



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 13 * № 1 * 1987

УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

21*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ
И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ
СЕМИ ИММУНОТИПОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Виноградов Е. В.,
Парамонов Н. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К.,
Станиславский Е. С.*, Холодкова Е. В.**

Институт органической химии им. И. Д. Зелинского

Академии наук СССР, Москва;

* *Институт вакцин и сывороток им. Н. Н. Мечникова Минздрава СССР, Москва*

При мягкой кислотной деградации липополисахаридов семи иммунотипов *Pseudomonas aeruginosa* получены О-специфические полисахариды и установлены их структуры. Основной особенностью полисахаридов является преобладание в их составе различных, большей частью кислых, амино- и диаминосахаров, многие из которых не были известны ранее. Отсутствие перекрестных серологических реакций (торможения пассивной гемагглютинации) у липополисахаридов семи иммунотипов коррелирует с отсутствием в их О-специфических полисахаридных цепях общих олигосахаридных фрагментов. Полученные данные выявили структурное и серологическое соответствие между О-антителами семи иммунотипов и родственных им О-серотипов. *P. aeruginosa* и показали, что иммунотипы 1 и 7 должны быть включены в серологическую классификационную схему в качестве самостоятельных О-серотипов.

Pseudomonas aeruginosa является грамотрицательным условно-патогенным микробом с высокой степенью серологической гетерогенности. Для этого вида был предложен ряд серологических классификационных схем, базирующихся на специфичности О-антител [2–4], а на основании данных по перекрестной активной защите мышей были выделены семь различных иммунотипов *P. aeruginosa* [5]. Показано, что липополисахарид наружной мембранны является как О-антителом, так и протективным антигеном *P. aeruginosa* [6, 7], и при помощи серологического анализа иммунотипы были соотнесены с О-серотипами [2].

На протяжении последних лет американскими исследователями проводится химическое исследование липополисахаридов семи иммунотипов *P. aeruginosa* [7, 9], ставящее своей целью создание основы для классификации и индикации штаммов этого микробы. Однако полученные данные по моносахаридному составу и строению О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов являются далеко не полными, а в ряде случаев оказались неверными и были исправлены нами [10–12].

В настоящем сообщении представлены результаты проведенного нами исследования, приведшего к установлению строения О-специфических полисахаридов всех семи иммунотипов *P. aeruginosa*, и в свете полученных данных обсуждается структурное и серологическое родство О-антител иммунотипов и О-серотипов этого вида бактерий.

Липополисахариды были выделены из сухих бактериальных клеток по методу [13] и были активны в реакции пассивной гемагглютинации с го-

* Сообщение 20 см. [1]. Сокращения: QuiNAc – N-ацетилхиновозамин, FucNAc – N-ацетилфукозамин, GalNAcA, GalNfMA – соответственно N-ацетил- и N-формилглактозаминуроновая кислота, GalNAcAN – N-ацетилглактозаминуронамид, GlcN₂Ac₂A, ManN₂Ac₂A, GulN₂Ac₂A – соответственно 2,3-диацетамило-2,3-дидезоксиглюкуроновая, -маннуроновая и -гулероновая кислота, ManNAcAmA, GulNAcAmA – соответственно 3-ацетамидило-2-ацетамило-2,3-дидезоксимиануроновая и -гулероновая кислота, PseNAcNFm, PseNHbNFm – соответственно 5-N-ацетил- и 5-N-[*(R)*-3-гидроксибутирил]-7-N-формилпсевдаминоповая (5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезокси-L-глициро-L-маннозуозоповая) кислота.

Таблица 1

Перекрестные реакции пассивной гемагглютинации липополисахаридов
*P. aeruginosa**

Липополисахарид иммунотипа	Обратная величина титра с О-антисывороткой к иммунотипу						
	1	2	3	4	5	6	7
1	25 600	100	50	200	50	50	50
2	1 600	1600	50	50	50	50	50
3	100	100	1600	50	50	50	100
4	50	50	50	1600	50	50	50
5	50	50	50	200	800	50	50
6	6 800	50	50	50	50	800	800
7	100	50	50	50	50	50	800

* Подчеркнуты гомологичные титры.

Таблица 2

Торможение реакции пассивной гемагглютинации липополисахаридов
P. aeruginosa в гомологичных тест-системах

Иммунотип	1	2	3	4	5	6	7
Минимальная тормозящая доза липополисахарида, мкг	3-5	50-62,5	5	5-6	25-31	3,7-5	1,5-5

Таблица 3

Строение О-специфических полисахаридов семи иммунотипов *P. aeruginosa*

Иммунотип	Структура О-специфического полисахарида	О-Серогруппа*	О-Серотип**	
			О-Серогруппа	О-Серотип
1	$\rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAcAN}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNfMA}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{QuiNAc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha-L-\text{Rha}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	6	-	-
2	$\rightarrow 2)-\beta-D-\text{Glc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-L-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 3)-\beta-D-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	11	11a, 11b (11a, 11c) **	-
3	$\rightarrow 4)-\beta-D-\text{ManNAcAmA}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-L-\text{GulN}_2\text{Ac}_2\text{A}-(1 \rightarrow 3)-\beta-D-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	2	(2a), 2c	-
4	$\rightarrow 4)-\beta-D-\text{GlcN}_2\text{Ac}_2\text{A}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{QuiNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	1	1	-
5	$\rightarrow 4)-\alpha-L-\text{GalNAcA}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{QuiNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-L-\text{Rha}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	10	10a, 10b	-
6	$\rightarrow 4)-\alpha-\text{PseNAcNFm}-(2 \rightarrow 4)-\beta-D-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\beta-D-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	7	7a, 7d	-
7	$\rightarrow 4)-\alpha-L-\text{GulNAcAmA}-(1 \rightarrow 4)-\beta-D-\text{ManNAc}_2\text{A}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{FucNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-\text{GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\text{OAc}$	2	-	-

* По классификационной схеме [4].

** Согласно данным работы [14], О-специфические полисахариды обоих О-серотипов имеют идентичную структуру.

мологичными О-антисыворотками (титры О-антител 1 : 800—1 : 25 600, табл. 1). Кроме того, наблюдалась односторонние реакции липополисахаридов иммунотипов 2 и 6 с анти-4-сывороткой при разведении 1 : 1600 и 1 : 6800 соответственно (гомологичный титр 1 : 25 600), а липополисахарид иммунотипа 6 реагировал с анти-7-сывороткой в таком же разведении (1 : 800), что и гомологичный О-антител.

Индивидуальная серологическая специфичность липополисахаридов семи иммунотипов была выявлена в реакции торможения пассивной гемагглютинации. Так, если минимальная ингибирующая доза липополисахаридов в гомологичных тест-системах составляла от 1,5 до 62,5 мкг (табл. 2), то в гетерологичных тест-системах ни один из липополисахаридов не тормозил реакцию в дозе, равной или менее 1000 мкг.

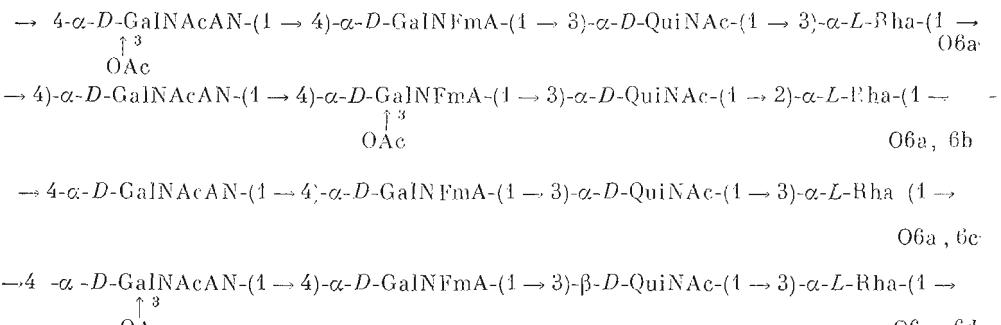
При мягком расщеплении 1% уксусной кислотой липополисахарида иммунотипов 1–5 и 7 давали высокомолекулярные О-специфические полисахариды, которые были выделены гель-фильтрацией на сефадексе G-50. При анализе методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии были установлены структуры их повторяющихся звеньев (табл. 3). Расщепление липополисахарида иммунотипа 6 сопровождалось деполимеризацией полисахаридной цепи, и ее строение было установлено при ^{13}C -ЯМР-анализе самого липополисахарида и образовавшегося при его расщеплении олигосахаридиого фрагмента полисахаридной цепи.

В ходе дальнейшего изложения полученных результатов пройдет рассмотрение каждой из приведенной в табл. 3 структур и их сопоставление со структурами О-специфических полисахаридов серологически родственных О-серотипов.

Иммунотип 1

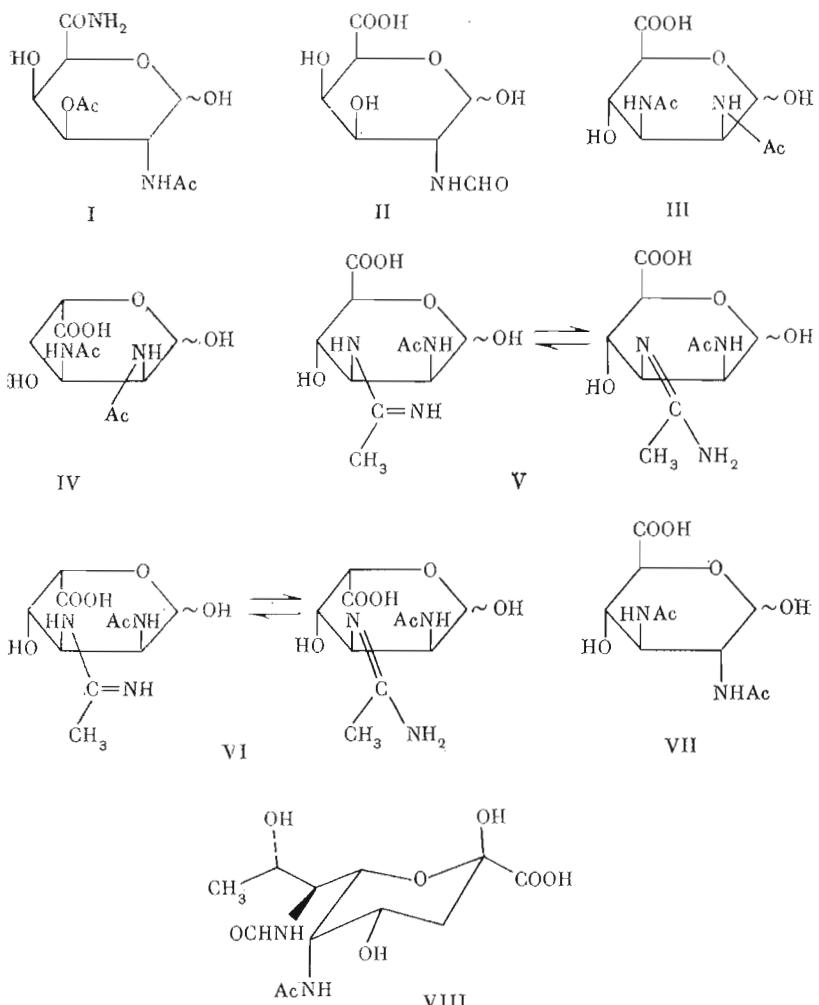
Установление состава и структуры О-специфического полисахарида этого иммунотипа описано в работах [11, 12]. Он кислый, построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих *L*-рамнозу, N-ацетил-*D*-хиновозамин и два необычных производных *D*-галактозаминоуроновой кислоты: ди-2-N,3-O-ацетилированный первичный амид (I) и N-формилированную свободную кислоту (II).

По своему моносахаридному составу полисахарид иммунотипа 1 идентичен полисахаридам серогруппы Ob (здесь и далее по классификационной схеме Лани – Бергана – Акаторовой – Смирновой – Хомма [4]), но по структуре повторяющегося звена не совпадает ни с одним из полисахаридов, входящих в эту серогруппу O-серотипов, которые, по данным [11], имеют следующие структуры:



Полисахарид иммунотипа 1 наиболее близок по строению к полисахаридам серотипов Оба и Оба, 6b, от которых он отличается только одним элементом первичной структуры: типом замещения остатка рамнозы (в положение 3 в серотипе Оба или в положение 2 в иммунотипе 1) или положением О-ацетильной группы (на остатке N-формилгалактозаминоуроновой кислоты в серотипе Оба, 6b или N-ацетилгалактозаминоуронамида в иммунотипе 1).

В соответствии с данными работы [2] серотип Оба и иммунотип 4 имеют идентичные О-антителы. Однако, как видно из строения О-специ-



тических полисахаридов, между этими антигенами имеется различие, которое было подтверждено нами данными по перекрестному торможению реакции пассивной гемагглютинации липополисахаридов. Так, хотя липополисахарид иммунотипа 1 обладал ингибирующей активностью в гетерологичной тест-системе липополисахарид серотипа Оба/анти-Оба-сыворотка при минимальной дозе 100 мкг, липополисахарид серотипа Оба не тормозил реакцию в гетерологичной тест-системе липополисахарид иммунотипа 1/анти-1-сыворотка в дозе, равной или менее 1000 мкг (минимальные ингибирующие дозы липополисахаридов в гомологичных тест-системах составляли 10–25 мкг). Таким образом, на основании полученных данных иммунотип 1 должен быть включен в серогруппу Об в качестве самостоятельного О-серотипа.

По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, изученный нами полисахарид иммунотипа 1 похож, но не идентичен полисахариду этого иммунотипа, исследованному в работе [9]. Согласно проведенному нами сравнительному анализу, эти два полисахарида имеют один и тот же углеводный скелет и одинаковые ацильные заместители, а различие между ними связано только с неодинаковой степенью О-ацетилирования остатка N-ацетилгалактозаминуронамида: ~80% для изученного нами штамма и ~40% для штамма, исследованного в работе [9].

Иммунотип 2

О-Специфический полисахарид иммунотипа 2, по данным ^{13}C -ЯМР-спектра, полностью идентичен полисахариду серогруппы О11. Об иден-

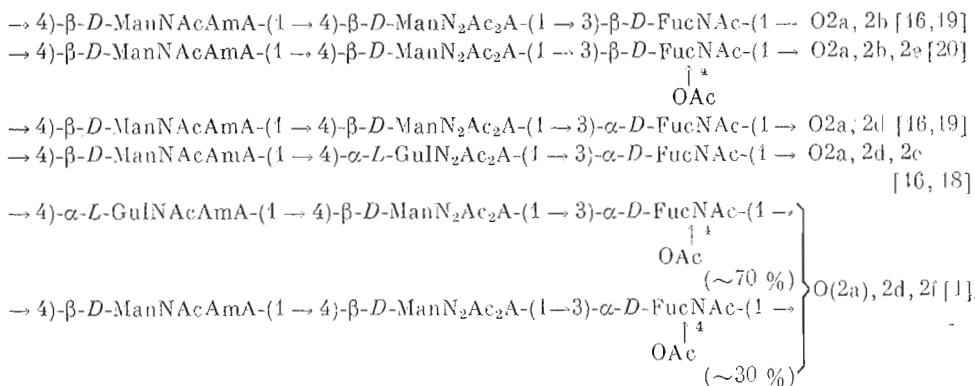
тичности этих полисахаридов сообщалось также в работе [9]. Таким образом, в этом случае данные по структурам О-специфических полисахаридов согласуются с серологическими данными, свидетельствующими об идентичности О-антител иммунотипа 2 и серогруппы O11 [2].

Строение полисахарида серогруппы О11 было установлено нами ранее [14, 15]. Он (единственный из полисахаридов семи иммунотипов) пентагликан, построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих D-глюкозу, N-ацетил-D-фукозамин и N-ацетил-L-фукозамин, т. е. обе энантиомерные формы этого 6-дезоксигексозамина одновременно.

Иммунотипы 3 и 7

Состав и строение О-специфических полисахаридов этих двух иммунотипов был установлен нами в работах [16, 17]. Оба полисахарида построены из трисахаридных повторяющихся звеньев и имеют одинаковый моносахаридный состав: они содержат N-ацетил-D-фукозамины и по два производных 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновых кислот, одно из которых имеет D-манно-, а другое L-гуло-конфигурацию. 2,3-Диамино-2,3-дидезокси-D-маннуроновая кислота в полисахариде иммунотипа 7 и 2,3-диамино-2,3-дидезокси-L-гулуроновая кислота в полисахариде иммунотипа 3 присутствуют в виде ди-N-ацетильных производных (III) и (IV). В производном диаминоманнуроновой кислоты в полисахариде иммунотипа 3 и диаминогулуроновой кислоты в полисахариде иммунотипа 7 аминогруппа при С3 входит в состав ацетамидиновой группы. Эта группа обладает основными свойствами и имеет таутомерный характер; таким образом, несущие ее моносахариды (V) и (VI) могут быть представлены в двух таутомерных формах.

По данным ^{13}C -ЯМР-спектра, полисахарид иммунотипа 3 идентичен полисахариду серотипа O(2a), 2c, структура которого установлена в работах [16, 18]. Остальные полисахарида серогруппы O2, по данным [4, 16, 18–20], имеют следующее строение:



Полисахарид иммунотипа 7 не совпадает по структуре ни с одним из полисахаридов серогруппы O2. Хотя он и имеет одинаковый моносахаридный состав с полисахаридом иммунотипа 3, а следовательно, и серотипа O(2a), 2c, но отличается от него конфигурацией трех асимметрических центров в каждом повторяющемся звене: C5 ацетамидаинового и диацетамидного производных уроновых кислот (что соответствует переходу от β -D-манно- к α -L-гуло-изомеру или наоборот) и C1 N-ацетил-D-фукозамина, что и обуславливает отсутствие перекрестной серологической реактивности у соответствующих липополисахаридов. Наиболее близок по структуре полисахариду иммунотипа 7 полисахарид серотипа O(2a), 2d, 2f, имеющий гибридную структуру [1]. Преобладающее повторяющееся звено полисахарида этого серотипа имеет такой же углеводный скелет, что и повторяющееся звено полисахарида иммунотипа 7, но отличается от него присутствием O-ацетильной группы, замещающей единственную сво-

бодную гидроксильную группу в положении 4 остатка N-ацетилфукозамина.

Согласно данным ^{13}C -ЯМР-спектра, полисахариды иммунотипов 3 и 7 наряду с основными повторяющимися звеньями, структуры которых приведены в табл. 3, содержат также небольшое количество (~10%) звеньев, отличающихся от основных конфигурацией C5 ацетамидинового производного уроновой кислоты, т. е. являющихся повторяющимися звеньями полисахаридов O2a, 2b и O2a, 2d соответственно. Это, по-видимому, отражает особенности биосинтеза этих полисахаридов, а также полисахаридов серогруппы O2, содержащих производные α -L-гулуроновой кислоты, который включает стадию эпимеризации по C5 соответствующих полисахаридов с β -D-манно-конфигурацией обоих производных уроновых кислот на полимерном уровне.

Таким образом, иммунотипы 3 и 7 родственны серогруппе O2, что соответствует данным [2], однако эта серогруппа должна быть расширена за счет включения в нее иммунотипа 7 в качестве самостоятельного О-серотипа.

Иммунотип 4

По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, полисахарид иммунотипа 4 идентичен полисахариду серогруппы O1, которая включает единственный О-серотип. Идентичными в соответствии с данными [2] являются и серологические свойства их О-антител.

Строение полисахарида серогруппы O1 установлено нами в работе [21]. Его кислые свойства обусловлены наличием 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновой кислоты (VII), которая была обнаружена также в составе липополисахарида *P. aeruginosa*, штамм P14 [22]. Остальными компонентами тетрасахаридного повторяющегося звена полисахарида иммунотипа 4 являются N-ацетилированные моносахара: N-ацетил-D-галактозамин, N-ацетил-D-хиновозамин и N-ацетил-D-фукозамин.

Иммунотип 5

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида этого иммунотипа идентичен спектру полисахарида серотипа O10a, 10b, строение которого установлено в работе [10]. Сходство структур полисахаридов иммунотипа 5 и серогруппы O10 отмечалось также в работе [9].

В состав трисахаридного повторяющегося звена полисахарида иммунотипа 5 входит N-ацетил-L-галактозаминуруоновая кислота, N-ацетил-D-хиновозамин и L-рамноза. Он имеет такой же углеводный скелет, что и полисахарид второго входящего в серогруппу O10 серотипа O10a, 10c, и отличается от него только присутствием О-ацетильной группы в положении 2 остатка рамнозы (степень ацетилирования ~80%).

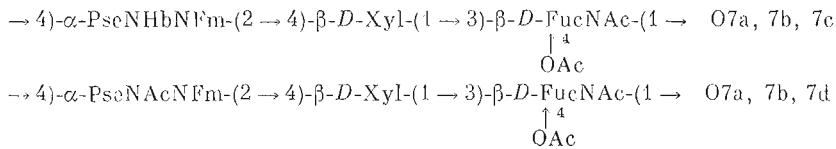
В соответствии с серологическими данными [2] иммунотип 5 идентичен по О-антителу серотипу O10a, 10c. Однако в соответствии с полученными в настоящей работе данными о структуре его О-специфического полисахарида в схему работы [2], проводящую корреляцию между иммунотипами и серотипами *P. aeruginosa*, должно быть внесено уточнение, и полисахарид иммунотипа 5 должен быть отнесен к серотипу O10a, 10b.

Иммунотип 6

Строение полисахарида иммунотипа 6 установлено в работе [23]. Он построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих D-ксилозу, N-ацетил-D-фукозамин и смалоподобный моносахарид 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезокси-7-формамило-L-глицеро-L-манно-ионулозоповую кислоту (VIII). Производные этого же высшего сахара, названного пами псевдаминовой кислотой, были найдены также в полисахаридах *P. aeruginosa* O7 [24, 25], O9 [25, 26], а также *Shigella boydii*, тип 7 [25, 26]. От широко распространенной в природных углеводах нейраминовой кислоты псевдаминовая кислота отличается наличием дополнительной амино-

группы при C7, дезоксизвена при C9 и конфигурацией трех асимметрических центров C5, C7 и C8. Гликозидная связь этого моносахарида кислотолабильна, и ее расщепление является причиной деполимеризации полисахаридной цепи при мягкой кислотной деградации липополисахарида иммунотипа б (см. выше).

По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, липополисахарид иммунотипа 6 имеет полисахаридную цепь, идентичную полисахаридной цепи липополисахарида серотипа O7a, 7d. От других полисахаридов серогруппы O7, строение которых в соответствии с данными [24] приведено ниже, он отличается отсутствием О-ацетильной группы в положении 4 остатка N-ацетилфукозамина, а от полисахарида серотипа O7a, 7b, 7c также ацильным заместителем при N5 псевдоминовой кислоты (N-ацетильная группа у иммунотипа 6 и (*R*)-3-гидроксибутирильная группа у серотипа O7a, 7b, 7c).



В соответствии с данными работы [2] иммунотип 6 по серологическим свойствам О-антителенов идентичен серотипу O7a, 7d, что согласуется с идентичностью О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов.

* * *

Таким образом, полученные данные по структурам О-специфических полисахаридов семи иммунотипов *P. aeruginosa* в ряде случаев (иммунотипы 2–4, 6) подтверждают серологические данные, на основе которых была проведена корреляция между иммунотипами и О-серотипами [2], а в других случаях (иммунотипы 1, 5, 7) позволяют уточнить эти данные.

Заслуживают внимания некоторые особенности моносахаридного состава О-специфических полисахаридов *P. aeruginosa*, который в значительной степени отличается от состава изученных до сих пор полисахаридов грамотрицательных бактерий [27]. Прежде всего для них малохарактерны широко распространенные у других бактерий пектральные моносахариды. Так, из 23 моносахаридных остатков, составляющих повторяющиеся звенья полисахаридов семи иммунотипов *P. aeruginosa*, только по одному разу встретились *D*-глюкоза (иммунотип 2) и *D*-ксилоза (иммунотип 6) и два раза — *L*-рамноза (иммунотипы 1 и 5). Остальными компонентами этих полисахаридов оказались аминосахара, причем из наиболее характерных для других бактерий гексозаминов лишь один раз встретился *D*-галактозамин (иммунотип 4), зато все полисахариды содержали в повторяющемся звене не менее одного остатка 6-дезоксигексозамина: *D*-хиновозамина, *D*- или *L*-фукозамина.

Около половины всех компонентов полисахаридов составляют кислые аминосахара, относящиеся к трем классам: 2-амино-2-дезоксиuronовые кислоты (*D*- и *L*-галактозаминуровая кислота, иммунотипы 1 и 5 соответственно), 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроповые кислоты (*D*-глюкоизомер, иммунотип 4, *D*-манно- и *L*-гуло-изомеры, иммунотипы 3 и 7) и 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезокси-*L*-глицеро-*L*-манно-инулизоновая (псевдоглициновая) кислота (иммунотип 6). Два последних класса моносахаридов впервые были обнаружены в полисахаридах *P. aeruginosa*. Только один из семи полисахаридов (иммунотип 2) не содержит кислых моносахаридов.

Большинство аминогрупп аминосахаров ацетилировано, но в некоторых случаях встречаются другие N-ацильные заместители, такие, как формильная группа (при N2 D-галактозаминуроновой кислоты, иммунотип 1, и при N7 псевдаминовой кислоты, иммунотип 6). Аминогруппа при C3 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновых кислот (иммунотипы 3 и 7) входит в состав ацетамидиновой функции, которая в других природных углеводах обнаружена не была. Одно из производных D-галактозаминуроновой кислоты (иммунотип 1) присутствует в виде первичного амида. Этот же моносахарид, а также рамноза (иммунотип 5) несут O-ацильные группы.

Таблица 4

Антигенные характеристика семи иммунотипов *P. aeruginosa*

Иммунотип	1	2	3	4	5	6	7
Штамм Парциальные О-антителы по [2]	170 041	170 042	170 043	170 044	170 045	170 046	170 047
	6a	11a, 11b	(2a), 2c	1	10a, 10c	7a, 7d	2a, 2d

Полисахариды всех семи иммунотипов являются линейными и построены из три- или тетрасахаридных повторяющихся звеньев. Сравнение их структур показывает, что они не имеют общих олигосахаридных фрагментов. Это относится даже к имеющим одинаковый моносахаридный состав полисахаридам иммунотипов 3 и 7, в которых моносахариды расположены в различной последовательности и имеют различные N-ацильные заместители. Таким образом, получает химическое обоснование серологическая обособленность О-антителов каждого из семи иммунотипов *P. aeruginosa* [2, 5], подтвержденная нами в настоящей работе результатами торможения реакции пассивной гемагглютинации липополисахаридов.

Экспериментальная часть

¹³C-ЯМР-спектры сняты на приборах Bruker WM-250 и AM-300 (ФРГ) в D₂O при 60°C с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δ_c 50,15); концентрация растворов полисахаридов 4–6%, липополисахарида – 2%. Содержание белка определяли по методу [28].

Серологические тесты проведены с использованием типовых О-антисыворотов, полученных из Национального института гигиены (Будапешт), а также О-антисывороток к иммунотипам 1–7, приготовленных нами по методу [29]. Формализированные эритроциты барана сенсибилизировали липополисахаридами в дозах 62,5–125 мкг. Реакцию пассивной гемагглютинации липополисахаридов и ее торможение проводили как описано нами ранее [14, 21].

Бактериальные культуры и наработка биомассы. Штаммы иммунотипов 1–7 получены из Венгерской национальной коллекции бактериальных культур (Институт национальной гигиены, Будапешт). Состав их парциальных антигенов в соответствии с данными [2] приведены в табл. 4.

Выращивание клеток проводили на твердой агаровой среде с казеиновым гидролизатом (120–130 мг% аммонийного азота, pH 7,4±0,1) в аппаратуре культивирования микроорганизмов Шестеренко в течение 18 ч [14], микробную массу трижды обрабатывали ацетоном и высушивали на воздухе.

Выделение липополисахаридов и О-специфических полисахаридов. Сухие бактериальные клетки (по 30 г каждого штамма) экстрагировали 45% водным фенолом по методу [13], липополисахариды выделяли из водного слоя (иммунотипы 4 и 6) или из водно-фенольного слоя без разделения фаз (иммунотипы 1–3, 5, 7), нуклеиновые кислоты отделяли обработкой цетавлоном и лиценполисахариды осаждали этанолом из водного раствора [13]. Выходы липополисахаридов 4–9% от веса сухих клеток, содержание белка 1–9%.

Липополисахариды (по 1 г каждого штамма) нагревали с 1% уксусной кислотой (100–150 мл, 100°C, 1,5–5 ч) до образования хорошо сформированного осадка липида, который отделяли центрифугированием. Гель-фильтрацией водорастворимой фракции на колонке (55×3,7 см) с сефадексом G-50 выделили О-специфические полисахариды иммунотипов 1–5, 7. Выходы полисахаридов 20–30% от веса лиценполисахаридов.

Авторы благодарят д-ра Лапи за предоставление бактериальных культур и типовых О-антисывороток и А. С. Шашкова за съемку ¹³C-ЯМР-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

- Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 12, с. 1649–1657.
- Lányi B., Bergan T. Meth. Microbiol., 1978, v. 10, p. 93–168.
- Акатова Н. С., Смирнова Н. Е. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1982, № 7, с. 87–91.
- Stanislavsky E. S., Dmitriev B. A., Lányi B., Joo I. Acta microbiol. Acad. scient. hung., 1985, v. 32, p. 3–37.
- Fisher M. W., Devlin H. B., Gnabasik F. J. J. Bacteriol., 1969, v. 98, № 2, p. 835–836.

6. Kropinski A. M., Jewell B., Kuzio J., Milazzo F., Berry D. In: Antibiotics and chemotherapy/Eds Schonfeld H., Hahn F. E. Basel: Karger, 1985, v. 36, p. 58-75.
7. Hanesian S., Regan W., Watson D., Haskell T. H. Nature New Biol., 1971, v. 229, p. 209-210.
8. Horton D., Rodemeyer G., Haskell T. H. Carbohydr. Res., 1977, v. 55, p. 35-47.
9. Horton D., Riley D. A., Samreth S., Schweitzer M. G. In: Bacterial lipopolysaccharides/Eds Andersen L., Unger F. M. Washington: American Chemical Society, 1983, p. 21-47.
10. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 221-227.
11. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1985, v. 150, № 3, p. 541-550.
12. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. C1-C4.
13. Бестфаль О., Янн К. В кн.: Методы химии углеводов/Ред. Кошетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325-332.
14. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 106, № 2, p. 643-651.
15. Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кошарова Н. А., Дмитриев Б. А., Кошетков Н. К. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1332-1337.
16. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кошетков Н. К. Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 7, с. 995-997.
17. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Кошетков Н. К. Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 7, с. 992-994.
18. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 2, p. 289-297.
19. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 128, № 4, p. 81-90.
20. Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Парамонов Н. А., Шашков А. С., Кошетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1263-1267.
21. Dmitriev B. A., Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 4, p. 229-237.
22. Okuda S., Suzuki N. Biochem. J., 1983, v. 215, p. 597-604.
23. Knirel Y. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1986, v. 145, № 2, p. C1-C4.
24. Книрель Ю. А., Кошарова Н. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кошетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 10, с. 1387-1390.
25. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Lvov V. L., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1984, v. 143, № 2, p. C5-C8.
26. Knirel Y. 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.
27. Kenne L., Lindberg B. In: The polysaccharides/Ed. Aspinall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1984, v. 2, p. 257-363.
28. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1955, v. 193, № 1, p. 265-275.
29. Lányi B. Acta microbiol. Acad. scient. hung., 1966/1967, v. 13, p. 295-318.

Поступила в редакцию
10.IV.1986

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 21. STRUCTURE OF
O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAINS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY
OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF SEVEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
IMMUNOTYPES

KNIREL Y. A., KOCHAROVA N. A., VINOGRADOV E. V., PARAMONOV N. A.,
DMITRIEV B. A., KOCHETKOV N. K., STANISLAVSKY E. S., KHOLODKOVA E. V.*

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

* I. I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Ministry of Health
of the USSR, Moscow

On mild acid degradation of lipopolysaccharides of seven *Pseudomonas aeruginosa* immunotypes, O-specific polysaccharides were obtained and their structures established. A peculiar feature of the polysaccharides is the presence of various, mostly acidic, mono- and diaminosugars, many of which have not previously been found in nature. The absence of serological cross-reactions (inhibition of passive haemagglutination) between lipopolysaccharides of seven immunotypes correlates with the absence of any common oligosaccharide fragments in their O-specific chains. The data obtained revealed structural and serological interrelations between O-antigens of seven immunotypes and *P. aeruginosa* O-serotypes, and showed that immunotypes 1 and 7 should be included into the serological classification scheme as individual O-serotypes.