



УДК 577.115.5+593.96-143.62.088

ГАНГЛИОЗИД С N-АЦЕТИЛНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, РАСПОЛОЖЕННОЙ ВНУТРИ УГЛЕВОДНОЙ ЦЕПИ, ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *Leptychaster anomalus*

© 1997 г. Г. П. Смирнова[#], Н. В. ЧекареваИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
117913, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 27.09.96 г. Принята к печати 29.10.96 г.

Из морской звезды *Leptychaster anomalus* выделен ганглиозид, структура которого установлена с помощью химических и физико-химических методов. Показано, что он является моносиалоганглиозидом, содержащим тетрасахаридную углеводную цепочку, в которой N-ацетилнейраминовая кислота занимает субтерминальное положение и гликозилирована в положение 4 концевым остатком галактопиранозы: Gal α 1-4Neu5Ac α 2-3Gal α 1-4Glc α 1-1Cer. В состав липидной части входят незамещенные высшие жирные кислоты (главным образом пальмитиновая и стеариновая кислоты и их монопредельные производные) и α -гидрокси-C₁₈: ω -кислота, а также сфингозины, среди которых преобладают соединения, содержащие 20 и 22 углеродных атома.

Ключевые слова: ганглиозиды, морская звезда, *Leptychaster anomalus*, N-ацетилнейраминовая кислота.

Ранее было показано, что олигосахаридные цепи ганглиозидов морских звезд в отличие от олигосахаридных цепей ганглиозидов морских ежей не имеют общего типа структуры, характерного для этого класса иглокожих [1–3]. Наибольшие различия в структуре встречаются в ганглиозидах морских звезд, относящихся к разным отрядам, т.е. таксономически наиболее далеких. Самым существенным различием, на наш взгляд, является положение сиаловой кислоты в углеводной цепи ганглиозида. Так, если в ганглиозидах морских звезд эволюционно относительно молодого отряда Педицелляриевых, как и в ганглиозидах позвоночных, сиаловые кислоты находятся на конце углеводной цепи в виде единичного остатка или цепочки из двух или трех остатков, то в ганглиозидах морских звезд двух других более древних отрядов – Игольчатых и Явнопластинчатых – обнаружены сиаловые кислоты, расположенные внутри углеводной цепи и гликозилированные в положение 4 остатком галактозы [4–9] или даже находящиеся в узле разветвления и замещенные в положении 4 и 8 [9]. Поскольку такая особенность строения олигосахаридных цепей показана пока только на примере трех изученных к настоящему времени видов морских звезд, два из которых относятся к отряду Игольчатых и один – к отряду Явнопластинчатых, мы продолжили исследование

этих животных с целью выяснить, является ли такая структурная особенность характерной для ганглиозидов морских звезд этих отрядов. В настоящей работе приведены данные по структуре ганглиозида морской звезды *Leptychaster anomalus* отряда Явнопластинчатых.

Препарат полярных гликолипидов, полученный из общего липидного экстракта животных, по данным ТСХ, содержал ганглиозид, нейтральные гликолипиды, фосфолипиды и пигменты. Ганглиозид был выделен из смеси ионообменной колонной хроматографией на DEAE-целлюлозе в зоне, характерной для моносиалогликолипидов.

Для определения структуры углеводной цепи ганглиозида использовали частичный и полный кислотный гидролиз, метилирование, метанолиз и окисление хромовым ангидридом, для определения состава липидной части использовали метанолиз и периодат-перманганатное окисление.

После полного кислотного гидролиза ганглиозида обнаружены глюкоза и галактоза в соотношении 1 : 2, а также значительное количество глицерина, присутствие которого можно объяснить тем, что полученный препарат ганглиозида, по-видимому, содержит глицериды. Для освобождения от глицеридов ганглиозидный препарат подвергли мягкой щелочной обработке, которая не вызывает деструкции ганглиозида: по данным ТСХ, после такой обработки полярности ганглиозида и сиалосодержащего фрагмента, образующегося при частичном кислотном гидролизе ган-

Сокращение: Cer – церамид.

[#] Автор для переписки.

глиозида, не изменились. Очищенный ганглиозид был выделен из реакционной смеси после диализа с помощью препаративной ТСХ.

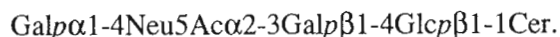
При частичном кислотном гидролизе ганглиозида в условиях расщепления кетозидных связей сиаловых кислот образовались два соединения — нейтральный гликолипид и кислый олигосахаридный фрагмент, содержащий сиаловую кислоту, которые были разделены с помощью диализа. Нейтральный гликолипид при ТСХ имел подвижность дигексозилцерамида и содержал глюкозу и галактозу в соотношении 1 : 1. Анализ с помощью ГЖХ метилированных метилгликозидов, полученных после метанолиза метилированного дигексозилцерамида, показал, что оба моносахарида находятся в пиранозной форме, галактоза является концевой, а глюкоза замещена в положение 4. При окислении ацетилированного производного дигексозилцерамида CrO_3 оба моносахарида разрушились практически полностью, что указывает на β -конфигурацию их гликозидных связей. Следовательно, в ганглиозиде начальным участком углеводной цепи, связанным со сфингозиновым основанием, является лактоза. Сиалосодержащий фрагмент при ТСХ имел несколько меньшую подвижность, чем N-ацетилнейраминовая кислота ($R_{\text{Neu5Ac}} 0.7$), и содержал N-ацетилнейраминовую кислоту и галактозу в соотношении 1 : 1.

Для определения мест замещения моносахаридов в ганглиозиде использовали тридегтерометилирование. Анализ с помощью ГЖХ тридегтерометилированных производных метилгликозидов глюкозы и галактозы, образующихся при метанолизе тридегтерометилированного ганглиозида, показал, что остаток глюкозы замещен в положение 4, один из остатков галактозы — в положение 3, а второй является концевым. Тридегтерометилированное производное сиаловой кислоты после ацетилирования по времени удерживания при ГЖХ и масс-спектру соответствовало метиловому эфиру метилкетозида 4-O-ацетил-7,8,9-три-O-тридегтерометил-N-тридегтерометил-N-ацетилнейраминовой кислоты. Масс-спектр содержал характеристические пики ионов с m/z 416 ($M^{*+} - \text{OCH}_3$), 399 ($M^{*+} - \text{CH}_2\text{OCD}_3$), 388 ($M^{*+} - \text{COOCH}_3$), 352 ($M^{*+} - \text{CHOC}_3 - \text{CH}_2\text{OCD}_3$), 160 (фрагмент C4–C5). Отсюда следует, что остаток N-ацетилнейраминовой кислоты расположен внутри углеводной цепи и замещен остатком галактозы в положение 4 [10].

Определить конфигурацию гликозидной связи концевого остатка галактозы мы попытались с помощью окисления ганглиозида хромовым ангидридом. Ранее было показано, что использование этого метода для анализа гликолипидов, в состав которых входят углеводные остатки, присоединенные кислотолabile связями, нецелесо-

образно, так как отщепление этих остатков в процессе окисления, протекающего в уксусной кислоте, приводит к появлению свободных гидроксильных групп у остатков сахаров, к которым они были присоединены, и далее эти остатки разрушаются в условиях окисления вне зависимости от конфигурации их гликозидных связей [11]. Однако этот метод был использован при исследовании ганглиозидов для определения конфигурации гликозидных связей остатков нейтральных сахаров, не гликозилированных сиаловыми кислотами, в том числе остатков галактозы, гликозилирующих сиаловые кислоты [6, 9]. При окислении ацетилированного производного ганглиозида *L. anomalous* ангидридом хромовой кислоты оба остатка галактозы разрушились, поэтому был сделан вывод, что концевой остаток галактозы присоединен к N-ацетилнейраминовой кислоте β -гликозидной связью. Однако последующий анализ ганглиозида с помощью ^1H -ЯМР показал, что эта связь имеет α -конфигурацию, как и кетозидная связь N-ацетилнейраминовой кислоты*. Следовательно, в случае ганглиозидов метод окисления CrO_3 нельзя использовать и для определения конфигурации гликозидных связей сахаров, присоединенных к сиаловым кислотам. По-видимому, в условиях окисления происходит деструкция остатка сиаловой кислоты, сопровождающаяся отщеплением связанного с ней моносахарида и последующей его деградации.

Таким образом, приведенные результаты показывают, что углеводная цепь ганглиозида *L. anomalous* имеет структуру



Состав липидной части ганглиозида определен с помощью метанолиза и окисления сфингозинов смесью $\text{NaIO}_4\text{-KMnO}_4$. В продуктах метанолиза ганглиозида с помощью ТСХ были обнаружены метиловые эфиры высших жирных кислот (главным образом незамещенных) и сфингозины. Метиловые эфиры высших жирных кислот выделяли из метанолизата и после разделения с помощью ТСХ незамещенных и α -гидроксикислот и ацетилирования последних анализировали с помощью ГЖХ (табл. 1). Из таблицы видно, что состав кислот относительно невелик: около 80% незамещенных кислот составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты и их мононепределенные производные, а среди α -гидроксикислот обнаружена только α -гидроксистеариновая кислота.

Сфингозины, выделенные из метанолизата и очищенные с помощью ТСХ, обрабатывали смесью $\text{NaIO}_4\text{-KMnO}_4$ и полученные высшие жирные кислоты анализировали с помощью ГЖХ в виде

* Съемка и анализ спектров ^1H -ЯМР проведены в Университете Бонна (Германия); результаты исследования будут опубликованы позже.

Таблица 1. Состав высших жирных кислот ганглиозида морской звезды *Leptychaster anomalus*

Кислоты	Незамещенные*, % от суммы незамещенных кислот
C ₁₄ :0	7.6
C ₁₅ :0	6.5
C ₁₆ :1	8.5
C ₁₆ :0	34.8
C ₁₇ :0	2.5
C ₁₈ :1	21.3
C ₁₈ :0	18.8

* Кроме незамещенных кислот обнаружена α -гидрокси-C₁₈:0-кислота.

Таблица 2. Состав сфингозиновых оснований ганглиозида морской звезды *L. anomalus*

Кислоты*	Сфингозиновые основания	Содержание, % от суммы сфингозинов
C ₁₄ :0	C ₁₈ :1	11.5
C ₁₅ :0	C ₁₉ :1	5.2
C ₁₆ :0	C ₂₀ :1	49.0
C ₁₈ :0	C ₂₂ :1	23.6
C ₁₉ :0	C ₂₃ :1	8.2
C ₂₀ :0	C ₂₄ :1	2.5

* Получены при окислении сфингозинов смесью NaIO₄-KMnO₄ (см. "Экспер. часть").

метиловых эфиров (табл. 2). Анализ показал, что около 70% смеси составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты, т.е. главными компонентами сфингозиновых оснований являются сфингозины C₂₀ и C₂₂.

Таким образом, из морской звезды *L. anomalus* отряда Явнопластинчатых звезд выделен ганглиозид, в котором N-ацетилнейраминавая кислота расположена внутри углеводной цепи и гликозилирована по C4 концевой галактопиранозой. Этот ганглиозид по структуре олигосахаридной цепи похож на ганглиозид, выделенный нами ранее из другого представителя отряда Явнопластинчатых звезд – морской звезды *Luidia quinaria bispinosa*, где также имеется тетрасахаридная цепь, в которой N-ацетилнейраминавая кислота занимает субтерминальное положение и гликозилирована в положении 4 концевой галактопиранозой, однако там N-ацетилнейраминавая кислота имеет O-метильную группу у C8 [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Морские звезды *L. anomalus* (450 г) собраны в Охотском море у берегов Камчатки в августе–

сентябре, лиофилизированы и измельчены. Липидный экстракт и препарат полярных липидов получали как описано ранее [10]. В работе использовали N-ацетилнейраминавую кислоту (Koch-Light, Англия). Хлороформ и метанол перед использованием перегоняли.

Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле 60 Н (Merck, Германия). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов – хлороформ–метанол–вода (6 : 4 : 1) и хлороформ–метанол–2 н. NH₄OH (60 : 35 : 8), обнаружение резорциновым [12] и орциновым [13] реактивами; для нейтральных гликолипидов – хлороформ–метанол–вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот – пропанол–вода–2 н. NH₄OH (6 : 2 : 1) и пропанол–вода (7 : 3), обнаружение резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований – хлороформ–метанол–2 н. NH₄OH (40 : 10 : 1), обнаружение 0.2% раствором нингидрина в ацетоне; для метилированных и тридейтерометилированных производных гликолипидов – хлороформ–метанол (24 : 1), обнаружение орциновым реактивом; для метиловых эфиров высших жирных кислот – хлороформ, обнаружение раствором бромтимолового синего и H₂SO₄.

ГЖХ выполняли на приборе фирмы Hewlett-Packard 5890 (США) на капиллярной колонке (15 м) Ultra-1 при 200–290°C (10°C/мин). Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов гекситов, сиаловую кислоту – в виде ацетата частично тридейтерометилированного метилового эфира метилкетозида, высшие жирные кислоты – в виде метиловых эфиров незамещенных и ОСD₃- и ОAc-производных α -гидроксикислот. Метилированные и тридейтерометилированные метилгликозиды нейтральных сахаров анализировали на приборе Pye Unicam (Англия) на колонке с 3% NGA на диатомите С при 190°C.

ГЖХ-масс-спектрометрический анализ ацетата частично тридейтерометилированного метилового эфира метилкетозида сиаловой кислоты и метиловых эфиров высших жирных кислот проводили на приборе Varian MAT 111 (Германия), снабженном колонкой с 3% OV-1 на диатомите С при ионизирующем напряжении 70 эВ.

Аналитические методы: сиаловую кислоту количественно определяли с резорциновым реактивом [14, 15], гексозы – в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит.

Колоночную хроматографию полярных липидов на DEAE-целлюлозе (ацетатная форма) проводили как описано ранее [16, 17]. Ганглиозид элюировали 0.025 М раствором ацетата аммония в метаноле и очищали препаративной ТСХ. Из 1.23 г полярных липидов получено 24 мг препарата

ганглиозида, содержащего 4.03 мкмоль сиаловой кислоты.

Мягкий щелочной гидролиз ганглиозидного препарата проводили 0.1 М NaOH в метаноле при 40°C в течение 3 ч [18]. Метанол упаривали без нагревания при пониженном давлении, остаток растворяли в воде и диализовали против дистиллированной воды. Раствор, находящийся в диализной трубке, лиофилизовали и анализировали ТСХ, ганглиозид выделяли препаративной ТСХ. Препараты ганглиозидов до и после мягкой щелочной обработки имеют одинаковую хроматографическую подвижность.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов проводили 2 М водной HCl при 100°C в течение 4 ч и обрабатывали как описано ранее [16]. Полученные ацетаты гекситов анализировали ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозида проводили 0.05 М H₂SO₄ при 80°C в течение 2 ч. Реакционную смесь диализовали 1 сут против дистиллированной воды. Раствор, находящийся в диализной трубке, лиофилизовали и анализировали ТСХ, нейтральный гликолипид выделяли препаративной ТСХ и определяли его моносахаридный состав после полного кислотного гидролиза. Внешний водный слой концентрировали до 5–7 мл и выделяли сиалосодержащий фрагмент на колонке с дауэксом 2 × 8 (ацетатная форма) элюцией 1 М ацетатным буфером, pH 4.6 [14]. Кислый элюат деионизировали на колонке с амберлитом IR-120(H⁺), упаривали, лиофилизовали и анализировали ТСХ. Сиаловую кислоту определяли количественно с резорциновым реактивом без предварительного гидролиза, а нейтральный моносахарид – с помощью ГЖХ после полного кислотного гидролиза фрагмента.

Метилирование дигексозилцерамида и **тридейтерометилирование** ганглиозида проводили в диметилсульфоксиде в присутствии порошкообразного NaOH при комнатной температуре [19]. Метилированные и тридейтерометилированные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды, очищали препаративной ТСХ и подвергали метанолизу 0.5 М HCl в метаноле при 80°C в течение 16 ч. Метилловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном и анализировали ТСХ. Метилловые эфиры незамещенных и α-тридейтерометоксикислот выделяли препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ и ГЖХ-МС. Частично метилированные и тридейтерометилированные метилглюкозиды и метилгалактозиды анализировали ГЖХ. Продукты метанолиза ацетилювали смесью уксусный ангидрид–пиридин (1 : 1) 2 ч при 100°C и полученное производное сиаловой кислоты анализировали с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии.

Полный кислотный метанолиз ганглиозида проводили 1 М HCl в метаноле при 80°C в течение 16 ч. К реакционной смеси добавляли равный объем воды, метилловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном, выделяли ТСХ и анализировали ГЖХ и ГЖХ-МС, метилловые эфиры α-гидроксикислот предварительно ацетилювали. Оставшийся метанольный раствор подщелачивали 4 н. КОН в 90% метаноле, сфингозиновые основания экстрагировали эфиром, эфирный экстракт промывали водой до нейтральной реакции промывной воды и анализировали ТСХ. Сфингозиновые основания выделяли препаративной ТСХ и окисляли смесью NaIO₄–KMnO₄, как описано в работе [20]. Полученные высшие жирные кислоты подвергали метанолизу, метилловые эфиры кислот экстрагировали гексаном и анализировали ГЖХ.

Окисление хромовым ангидридом дигексозилцерамида и ганглиозида проводили по методу [11]. Ацетилюрованные производные гликолипидов обрабатывали CrO₃ в смеси CH₃COOH–(CH₃CO)₂O (9 : 1) 45 мин при 40°C, продукты реакции подвергали ацетолузу, гидролизу, последующему восстановлению KBH₄ и ацетилюванию. Ацетаты сорбита и дульцита анализировали ГЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N.K., Smirnova G.P. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1986. V. 44. P. 387–438.
2. Смирнова Г.П. // Прогресс химии углеводов / Ред. И.В. Торгов. М.: Наука, 1985. С. 126–148.
3. Смирнова Г.П. // Биология моря. 1987. С. 3–11.
4. Kochetkov N.K., Smirnova G.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 759. P. 192–198.
5. Smirnova G.P., Kochetkov N.K. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 618. P. 486–495.
6. Смирнова Г.П., Кочетков Н.К. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 1650–1655.
7. Kawano Y., Higuchi R., Komori T. // Liebigs Ann. Chem. 1990. V. 1. P. 43–50.
8. Peter-Katalinic J., Smirnova G.P., Kochetkov N.K., Egge H. // Mass Spectrometry of Large Non-volatile Molecules for Marine Organic Chemistry. Proc. Int. Workshop on PDMS and Marine Org. Chem. / Eds E.R. Hilf, W. Tuszynski, 1989. P. 222–231.
9. Sugita M. // J. Biochem. 1979. V. 86. P. 765–772.
10. Смирнова Г.П. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 830–838.
11. Laine G., Renkonen O.J. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. P. 102–106.
12. Svennerholm L. // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 24. P. 604–611.
13. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Svetashev V.I., Zhukova I.G., Smirnova G.P. // Comp. Biochem. Physiol. 1970. V. 34. P. 163–177.
14. Svennerholm L. // Acta Chem. Scand. 1958. V. 12. P. 547–554.

15. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. // Acta Chem. Scand. 1959. V. 13. P. 856–858.
16. Чекарева Н.В., Смирнова Г.П., Садовская В.Л. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 62–67.
17. Winterbjurn C.C. // J. Neurochem. 1971. V. 18. P. 1153–1155.
18. Ledeen R.W., Yu R.K. // Methods Enzymol. 1982. V. 83. P. 139–191.
19. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. P. 209–217.
20. Weiss B. // Lipid Chromatographic Analysis. V. 2 / Ed. G.V. Marinetti. New York; Basel: Varcel Dekker, 1976. P. 701–712.

A Ganglioside from Starfish *Leptychaster anomalus* with Subterminal *N*-Acetylneuraminic Acid Residue

G. P. Smirnova and N. V. Chekareva

*Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 117913 Russia*

Abstract—From starfish *Leptychaster anomalus*, a ganglioside was isolated, and its structure was elucidated by chemical and physicochemical methods. The ganglioside was found to be a monosialoganglioside with a tetrasaccharide chain in which the *N*-acetylneuraminic acid residue occupies the subterminal position and is glycosylated with the terminal galactopyranose residue at the position 4: Gal α 1-4Neu5Ac α 2-3Gal α 1-4Glc α 1-1Cer. The lipid part of the ganglioside contains unsubstituted fatty acids (mainly palmitic and stearic acids and their monounsaturated derivatives), an α -hydroxy-C_{18:0} acid, and sphingosines (predominantly C₂₀ and C₂₂).

Key words: ganglioside, starfish, *Leptychaster anomalus*, *N*-acetylneuraminic acid