

УДК 547.952 : 547.9

ГЛИКОСФИНГОЛИПИДЫ: УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ, СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

А. Я. Вейнберг, Л. А. Вакулова и Г. И. Самохвалов

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Номенклатура	2072
II. Строение и распространение	2073
1. Сфингозины	2073
2. Цереброзиды	2075
3. Сульфатиды	2076
4. Церамид-олигогексозиды	2077
5. Глобозиды	2077
6. Гематозиды	2078
7. Ганглиозиды	2078
III. Синтетические исследования	2081
1. Синтез дигидросфингозина	2081
2. Синтез сфингозина	2085
3. Пути синтеза гликосфинголипидов	2089
4. Синтез цереброзидов и психозина	2091
5. Синтез цитолипина Н	2093
IV. Биологические свойства	2093
1. Иммунологические свойства	2093
2. Биологическая активность сфингозина и цереброзидов	2095
3. Нейрофизиологическая роль ганглиозидов	2096

Настоящий обзор рассматривает группу соединений класса липидов, которая объединяется собирательным названием — гликосфинголипиды. Эти соединения, помимо структурного подобия, отличаются также, по крайней мере, одним свойством — способностью принимать участие в специфических иммунологических реакциях, изучение которых может дать новый подход к пониманию тонких различий в строении тканей животных и человека в нормальном и патологическом состояниях.

I. НОМЕНКЛАТУРА

Термин «сфинголипиды» был предложен Картером¹ для обозначения тех липидов, которые содержат алифатический аминокликоль сфингозин (I). Теперь термин этот можно распространить также на природные производные дигидросфингозина (II), C₂₀-сфингозина (III) и C₂₀-дигидросфингозина (IV), обнаруженные наряду с производными сфингозина (I) в тканях животного происхождения, а также соединения фитосфингозина (V) и дегидрофитосфингозина (VI) и их C₂₀-гомологи, выделенные из растений.

Термином «гликосфинголипиды» будем называть группу сфинголипидов, которые кроме сфингозинов (I—VI) содержат также углеводы.

В настоящем обзоре рассматриваются гликофинголипиды животного происхождения, т. е. производные в основном сфингозинов (I—IV) * (схема 1).

Простейшие представители этой группы — цереброзиды (VII) — являются моногликозидами N-ацилсфингозинов (церамидов).

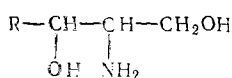
Сульфатиды или цереброзид-сульфаты (VIII) — сернокислотные эфиры цереброзидов.

Церамид-олигогексозиды (IX) — производные церамидов, в состав которых входят олигосахариды, содержащие простые гексозы. Дисахариды церамидов предложено называть также цитозидами.

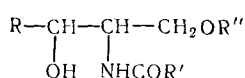
Глобозиды (X) — гетероолигосахариды церамидов, содержащие кроме простейших моноз также гексозамины, а если в состав гетероолигосахаридов вместо гексозаминов входят сиаловые кислоты (XI), их называют «гематозидами» (XII).

Сиаловые кислоты (XI) — это групповое название всех ацилированных нейраминных кислот³, представляющих собой как бы продукты альдольной конденсации N-ацилманнозамина и пировиноградной кислоты.

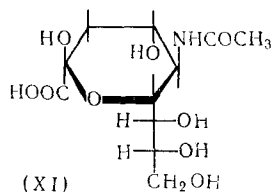
Ганглиозидами (XIII) принято называть производные сфингозина, содержащие жирные кислоты, монозы, гексозамины и сиаловые кислоты.



(I—VI)



(VII—X, XII, XIII)



(XI)

- I, R=CH₃(CH₂)₁₂CH=CH—
 II, R=CH₃(CH₂)₁₄—
 III, R=CH₃(CH₂)₁₄CH=CH—
 IV, R=CH₃(CH₂)₁₆—
 V, R=CH₃(CH₂)₁₃CH—
 |
 OH
 VI, R=CH₃(CH₂)₁₁CH=CHCH—
 |
 OH

- VII, R''=гексоза
 VIII, R''=гексоза—SO₃H
 IX, R''=олигосахарид
 X, R''=олигосахарид-гексозамины
 XII, R''=олигосахарид—сиаловые кислоты
 XIII, R''=олигосахарид—гексозамины—сиаловые кислоты
 R—как в соединениях I—VI
 R'—остаток жирной кислоты

II. СТРОЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ

1. Сфингозины

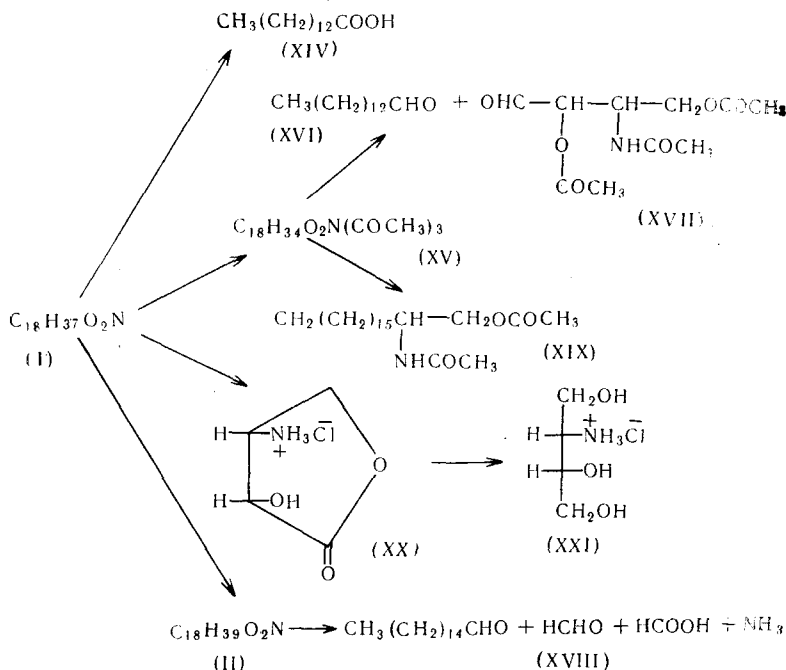
Сфингозин (I) впервые выделил из липидов мозга Тудикум⁴ в 1901 г. Вскоре было показано, что это аминокислот с двойной связью в 4—5 положении длинной углеводородной цепи^{5,6}.

Окислением сфингозина (I) хромовой кислотой получена миристиновая кислота (XIV)⁷, а озонлизом триацетилсфингозина (XV) — мири-

* Недавно Карлсон² впервые сообщил о существовании производных фитосфингозинов (V) в тканях животных и человека.

стиновый альдегид (XVI) и триацетиламинотетроза (XVII)⁸, строение которой установлено Картером^{9, 10} (схема 1).

СХЕМА 1



Для окисления дигидросфингозина (II) до пальмитинового альдегида (XVIII), формальдегида, аммиака и муравьиной кислоты требуется 2 моля иодной кислоты. При гидрировании триацетата (XV) в присутствии платины в результате гидрогенолиза 3-ацетоксигруппы образуется диацетат 1-окси-2-аминооктадекана (сфингина) (XIX), что свидетельствует об аллильном положении одного гидроксила сфингозина (I)¹¹.

D-Конфигурация при $\text{C}_{(2)}$ сфингозина установлена почти одновременно двумя методами. Картер и Хумистон¹¹ провели сравнительное изучение изменения оптического вращения при разбавлении водой растворов в диоксане или уксусной кислоте *N*-бензоил- α -аминостеариновой кислоты, которую выделяют при окислении полученного из триацетата сфингозина (XV) *N*-бензоилсфингина, и *N*-ацильных производных известных *L*- и *D*-аминокислот.

Киш¹² озонированием перевел сфингозин (I) в хлоргидрат 2-окси-3-аминобутиролактона (XX), который восстановил в левовращающий *D*-эритро-2-аминобутантриол-1,3,4 (XXI) (см. схему 1).

Конфигурация при $\text{C}_{(3)}$ установлена путем синтеза *трео*- и *эритро*-изомеров дигидросфингозина (II)¹³ (см. стр. 2083—2084). ИК спектр сфингозина (I) содержит полосу при 10,3 μ , указывающую на транс-двойную связь^{14, 15}. Полный синтез окончательно подтвердил строение сфингозина (I) как *D*-(+)-эритро-транс-1,3-диокси-2-аминооктадецена-4.

Дигидросфингозин (II), идентичный продукту гидрирования сфингозина (I), был впервые обнаружен в личинках кошачьих солитеров¹⁶,

а вскоре выделен^{17, 18} также из цереброзидной фракции спинного мозга и (в меньшем количестве) головного мозга коровы.

В последние годы выделены новые природные аминодиолы животного происхождения: C_{20} -сфингозин (III) и C_{20} -дигидросфингозин (IV). C_{20} -сфингозин (III) впервые был обнаружен группой югославских биохимиков в мозгах коровы и лошади^{19, 20}. Газо-жидкостная хроматография метиловых эфиров кислот, полученных окислительным расщеплением смеси природных аминодиолов хромовой кислотой и последующим метилированием, показывает присутствие метилмиристата и метилпальмитата, а в продуктах окисления и метилирования дигидросоединений найден метилстеарат. Недавно предложен быстрый метод прямого определения сфинголипидных оснований газо-жидкостной хроматографией их триметилсилильных производных²¹.

C_{20} -сфингозин (III), названный икосисфингозином²², был обнаружен также в качестве главного компонента в смеси оснований, полученной при кислотном гидролизе муколипида^{23, 24} из мозга быка и ганглиозидов мозга человека²⁵.

С помощью газо-жидкостного хроматографирования смеси метиловых эфиров жирных кислот, полученных после периодатного расщепления по связи $C_{(2)}-C_{(3)}$ сфингозиновой фракции ганглиозидов мозга человека, был обнаружен C_{20} -дигидросфингозин (IV)²⁵. Его выделили препаративной хроматографией на бумаге смеси динитрофенилпроизводных сфингозинов, полученных из мозга и волос человека и коровьего мозга²⁶. Ганглиозидная фракция мозга содержит $\frac{2}{3}$ C_{20} -сфингозинов (III, IV) и $\frac{1}{3}$ C_{18} -сфингозинов (I, II), причем $\sim 10\%$ составляют дигидросоединения (II, IV)²⁷.

2. Цереброзиды

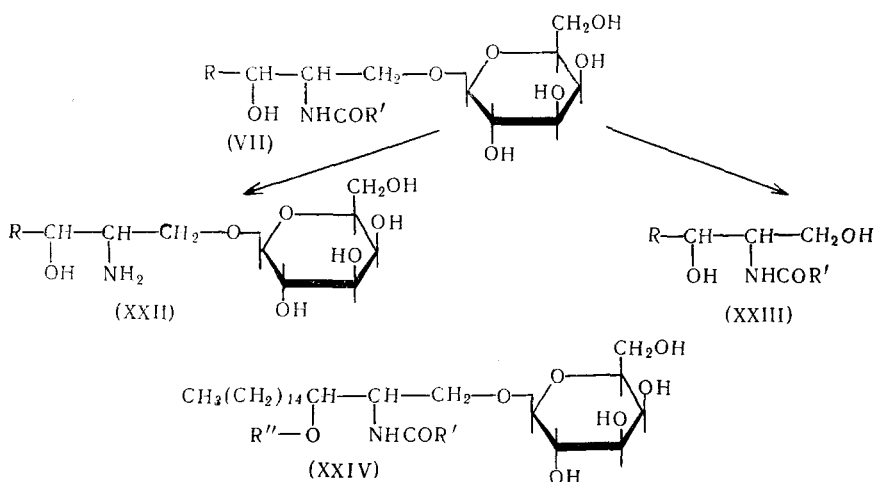
Первые два цереброзида — френозин и церазин обнаружил Тудикум²⁸ при изучении состава мозга. Позднее Кленк^{29, 30} выделил еще два цереброзида — нервон и оксинервон: все четыре цереброзида отличаются друг от друга своими жирнокислотными компонентами. Френозин содержит цереброновую — $CH_3(CH_2)_{21}-CHON-COOH$, церазин — лигноцериновую — $CH_3(CH_2)_{22}COOH$, нервон — нервоновую (*цис*-тетракозен-15-овую) и оксинервон — оксинервоновую кислоты. Известны также цереброзиды, в состав которых входят другие жирные кислоты^{31, 32}.

С помощью многократной тонкослойной хроматографии смесь цереброзидов, выделенную из спинного мозга человека, удастся разделить на 12 компонентов, содержащих различные остатки жирных кислот³³. Судя по данным газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров кислот, полученных гидролитическим расщеплением цереброзидов человеческого мозга, в их состав входят четные и нечетные, насыщенные, мононенасыщенные и α -оксикислоты с неразветвленной цепью, содержащие от 14 до 26 атомов углерода³⁴.

Цереброзиды из нормального мозга животных и человека содержат галактозу. При некоторых аномальных состояниях, в частности при липидозе (болезни Гаухера), в селезенке человека накапливается глюкоцереброзид^{35, 36}, который содержится также в селезенке здоровых людей, но в значительно меньших количествах³⁷.

Строение цереброзидов установлено. Их селективный гидролиз приводит к галактозиду сфингозина (психозину) (XXII), а в других условиях — к *N*-ацилсфингозину (церамиду) (XXIII)^{28, 29} (схема 2).

СХЕМА 2



где $\text{R}=\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}=\text{CH}-$; $\text{R}'=\text{остаток жирной кислоты}$;
 $\text{R}''=\text{C}_n\text{H}_{n+1}\text{CH}=\text{CH}-$.

Психозин (XXII) не восстанавливается обычными реагентами на альдегидную группу и, следовательно, является гликозидом. Исчерпывающее метилирование цереброзидов (VII) и последующий гидролиз дают 2,3,4,6-тетраметилгалактозу, что указывает на наличие в них 1,5-пиранозного цикла^{38, 39}.

При гидрогенолизе над платиной и последующем гидролизе гексаацетилфренозина, так же как и триацетилсфингозина (XV), образуются сфингин и уксусная кислота⁴⁰ — значит, галактоза присоединена по первичному гидроксилу церамида. β -Конфигурация гликозидной связи доказана полным стереонаправленным синтезом некоторых цереброзидов (см. стр. 2092).

С помощью тонкослойной хроматографии цереброзидной фракции мозга Кочеткову, Жуковой и Глуходед удалось отделить небольшое количество галактоцереброзида с большим значением R_f , чем у классических цереброзидов⁴¹. Изучение ИК спектра, а также поведения при щелочном и кислотном гидролизе указывают на то, что в его состав входит более 90% дигидросфингозина и что по вторичному гидроксилу присоединена алкенилэфирная группа. Новое соединение получило название сфингоплазмалоген (XXIV)⁴².

3. Сульфатиды

Исследуя цереброзиды мозга, Тудикум обнаружил в них серу²⁸. В 1933 г. Бликс⁴³ выделил из нормального мозга человека сульфатид (VIII) в виде калиевой соли (20—25% от суммы цереброзидов). Сульфатид содержал жирные кислоты (в основном цереброновую), галактозу, сфингозин и остаток серной кислоты. Отделение сульфатидов (VIII) от цереброзидов (VII) может быть успешно осуществлено хроматографией на диэтиламиноэтилцеллюлозе⁴⁴.

Жирнокислотный состав сульфатидов из серого и белого вещества мозга человека, изученный с помощью газо-жидкостной хроматографии, близок к жирнокислотному составу цереброзидов, выделенных из тех же тканей, однако, сульфатиды содержат меньше оксикислот⁴⁵.

Яцкевич⁴⁶ с помощью колоночной хроматографии на бумаге разде-

лил сульфатиды мозга человека, содержащие цереброновую, лигноцериную и нервоновую кислоты. Два сульфатида мозга крысы, выделенные Бэкке и Корнатпером^{47, 48}, вероятно, соответствуют сернокислотным эфирам церазина и френозина.

Метилированием цереброзидсульфата мозга коровы и изучением продуктов последующего гидролиза хроматографией на бумаге Танхаузер и Бонкадо⁴⁹ показали, что в нем сульфогруппа связана с первичной оксигруппой галактозы при C₍₆₎. Однако повторное исследование того же сульфатида путем исчерпывающего метилирования в диметилформамиде, последующего метанолиза и газо-жидкостной хроматографии метилированных сахаров показало присутствие метил-2,4,6-триметилгалактозида⁵⁰, а не 2,3,4-триметилгалактозида⁴⁹. Поглощение при 820 см⁻¹ (C—O—S колебания) соответствует экваториальному положению группы —OSO₃H⁵¹, что для C₁ конформации галактопиранозы одинаково осуществимо при 6- и 3-положении группы —OSO₃H. Повидимому, сульфатная группа присоединена к гидроксилу при C₍₃₎ галактозы, а Танхаузер и Бонкадо⁴⁹ допустили ошибку, вызванную близостью значений R_f при бумажной хроматографии триметилгалактоз.

На основании изучения ИК спектров и продуктов метилирования Хакомори, Ишимода и Накамура⁵² подтвердили строение цереброзид-3'-сульфата; они же выделили сложный сульфатид, состоящий из цереброзид-3'- и 6'-сульфатов, которые, возможно, связаны между собой в виде диэфира серной кислоты.

4. Церамид-олигогексозиды

Раппорт, Граф и Алонсо⁵³ хроматографией на кремневой кислоте хлороформ-метанольных экстрактов выделили из эпидермоидной карциномы человека простейший церамид-олигогексозид (IX) и назвали его цитолипином Н^{54, 55}. Вещества, близкие ему по строению, выделены из селезенки быка^{56, 57} и человека³⁷, из эритроцитов лошади⁵⁸ и человека⁵⁰, а также из почек человека^{59, 60}.

Цитолипин Н — смесь β-лактозидов церамида, в которых сфингозин соединен амидной связью с лигноцериновой, пальмитиновой, бегеновой или (в небольшой степени) еще какой-нибудь из других высших жирных кислот⁶¹. Жирно-кислотный состав был выяснен с помощью бумажной и газо-жидкостной хроматографии.

Анализ продуктов кислотного гидролиза цитолипина Н с помощью бумажной хроматографии показал, что в состав углеводной части входят эквимолекулярные количества глюкозы и галактозы. Конфигурация углеводного остатка установлена иммунохимическим методом ингибирования реакции цитолипина Н с антителами при добавлении простых углеводов⁵⁴ (см. стр. 2094). Полный синтез подтвердил его строение (см. стр. 2093) как 1-О-β-лактозида *D*-эритро-N-ацилсфингозина.

Другие церамид-олигогексозиды (IX) — галактозил[1 → 4]галактозил-церамид и галактозил[1 → 4]галактозил[1 → 4]глюкозилцерамид⁶⁰ выделены из селезенки³⁷, почек⁵⁹ и эритроцитов⁶² человека, из почек и молока⁶³ коровы и почек лошади.

5. Глобозиды

Главный гликолипид эритроцитов человека^{58, 64} — глобозид — как показало изучение продуктов среднекислотного гидролиза, окисления иодной кислотой и исчерпывающего метилирования в диметилформамиде⁶⁵, является N-ацетилгалактозаминил[1 → 6]галактозил[1 → 4]галактозил[1 → 4]глюкозил[1 → 1]-N-лигноцерилсфингозином.

Вещество, близкое по строению глобозиду из эритроцитов, выделили из почек человека Раппорт, Граф и Шнайдер⁶⁶, а также Макита, Иванага и Ямакава⁶⁷, и показали, что оно является N-ацетилгалактозаминил [1→3] галактозил [1→4] галактозил [1→4] глюкозил [1→1] церамидом⁵⁹. Глобозиды получены также при фракционировании на кремневой кислоте метанол-эфирных экстрактов эритроцитов овцы и гвинейской свиньи⁶².

Недавно из раковой ткани был выделен⁶⁸ гликосфинголипид, который формально также является глобозидом, однако отличается от известных ранее соединений этого типа высоким содержанием глюкозамина (9—10%) и 6-дезоксигексозида — фукозы (8,5—9,5%). Отношение глюкоза : галактоза : фукоза = 1 : 2,3 : 1,2. Это главный компонент водорастворимых гликолипидов аденокарциномы человека. Попытки получить такой же, содержащий фукозу, глобозид из ткани нормальных органов были безуспешны.

6. Гематозиды

Из стромы эритроцитов собаки, кошки и лошади Ямакава и Сузуки⁶⁹, а впоследствии Кленк и Падберг⁷⁰ выделили гематозид — N-ацетилнейраминил[2→3]галактозил[1→4]глюкозил[1→1] - N - ацилсфингозин. Его сиаловая кислота^{71,72} легко отщепляется⁷³ специфическим гидролитическим ферментом — нейраминидазой (или сиалидазой), выделенной из *Vibrio cholerae*.

Описан также выделенный из мозга человека гематозид^{74,75,76}, в котором, по всей вероятности, содержится 2 моля галактозы и отсутствует глюкоза. Из мозга свиньи недавно был выделен более сложный гематозид, содержащий 4 моля нейтральных гексоз и 2 моля сиаловых кислот на 1 моль церамида⁷⁷.

7. Ганглиозиды

Ганглиозид был впервые обнаружен Ландштейнером и Левеном⁷⁸ в 1925 г. в экстракте из почек лошади, но только в 1942 г. Кленк⁷⁹ выделил из коры головного мозга человека сравнительно чистое соединение, содержащее сфингозин, глюкозу, галактозу, галактозамин, N-ацетилнейраминовую кислоту и высшую жирную кислоту (в основном стеариновую) в эквимолекулярных количествах^{80,81}.

Позднее оказалось, что в природе существует много ганглиозидов, отличающихся по составу и строению. Жирнокислотный состав ганглиозидов мозга был изучен с помощью газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров, полученных после омыления ганглиозидов⁸²⁻⁸⁶. Основной кислотой оказалась стеариновая — ее содержание колеблется от 72 до 96%; кроме нее, в состав ганглиозидов входят, главным образом, линейные насыщенные кислоты C₂₀, C₂₂ и C₂₄.

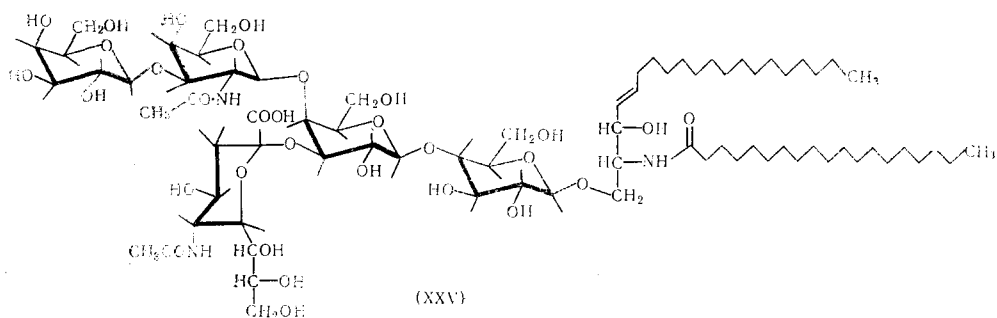
Строение углеводной части выделенного из нормального мозга человека моносиалоганглиозида, который, пользуясь номенклатурой Свеннерхольма (см. обзор⁸⁷), обозначим G_{M1}, было определено совместными усилиями нескольких лабораторий⁸⁸⁻⁹¹. Среднекислотный гидролиз C_{M1} дает два дисахарида: O-α-N-ацетил-D-галактозаминил[1→3]галактозу и O-β-D-галактопиранозил[1→3]-2-ацетида-2-дезоксид-D-галактозу⁹².

При ацетоллизе этого ганглиозида смесью уксусной кислоты и уксусного ангидрида, содержащей небольшое количество серной кислоты⁹³, удается получить ганглио-N-тетрозу : галактозил[1→3]-N-ацетилгалактоз-

аминил[1→4]галактозил[1→4]глюкозу, две ганглио-N-триозы: галактозил[1→3]-N-ацетилгалактозаминил[1→4]галактозу и N-ацетилгалактозаминил[1→4]галактозил[1→4]глюкозу, две ганглио-N-биозы: галактозил[1→3]-N-ацетилгалактозамин и N-ацетилгалактозаминил[1→4]галактозу и лактозу — галактозил[1→4]глюкозу, строение которых устанавливалось сочетанием периодатного окисления и последующего восстановления борогидридом калия. Были выделены также сахараиды, содержащие N-ацетилнейраминую кислоту: сиалил[2→3]галактоза, сиалил[2→3]галактозил[1→4]глюкоза, сиалилганглио-N-триозы и сиалилганглио-N-тетроза. Их строение определено ферментативным методом, основанным на известной зависимости скорости ферментативного отщепления сиаловой кислоты от ее местоположения.

Как показало периодатное окисление метилсфингозина, полученного исчерпывающим метилированием ганглиозида G_{M1} , углеводная часть в нем присоединена к первичному гидроксилу сфингозина⁸⁸.

Таким образом, строение ганглиозида G_{M1} отвечает формуле (XXV), недавно она была вновь подтверждена с помощью периодатного окисления⁹⁴.



Выделен также другой моносиалоганглиозид G_{M2} ⁹⁰, содержание которого в нормальном мозгу человека составляет 3—5%, но резко возрастает в мозгу людей, умерших от инфантильной формы наследственной болезни Тай-Захе. Для установления строения ганглиозида G_{M2} он был расщеплен кислотным гидролизом до ацилсфингозин-сахаридов и свободных сахаров, которые затем были подвергнуты количественному анализу и охарактеризованы^{90, 95} (см. схему 3).

Выделенные из мозга человека два дисиалоганглиозида (G_{D1a} и G_{D1b}) и трисиалоганглиозид (G_{T1a})^{88, 90, 95, 96} количественно расщепляются сиалидазой до моносиалоганглиозида G_{M1} . G_{D1a} гидролизуется значительно быстрее, чем G_{D1b} , а G_{T1a} сначала превращается в G_{D1b} (с небольшой примесью G_{D1a}) и уже потом в G_{M1} . Гидролиз G_{T1a} 0,01N соляной кислотой при 100° дает равные количества G_{D1a} и G_{D1b} . Поскольку известно⁹⁷, что сиалил [2→6]лактоза медленнее гидролизуется сиалидазой, чем сиалил [2→3]лактоза, можно предположить⁹⁵, что в G_{D1a} вторая молекула сиаловой кислоты связана с $C_{(3)}$ концевой галактозы, в G_{D1b} с $C_{(6)}$ этого же галактозного остатка, а в G_{T1a} замещены оба гидроксила.

Изучением строения еще одной группы полисиалоганглиозидов, близких по строению G_{M1} , занимались Джонсон и Мак Клюер⁹⁴, применившие метод периодатного окисления (см. схему 3).

Окисление одного галактозного остатка в дисиалоганглиозиде G_{D1c} (следуя принципам номенклатуры Свеннерхольма; 3-G у авторов) показывает, что концевой галактозный остаток не замещен, а разрушение только одной моле-

СХЕМА 3*

G_{M1-}	гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R
G_{M2-}	галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк
G_{D1a}	NAcHк[2→3]гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк
G_{D1b}	NAcHк[2→6]гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк
G_{D1c}	гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк[2→8]NAcHк
G_{T1a}	NAcHк[2→6]гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк
G_{T1b}	NAcHк $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ 6 \end{array}$ гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк[2→8]NAcHк
G_{T1c}	NAcHк[2→3]гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк[2→8]NAcHк
$G_{Tet.1}$	NAcHк $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ 6 \end{array}$ NAcHк[2→3]гал[1→3]галNHAc[1→4]гал[1→4]глю[1→1]—R $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{array}$ NAcHк[2→8]NAcHк

* гал—галактоза; галNHAc—N-ацетилгалактозамин; глю—глюкоза; NAcHк—N-ацетилнейраминная кислота; R—церамид.

кулы N-ацетилнейраминной кислоты и устойчивость второй указывают на [2→8]-связь двух молекул сиаловых кислот между собой⁹⁸⁻¹⁰⁰. Такой же дисиалоганглиозид выделили Кун и Вигандт¹⁰¹.

Потребность в 6 молях иодной кислоты для полного окисления трисиалоганглиозида (G_{T1b})⁹⁴, объясняемая расщеплением 2 молей N-ацетилнейра-

миновой кислоты и 1 моля галактозы, и образование при действии сиалидазы дисиалоганглиозида G_{D1c} в качестве промежуточного соединения показывают, что G_{T1b} также содержит [2→8]-димер сиаловых кислот. По расщеплению 2 молями иодной кислоты концевой галактозы можно судить, что она не замещена, а третья молекула N-ацетилнейраминовой кислоты присоединена не к ней (как в G_{D1a}), а, возможно, к $C_{(6)}$ N-ацетилгалактозамина. Последнее утверждение требует дополнительных доказательств.

Трисиалоганглиозид G_{T1c} , выделенный Куном и Вигандтом¹⁰¹ (G_{IV} у авто-ров), отличается положением третьего остатка N-ацетилнейраминовой кислоты. Возможно, четвертый остаток сиаловой кислоты в $G_{Tet.1}$ (G_V по Куну), выделенный вместе с G_{T1c} , присоединен к $C_{(6)}$ N-ацетилгалактозамина аналогично третьему остатку в G_{T1b} (см. схему 3).

В последнее время путем разделения ганглиозидов мозга препаративной тонкослойной хроматографией выделена смесь трисиалоганглиозидов, в которой отношения гексоза : церамид и галактоза : глюкоза составляют 3 : 1, что может соответствовать 25 %-ному содержанию в этой смеси галактозного, не содержащего глюкозы ганглиозида¹⁰².

Кун и Вигандт¹⁰³ выделили из эритроцитов и молока крупного рогатого скота хроматографией на кизельгуре новый ганглиозид, который содержит вместо галактозамина глюкозамин и легко расщепляется нейраминатгликогидролазой. Исследование его строения, проведенное методом энзиматического и кислотного гидролиза и озонирования¹⁰⁴, показало, что он, по-видимому, близок к ганглиозиду, выделенному ранее из стромы эритроцитов¹⁰⁵.

При изучении веществ, определяющих групповую специфичность крови¹⁰⁶ (см. стр. 2094), были выделены два ганглиозида, которые содержат остатки галактозамина, глюкозамина, галактозы, глюкозы, сиаловой кислоты, фукозы и сфингозина, отличаются по жирно-кислотному составу и имеют соотношение сфингозин : глюкоза : сиаловая кислота 2 : 1 : 1.

Молекулярный вес ганглиозидов колеблется в пределах 1500—3000. Однако в водных растворах они могут образовывать мицеллы⁷⁴ с агрегатным весом более 250 000; некоторые исследователи¹⁰⁷ приняли их за высокомолекулярные соединения, в которых объединены сотни структурных компонент обычных ганглиозидов¹⁰⁸.

В водной среде мицелла должна ориентироваться таким образом, чтобы остатки нейраминовой кислоты находились на ее поверхности и могли ассоциироваться с молекулами воды, а липидная часть молекулы укрывалась внутри. В органических растворителях, в соответствии с представлениями Кленка и Гилена⁷⁴, мицелла должна как бы вывернуться наизнанку, спрятав гидрофильные остатки нейраминовой кислоты за барьером углеводородных остатков сфингозина и жирных кислот.

Хорвард и Бартон¹⁰⁹ выдвинули гипотезу о ван-дер-ваальсовом взаимодействии гидрофобных остатков в мицелле. Так, например, сфингозин ганглиозида № 1 может вовлекаться в ассоциацию с жирнокислотной цепью ганглиозида № 2, сфингозин которого будет ассоциироваться с жирнокислотной цепью ганглиозида № 3 и так далее. Это означает, что кинетическое высвобождение одной гидрофобной цепи не должно приводить к растворению молекулы ганглиозида, так как другая гидрофобная цепь будет все еще «запутана» в мицелле.

Вероятно, такого же рода неионные и нековалентные связи могут существовать в таких гетерогенных мицеллоподобных структурах как клеточные мембраны и субклеточные частицы, состоящие из липидов и белков.

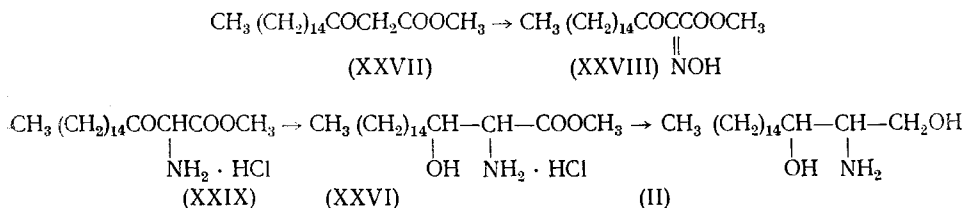
II. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Синтез дигидросфингозина

Синтезы сфингозина (I), дигидросфингозина (II) и некоторых сфинголипидов, осуществленные с целью окончательного установления их строения, способствовали в последние годы развитию биологических исследований, для которых требуются в значительных количествах индивидуальные соединения.

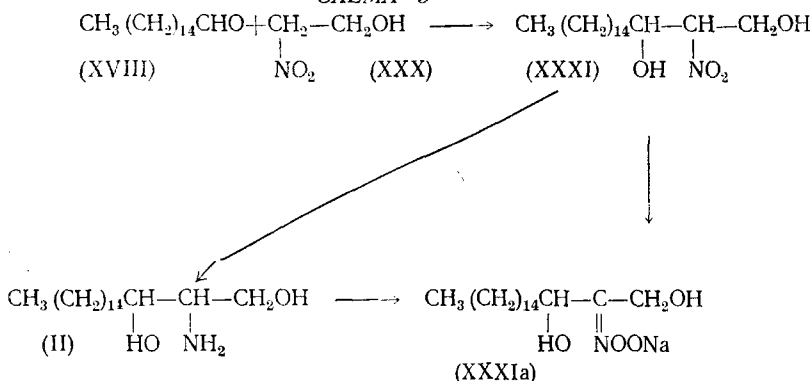
Картер и сотрудники¹¹⁰ в 1947 г. предложили идею синтеза дигидросфингозина через метил- α -амино- β -оксистеарат (XXVI), следуя которой Грегори и Малкин¹¹¹ в 1951 г. синтезировали смесь рацематов дигидросфингозина (II) из метил-3-кетостеарата (XXVII) путем нитрозирования¹¹² и последующего ступенчатого восстановления оксима (XXVIII) сначала палладием на угле в присутствии 2 молей соляной кислоты, затем над окисью платины и, наконец, алюмогидридом лития (XXVIII \rightarrow XXIX \rightarrow XXVI \rightarrow II) (схема 4).

СХЕМА 4



В том же году Гроб, Дженни и Утцингер¹¹³ описали синтез смеси рацематов дигидросфингозина (II) путем конденсации пальмитинового альдегида (XVIII) с нитроэтанолом (XXX) в присутствии едкого натра с последующим восстановлением нитродиола (XXXI) над скелетным никелем (см. схему 5); в полученной смеси преобладал *трео*-изомер (IIб). Использование метилата натрия в качестве конденсирующего агента¹¹⁴, выделение промежуточной соли аци-формы нитродиола (XXXIа) и восстановление над окисью платины позволили поднять общий выход дигидросфингозина (IIа, б) с 10,5 до 44%.

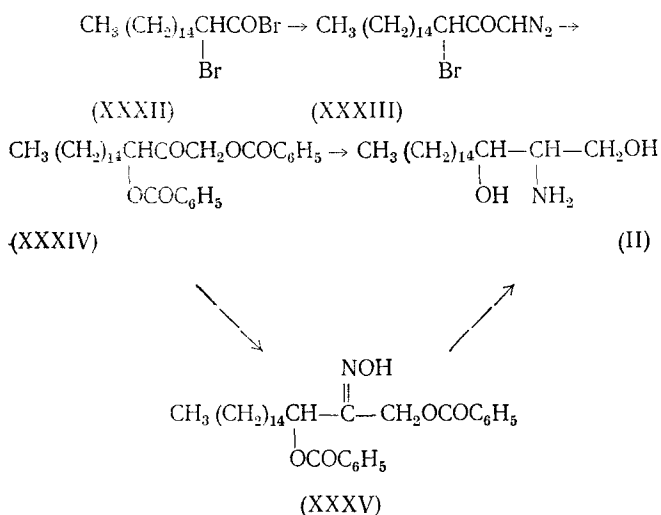
СХЕМА 5



Группа югославских исследователей¹¹⁵ описала синтез смеси рацематов II путем конденсации бромангидрида 2-бромгептадекановой кислоты (XXXII) с диазометаном, обработки выделяемого при этом 1-диазо-3-бромоктадеканона-2 (XXXIII) бензоатом серебра и бензойной кис-

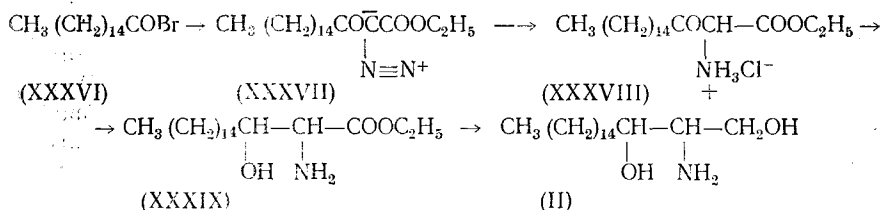
лотой и восстановительного аминирования полученного кетодиэфира (XXXIV) над скелетным никелем или восстановления синтезированного из XXXIV оксима (XXXV) алюмогидридом лития (см. схему 6).

СХЕМА 6



Описан также синтез дигидросфингозина (II) ¹¹⁶ из более доступной пальмитиновой кислоты конденсацией ее бромангидрида (XXXVI) с диазоацетоуксусным эфиром и последующим ступенчатым восстановлением образующегося 2-диазопальмитоилуксусного эфира (XXXVII) сначала гидрированием над палладием, затем борогидридом натрия и алюмогидридом лития (XXXVII → XXXVIII → XXXIX → IIa, б) (см. схему 7).

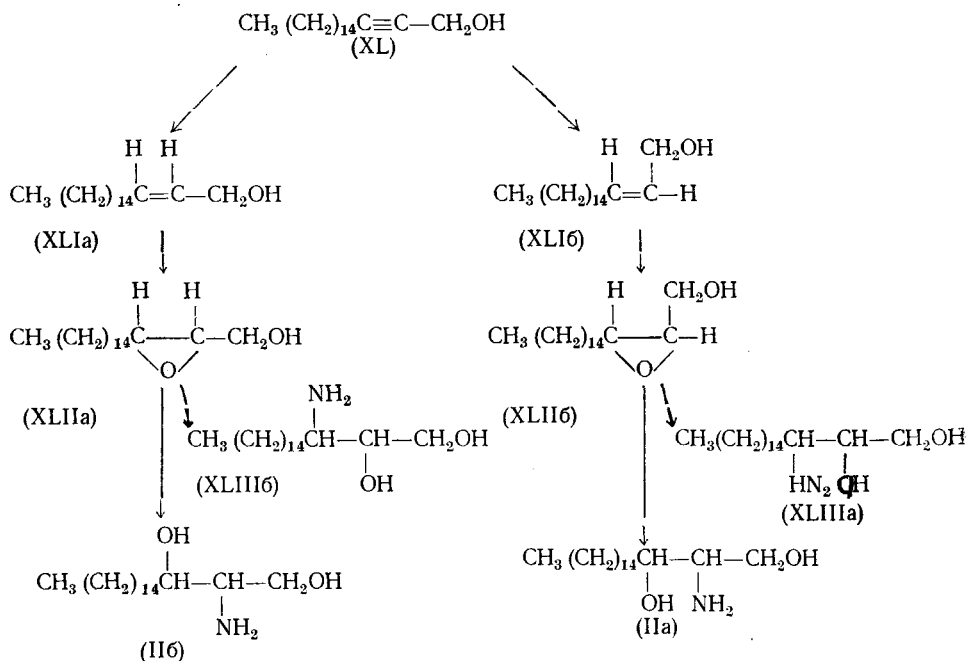
СХЕМА 7



Общим недостатком описанных выше синтезов является отсутствие стереонаправленности: способы разделения образующихся диастереомеров II также не были разработаны.

Вопрос о стереохимии сфингозина (I) у 2 и 3 углеродных атомов был решен благодаря осуществлению стереоспецифического синтеза эритро-(IIa) и трео-(IIб) изомеров дигидросфингозина ^{117, 118}. При восстановлении 1-оксооктадецина-2 (XL) каталитическим гидрированием или химически образуются *цис* и *транс*-1-оксооктадецены (XLIa, б) соответственно, окислением которых надфталевой кислотой получены *цис*- и *транс*-эпоксиды (XLIIa, б). Сопровождающееся обращением конфигурации раскрытие эпоксидов (XLII) аммиаком, приводит к *трео*-(IIб) и *эритро*-(IIa) дигидросфингозинам. При этом также образуются небольшие количества изомерных аминодиолов (XLIIIa, б) (см. схему 8).

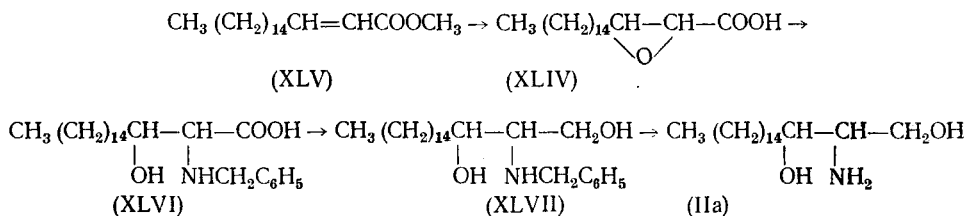
СХЕМА 8



Одновременно Картер, Шапиро и Харрисон¹³ осуществили синтез *D*-(+)-, *L*-(—)-эритро- и *DL*-трео-дигидросфингозинов (IIa, б) восстановлением эритро- и трео- α -амино- β -оксистеаратов¹¹⁹ (XXVa, б) соответственно и расщеплением *DL*-эритро-дигидросфингозина (IIa) в виде *L*-глутаматов¹²⁰ на антиподы. Эти работы завершили исследования по установлению строения сфингозина (I).

Большое разнообразие предложенных методов не уменьшило интереса химиков к созданию новых, более эффективных путей синтеза дигидросфингозина (II). Еще один стереоспецифический синтез эритро-дигидросфингозина (IIa) был описан в 1964 г.¹²¹ Реакция *транс*-2,3-эпоксистеариновой кислоты (XLIV)^{122, 123}, полученной эпоксидированием и последующим омылением метил-*транс*-октадецен-2-оата (XLV) с бензиламином приводит к *DL*-эритро-2-бензиламино-3-оксистеариновой кислоте (XLVI). При восстановлении метилового эфира (XLVI) алюмогидридом лития и последующем гидрогенолизе образуется *DL*-эритро-дигидросфингозин (IIa) (XLVI \rightarrow XLVII \rightarrow IIa) (см. схему 9).

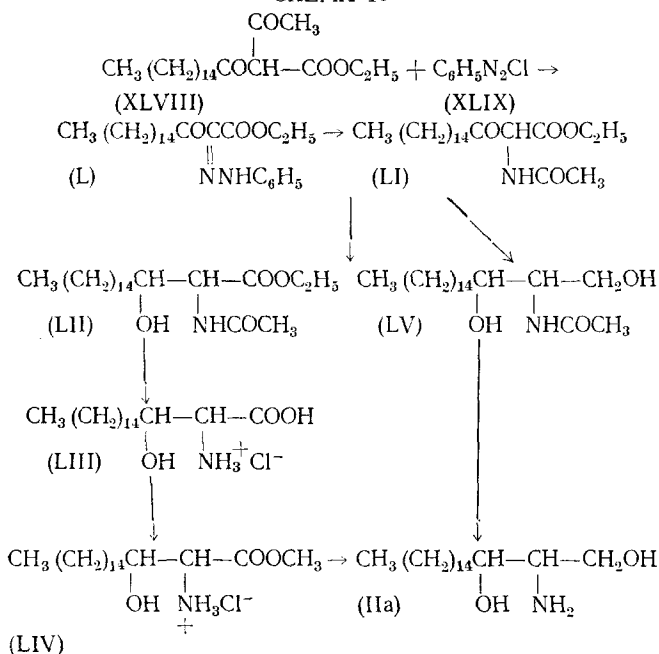
СХЕМА 9



В процессе разработки синтеза сфингозина (см. стр. 2086) Шапиро, Сегаль и Флауэрс¹²⁴ также осуществили синтез IIa. При конденсации по Яппу — Клингеману¹²⁵ этилпальмитоилацетата (XLVIII) с хлори-

стем фенилдиазонием (XLIX) и последующим гидролизом был получен фенилгидразон (L), восстановление которого цинком и уксусной кислотой в присутствии уксусного ангидрида приводит к этил-2-ацетамидо-3-кетостеарату (LI). При восстановлении LI борогидридом натрия образуется неразделяемая смесь эритро- и трео-рацематов (LII), омыление которой, последующая этерификация и восстановление алюмогидридом лития приводят к дигидросфингозину (II) (LII→LIII→LIV→→IIa), эритро-изомер которого выделен в виде трибензоата. Удобнее получать IIa в две стадии восстановлением LI алюмогидридом лития в эритро-N-ацетил-1,3-диокиси-2-аминооктадекан (LV) с последующим гидролизом LV (см. схему 10).

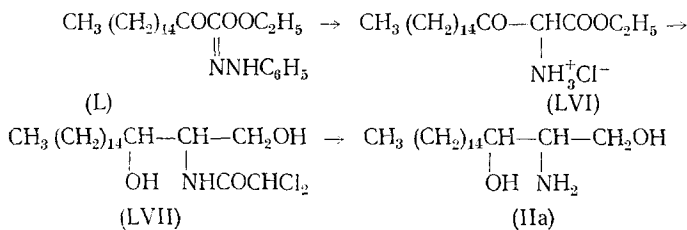
CXEMA 10



Однако при увеличении масштабов синтеза выход **IIa** значительно снижается из-за устойчивости амида (LV) к гидролизу. Поэтому позднее Шапиро и Шерадский¹²⁶ видоизменили метод. Восстановление фенилгидразона (L) цинком в водной 97%-ной уксусной кислоте приводит к кетозфиру (LVI), выделенному в виде хлоргидрата. После восстановления последнего алюмогидридом лития полученную смесь изомеров обрабатывают метилдихлорацетатом¹²⁷ и выделяют *эритро*-N-дихлорацетилдигидросфингозин (LVII), который легко гидролизуеться в *эритро*-дигидросфингозин (**IIa**) (см. схему 11).

Последний синтез дигидросфингозина является, по-видимому, самым эффективным.

CXEMA 11

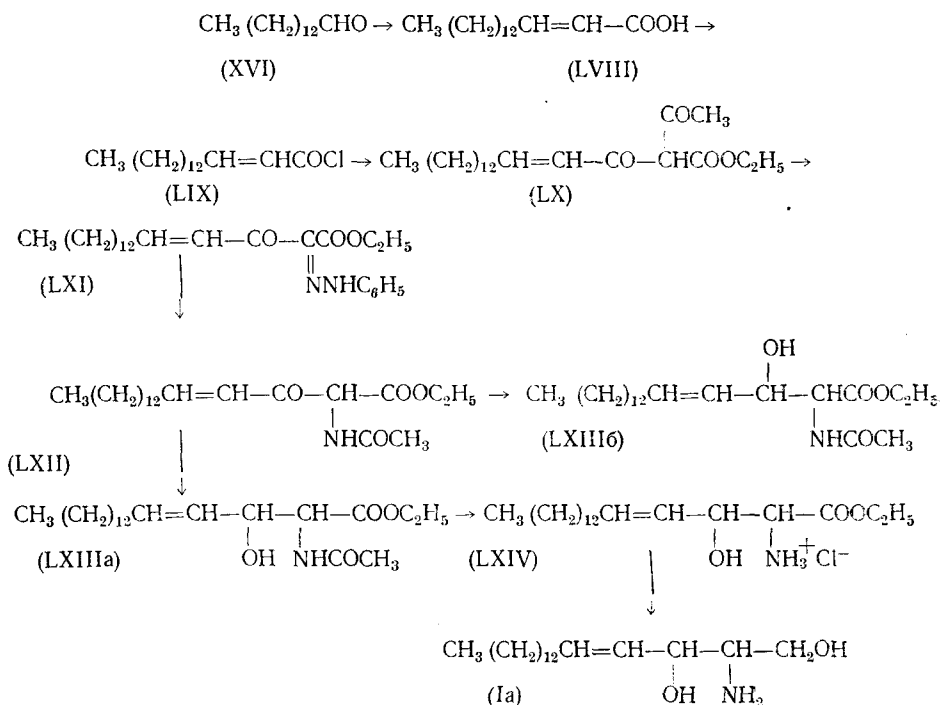


2. Синтез сфингозина

Известны две принципиальные схемы синтеза сфингозина, впервые реализованные почти одновременно в лабораториях Шапиро¹²⁸ и Гроба¹²⁹.

В синтезе Шапиро (схема 12) конденсация миристинового альдегида (XVI) с малоновой кислотой по Кневенателю — Дебнеру в присутствии пиперидина приводит к *транс*-гексадецен-2-овой кислоте (LVIII), из которой реакцией с тионилхлоридом получают нестойкий *транс*-гексадецен-2-ойлхлорид (LIX).

СХЕМА 12



Конденсацией хлорангидрида (LIX) с ацетоуксусным эфиром получен этил-2-ацетил-3-кетоктадецен-4-оат (LX), который по реакции Яппа — Клингемана с хлористым фенилдиазонием в строго контролируемых условиях превращают в фенилгидразон (LXI). Восстановление последнего в ацетамидоэфир (LXII) цинком в уксусной кислоте и последующее селективное восстановление борогидридом натрия приводит к смеси диастереомерных спиртов (LXIIIa, б), из которой удается выкристаллизовать только *эритро*-изомер (LXIIIa). При дезацетилировании **LXIIIa** разбавленной соляной кислотой в диоксане образуется хлорид-рат *эритро*-этил-2-амино-3-оксоктадецен-4-оата (LXIV) с относительно низким выходом, что объясняется частичной конверсией **LXIV** в *трео*-изомер. Восстановление **LXIV** алюмогидридом лития приводит к рацемическому *эритро*-сфингозину (Ia). Общий выход последнего ~4% в расчете на миристиновый альдегид (XVI).

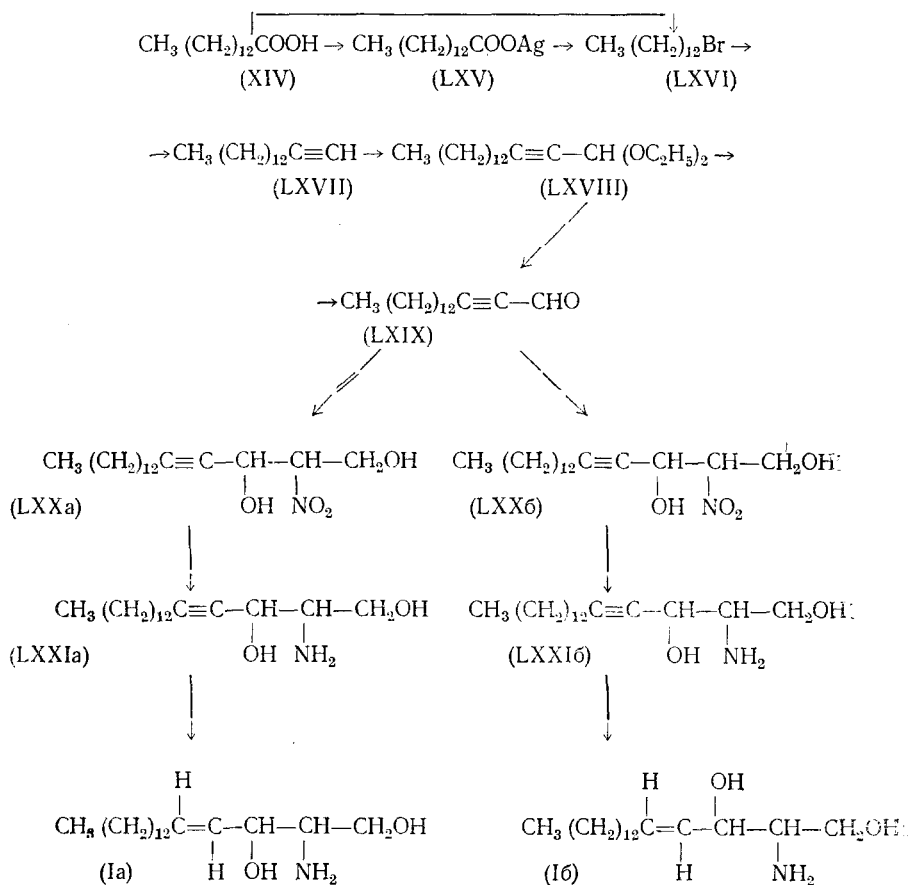
Исходным соединением в синтезе сфингозина, предложенном Гробом и Гадием (схема 13), является относительно доступная миристиновая кислота (XIV), которую можно через миристал серебра (LXV) по реак-

ции Хундикера — Бородина или путем прямого бромирования в присутствии красной окиси ртути¹³⁰ по методике, разработанной нами, превратить в тридецилбромид (LXVI). Конденсация последнего с ацетиленидом натрия в жидком аммиаке приводит к пентадецину-1 (LXVII), который по реакции Июича с орто-муравьиным эфиром переводят в диэтилацеталь гексадецин-2-аля-1 (LXVIII), последний гидролизуют в альдегид (LXIX). При конденсации LXIX с нитроэтанолом в присутствии поташа образуется смесь эритро- и трео-1,3-диокси-2-нитрооктадеценов-4 (LXXa, б), из которой фракционной кристаллизацией выделены чистые трео- (LXXб) и эритро- (LXXa) изомеры.

Восстановление нитродииолов (LXX) цинком и соляной кислотой приводит к смеси эритро- и трео-1,3-диокси-2-аминооктадеценов-4 (LXXIa, б). Последующим восстановлением тройной связи алюмогидридом лития получены эритро- и трео-сфингозины (Ia, б). Общий выход эритро-сфингозина (Ia) в расчете на миристиновую кислоту (XIV) составляет ~7%, параллельно синтезирован трео-сфингозин (Iб) с выходом ~9%. Восстановлением аминодииолов (LXXI) над Pd/CaCO₃ можно получить *цис*-изомеры сфингозина.

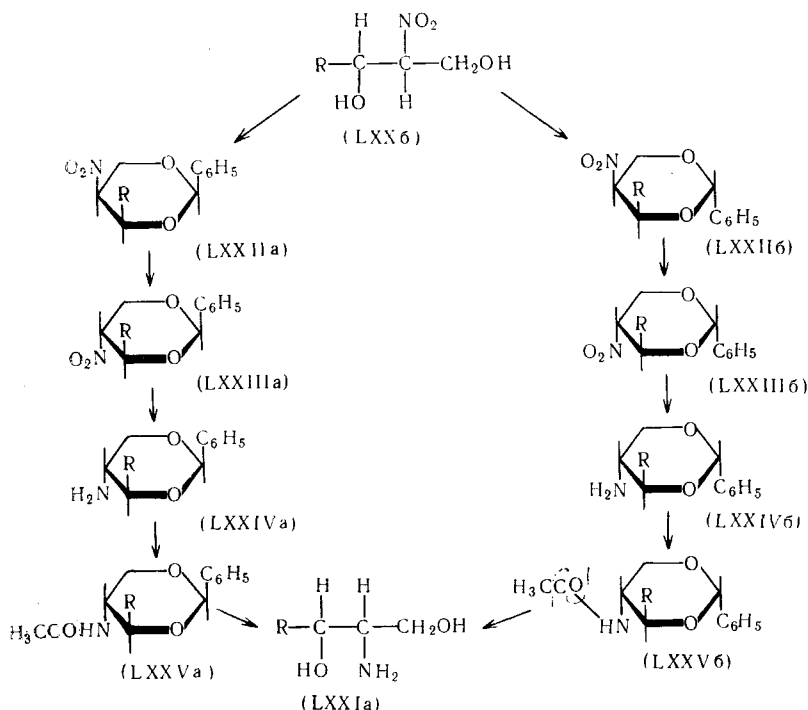
Таким образом, более эффективный метод Гроба открывает путь к получению всех возможных пространственных изомеров сфингозина, представляющих значительный интерес для биологических исследований.

СХЕМА 13



Учитывая образование при синтезе сфингозина по последней схеме преобладающих количеств неприродного *трео*-изомера (I6), Гроб и Гаддиент предложили метод *трео-эритро*-изомеризации сфингозина¹²⁹. С этой целью получают смесь двух промежуточных циклических бензальных производных (LXXIIa, б), образующихся в отношении 5:1 в реакции *трео*-1,3-диокси-2-нитрооктадецина-4 (LXXб) с бензальдегидом в присутствии хлористого цинка (схема 14, где $R = CH_3(CH_2)_{12}C \equiv C-$).

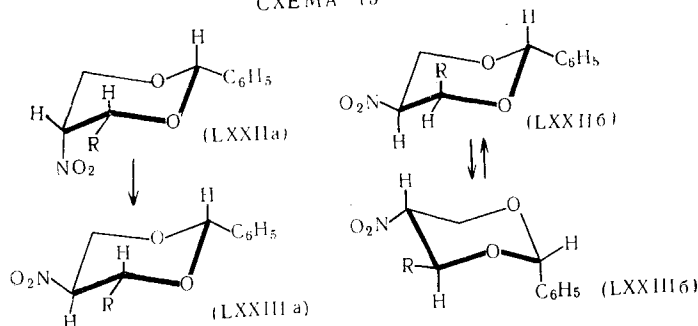
СХЕМА 14



Циклические ацетали (LXXII а, б) отличаются ориентацией фенильной группы в положении 2 диоксанового-1,3 цикла. Обработка **LXXIIa** этилатом натрия в этаноле вызывает практически полную конверсию в эпимер (LXXIIIa), тогда как при проведении этой реакции с **LXXIIб** получается равновесная смесь, содержащая эпимер (LXXIIIб) и исходный **LXXIIб** в отношении 3:2.

Подобное различие в положении равновесия объясняется более высокой устойчивостью наиболее выгодной полностью экваториальной конформации **LXXIIIa** по сравнению с **LXXIIa** и примерно одинаковой стабильностью конформаций **LXXIIб** и **LXXIIIб** (схема 15).

СХЕМА 15



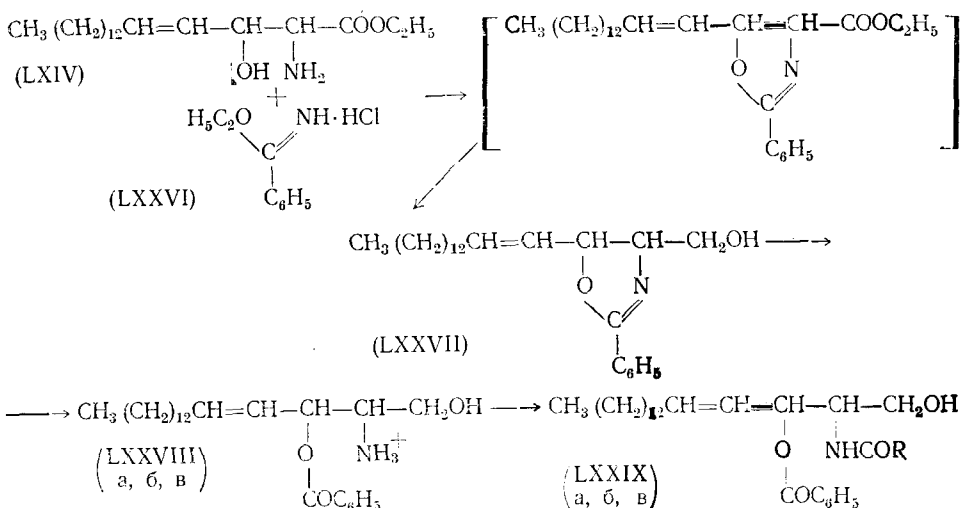
При восстановлении LXXIII амальгамой алюминия образуются амины (LXXIV), ацетилирование которых приводит к *эритро*-2-фенил-4-(пентадецин-1')-ил-5-ацетида-*т*-диооксанам (LXXVa, б) (см. схему 14); гидролизом последних получен *эритро*-1,3-диоокси-2-аминооктадецин-4 (LXXIa). Недостатком метода является многостадийность и большая продолжительность некоторых стадий. Поэтому нами разработан новый метод *трео-эритро*-изомеризации сфингозина, сущность которого изложена в следующей главе.

Метод Гроба успешно применяли для синтеза выделенных в последние годы C_{20} -*эритро*-сфингозина (III) ¹³¹ и C_{20} -*эритро*-дигидросфингозина (IV) ¹³² и их стереоизомеров, а также ряда длинноцепных аминоктилов — гомологов сфингозина ¹³³.

3. Пути синтеза гликоcфинголипидов

Природные сфинголипиды, в частности гликоcфинголипиды, содержат свободный аллильный гидроксил, который в процессе их синтеза желательно временно блокировать ^{134–137}. Осуществить это, исходя из сфингозинов (I), затруднительно из-за наличия сложной системы близких по реакционной способности активных центров этих оснований в сочетании с этиленовой связью, создающей возможность аллильных перегруппировок. Первого серьезного успеха достигли Шапиро и сотрудники на основе своего синтеза сфингозина, в котором промежуточный *эритро*-эфир (LXIV) имеет потенциальный первичный гидроксил сфингозина в скрытой форме в виде сложно-эфирной группировки. Конденсацией *эритро*-эфира (LXIV) с хлоргидратом этилиминобензоата (LXXVI) и последующим восстановлением сложно-эфирной группы алюмогидридом лития получен оксазолин (LXXVII) (схема 16).

СХЕМА 16



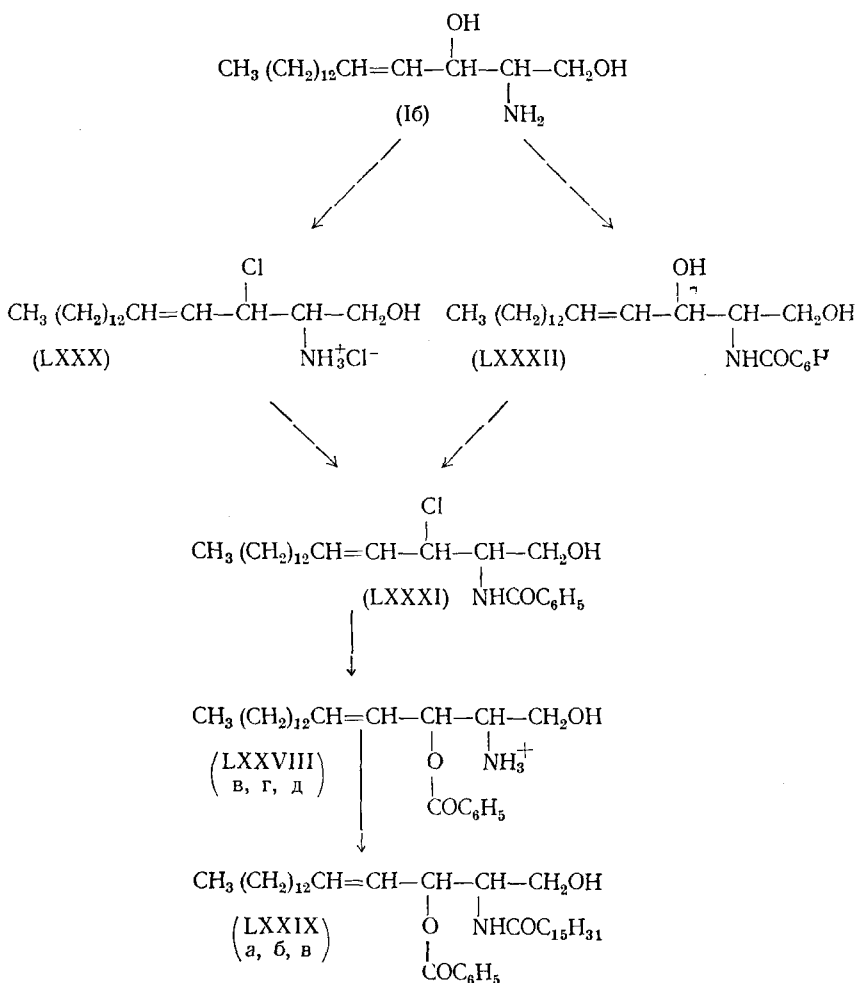
При обработке оксазолина (LXXVII) разбавленной серной кислотой в тетрагидрофуране образуется сульфат *эритро*-3-О-бензоилсфингозина (LXXVIIIa).

Расщепление сульфата (LXXVIIIa) на антиподы Шапиро проводил ¹³⁷ с помощью *L*- и *D*-винных кислот через *L*-тарtrat *L*-*эритро*-3-О-бензоилсфингозина (LXXVIIIб) и *D*-тарtrat *D*-*эритро*-3-О-бензоилсфин-

гозина (LXXVIIIв). Ацилирование сульфата (LXXVIIIа) или тартратов (LXXVIIIб, в) действием хлорангидрида жирной кислоты в присутствии буферного раствора ацетата натрия и уксусной кислоты приводит к *DL*-, *L*- и *D*-эритро-*N*-ацил-3-*O*-бензоилсфингозинам (LXXIXа, б, в) соответственно, которые используются затем в направленном синтезе сфинголипидов.

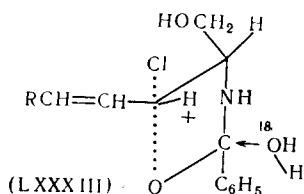
Нам удалось разработать другой способ¹³⁸ защиты аллильного гидроксила с одновременной *трео*-эритро-изомеризацией, дающий возможность получения природных производных эритро-сфингозина из его *трео*-формы (16), преимущественно образующейся при синтезе по схеме Гроба. При взаимодействии соли *трео*-сфингозина (16) (схема 17) с тионилхлоридом при 20° в хлороформе образуется хлоргидрат *трео*-*транс*-1-окси-2-амино-3-хлороктадецена-4 (LXXX), при *N*-бензоилировании которого бензойным ангидридом в присутствии бикарбоната натрия образуется *трео*-*транс*-1-окси-2-бензамидо-3-хлороктадецен-4 (LXXXI).

СХЕМА 17



Последний можно получить также, изменив порядок стадий, т. е. хлорировать *трео*-N-бензоилсфингозин (LXXXII). Интересно отметить, что при этом не происходит образования заметных количеств оксазолина (LXXVII), промежуточного соединения в синтезах сфинголипидов по методу Шапиро (см. схему 16). По-видимому, это энергетически невыгодно¹³⁹.

При нагревании β-хлорамида (LXXXI) в водном тетрагидрофуране удалось получить хлоргидрат *эритро*-3-О-бензоилсфингозина (LXXVIIIг), соединение, пригодное для проведения направленных синтезов сфинголипидов. Путем измерения количества выделяющихся ионов хлора методом амперометрического титрования было установлено, что реакция является равновесной. Специальный эксперимент с тяжелоокислородной водой¹⁴⁰ показал, что процесс, вероятно, протекает через гипотетическое переходное активное состояние (LXXXIII), причем вновь возникающая кислородная функция хлоргидрата *эритро*-3-О-бензоилсфингозина (LXXVIIIг) образуется из кислорода карбонильной группы, а карбонильная функция сложно-эфирной группировки LXXIIIг построена с участием кислорода воды.

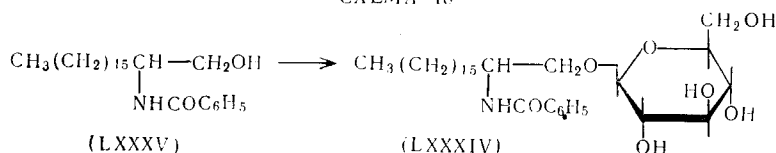


Разделение на антиподы в этом случае^{141, 142} производится реакцией хлоргидрата (LXXVIIIг) с моносеребряной солью *D*-винной кислоты¹⁴³ и фракционной кристаллизацией образующихся *D*-тарtratoв *D*- и *L*-*эритро*-3-О-бензоилсфингозинов (LXXVIIIв, д). Пальмитоилирование хлоргидрата (LXXVIIIг) или тарtratoв (LXXVIIIв, д) приводит к *DL*-, *D*- и *L*-*эритро*-N-пальмитоил-3-О-бензоилсфингозинам (LXXIXа, б, в), идентичным соответствующим соединениям, полученным по методу Шапиро.

4. Синтез цереброзидов и психозина

История синтетических исследований в области гликоcфинголипидов начинается в 1957 г., когда Проштеник и Крвавица¹⁴⁴ описали синтез 1-β-*D*-глюкопиранозил-*DL*- и *L*-бензоилсфингина (LXXXIV), осуществленный реакцией *N*-бензоил-*DL*- или *L*-сфингина (LXXXV) с α-бензобромглюкозой в присутствии цианида ртути в нитрометане и последующим омылением продукта реакции метилатом натрия¹⁴⁵ (схема 18).

СХЕМА 18

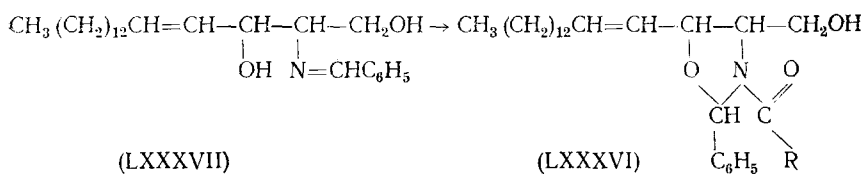


Синтез дигидrocереброзида был впервые проведен Кишем^{146, 147}, путем реакции *N*-тетракозаноилдигидросфингозина с α-ацетобромгалактозой и последующей аномеризации с помощью четыреххлористого титана образующейся смеси α- и β-галактозидов в виде их пентаацетатов. На ос-

новании этого синтеза был сделан вывод об α -конфигурации дигидроцерамина, полученного гидрированием природных церамина или нервона, поскольку он оказался идентичным синтетическому α -галактозиду дигидроцерамида (т. пл. 186° $[\alpha]_D + 5,31^\circ$). Последующие исследования Шапи-ро и Флауэрс¹³⁵ опровергают этот результат.

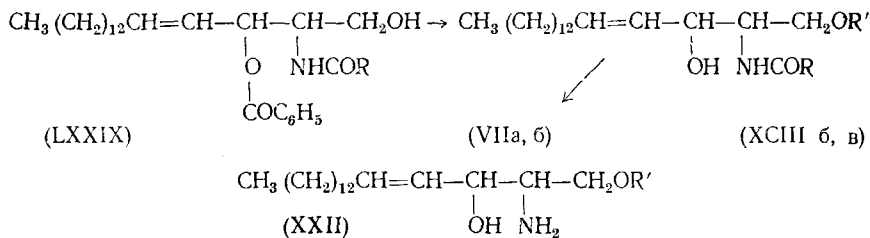
Попытки Вайса¹³⁶ гликозидировать замещенный оксазолидин (LXXXVI), полученный ацилированием N-бензилиденсфингозина (LXXXVII) (см. схему 19), и Шапи-ро — проделать то же самое с оксазолином (LXXVII) (см. схему 16) оказались безуспешными из-за крайне низкой реакционной способности гидроксила в этих соединениях, а также чувствительности к щелочи образующегося в небольшой степени гликозида.

СХЕМА 19



Шапи-ро и Флауэрс¹³⁵ впервые осуществили синтезы цереброзидов (VII) из защищенных церамидов (LXXIX), полученных описанным в предыдущей главе методом. Конденсация бензоилцерамидов (LXXIX) с α -ацетобромгалактозой или α -ацетобромглюкозой в присутствии цианистой ртути и последующее омыление защитных групп приводят к β -D-галакто- и -глюкоцереброзидам (VII) (схема 20), идентичным по физическим свойствам (ИК спектр и $[\alpha]_D$) природным церамину и френозину и цереброзиду, накапливающемуся в селезенке человека при болезни Гаухера.

СХЕМА 20

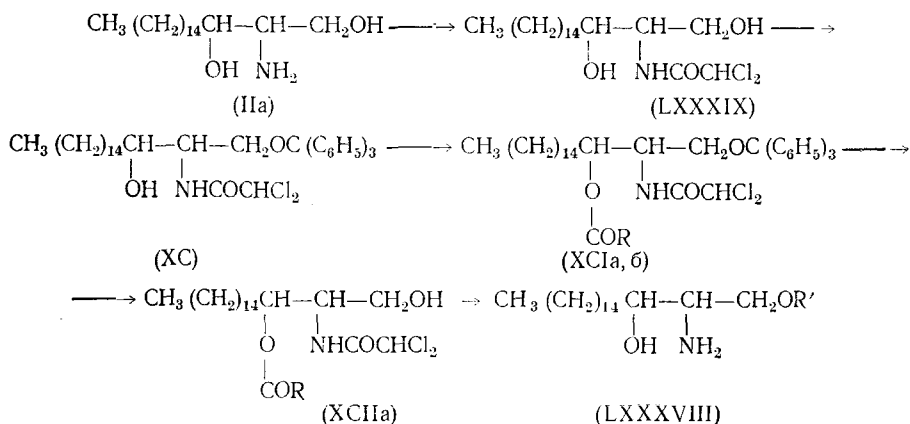


VIIa, R=CH₃(CH₂)₂₂⁻, R'=глюкоза; VIIб, R=Cl₂CH⁻, R'=галактоза; XXII, R'=галактоза; XIIIб, R=CH₃(CH₂)₂₂⁻, R'=лактоза; XIIIв, R=CH₃(CH₂)₁₄⁻, R'=лактоза

Шапи-ро, Рахаман и Шерадский¹³⁷ описали также получение предшественника цереброзидов в биосинтезе¹⁴⁸ — психозина (XXII) и его дигидропроизводного (LXXXVIII), которые представляют интерес для биосинтетических исследований, в частности для синтеза цереброзидов, меченых в жирнокислотном остатке. Для временной защиты аминной функции психозина (XXII) и дигидропсихозина (LXXXVIII) наиболее удачной оказалась дихлорацетильная группировка. Психозин (XXII) получают аналогично цереброзидам (VII) (см. схему 20), гидролизую образующийся дихлорацетамид (VIIб) кипячением с гидроокисью бария.

Для синтеза дигидропсихозина (LXXXVIII) был разработан новый путь (см. схему 21).

СХЕМА 21



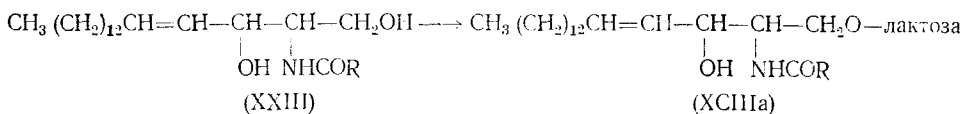
де (а) $\text{R} = -\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2-p$; (б) $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5$; (в) $\text{R}' = \text{глюкоза}$.

В реакции дигидрофсфингозина (IIa) с метилдихлорацетатом образуется амид (LXXXIX), первичный гидроксил которого временно тритилируют, а вторичный затем *p*-нитробензоилируют (LXXXIX → XC → XCIa), поскольку бензоильное производное (XCIб) трудно очистить. Снятие тритильной защиты разбавленной уксусной кислотой приводит к эфиру дихлорацетамида (XCIIa), который переводят в дигидропсихозин (LXXXVIII) обычным методом. Позднее появилось указание¹⁴⁹ на возможность осуществления синтезов природных производных эритро-фсфингозина по той же новой схеме (см. схему 21). Это особенно интересно, так как открывает более короткий синтетический путь от природного эритро-фсфингозина к фсфинголипидам.

5. Синтез цитолипина Н

Шрам, Байерс и Вильсон¹⁵⁰ синтезировали лактозид (XCIIIa), близкий по строению цитолипину Н, исходя из церамида (XXIII), полученного энзиматическим гидролизом¹⁵¹ фсфингомиелина бычьего сердца (схема 22). ИК спектры лактозида (XCIIIa) и цитолипина Н почти полностью идентичны, однако их удельные вращения отличны ($[\alpha]_D + 2,1^\circ$ и $-10,8^\circ$ соответственно).

СХЕМА 22



В 1964 г. был опубликован¹⁵² без экспериментальных деталей синтез 1-О-β-*D*- и -*DL*-лактозил-*N*-лигноцерилфсфингозинов (XCIIIб) по методу, разработанному Шапиро для получения цереброзидов (см. схему 20). Лактозид (XCIIIб) оказался полностью идентичным цитолипину Н по физико-химическим и серологическим свойствам. Исследование Шрама¹⁵⁰ было подвергнуто критическому разбору. В частности, указывалось на вероятную неоднозначность лактозидирования незащищенного церамида (XXIII), с которой связывали завышение угла вращения лактозида (XCIIIa).

Независимо лактозиды эритро-N-пальмитоилсфингозина (ХСIIв) и его *трео*-изомера, близкие по строению цитолипину Н, были получены авторами данной статьи^{141, 142} на основе описанного выше нового метода синтеза сфинголипидов¹³⁸ (см. схему 20).

IV. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

1. Иммунологические свойства

Исследования последних лет, связанные с проблемой рака, показали существование значительных различий в структуре и биохимическом составе нормальных и опухолевых клеток, обуславливающих злокачественное перерождение тканей¹⁵³.

В настоящее время установлено, что все гликосфинголипиды обладают свойствами органоспецифичных и тканеспецифичных гаптенов (см. обзор¹⁵⁴). Возможно, находясь в мембранах, гликосфинголипиды участвуют в иммунологическом контроле роста клеток¹⁵⁵.

Широкое исследование гликосфинголипидных гаптенов проводят Раппорт и Граф. Пользуясь методом связывания комплемента, им впервые удалось показать, что выделенный из эпидермоидной карциномы человека индивидуальный липидный гаптен — цитолипин Н является тканеспецифичным веществом ряда злокачественных новообразований, таких как карциномы легкого, спинного мозга, почки и гортани, гранулома Ходжкинса, костная саркома, лимфосаркома, миелогенная лейкемия и малигнантная меланома. С другой стороны, цитолипин Н не реагирует с антисыворотками против карцином прямой и ободочной кишки и эпидермоидной карциномы^{53, 156}. В больших количествах он находится в селезенке, в меньших — в ткани печени раковых больных, а в тканях почки он вообще не был обнаружен.

Неоднократные попытки получить антитела, реагирующие с липидными экстрактами раковых тканей, путем инъекции тканевых фракций нормальных органов окончились неудачей. Отсюда следует, что цитолипин Н, если и присутствует в нормальных органах, то лишь в незначительном количестве¹⁵⁷. К обратному результату привели исследования японских биохимиков^{37, 50, 59, 60} по выделению ряда гликосфинголипидов, в частности лактозилцерамидов, из различных органов, в том числе из почек здоровых людей.

Иммунохимическое исследование дигидроцитолипина Н⁵⁷, а также систематических *D*- и *DL*-эритро-лактозил-N-лигноцерилсфингозинов¹⁵⁸ показало, что наличие двойной связи сфингозина и оптическая деятельность липидной части молекулы не существенны для иммунологической активности цитолипина Н. Однако изменение строения углеводной части молекулы приводит к потере такой активности¹⁵⁹. Отсюда Раппорт сделал вывод⁶¹, который он недавно подтвердил вновь⁶⁶, что иммунологическая специфичность гликосфинголипидных гаптенов, и в частности цитолипина Н, зависит в основном — если не исключительно — от строения углеводной части молекулы. При этом липидные остатки играют роль лишь в локализации гаптена в клеточной мембране.

Эта точка зрения была излишне прямолинейно воспринята Шрамом, Байерсом и Вильсоном¹⁵⁰, которые считают, что лактозиды любых жирных или ароматических спиртов должны вести себя в реакции связывания комплемента так же, как цитолипин Н.

Попытки иммунизации кроликов цитолипином Н, даже в присутствии чистых вспомогательных липидов — лецитина и холестерина — оказались

безуспешными. Специфические антитела были получены при иммунизации смесью цитолипина Н и суммы липидов тканей.

Простейший гликофинголипид — галактоцереброзид^{159, 160} — является органоспецифичным липидом мозга¹⁶¹. Антисыворотка, полученная иммунизацией кроликов фракциями человеческого и коровьего мозга, активна в реакции связывания комплемента с галактоцереброзидом¹⁶⁰ в присутствии вспомогательных липидов, но она не взаимодействует с глюкотоцереброзидом и с цитолипином Н.

Выделенный из почки человека и названный цитолипином К глобозид является органоспецифичным гаптенем почки⁶⁶. Гаптен Форсмана из эритроцитов овцы также содержит характерные для гликофинголипидов остатки сахаров, жирных кислот и сфингозина⁶¹.

Йокояма, Трамс и Брэди¹⁶² предложили хороший метод получения антиганглиозидных сывороток. При иммунизации ганглиозидами, нанесенными на поверхность эритроцитов, был получен высокий титр антител. Специфичность антиганглиозидных антител была продемонстрирована с помощью реакции гемагглютинации, которая почти не наблюдалась с эритроцитами, покрытыми асиалоганглиозидами.

Ганглиозиды мозга, наряду с другими соединениями, ингибируют реакцию гемагглютинации с антителами против резус-положительных эритроцитов¹⁶³, что указывает на существование иммунологического подобия ганглиозидов и антигена группы крови¹⁶⁴. Однако антиганглиозидная сыворотка не реагирует с резус-положительными эритроцитами в гемагглютинационном тесте. По-видимому, это отражает тонкие структурные различия ганглиозидов и антигенной детерминанты (возможно, комплексного липополисахарида¹⁶⁵) резус-положительных эритроцитов человека.

Из эритроцитов человека выделено также два ганглиозидоподобных соединения¹⁶⁵, которые, наряду с мукополисахаридами¹⁶⁶, являются веществами, характерными для группы крови А. Эти вещества отличаются по физико-химическим свойствам и составу от глобозидов эритроцитов человека, которым приписывали групповую активность А, В, О и АВ групп крови¹⁶⁷ человека. Последняя по-видимому объяснялась в данном случае присутствием в препаратах примесей активных мукополисахаридов.

Реакция диазотированного *N*-*p*-аминобензоилдигидропсихозина с белками¹⁶⁸ дает в соответствии с классическим методом диазосвязывания Ландштейнера¹⁶⁹ искусственные антигены. Иммунохимический анализ методом преципитации показал, что антисыворотка, полученная иммунизацией такими искусственными альбуминолипидными антигенами, содержит, по крайней мере, два типа антител — антидигидропсихозинового и антиальбуминового. Однако вопрос, в какой степени полученные таким образом антитела будут комплементарны природным гликофинголипидным гаптенам, остается открытым.

2. Биологическая активность сфингозина и цереброзидов

Одну из стадий сложного процесса свертывания крови¹⁷⁰ катализирует высокомолекулярный липопротеиновый фермент — тромбопластин. Антикоагулянтная активность^{171, 172} сфингозина связана с его анти-тромбопластическим¹⁷³, т. е. антиферментным действием. Это удалось впервые показать на цыплячьей плазме¹⁷⁴.

Применение сравнительно небольших количеств сфингозина в присутствии липидного активатора свертывания крови не дает ингибирующего эффекта, а предварительное инкубирование сфингозина и плазмы крови цыплят и последующее добавление липидного активатора уско-

ряет процесс свертывания в большей степени, чем в случае применения одного липидного активатора.

Таким образом, направление действия сфингозина зависит от его концентрации, от концентрации липидного активатора и от индивидуальных свойств плазмы. Синтетические *эритро*- и *трео*-дигидросфингозины оказались более слабыми ингибиторами свертывания, чем сфингозин, а *N*-бензоилдигидросфингозин и триацетилсфингозин — вообще не активными. Синтетические гомологи сфингозина¹³³ проявляют наибольшую активность при наличии 17—18 углеродных атомов в цепи. Следовательно, присутствие двойной связи, свободных окси- и аминогрупп и длинной углеводородной цепи необходимо для проявления антикоагулянтной активности¹⁷⁴.

Церебровиды при введении в организм экспериментальных животных и человека вызывают усиленное выделение холестерина с фекалиями и снижение уровня холестерина в крови¹⁷⁵. Механизм процесса не установлен.

3. Нейрофизиологическая роль ганглиозидов

В последнее время работами ряда исследователей отмечено большое значение входящих в состав ганглиозидов сиаловых кислот.

Ван Хайнинген показал в опытах *in vitro*¹⁷⁶, что ганглиозиды мозга коровы являются рецепторами токсина столбняка¹⁷⁷, а также таких лекарств, как стрихнин, бруцин и тебаин, обладающих подобным нейрофизиологическим действием¹⁷⁸. Фиксирующая способность ганглиозидов пропорциональна¹⁷⁹ количеству остатков сиаловых кислот, входящих в их состав, но зависит и от строения всей углеводной части молекулы. Например, несодержащие тексозамина гематозиды, выделенные из мозга или эритроцитов лошади, и ганглиозид, накапливающийся в селезенке человека при болезни Тай-Захе, практически не активны¹⁷⁸.

Фиксация токсина столбняка ганглиозидами строго специфична именно для этого токсина, а неспецифичная инактивация ими же токсинов дифтерии и стафилококков, отмеченная Норсом и Дозри^{180, 181}, ничего общего не имеет с фиксацией токсина столбняка, при которой инактивация последнего как раз не наблюдается¹⁷⁶. Ганглиозиды взаимодействуют также с серотонином, триптофаном и родственными соединениями, но не взаимодействуют с γ -аминомасляной и β -окси- γ -аминомасляной кислотами, а также гистамином, адреналином и норадреналином¹⁷⁸.

Процесс фиксации токсина столбняка рецептором-ганглиозидом в нервной ткани непосредственно связан с механизмом действия токсина. Помимо высокой специфичности, это подтверждается также тем, что как ингибируемые токсином синапсы, так и ганглиозиды находятся в сером веществе головного мозга.

В литературе описано также взаимодействие ганглиозидов с эндотоксином бактерий, вызывающих лихорадку, которое приводит к расстройству терморегуляции тела¹⁸².

Возможно, взаимодействие ганглиозида с токсином или рядом лекарств, указанных выше, является первым шагом, который ведет к биохимическому поражению, лежащему в основе их фармакологического действия. С другой стороны, рецептор может быть ответственным за адсорбцию токсина в места инфекции, его локализацию в нервных клетках и последующий центростремительный перенос по нервным стволам к месту действия в головной или спинной мозг. Однако ни одна из этих гипотез не может быть принята без оговорок.

Ганглиозиды мозга ассоциируются главным образом с фракциями субклеточных частиц¹⁸³, имеющими сходство с основными белками¹⁸⁴,

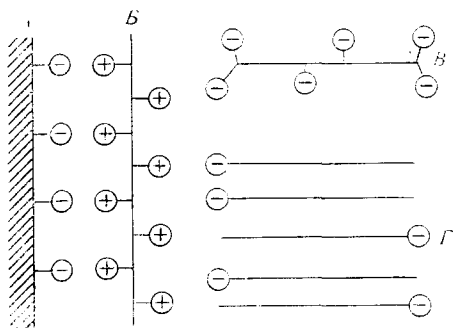
особенно с микросомами¹⁸⁵ и, в меньшей степени, с митохондриями. Они легко экстрагируются из мозга, однако при добавлении к суспензии субклеточных фракций **основных белков**, например, протамина, выделить ганглиозиды не удается¹⁴². По-видимому, нативные ганглиозиды — кислотные компоненты богатых липидами мембран, участвующие в активном транспорте катионов, — соединяются ионными силами с основными белками. Отсюда противоположное влияние последних и ганглиозидов на возбудимость мозга.

Нормальный мозг проявляет непрерывную электрическую и метаболическую активность, которую можно стимулировать, в частности, электрическими импульсами¹⁸⁷. Изолированная мозговая ткань в подходящем питательном растворе может дышать и отвечать на электрические возбуждения повышением усвоения глюкозы и кислорода¹⁸⁸. При охлаждении такой системы до 0° дыхательный ответ на электрическое возбуждение составляет всего 15% от максимальной реакции нормальной ткани, однако возрастает до 52—80% при добавлении 60—120 мкг/мг ганглиозидов. Очевидно, при охлаждении ткани гистоны — основные белки, связанные с рибонуклеиновой кислотой в ядрах клеток, — теряют способность образовывать нуклеогистоновый гель¹⁸⁴. Они отделяются от РНК и мигрируют из ядер, блокируя кислотные участки мембран. Это приводит к прекращению обратного перемещения ионов калия в церебральную ткань после стимуляции. Добавленные ганглиозиды ассоциируются с этими основными белками и компенсируют их действие^{189–192}.

Ингибирование возбудимости мозга протаминнами протекает так же, как при охлаждении, и точно так же устраняется ганглиозидами.

Обычные кислотные реагенты не могут заменить ганглиозиды. Ни N-ацетилнейраминная кислота, ни L-глутаминовая кислота не дают эффекта восстановления возбудимости. Монокислотные вещества, не способные образовывать агрегаты, могут лишь нейтрализовать основные группы протамина, а этого недостаточно для восстановления возбудимости, связанной с наличием на наружной поверхности мембраны кислотных групп (см. схему 23). С другой стороны, поликислотные вещества — сиаломукополисахариды, хондроитинсульфат, поли-L-глутаминовая кислота, ароматическая гексасульфоновая кислота — сурамин или мицеллярные агрегаты таких веществ как лецитин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и фосфатидилсерин, соединения, сильно различающиеся по структуре — ведут себя подобно ганглиозидам¹⁹³.

СХЕМА 23



Предполагаемое взаимодействие между кислотными участками ткани (А), основными белками (Б) и поликислотными молекулами (В) или мицеллярными агрегатами (Г).

Указанная активность ганглиозидов выше активности всех прочих соединений, она возрастает с увеличением числа входящих в их состав остатков сиаловых кислот. Характерно, что ганглиозиды восстанавливают возбудимость мозговой ткани, присутствуя в концентрациях, близких к критической концентрации образования мицеллы. По всей вероятности, индивидуальные молекулы ганглиозидов сначала взаимодействуют с тканями, связывающими протамины, а затем уже объединяются в мицеллы.

Аналогичное объяснение получили метахроматические свойства ганглиозидов¹⁹⁴, т. е. способность образовывать с подходящими основными красителями (например, толуидиновым синим или пинацианоилом¹⁹⁵) ассоциаты, отличающиеся по цвету от самого красителя¹⁹⁶. Этот эффект вызывается ассоциацией молекул красителей с соответствующим образом расположенными кислотными группами вещества, которое подвергается окраске¹⁹⁷. По-видимому, молекула тиазинового красителя соединяется с кислотными группами мицеллярных ганглиозидов за счет ионных сил, а затем ассоциируется вторичными силами с образованием метахроматических димеров и полимеров. В органических растворителях эффект исчезает; происходит это, видимо, в результате изменения строения мицелл ганглиозидов — удаления с поверхности сферы остатков сиаловых кислот, а также за счет такого взаимодействия красителя с растворителем, которое разрушает метахроматический агрегат. Благодаря способности взаимодействовать с ганглиозидами, протамин также ингибирует метахроматическую реакцию с толуидиновым синим.

По изучению локализации ганглиозидов в нервной системе гистохимическим методом на основе метахроматических реакций Кениг¹⁹⁸ установил, что гликолипопротеиновые цитоплазматические гранулы, так называемые синаптические пузырьки, содержащие ацетилхолин¹⁹⁹, богаты также ганглиозидами. В связи с этим Бартоном и сотрудниками^{109, 200} была выдвинута гипотеза о роли ганглиозидов в передаче нервного импульса через синапс в соответствии с представлениями о нейро-гуморальном механизме. В настоящее время, однако, эти представления уступают место концепции²⁰¹ о единообразной функции ацетилхолина в синаптических соединениях и в проводящих мембранах аксонов.

Как видно из вышеизложенного, роль ганглиозидов в нейрофизиологических процессах весьма существенна, хотя наши знания в этой области пока еще совершенно недостаточны.

Дальнейшее углубление представлений о значении гликосфинголипидов в биологических системах будет определяться, вероятно, главным образом развитием биохимических, биофизических и синтетических работ в этой области. Ближайшей задачей становится не только выяснение первичной структуры новых, до сих пор неизвестных, типов гликосфинголипидов, но и установление форм их реального существования в трехмерном пространстве, тех форм, в которых они и осуществляют свои биологические функции.

* * *

За время подготовки рукописи к печати вышли в свет интересные обзоры по химии ганглиозидов²⁰² и сульфатидов²⁰³, по методам анализа гликолипидов²⁰⁴, а также сводная статья, посвященная иммунохимическим свойствам гликолипидов²⁰⁵. Дальнейшие исследования^{206–208} привели к выделению ряда новых сфингозиновых оснований из животных тканей. Так что в настоящее время уже известно двадцать соединений этого типа, различающихся длиной цепи, количеством гидроксильных

групп и степени ненасыщенности. Выделен ряд новых гликофинголипидов: О-ацилцереброзиды из бычьего мозга²⁰⁹, а также ганглиозиды из мозга^{210, 211}, лейкоцитов²¹² и плаценты²¹³ человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Carter, D. Galanos, G. Fujino, *Canad. J. Biol. and Physiol.*, **34**, 320 (1956).
2. K. Karlsson, *Acta chem. scand.*, **18** (10), 2397 (1964).
3. F. Blix, A. Gottschalk, E. Klenk, *Nature*, **179**, 1088 (1957).
4. J. L. W. Thudichum, *Die chemische Konstitution des Gehirns*, Pietzecker, Tübingen, 1901.
5. P. Levene, C. West, *J. Biol. Chem.*, **16**, 549 (1913).
6. P. Levene, C. West, Там же, **18**, 481 (1914).
7. E. Klenk, *Ztschr. physiol. Chem.*, **185**, 169 (1929).
8. E. Klenk, W. Diebold, Там же, **198**, 25 (1931).
9. H. Carter, *J. Biol. Chem.*, **142**, 449 (1942).
10. H. Carter, F. Glick, W. Norris, G. Phillips, Там же, **170**, 285 (1947).
11. H. Carter, C. Humiston, Там же, **191**, 727 (1951).
12. J. Kiss, *Helv. chim. acta*, **37**, 1471 (1954).
13. H. Carter, D. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1007 (1953).
14. K. Mislow, Там же, **74**, 5155 (1952).
15. G. Marinetti, E. Stotz, Там же, **76**, 1347 (1954).
16. A. Lesuk, R. Anderson, *J. Biol. Chem.*, **139**, 457 (1941).
17. H. Carter, W. Norris, Там же, **145**, 709 (1942).
18. H. Carter, W. Norris, F. Glick, G. Phillips, R. Harris, Там же, **170**, 269 (1947).
19. M. Prostenik, B. Majhofer-Orescanin, *Naturwiss.*, **47** (17), 399 (1960).
20. B. Majhofer-Orescanin, M. Prostenik, *Croat. chem. acta*, **33** (4), 219 (1961).
21. R. Garver, S. Sweeney, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42** (4), 234 (1965).
22. N. Stanacev, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, **59**, 733 (1962).
23. A. Rosenberg, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.*, **232**, 1031 (1958).
24. N. Stanacev, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, **98** (1), 168 (1965).
25. K. Sambasivarao, R. McCluer, *J. Lipid Res.*, **5** (1), 103 (1964).
26. K. Karlsson, *Nature*, **188**, 312 (1960).
27. K. Karlsson, *Acta chem. scand.*, **18** (2), 565 (1964).
28. J. Thudichum, *A Treatise on the Chemical Composition of Brain*, 1884.
29. E. Klenk, *Ztschr. physiol. Chem.*, **153**, 74 (1956).
30. E. Klenk, R. Harle, Там же, **189**, 243 (1930).
31. A. Chibnall, S. Piper, E. Williams, *Biochem. J.*, **55**, 707 (1953).
32. A. Chibnall, S. Piper, E. Williams, Там же, **55**, 711 (1953).
33. G. Hooghwinkel, P. Borri, J. Riemersma, *Rec. trav. chim., Pays — Bas*, **83** (6), 576 (1964).
34. J. O'Brien, G. Rouser, *J. Lipid Res.*, **5** (3), 339 (1964).
35. O. Hillborg, L. Svennerholm, *Acta paediatr.*, **49**, 707 (1960).
36. N. Halliday, H. Deuel, L. Tragenman, W. Ward, *J. Biol. Chem.*, **132**, 171 (1940).
37. A. Makita, T. Yamakawa, *J. Biochem.*, **51** (2), 124 (1962).
38. J. Pryde, R. Humphreys, *Biochem. J.*, **18**, 661 (1924).
39. J. Pryde, R. Humphreys, Там же, **20**, 825 (1926).
40. H. Carter, F. Greenwood, *J. Biol. Chem.*, **199**, 283 (1952).
41. Н. К. Кочетков, И. Г. Жукова, И. С. Глуходед, *Biochim. et Biophys. acta*, **70** (6), 716 (1963).
42. Н. К. Кочетков, И. Г. Жукова, И. С. Глуходед, *ДАН*, **139**, 608 (1961).
43. G. Blix, *Z. physiol. Chem.*, **219**, 82 (1933).
44. L. Svennerholm, H. Thorin, *J. Lipid Res.*, **3**, 483 (1962).
45. J. O'Brien, D. Fillerup, J. Mead, Там же, **5**, (1), **109** (1964).
46. H. Yatzkewitz, *Ztschr. physiol. Chem.*, **320**, 134 (1960).
47. J. Bakke, W. Cornatzer, *Federat. Proc.*, **19**, 224 (1960).
48. J. Bakke, W. Cornatzer, *J. Biol. Chem.*, **236**, 653 (1961).
49. S. Thannhauser, N. Boncoddio, *Federat. Proc.*, **12**, 280 (1953).
50. T. Yamakawa, N. Kiso, S. Nanda, A. Makita, S. Yokoyama, *J. Biochem.*, **52**, 226 (1962).
51. A. Lloyd K. Dodgson, *Biochim. et biophys. acta*, **46**, 116 (1961).
52. S. Hakomori, T. Yshimoda, K. Nakamura, *J. Biochem.*, **52**, 468 (1962).
53. M. Rapport, L. Graf, N. Alonzo, *Cancer*, **12**, 438 (1959).

54. M. Rapport, L. Graf, J. Yariv, *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 438 (1961).
55. M. Rapport, V. Skipski, C. Sweeley, *J. Lipid Res.*, **2**, 148 (1961).
56. E. Klenk, F. Reinkamp, *Ztschr. physiol. Chem.*, **273**, 253 (1942).
57. M. Rapport, H. Schneider, L. Graf, *J. Biol. Chem.*, **237** (4), 1056 (1962).
58. E. Klenk, *Ztschr. physiol. Chem.*, **291**, 259 (1952).
59. A. Makita, *J. Biochem.*, **55** (3), 269 (1964).
60. A. Makita, T. Yamakawa, Там же, **55** (4), 365 (1964).
61. M. Rapport, *J. Lipid Res.*, **2** (1), 25 (1961).
62. T. Yamakawa, R. Yrie, M. Iwanaga, *J. Biochem.*, **48** (4), 490 (1960).
63. W. Morrison, L. Smith, *Biochim. et biophys. acta*, **84**, 759 (1964).
64. T. Yamakawa, *J. Biochem.*, **39**, 393 (1952).
65. T. Yamakawa, S. Yokoyama, N. Kiso, Там же, **52**, 228 (1962).
66. M. Rapport, L. Graf, T. Schneider, *Arch. Biochem. Biophys.*, **105** (2), 431 (1964).
67. A. Makita, M. Iwanaga, T. Yamakawa, *J. Biochem.*, **55** (2), 202 (1964).
68. S. Hakomori, R. Yanloz, *J. Biol. Chem.*, **239** (10), PC 3606 (1964).
69. T. Yamakawa, S. Suzuki, *J. Biochem.*, **38**, 199 (1951).
70. E. Klenk, G. Padberg, *Ztschr. physiol. Chem.*, **327**, 249 (1962).
71. A. Gottschalk, *The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*, Cambridge Univ. Press, 1960.
72. A. Gottschalk, *Revs Pure Appl. Chem. (Australia)*, **12**, 46 (1962).
73. L. Svennerholm, *Acta chem. scand.*, **17**, 860 (1963).
74. E. Klenk, W. Gielen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **319**, 283 (1960).
75. E. Berman, S. Gatt, In *Cerebral sphingolipidoses*, Acad. Press, N. Y., 1962, стр. 237.
76. E. Klenk, W. Gielen, G. Padberg, Там же, стр. 301.
77. G. Tettamanti, L. Bertona, V. Sambotti, *Biochim. et biophys. acta*, **84** (6), 756 (1964).
78. K. Landsteiner, P. Levene, *J. Immunol.*, **10**, 731 (1925).
79. E. Klenk, *Ztschr. physiol. Chem.*, **273**, 76 (1942).
80. E. Klenk, W. Gielen, *Bull. Soc. chim. biol.*, **42**, 1395 (1960).
81. L. Svennerholm, *Nature*, **177**, 524 (1956).
82. E. Trams, L. Ginfriida, A. Karmen, Там же, **193**, 680 (1962).
83. L. Svennerholm, A. Raal, *Biochim. et biophys. acta*, **53**, 422 (1961).
84. R. Kuhn, H. Wiegandt, H. Egge, *Angew. Chemie*, **73**, 580 (1961).
85. E. Klenk, W. Gielen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **326**, 158 (1961).
86. J. Dain, G. Schmidt, S. Thannhauser, *Federat. Proc.*, **20**, 269 (1961).
87. L. Svennerholm, *J. Lipid Res.*, **5** (2), 145 (1964).
88. E. Klenk, W. Gielen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **326**, 144 (1962).
89. R. Cote, W. Morgan, *Nature*, **178**, 1171 (1956).
90. L. Svennerholm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 436 (1962).
91. E. Klenk, U. Hendricks, W. Gielen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **330**, 140 (1962).
92. T. Painter, J. Cheese, W. Morgan, *Chem. Ind.*, **1962**, 1535.
93. R. Kuhn, H. Wiegandt, *Chem. Ber.*, **96**, 866 (1963).
94. G. Johnson, R. McCluer, *Biochim. et biophys. acta*, **84** (5), 587 (1964).
95. L. Svennerholm, *J. Neurochem.*, **10**, 613 (1963).
96. E. Klenk, W. Gielen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **330**, 218 (1963).
97. R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gaude, P. Klesse, W. Lochinger, E. Röhm, H. Trischmann, D. Tschampel, *Angew. Chemie*, **72**, 805 (1960).
98. A. Rosenberg, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, **42**, 357 (1960).
99. E. McGuire, S. Binkley, *Federat. Proc.*, **21**, 172 (1962).
100. D. Aminoff, F. Dodyk, S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, **238**, PC 1177 (1963).
101. R. Kuhn, H. Wiegandt, *Naturforsch.*, **18b**, 541 (1963).
102. L. Wolfe, J. Lowden, *Canad. J. Biochem.*, **42** (7), 1041, 1057 (1964).
103. R. Kuhn, H. Wiegandt, *Naturforsch.*, **19b**, 80 (1964).
104. H. Wiegandt, G. Baschang, Там же, **206** (2), 164 (1965).
105. G. Uhlenbruck, M. Krüpe, *Nature*, **199**, 1289 (1963).
106. J. Koscielak, *Biochim. et biophys. acta*, **78** (2), 313 (1963).
107. A. Rosenberg, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.*, **232**, 1031 (1958).
108. S. Bogoch, *Biochem. J.*, **68**, 319 (1958).
109. R. Howard, R. Burton, *Biochem. Pharmacol.*, **13** (12), 1677 (1964).
110. H. Carter, W. Norris, H. Rockwell, *J. Biol. Chem.*, **170**, 295 (1947).
111. G. Gregory, T. Malkin, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 2453.
112. K. Stållberg-Stenhagen, *Arkiv kemi mineralogi geol.*, **20**, A (19) (1945).
113. C. Grob, E. Jenny, H. Utzinger, *Helv. chim. acta*, **34**, 2249 (1951).
114. M. Egerton, G. Gregory, T. Malkin, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 2272.
115. M. Prostenik, N. Stanacev, *J. Organ. Chem.*, **18** (1), 59 (1953).
116. J. Sallay, F. Dutka, G. Fodor, *Helv. chim. acta*, **37**, 778 (1954).

117. E. Jenny, C. Grob, Там же, **36**, 1454 (1953).
118. C. Grob, Там же, **36**, 1454 (1953).
119. H. Carter, J. Harrison, D. Shapiro, J. Am. Chem. Soc., **75**, 4705 (1953).
120. H. Carter, D. Shapiro, Там же, **75**, 5131 (1953).
121. K. Sisidi, N. Hirowatati, T. Ysida, J. Organ. Chem., **29** (9), 2783 (1964).
122. G. Myers, J. Am. Chem. Soc., **74**, 1390 (1952).
123. B. A. Артамонов, ЖОХ, **28**, 1355 (1958).
124. D. Shapiro, H. Segal, H. Flowers, J. Am. Chem. Soc., **80**, 2170 (1958).
125. R. Japp, F. Klingemann, Chem. Ber., **20**, 2942, 3284, 3398 (1887).
126. D. Shapiro, T. Sheradsky, J. Am. Chem. Soc., **28**, 2157 (1963).
127. J. Controulis, M. Rebstock, H. Crooks, Там же, **71**, 2463 (1949).
128. D. Shapiro, H. Segal, H. Flowers, Там же, **80** (5), 1194 (1958).
129. C. Grob, F. Gadiant, Helv. chim. acta, **40**, 1145 (1957).
130. S. Britol, W. Firth мл., J. Organ. Chem., **26** (1), 280 (1961).
131. B. Majhofer-Orescanin, M. Prostenik, Croat. chem. acta, **34**, 161 (1962).
132. B. Majhofer-Orescanin, M. Prostenik, Tetrahedron, **12**, 56 (1961).
133. E. Jenny, J. Druey, Helv. chim. acta, **42** (2), 401 (1959).
134. B. Weiss, J. Organ. Chem., **26**, 491 (1961).
135. D. Shapiro, H. Flowers, J. Am. Chem. Soc., **83** (15), 3327 (1961).
136. B. Weiss, J. Organ. Chem., **26**, 491 (1961).
137. D. Shapiro, E. Rachaman, T. Sheradsky, J. Am. chem. Soc., **86**, 4472 (1964).
138. А. Я. Вейнберг, Л. А. Вакулова, В. Г. Майрановский, Г. И. Самохвалов, ЖОХ, **34** (12), 3979 (1964).
139. J. Sicher, M. Pankow a, Coll. Czech. Chem. Comm., **20**, 1409 (1955).
140. А. Я. Вейнберг, Л. А. Вакулова, Г. И. Самохвалов, ЖОрХ, **2**, 337 (1966).
141. А. Я. Вейнберг, Л. А. Вакулова, Г. И. Самохвалов, Ж. ВХО им. Менделеева, **9** (3), 348 (1964).
142. А. Я. Вейнберг, Л. А. Вакулова, Г. И. Самохвалов, ЖОрХ, **1** (5), 968 (1965).
143. W. Perkin, J. Chem. Soc., **51**, 362 (1887).
144. M. Prostenik, N. Krvavica, Croat. chem. acta, **29** (2), 101 (1957).
145. B. Helferich, K. Weiss, Chem. Ber., **89**, 314 (1956).
146. J. Kiss, Chimia, **13**, 115 (1959).
147. J. Kiss, Acta chim. Acad. sci hung., **5**, 477 (1955).
148. R. Brady, J. Biol. Chem., **237** (7), PC 2416 (1962).
149. D. Shapiro, J. Amer. Oil Chem. Soc., **42** (4), 267 (1965).
150. A. Schram, E. Byers, R. Wilson, Nature, **197**, 1074 (1963).
151. M. Sribney, E. Kennedy, J. Biol. Chem., **233**, 1315 (1958).
152. D. Shapiro, E. Rachaman, Nature, **201**, 878 (1964).
153. E. Day, Ann. Rev. Biochem., **31**, 549 (1962).
154. R. O. Brady, E. G. Trams, Там же, **33**, 75 (1964).
155. H. Green, In Ciba Foundat. Sympos. Carcinogenesis, London, Churchill, **1959**, 131.
156. L. Graf, M. Rapport, Cancer Res., **20**, 546 (1960).
157. M. Rapport, L. Graf, Там же, **21**, 1225 (1961).
158. M. Rapport, L. Graf, Nature, **201**, 879 (1964).
159. S. Joffe, M. Rapport, L. Graf, Там же, **197**, 60 (1963).
160. M. Rapport, L. Graf, L. Autilio, W. Norton, J. Neurochem., **11** (12), 855 (1964).
161. B. Yankovic, K. Isakovic, L. Micailovic, Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol., **17**, 211 (1960).
162. M. Yokoyama, E. Trams, R. Brady, J. Immunol., **90**, 372 (1963).
163. M. Dodd, N. Bigley, V. Geyer, Science, **132**, 1398 (1960).
164. M. Dodd, N. Bigley, V. Geyer, J. Immunol., **90** (4), 518 (1963).
165. B. Urbaschek, O. Thide, J. Gurndice, O. Preisler, Naturwiss., **50**, 229 (1963).
166. E. Kabat, Blood Group Substances, N. Y., 1956.
167. T. Yamakawa, M. Matsumoto, S. Suzuki, T. Yida, J. Biochem., **43** (1), 41 (1956).
168. T. Taketomi, T. Yamakawa, Там же, **54** (5), 444 (1963).
169. K. Landsteiner, The Specificity of Serological Reactions, Cambridge, 1947.
170. Я. В. Бялик, Е. Л. Ходорова, Биохимия свертывания крови, 1957.
171. W. Seegers, R. Landaburn, Federat. Proc., **16**, 116 (1957).
172. E. Hecht, Там же, **16**, 194 (1957).
173. L. Tocantins, R. Carroll, Blood Clotting and Allied Problems, N. Y.—London, 1949.
174. E. Hecht, D. Shapiro, Science, **125**, 1041 (1957).

175. K. Carroll, *J. Lipid Res.*, **1** (2), 171 (1960).
176. W. Van Heyningen, P. Miller, *J. Gen. Microbiol.*, **24**, 107 (1961).
177. W. Van Heyningen, Там же, **20** (2), 310 (1959).
178. W. Van Heyningen, Там же, **31**, 375 (1963).
179. A. Bernheimen, W. Van Heyningen, Там же, **24**, 121 (1961).
180. E. North, H. Doery, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **42**, 23 (1961).
181. H. Doery, E. North, *Austral. J. Exptl. Biol. and Med. Sci.*, **39**, 333 (1961).
182. O. Westphal, *Naturwiss.*, **45**, 60 (1959).
183. L. Wolfe, *Biochem. J.*, **79**, 348 (1961).
184. L. Wolfe, H. McIlwain, Там же, **78**, 33 (1961).
185. J. Wherett, H. McIlwain, Там же, **84**, 232 (1962).
186. L. Wolfe, Там же, **77**, 9P (1960).
187. H. McIlwain, *Chemical Exploration of the Brain*, Amsterdam, 1963.
188. H. McIlwain, *Biochem. J.*, **49**, 382 (1951).
189. C. Thompson, H. McIlwain, Там же, **79**, 342 (1961).
190. R. Woodman, H. McIlwain, Там же, **79**, 1P (1961).
191. H. McIlwain, *J. Physiol.*, **152**, 60P (1960).
192. S. Balakrishnan, H. McIlwain, *Biochem. J.*, **81**, 72 (1961).
193. H. McIlwain, Там же, **90** (2), 442 (1964).
194. A. Harris, A. Saifer, *Cerebral Sphingolipidoses*, 1962, 271.
195. A. Harris, A. Saifer, *J. Neurochem.*, **5**, 218 (1960).
196. D. Booth, Там же, **9**, 265 (1962).
197. B. Sylvan, *Quart. J. Microscop. Sci.*, **95**, 327 (1954).
198. K. Koenig, *Nature*, **195**, 782 (1962).
199. D. Nachmansohn, *Chemical and Molecular basis of nerve activity*, N. Y.—London, Acad. Press, 1959, стр. 235.
200. R. Barton, R. Howard, S. Baer, J. Balfour, *Biochim. et biophys. acta*, **84**, (4), 441 (1964).
201. Д. Нахмансон, *Молекулярная биология, Проблемы и перспективы*, М., 1964, стр. 282.
202. R. Ledeen, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **43** (2), 57 (1966).
203. P. J. Stoffyn, Там же, **43** (2), 69 (1966).
204. H. E. Carter, *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 109 (1965).
205. R. O. Brady, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **43** (2), 67 (1966).
206. K. A. Karlsson, *Acta Chem. Scand.*, **19** (10), 2423, 2425 (1965).
207. C. Michalec, *Biochim. Biophys. Acta*, **106** (1), 197 (1965); **116** (2), 400 (1966).
208. C. Michalec, Z. Kollman, *Clin. Chim. Acta*, **13** (4), 529 (1966).
209. И. Г. Жукова, И. С. Глуходед, Н. К. Кочетков, *ДАН*, **167** (2), 346 (1966).
210. R. J. Penich, R. H. McCluer, *Biochem. Biophys. Acta*, **106** (2), 435 (1965).
211. R. J. Penich, M. H. Meisler, R. H. McCluer, Там же, **116** (2), 279 (1966).
212. C. Miras, J. D. Mantzos, G. M. Levis, *Biochem. J.*, **38** (3), 782 (1966).
213. L. Svennerholm, *Acta chem. Scand.*, **19**, 1506 (1965).

Всесоюзный н.-и. витаминный ин-т,
Москва