


На правах рукописи



**ГРАЧЕВ**

**Алексей Александрович**

**СПЕКТРАЛЬНОЕ (ЯМР) И КОНФОРМАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ОЛИГОСАХАРИДОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ФРАГМЕНТАМ ФУКОИДАНОВ**

02.00.03 – органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена в лаборатории химии гликоконъюгатов Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН

Научный руководитель:  
профессор, доктор химических наук **Нифантьев Николай Эдуардович**

Официальные оппоненты:  
доктор химических наук **Анаников Валентин Павлович**  
доктор химических наук **Польшаков Владимир Иванович**

Ведущая организация: Химический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится « 29 » сентября 2006 г. в 11<sup>30</sup> часов на заседании диссертационного совета К 002.222.01 по присуждению ученой степени кандидата химических наук в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН

Автореферат разослан « 28 » августа 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета К 002.222.01

доктор химических наук



Л.А. Родионовская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Настоящая работа посвящена изучению конформационных свойств олигосахаридных фрагментов фукоиданов – природных полисахаридов, обладающих широким спектром физиологической активности. Известно, что эти биополимеры ингибируют воспаления, оказывают антикоагулянтное и антиангиогенное действие, блокируют бактериальную и вирусную адгезии. Фукоиданы построены преимущественно из  $\alpha$ -L-фукопиранозных остатков, связанных в полимерные цепи. При этом для фукоидановых цепей характерно наличие разветвленных фрагментов, большая степень сульфатирования, а также присутствие других углеводных остатков (глюкозы, галактозы, ксилозы, глюкуроновой кислоты).

Наличие физиологической активности у фукоиданов связывают с тем, что отдельные участки их полисахаридных цепей имитируют природные углеводные лиганды белковых рецепторов. Это свойство фукоиданов определяется наличием в их структуре сульфатных групп, которые имеют определенную пространственную ориентацию. Таким образом, для понимания механизма физиологической активности необходимо знать пространственную структуру фукоиданов.

Структурная характеристика природных фукоиданов осложнена из-за их нерегулярности, гетерогенности, а также отсутствия методов их направленного и контролируемого расщепления. Изучение конформационных свойств олигофукозидов является перспективным подходом к установлению взаимосвязи между структурой и свойствами природных фукоиданов.

**Целью работы** является спектральное (ЯМР) и молекулярно-механическое исследование конформационных свойств олигосахаридных фрагментов фукоиданов, построенных из остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозны и различающихся длиной цепи (от ди- до гексасахаридов), типом гликозидных связей, количеством и положением сульфатных групп. Выбранный круг олигофукозидов позволяет определить основные структурные и стереохимические факторы, от которых зависит пространственная организация фукоиданов.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** На основании экспериментальных величин трансгликозидных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{C,H}$  и данных молекулярно-механических расчетов впервые проведен конформационный анализ представительного ряда синтетических олигофукозидов, отвечающих основным структурным элементам природных физиологически активных полисахаридов фукоиданов.

В ходе работы исследована область применения величин трансгликозидных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{C,H}$  при проведении систематического конформационного

анализа олигофукозидов. Для определения величин констант была использована новейшая методика двумерной ЯМР-спектроскопии J-НМВС.

В ходе работы показаны существенные различия в конформационных свойствах (1→3)- и (1→4)-связанных дифукозидных фрагментов, являющихся основными структурными элементами фукоидановых цепей. Исследованы конформационные изменения цепей фукоолигосахаридов, вызванных удлинением цепи, введением сульфатных групп и боковых заместителей (создание разветвленных фрагментов). На основании данных конформационного анализа синтетических олигофукозидов предложены пространственные структуры полисахаридных цепей природных фукоиданов.

Для исследуемых олигофукозидов определены специфические характеристики спектров ЯМР, включая химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР и эффекты сульфатирования, привлечение которых упростит установление структур новых фукоидановых полисахаридов.

**Публикация и апробация работы.** По результатам диссертации опубликовано 6 статей. Отдельные части работы были представлены на конкурсе молодых ученых ИОХ РАН (Москва, 2003), Международной конференции “Carbohydrate Workshop” (Борстель, Германия, 2004), III-ей Всероссийской школе-конференции “Химия и биохимия углеводов” (Саратов, 2004) и Международной конференции “NMR in Condensed Matter” (Санкт-Петербург, 2005). Результаты настоящей диссертации являются частью работы “Стереонаправленный синтез, спектроскопический (ЯМР) и конформационный анализ фрагментов фукоиданов”, удостоенной медали Российской академии наук (2004) (совместно с Устюжаниной Надеждой Евгеньевной и Гербстом Алексеем Генриховичем).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из введения, литературного обзора, посвященного методам конформационного анализа углеводов в растворе, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитированной литературы и двух приложений.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Целевые соединения и методы их исследования.

Различают два основных типа цепей фукоиданов. К первому типу относятся полисахариды, построенные из  $\alpha$ -L-фукопиранозных остатков, связанных между собой преимущественно (1→3)-гликозидными связями. Для фукоиданов второго типа характерно чередование (1→3)- и (1→4)-гликозидных связей между  $\alpha$ -L-фукопиранозными остатками. В данной работе проведен конформационный анализ представительного ряда синтетических

олигофукозидов<sup>1</sup> (Рисунки 1 и 2), отвечающих фрагментам фукоидановых цепей обоих типов. При этом были рассмотрены олигофукозиды, различающиеся межфукозными связями (1→3, 1→4), числом звеньев в цепи (от 2 до 6), положением сульфатных групп, а также олигофукозиды, содержащие в своей структуре 2,3- и 3,4-разветвленные фрагменты.

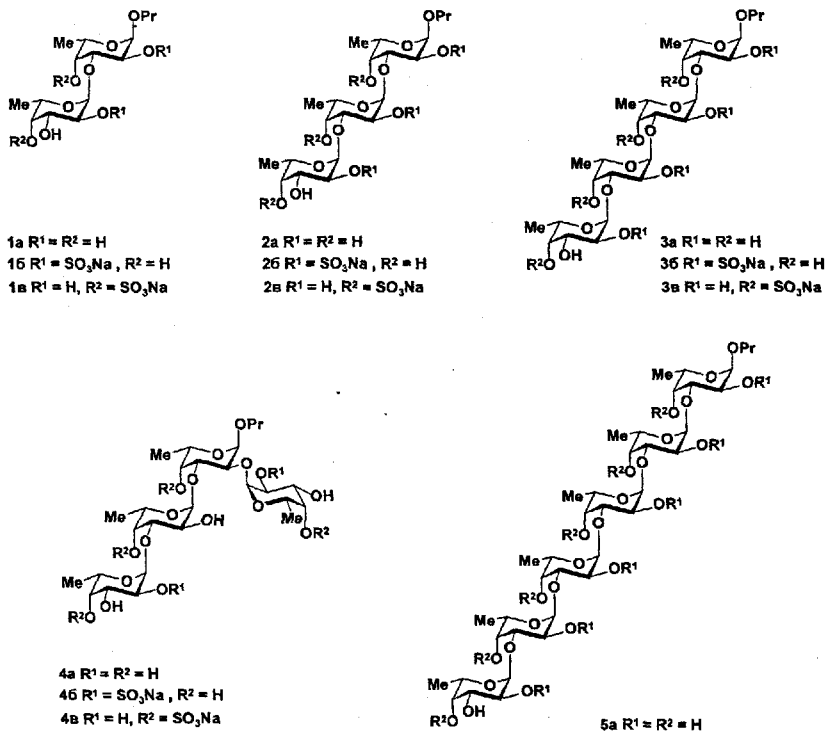
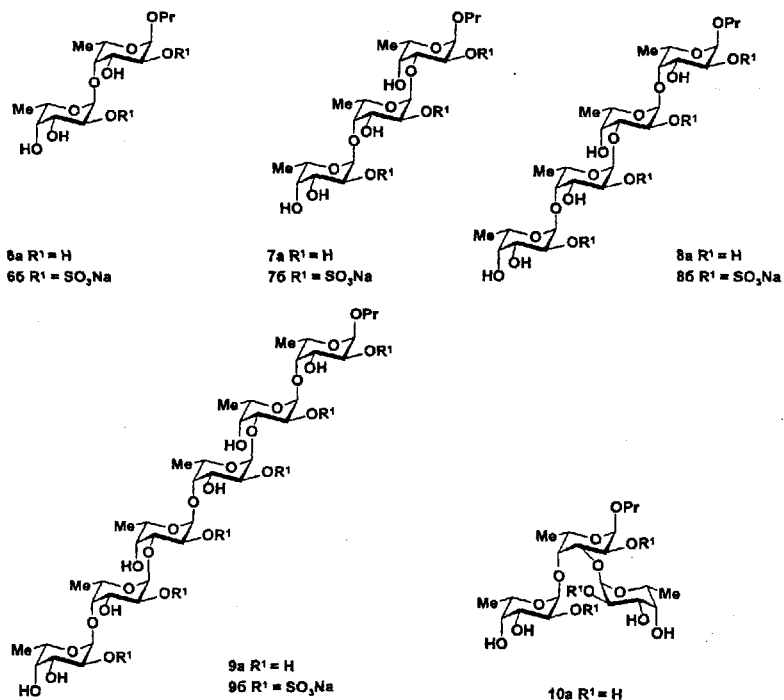


Рисунок 1. Исследованные олигофукозиды, родственные фрагментам гомо-(1→3)-связанных фукоидановых цепей.

Изучение пространственной организации олигофукозидов заключается, в основном, в определении конформационных свойств гликозидных связей, так как фукопиранозные моносахаридные остатки в исследуемых соединениях являются конформационно жесткими и их геометрия хорошо известна. Для установления строения гликозидных связей традиционно используют величины ЯЭО между протонами, принадлежащими соседним моносахаридным остаткам. Однако, в случае тетра- и гексафукозидов, рассматриваемых в данной работе, этот

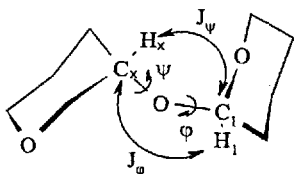
<sup>1</sup> Синтез исследуемых соединений проведен к.х.н. Устюжаниной Н.Е. (лаборатория химии глюкоконъюгатов ИОХ РАН).

подход оказался неприменимым из-за перекрытия сигналов в спектрах 1D и 2D ЯЭО, а также из-за близости к нулю абсолютных величин ЯЭО для большинства крупных олигосахаридов.



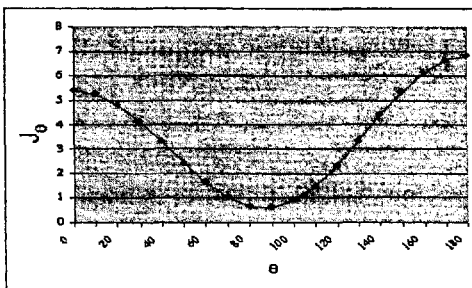
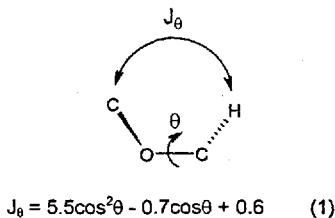
**Рисунок 2.** Исследованные олигофукозиды, родственные фрагментам фукоидановых цепей с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями.

В данной работе была исследована возможность использования величин трансгликозидных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ)  $J_{C,H}$  для конформационного анализа олигофукозидов. Величины  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  констант для трансгликозидного фрагмента С-О-С-Н углеводов (Рисунок 3) зависят от величин торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$  и могут быть рассчитаны по уравнению Карплуса (1) (Рисунок 4).



**Рисунок 3.** Торсионные углы  $\phi$  и  $\psi$  при гликозидной связи и соответствующие им КССВ  $J_\phi$  и  $J_\psi$ .

Экспериментальные величины  $J_\phi$  и  $J_\psi$  были измерены при помощи двумерных ЯМР-экспериментов J-НМВС (J-версия гетероядерной корреляционной спектроскопии через несколько связей) и J-resolved (селективная J-модулированная гетероядерная спектроскопия). Методика 2D J-НМВС является одной из наиболее информативных для детектирования дальних протон-углеродных КССВ  ${}^nJ_{C,H}$  (где  $n \geq 2$ ).



**Рисунок 4.** Уравнение (1) и график функции Карплуса для определения величин КССВ  ${}^3J_{C,H}$  во фрагменте  ${}^{13}C-O-C-{}^1H$  углеводов.

Из спектров J-НМВС нам удалось определить величины констант  $J_\psi$  для всех гликозидных связей в исследуемых олигофукозидах (Рисунок 5). Однако определение величин констант  $J_\phi$  с помощью эксперимента J-НМВС не всегда было возможно из-за перекрывания корреляционных пиков, отвечающих внутри- и межстаточным взаимодействиям. Для определения недостающих величин констант  $J_\phi$  был использован селективный 2D J-resolved эксперимент, применение которого проиллюстрировано на рисунке 6.

Нами была проведена оценка ошибки измерения экспериментальных величин  ${}^3J_{C,H}$  констант. С этой целью проводился анализ величин  $J_{H1,C5}$ . Двухгранный угол вокруг связи (C-1)—O во фрагменте (H-1)—(C-1)—O—(C-5) фукопиранозных колец в олигосахаридах близок к  $180^\circ$ . Согласно уравнению Карплуса (1), это отвечает характеристичным большим величинам констант  $J_{H1,C5}$ , равным  $\sim 6.5$  Гц. Их корреляционные пики хорошо разрешены как

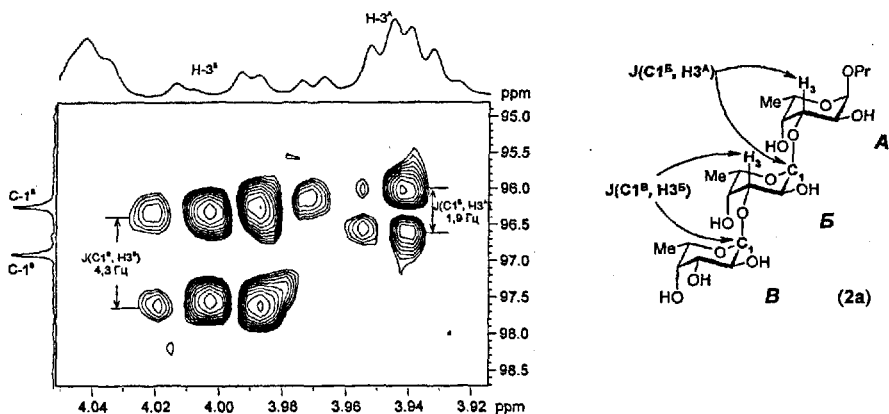


Рисунок 5. Фрагмент J-HMBC спектра трисахарида **2a**, показывающий взаимодействия между атомами углерода C-1 и протонами H-3. На спектре видно два корреляционных пика, соответствующих двум O-гликозидным связям молекулы. Вдоль вертикальной  $^{13}\text{C}$ -оси корреляционные пики расщеплены в дублеты на величины, пропорциональные константам  $J_{\text{CH}}$ . Коэффициент пропорциональности в данном случае был равен 37.

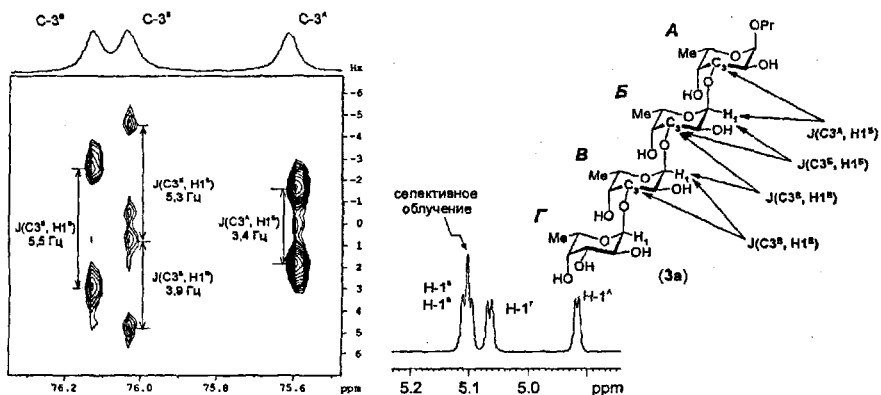


Рисунок 6. Фрагмент 2D J-resolved спектра тетрафукозида **3a** (слева), содержащий корреляционные пики гликозильрованных атомов углеродов C-3. Расщепление сигналов C-3 возникает за счет спин-спиновых взаимодействий с протонами H-1<sup>B</sup> и H-1<sup>B'</sup>, облучаемыми в ходе эксперимента 2D J-resolved.



в J-HMBC, так и в J-resolved спектрах. Для каждого соединения нами была сделана выборка величин констант  $J_{\text{H1,C5}}$  из 2D J-resolved и J-HMBC спектров. Анализ этих величин показывал, что ошибка измерения величин  $^3J_{\text{C,H}}$  не превышала 0.5 Гц для обоих методов. С другой стороны, расчет констант в соответствии с уравнением (1) может быть проведен с точностью 1 Гц.

Экспериментальные величины констант были сопоставлены с рассчитанными. Расчет констант проводился исходя из данных молекулярно-механических расчетов<sup>2</sup> (силовое поле ММ3). При этом для каждой гликозидной связи исследуемых соединений была построена конформационная карта, дающая информацию об относительных энергиях конформеров вращения.

Конформационный анализ O-сульфатированных дифукозидов проводился в предположении, что обе сульфатные группы находятся в ионизированном (депротонированном) состоянии. Однако в случае O-сульфатированных три-, тетра- и гексафукозидов рассчитанные величины  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  расходились с экспериментальными, если все сульфатные группы рассматривались ионизированными. Было найдено, что для этих соединений лучшие результаты получаются, когда сульфатная группа фукопиранозного остатка на восстанавливающем конце молекулы рассматривается в протонированной форме.

Стоит также отметить, что конформационные расчеты проводились без учета молекул растворителя в явном виде (без учета молекулярной структуры раствора). Однако мы предполагали, что молекулы растворителя изменяют диэлектрическую проницаемость среды ( $\epsilon$ ). В расчетах использовалось значение  $\epsilon=81$ , соответствующее диэлектрической проницаемости воды.

Эмпирическое уравнение Карплуса (1) позволяет рассчитать величины трансгликозидных КССВ  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  для каждой точки ( $\phi$ ,  $\psi$ ) конформационного пространства молекулы. Экспериментально получаемые величины  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  являются усредненными по всем конформерам, существующим в растворе. Такие же усредненные величины могут быть получены из данных конформационного анализа, с помощью распределения Больцмана. Показателем правильности молекулярного моделирования можно считать совпадение полученных из расчета величин трансгликозидных КССВ  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  с экспериментально определенными.

Данные, полученные в ходе конформационного анализа синтетических олигофукозидов, использовались нами для моделирования пространственных структур природных фукоиданов.

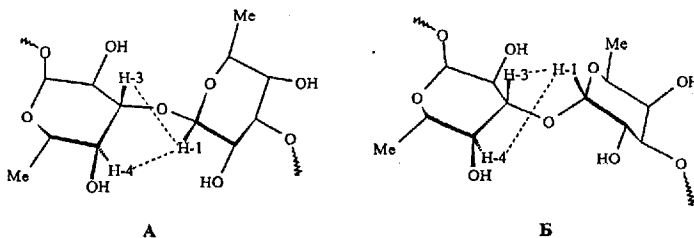
---

<sup>2</sup> Молекулярно-механические расчеты проведены А.Г. Гербстом (лаборатория химии гликоконъюгатов ИОХ РАН).

## 2. Конформационный анализ олигосахаридов, родственных фрагментам гомо- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных фукоидановых цепей.

**2.1. Молекулярное моделирование соединений 1а-4в.** На конформационных картах соединений 1а-4в присутствовало два ярко выраженных минимума А и Б (Рисунки 7, 8). В конформере А ( $\varphi=40^\circ$ ,  $\psi=40^\circ$ ) протон Н-1 гликозилирующего остатка равноудален от протонов Н-3 и Н-4 гликозилируемого остатка, в конформере Б ( $\varphi=30^\circ$ ,  $\psi=-40^\circ$ ) протон Н-1 гликозилирующего остатка сближен с протоном Н-3 гликозилируемого остатка.

В случае несulfатированного дифукозида 1а статистические веса конформеров А и Б составляли 60% и 40%, соответственно (Таблица 1). Переход от дифукозида 1а к тетрафукозиду 3а сопровождался увеличением доли конформера А до 100%. Дальнейшее удлинение цепи при переходе от тетрафукозида 3а к гексафукозиду 5а не сопровождалось каким-либо значимым изменением конформаций (1 $\rightarrow$ 3)-связей. Все связи в гексафукозиде существуют в конформации А. Введение (1 $\rightarrow$ 2)-связанного фукозного остатка в (1 $\rightarrow$ 3)-связанную трифукозидную цепь в случае 2,3-разветвленного тетрасахарида 4а также приводило к увеличению доли конформера А (до 100%, Таблица 1) по сравнению с линейным трисахаридом 2а.

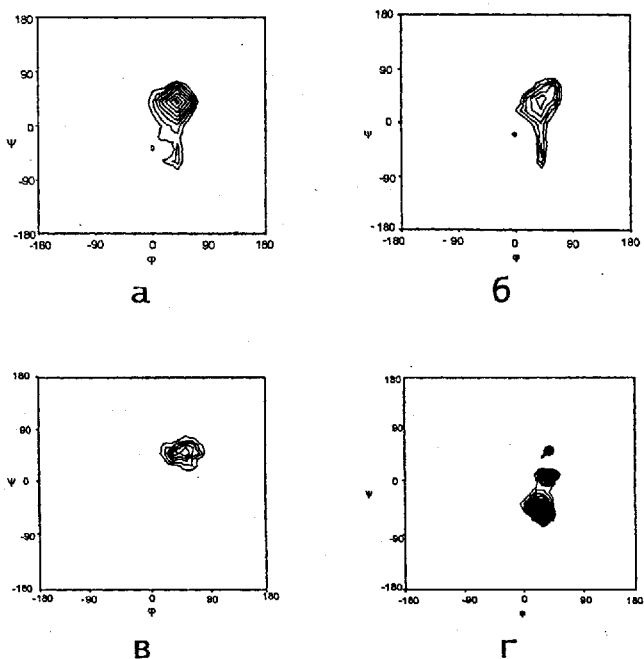


**Рисунок 7.** Конформеры А ( $\varphi=40^\circ$ ,  $\psi=40^\circ$ ) и Б ( $\varphi=30^\circ$ ,  $\psi=-40^\circ$ ) для O-гликозидных связей в  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных олигофукозидах.

В случае 2-O-сульфатированного дифукозида 1б статистический вес конформера А в конформационном распределении молекулы составлял 55% (Таблица 1). Для  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связей трисахарида 2б, тетрасахарида 3б, а также 2,3-разветвленного тетрасахарида 4б теоретические расчеты предсказывали увеличение доли конформера А по сравнению с дисахаридом 1б. Эти результаты аналогичны полученным ранее для несulfатированных соединений 1а-5а, что свидетельствует о том, что увеличение доли конформера А в большей степени есть следствие удлинения и разветвления цепей олигофукозидов, чем введения в них сульфатных групп.

Введение 4-O-сульфатной группы в  $\alpha$ -L-фукопиранозные остатки уменьшает долю конформера А в конформационном равновесии  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидных связей. Так, для 4-O-

сульфатированного дифукозида **1в** доля конформера А составляла 39% (Таблица 1). В случае 4-*O*-сульфатированных трифукозида **2в** и тетрафукозида **3в** доля конформера А была еще меньше и составляла порядка 20%. Исключением являлась только (1→3)-связь из 2,3-разветвленного фрагмента тетрафукозида **4в**, существующая преимущественно в конформации А (Таблица 1). В последнем случае конформер Б является невыгодным из-за стерических взаимодействий (1→3)- и (1→2)-связанных фукопиранозных остатков в 2,3-разветвленном фрагменте молекулы.



**Рисунок 8.** Конформационные карты  $\alpha$ -(1→3)-связей в дифукозидах **1а** (а) и **1в** (б), а также линейных тетрафукозидах **3а** (в) и **3в** (г).

**2.2. Анализ величин констант  $J_\phi$  и  $J_\psi$  для соединений 1а,в-5а.** В случае линейных дифукозида **1а**, трифукозида **2а** и тетрафукозида **3а** экспериментальные величины констант  $J_\phi$  близки друг другу и равны  $3,6 \pm 0,3$  Гц для всех (1→3)-связей. В то же время, величины  $J_\psi$  констант в олигофукозидах **1а-3а** оказываются зависимыми от длины (1→3)-связанной цепи и позиции соответствующей связи в цепи. Величины  $J_\psi$  уменьшаются для межостаточных

связей в направлении от невосстанавливающего к восстанавливающему концу молекул (Таблица 2).

Изучение линейного (1→3)-связанного гексафукозида **5a** было осложнено из-за наложения сигналов в 2D ЯМР спектрах J-NMBC и J-resolved. Однако было достоверно установлено, что величины констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  различались для внешних и внутренних дисахаридных фрагментов гексафукозида **5a** (Таблица 2). В случае внутренних фрагментов значения  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  были одинаковы для всех гликозидных связей.

Экспериментальные величины констант  $J_{\phi}$  для (1→3)-гликозидных связей в 2-*O*-сульфатированных линейных дифукозидах **1b** и трифукозидах **2b** близки друг другу и равны  $4,1 \pm 0,1$  Гц (Таблица 2). В случае линейного тетрафукозида **3b** экспериментальная величина константы  $J_{\phi}$  для дисахаридного фрагмента на восстанавливающем конце молекулы имеет близкую величину и равна  $4,3$  Гц. Для двух других дисахаридных фрагментов тетрафукозида **3b** величины  $J_{\phi}$  были больше ( $5,2 \pm 0,1$  Гц). В то же время величины констант  $J_{\psi}$  для олигофукозидов **1b-3b** увеличиваются для межостаточных связей в направлении от невосстанавливающего к восстанавливающему концу молекул (Таблица 2). Это противоположно тенденции, наблюдаемой в случае несulfатированных олигофукозидов **1a-3a**.

В случае 4-*O*-сульфатированных линейных олигофукозидов **1в-3в** экспериментальные величины констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  имели близкие значения для всех (1→3)-связей (Таблица 2) и не зависели от расположения последних в молекулах.

Сопоставление экспериментальных и рассчитанных величин констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  для линейных олигофукозидов показывало их хорошее соответствие (расхождение не превышало 1 Гц) для всех внутренних дисахаридных фрагментов тетрафукозидов **3a-3в** и гексафукозида **5a**, а также для некоторых терминальных звеньев ди-, три- и тетрафукозидов. В то же время в случае сульфатированных олигофукозидов хорошее соответствие наблюдалось для большего числа дисахаридных фрагментов. Однако молекулярно-механические расчеты не показали различия в конформациях дисахаридных фрагментов в несulfатированных и 2-*O*-сульфатированных олигофукозидах (Таблица 1 и 2). По-нашему мнению, такое несоответствие между экспериментальными и рассчитанными данными связано с тем, что молекулярно-механические расчеты воспроизводят конформации терминальных дисахаридных фрагментов в олигофукозидах менее точно, потому что они более конформационно подвижны, чем внутренние фрагменты.

Введение (1→2)-связанного фукозного остатка в (1→3)-связанную трифукозидную цепь в случае 2,3-разветвленных тетрасахаридов **4a-4в** изменяло экспериментальные

**Таблица 1.** Рассчитанные статистические веса конформеров А и Б для  $\alpha$ -(1→3)-связей олигофукозидов 1а-4в.

Связь	А		Б		А		Б		
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>1а</b>	60%	40%	<b>1б</b>	55%	45%	<b>1в</b>	39%	61%
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>2а</b>	80%	20%	<b>2б</b>	72%	28%	<b>2в</b>	20%	80%
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		80%	20%		69%	31%		19%	81%
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>3а</b>	100%	0%	<b>3б</b>	74%	26%	<b>3в</b>	21%	79%
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		100%	0%		72%	28%		23%	77%
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		100%	0%		72%	28%		23%	77%
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>4а</b>	100%	0%	<b>4б</b>	80%	20%	<b>4в</b>	80%	20%
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		100%	0%		75%	25%		40%	60%

Таблица 2. Сопоставление экспериментальных и рассчитанных (в скобках) величин констант  $J_\phi$  и  $J_\psi$  для олигофукозидов 1a, в-5a.

Связь	$J_\phi$ , Гц	$J_\psi$ , Гц	$J_\phi$ , Гц	$J_\psi$ , Гц	$J_\phi$ , Гц	$J_\psi$ , Гц
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	1a 3,5 (3,6)	2,6 (3,4)	16 4,1 (3,8)	4,7 (3,4)	1в 4,0 (3,8)	5,1 (4,0)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	2a 3,6 (3,8)	2,2 (3,5)	26 4,1 (3,8)	4,9 (3,1)	2в 3,9 (4,0)	4,8 (4,9)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→	3,7 (3,3)	4,3 (3,1)	4,0 (3,6)	2,0 (2,9)	4,4 (4,0)	5,2 (5,0)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	3a 3,4 (3,6)	1,7 (3,4)	36 4,2 (3,9)	4,8 (4,3)	3в 4,1 (3,8)	5,2 (4,0)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→	3,9 (3,6)	2,7 (3,1)	5,2 (4,5)	2,8 (3,6)	4,5 (4,3)	5,4 (5,0)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→	3,8 (3,3)	4,3 (3,1)	5,1 (4,5)	1,8 (3,0)	4,1 (4,3)	4,9 (4,7)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	4a 3,1 (3,0)	3,1 (2,8)	46 4,4 (3,5)	2,8 (3,0)	4в 2,7 (3,1)	3,9 (3,7)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→	3,2 (3,2)	4,0 (3,4)	3,7 (3,4)	4,2 (3,7)	3,7 (3,7)	4,0 (3,5)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	2,2 (3,2)	2,1 (2,8)	2,3 (2,7)	3,7 (3,3)	2,5 (3,0)	2,6 (3,1)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	5a 5,0 (3,5)	2,0 (3,4)				
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1 <sup>a</sup> →	4,5 <sup>b</sup> (3,5)	3,6 <sup>b</sup> (3,3)				
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→	4,0 (3,5)	2,1 (3,4)				

<sup>a</sup> Сигналы всех интернальных фукозных остатков. <sup>b</sup> Ошибка измерения для этих величин была больше из-за перекрывания сигналов в 2D ЯМР спектрах. Полям серого цвета (■) выделены дисахаридные фрагменты, для которых расхождение между экспериментальными и рассчитанными величинами  $J_\phi$  и  $J_\psi$  констант не превышает 1 Гц.

величины обеих  $J_\phi$  и  $J_\psi$  констант для (1→3)-связей молекул. В то же время, наличие 2,3-разветвления делает (1→3)-связанные дисахаридные фрагменты жестче. Поэтому хорошее соответствие между экспериментальными и рассчитанными величинами  $J_\phi$  и  $J_\psi$  наблюдалось для всех фрагментов (Таблица 2).

### 3. Конформационный анализ олигосахаридов, родственных фрагментам фукоидановых цепей с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями.

**3.1. Молекулярное моделирование соединений 1а,б и 6а,б-10а.** Конформационный анализ (1→3)-связанного дифукозида **1а** был рассмотрен в разделе 2. Для этого соединения характерны два конформера **A** и **B** (Рисунок 7) со статистическими весами 60% и 40%, соответственно. Для (1→3)-связанных дисахаридных фрагментов линейных три- (**7а**), тетра- (**8а**) и гексафукозида **9а**, согласно расчетам, характерным оказывается только конформер **A**, с углами  $\phi > 0$  и  $\psi > 0$  (Рисунок 9). Эта ситуация аналогична наблюдаемой ранее в случае несulfатированных (1→3)-связанных олигофукозидов **1а-5а** (см. раздел 2.1.), для которых удлинение цепи молекулы также приводило к увеличению доли конформера **A** в конформационном равновесии (1→3)-связей.

Конформационные карты, отвечающие (1→4)-связанным дисахаридным фрагментам соединений **6а-10а** (Рисунок 9), содержали по два ярко выраженных конформационных минимума **B** и **Г** (Рисунок 10), для которых средние величины углов равны  $\phi = 35^\circ$  и  $\psi = 20^\circ$ , а также  $\phi = 20^\circ$  и  $\psi = -35^\circ$ , соответственно. В конформере **B** протон Н-1 гликозилирующего остатка оказывается равноудаленным от протона Н-4 и протонов метильной группы гликозилируемого остатка, а в конформере **Г** протон Н-1 пространственно сближен с протоном Н-4. Для (1→4)-связанного дифукозида **6а** статистический вес конформера **B** составлял 70%, однако в случае три- (**7а**), тетра- (**8а**) и гексасахарида **9а** его доля была около 45%.

Конформационный анализ 3,4-разветвленного олигофукозида **10а** показывал, что для его (1→3)-гликозидной связи преобладающим является конформер **B** (80%), а для (1→4)-связи – конформер **Г** (93%). Таким образом, переход от линейных олигофукозидов к 3,4-разветвленному трифукозиду **10а** приводил к увеличению долей конформеров **B** и **Г** для (1→3)- и (1→4)-связей, соответственно. Этот эффект вызван стерическими взаимодействиями гликозилирующих остатков в 3,4-разветвленном фрагменте трифукозида **10а**.

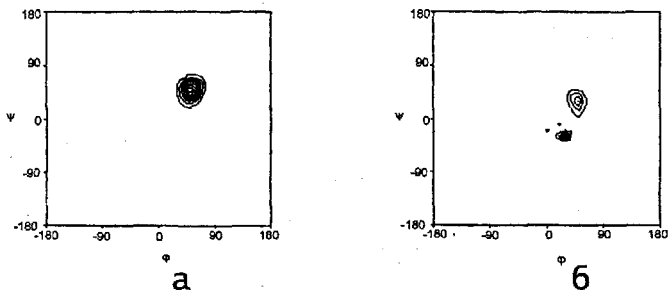


Рисунок 9. Конформационные карты  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связи (а) и  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связи (б) тетрафукозида 8а.

Конформационные карты 2-*O*-сульфатированных олигофукозидов 16 и 66-96 были похожи на конформационные карты несulfатированных олигофукозидов 1а и 6а-9а. В случае (1 $\rightarrow$ 3)-связанных дисахаридных фрагментов доля конформера А составляла 55% для дифукозида 16 и 100% для три- (76), тетра- (86) и гексафукозида 96. В случае (1 $\rightarrow$ 4)-связанных фрагментов ди- (66), три- (76) и тетрафукозида 86 доля конформера В составляла около 75%, однако в случае гексафукозида 96 она была около 55%.

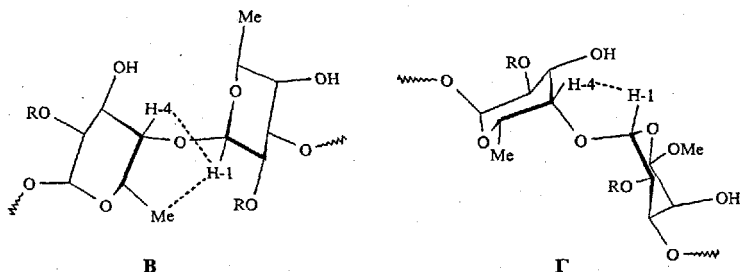


Рисунок 10. Конформеры В ( $\varphi=35^\circ$ ,  $\psi=20^\circ$ ) и Г ( $\varphi=20^\circ$ ,  $\psi=-35^\circ$ ), характерные для  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связанных дифукозидных фрагментов.

3.2. Анализ величин констант  $J_\varphi$  и  $J_\psi$  для соединений 1а,б и 6а,б-10а. Для всех (1 $\rightarrow$ 4)-связей линейных несulfатированных олигофукозидов 1а и 6а-9а экспериментальные величины констант  $J_\varphi$  и  $J_\psi$ , равны  $3,9 \pm 0,1$  и  $5,8 \pm 0,2$  Гц (Таблица 3), соответственно. В случае (1 $\rightarrow$ 3)-связей соединений 6а-9а экспериментальные величины констант  $J_\varphi$  также близки между собой и равны  $3,5 \pm 0,4$  Гц, однако величины констант  $J_\psi$  зависели от положения связи в молекуле. Так, в дифукозиде 1а и трифукозиде 7а (1 $\rightarrow$ 3)-связи являются терминальными,



для них величины  $J_{\psi}$  равны  $2,4 \pm 0,2$  Гц. В случае тетрафукозида **8а** и гексафукозида **9а** (1→3)-связи являются внутренними, для них величины  $J_{\psi}$  равны 3,8 Гц. Эта ситуация аналогична наблюдаемой ранее при изучении (1→3)-связанных олигофукозидов (см. раздел 2.2.), для которых величина  $J_{\psi}$  также зависела от положения связи в молекуле. Различие в величинах констант  $J_{\psi}$  для (1→3)-связей говорит о различии конформаций соответствующих связей.

В случае 2-О-сульфатированных олигофукозидов **66-96** экспериментальные величины констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  близки для всех (1→4)-связей. Их значения равны  $4,6 \pm 0,3$  и  $5,4 \pm 0,1$  Гц для  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$ , соответственно (Таблица 3). В случае (1→3)-связей в соединениях **16** и **66-96** экспериментальные величины констант  $J_{\phi}$  зависели от положения связи в молекуле. В дифукозиде **16** и трифукозиде **76** (1→3)-связи являются терминальными, для них величины  $J_{\phi}$  составляют 4,1 Гц. В случае тетрафукозида **86** и гексафукозида **96** (1→3)-связи являются внутренними, для них величины  $J_{\phi}$  были меньше и равны  $3,3 \pm 0,1$  Гц. В то же время, экспериментальные величины констант  $J_{\psi}$  близки между собой для всех (1→3)-связей молекул и лежат в диапазоне  $4,7 \pm 0,2$  Гц. Эта ситуация обратна наблюдаемой в случае несulfатированных олигофукозидов **1а** и **7а-9а**, для которых величина  $J_{\psi}$  зависела от положения (1→3)-связи в молекуле.

Сопоставление экспериментальных и рассчитанных величин трансгликозидных  $^3J_{C,H}$  констант для олигофукозидов **1а,б** и **6а,б-10а** в случае (1→3)-связей показывало хорошее соответствие для всех констант (расхождение менее 1 Гц), кроме констант  $J_{\psi}$  для внешних дисахаридных фрагментов трифукозида **7а** и дифукозида **16** (Таблица 3). Как было показано в разделе 2.2, внешние (1→3)-связанные дисахаридные фрагменты более конформационно подвижны, чем внутренние, а потому молекулярная механика предсказывает их поведение менее точно.

В случае (1→4)-связей соединений **6а,б-10а** различие между экспериментальными и рассчитанными величинами  $J_{\phi}$  не превышало 1 Гц, однако в случае констант  $J_{\psi}$  расхождение в большинстве случаев было больше. Мы связываем это с тем, что молекулярная механика недооценивает вклад конформеров с величинами углов  $\psi$  близкими  $0^\circ$  в конформационное равновесие (1→4)-связанных дифукозидных фрагментов. Действительно, для этих фрагментов экспериментальные величины  $J_{\psi} = 5,4 + 6,0$  Гц и отвечают максимумам функции Карплуса (Рисунок 4), которые достигаются при величинах углов  $\psi$  близких  $0^\circ$  и  $160^\circ$ . Конформеры с углами  $\psi$  близкими  $160^\circ$  энергетически невыгодны из-за расталкивания атомов, принадлежащих соседним фукопиранозным остаткам. Таким образом, согласно

Таблица 3. Сопоставление экспериментальных и рассчитанных (в скобках) величин констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  для линейных олигофукозидов **1а,б** и **ба,б-9а,б**, родственных фрагментам фукоидановых цепей с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями.

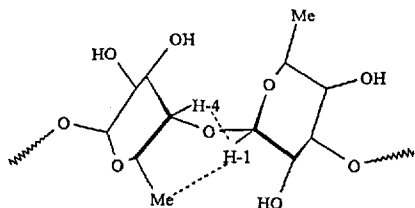
Связь		$J_{\phi}$ , Гц	$J_{\psi}$ , Гц		$J_{\phi}$ , Гц	$J_{\psi}$ , Гц
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>1а</b>	3,5 (3,6)	2,6 (3,4)	<b>1б</b>	4,1 (3,8)	4,7 (3,4)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>ба</b>	3,9 (3,7)	5,9 (4,6)	<b>6б</b>	4,5 (3,9)	5,3 (4,7)
→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>7а</b>	3,1 (3,5)	2,3 (3,7)	<b>7б</b>	4,1 (3,9)	4,5 (4,2)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		3,8 (3,5)	5,9 (4,0)		4,4 (3,8)	5,4 (4,8)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>8а</b>	3,9 (3,8)	5,6 (4,5)	<b>8б</b>	4,9 (3,9)	5,4 (3,9)
→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		3,9 (3,1)	3,8 (3,3)		3,2 (3,5)	4,9 (4,2)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		3,9 (3,8)	5,6 (4,4)		4,6 (3,8)	5,4 (4,5)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>9а</b>	<sup>a</sup> (3,9)	6,0 (4,5)	<b>9б</b>	4,7 (4,3)	5,5 (4,2)
→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		<sup>a</sup> (3,5)	3,8 (3,4)		3,4 (3,5)	4,7 (3,8)
→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		<sup>a</sup> (3,8)	6,0 (4,0)		4,5 (4,3)	5,5 (4,5)
→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		<sup>a</sup> (3,6)	3,8 (3,5)		3,3 (3,6)	4,7 (3,8)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→		<sup>a</sup> (4,0)	6,0 (4,2)		4,4 (4,0)	5,5 (4,2)
$\alpha$ -L-Fuc-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr	<b>10а</b>	3,9 (3,8)	5,6 (4,5)			
$\alpha$ -L-Fuc-(1→3)- $\alpha$ -L-Fuc-OPr		3,9 (3,1)	3,8 (3,3)			

<sup>a</sup> Определение величин  $J_{\phi}$  констант в случае гексасахариды **9а** было невозможно из-за перекрывания сигналов и большого уровня шума в соответствующих областях J-НМВС и J-resolved спектров. Полем серого цвета (■) выделены дисахаридные фрагменты, для которых расхождение между экспериментальными и рассчитанными величинами констант  $J_{\phi}$  и  $J_{\psi}$  не превышает 1 Гц.

экспериментальным данным, для (1→4)-связанных дифукозидных фрагментов характерными оказываются конформеры с углами  $\psi$  близкими 0° (Рисунок 11). В этих конформерах протон H-1 гликозилирующего остатка оказывается между протоном H-4 и протонами метильной группы гликозилируемого остатка, однако пространственно протон H-1 более сближен с

протоном Н-4. Присутствие в растворе значимого количества конформеров с углами  $|\psi| > 0^\circ$  приводило бы к уменьшению экспериментальной величины  $J_\psi$  константы. Мы предполагаем, что конформеры с углами  $\psi$  близкими  $0^\circ$  стабилизированы за счет сольватационных эффектов.

Стоит также отметить, что введение 2-О-сульфатных групп в олигофукозиды с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями изменяет величины трансгликозидных  $^3J_{CH}$  констант, что говорит об изменении конформаций молекул. При этом в случае сульфатированных олигофукозидов хорошее соответствие между рассчитанными и экспериментальными величинами констант наблюдается для большего числа дисахаридных фрагментов, что связано с увеличением жесткости молекул.

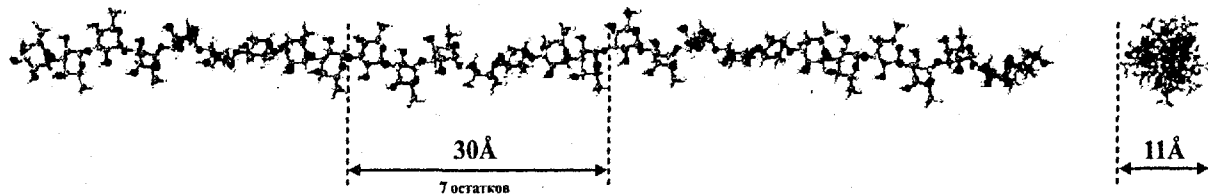


**Рисунок 11.** Конформер ( $\varphi=35^\circ$ ,  $\psi=0^\circ$ ) для (1→4)-связанного дисахаридного фрагмента, согласующийся с экспериментальными данными по величинам констант  $J_\varphi$  и  $J_\psi$ .

Хотелось бы еще раз отметить, что согласно данным конформационного анализа внутренние дисахаридные фрагменты тетра- и гексафукозидов являются менее конформационно подвижными, чем внешние фрагменты. Мы предполагаем, что конформации внутренних фрагментов в этих молекулах близки конформациям дисахаридных фрагментов природных фукоиданов. Нами было проведено моделирование пространственных структур фрагментов фукоидановых цепей с (1→3)- и чередующимися (1→3)- и (1→4)-гликозидными связями (как в несulfатированной, так и в sulfатированной формах) с использованием конформационных характеристик внутренних дисахаридных фрагментов тетра- и гексафукозидов (Рисунок 12) (о правомочности такого моделирования см. раздел 5). Полученные модели фукоидановых цепей будут способствовать пониманию механизма связывания этих молекул с белковыми рецепторами.

**4. Анализ эффектов сульфатирования для соединений 16, в-96.** Эффект сульфатирования ( $\Delta\delta C$ ) есть разница между химическими сдвигами ЯМР аналогичных атомов углерода  $^{13}C$  в сульфатированном и несulfатированном олигофукозидах. Ранее в лаборатории химии гликоконъюгатов были проанализированы данные по эффектам сульфатирования в ди- и

## $\alpha$ -(1→3)-связанная фукоидановая цепь



## фукоидановая цепь с чередующимися $\alpha$ -(1→3)- и $\alpha$ -(1→4)-связями

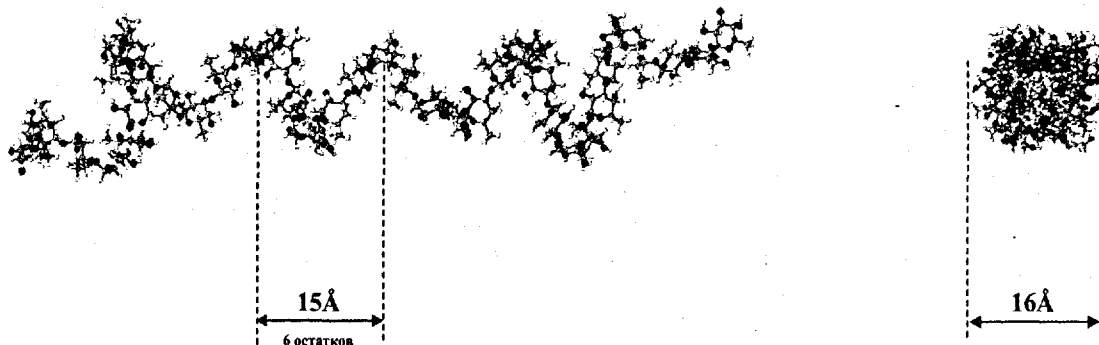


Рисунок 12. Фрагменты несulfатированных фукоидановых цепей с (1→3)- и чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями, смоделированные исходя из данных конформационного анализа тетрафукозидов 3а и 8а, соответственно. Обе цепи имеют форму спиралей, однако эти спирали достаточно сильно различаются по геометрическим параметрам (показаны шаги и диаметры спиралей).

трифукозидах. В данной работе показано, что эффекты сульфатирования в тетра- и гексафукозидах качественно совпадают с эффектами, найденными для ди- и трифукозидов.

**2-О-сульфатированные олигофукозиды 16-96.**  $\alpha$ -Эффекты сульфатирования на атомах С-2 были равны  $+7 \pm 0.5$  м.д.  $\beta$ -Эффекты сульфатирования на атомах С-1 и С-3 были также существенны, однако имели отрицательные величины (до  $-3.4$  м.д.). Значимые  $\gamma$ -эффекты сульфатирования ( $\sim +2.5$  м.д.) наблюдались только на С-4 атомах 4-О-гликозилированных остатков олигофукозидов **66-96**. Такие большие  $\gamma$ -эффекты не характерны для сульфатных групп. Ранее в работах А.С. Шашкова (ИОХ РАН) было показано, что химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  ЯМР атомов углерода вблизи гликозидной связи зависят от конформации последней. Согласно данным конформационного анализа, введение 2-О-сульфатных групп в исследуемые олигофукозиды изменяло характеристики основных конформеров молекул. Последнее обстоятельство, как мы предполагаем, и вызывало появление больших  $\gamma$ -эффектов на С-4 атомах 4-О-гликозилированных фукопиранозных остатков.

**4-О-сульфатированные олигофукозиды 1в-4в.**  $\alpha$ -Эффекты сульфатирования на атомах С-4 были положительны и равны  $\sim 11$  м.д. для всех фукопиранозных остатков, кроме терминальных на невосстанавливающих концах молекул, где они были на  $\sim 2$  м.д. меньше.  $\beta$ -Эффекты сульфатирования на атомах С-5 большинства фукопиранозных остатков и на атомах С-3 терминальных остатков на невосстанавливающих концах молекул имели отрицательные величины, как и в случае 2-О-сульфатированных олигофукозидов. Однако  $\beta$ -эффекты на атомах С-3, вовлеченных в образование гликозидных связей, в случае 4-О-сульфатированных линейных олигофукозидов имели существенные положительные величины. Также существенные эффекты сульфатирования (положительной величины) наблюдались на атомах С-1, вовлеченных в образование гликозидных связей.

Как было показано выше, введение 4-О-сульфатных групп в (1 $\rightarrow$ 3)-связанные олигофукозиды приводит к изменению конформаций молекул и сопровождается увеличением доли конформера **Б** для (1 $\rightarrow$ 3)-гликозидных связей (см. раздел 2), что в свою очередь приводит к слабopольному сдвигу сигналов С-1 и С-3, вовлеченных в образование гликозидных связей. Этот эффект подобен обнаруженному нами для сигналов С-4 атомов в 4-О-гликозилированных фукопиранозных остатках олигофукозидов с чередующимися (1 $\rightarrow$ 3)- и (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями, как следствие введения в них 2-О-сульфатных групп.

## 5. Анализ спектров $^{13}\text{C}$ -ЯМР природных фукоиданов с применением данных по синтетическим олигофукозидам.

Как было сказано в разделе 4, химические сдвиги атомов углерода, находящихся вблизи гликозидной связи, зависят от ее конформации. Следовательно, если конформации дисахаридных фрагментов олигофукозидов близки конформациям дисахаридных фрагментов фукоидановых полисахаридов, то и химические сдвиги атомов углерода  $^{13}\text{C}$  должны быть близки для этих молекул.

Согласно методу аддитивных схем, химический сдвиг  $\delta C_i$  любого атома углерода  $i$  моносахаридного остатка в полисахаридной или олигосахаридной цепи можно представить в виде уравнения:

$$\delta C_i = \delta C_i^0 + A(k, i) + B(k', i) \quad (2)$$

где  $\delta C_i^0$  - химический сдвиг  $^{13}\text{C}$  этого углерода в изолированном моносахаридном остатке;  $A(k, i)$  и  $B(k', i)$  - эффекты, обусловленные тем, что данный моносахаридный остаток с одной стороны гликозилирован (образование связи  $k$ ), а с другой стороны сам является гликозилирующим (образование связи  $k'$ ) (Рисунок 13). Уравнение 2 позволяет рассчитать химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  ЯМР фукоиданов, исходя из данных по эффектам гликозилирования [ $A(k, i)$  и  $B(k', i)$ ] для синтетических олигофукозидов. Нами проводился расчет химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  ЯМР фукоидановых цепей с (1→3)- и чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями, как в несulfатированной, так и в sulfатированной формах. Расчет проводился исходя из ди-, три-, тетра- и гексасахаридных моделей (Таблица 4).

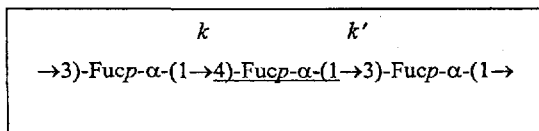


Рисунок 13. Фрагмент фукоидановой цепи и обозначение связей  $k$  и  $k'$ .

Для каждой олигосахаридной модели впоследствии был проведен расчет среднеквадратичного отклонения  $S$  по уравнению (3). Величины  $S$  позволяют судить о степени соответствия экспериментальных и рассчитанных химических сдвигов и позволяют сопоставить олигосахаридные модели между собой.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \left[ \sum_{i=1}^n [\delta C_i^{\text{эксп}} - \delta C_i^{\text{расч}}]^2 \right]} \quad (3)$$

где  $n$  - число атомов углерода, приходящихся на повторяющееся звено фукоидановой цепи.

Анализ величин среднеквадратичных отклонений (S) показывал, что они уменьшаются при использовании для расчета олигосахаридов с большей длиной цепи (Таблица 4, последняя колонка). Это утверждение правомочно как в случае фукоидановой цепи, построенной через (1→3)-связи, так и в случае цепи с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями. При этом для обоих типов цепей величины S тетра- и гексасахаридных моделей были близки друг другу и находились в пределах допустимого диапазона изменения химических сдвигов полисахарида (0,20 м.д., см. таблицу 4). Это говорит о том, что конформации дисахаридных фрагментов тетрафукозидов и гексафукозидов близки конформациям дисахаридных фрагментов природных полисахаридов. Этот факт доказывает правомочность моделирования дисахаридных фрагментов природных фукоиданов, исходя из данных конформационного анализа для фрагментов тетра- и гексафукозидов (см. раздел 3.2.).

**Таблица 4.** Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  ЯМР несультрированных полисахаридных цепей фукоиданов и отклонения от аддитивности<sup>a</sup> ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ), наблюдаемые для олигосахаридных моделей, и соответствующие им среднеквадратичные отклонения (S).

Объект	Фрагмент	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	S
химические сдвиги $^{13}\text{C}$ ЯМР (м.д.)								
фукоидан из водоросли <i>Chorda filum</i> <sup>3</sup>	→3)-Fucp-α-(1→	96,9	67,7	76,3	69,8	67,8	16,5	0,20 <sup>b</sup>
отклонения от аддитивности $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (м.д.)								
дисахаридная модель 1a	→3)-Fucp-α-(1→	0,5	0,1	0,5	0,5	0,3	0	0,38
трисахаридная модель 2a (A) <sup>b</sup>	→3)-Fucp-α-(1→	0,4	0	0,4	0,2	0,2	-0,2	0,27
трисахаридная модель 2a (B) <sup>a</sup>	→3)-Fucp-α-(1→	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	0,16
тетрасахаридная модель 3a	→3)-Fucp-α-(1→	0	0,1	0,3	0,1	0	0,1	0,14
гексасахаридная модель 5a	→3)-Fucp-α-(1→	0,1	0,1	0,3	0	0	0	0,14

<sup>3</sup> A.O. Chizhov, A. Dell, H.R. Morris, S.M. Haslam, R.A. McDowell, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev, E.A. Khatuntseva, A.I. Usov. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. // *Carbohydr. Res.*, 1999, V. 320, P. 108-119.

Таблица 4. (продолжение)

Объект	Фрагмент	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	S
химические сдвиги $^{13}\text{C}$ ЯМР (м.д.)								
фукоидан из водоросли <i>Fucus evanescens</i> <sup>4</sup>	→3)-Fucp-α-(1→	101,6	68,3	77,2	70,2	67,7	16,4	0,20 <sup>5</sup>
	→4)-Fucp-α-(1→	97,8	69,2	70,0	81,2	68,8	16,4	
отклонения от аддитивности $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (м.д.)								
дисахаридная модель 1a+6a	→3)-Fucp-α-(1→	0	0,7	1,4	0,9	0,2	-0,1	0,69
	→4)-Fucp-α-(1→	1,4	-0,1	-0,4	-0,1	0,5	-0,1	
трисахаридная модель 7a	→3)-Fucp-α-(1→	0	0,7	1,2	0,8	0,3	-0,1	0,59
	→4)-Fucp-α-(1→	1,2	-0,1	-0,2	-0,1	0,1	-0,1	
тетрасахаридная модель 8a	→3)-Fucp-α-(1→	0	-0,1	0,1	-0,1	0	-0,1	0,14
	→4)-Fucp-α-(1→	0	-0,1	-0,3	-0,3	0	-0,1	
гексасахаридная модель 9a	→3)-Fucp-α-(1→	-0,1	-0,1	0	-0,1	0	-0,1	0,11
	→4)-Fucp-α-(1→	0	0	0,3	0	0	-0,1	

<sup>a</sup> Отклонение от аддитивности ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_i$ ) для  $i$ -ого атома углерода есть разница между экспериментальным химическим сдвигом этого атома в полисахариде ( $\text{C}_i^{\text{эксп}}$ ) и химическим сдвигом, рассчитанным по формуле 2 ( $\text{C}_i^{\text{расч}}$ ), исходя из данных по олигофукозидам ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_i = \delta\text{C}_i^{\text{эксп}} - \delta\text{C}_i^{\text{расч}}$ ). <sup>6</sup> Доп устимая величина среднеквадратичного отклонения экспериментальных химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  ЯМР полисахарида, обусловленная зависимостью последних от концентрации и вязкости раствора полисахарида.

<sup>b</sup> Трисахаридная модель 2a: А – расчет исходя из данных по дисахаридному фрагменту на восстанавливающем конце молекулы, Б – расчет исходя из данных по дисахаридному фрагменту на невосстанавливающем конце молекулы.

Следует также отметить, что в случае полисахаридной цепи фукоидана из водоросли *Fucus evanescens* с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями различие между экспериментальными и рассчитанными химическими сдвигами  $^{13}\text{C}$  ЯМР на атомах, находящихся в непосредственной близости к (1→4)-гликозидной связи (атомы C-1 – гликозилирующего остатка и атомы C-3, C-4 и C-5 – гликозилируемого остатка, Таблица 4) претерпевают меньшие изменения при удлинении цепи олигосахарида, по-сравнению с аналогичными эффектами на атомах  $^{13}\text{C}$  при (1→3)-гликозидной связи. Этот факт еще раз свидетельствует об ограниченности конформационной подвижности (1→4)-связанных фрагментов, которые, как мы предполагаем, стабилизированы за счет сольватации (см. раздел 3).

<sup>4</sup> M.I. Bilan, A.A. Grachev, N.E. Ustuzhanina, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev, A.I. Usov. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. // *Carbohydr. Res.*, 2002, V. 337, P. 719-730.



## Выводы

1. На основании экспериментальных величин трансгликозидных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{C,H}$  и данных молекулярно-механических расчетов исследованы конформационные свойства олигофукозидов, построенных только из  $\alpha$ -(1→3)- или чередующихся  $\alpha$ -(1→3)- и  $\alpha$ -(1→4)-связанных дисахаридных звеньев и отвечающих основным структурным фрагментам природных полисахаридов фукоиданов.
2. Показано, что конформации  $\alpha$ -(1→3)-связанных дисахаридных фрагментов в изучаемых олигофукозидах зависят от их положения в олигосахаридной цепи, наличия сульфатных групп и разветвлений, в то время как конформации  $\alpha$ -(1→4)-связанных фрагментов заметно изменяются только при введении в молекулы сульфатных групп.
3. Показано, что конформации внутренних дисахаридных фрагментов в исследованных олигосахаридах с числом фукозных звеньев от четырех и выше совпадают с конформациями соответствующих дисахаридных фрагментов фукоиданов.
4. Построены вторичные структуры фукоидановых цепей с гомо  $\alpha$ -(1→3)- или чередующимися  $\alpha$ -(1→3)- и  $\alpha$ -(1→4)-связями; выявлены особенности пространственной организации этих двух типов цепей.
5. Для исследуемых олигофукозидов определены экспериментальные эффекты сульфатирования и гликозилирования в спектрах  $^{13}C$  ЯМР и изучена их взаимосвязь с конформационными характеристиками молекул.

### Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. A.G. Gerbst, N.E. Ustuzhanina, A.A. Grachev, E.A. Khatuntseva, D.E. Tsvetkov, D.M. Whitfield, A. Berces, N.E. Nifantiev. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 3: effect of benzoyl group at O-3 on stereoselectivity of glycosylation by 3-O- and 3,4-di-O-benzoylated 2-O-benzylated fucosyl bromides // *J. Carbohydr. Chem.*, 2001, V. 20, P. 821-831.
2. A.G. Gerbst, N.E. Ustuzhanina, A.A. Grachev, N.S. Zlotina, E.A. Khatuntseva, D.E. Tsvetkov, A.S. Shashkov, A.I. Usov, N.E. Nifantiev. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 4: 4-mono- and 4,4'-disulfated (1-3)- $\alpha$ -L-fucobioside and 4-sulfated fucoside fragments // *J. Carbohydr. Chem.*, 2002, V. 21, P. 313-324.
3. A.G. Gerbst, N.E. Ustuzhanina, A.A. Grachev, E.A. Khatuntseva, D.E. Tsvetkov, A.S. Shashkov, A.I. Usov, M.E. Preobrazhenskaya, N.A. Ushakova, N.E. Nifantiev. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 5: Linear 4,4',4''-tri-O-sulfated and

- parent non-sulfated (1-3)-fucotrioside fragments // *J. Carbohydr. Chem.*, 2003, V. 22, P. 37-50.
4. А.Г. Гербст, А.А. Грачев, Н.Е. Устюжанина, Е.А. Хатунцева, Д.Е. Цветков, А.И. Усов, А.С. Шашков, М.Е. Преображенская, Н.А. Ушакова, Н.Э. Нифантьев. Синтез, ЯМР и конформационные исследования фрагментов фукоиданов. VI. Фрагменты, содержащие  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-связанное фукобиозидное звено // *Биоорганическая химия*, 2004, Т. 30, С. 156-167.
  5. A.A. Grachev, A.G. Gerbst, N.E. Ustyuzhanina, E.A. Khatuntseva, A.S. Shashkov, A.I. Usov, N.E. Nifantiev. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 7: influence of length and branching on the conformational flexibility of linear (1 $\rightarrow$ 3)-linked oligosaccharide chains // *J. Carbohydr. Chem.*, 2005, V. 24, P. 85-99.
  6. A.A. Grachev, A.G. Gerbst, N.E. Ustyuzhanina, A.S. Shashkov, A.I. Usov, N.E. Nifantiev. NMR investigation of the influence of sulfate groups at C-2 and C-4 on the conformational behaviour of the fucoidan fragments with homo-(1 $\rightarrow$ 3)-linked backbone // *J. Carbohydr. Chem.*, 2006, V. 25, P. 315-330.
  7. A.A. Grachev, A.G. Gerbst, N.E. Ustyuzhanina, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev. The conformational study of oligosaccharides which are related to the fragments of natural fucoidans // *Международная конференция "Carbohydrate Workshop"* (Борстель, Германия), 2004, Тезисы докладов, С. 22.
  8. А.А. Грачев, А.Г. Гербст, А.С. Шашков, Н.Э. Нифантьев. Применение трансгликозидных вицинальных С-Н констант спин-спинового взаимодействия в конформационном анализе олигосахаридных фрагментов фукоиданов // *III Всероссийская школа-конференция "Химия и биохимия углеводов"* (Саратов), 2004, Тезисы докладов, С. 28.
  9. A.A. Grachev, A.G. Gerbst, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev. The conformational study of oligosaccharides related to the fragments of natural fucoidans // *Международная конференция "NMR in Condensed Matter"* (Санкт-Петербург), 2005, Тезисы докладов, С. 76.

Принято к исполнению 23/08/2006  
Исполнено 24/08/2006

Заказ № 563  
Тираж: 150 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Варшавское ш., 36  
(495) 975-78-56  
(495) 747-64-70  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

