



УДК 577.114.5:579.842.14.083.3

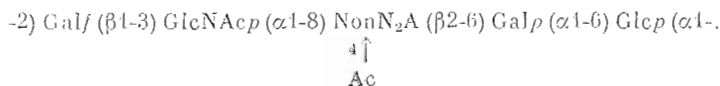
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ. СТРОЕНИЕ ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA BOYDII*, ТИП 7

Львов В. Л., Шапков А. С.*, Дмитриев Б. А.

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР, Москва;

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

Из антигенного липополисахарида бактерий *Shigella boydii*, тип 7, мягким кислотным гидролизом получен полисахарид, построенный из остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, *D*-глюкозы, *D*-галактозы, 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-7-[(3*R*)-3-гидроксибутирамидо]-*L*-глицеро-*L*-манно-полулозоновой кислоты (NonN₂A) и ацетата в соотношении 1 : 1 : 2 : 1 : 1. На основании данных анализа методом метилирования, сольволиза жидким фтористым водородом и избирательного расщепления по Смитту установлена структура повторяющегося звена полисахарида, которое представляет собой линейный пентасахарид



Проведена полная интерпретация ¹³C-ЯМР-спектра полисахарида, подтверждающая его строение.

Недавно мы сообщили об идентификации в составе О-специфического липополисахарида *Shigella boydii*, тип 7, нового необычного моносахарида, являющегося впервые обнаруженным в природе аналогом *N*-ацетилнейрамидиновой кислоты, а именно 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-7-[(3*R*)-3-гидроксибутирамидо]-*L*-глицеро-*L*-манно-полулозоновой кислоты [1, 2], для обозначения которой мы используем символ NonN₂A. В настоящей работе мы приводим результаты установления строения повторяющегося звена полисахарида *Sh. boydii*, тип 7.

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток *Sh. boydii*, тип 7, экстракцией горячим водным фенолом с последующим осаждением нуклеиновых кислот в виде солей с цетавлоном и ультрацентрифугированием [3]. Полученный липополисахарид расщепляли нагреванием с 1% уксусной кислотой (100°С, 1,5 ч) и супернатант после отделения нерастворимого осадка липида А хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Полученный таким образом полисахарид (ПС-1), [α]_D²⁰ +41°, по данным электрофореза на бумаге, был кислым (E_{GICA} 0,32) и давал интенсивную цветную реакцию с резорциновым реагентом на сialовые кислоты [4]. В его ИК-спектре имелись полосы поглощения ацетамидной (1650, 1570 см⁻¹) и карбоксильной (1740 см⁻¹) групп.

В ПМР-спектре нативного ПС-1 в области резонанса аномерных протонов присутствовал уширенный сигнал с δ 5,30 м.д. и три перекрывающихся дублетных сигнала с одинаковой константой спин-спинового взаимодействия (KССВ) *J* 3,5 Гц и близкими химическими сдвигами (δ 5,02–5,09 м.д.) при соотношении интегральных интенсивностей синглета и мультиплета 1 : 3. В сильнополюсной области спектра наблюдались два синглета ацетильных групп (δ 2,09 и 2,15 м.д.) с соотношением интегральных интенсивностей 3H : 6H, уширенный двухпротонный дублет при

Сокращения: NonN₂A. NonN₂ – 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-7-[(3*R*)-3-гидроксибутирамидо]-*L*-глицеро-*L*-манно-полулозоновая кислота и -полулоза; Egl – этиленгликоль.

δ 2,45 м.д., два однопротонных сигнала при δ 2,56 м.д. (дублет дублетов, J 4,5 и 12,8 Гц) и 1,88 м.д. (триплет, J 12,8 Гц). В области резонанса С-метильных групп находились два трехпротонных дублета с J 6 Гц и почти совпадающими химическими сдвигами ($\delta \sim 1,35$ м.д.).

Спектр ПМР О-дезацетилированного полисахарида (ПС-2) во всех деталях повторял спектр ПС-1, за одним исключением: соотношение интенсивностей синглетов при 2,09 и 2,15 м.д. в нем становилось равным 1 : 1. Все сигналы в сильном поле спектра ПМР ПС-2, кроме одного из сигналов в области 2 м.д., принадлежали протонам остатка кислоты NonN₂A, выделенной в виде гликозида этиленгликоля из исследуемого полисахарида [1, 2]. Как показано ранее [1, 2], кислота NonN₂A ацилирована по аминогруппе при С7 (3R)-3-гидроксимасляной кислотой. Этим объясняется появление в спектре ПМР ПС-1 и ПС-2 одного из дублетов в области резонанса С-метильных групп и двухпротонного дублета при δ 2,45 м.д. Второй дублет в области резонанса С-метильных групп следует отнести за счет протонов при С9 самой кислоты. Однопротонный дублет дублетов с δ 2,56 м.д. и триплет с δ 1,88 м.д., несомненно, принадлежат экваториальному и аксиальному протонам при С3 нонулозоновой кислоты, а величины их химических сдвигов свидетельствуют об аксиальной ориентации карбоксильной группы при аномерном С2, т. е. β -конфигурации [1, 2]. Об N-ацелировании аминогруппы при С5 в остатке NonN₂A свидетельствовало наличие синглетного сигнала с δ 2,09 и 2,15 м.д. Таким образом, по данным ПМР-спектроскопии, в состав повторяющегося звена ПС-1 наряду с остатком нонулозоновой кислоты входят четыре альдозы, одна из которых является N-ацетиламиносахаром, причем один из пяти моносахаридных остатков несет О-ацетильную группу.

Спектры ¹³С-ЯМР ПС-1 и ПС-2 (рис. 1 и 2) содержали в области аномерных атомов углерода пять сигналов. Самый слабополярный из них с 107,4 м.д. принадлежит фуранозному остатку с транс-ориентированными заместителями при С1 и С2 [5]. В спектре, снятом в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия (GD-спектр), ¹J_{Н1-С1} для этого сигнала составила 173,9 Гц. Сигнал при 102,2 м.д. в спектре ПС-1 и соответствующий ему сигнал при 101,5 м.д. в спектре ПС-2 не претерпевали расщепления в условиях съемки GD-спектров и, следовательно, принадлежали С2 остатка нонулозоновой кислоты. Остальные сигналы в области резонанса аномерных атомов углерода имели химические сдвиги и ¹J_{Н1-С1}, характерные для пиранозидных остатков с аксиальной ориентацией заместителя при С1 (170–171 Гц) [5]. Эти данные указывают на наличие в повторяющемся звене полисахарида наряду с остатком NonN₂A одного остатка β -фуранозы и трех остатков α -пираноз.

В гидролизате ПС-1 (2 М HCl, 100° С, 3 ч) с помощью ионообменной хроматографии в боратном буфере были идентифицированы глюкоза и галактоза в соотношении 1 : 2. Деаминарование гидролизата азотистой кислотой с последующим восстановлением боргидридом натрия, ацелированием и ГЖХ-анализом полученных таким образом ацетатов полиолов [6] позволило наряду с глюкозой и галактозой идентифицировать эквивалентное (по отношению к глюкозе) количество 2-амино-2-дезоксиглюкозы, содержание которой, по данным ионообменной хроматографии с использованием аминокислотного анализатора, составило 15,5% (гидролиз ПС-1 4 М HCl, 100° С, 16 ч). Нонулозоновая кислота в условиях кислотного гидролиза разрушается с заметным осмолением растворов полисахаридов, вследствие чего выделить ее в свободном состоянии не удалось.

Гексозные компоненты гидролизата ПС-1 были выделены препаративной хроматографией на бумаге и на основании измерения величин удельного оптического вращения отнесены к D-ряду. Таким образом, учитывая данные ЯМР-спектроскопии, можно заключить, что в состав пентасахаридного звена полисахарида *Sh. boydii*, тип 7, входят 5-ацетиамидо-3,5,7,9-тетрадезоксигуано-[(3R)-3-гидроксибутирамидо]-L-глицеро-L-манно-нонулозоновая кислота, D-глюкоза, D-галактоза и 2-ацетиамидо-2-дезоксигуано-глюкоза в соотношении 1 : 1 : 2 : 1.

Для выяснения характера замещения моносахаридных остатков в поли-

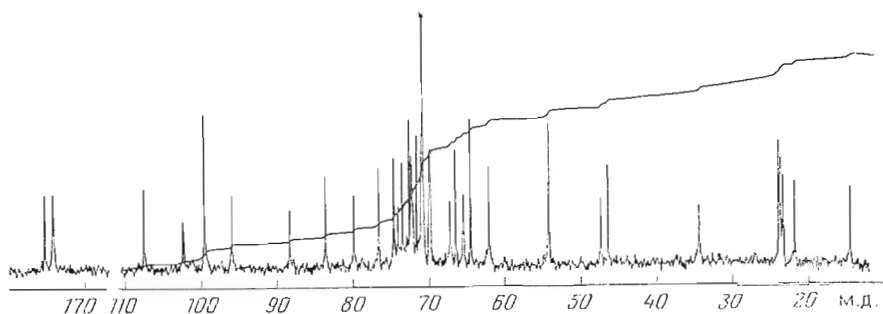


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР нативного полисахарида ПС-1

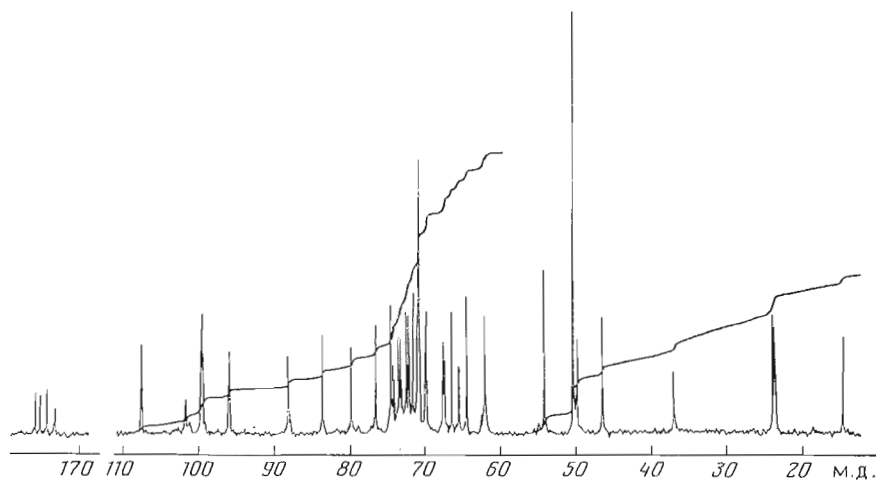


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР О-ацетилированного полисахарида ПС-2

сахаридной цепи был использован анализ методом метилирования. При исследовании гидролизата метилированного по Хакомори [7] ПС-2 с помощью хроматомасс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов были идентифицированы 1,2,4-три-О-ацетил-3,5,6-три-О-метилгалактитол, 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилглюцитол и аналогичным образом замещенный галактитол в эквимольных количествах с временами удерживания 1,95; 2,25 и 2,90 соответственно относительно 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилглюцитола. Метанолизат метилированного ПС-2 в качестве единственного аминсахарного компонента содержал 2-метиламино-2-дезоксид-4,6-ди-О-метил- α,β -метил-*D*-глюкопиранозид, который был идентифицирован с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии в виде О,N-ацетата сравнением с заведомым образцом [8]. Из приведенных данных следовало, что полисахарид имеет линейную структуру, остаток *D*-глюкопиранозы и один из остатков *D*-галактопиранозы замещены в положение 6, остаток *D*-галактофуранозы замещен в положение 2, а остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы — в положение 3.

Для выяснения характера замещения нонулозоновой кислоты был использован следующий прием. ПС-2 был восстановлен по карбоксильным группам [9] и далее подвергнут мягкому кислотному гидролизу (0,01 М НСl, 100° С, 2 ч) для расщепления только кетозидных связей модифицированных остатков кислоты NonN₂A. Исходный полисахарид в этих условиях устойчив. Полученный таким образом пентасахарид, индивидуально-натуральный, по данным гель-хроматографии на колонке TSK HW-40(S) и электрофореза на бумаге, был восстановлен боргидридом натрия и подвергнут метилированию по Хакомори с последующим расщеплением гликозидных связей жидким фтористым водородом при 20° С [10]. Смесь полученных частично метилированных моносахаридов была подвергнута ГЖХ-масс-спектрометрическому анализу после восстановления натрийборгидридом

Химические сдвиги (δ , м. д.) полуулозоновой кислоты в

Соединение	C2	C3	C4	C5	C6	C7
NonN ₂ α 2 (VII)	98,8	34,3	68,5	50,1	68,7	54,3
NonN ₂ A β 2-Egl (VI) ^{3*}	102,1	36,7	67,7	49,7	74,6	54,8
Дисахарид (II)	101,2	36,9	67,8	49,7	74,6	54,8
Дисахарид (V)	102,5	37,0	67,6	49,6	73,3	54,0
Трисахарид (III)	101,6	36,6	67,4	49,6	73,4	53,9
Трисахарид (IV)	102,0	36,7	67,5	49,5	73,3	53,8
ПС-1	101,5	36,8	67,5	49,7	73,4	54,0
ПС-2	102,5	34,2	70,7	47,1	74,5	54,0

* Сигналы атомов углерода O=C-групп остатков полуулозоновой кислоты и (3R)-3-гидроуглерода CH₂CON-групп остатков полуулозоновой кислоты имеют химические сдвиги в области

^{2*} Сигналы остатка (3R)-3-гидроксимасляной кислоты.

^{3*} Данные работ [1, 2].

* Сигналы остатка этиленгликоля.

* Сигналы остатка глицерина

и ацетилирования. При этом наряду с идентифицированными ранее 1,2,4-три-О-ацетил-3,5,6-три-О-метил- и 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилгалактитолом были обнаружены 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюцитол и O,N-диацетат частично метилированного полиола (I), образующегося из NonN₂A (рис. 3). Сопоставление характера фрагментации под электронным ударом полиола (I) и его полностью метилированного аналога, масс-спектр которого был рассмотрен нами ранее [1], однозначно доказывает замещение полуулозоновой кислоты по C8: присутствие в масс-спектре (I) иона с m/z 230 указывает на наличие О-ацетата во фрагменте C7-C9, а отсутствие в спектре характерного иона с m/z 57 (CH₃CH=O⁺Me, ср. [1]) и незначительная интенсивность пика с m/z 419 (фрагмент C1-C7) свидетельствуют о локализации О-ацетильной группы при C8 полиола (I).

Для выяснения последовательности моносахаридных остатков в полисахаридной цепи были использованы данные по установлению строения

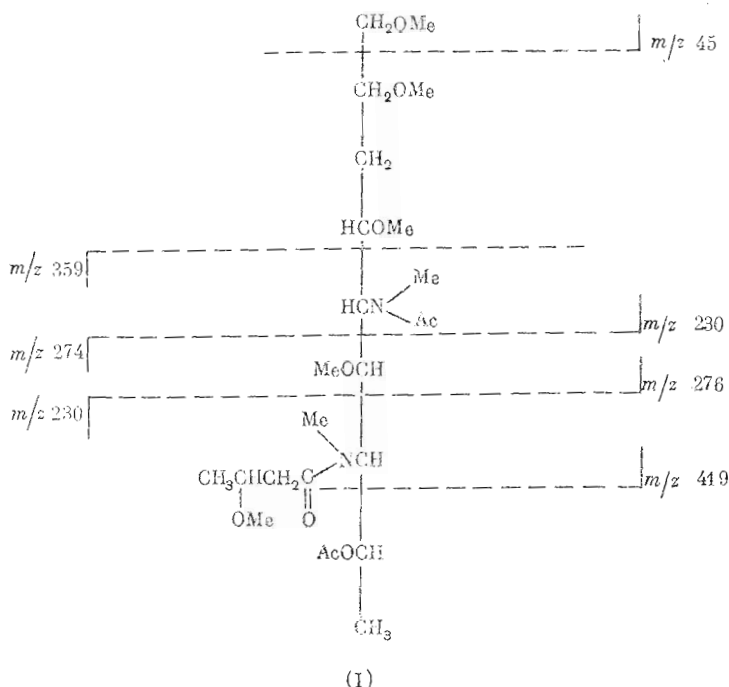


Рис. 3. Фрагментация под электронным ударом ацетата частично метилированного производного полуулозоновой кислоты (первичные фрагменты)

¹³С-ЯМР-спектрах соединений, ее содержащих *

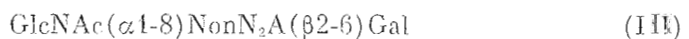
C8	C9	C2 **	C3 **	C4 **	C1	C2	C3
70,8	17,2	46,4	66,3	23,5			
70,4	18,2	46,3	66,3	23,5	66,8 ^{4*}	61,9 ^{4*}	
70,6	18,2	46,3	66,1	23,4			
74,0	14,0	46,2	66,2	23,5	66,7 ^{4*}	61,8 ^{4*}	
74,2	14,3	46,2	66,2	23,5			
73,8	13,9	46,2	66,2	23,5	66,5 ^{5*}	71,5 ^{5*}	63,8 ^{5*}
74,4	14,4	46,3	66,3	23,6			
74,5	14,3	46,2	66,3	23,6			

кислоты имеют химические сдвиги в области 173—175 м. д. Сигналы атомов: 23,3—23,5 и 173—175 м. д.

олигосахаридов, полученных при сольволизе ПС-2 жидким фтористым водородом [10] и избирательном распаде по Смитсу [11]. При сольволизе ПС-2 жидким фтористым водородом кислота NonN₂A не отщепляется и остается в составе образующихся олигосахаридов. В зависимости от продолжительности сольволиза (20° С, 1—16 ч) оказалось возможным выделить из реакционной смеси с помощью хроматографии на колонке с TSK HW-40(S) дисахарид (II) или трисахарид (III).

В гидролизате дисахарид (II) (2 М HCl, 100° С, 3 ч) с использованием ГЖХ в виде ацетатов полиолов была идентифицирована галактоза. Обработка дисахарид (II) водным раствором брома [12] привела к полному исчезновению галактозы из его гидролизата, что свидетельствовало о ее расположении на восстанавливающем конце дисахарид (II). Из данных ¹³С-ЯМР спектра (II) следовало, что в его состав наряду с β-связанным остатком нонулозоновой кислоты (отнесение сигналов NonN₂A проведено нами ранее [1, 2], см. табл. 1) входит остаток D-галактопиранозы. Наличие в спектре двух серий сигналов, характерных для 6-О-замещенного остатка α,β-D-галактопиранозы (см. табл. 2), доказывало, что нонулозоновая кислота присоединена к галактопиранозе в положение 6.

Гидролизат трисахарид (III), по данным ГЖХ, в виде ацетатов полиолов, полученных после его дезаминирования азотистой кислотой [6], содержал эквивалентные количества 2-ампно-2-дезоксид-D-глюкозы и D-галактозы, последняя из которых исчезала из гидролизата после обработки трисахарид (III) водным раствором брома. Таким образом, и в трисахарид (III) остаток 6-О-замещенной галактозы расположен на восстанавливающем конце. Спектр ¹³С-ЯМР трисахарид (III) (см. табл. 1—3) содержал по сравнению со спектром дисахарид (II) восемь дополнительных резонансных линий незамещенного остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозы. α-Конфигурация гликозидной связи остатка N-ацетилглюкозамина следовала, кроме того, из уже рассмотренного выше предварительного анализа спектра ¹³С-ЯМР ПС-1 и ПС-2. Существенное смещение положения резонансной линии, относящейся к атому С9 нонулозоновой кислоты (от 18,2 м. д. в спектре (II) к 14,3 м. д. в спектре (III)), однозначно свидетельствовало о замещении остатка кислоты NonN₂A остатком 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозы в положение 8, что соответствует данным анализа полисахарид методом метилирования.



Таким образом, из результатов установления строения олигосахаридов (II) и (III) следовало взаимное расположение трех из пяти моносахаридных компонентов полисахаридной цепи.

Дальнейшая информация о расположении моносахаридных остатков

Химические сдвиги (δ , м. д.) остатка 6-О-замещенной *D*-галактопиранозы в ^{13}C -ЯМР-спектрах соединений, его содержащих

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Gal ρ α 1 *	93,6	69,8	70,5	70,6	71,7	62,5
Gal ρ β 1 *	97,7	73,3	74,2	70,1	76,3	62,3
Дисахарид (II)						
α -аномер	93,6	69,7	70,6	70,6	70,1	65,2
β -аномер	97,7	73,2	73,9	70,3	74,8	65,2
Трисахарид (III)						
α -аномер	93,5	69,9	70,3	70,6	70,1	65,3
β -аномер	97,7	73,1	74,0	70,2	74,7	65,1
ПС-1	99,3	69,7	70,7	70,9	70,7	65,3
ПС-2	99,4	69,7	70,7	70,9	70,7	65,3

* Данные работы [13].

Таблица 3

Химические сдвиги (δ , м. д.) остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -*D*-гликопиранозы в ^{13}C -ЯМР-спектрах соединений, его содержащих *

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
GlcNAc ρ α 1-Me ^{2*}	99,5	55,0	72,4	71,5	72,9	62,0
3MeGlcNAc ρ α 1-Me ^{3*}	99,4	53,2	81,6	70,5	72,9	61,7
Дисахарид (V)	95,7	54,8	72,1	71,3	72,7	61,8
Трисахарид (III)	95,9	54,9	72,2	71,4	73,1	61,9
Трисахарид (IV)	95,7	53,8	79,7	69,8	72,8	61,9
ПС-1	95,8	54,0	79,7	69,8	73,1	61,9
ПС-2	95,9	54,0	79,7	69,8	73,3	61,9

* Сигналы атомов углерода CH_2CON -групп имеют химические сдвиги в области 23,3 и 173—175 м. д.^{2*} Данные работы [14].^{3*} Данные работы [15].

была получена при изучении строения олигосахарида, образующегося при избирательном расщеплении ПС-2 по Смитту [11]. Окисление ПС-2 (0,1 М NaIO_4 , 4° С, 60 ч) с последующим восстановлением боргидридом натрия и хроматографией на колонке с сефадексом G-50 привело к модифицированному полисахариду, который гидролизовали (0,5 М HCl , 20° С, 16 ч), нейтрализовали и после концентрирования хроматографировали на колонке с TSK HW-40(S). В результате был выделен трисахарид (IV), в гидролизате которого были идентифицированы эквивалентные количества арабинозы и глюкозамина (ГЖХ в виде ацетатов полиолов после дезаминирования и ацетилирования). Обнаружение арабинозы, которая образовалась из остатка 2-О-замещенной галактофуранозы, доказывало, что остаток β -*D*-галактофуранозы присоединен в полисахаридной цепи к остатку 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы. Аналогичный вывод следовал также из анализа спектра трисахарида (IV) (табл. 4). Для подтверждения строения трисахарида (IV) был подвергнут двум последовательным распадам по Смитту. В результате первого распада был получен дисахарид (V). В гидролизате которого отсутствовала арабиноза, но сохранялся глюкозамин. Исчезновение арабинозы в результате периодатного окисления подтверждало, что остаток α -*L*-арабинофуранозы расположен на невосстанавливаемом конце трисахарида (IV). При распаде по Смитту дисахарида (V) был получен гликозид (VI), состоящий из понулозоновой кислоты и этиленгликоля, и его строение было доказано ранее [1, 2]. Восстановление метилового эфира гликозида (VI) боргидридом натрия при постоянном значении pH 7,5—8,0 [9] с последующим гидролизом (0,01 М HCl , 100° С, 2 ч) привело к 5-ацетиамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-7[(3*R*)-3-гидро-

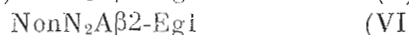
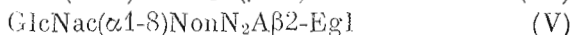
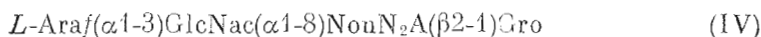
Химические сдвиги (δ , м. д.) остатка β -D-галактофуранозы и гомоморфного ему остатка α -L-арабинофуранозы в ^{13}C -ЯМР-спектрах соединений, их содержащих

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
L-Ara/ α 1-Me *	109,3	81,9	77,5	84,9	62,5	
2Pr'-L-Ara/ α 1-Me *	108,2	87,7	76,3	84,0	62,1	
D-Gal/ β 1-Me **	109,9	81,3	78,4	84,7	71,7	63,6
Трисахарид (IV)	109,3	82,3	77,6	84,9	62,4	
ПС-1	107,4	88,0	76,5	83,4	72,1	64,3
ПС-2	107,4	88,2	76,5	83,5	72,1	64,3

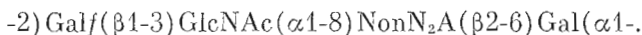
* Данные работы [17].

** Данные работы [18].

ксибутирамидо]-L-глицеро-L-манно-ноулозе (VII) *, восстановление которой боргидридом натрия с последующим метилированием по Хакомори привело к полностью метилированному полиолу, масс-спектр которого был интерпретирован нами ранее [1].



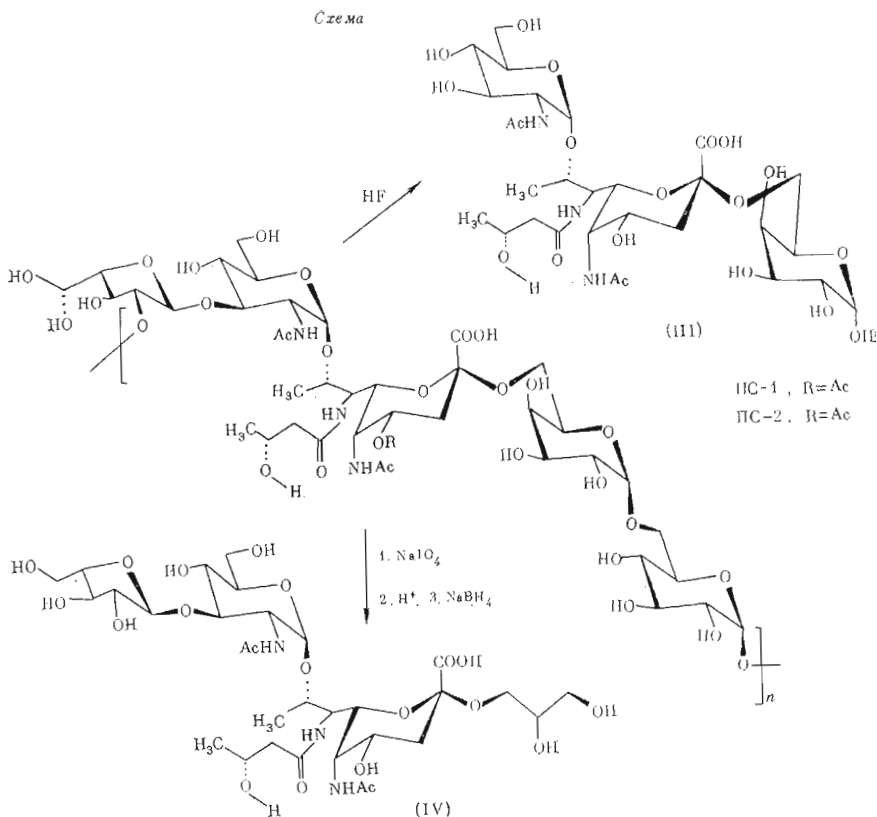
Таким образом, установление строения трисахариды (IV) с учетом данных о структуре олигосахаридов (II) и (III) позволило однозначно определить последовательность четырех из пяти моносахаридных остатков в повторяющемся звене полисахарида, а именно



Принимая во внимание результаты анализа полисахарида методом метилирования, согласно которым повторяющееся звено имеет линейную структуру, следует сделать вывод, что остаток α -D-глюкопиранозы замещен в полисахаридной цепи в положение 6 остатком α -D-галактопиранозы и, в свою очередь, присоединен в положение 2 к остатку β -D-галактофуранозы. Таким образом, повторяющееся звено O-деацетилированного полисахарида имеет строение, приведенное на схеме.

Полная интерпретация спектра ^{13}C -ЯМР ПС-2 позволила полностью подтвердить его строение и, кроме того, установить место присоединения O-ацетильной группы в повторяющемся звене полисахарида. Первым этапом расшифровки спектра ^{13}C -ЯМР ПС-2 явилось отнесение сигналов в спектрах моно- и олигосахаридных фрагментов, полученных при последовательных расщеплениях полисахарида по Смуту (см. выше). Установление строения гликозида (VI), выполненное нами ранее [1, 2] с использованием масс-спектрометрии и техники ЯМР (селективный гомо- и гетероядерный ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ двойной резонанс и эффект Оверхаузера), позволило провести полное отнесение всех резонансных линий в ^{13}C -ЯМР-спектре (VI). Для расшифровки спектра дисахариды (V) были использованы данные спектра гликозида (VI) (табл. 1) и модельного соединения 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -метил-D-глюкопиранозиды (табл. 3). Сопоставление спектров дисахариды (V) и трисахариды (IV) показывало, что последний отличается наличием шести дополнительных сигналов, пять из которых несомненно принадлежат остатку α -L-арабинофуранозы (табл. 4). Шестой дополнительный сигнал возникает за счет изменения природы агликона при C2 ноулозоновой кислоты: 1-O-замещенный остаток глицерина в гликозиде (IV) вместо 1-O-замещенного остатка этиленгликоля в дисахариде (V) (отнесение сигналов остатка глицерина в дисахариде

* Из анализа ^{13}C -ЯМР-спектра (VII) следовало, что данный моносахарид существует в растворе в α -конфигурации (в отличие от (VI)), с чем связаны существенные различия химических сдвигов атомов C2--C6 в соединениях (VI) и (VII); ср. табл. 1 и данные [1] по отнесению сигналов в спектре α -аномера ноулозоновой кислоты.



(V) выполнено сравнением спектра последнего со спектром 1-О-фосфата глицерина [16]). Анализ спектров соединений (IV) и (V) (табл. 3) показывает, что сигнал атома С2 остатка 2-ацетида-2-деокси- α -D-глюкопиранозы в спектре (V) имеет химический сдвиг 54,8 м.д., тогда как в спектре (IV) этот атом резонирует при δ 53,8 м.д. Наблюдаемое смещение обусловлено β -эффектом замещения по С3 остатком α -L-арабинофуранозы. Данные, приведенные в табл. 1—4, позволили окончательно подтвердить структуру трисахарида (IV) и отнести все сигналы в его спектре.

Из данных анализа PC-2 методом метилирования следовало, что остаток β -D-галактофуранозы замещен в полисахаридной цепи в положение 2. Аналогичный вывод следовал из рассмотрения спектров ¹³C-ЯМР PC-2 и трисахарида (IV) (табл. 4). Изменение положения сигнала С1 остатка β -D-галактофуранозы (смещение на 1,9 м.д. в сильное поле) в спектре PC-2 по сравнению с положением сигнала С1 остатка α -L-арабинофуранозы в спектре (IV) может быть объяснено только β -эффектом замещения. В таком случае сигналы 2-О-замещенного остатка β -D-галактофуранозы в спектре PC-2 выделяются при сопоставлении спектра PC-2 со спектрами метил- β -D-галактофуранозида (сигналы С4—С6) и 2-О-изопропил- α -метил-L-арабинофуранозида (С1—С3) (см. табл. 4).

После этого в спектре PC-2 (рис. 2) могут быть идентифицированы все сигналы, принадлежащие остатку α -D-глюкопиранозы. Среди оставшихся неотнесенными шести сигналов спектра PC-2 отсутствовала резонансная линия, характерная для незамещенной оксиметильной группы пираноз (61—62 м.д.). Ближайший неидентифицированный сигнал с триплетным расщеплением в GD-спектре PC-2, судя по химическому сдвигу 67,0 м.д., мог принадлежать только оксиметильной группе, замещенной остатком пиранозы с α -конфигурацией гликозидной связи. Для отнесения оставшихся сигналов остатка 6-О-замещенной α -D-глюкопиранозы оказалось достаточно сопоставления спектра PC-2 со спектром метил- α -D-глюкопиранозида (сигналы С2—С4) и спектром 6-О-(α -D-галактопиранозил)- α -D-глюкопиранозы (сигналы С4—С6 остатка моносахарида на восстанавливаемом конце) (табл. 5).

Химические сдвиги (δ , м. д.) остатка α -D-глюкопиранозы в ^{13}C -ЯМР-спектрах соединений, его содержащих

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Glc α 1-Me *	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,8
Gal(α 1-6)Glc α 1 **	93,0	72,3	73,8	70,4	70,9	66,8
ПС-1	99,4	72,4	74,0	70,6	71,4	67,2
ПС-2	99,4	72,3	73,9	70,6	71,5	67,0

* Данные работы [13].

** Данные работы [19].

Вопрос о локализации О-ацетильной группы в ПС-1 был однозначно решен при сравнении его спектра ^{13}C -ЯМР со спектром ПС-2. Сильнопольное смещение характерных сигналов атомов С3 и С5 остатка нонулозоновой кислоты на 2,6 м.д. в сильное поле в спектре ПС-1 несомненно соответствует β -эффекту О-ацетилирования по С4. Сигнал атома С4 смещается в свою очередь вследствие α -эффекта О-ацетилирования в слабое поле на 3,2 м.д. (см. табл. 1).

Таким образом, полная расшифровка спектра ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида позволила независимым способом подтвердить структуру повторяющегося звена и установить характер локализации О-ацетильных групп, как приведено на схеме.

Ранее было показано [20] наличие интенсивной перекрестной серологической реакции между бактериями *Sh. boydii*, тип 7, и *P. aeruginosa* 010, структура О-специфического полисахарида последнего из которых установлена недавно [21]. В результате выяснения строения повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 7, становится очевидным, что обнаруженный серологический перекрест обусловлен общим моносахаридным компонентом, а именно понулозоновой кислотой. Общие олигосахаридные фрагменты в полисахаридах отсутствуют, и, кроме того, остатки понулозоновой кислоты имеют различный характер замещения. Бактерии *P. aeruginosa* 05 также содержат в составе своего специфического полисахарида понулозоновую кислоту [22], но с другой конфигурацией кетозидной связи и вследствие этого не проявляют серологического родства с клетками *Sh. boydii*, тип 7.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Электрофорез на бумаге проводили в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 27 В/см в течение 90 мин, хроматографию на бумаге FN-11 — в системе бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Для обнаружения веществ на бумаге использовали щелочной нитрат серебра с последующим нагреванием хроматограммы в случае олигосахаридов и полисахарида водяным паром. Гель-хроматографию осуществляли на колонке с сефадексом G-50 (3,7×80 см) и TSK HW-40(S) в 0,05 н. уксусной кислоте. Элюционные кривые получены с помощью углеводного анализатора Technicon SC-2. ГЖХ выполнена на приборе Pye-Uniscam, модель 104, со стеклянной колонкой (0,4×150 см), наполненной 3% ECNSS-M на Gas-Chrom Q (100–200 меш). ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT GNOM 111. Оптические вращения определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141. ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры были сняты на приборе Bruker WM 250 при 80° С относительно метанола (δ 50,14 м.д.). Реакция с резорциновым реагентом на сialовые кислоты выполняла по [4].

Выделение липополисахарида (ЛПС) и получение полисахаридов. Экстракцию сухих бактериальных клеток *Sh. boydii*, тип 7, проводили дважды 45% водным фенолом (20 г клеток на 1 л фенольного раствора) при 68° С в течение 15–20 мин. Нуклеиновые кислоты удаляли из экстракта с помощью цетавлона [3]. Окончательная очистка ЛПС осуществлялась ультрацентрифугированием при 105 000g. Для получения ПС-1 раствор ЛПС в 1% уксусной кислоте (2 мг/мл) нагревали 1,5 ч при 100° С. После отделения осадка липида А суперпатайт лиофилизировали и хроматографировали остаток на колонке с сефадексом G-50. Выход ЛПС составил 4% от веса клеток, выход ПС-1 — 18% от веса ЛПС.

О-Дезацетилирование ПС-1 проводили действием 0,5 М триэтиламина в 30% метаноле (25°С, 16 ч). После концентрирования раствора и хроматографии на колонке с сефадексом G-50 с выходом 90% получен ПС-2.

Раствор ПС-2 в сухом диметилсульфоксиде (5 мг/мл) обрабатывали эфирным раствором диазометана до устойчивой желтой окраски и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Полученный метиловый эфир полисахарида восстанавливали при pH 7–7,5 боргидридом натрия [9]. Восстановление гликозида (VI) было проведено аналогично, за исключением того, что метилирование диазометаном осуществляли в метаноле с последующим упариванием. Для выделения восстановленного гликозида (VI) была использована обработка смолой КУ-2 (H⁺-форма) с последующим удалением борной кислоты упариванием с метанолом.

Анализ методом метилирования. ПС-2 (5 мг) метилировали по методу Хакомори [7]. Через 16 ч прозрачный раствор разбавляли небольшим количеством воды и удаляли избыток иодистого метила слабым током азота. Полученный раствор хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (1,7×30 см), фракции, содержащие метилированный ПС-2, объединяли и лиофилизовали. Выход метилированного ПС-2 составил 80%. Аналогично проводили метилирование олигосахаридов и продукты реакции выделяли экстракцией хлороформом из водных растворов. Метилированные поли- и олигосахариды деполимеризовали нагреванием с 98% муравьиной кислотой (100°С, 2 ч) и после упаривания гидролизовали 0,25 М HCl (100°С, 16 ч). Смесь частично метилированных моносахаридов восстанавливали боргидридом натрия (25°С, 16 ч), обрабатывали катионитом КУ-2 (H⁺-форма) и после упаривания с метанолом (3 раза) ацетилировали смесью уксусной ангидрид – пиридин (0,5 мл, 1:1) в течение 30 мин. Полученные ацетаты полиолов анализировали методом ГЯХ-масс-спектрометрии. Метанализ метилированного ПС-2 проводили 0,1 М HCl в метаноле (100°С, 16 ч). Для полного ацетилирования частично метилированных аминсахаров метанолизат нагревали с ацетилирующей смесью 2 ч при 100°С.

Сольволиз ПС-2 жидким фтористым водородом. К 100 мг высушенного над P₂O₅ при 50°С ПС-2 прибавляли в приборе для сольволиза [10] 10 мл жидкого фтористого водорода, перегнанного над фторидом кобальта. Полученный раствор перемешивали 3 ч при 20°С и упаривали в вакууме. Остаток обрабатывали 5% уксусной кислотой и упаривали. Олигосахариды хроматографировали на колонке с TSK HW-40(S) (1,6×100 см) и получили 41 мг трисахарид (III) и 7 мг дисахарид (II). При уменьшении времени сольволиза до 1 ч образуется практически только трисахарид (III) с выходом 43 мг.

Распад полисахарида по Смитту. Раствор 150 мг ПС-2 в 25 мл 0,1 М периодата натрия выдерживали 60 ч в темноте и прибавляли 3 мл этиленгликоля. Через 1,5 ч смесь концентрировали до 5–7 мл лиофилизацией и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Окисленный полисахарид в 5 мл воды восстанавливали 4 ч 70 мг NaBH₄, подкисляли уксусной кислотой до pH 5 и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. После лиофилизации фракций, выходящих с удерживаемым объемом колонки, получили 105 мг модифицированного полисахарида, который далее гидролизировали 36 ч при 20°С в 15 мл 0,5 М HCl. Гидролизат лиофилизовали, остаток хроматографировали на колонке TSK HW-40(S) и получили трисахарид (IV). Аналогично было проведено расщепление трисахарид (IV) и образующегося из него дисахарид (V). При распаде по Смитту олигосахаридов (IV) и (V) обессоливание продуктов реакции проводили с помощью хроматографии на колонке с TSK HW-40.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Lvov V. L., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. C5–C8.
2. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Lvov V. L., Dmitriev B. A. Carbohydr. Res., 1985, v. 141, № 2, p. C1–C3.
3. Westphal O., Jann K. Method. Carbohydr. Chem., 1965, v. 5, p. 88–91.

