

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО

На правах рукописи



Гербст Алексей Генрихович

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДИ- И ТРИФУКОЗИДОВ,
СООТВЕТСТВУЮЩИХ ОСНОВНЫМ СТРУКТУРНЫМ ФРАГМЕНТАМ
ФУКОИДАНОВ.**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2006

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

Научный руководитель:

профессор, д.х.н. Николай Эдуардович Нифантьев

Официальные оппоненты:

профессор, д. х. н. Пивина Татьяна Степановна
профессор, д. х. н. Устынюк Юрий Александрович

Ведущая организация:

Институт биомедицинской химии РАН

Защита состоится «29» сентября 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета К 002.222.01 в Институте органической химии им. И.Д. Зелинского РАН (Москва,
Ленинский проспект, 47, конференц-зал).

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

Автореферат разослан «28» августа 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета К 002.222.01
доктор химических наук



Родиновская Л. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы: Актуальность данной работы определяется фундаментальной задачей современной химии природных соединений, состоящей в выявлении взаимосвязи структуры и свойств природных макромолекул, в частности, природных полисахаридов.

Фукоиданы представляют собой класс природных полисахаридов, встречающихся в морских беспозвоночных, а так же в бурых водорослях. Они построены преимущественно из остатков α -L-фукозы и имеют нерегулярные разветвления. Для фукоиданов характерна высокая степень сульфатирования, при этом сульфо-группы в цепи молекулы также могут располагаться нерегулярно. Несмотря на то, что эти биополимеры известны уже несколько десятков лет, имеются лишь фрагментарные сведения об их структурах. Это вызвано тем, что установление структуры фукоиданов классическими методами часто бывает затруднено вследствие их высокой лабильности. Проведенные ранее исследования показывают, что одним из основных структурных мотивов природных фукоиданов является α -(1 \rightarrow 3)-связанная цепь остатков L-фукозы. Сульфатные группы располагаются в положениях O-4 или O-2. В такой цепи могут присутствовать 2,3- или 3,4-разветвления. Встречаются также структуры, в которых основная цепь содержит чередующиеся (1 \rightarrow 3) и (1 \rightarrow 4) связи. Для фукоиданов характерна разнообразная физиологическая активность, в частности противоопухолевая, антикоагулянтная и антивирусная. Наличие такой активности связано с тем, что эти биополимеры способны мимикрировать углеводные лиганды природных рецепторов, например, белков селектинов. При этом способность к мимикрированию очевидно определяется не только химической структурой, но и конформацией полимерной цепи. Для выяснения особенностей конформационного поведения фрагментов фукоиданов в данной работе проведено систематическое изучение синтетических олигофукозидов, представляющих наиболее характерные структурные фрагменты этих биополимеров.

Цель работы: В диссертации проведено систематическое изучение конформаций синтетических олигофукозидов, представляющих собой наиболее характерные структурные фрагменты природных фукоиданов. Изучение проводилось как с использованием методов теоретического молекулярного моделирования, так и ЯМР экспериментов¹. Другой целью работы являлась систематизация спектральных (¹³C-ЯМР) эффектов сульфатирования и гликозилирования для фукозидов и их объяснение в свете результатов теоретического конформационного анализа. В дальнейшем эти эффекты могут быть использованы при установлении структуры природных фукоиданов по данным ¹³C-ЯМР.

¹ Эксперименты по ЯМР проводились А.А. Грачевым (лаборатория химии гликоконъюгатов, ИОХ РАН).

Научная новизна и практическая ценность работы: Конформации фукоиданов до сих пор систематически не исследовались. В данной работе впервые проведено изучение влияния заместителей (сульфатных групп, дополнительных остатков фукозы) на конформации различных типов связей Fuc- α (1 \rightarrow x)Fuc.

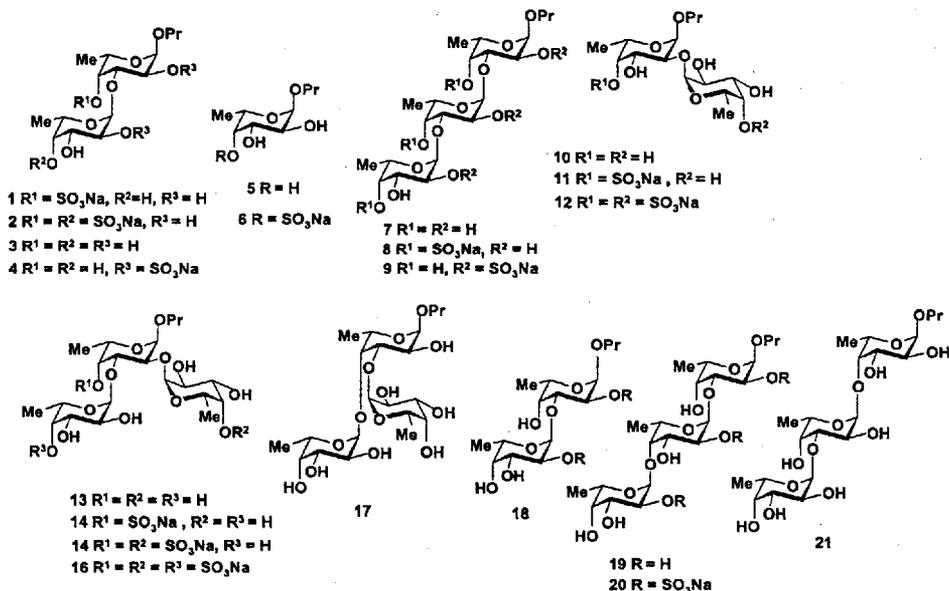
В ходе данной работы изучались сахараиды, содержащие 3 сульфатных группы в одной молекуле, и изучалась возможность учета их неполной диссоциации в расчетах.

Публикации: По теме настоящей диссертации опубликовано 3 статьи, содержание работы докладывалось на 3 конференциях.

Структура и объем диссертации: диссертация содержит 100 страниц, состоит из литературного обзора, посвященного рассмотрению различных методов конформационного анализа углеводов, обсуждения результатов и выводов. Библиография включает 144 ссылки.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Ниже представлены 21 исследованное в данной работе соединения², соответствующее основным структурным фрагментам фукоиданов. Далее в каждом разделе обсуждаются результаты конформационного анализа подгрупп этих соединений.



² Синтез соединений проведен к.х.н. Н.Е. Устюжаниной (лаборатория химии глюкокопьюгатов, ИОХ РАН).

1. Конформационный анализ α -(1 \rightarrow 3)-связи в дисахаридах.

Нами было проведено изучение основных конформеров α -(1 \rightarrow 3)-фукозидной связи в фрагментах фукоиданов и влияния 4-О-сульфатирования на конформационное равновесие на примере дифукозидов 1-3. Кроме этого, для изучения спектральных эффектов сульфатирования и гликозилирования использовались так же моносахариды 5 и 6.

Влияние сульфатирования на сдвиги ЯМР ^{13}C исследуемых соединений выяснялось измерением так называемых эффектов сульфатирования ($\Delta\delta$), которые представляют собой разницу соответствующих химических сдвигов сульфатированного и нессульфатированного соединения. Как и следовало ожидать, наиболее значительный положительный эффект сульфатирования наблюдался на атомах С4, непосредственно связанных с сульфатированным атомом кислорода (Таблица 1).

В то же время эффекты сульфатирования на атомах С4 в дисахариде 1 и в восстанавливающем остатке дисахариде 2 приблизительно на 2 м.д. превосходят соответствующие эффекты в моносахариде 4. Так же видно, что в дисахаридах 1 и 2 проявляется значительный положительный эффект на атоме С1', отсутствующий в моносахариде 6.

На атоме С3 в моносахариде 6 закономерно обнаруживается небольшой отрицательный эффект сульфатирования, так называемый β -эффект. В остатке на восстанавливающем конце дисахариде 2 подобный β -эффект отсутствует и, более того, эффект сульфатирования на атоме С3 положительный.

Все эти изменения эффектов сульфатирования в дисахаридах по сравнению с моносахаридом, на наш взгляд, имели конформационную природу, и мы рассчитывали объяснить их при помощи результатов теоретического конформационного анализа.

Таблица 1. Эффекты сульфатирования ($\Delta\delta$) в спектрах ЯМР ^{13}C соединений 1, 2 и 6.

Соединение	Остаток	$\Delta\delta\text{C1}$	$\Delta\delta\text{C2}$	$\Delta\delta\text{C3}$	$\Delta\delta\text{C4}$	$\Delta\delta\text{C5}$	$\Delta\delta\text{C6}$
1	α -L-FucOPr	0.1	0.4	1.0	10.8	-0.3	0.1
	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)	2.7	0.5	0.5	0.1	0.2	0.6
2	α -L-FucOPr	0.0	0.2	0.8	10.7	-0.4	0.5
	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)	2.3	0.5	-0.5	8.8	-0.5	0.5
6	α -L-FucOPr	-0.4	0.1	-1.0	8.4	-0.9	0.1

Конформационное исследование соединений 1-3. На примере данных соединений мы отработывали методики как конформационных расчетов, так методики регистрации ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Нами была применена процедура так называемого сканирования торсионных углов φ и ψ с использованием силового поля ММ3. Это процедура заключается в последовательном переборе значений торсионных углов из заданного диапазона с некоторым шагом. При этом в каждой точке проводится оптимизация геометрии, в которой значения сканируемых торсионных углов фиксируются. Диэлектрическая проницаемость равнялась 81, молекулы растворителя в явном виде не учитывались, сульфатные группы рассматривались как анионы, противоионы в расчете отсутствовали. Диапазон сканирования торсионных углов составлял $-180^\circ+180^\circ$ по каждому углу с шагом 10° . Полученные таким образом конформационные карты приведены на Рис. 1.

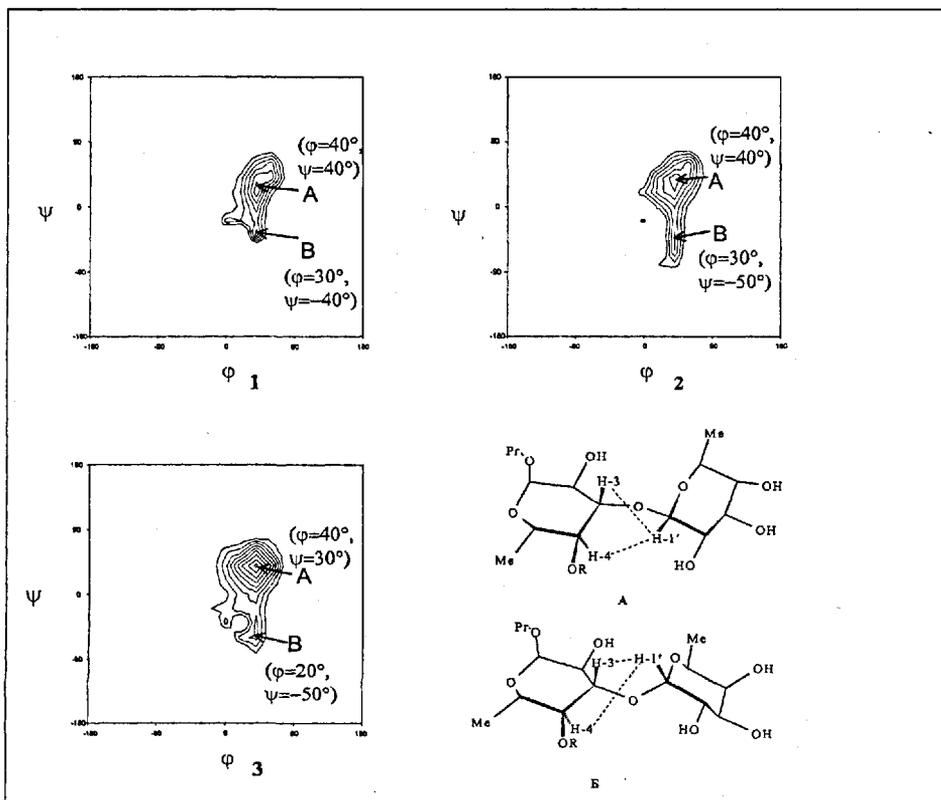


Рисунок 1. Конформационные карты и основные конформеры дисахаридов 1-3.

Для подтверждения адекватности проведенных расчетов нами всегда использовались данные экспериментов по ЯЭО на ядрах ^1H , которые могут быть измерены по одной из двух методик – равновесной или неравновесной. Величины равновесного ЯЭО являются функцией всех межпротонных расстояний в молекуле, которые сильно зависят от конформации. Теоретические величины равновесного ЯЭО для заданной конформации рассчитывались по итерационной формуле Ноггла-Ширмера (1), где i – индекс облучаемого атома H , k – индекс атома H , на котором измеряется ЯЭО, d – индексы всех остальных атомов H в молекуле, $d \neq i$, k .

$$f_i^k = \frac{1}{2} \cdot (r_{ik})^{-6} - \frac{1}{2} \cdot \sum_d (r_{kd})^{-6} \cdot f_i^d \quad (1)$$

Первоначально мы анализировали только основные минимумы, найденные на конформационных картах. Для каждого из этих минимумов были рассчитаны величины ЯЭО, которые были затем усреднены в соответствии с распределением Больцмана.

В данном приближении для всех трех дисахаридов были обнаружены две основные конформации, которые мы обозначили как конформеры А и Б (Рис. 1). Конформация А соответствует точке с координатами $\varphi = 40^\circ$, $\psi = 40^\circ$, и характеризуется пространственной сближенностью протонов $\text{H}1'$ и $\text{H}4$ (Рис. 1).

Конформер В соответствует точке с координатами $\varphi = 30^\circ$, $\psi = -40^\circ$, и характеризуется пространственной сближенностью протонов $\text{H}1'$ и $\text{H}3$ (Рис. 1). Межпротонные расстояния в конформерах А и Б приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Расстояния $\text{H}1'$ — $\text{H}3$ и $\text{H}1'$ — $\text{H}4$ (Å) в конформациях А и Б для дисахаридов 1-3.

Соединение	$\text{H}1'$ — $\text{H}3$		$\text{H}1'$ — $\text{H}4$	
	А	Б	А	Б
1	2.56	2.27	2.21	3.92
2	2.55	2.26	2.21	3.43
3	2.56	2.21	2.22	3.72

В случае дисахарида 3 соотношение заселенностей конформеров А и Б в соответствии с Больцмановским распределением составляло 1.6:1. Для 4,4'-ди-О-сульфатированного дисахарида 2 отношение заселенностей минимума А к заселенности минимума Б составляло 1:1.4. Это свидетельствует о том, что при сульфатировании положения О-4, вероятно, вследствие стерических препятствий, создаваемых сульфатной группой, сокращается среднее

расстояние между протонами H1' и H3. Таким образом, следовало ожидать увеличения ЯЭО на протоне H3 при переходе от несультфатированного к дисультфатированному дисахариду.

Такой подход, однако, оказался практически неприменим в случае моносультфатированного дисахарида 1. Конформационная карта этого соединения содержала большое количество практически равнозаселенных локальных минимумов, лежащих между конформерами А и Б. Для более детального изучения этой ситуации нами был использован следующий алгоритм расчета ЯЭО: была взята величина энергии, соответствующая глобальному минимуму, и для расчета использовались все конформации, имеющие энергию, отличающуюся от энергии этого минимума менее, чем на некоторую заданную величину. Эмпирически было установлено, что наилучшее совпадение рассчитанных величин ЯЭО с экспериментальными наблюдается, если энергия учитываемых конформеров отличается от энергии глобального минимума менее чем на 10%. Впоследствии мы пересчитали величины ЯЭО для соединений 2 и 3, используя тот же подход. Полученные результаты приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Относительные экспериментальные и вычисленные ЯЭО для соединений 1-3 (при насыщении сигнала H1' фукозы на невозстанавливаемом конце; время насыщения 7.2 с).

Соединение	Протон	Экспериментальный ЯЭО, %	Вычисленный ЯЭО, %
1	H2	0	-0.3
	H3	100	100
	H4	41.5	49
	H5	-13.3	-11.9
2	H2	0	-0.3
	H3	100	100
	H4	49.5	41.5
	H5	-10.2	-12.0
3	H2 + H3	100 ^a	100 ^a
	H4	88.8	85
	H5	-12.9	-14.1

^a Приведено значение для суммы ЯЭО H1'/H2 и H1'/H3 из-за перекрытия сигналов в спектре.

Из таблицы видно, что и рассчитанные, и экспериментально наблюдаемые величины ЯЭО в сультфатированных дисахаридах 1 и 2 на протонах H4 приблизительно в два раза ниже,

чем в несulfатированном соединении 3. Таким образом, эксперименты по равновесному ЯЭО подтвердили, что 4-О-sulfатирование приводит к повышению заселенности конформера Б и, следовательно, к увеличению среднего расстояния между протонами Н1' и Н4.

На данном этапе нами была также исследована возможность регистрации неравновесного ЯЭО (эксперимент 2D NOESY). Эта методика отличается большей общностью, поскольку является двумерной и не требует предварительного селективного насыщения какого-либо резонанса. С другой стороны, в 2D NOESY спектре возможно наблюдать сразу все протон-протонные взаимодействия. Величины ЯЭО в этом случае могут быть измерены как интегралы кросспиков. При использовавшихся нами экспериментальных условиях (время смешивания 500 мс), теоретическая величина ЯЭО обратно пропорциональна шестой степени межпротонного расстояния: $f \sim 1/r^6$

На данном этапе работы для расчета величин неравновесного ЯЭО, исходя из полученного ранее теоретического конформационного распределения, нами использовались только две основные конформации, А и Б. Однако в этом случае оказалось, что вычисленные величины сильно отличаются от экспериментальных. (Таблица 4). Поэтому далее нами был использован изложенный выше подход, основанный на учете конформаций с энергией, отличающейся от энергии глобального минимума менее чем на 10%. Полученные таким образом величины неравновесного ЯЭО приведены в Таблице 4. Видно, что они так же коррелируют с экспериментальными данными, демонстрируя увеличение относительного ЯЭО на протоне Н3 при введении сульфатной группы в положение О4.

Отсутствие совпадения величин неравновесного ЯЭО, рассчитанных исходя из предположения о существовании только двух основных конформеров, с экспериментом, может свидетельствовать, на наш взгляд, о том, что представление конформационного равновесия дисахарида лишь главными конформациями является слишком грубым приближением. В дальнейшем в нашей работе мы использовали методику расчета ЯЭО, учитывая все конформеры с энергией в пределах 10% от энергии глобального минимума.

Используя полученные данные, мы заново проанализировали описанные ранее эффекты сульфатирования и попытались предложить для них рациональное объяснение с точки зрения качественной теории Гранта-Чини. В конформационном равновесии обоих сульфатированных дисахаридов 1 и 2 найден большой вклад формы Б. В этой форме наблюдается весьма небольшое расстояние между протонами Н1' и Н3 (Рис 3В, Таблица 2). С точки зрения концепции Гранта-Чини это должно приводить к поляризации СН связей и сдвигу сигналов атомов углерода С3 и С1' в слабое поле. Таким образом, наблюдаемый положительный эффект $\Delta\delta C1'$ следует, видимо, отнести на счет этого взаимодействия. Для

атома углерода С3 это выражается в том, что в восстанавливающем остатке при сульфатировании не наблюдается отрицательного β-эффекта, как в остатке на восстанавливающем конце или в моносахариде 6.

Таблица 4. Экспериментальные и вычисленные (в скобках) относительные величины неравновесного ЯЭО для соединений 1-3.

№	Н2'/Н1'	Н3/Н1'	Н4/Н1'	
			ЯЭО ^а	ЯЭО ^б
1	95 (100)	100 (100)	55 (45)	(80)
2	90 (82)	100 (100)	49 (42)	(70)
3	125 (102)	100 (100)	109 (92)	(180)

^а Теоретические величины ЯЭО, вычисленные по конформациям, лежащим в пределах 10% от энергии глобального минимума.

^б Теоретические величины ЯЭО, вычисленные по двум основным конформерам А и Б.

С другой стороны, согласно концепции Гранта и Чини, взаимодействие сближенных протонов Н1' и Н4 в конформации А должно приводить к значительному сильнополюному сдвигу сигнала атома углерода С4. В форме Б, из-за изменения угла Н4—Н1'—С1', это взаимодействие приводит к небольшому слабополюному сдвигу. По-видимому, увеличение статистического веса формы Б при сульфатировании, по сравнению с нессульфатированным производным, приводит к тому, что сигнал углерода С4 восстанавливающего остатка дополнительно сдвигается в слабое поле, и эффект сульфатирования на нем увеличивается на 2 м.д. по сравнению с моносахаридом или же с невосстанавливающим остатком.

2. Конформационный анализ α-(1→3)-связи в линейных трисахаридах.

В данном разделе рассматриваются структуры 7 и 8, являющиеся гомологами изученных ранее нессульфатированного дисахарида 3 и 4,4'-ди-О-сульфатированного дисахарида 2. Спектральные эффекты сульфатирования в трисахаридах оказались аналогичны эффектам в сульфатированных дисахаридах 1 и 2 (Таблица 5), что позволило предположить схожесть конформационного поведения трисахарида и дисахаридов. Таким образом, одной из целей конформационного анализа данных структур было подтвердить это предположение.

Конформационное исследование соединений 7 и 8. Для теоретического конформационного анализа соединений 7 и 8 мы использовали методику, описанную в предыдущем разделе. В связи с тем, что в исследуемых теперь структурах присутствовало по две гликозидных связи, для каждого трисахарида строилось по две конформационных карты. При сканировании торсионных углов вокруг каждой связи вторая связь в трисахаридах рассматривалась как независимая, то есть, значения ее торсионных углов не фиксировались в

ходе оптимизации. Остальные процедуры и параметры были аналогичны использованным при моделировании конформаций дисахаридов 1-3.

Таблица 5. Эффекты сульфатирования ($\Delta\delta$) в спектре ЯМР ^{13}C трисахарид 8.

Фрагмент	$\Delta\delta\text{C1}$	$\Delta\delta\text{C2}$	$\Delta\delta\text{C3}$	$\Delta\delta\text{C4}$	$\Delta\delta\text{C5}$	$\Delta\delta\text{C6}$
$\rightarrow 3)\alpha\text{-L-FucOPr}$	0.0	0.0	1.4	10.8	-0.4	0.3
$\rightarrow 3)\alpha\text{-L-Fuc}(1\rightarrow$	3.0	0.5	0.4	10.5	-0.3	0.3
$\alpha\text{-L-Fuc}(1\rightarrow$	1.8	0.6	-0.7	8.8	-0.6	0.3

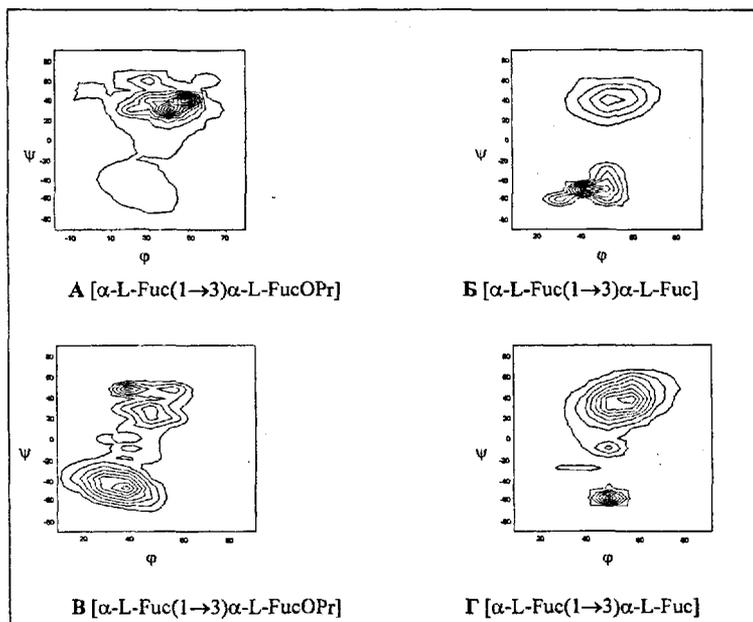


Рисунок 2. Конформационные карты для гликозидных связей в трисахаридах 7 (А,Б) и 8 (В,Г).

После расчета основные минимумы, найденные на обеих картах для каждой структуры, проверялись на структурную идентичность; если в конформерах различие торсионных углов при каждой из связей не превышало 10° и энергии различались менее, чем на 0.2 ккал/моль, они принимались как идентичные.

Для гликозидных связей в трисахаридах **7** и **8** нами были найдены те же формы **A** и **B** как основные конформации этих связей. В то же время, в количественном плане мы наблюдали ряд отличий, которые подробно обсуждаются ниже для каждой структуры. Для проверки результатов теоретического моделирования трисахаридов **7** и **8** мы использовали только методику 2D NOESY.

Соединение 7. Конформационные карты для несulfатированного трисахарида **8** показаны на Рис. 2 (**A**, **B**). Для этой структуры нами было обнаружено три основных конформера, которые показаны на Рисунке 3. Для сравнения, на этом же рисунке изображен основной конформер дисахарида **3**. В случае трисахарида **7** основным является конформер, в котором обе гликозидные связи находятся в конформации типа **A**, то есть, углы ϕ и ψ для этих связей находятся в районе (40° , 40°), а протоны $H1'$ и $H1''$ сближены, соответственно, с протонами $H4$ и $H4'$.

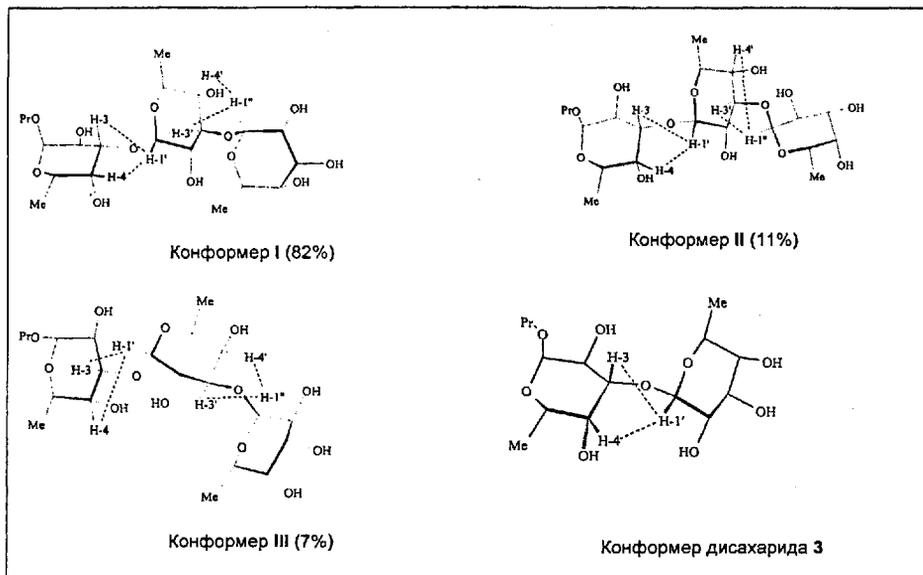


Рисунок 3. Конформеры несulfатированного трисахарида **7** (в скобках - их статистические веса), и основной конформер дисахарида **3**.

Статистические веса, указанные на рисунке, посчитаны согласно Больцмановскому распределению, исходя из энергий соответствующих конформеров. Было найдено, что статистический вес основного конформера **I** составляет чуть больше 80%, в то время как для

дисахарида 3 конформер со сближенными протонами Н1' и Н4 вносил в общее распределение вклад около 60%. Конформер, в котором обе связи находятся в конформации Б, имеет пренебрежимо малый вес и на рисунке не показан. Величины неравновесного ЯЭО, измеренные для данного соединения, приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Экспериментальные и вычисленные (в скобках) значения неравновесного ЯЭО для трифукозидов 7 и 8.

Соединение	Гликозидная связь	Н2'/Н1'	Н3/Н1'	Н4/Н1'	
				ЯЭО ^а	ЯЭО ^б
7	α -L-Fuc(1→3)- α -L-FucOPr	214 ^а (120+100)		143 (155)	(250)
7	α -L-Fuc(1→3)- α -L-Fuc	119 (110)	100 (100)	143 (160)	(235)
8	α -L-Fuc(1→3)- α -L-FucOPr	80 (90)	100 (100)	57.5 (35)	(85)
8	α -L-Fuc(1→3)- α -L-Fuc	70 (95)	100 (100)	57.5 (40)	(95)

^а Теоретические величины ЯЭО, вычисленные по конформациям, лежащим в пределах 10% от энергии глобального минимума. ^б Теоретические величины ЯЭО, вычисленные по трем основным конформерам, изображенным на Рис. 4. ^в Измерено для сумм интегралов Н3/Н1' и Н2'/Н1' из-за перекрытия кросспиков.

Экспериментальные величины ЯЭО подтвердили, что в трифукозиде 7 среднее расстояние между протонами Н1 гликозилирующего и Н4 гликозилируемого остатков заметно меньше, чем в несультатированном дисахариде 3. Это проявляется в значительном (в 1.5 раза) увеличении относительного ЯЭО на протоне Н4 в трисахариде. Таким образом, в результате исследования линейного трисахарида 7, нами было экспериментально и теоретически показано, что конформации (1→3)-связи в несультатированном фукобиозиде и соответствующем фрагменте в цепи фукоотриозиде заметно различаются. Ранее для линейных гомо-(1→3)-связанных три- и тетрасахаридов подобный эффект не описывался.

Соединение 8. Используя описанный выше метод, мы не смогли получить совпадения рассчитанных величин ЯЭО с экспериментальными. Результаты расчетов свидетельствовали, что конформации обеих гликозидных связей в этой структуре не отличаются от конформаций в несультатированном соединении. В то же время, согласно экспериментально зарегистрированным величинам ЯЭО, изменение конформаций в трисахариде при введении сульфатных групп должно было быть таким же, как и в случае дисахаридов 1 и 2.

Нами было предположено, что в таком трисульфатированном производном не все сульфатные группы могут быть диссоциированы. Изначально трудно аргументированно предположить, какая именно из этих групп может оказаться недиссоциированной, поэтому

нами был проведен молекулярно-механический расчет всех трех возможных форм трисахарида **8** (Рис. 4).

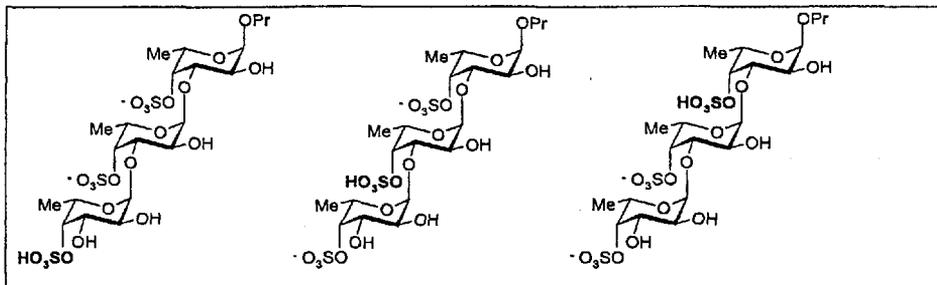


Рисунок 4. Частично недиссоциированные структуры, использованные при моделировании трисахарида **8**.

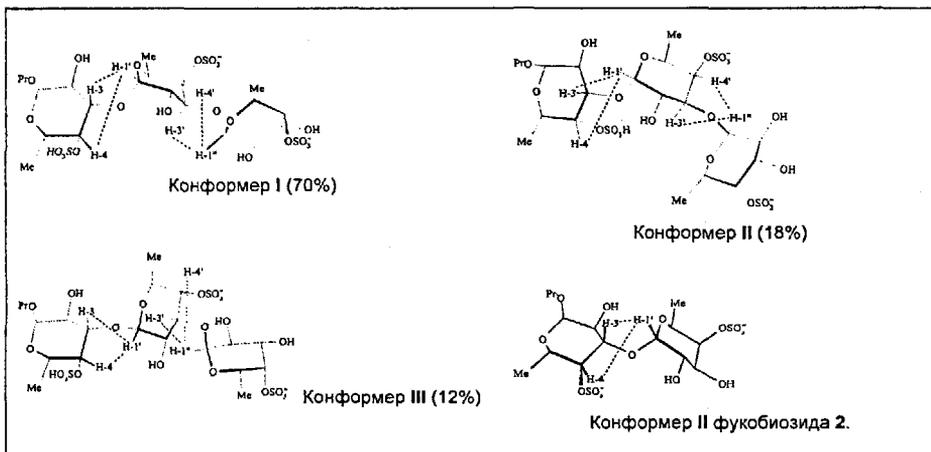


Рисунок 5. Конформеры три-О-сульфатированного трисахарида **8** (в скобках - их статистические веса), и основной конформер дисахарида **2**.

Расчитанные величины находились в одном и том же диапазоне для всех форм, кроме той, что содержит недиссоциированную сульфатную группу в остатке на восстанавливающем конце. В Таблице 6 приведены расчитанные для этой формы величины ЯЭО, которые удовлетворительно совпадают с экспериментальными. В данном случае, так же, как и в случае

дисахаридов **1** и **2**, происходит сдвиг конформационного равновесия (1→3)-связи в сторону преобладания конформера со сближенными протонами Н1' и Н3. Конформационные карты для данного соединения приведены на Рисунке 2 (В, Г). На Рисунке 5 показаны три основных конформера, теоретически найденные нами для трисахаридов **8**, и их статистические веса. Там же для сравнения показан конформер II дисахаридов **2**.

Анализ химических сдвигов ^{13}C в ЯМР-спектрах трифукозидов **7 и **8**.** В Таблице 5 приведены величины эффектов сульфатирования для трисахаридов **8**. Можно видеть, что отсутствует β -эффект на атомах С3 в восстанавливающем и среднем остатках. В то же время наблюдается положительный эффект сульфатирования на атомах С1 в среднем и невосстанавливающем остатках. Это может быть объяснено, как и в случае дифукозидов, уменьшением расстояния между протонами Н1' и Н3 и увеличением расстояния между протонами Н1' и Н4 при введении остатка сульфата.

В то же время, мы имеем возможность сравнить химические сдвиги ^{13}C дисахаридных фрагментов соединений **7** и **8** с химическими сдвигами соответствующих дисахаридов **2** и **3**. В Таблице 7 представлены так называемые отклонения от аддитивности в спектрах трисахаридов **7** и **8**. Они вычислены как разность химических сдвигов в трисахариде и в соответствующем дисахариде.

Таблица 7. Отклонения от аддитивности в трисахаридов **7** и **8**, вычисленные относительно соответствующих фукобиозидов.

Соединение	Остаток	$\Delta\delta\text{C1}$	$\Delta\delta\text{C2}$	$\Delta\delta\text{C3}$	$\Delta\delta\text{C4}$	$\Delta\delta\text{C5}$	$\Delta\delta\text{C6}$
7	→3)α-L-FucOPr	0	-0.1	-0.1	0.1	0	0
	→3)-α-L-Fuc(1→	0	0	0.4	0.4	0.4	0
	α-L-Fuc(1→	0.6	-0.2	0	0	0	0
8	→3)α-L-FucOPr	0.1	-0.1	0.7	0.4	0.1	0.0
	→3)-α-L-Fuc(1→	0.8	0.5	0.2	0.4	0.6	0.0
	α-L-Fuc(1→	0.2	0.1	0.0	0.4	0.1	0.0

Для трисахаридов **8** как теоретические расчетные данные, так и анализ экспериментальных величин ЯЭО показывают, что конформационное состояние (1→3)-связей в нем схоже с таковым в дисахариде **2**. С точки зрения теории Гранта и Чини, это должно означать, что отклонения от аддитивности в данном случае должны быть близки к 0. На самом деле, эти величины имеют небольшие положительные значения (Таблица 7).

Отметим, что подобные отклонения от аддитивности наблюдаются для нессульфатированного трисахаридов **7**. В случае этого соединения величины отклонений для

него так же малы, что находится в противоречии с данными спектроскопии ЯЭО и расчетов, которые свидетельствуют об увеличении расстояния Н1'–Н4. Это наблюдение показывает, что теория Гранта-Чини может давать качественно неверные предсказания даже в случае простых олигосахаридов.

3. Конформационный анализ соединений, содержащих α -(1→2)-фукозидную связь.

В данном разделе приводятся результаты конформационного анализа трех дисахаридов 10-12, содержащих α -(1→2)-фукозидную связь и различающихся присутствием сульфатных групп, а так же анализ серии сульфатированных и несulfатированных трисахаридов 13-16, содержащих вицинальное 2,3-разветвление.

В отличие от исследовавшихся ранее олигофукозидов, в случае (1→2)-связанных дисахаридов 10-12 молекулярно-механические расчеты по методу ММ3 приводили к результатам, существенно отличающимся от экспериментальных данных (Таблица 8). Так, рассчитанные величины ЯЭО на протоне Н1' сильно превышали экспериментальные значения. Это указывало на то, что молекулярная механика ошибочно предсказывает предпочтительность конформера со сближенными протонами Н1 и Н1' (Рис. 6).

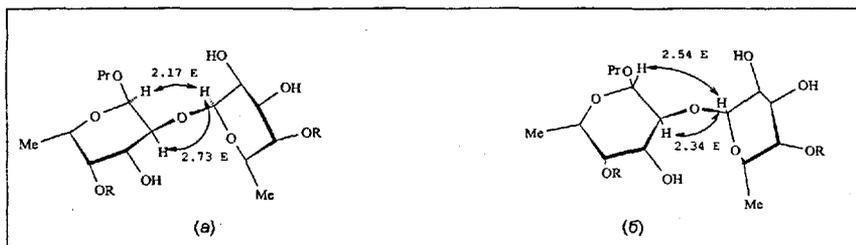


Рисунок 6. Основной конформер соединений 10-12 по данным молекулярно-механических расчетов (а) и расчетов по методу ФП (б).

Дисахариды 10-12 содержат 1,2-псевдоразветвление, благодаря вицинальному расположению пропильного агликона и присоединенного через (1→2)-связь фукозного остатка. В то же время, молекулярная механика корректно описывает конформационное распределение для гликозидной связи при пропильном агликоне.

Из данных расчетов следовало, что OCH_2 -группа агликона находится преимущественно в конформации, показанной на Рисунке 7. В такой конформации должен

наблюдаться значительный ЯЭО между протоном H1 и одним из протонов метиленовой группы (Ha), и заметно меньший ЯЭО между протоном H1 и вторым метиленовым протоном (Hb). При этом между протоном Hb и протоном H5 пиранозного кольца также должен наблюдаться ЯЭО, но в несколько раз меньший по величине. Экспериментально все эти эффекты были зафиксированы: соотношение ЯЭО Ha/H1 к Hb/H1 и Hb/H1 к Hb/H5 в случае дисахаридов 10-12 составляло 2:1 и 1:2+1:4.

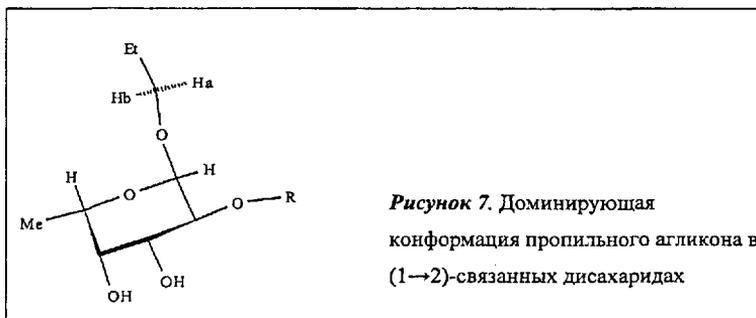


Рисунок 7. Доминирующая конформация пропильного агликона в (1→2)-связанных дисахаридах

На основании полученных данных можно было предположить, что расхождение между экспериментальными и рассчитанными величинами ЯЭО связаны с некорректностью описания молекулярной механикой распределения конформеров для (1→2)-связи. Для дальнейшего исследования этой проблемы мы провели расчеты также 3,4-разветвленного трифукозида 17. В этом соединении, как и в дисахаридах 10-12, представлено вицинальное аксиально-экваториальное дизамещение, при этом для (1→3)-связанного фукобизидного звена наблюдается стереохимическая ситуация, подобная таковой для (1→2)-связанного звена в дисахаридах 10-12.

Расчеты конформаций трисахарида 17 по методу ММ3 привели к результатам, удовлетворительно совпадающим с экспериментальными данными (Таблица 8). Из таблицы видно, что присутствие остатка фукозы в положении O4 приводит к возрастанию относительного ЯЭО на протоне H3. По аналогии, в случае (1→2)-связи это должно было бы вызывать увеличение ЯЭО на протоне H2, что и наблюдается экспериментально, но не наблюдается в расчете. По нашему мнению, это может означать, что молекулярная механика неправильно описывает (1→2)-гликозидную связь в присутствии пропильного агликона, который вызывает меньшие стерические затруднения, чем остаток фукозы.

Таблица 8. Экспериментальные и рассчитанные (в скобках) по конформационному распределению из силового поля ММ3 величины ЯЭО для соединений 10-16 и 3,4-разветвленного трифукозида 17.

Соединение	Связь	H2'	H1	H2	H3	H4	H6
10		120 (108)	89.5 (140)	100			
11		114 (108)	88 (135)	100			
12		145 (108)	65 (140)	100			
13	(1→2)	146 (150)	109 (100)	100 (100)			
	(1→3)	100 (100)			172 (45+110)		
14	(1→2)	164 (150)	133 (120)	100 (100)			
	(1→3)	138 (145)			100 (100)	143 (155)	
15	(1→2)	150 (150)	100 (115)	100 (100)			
	(1→3)	150 (140)			100 (100)	125 (135)	
16 ^a	(1→2)	151 (150)	123 (120)	100 (100)			
	(1→3)	123 (140)			100 (100)	130 (150)	
16 ^b	(1→2)	(150)	(120)	(100)			
	(1→3)	(105)			(100)	(320)	
16 ^a	(1→2)	(145)	(120)	(100)			
	(1→3)	(105)			(100)	(350)	
16 ^c	(1→2)	(150)	(128)	(100)			
	(1→3)	(105)			(100)	(350)	
17	(1→3)	115 (102)		20 (0)	100 (100)	80 (95)	
	(1→4)	70 (105)				100(100)	40 (55)

^aРасчетные данные приведены для дианиона с недиссоциированной сульфатной группой в бисгликозилированном звене. ^bТрианион с диссоциированными сульфатными группами.

^cДианион с недиссоциированной сульфатной группой в остатке фукозы при O2. ^dДианион с недиссоциированной сульфатной группой в остатке фукозы при O3.

Поэтому для оценки относительной энергии конформеров соединений 10-12 нами был использован метод функционала плотности (ФП), являющийся методом более высокого уровня теории. Квантово-механические расчеты проводились при помощи программы PGrida. Используемый при этом диапазон значений ϕ и ψ составлял $0^\circ \pm 70^\circ$ и $-70^\circ \pm 80^\circ$, соответственно. Этот интервал был выбран для сканирования, так как из молекулярно-механических расчетов было известно, что доля конформеров, лежащих вне его, пренебрежимо мала, и, таким образом, проводить сканирование всей конформационной карты было нецелесообразно из-за значительного увеличения времени расчета.

Рассчитанные по методу ФП теоретические и экспериментальные величины ЯЭО совпадали (Таблица 9), то есть метод ФП корректно описывает конформацию (1→2)-связи. Анализ величин ЯЭО показал, что, в отличие от исследовавшихся нами ранее (1→3)-связанных дифукозидов, в ряду (1→2)-связанных дифукозидов не происходит таких сильных конформационных изменений при введении сульфатной группы в О4. Это связано с пространственной удаленностью сульфатной группы при С4 и (1→2)-связи.

Таблица 9. Экспериментальные и рассчитанные (в скобках) по конформационному распределению из метода ФП величины ЯЭО для (1→2) фукобиозидов 10-12.

Соединение	H2'	H1	H2
10	120 (105)	89.5 (75)	100
11	114 (105)	88 (69)	100
12	145 (128)	65 (60)	100

Чтобы исследовать возможное влияние фукозного заместителя при О3 на конформацию (1→2)-звена, нами были изучены разветвленные трисахариды 13-16. В случае этих соединений результаты конформационных расчетов при использовании силового поля ММ3 и метода ФП соответствовали экспериментальным величинам ЯЭО (Таблица 9). При переходе от (1→2)-связанных дисахаридов 10-12 к соответствующим трисахаридам 13-16 наблюдается незначительное изменение конформации (1→2)-фукобиозидного фрагмента. В трисахаридах протоны Н1 и Н1' более сближены, чем в дисахаридах, что подтверждается некоторым увеличением ЯЭО на протоне Н1 гликозилируемого остатка.

Конформация (1→3)-фукобиозидного фрагмента в трисахаридах 13-16 определяется наличием соседнего гликозидного остатка при О2, ограничивающего конформационную подвижность, особенно вокруг связи С3-О3 (угол вращения ψ). Указанное изменение конформаций приводит к сближению протонов Н1' и Н4. Это подтверждается и величинами ЯЭО на протоне Н4 при облучении протона Н1', которые в 1.3-1.5 раза превышают ЯЭО на протоне Н3.

При сопоставлении данных для нессульфатированного трисахарида 13 и его сульфатированных производных 14-16 нами не выявлено существенных конформационных различий. Это свидетельствует о том, что в рассматриваемых 2,3-разветвленных трисахаридах главным структурным элементом, определяющим общее конформационное состояние,

является (1→2)-фукобиозидный фрагмент, тогда как влияние 4-*O*-сульфатирования имеет меньшее значение.

При расчете конформаций трисульфатированного трисахарида **16** наблюдалась ситуация, подобная отмечавшейся ранее при изучении 4,4',4''-трисульфатированного линейного (1→3)-фукотриозида **8**, когда совпадение теоретических и экспериментальных величин ЯЭО было достигнуто только при использовании в расчете структуры, содержащей одну недиссоциированную из трех имеющихся сульфатных групп. В данном случае (Таблица 8), наилучшее совпадение было получено для формы, содержащей незаряженную сульфатную группу в бисгликозилированном звене.

Результаты исследования трисахарида **16** и его линейного изомера **8** показывают, что конформационные расчеты олигоионных производных олигосахаридов даже при использовании методов такого высокого уровня как метод ФП, сопряжены с возможной ошибкой из-за принудительного упрощения этих сложных соединений при задании расчетной модели.

Анализ спектров ЯМР соединений 10-16. В Таблице 10 представлены величины эффектов сульфатирования в спектрах ¹³C-ЯМР соединений **11**, **12**, и **14-16**.

Наличие в дифукозидах **11**, **12** сульфогруппы при *O*4 гликозилируемого остатка, пространственно удаленной от (1→2)-связи, слабо сказывается на конформации этой связи. Таким образом, эффекты сульфатирования как в гликозилируемом, так и в гликозилирующем остатке обусловлены только электроноакцепторными свойствами сульфогруппы. Влияние различия межпротонных расстояний из-за разных конформаций (концепция Гранта-Чини) в данном случае отсутствует. Это проявляется в сопоставимости эффектов сульфатирования гликозилируемых остатков соединений **11**, **12** с эффектом сульфатирования в гликозилирующем остатке соединения **12** (Таблица 10).

Заметное увеличение эффектов сульфатирования на *C*4 центральных остатков по сравнению с влиянием на *C*4 гликозилирующих остатков в сульфатированных трисахаридах **12**, и **14-16** обусловлено изменением конформации (1→3)-связи по сравнению с нессульфатированным трисахаридом **13** (Таблица 8). Согласно экспериментальным и рассчитанным величинам ЯЭО (Таблица 8), в сульфатированных трисахаридах **12**, и **14-16** происходит уменьшение ЯЭО на протоне *H*4 и увеличение на *H*3 центрального остатка в ответ на возбуждение *H*1'-протона (1→3)-связанного остатка. Это соответствует увеличению среднего расстояния между *H*1' и *H*4.

В отличие от (1→3)-связанных дисахаридов и линейных трисахаридов, в случае 2,3-разветвленных трисахаридов **12**, и **14-16** отсутствовал ярко выраженный положительный

эффект на химических сдвигах атомов C1' (1→3)-связанных остатков в ответ на 4-*O*-сульфатирование центрального остатка. Это свидетельствует о малых изменениях конформации (1→3)-гликозидной связи по сравнению с ее изменением при 4-*O*-сульфатировании (1→3)-связанных дифукозидов.

Таблица 10. Величины эффектов сульфатирования ($\Delta\delta$, м.д.) для соединений **11**, **12** и **14-16**.

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
11	α -L-FucOPr	0.2	0.6	-0.4	8.8	-0.7	0.5
	α -L-Fuc(1→2)	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
12	α -L-FucOPr	0	0.7	-0.7	8.8	-0.8	0.4
	α -L-Fuc(1→2)	0.3	0.1	-1.0	8.8	-0.7	0.5
14	α -L-FucOPr	0.1	0.4	-1.7	9.4	0	0.6
	α -L-Fuc(1→2)	0.2	0.2	0.1	0	-0.2	0.1
	α -L-Fuc(1→3)	0.2	0.1	0.4	0	0	0
15	α -L-FucOPr	0.1	0.7	-1.6	9.5	0	0.6
	α -L-Fuc(1→2)	0.2	0.3	-1	8.5	-0.4	0.6
	α -L-Fuc(1→3)	0.4	0.1	0.3	0	-0.2	0.1
16	α -L-FucOPr	0.2	0.9	-1.3	9.6	0	0.6
	α -L-Fuc(1→2)	0.3	0.3	-1.1	8.5	-0.4	0.6
	α -L-Fuc(1→3)	0.5	0.3	-0.8	8.6	-0.8	0.6

Как и следовало ожидать, эффекты сульфатирования 2-*O*-гликозилирующих остатков трисахаридов **14-16** сопоставимы с эффектами сульфатирования в (1→2)-связанных дисахаридах **11** и **12** (Таблица 10).

4. Конформационный анализ соединений, содержащих чередующиеся α -(1→3)- и α -(1→4)-фукозидные связи.

В данном разделе описывается конформационный анализ двух изомерных трисахаридов **19** и **21**. С точки зрения данной диссертационной работы эти соединения представляют интерес, поскольку позволяют выяснить, изменяется ли конформация α -(1→3)-фукозидной связи при удлинении цепи α -(1→4)-фрагментом.

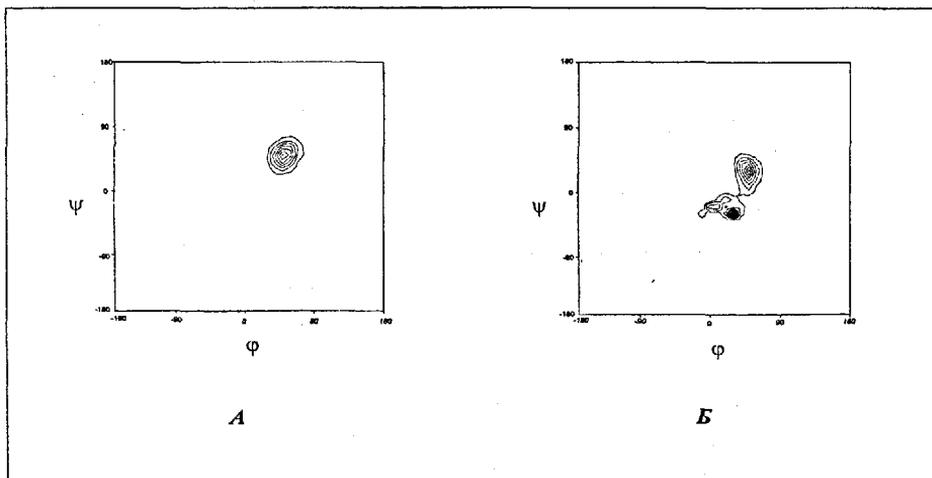


Рисунок 8. Конформационные карты соединения 19: А (1→3)-связь, Б (1→4)-связь.

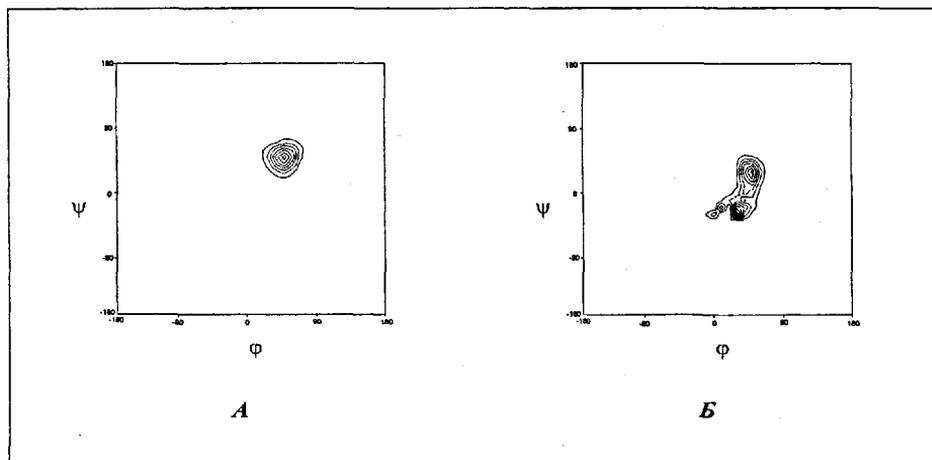


Рисунок 9. Конформационные карты соединения 21: А (1→3)-связь, Б (1→4)-связь.

Конформационные карты для данных соединений, полученные в результате молекулярно-механических расчетов, представлены на Рисунках 8 и 9. Для α -(1→3)-связи в обоих соединениях, как и в случае (1→3)-(1→3)-связанного трисахарида, нами был найден только один минимум, соответствующий конформеру А (Рис. 2). Рассчитанные и

экспериментально измеренные величины ЯЭО так же свидетельствовали о предпочтительности сближения протонов Н1' и Н4 (Таблица 11).

Для (1→4)-фукозидной связи в ходе расчета было найдено два основных конформера. Они схематически изображены на Рисунке 10. Один из них, обозначенный В, характеризуется пространственной сближенностью протонов Н1' и Н4, второй, Г, сближенностью протона Н1' и метильной группы гликозилируемого остатка. Для обоих трисахаридов соотношение конформеров В и Г составляло приблизительно 3:2. Рассчитанные величины ЯЭО приведены в Таблице 11.

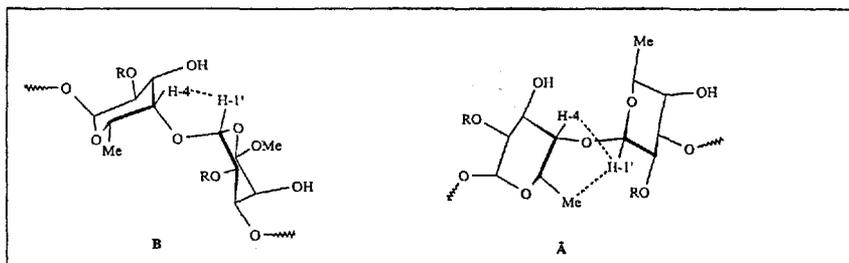


Рисунок 10. Два основных конформера α -(1→4)-фукозидной связи.

Таблица 11. Экспериментальные и рассчитанные (в скобках) величины ЯЭО для (1→3)-(1→4)-связанных фукобизидов 19 и 21.

№	Связь	Н3	Н4	Н6
19	α -L-Fuc(1→3)- α -L-FucOPr	100 (100)	140 (120)	
	α -L-Fuc(1→4)- α -L-Fuc		(214) 180	100 (100)
21	α -Fuc(1→4)- α -L-FucOPr	-	(200) 180	100 (100)
	α -L-Fuc(1→3)- α -L-Fuc	100 (100)	150 (140)	-

Как можно видеть, относительные величины ЯЭО на протоне Н4 агликона приблизительно в 2 раза превосходят величины ЯЭО на протонах метильной группы. Это может быть объяснено тем, что в конформере В, имеющем немного больший статистический вес, расстояние между протоном Н1' и Н4 сильно меньше среднего расстояния между протоном Н1' и протонами метильной группы (2.3 Å и 4.1 Å соответственно), в то время как в конформере Г расстояние Н1'—Н4 хотя и снижается, но остается соизмеримым с расстоянием Н1'—СН₃ (2.4-2.5 Å).

4. Конформационный анализ соединений, содержащих 2-О-сульфатную группу.

В данном разделе представлен конформационный анализ соединений, содержащих 2-О-сульфатную группу при α -(1 \rightarrow 3)-фукозидной связи (4 и 9), α -(1 \rightarrow 4)-связи (18), а так же при α -(1 \rightarrow 3)- и α -(1 \rightarrow 4)-связи одновременно (20). Теоретическое моделирование этих соединений было осуществлено с помощью методов молекулярной механики (силовое поле ММ3). При этом нам удалось добиться удовлетворительного совпадения рассчитанных величин ЯЭО с экспериментальными (Таблица 12). Конформационные карты α -(1 \rightarrow 3)- и α -(1 \rightarrow 4)-связи в 2-О-сульфатированных соединениях 4 и 18 представлены на Рисунке 11. Конформационные карты для данных связей в остальных изученных соединениях были схожи.

Таблица 12. Экспериментальные и рассчитанные (в скобках) величины ЯЭО для фукозидов 4, 9, 18 и 20.

Соединение	Связь	H3	H4	H6
4	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)- α -L-FucOPr	100 (100)	(95) 90	-
9	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc	*	*	-
	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)- α -L-FucOPr	100 (100)	140 (160)	
18	α -Fuc(1 \rightarrow 4)- α -L-FucOPr		100 (100)	22 (40)
20	α -Fuc(1 \rightarrow 4)- α -L-FucOPr	-	(100) 100	31 (145)
	α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc	*	*	-

* Не измерено из-за перекрывания кросс-пиков.

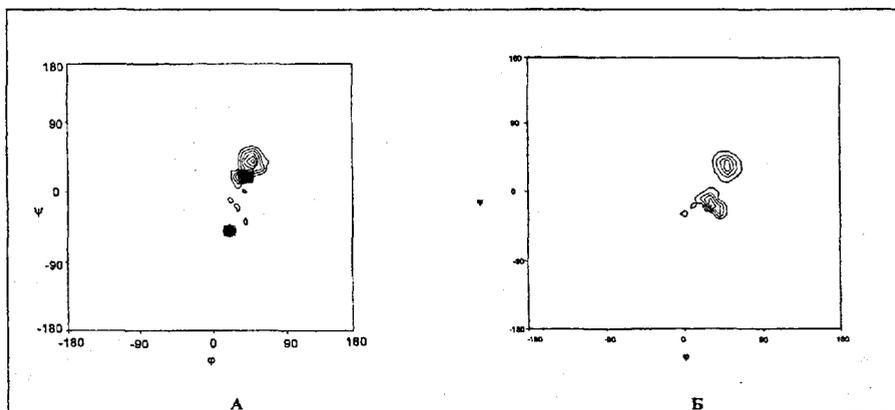


Рисунок 11. Конформационные карты α -(1 \rightarrow 3)-фукозидной связи (А, соединение 4) и α -(1 \rightarrow 4)-фукозидной связи (Б, соединение 18).

Сопоставление конформационных карт, а также рассчитанных и экспериментальных величин ЯЭО для обсуждаемых соединений с данными для соответствующих несультфатированных производных показывает, что влияние 2-О-сультфатирования на конформацию как (1→3), так и (1→4) связи практически отсутствует. Для (1→3) связи наблюдается эффект изменения конформации при удлинении цепи, аналогично тому, как это имело место в несультфатированных структурах.

Отсутствие влияния 2-О-сультфатирования на конформацию (1→4)-связи, вероятно, объясняется пространственной удаленностью этой связи от положения сультфатирования. В случае (1→3)-связи сохранение конформации вызвано тем, что в конформере А для этой связи аномерный протон пространственно ближе к положению О4, и поэтому введение заместителя в это положение сказывается на конформации, в то время как заместитель, вводимый в положение О2, не оказывает влияния на пространственное расположение гликозилирующего остатка, и, следовательно, не изменяет конформацию.

Выводы

1. Методами молекулярной механики и методом функционала плотности, а также экспериментами по ядерным эффектам Оверхаузера, изучены конформации гликозидных связей в ди- и трифукозидах, отвечающих основным структурным фрагментам природных полисахаридов фукоиданов, в результате чего создан базис для дальнейшего изучения более сложных олигофукозидов.

2. Исследованы основные конформеры для α -(1→2)-, -(1→3)- и -(1→4)-дифукозидных звеньев и впервые показано, что соотношение конформеров в ряду α -(1→3)-связанных соединений изменяется при переходе от ди- к трисахаридам.

3. При сопоставлении данных для исследованных олигосахаридов показано, что введение 4-О-сультфатной группы вызывает изменение соотношения конформеров для α -(1→3)-, но не α -(1→2)-фукобиозидов, а также не влияет на конформации обоих дисахаридных фрагментов в составе 2,3-разветвленного трисахарида.

4. Найдено, что в ряду исследованных олигосахаридов введение 2-О-сультфо-группы не влияет на соотношения конформеров α -(1→3)- и -(1→4)-фукобиозидных звеньев.

5. Показано, что методы молекулярной механики некорректно описывают распределение конформеров вокруг α -(1→2)-связи в фукобиозидях, но дают удовлетворительные результаты при исследовании 2,3-разветвленных трисахаридов, в то время как метод функционала плотности в обоих случаях корректно предсказывает единственный доминирующий конформер α -(1→2)-связанного звена.

6. Конформационное поведение три-О-сульфатированных трифукозидов может быть корректно промоделировано методами молекулярной и квантовой механики только в приближении ионизации двух из трех сульфатных групп.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. 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)- α -L-fucobioside and 4-sulfated fucoside fragments. // *J. Carbohydr. Chem.*, 2002, 21(4), 313-324
2. 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, 22(2), 37-50.
3. 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 α -(1→2)-связанное фукобиозидное звено. // *Биоорганическая химия*, 2004, 30, 1-12.
4. A.G. Gerbst, A.A. Grachev, D.E. Tsvetkov, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev, Conformational behaviour of fucoidan fragments: substituent pattern dependence. // *Proceed. 2nd German-Polish-Russian Meeting on Bacterial Carbohydrates* Moscow, 2002, p. 16.
5. Н.Е. Устюжанина, А.Г. Гербст, А.А. Грачев, Е.А. Хатунцева, А.И. Усов, Д.Е. Цветков, А.С. Шашков, М.Е. Преображенская, Н.А. Ушакова, Н.Э. Нифантьев, Синтез и конформационный анализ фрагментов фукоиданов. // *Тезисы докладов XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии* Казань, 2003, т. 2, с. 340.
6. А.Г. Гербст, А.А. Грачев, А.С. Шашков, Н.Э. Нифантьев, Теоретический конформационный анализ ди- и трифукозидных фрагментов фукоиданов. // *Тезисы докладов III Всероссийской школы-конференции "Химия и биохимия углеводов"* Саратов, 2004, с. 25.

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

Заказ № 564
Тираж: 150 экз.

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

