



УДК 547.458.1:543.424

## СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СИАЛОЗИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

© 1996 г. А. В. Феофанов, В. А. Олейников<sup>#</sup>, А. Б. Тузиков, А. И. Януль, Е. Ю. Крюков, К. В. Соколов, Н. В. Бовин, И. Р. Набиев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.03.96 г.

Проведен анализ спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) некоторых гликозидов N-ацетилнейраминовой кислоты и их производных, в том числе  $\alpha$ -бензилгликозида,  $\beta$ -бензилгликозида,  $\alpha$ -метилгликозида, метилового эфира  $\alpha$ -бензилгликозида,  $\alpha$ -бензилгликозида N-трифторацетилнейраминовой кислоты и  $\alpha$ -бензилгликозида 4-эпи-N-ацетилнейраминовой кислоты, и сделано отнесение колебаний, проявляющихся в ГКР-спектрах. Показано, что для адсорбции на ГКР-активной поверхности важны карбоксильная, N-ацетильная, гидроксильные группы глицерильного остатка сиаловой кислоты. Обнаружена корреляция между интенсивностью спектров ГКР сиалозидов и их связыванием с гемагглютинином вируса гриппа. Предполагается, что конформация сиалозидов в комплексе с гемагглютинином воспроизводится при адсорбции на ГКР-активной поверхности, что объясняет эту корреляцию. Рассмотрены свойства ГКР-активной поверхности, определяющие данный тип адсорбции сиалозидов.

*Ключевые слова:* сиаловые кислоты, сиалозиды, гигантское комбинационное рассеяние.

Сиаловые кислоты (SA) гликопротеинов благодаря своему типичному расположению на периферии гликокаликса имеют возможность первыми вступать в межклеточные взаимодействия. Они являются терминальными остатками углеводных цепей гликопротеинов, протеогликанов и ганглиозидов, обеспечивающими специфическое связывание во многих биологических процессах. В то же время периферическое расположение делает SA мишенью для многих вирусов, бактерий и микоплазм, в частности для вирусов гриппа всех типов и подтипов. Исследование молекулярных механизмов взаимодействия природных соединений, содержащих SA, – ключ к пониманию межклеточного узнавания как в норме, так и в патологических и инфекционных процессах.

Ранее нами было показано [1], что спектроскопия ГКР предоставляет уникальную возможность селективной регистрации сигналов SA в составе гликозидов, гликопротеинов, сиалоолигосахаридов, неогликоконъюгатов, клеточных мембран.

Сокращения: ГКР – гигантское комбинационное рассеяние, ОВЦ – окислительно-восстановительный цикл, SA – сиаловая кислота, Neu5Ac – N-ацетилнейраминовая кислота, Neu5Tf – трифторацетилнейраминовая кислота, GalA – D-галактуронозная кислота, GlcNAc – глюкозаминная (2-дезоксид-2-аминоглюкозояная) кислота, Bz – бензил, Tf – трифторацетил, Ipd – изопропилиден. Аббревиатура производных нейраминовой кислоты построена в соответствии с рекомендациями Номенклатурной комиссии IUPAC-IUB.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Спектры ГКР могут быть получены при низкой (вплоть до  $10^{-5}$  M) концентрации SA. Обнаружено, что спектры ГКР сиаловых кислот  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина здоровых доноров и больных раком заметно различны. Найдена корреляция между интенсивностью спектра ГКР сиалозидов на полимерном носителе и их связыванием с гемагглютинином вируса гриппа [1–3].

Применение спектроскопии ГКР в исследованиях SA, находящихся на периферии молекулярных или мембранных структур, базируется на следующих особенностях метода:

1) адсорбция молекул на специальном образом подготовленной серебряной поверхности приводит к усилению сигнала КР в миллион и более раз;

2) эффект усиления сигнала КР имеет место для молекул и их фрагментов, непосредственно адсорбированных или находящихся на расстоянии не более  $10 \text{ \AA}$  от ГКР-активной поверхности [4]. Удаленные от поверхности и заглубленные внутрь молекулярной системы группировки дают только фоновый неусиленный сигнал КР. Благодаря этому эффекту короткого действия спектроскопия ГКР позволяет исследовать топологию супрамолекулярных комплексов и мембранных систем [5, 6]. Известно, что взаимодействие с ГКР-активной поверхностью может служить в ряде случаев адекватной моделью для изучения поведения

биологических молекул или функционально важных молекулярных группировок на поверхности рецепторов, мембран, вирусов и клеток [1, 7, 8].

В данной работе проведен анализ спектров ГКР ряда сиалозидов и предложено соотношение линий, проявляющихся в спектрах. Полученные результаты характерны для широкого круга молекул, содержащих остатки SA, так как спектры ГКР различных сиалозидов имеют сходные спектральные особенности. Определены группировки атомов, участвующих в адсорбции на ГКР-активной поверхности и/или влияющих на адсорбционные свойства сиалозидов, а также предложена модель их адсорбции. Обнаружена качественная корреляция между интенсивностью спектров ГКР исследованных в работе сиалозидов с их способностью связываться с вирусами гриппа. Проведенный анализ колебательных мод, проявляющихся в спектрах ГКР сиалозидов, создает основу для исследования конформации и взаимодействий сиаловых кислот в составе более сложных систем: в синтетических гликоконъюгатах, в гликопротеинах, в ганглиозидах, а также на клеточной мембране.

### ГКР-спектры сиалоолигосахаридов и гликозидов

Ранее нами было показано, что ГКР-активная система на основе цитратного серебряного гидрозоля позволяет с высокой чувствительностью и избирательностью регистрировать спектры ГКР SA, находящихся в составе различных сиалозидов [1]. Спектры ГКР SA характеризуются набором интенсивных линий ( $1648, 1576, 1508, 1364 \text{ см}^{-1}$ ) и линий средней интенсивности ( $1312, 1180, 774$  и  $610 \text{ см}^{-1}$ ). Десиалирование нейраминидазой приводит к полному исчезновению спектра, что подтверждает отнесение этих линий к колебаниям SA [1].

Для оценки вклада в спектр ГКР колебаний различных молекулярных группировок, входящих в состав SA, а также для построения модели адсорбции сиалозидов на ГКР-активной поверхности были записаны спектры ГКР ряда гликозидов N-ацетилнейраминной кислоты и ее производных (рис. 1, 2), некоторых кислых сахаров, а

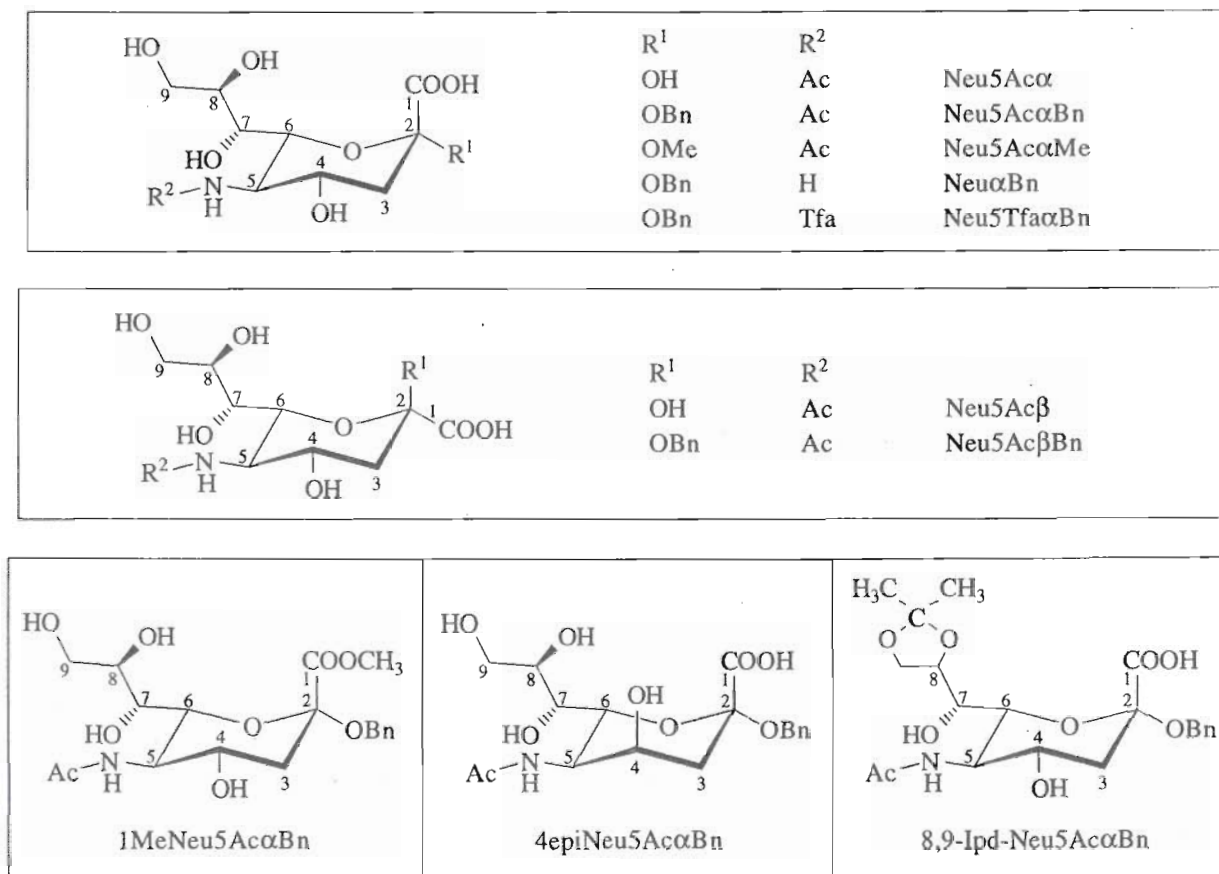


Рис. 1. Структурные формулы  $\alpha$ - и  $\beta$ -N-ацетилнейраминной кислоты (Neu5Ac $\alpha$  и Neu5Ac $\beta$ ) и их производных:  $\alpha$ - и  $\beta$ -бензилгликозидов (Neu5Ac $\alpha$ Bn и Neu5Ac $\beta$ Bn),  $\alpha$ -метилгликозида (Neu5Ac $\alpha$ Me),  $\alpha$ -бензилгликозида нейраминной кислоты (Neu $\alpha$ Bn),  $\alpha$ -бензилгликозида N-трифторацетилнейраминной кислоты (Neu5Tfa $\alpha$ Bn), метилового эфира  $\alpha$ -бензилгликозида Neu5Ac (1MeNeu5Ac $\alpha$ Bn),  $\alpha$ -бензилгликозида 4-эпи-N-ацетилнейраминной кислоты (4epiNeu5Ac $\alpha$ Bn) и  $\alpha$ -бензилгликозида 8,9-изопропилиден-N-ацетилнейраминной кислоты (8,9-Ipd-Neu5Ac $\alpha$ Bn).

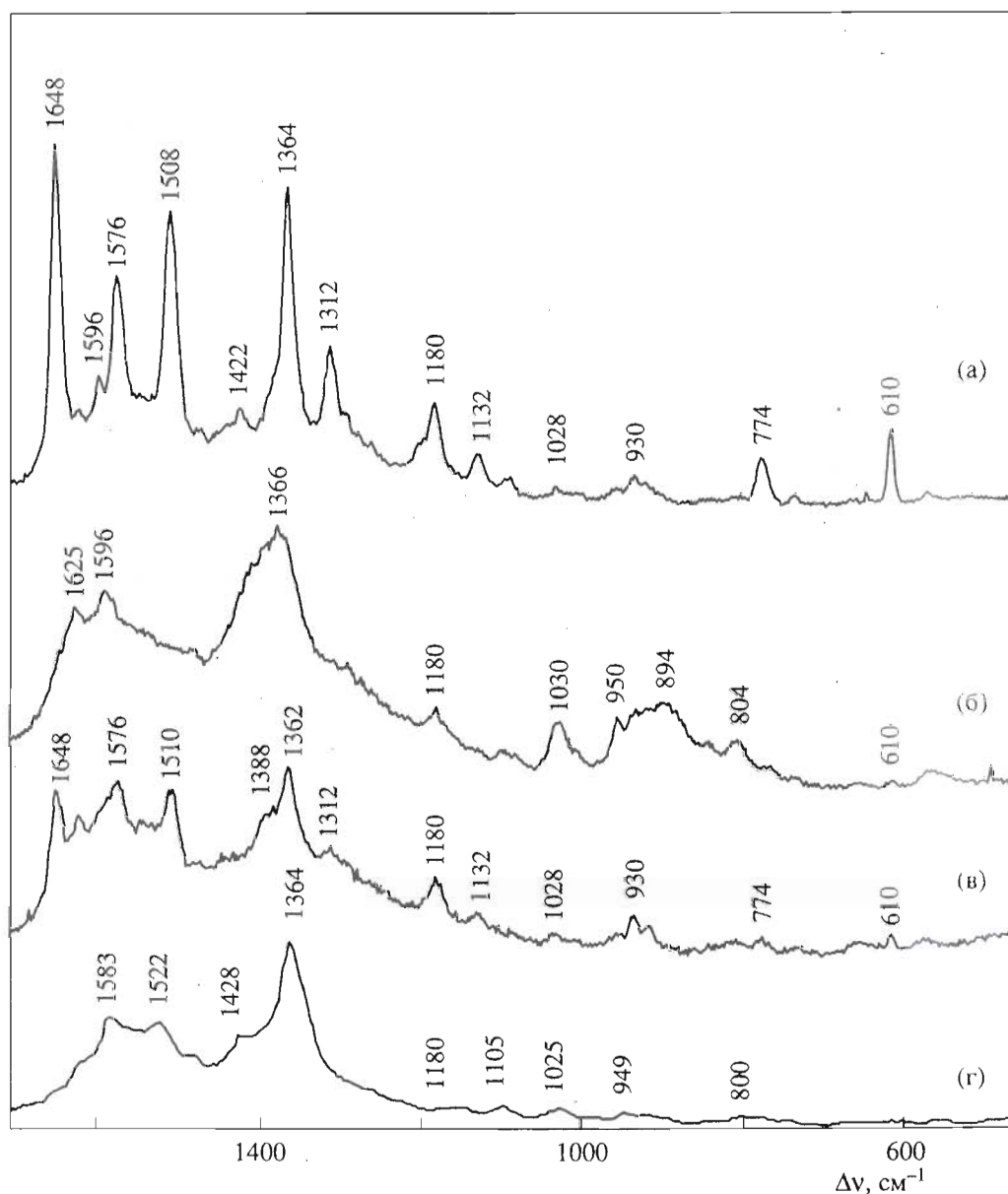


Рис. 2. Спектры ГКР гликозидов: Neu5Ac $\alpha$ Vn (а), Neu5Ac $\beta$ Vn (б) и Neu5Tf $\alpha$ Vn (в), а также *D*-галактурановой кислоты (г). Концентрация 1 мМ, длина волны возбуждения 514.5 нм, мощность 30 мВт.

также полигидроксильных соединений неуглеводной природы (рис. 3).

Ранее нами было показано, что спектры ГКР Neu5Ac $\alpha$ Vn и Neu5Ac $\alpha$ Me практически идентичны [1]. Следовательно, фенольная группа в Neu5Ac $\alpha$ Vn и метильная группа в Neu5Ac $\alpha$ Me удалены от ГКР-активной поверхности и не дают вклада в спектр; указанные группы не влияют на взаимодействие этих сиалозидов с поверхностью.

Сравнительный анализ спектров ГКР Neu5Ac $\alpha$ Vn, метилового эфира 1MeNeu5Ac $\alpha$ Vn, *D*-глюкозаминовой кислоты, солей гликолевой, молочной, винной и *D*-галактурановой кислот позволил выявить в спектрах ГКР сиалозидов ли-

нии, относящиеся к колебаниям карбоксильной группы. Спектры ГКР Neu5Ac $\alpha$ Vn и Neu5Tf $\alpha$ Vn дали возможность оценить вклад колебаний ацетамидной группировки. Вклад колебаний гидроксильных групп изучали на примере кислых сахаров, а также  $\alpha$ -*D*-глюко-гептозы и  $\alpha$ -*D*-манно-гептозы. Влияние на спектры ГКР пространственного расположения заместителей при атомах C2 и C4 сиалозидов исследовалось с помощью гликозидов Neu5Ac $\alpha$ Vn, Neu5Ac $\beta$ Vn и 4epiNeu5Ac $\alpha$ Vn. При анализе спектров ГКР использовали данные спектроскопии КР и ИК углеводов [9] и соединений, содержащих карбоксильные [10, 11], гидроксильные [10], фенольные [12], амидные и ацетамидные [13]

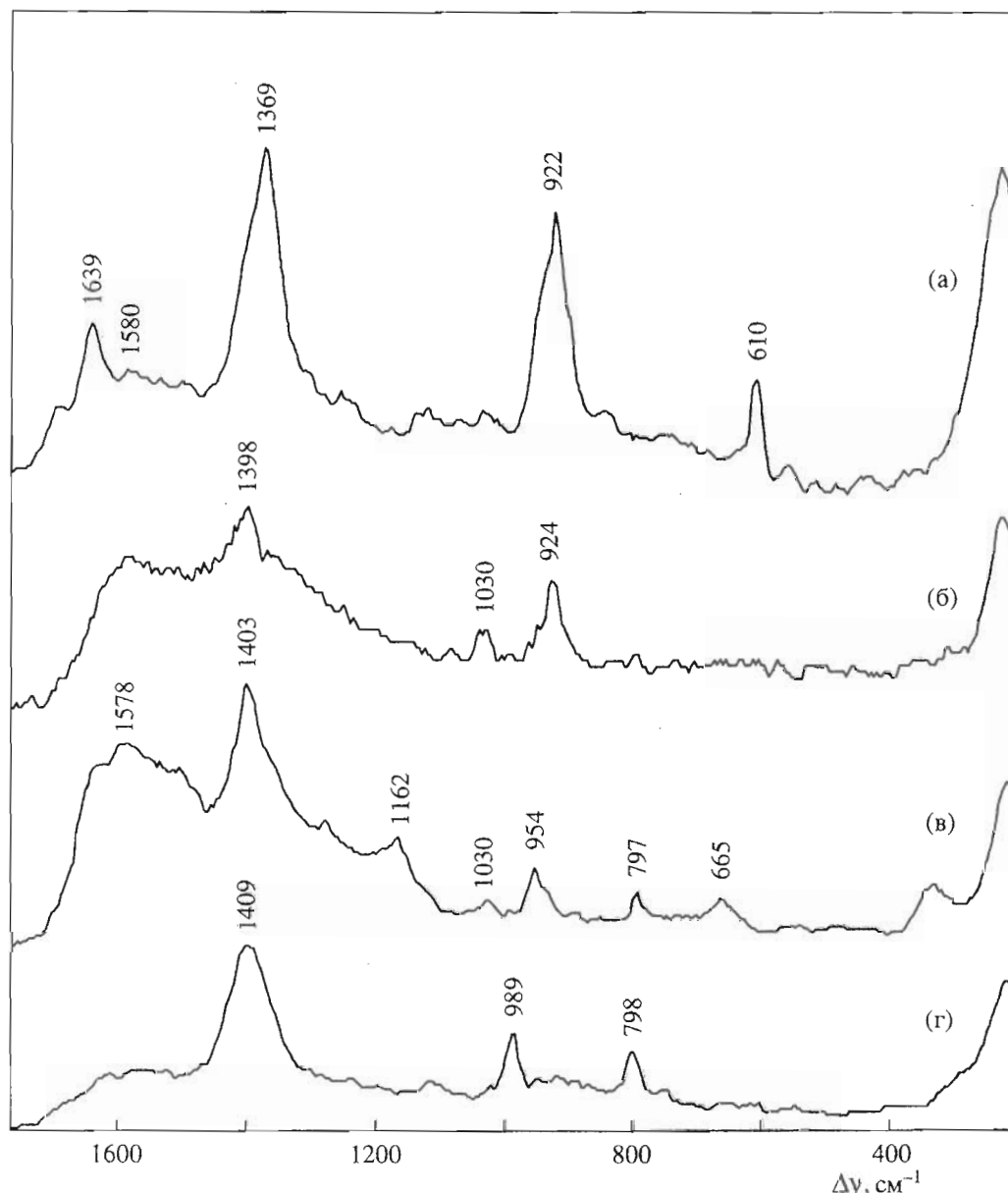


Рис. 3. ГКР-спектры GlcNA (а), гликолята (б), лактата (в) и тартрата (г) натрия. Условия регистрации спектров – см. подпись к рис. 2.

группы, а также результаты расчетов колебательных спектров углеводов [9, 14, 15]. Соотнесения колебаний, проявляющихся в спектрах ГКР свалозидов, представлены в табл. 1. Выводы, полученные на основе сравнительного анализа спектров, могут быть обобщены следующим образом.

**Колебания пиранозного цикла.** Сопоставление результатов расчетов частот колебаний моносахаридов [9, 14, 15], спектров ГКР свалозидов и модельных соединений позволило выделить группу линий, относящихся к колебаниям пиранозного цикла, СН- и ОН-групп. В ГКР-спектрах свалозидов усиливаются деформационные колебания

связей ССО, ССН и ОСН, которые представлены линиями средней или слабой интенсивности около 890, 950, 1180  $\text{см}^{-1}$ , в областях 1406–1428 и 770–800  $\text{см}^{-1}$ , а также валентные колебания ОС и СС, представленные средними по интенсивности линиями в области 1025–1030 и около 1130  $\text{см}^{-1}$ . Теоретические расчеты показывают [9, 15], что линии в колебательных спектрах моносахаридов имеют сложное происхождение. В нормальных колебаниях с определенными частотами принимает участие совокупность различных групп и связей молекулы. Поэтому нельзя приписать отдельные линии колебаниям конкретных связей пиранозного цикла или СН- и ОН-групп. В спектрах ГКР

**Таблица 1.** Интерпретация колебаний в спектрах ГКР  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидов нейраминной кислоты и *D*-галактуроната натрия\*

| Соотнесение  | Neu5Ac $\alpha$ Bn | Neu5Ac $\beta$ Bn | Neu5Tf $\alpha$ Bn | <i>D</i> -Галактуронат натрия |
|--|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| <i>ц</i> -Амид I**   | 1648vs             |                   | 1648s              |                               |
| <i>т</i> -Амид I***  | 1620w              | 1625m             | 1620m              |                               |
| $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$                            | 1596w              | 1596m             | 1596sh             | 1583m                         |
| <i>т</i> -Амид II  | 1576s              |                   | 1576s              |                               |
| $\delta(\text{CОН}), \delta(\text{CСН})$                     |                    |                   |                    | 1522m                         |
| <i>ц</i> -Амид II  | 1508vs             |                   | 1510s              |                               |
| $\delta(\text{CОН}), \delta(\text{CСН}), \delta(\text{ОСН})$ | 1422w              | 1406sh            | 1388sh             | 1428w                         |
| $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$                             | 1364vs             | 1366m             | 1362s              | 1364s                         |
| <i>т</i> -Амид III   | 1312m              |                   | 1312w              |                               |
| $\delta(\text{ОСН}), \delta(\text{CСН})$                     | 1180m              | 1180w             | 1180m              | 1180w                         |
| $\nu(\text{CC}), \nu(\text{OC})$                             | 1132m              |                   | 1132w              | 1105w                         |
| $\nu(\text{OC}), \nu(\text{CC})$                             | 1028w              | 1030m             | 1028vw             | 1025w                         |
| $\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CСН}), \delta(\text{ОСН})$ |                    | 950w              |                    | 949w                          |
| $\nu(\text{ClO}_4^-)$  | 930w               | 930w              | 930m               | 930w                          |
| $\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CСН}), \delta(\text{ОСН})$ |                    | 894m              | 914w               |                               |
| $\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CСН}), \delta(\text{ОСН})$ | 774m               | 804w              | 774w               | 800w                          |
| $\delta(\text{COO}^-)$                                       | 610m               | 610w              | 610w               |                               |

\* Интенсивности линий ГКР: vw – очень слабая, w – слабая, m – средняя, s – сильная, vs – очень сильная, sh – плечо.

\*\* Колебания ацетамидной группы в *цис*-конформации.\*\*\* Колебания ацетамидной группы в *транс*-конформации.

усиливается лишь часть колебаний. Усиление тех или иных колебательных мод и их относительная интенсивность могут меняться для различных силалозидов в зависимости от геометрии адсорбции молекулы на ГКР-активной поверхности и сбли-

женности различных молекулярных группировок с поверхностью [16].

**Колебания карбоксильной группы.** Для выяснения вклада в спектры ГКР силалозидов колебаний карбоксильной группы были записаны спектры ГКР солей гликолевой, молочной, винной и *D*-галактуроновой кислот (рис. 2, 3). В спектрах лактата и тартрата натрия наблюдаются слабая широкая линия в области  $1580 \text{ см}^{-1}$  и интенсивная линия  $1403 \text{ см}^{-1}$  (лактат) или  $1409 \text{ см}^{-1}$  (тартрат) (табл. 2), которые, согласно анализу колебательных мод в спектрах КР [10], соотносятся соответственно с антисимметричным ( $\nu_{\text{asym}}$ ) и симметричным ( $\nu_{\text{sym}}$ ) валентными колебаниями группы  $\text{COO}^-$ . В спектрах ГКР *D*-галактуроновой (рис. 2г) и *D*-глюкозаминовой (рис. 3а) кислот линии, соответствующие колебанию  $\nu_{\text{sym}}$ , наблюдаются соответственно около  $1364$  и  $1369 \text{ см}^{-1}$  (табл. 1 и 2). Это согласуется со спектрами ГКР свободных аминокислот, где интенсивная линия колебания  $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$  наблюдалась около  $1402$  (Val),  $1387$  (Glu),  $1380$  (Asp),  $1375$  (Gln),  $1365 \text{ см}^{-1}$  (Asn) [17]. В случае *D*-галактуроната (рис. 2г) и лактата (рис. 3в) заметно возрастает интенсивность линии,

**Таблица 2.** Интерпретация колебаний в спектрах ГКР некоторых гидроксикарбоновых кислот

| Соотнесение                                     | Гликолят натрия | Тартрат натрия | Лактат натрия | GlcNA  |
|---|-----------------|----------------|---------------|--------|
| $\delta(\text{NH}_2)$                           |                 |                |               | 1639m  |
| $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$               |                 |                | 1578vw        | 1580vw |
| $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$                | 1398w           | 1409s          | 1403s         | 1369s  |
| $\nu_{\text{asym}}(\text{CCO})$                 |                 |                | 1162m         |        |
| $\nu_{\text{asym}}(\text{C}^\alpha\text{CO})^*$ | 1030w           | 989m           | 1030m         |        |
| $\nu_{\text{sym}}(\text{C}^\alpha\text{CO})$    | 924m            | 798m           | 954m          | 922s   |
| $\nu_{\text{sym}}(\text{CCO})$                  |                 |                | 797m          |        |
| $\delta(\text{COO}^-)$                          |                 |                | 665w          | 610m   |
| $\delta(\text{CCO})$                            |                 |                | 339m          |        |

\*  $\text{C}^\alpha$  – углерод карбоксильной группы.

соответствующей колебаниям  $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$  – 1583 и 1578  $\text{cm}^{-1}$  (табл. 1, 2). В ГКР-спектре *D*-глюкозаминной кислоты (табл. 2) активным становится также деформационное колебание  $\delta(\text{COO}^-)$  610  $\text{cm}^{-1}$ , частота которого претерпевает низкочастотный сдвиг по сравнению с 726  $\text{cm}^{-1}$  в спектрах КР [10]. Аналогичное усиление линии и сдвиг частоты колебания  $\delta(\text{COO}^-)$ , наблюдавшиеся в спектрах ГКР свободных аминокислот [17], подтверждают сделанное соотнесение. Значительные сдвиги частот колебаний  $\nu_{\text{sym}}$  и  $\delta(\text{COO}^-)$  в ГКР-активной системе по сравнению с КР-спектрами свидетельствуют о том, что карбоксильные группы *D*-галактуроновой и *D*-глюкозаминной кислот непосредственно участвуют в адсорбции молекул на серебряной поверхности.

Определяющая роль карбоксильной группы в формировании спектра ГКР кислых сахаров подтверждается также тем, что не содержащие  $\text{COO}^-$ -группу сахараиды ( $\alpha$ -*D*-глюко-гептоза, *D*-манно-кетогептоза) дают очень слабые и значительно отличающиеся по виду спектры ГКР (не показаны).

Аналогично линии 1364 и 610  $\text{cm}^{-1}$  в спектрах ГКР сиаозидов (табл. 1) соотносятся соответственно с симметричным валентным  $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$  и деформационным  $\delta(\text{COO}^-)$  колебаниями карбоксильной группы. Слабая линия 1596  $\text{cm}^{-1}$  может быть отнесена к антисимметричному валентному колебанию  $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ . Сдвиг частот  $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$  и  $\delta(\text{COO}^-)$  по сравнению со спектрами КР [10] и высокая интенсивность линий колебаний карбоксильной группы позволяют сделать вывод, что адсорбция сиаозидов на серебряной поверхности происходит через карбоксильную группу и плоскость, в которой лежит  $\text{COO}^-$ -группа, ориентирована по нормали (или под небольшим углом к нормали) к этой поверхности. Оба атома кислорода, по-видимому, принимают участие в адсорбции. В противном случае на одном из атомов кислорода карбоксильной группы происходила бы локализации электронной плотности и в спектре ГКР в области 1700–1720  $\text{cm}^{-1}$  присутствовала бы характеристичная линия  $\nu(\text{C}=\text{O})$  [10, 18]. Адсорбция с участием карбоксильной группы может происходить за счет электростатических взаимодействий и/или взаимодействия с центрами адсорбции [19].

**Колебания ацетамидной группы.** Колебания ацетамидной группы в спектрах ГКР гликозидов Neu5Ac $\alpha$ Vn и Neu5Ac $\alpha$ Me, представленные линиями 1648, 1620, 1576, 1508 и 1312  $\text{cm}^{-1}$  (табл. 1), соотнесены нами с колебаниями Амид I, Амид II и Амид III [1, 10, 12, 13]. Линии 1620, 1576 и 1312  $\text{cm}^{-1}$  в спектрах ГКР хорошо соотносятся с колебаниями, регистрируемыми в ИК-спектрах и спектрах предрезонансного КР водных растворов *N*-метил-

ацетамида и некоторых других *N*-алкилацетамидов в *транс*-конформации [13]: *m*-Амид I (1620  $\text{cm}^{-1}$ ), *m*-Амид II (1574–1581  $\text{cm}^{-1}$ ) и *m*-Амид III (1312–1316  $\text{cm}^{-1}$ ). В спектрах предрезонансного КР молекул лактамов и некоторых третичных аминов, для которых характерна *цис*-конформация амидной группы, обнаружено исчезновение линии Амид III и характеристичный сдвиг колебания Амид II в область 1486–1510  $\text{cm}^{-1}$  [13, 20]. Для *цис*-изомеров *N*-метилацетамида и *N,N*-диметилацетамида в растворе колебания  $\nu$ -Амид II (Амид II в *цис*-конформации) имеют частоты 1496 и 1509  $\text{cm}^{-1}$  соответственно [13]. Поэтому линия 1508  $\text{cm}^{-1}$  в спектрах ГКР сиаозидов может быть отнесена к колебанию  $\nu$ -Амид II (табл. 1). Линия 1648  $\text{cm}^{-1}$  приписана нами колебанию  $\nu$ -Амид I (табл. 1), поскольку обнаружено, что ее интенсивность меняется синхронно с интенсивностью линии  $\nu$ -Амид II, указывая на изменение относительной концентрации *цис*-изомера. Это соотнесение не противоречит данным КР, так как частота колебания Амид I в спектрах *N,N*-диалкилацетамидов, для которых характерна *цис*-конформация амидной группы, лежит в области 1638–1645  $\text{cm}^{-1}$  [10].

Для спектров КР вторичных амидов характерны интенсивные линии Амид I, Амид III и слабая линия Амид II [10]. Известно [16, 17, 21], что в спектрах ГКР правила отбора могут меняться, что приводит к усилению линий, обычно слабых или не проявляющихся в спектрах КР. Усиление в спектрах ГКР колебания Амид II по сравнению с Амид I и Амид III, по-видимому, является отражением альтернативных спектрам КР правил отбора. Отметим, что интенсивная линия колебания Амид II наблюдалась также в спектрах ГКР дипептидов [21].

Двойной набор амидных колебаний, регистрируемый в спектрах ГКР Neu5Ac $\alpha$ Vn, Neu5Ac $\alpha$ Me и ряда других *N*-ацетилсиаозидов, позволяет заключить, что при адсорбции этих молекул реализуется как *цис*-, так и *транс*-конформация ацетамидной группы. Значительное усиление линий *цис*-изомера указывает на то, что *цис-транс* равновесное состояние амидной группы *N*-ацетилсиаозидов смещается в сторону *цис*-изомера по сравнению с *цис-транс*-равновесным состоянием *N*-метилацетамида (1–2% *цис*-изомера [13]) и Neu5Ac $\alpha$ Me в растворе [22]. Учитывая, что сечение КР колебательных мод *цис*-изомера в несколько раз превышает сечение КР колебательных мод *транс*-изомера [13], можно предположить, что относительная концентрация *цис*-изомера  $\alpha$ -бензил-,  $\alpha$ -метил- и ряда других [1] адсорбированных на ГКР-активной поверхности *N*-ацетилсиаозидов достигает нескольких десятков процентов.

Обнаружено, что фторирование ацетамидной группы ухудшает адсорбцию сиаозида, что в

случае Neu5TfαVn проявляется как ослабление интенсивности спектра ГКР как целого (рис. 2в). Отмечено относительное ослабление линий *α*-Амид I и *α*-Амид II по сравнению с линиями *m*-Амид I и *m*-Амид II, что указывает на уменьшение относительной концентрации *цис*-изомера Neu5TfαVn по сравнению с Neu5AcαVn.

**Роль гидроксильных групп в адсорбции сиалозидов.** Существенную роль в адсорбции молекул гликозидов, и в частности сиалозидов, играют гидроксильные группы. Ранее нами было показано, что модификация глицерильного остатка в положении С6 сиалозидов (соединение 8,9-Ipd-Neu5AcαVn) приводит к полному исчезновению характерного спектра ГКР [1], что, по-видимому, объясняется значительным ухудшением адсорбционных свойств.

Аксиальная ориентация ОН-группы в положении С4 вызывает резкое изменение ГКР-спектра 4epiNeu5AcαVn по сравнению с Neu5AcαVn и ослабление его интенсивности: в спектре наблюдаются слабые линии колебаний карбоксильной группы, пиранозного цикла, СН- и ОН-групп. В области амидных колебаний присутствует широкая полоса с максимумом 1583 и плечом 1530 см<sup>-1</sup>, происхождение которой неясно. Можно предположить, что вклад в эту полосу в области 1583 см<sup>-1</sup> дают относительно усиленное колебание  $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$  и колебание *m*-Амид II, а плечо 1530 см<sup>-1</sup> формируется колебаниями  $\delta(\text{CONH})$  и  $\delta(\text{CCH})$ , как в случае *D*-галактуроновой кислоты (рис. 2г). В любом случае исчезновение в спектре интенсивных амидных колебаний говорит о том, что ацетамидная группа не принимает участия в адсорбции 4epiNeu5AcαVn и удалена от ГКР-активной поверхности. Исходя из предположения, что гидроксильные группы активно участвуют в адсорбции сиалозидов, особенности ГКР-спектра 4epiNeu5AcαVn по сравнению с Neu5AcαVn могут быть интерпретированы как изменение геометрии адсорбции, связанное с аксиальной ориентацией гидроксильной группы в положении С4.

Влияние гидроксильных групп на геометрию и эффективность адсорбции гликозидов подтверждается сравнительным анализом спектров ГКР гликолята, лактата и *D*-галактуроната натрия, а также *D*-глюкозаминовой кислоты (рис. 2, 3). В зависимости от числа и расположения гидроксильных групп в молекулах этих соединений карбоксильная группа оказывается либо сравнительно удаленной от серебряной поверхности (гликолят натрия – слабый сигнал карбоксильной группы), либо сближенной с ней (лактат натрия – сильный сигнал карбоксильной группы), либо участвует в адсорбции (GlcNA и *D*-галактуронат натрия – сильный сигнал карбоксильной группы и сдвиг линий вследствие взаимодействия с поверхностью).

**Адсорбция β-аномеров сиаловых кислот.** Изменение ориентации заместителя в положении С2 молекулы (Neu5AcβVn по сравнению с Neu5AcαVn) кардинально меняет картину взаимодействия гликозида с поверхностью металла. Адсорбция Neu5AcβVn слабее, чем Neu5AcαVn, что проявляется в уменьшении интенсивности сигнала ГКР (рис. 2а, б). Наиболее интенсивная линия в ГКР-спектре Neu5AcβVn (1366 см<sup>-1</sup>) соответствует колебанию  $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$  и указывает на то, что адсорбция происходит с участием карбоксильной группы. На основании исчезновения в спектре β-гликозида линий *α*-Амид I, *α*-Амид II и резкого ослабления по сравнению с  $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$  линий *m*-Амид I, *m*-Амид II, можно заключить, что ацетамидная группа Neu5AcβVn удалена от ГКР-активной поверхности и находится в *транс*-конформации.

Спектр ГКР свободной *N*-ацетилнейраминной кислоты зарегистрировать не удастся, что, по-видимому, объясняется преобладанием в водном растворе β-аномера, доля которого, согласно данным [23], составляет 95%.

По-видимому, ослабление адсорбционных свойств и изменение геометрии адсорбции – общее свойство β-сиалозидов.

**Влияние заместителя в положении С1.** Замещение карбоксильной группы на метоксикарбонильную в 1MeNeu5AcαVn приводит к полному исчезновению спектра ГКР. Поскольку не удается зарегистрировать ни слабого сигнала амидных колебаний, ни линий колебаний пиранозного кольца, ОН- и СН-групп, можно предположить, что 1MeNeu5AcαVn теряет способность адсорбироваться на ГКР-активной поверхности. Тем самым еще раз подтверждается значительная роль карбоксильной группы в адсорбции и формировании характерного спектра сиалозидов.

**Геометрия адсорбции сиалозидов на поверхности серебряных частиц цитратного золя.** Анализ полученных данных позволяет предположить следующую модель адсорбции сиалозидов, в частности Neu5AcαVn и Neu5AcαMe, на серебряной поверхности. Адсорбция происходит через карбоксильную группу, и плоскость, в которой лежит  $\text{COO}^-$ -группа, ориентирована по нормали (или под небольшим углом к нормали) к этой поверхности. Адсорбция происходит за счет электростатических взаимодействий или (что менее вероятно) водородного связывания обоих атомов кислорода карбоксильной группы с центрами адсорбции. Гидроксильные группы полигидроксильного фрагмента С7–С9 принимают участие в адсорбции, определяя как ее эффективность, так и специфическую ориентацию молекулы сиалозида, при которой ацетамидная группа оказывается сближенной с поверхностью, и ОСNH-фрагмент фиксируется либо в *транс*- (70–90%), либо в *цис*-конформации (30–10%). Агликоновый заместитель удален от

поверхности и слабо влияет на адсорбционные свойства сиалозида.

**Другие ГКР-активные системы.** Известно, что геометрия адсорбции молекул может различаться в различных ГКР-активных системах. При этом сближенными с поверхностью металла оказываются разные группировки молекулы, колебания которых избирательно регистрируются в спектрах ГКР. Это в общем случае позволяет исследовать пространственное расположение и взаимодействие отдельных частей сложных объектов. Кроме того, интенсивность спектров ГКР одного и того же соединения может значительно варьировать в различных ГКР-активных системах, что делает актуальным поиск системы, наиболее чувствительной и избирательной для исследуемого класса соединений.

В данной работе были исследованы адсорбционные свойства сиалозидов в некоторых других помимо цитратного гидрозоля серебра ГКР-активных системах: на поверхности серебряного электрода, разрыхленного путем проведения ОВЦ, и в коллоидной системе, приготовленной восстановлением азотнокислого серебра боргидридом натрия (боргидридный золь).

Спектры ГКР Neu5Ac $\alpha$ Vn и Neu5Ac $\beta$ Vn, адсорбированных на электроде, принципиально отличаются от спектров, полученных с использованием цитратного гидрозоля серебра. В этих спектрах усиливаются исключительно колебания фенильной группы молекул (линии 1597, 1215, 1032, 1003 и 650 см<sup>-1</sup>), соответствующие, согласно классификации Вильсона [12], колебательным модам  $\nu_{8a}$ ,  $\nu_{13}$ ,  $\nu_{18a}$ ,  $\nu_{12}$  и  $\nu_{6b}$  бензольного кольца. Таким образом, адсорбция бензилгликозидов на электроде происходит через ароматическое кольцо. Не содержащий фенильной группы метилгликозид Neu5Ac $\alpha$ Me спектра ГКР на электроде не дает. Изменение потенциала электрода не приводит к реадсорбции бензилгликозидов через карбоксильную группу. Обнаружено, что варьирование потенциала электрода меняет отношение интенсивностей линий 1003 и 1030 см<sup>-1</sup>, что указывает на изменение ориентации фенильного кольца относительно поверхности электрода [24].

ГКР-спектр Neu5Ac $\alpha$ Vn, записанный с использованием боргидридного золя, представляет собой суперпозицию интенсивных линий фенильной группы и слабых линий остатка сиаловой кислоты. Последние совпадают по частоте с линиями, регистрируемыми с применением цитратного золя.

Эти результаты показывают, что серебряный цитратный золь остается пока единственной ГКР-активной системой, позволяющей с высокой чувствительностью и избирательностью регистрировать спектры ГКР остатков сиаловых кислот в составе различных сиалозидов.

### *Корреляция между интенсивностью спектра ГКР и биологической активностью сиалозидов*

Сопоставление результатов измерения спектров ГКР гликозидов и их способности связываться с гемагглютинином вируса гриппа [2, 3, 25] обнаруживает качественную корреляцию, а именно:

1. Сиалозиды с модифицированной карбоксильной группой, не обладающие биологической активностью [2, 3], спектра ГКР не дают.

2.  $\beta$ -Аномеры не обладают ингибиторной активностью в отношении вируса гриппа [25]. Соответственно и адсорбция Neu5Ac $\beta$ Me на ГКР-активной поверхности отсутствует.

3. Связывание 4epiNeu5Ac $\alpha$ Vn с гемагглютинином, так же как и интенсивность его спектра ГКР, резко уменьшается по сравнению с Neu5Ac $\alpha$ Vn.

4. Замена метильной группы N-ацетильного фрагмента Neu5Ac $\alpha$ Vn на CF<sub>3</sub>-группу приводит к уменьшению связывания с гемагглютинином [25] и к уменьшению интенсивности спектра ГКР. Однако эффект, вызываемый CF<sub>3</sub>CO-заместителем, меньше, чем эффект эимеризации в положении C4, что верно и для связывания с рецептором, и для интенсивности спектра ГКР.

5. Ранее [2, 3] было показано, что относительная способность к связыванию с гемагглютинином мультивалентных полимерных конъюгатов с различным содержанием сиаловой кислоты коррелирует с относительной интенсивностью их спектров ГКР.

6. Полученные в данной работе результаты позволяют сделать вывод, что для адсорбции на ГКР-активной поверхности, так же как и для связывания с белком [25–30], важны карбоксильная, N-ацетильная, а также гидроксильные группы глицерильного остатка SA.

7. По-видимому, совпадение групп сиаловых кислот, связывающихся с гемагглютинином и ГКР-активной поверхностью, – не единственная причина корреляции между интенсивностью спектра ГКР и биологической активностью сиалозидов. Есть основания считать, что в обоих случаях молекула SA претерпевает сходные конформационные изменения. Конформация SA в растворе определена с помощью ЯМР [31]. Направленность боковых заместителей SA в составе комплекса с гемагглютинином известна из рентгеноструктурных данных [32]. При связывании SA с гемагглютинином наиболее существенное изменение конформации затрагивает ацетамидную группу, фрагмент которой (NHCO), оставаясь в транс-конформации, формально поворачивается вокруг связи C5N на 180° с разрывом внутримолекулярных водородных связей между NH-группой и C7-гидроксилом, а также между CO-группой и C4-гидроксилом (рис. 4). Стабилизация SA в новой конформации происходит благодаря



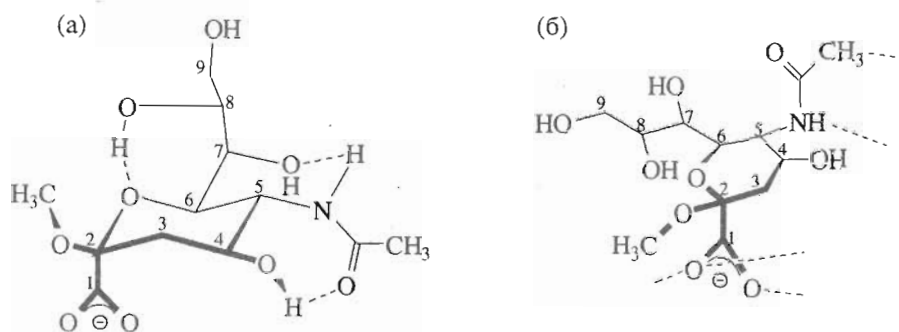


Рис. 4. Пространственная структура Neu5Ac $\alpha$ Me: (а) – в водном растворе (по данным спектроскопии ЯМР [31]), (б) – в составе активного центра рецептора гемагглютиниона (по результатам исследования методами рентгеновской кристаллографии и молекулярного моделирования [31, 32]). Штриховыми линиями показаны внутримолекулярные водородные связи, определяющие конформацию гликозида в свободном состоянии (а), и связи между Neu5Ac $\alpha$ Me и гемагглютинином (б).

образованию новых водородных связей, а также гидрофобному взаимодействию с аминокислотными остатками связывающего фрагмента белка [32]. Ситуация при связывании SA с поверхностью серебра представляется весьма сходной: найденное повышение содержания *цис*-изомера сиалозида при адсорбции можно объяснить тем, что для связывания SA с поверхностью необходима C7-гидроксильная группа, при этом разрывается водородная связь этой группы с ацетамидной и доля *цис*-конформера (в котором водородная связь между NHCO-группировкой и C7-OH невозможна) увеличивается.

Обнаруженные соответствия могут быть объяснены сходством геометрии адсорбции сиалозидов на ГКР-активной поверхности и геометрии связывания сиалозидов в активном центре лиганда. Каковы же свойства ГКР-активной поверхности, определяющие данное сходство?

Центр связывания гемагглютиниона вируса гриппа содержит консервативный остаток Glu190, карбоксильная группа которого определяет отрицательный заряд центра в целом [32]. Потенциал серебряных золевых частиц цитратного золя является отрицательным по отношению к точке нулевого заряда серебра [17]. Таким образом, в обоих случаях реализуется взаимодействие отрицательно заряженной молекулы сиалозида с отрицательно поляризованным "рецептором", что само по себе довольно необычно.

Центр связывания на поверхности гемагглютиниона представляет собой неглубокую, полностью открытую со стороны растворителя впадину, дно и стенки которой образованы аминокислотными остатками, обеспечивающими связывание сиалозида за счет образования системы межмолекулярных водородных связей [32]. Связывание сиалозида не сопровождается образованием ковалентных связей и не вызывает конформационной перестройки гемагглютиниона [32]. Такой тип связывания можно условно характеризовать как

статическое взаимодействие фиксированных в определенных местах молекулярных группировок рецептора с комплементарными молекулярными группировками сиалозида. Теории адсорбции молекул и явления ГКР позволяют предложить механизм формирования на поверхности серебряной золевой частицы донорных и акцепторных состояний, полностью комплементарных группировкам атомов адсорбированной молекулы, – приблизительный аналог взаимодействий сиалозида с гемагглютинином вируса гриппа. Так, теория сил изображения [33] основывается на явлении перераспределения "электронного газа" металлической частицы вблизи точки, к которой подносится диполь или заряд, и формировании в этом месте наведенного диполя противоположной ориентации или противоположно заряженного поляризованного состояния (заряда). Взаимодействие между дипольными моментами и зарядами молекулы, с одной стороны, и наведенными дипольными моментами и поляризованными состояниями в металле – с другой, способны удерживать молекулу в пределах двойного электрического слоя золевой частицы, создавая в отдельных случаях имитацию взаимодействий лиганд-рецептор.

Ряд данных указывает на реализацию дополнительного механизма адсорбции через специфические сайты адсорбции, роль которых могут выполнять кластеры серебра или другие дефекты поверхности металлической частицы [4, 11, 24, 33, 34]. Существование таких сайтов адсорбции было впервые предсказано в работе [34] и продемонстрировано для золевой ГКР-активной системы [4]. Мы предполагаем, что именно взаимодействие со специфическими сайтами определяет адсорбцию сиалозида на поверхности цитратного золя через карбоксильную группу. В пользу этого предположения свидетельствует то, что на электроде в электрохимической ячейке ни при каком значении потенциала не удалось добиться сходной с

цитратным золев геометрией адсорбции сиалозидов. По-видимому, при преагрегации цитратного золя перхлоратом натрия (необходимое условие для проявления эффекта ГКР в цитратном золе) формируются особые специфические сайты адсорбции, которые не образуются при проведении ОВЦ на электроде.

Среди факторов, определяющих адсорбцию сиалозида на ГКР-активной поверхности в той же конформации, что и при связывании с гемагглютинином, необходимо отметить уникальную конформацию сиаловой кислоты. По данным спектроскопии ЯМР [31], сиаловая кислота в составе сиалозидов имеет единственную фиксированную конформацию в водном растворе. Подвижность молекулярных группировок сиаловой кислоты сильно ограничена внутримолекулярными водородными связями. В процессе взаимодействия как с гемагглютинином, так и с ГКР-активной поверхностью конформация SA изменяется сходным образом, оставляя зафиксированным взаимное расположение глицирильной, карбоксильной и гидроксильных групп.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гликозиды N-ацетилнейраминовой кислоты (рис. 1):  $\alpha$ -бензилгликозид,  $\beta$ -бензилгликозид,  $\alpha$ -метилгликозид, а также метиловый эфир  $\alpha$ -бензилгликозида,  $\alpha$ -бензилгликозид нейраминовой кислоты,  $\alpha$ -бензилгликозиды N-трифторацетилнейраминовой и 4-эпи-N-ацетилнейраминовой кислот синтезировали согласно [35].  $\alpha$ -Бензилгликозид 8,9-изопропилиден-N-ацетилнейраминовой кислоты получен как описано в работе [1].

Спектры ГКР регистрировали с помощью КР-спектрометра (Jobin-Yvon Ramanog HG-2S, Франция). Для возбуждения использовали линию 514.5 нм аргонового лазера Spectra-Physics 164-03. Во всех экспериментах мощность излучения на образце не превышала 30 мВт. Все спектры регистрировали в режиме сканирования с шагом  $1 \text{ см}^{-1}$  и временем накопления каждой точки 1 с.

В качестве ГКР-активных систем использовали: серебряный гидрозоль, получаемый восстановлением нитрата серебра цитратом натрия; серебряный электрод, поверхность которого огрубляли проведением окислительно-восстановительно цикла (ОВЦ) в электрохимической ячейке; серебряный гидрозоль, получаемый восстановлением нитрата серебра боргидридом натрия.

Процедура приготовления серебряного цитратного гидрозоля и его преагрегация перхлоратом натрия подробно описаны в работе [36]. Кратко: 90 мг  $\text{AgNO}_3$  ("Реахим") растворяли в 500 мл бидистиллированной воды и доводили до кипения. Затем прибавляли по каплям 10 мл 1% цитрата натрия (Merck) и кипятили 90 мин при интен-

сивном перемешивании. Перед экспериментом 20 мкл разбавленного в 2 раза водой гидрозоля агрегировали добавлением 2 мкл 0.6 М  $\text{NaClO}_4$  и смешивали с 20 мкл раствора исследуемого соединения в воде.

Рыхление поверхности серебряного электрода в электрохимической ячейке проводили как описано в работе [17]. Использовали ячейку объемом  $0.5 \text{ см}^3$ , диаметр рабочего электрода составлял  $\sim 2 \text{ мм}$ , электролит – 0.3 М раствор KCl. Для проведения ОВЦ на рабочий электрод последовательно подавали потенциалы:  $-0.65$ ;  $0$ ;  $+0.25$ ;  $0$ ;  $-0.65 \text{ В}$  на 20 мин; 1 мин; 15 с; 15 с; 5 мин соответственно. Для удаления электролита электрод промывали и высушивали. На подготовленную таким образом поверхность электрода наносили 3 мкл раствора (концентрация 1 мМ) исследуемого соединения. По другому варианту исследуемое соединение добавляли в электролит (концентрация 1 мМ), после чего проводили ОВЦ, как описано выше. В данном случае схема потенциостатирования позволяла задавать и варьировать потенциал электрода, что обеспечивало возможность управлять условиями адсорбции исследуемого соединения. Возбуждение и сбор рассеянного излучения осуществляли сквозь прозрачную стенку ячейки без удаления электролита.

Процедура приготовления серебряного боргидридного гидрозоля описана в [37]. Кратко: 2 мл 1 мМ раствора азотнокислого серебра добавляли по каплям к 6 мл 2 мМ раствора боргидрида натрия при  $0^\circ\text{C}$ . Смесь помещали на 2 ч в холодильник ( $4^\circ\text{C}$ ). Непосредственно перед экспериментом смешивали равные объемы гидрозоля и раствора исследуемого соединения.

Данная работа выполнена при поддержке грантов МНФ (№ МПУ300), РФФИ (№ 96-04-48764) и частично INTAS (№ 93-1829 ext).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolov K.V., Byramova N.E., Mochalova L.V., Tuzikov A.B., Shiyani S.D., Bovin N.V., Nabiev I.R. // *Appl. Spectroscopy*. 1993. V. 47. P. 535–538.
2. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Manfait M. // *Biomolecular Spectroscopy, Part A. V. 20* / Eds R.J.H. Clark, R.E. Hester. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: John Wiley & Sons, 1993. P. 267–338.
3. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Oleinikov V.A., Yanul A.I., Feofanov A.V., Shiyani S.D., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *Int. Conf. "Biology and Chemistry of Sialic Acids"*. Abstracts. M., 1994. P. 16–18.
4. Hildebrandt P., Stockburger M. // *J. Phys. Chem.* 1994. V. 88. P. 5935–5944.
5. Picorel R., Lu T., Holt R.E., Cotton T.M., Seibert M. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 707–712.
6. Nabiev I.R., Efremov R.G., Chumanov G.D. // *J. Biosci.* 1985. V. 8. P. 363–374.

7. Hildebrandt P., Stockburger M. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 6710–6721.
8. Hildebrandt P., Stockburger M. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 6722–6728.
9. Жбанков Р.Г., Андрианов В.М., Ратайчик Х., Мархевка М. // *Журн. физ. химии*. 1995. Т. 69. С. 553–558.
10. Dollish F.R., Fateley W.G., Bentley F.F. // *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*. New-York–London–Sydney–Toronto: Wiley, 1974.
11. Spinner E. // *J. Chem. Soc.* 1964. P. 4217–4226.
12. Varsanyi G. // *Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives*. Budapest: Akad. Kiado, 1974. V. 1.
13. Song S., Asher S.A., Krimm S., Shaw K.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 1155–1163.
14. Андрианов В.М., Жбанков Р.Г., Дашевский В.Г. // *Журн. структур. химии*. 1980. Т. 21. С. 42–47.
15. Zbancov R.G. // *J. Mol. Struct.* 1992. V. 275. P. 65–84.
16. Creighton J.A. // *Spectroscopy of Surfaces* / Eds R.J.H. Clark, R.E. Hester. N. Y.: Wiley, 1988. P. 37–61.
17. Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д. // *Успехи физ. наук*. 1988. Т. 154. С. 459–496.
18. Mueller E., Blume A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1146. P. 45–51.
19. Otto A. // *Colloids Surf.* 1989. V. 38. P. 27–36.
20. Wang Y., Purrello R., Spiro T.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 8274–8276.
21. Herne T.M., Ahern A.M., Garrell R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 846–854.
22. Vliegthart J.F.G., Dorland L., Van Halbeek H., Haverkamp J. // *Cell Biology Monographs*. V. 10 / Ed. R. Schauer. Wien–New York: Springer-Verlag, 1982. P. 127–172.
23. Schauer R. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1982. V. 40. P. 131–234.
24. Флейшман М., Хилл И.Р. // *Гигантское комбинационное рассеяние* / Ред. Р. Ченг, Т. Фуртак. М.: Мир, 1984. С. 274–290.
25. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Byramova N.E., Mochalova L.V., Golbraikh A.A., Shenderovich M.D., Finne J., Bovin N.V. // *Virology*. 1993. V. 196. P. 111–121.
26. Pritchett T. J., Brossmer R., Rose U., Paulson J.C. // *Virology*. 1987. V. 160. P. 502–506.
27. Pritchett T.J., Paulson J.C. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 9850–9858.
28. Sauter N.K., Bednarsky M.D., Wursburg B.A., Hanson J.E., Whitesides G.M., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 8388–8396.
29. Sauter N.K., Hanson J.E., Glick G.D., Brown J.H., Crowther R.L., Seong-Joon P., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 9609–9621.
30. Kelm S., Paulson J.C., Rose U., Brossmer R., Schmid W., Bandgar B.P., Schreiner E., Hartmann M., Zbiral E. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 205. P. 147–153.
31. Czarniecki M.F., Thornton E.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 8273–8279.
32. Weis W., Brown J.H., Cusack S., Paulson J.C., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Nature*. 1988. V. 333. P. 426–431.
33. Шапц Д.К. // *Гигантское комбинационное рассеяние* / Ред. Р. Ченг, Т. Фуртак. М.: Мир, 1984. С. 46–60.
34. Otto A., Timper J., Billman J., Pockrand I. // *Phys. Rev. Lett.* 1980. V. 45. P. 46–50.
35. Byramova N.E., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *Carbohydr. Res.* 1992. V. 237. P. 161–175.
36. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Voloshin O.N. // *J. Raman Spectrosc.* 1990. V. 21. P. 333–336.
37. Laserna J.J., Torres E.L., Winefordner J.D. // *Anal. Chim. Acta*. 1987. V. 200. P. 469–480.

## Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy of Sialosides and Their Derivatives

A. V. Feofanov, V. A. Oleinikov, A. B. Tuzikov, A. I. Ianoul, E. Yu. Kryukov, K. V. Sokolov, N. V. Bovin, and I. R. Nabiev

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia.*

**Abstract**—The spectra of the surface-enhanced Raman scattering (SERS) of some glycosides of *N*-acetylneuraminic acid and their derivatives, including  $\alpha$ -benzyl glycoside,  $\beta$ -benzyl glycoside,  $\alpha$ -methyl glycoside, methyl ester of  $\alpha$ -benzyl glycoside,  $\alpha$ -benzyl glycoside of *N*-trifluoroacetylneuraminic acid, and  $\alpha$ -benzyl glycoside of 4-*epi-N*-acetylneuraminic acid, were analyzed. The assignment of the bands appearing in the SERS spectra was made. It was shown that for adsorption on the SERS-active surface, carboxylic, *N*-acetyl, and hydroxyl groups of the glycerol residue of sialic acid are important. A correlation between the intensity of the SERS spectra of sialosides and their binding together with hemagglutinin of the influenza virus was found. It was proposed that the conformations of sialosides in the complex with hemagglutinin and upon the adsorption at the SERS-active surface are similar, which explains this correlation. Surface characteristics that determine a given type of the sialoside adsorption were considered.

*Key words:* sialic acids, sialosides, surface-enhanced Raman scattering.