 37° С при постоянном перемешивании. Жизнеспособность клеток проверяли по их способности к белковому синтезу. Включение <sup>14</sup>С-лейцина во фракции, нерастворимые в горячей трихлоруксусной кислоте, было одинаковым у инкубированных и исходных клеток. Затем клетки осаждали центрифугированием и промывали, как описано выше. Количественное определение гликофинголипидов по фракциям проводили по методу [7].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Проказова Н. В., Кочаров С. Л., Фомина-Агеева Е. В., Садовская В. Л., Розынов Б. В., Волгин Ю. В., Бергельсон Л. Д. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 404—412.
2. Karlsson K.-A., Pasher J., Samuelsson B. C. Chem. Phys. Lipids. 1974, v. 12, № 2, p. 271—286.
3. Dyatlovitskaya E. V. Lipid biomedical preparation / Ed. Bergelson L. D. Amsterdam — Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 244.
4. Saito T., Nakomori S.-I. J. Lipid Res., 1971, v. 12, № 3, p. 257—259.
5. Yu R. K., Ledeen R. W. J. Lipid Res., 1972, v. 13, № 5, p. 680—686.
6. Dyatlovitskaya E. V., Bergelson L. D. Lipid biomedical preparation / Ed. Bergelson L. D. Amsterdam — Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 233—235.
7. Дятловицкая Э. В., Голованова Н. К., Волгин Ю. В., Азизов Ю. М., Иткин Б. З., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 1981, т. 46, с. № 11, с. 2004—2010.
8. Свилей Ч. К., Тао Р. В. Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975, с. 13—17.
9. Oulevey J., Bodden E., Thiele O. W. Eur. J. Biochem., 1977, v. 79, p. 265—267.
10. Rauvala H. FEBS Lett., 1976, v. 62, № 1, p. 161—164.
11. Nakomori S.-I. J. Biochem., 1964, v. 55, № 1, p. 205—208.
12. Stoffel W., Hanfland P. Hoppe-Seyler's Physiol. Chem., 1973, B. 35, № 1, S. 21—31.

Поступила в редакцию  
8.VII.1983

#### NEUTRAL GLYCOSPHINGOLIPIDS OF THE EHRlich ASCITE CARCINOMA CELLS

PROKAZOVA N. V., KOCHAROV S. L., ISAEV I. V.,  
FOMINA-AGEEVA E. V., SHAPOSHNIKOVA G. I., SADOVSKAYA V. L.,  
ROSYNOV B. V., BERGELSON L. D.

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

The structure of the neutral glycosphingolipids of the Ehrlich ascite carcinoma (EAC) cells was studied. The main four components were identified as glycosylceramide, lactosylceramide, N-acetylgalactosyllactosylceramide and galactosyl-N-acetyllactosylceramide (asialo-G<sub>M1</sub>). The neutral glycolipid pattern of the cells was found to depend on their density. Dilution of the cell suspension resulted in an increased content of asialo-G<sub>M1</sub>, whereas the content of the other neutral glycolipids remained unchanged. The possible connection between these changes and the earlier disclosed cell density dependence of the gangliosides in EAC cells is discussed.