

В.Н. Шibaев

**НАУЧНАЯ ШКОЛА ПО ХИМИИ И БИОХИМИИ УГЛЕВОДОВ
АКАДЕМИКА Н.К. КОЧЕТКОВА**

Создание в нашей стране научной школы по химии и биохимии углеводов относится к 1959 г., когда Н.К. Кочетков, тогда член-корреспондент АН СССР и АМН СССР, возглавил Лабораторию химии углеводов и нуклеотидов в созданном в том же году при его активном участии Институте химии природных соединений АН СССР. Это время характеризовалось возникновением физико-химической биологии – науки, направленной на объяснение сути жизненных процессов в терминах более точных химических и физических наук. Внимание



ученых сконцентрировалось в первую очередь на исследовании нуклеиновых кислот и белков, и работа по этим направлениям до сих пор развивается весьма интенсивно. Однако очень быстро выяснилось, что понимание на молекулярном уровне многих жизненно важных процессов, таких как межклеточные взаимодействия, эмбриональное развитие и морфогенез многоклеточных организмов, невозможно без исследования строения и биологической функции еще одного обширного класса природных соединений – углеводовсодержащих биополимеров (биогликанов).

Биогликаны широко распространены в природе. Особенно велико количество растительных полисахаридов, которые по массе составляют ~90% органического вещества биосферы и легко доступны из возобновляемого растительного сырья. Целлюлоза и крахмал используются человечеством с незапамятных времен, и переработка растительного сырья для их полу-

чения, а также превращение этих полимеров в различные продукты с полезными свойствами составляют основу целых отраслей промышленности. Давно известна роль крахмала и родственных полимеров (резервных полисахаридов) как основной формы запасаения энергии и углеродных строительных блоков для биосинтеза других природных соединений в живых организмах. Полисахаридные цепи биогликанов играют важную роль в образовании прочных опорных структур, обеспечивающих механическую целостность как одноклеточных, так и многоклеточных организмов.

В то же время биогликаны выполняют ряд важных специфических функций. Входя в состав поверхностных структур клетки, они обеспечивают специфическое узнавание клеток и модулирование различных межклеточных сигналов, благодаря чему они определяют поведение клеток при оплодотворении и эмбриогенезе. Биогликаны играют важную роль во многих процессах в иммунной системе, в поддержании нормальной функции крови и регуляции ее свертывания, в патогенезе инфекционных болезней и установлении симбиоза между разными организмами. Биогликаны, участвующие в такого рода процессах, чрезвычайно разнообразны по своей химической структуре. Зачастую они присутствуют в

живых клетках лишь в небольших количествах.

В связи с выдающейся ролью биогликанов в науке и технике было решено сконцентрировать усилия коллектива школы на их разностороннем изучении. Работа, проводившаяся с 1967 г. в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского, затрагивала такие аспекты, как установление структуры биогликанов различных классов и разного происхождения, химический синтез их фрагментов (в том числе весьма протяженных), а также синтез неогликоконъюгатов на их основе и исследование процессов биосинтеза сложных биогликанов.

Поскольку функции, биологические и физико-химические свойства и возможное практическое использование биогликанов непосредственно связаны с особенностями их химического строения, приоритетное значение получило структурное изучение биогликанов, выделенных из различных природных источников. Следует подчеркнуть, что последняя задача является значительно более трудной, чем выяснение строения других биополимеров – нуклеиновых кислот и белков, для которых достаточно установить последовательность мономерных звеньев, соединенных однотипными связями в линейную полимерную цепь. В биогликанах гликозидные связи между соседними моносахаридными остатками разнообразны, в их образовании могут участвовать различные гидроксильные группы одного из моносахаридов, при этом конфигурация аномерного центра другого моносахарида также может быть разной. Известны примеры биогликанов, в которых мономеры связаны не только гликозидными, но и фосфодиэфирными связями (например, тейхоевые кислоты) или амидными связями (в гликопротеинах и гексоаминогликанах). Кроме того, биогликаны значительно различаются по топологии – встречаются как линейные гликополимеры, так и полисахариды с разной степенью разветвленности, в том числе очень высокой. Наконец, хотя многие полисахариды построены из регулярно повторяющихся олигосахаридных звеньев, известны многочисленные случаи, когда в процессе биосинтеза регулярного полимера происходит его модификация с образованием уникальных по строению участков. Именно эти факторы ответственны за огромное разнообразие структур существующих в природе биогликанов.

Первой фундаментальной задачей была разработка новых и усовершенствование существующих методов аналитической углеводной химии и создание на этой основе общей стратегии быстрого и эффективного определения строения биогликанов различного типа. Классический химический подход к определению структуры биогликанов состоит в расщеплении их полимерных цепей, установлении строения образующихся фрагментов и реконструкции структуры исходного полимера. В этой связи чрезвычайно важной являлась разработка новых химических методов селективного расщепления биогликанов. Уже в начале работы были предложены подходы, позволяющие разрывать цепь биогликанов по определенным остаткам моносахаридов, таким как уроновые кислоты и аminosахара. Важным достижением более позднего периода явилась разработка методов избирательного сольволитического расщепления гликозидных связей без затрагивания амидных связей и, наоборот, расщепления амидных связей без затрагивания гликозидных, что существенно облегчило структурный анализ гексоаминогликанов и гликопротеинов. Разработаны также методы сольволитического десульфатирования сульфатированных полисахаридов и восстановительного гидролиза гликозидных связей; последний позволил идентифицировать моносахариды, лабильные в условиях обычного кислотного гидролиза. Кроме того, изучалась возможность проведения направленной модификация биогликанов для изменения их физико-химических и биологических свойств.

Большое значение для усовершенствования методов структурного анализа биогликанов имело дальнейшее развитие масс-спектрометрии, основы применения которой для изучения строения фрагментов биогликанов были разработаны в школе уже в 1960-е годы. Этот метод

в настоящее время нашел широкое применение в мировой практике структурного анализа биогликанов. Разработанный позднее в коллективе новый подход к определению сайтов О-гликозилирования в гликопротеинах основан на совместном использовании эффективных хроматографических методов разделения сложных смесей олигосахаридов и гликопептидов, образующихся при избирательном расщеплении гликопротеинов, и масс-спектрометрического анализа гликопептидных фрагментов.

В 1970-е годы в школе были начаты систематические исследования в области спектроскопии ЯМР углеводов. Изучение спектров углеводных цепей биогликанов различного типа привело к разработке стратегии быстрого и эффективного установления их строения без расщепления на фрагменты. С этой целью создан банк данных спектров ЯМР ^{13}C специально синтезированных модельных соединений. В результате анализа накопленных данных по связи структуры и спектров ЯМР углеводов предложен компьютерный метод структурного анализа регулярных полисахаридов, основанный на расчете спектров ЯМР ^{13}C для всех возможных альтернативных структур полимера и сопоставлении рассчитанных спектров с экспериментальным. Было найдено, что во многих случаях детальный анализ спектров ЯМР позволяет надежно определять не только тип, но и конфигурацию моносахаридных компонентов. При анализе спектров получена также информация о пространственной структуре биогликанов, что особенно важно для понимания их биологических и физико-химических свойств.

Развитие методов масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР в применении к структурному анализу сложных углеводов относится к важнейшим достижениям школы, общепризнанным во всем мире.

Параллельно с разработкой общей стратегии и методов анализа сложных углеводов проводилась большая работа по выделению и определению строения ряда важных классов биогликанов. Исторически первыми были изучены природные гликозиды, выделенные из растений, произрастающих в различных регионах нашей страны, и используемые в медицине в качестве общих стимуляторов человеческого организма. Оказалось, что эти гликозиды (сапонины) представляют собой полициклические тритерпены с длинными олигосахаридными цепями (до 10-12 моносахаридов). Они были названы олигозидами. Было предпринято систематическое изучение структуры этих соединений. Многие из них были выделены из аралии манчжурской, элеутерококка и других растений семейства аралиевых. Эти соединения оказались действующими началами биологически активных растительных экстрактов и нашли применение как лечебные средства. Специальный поиск и изучение растений, содержащих олигозиды, продолжается и в настоящее время рядом исследовательских групп в разных регионах России и странах СНГ.

Значительное внимание в школе было уделено исследованию строения гликолипидов, главным образом, ганглиозидов морских беспозвоночных, содержащих сиаловые кислоты (последние играют важную роль в межклеточных взаимодействиях). Сиалогликолипиды были впервые обнаружены в иглокожих членами коллектива в сотрудничестве с дальневосточными учеными в середине 1960-х годов, и оказалось, что они широко распространены. Это открытие вызвало большой научный интерес и положило начало изучению детального строения этих соединений в Лаборатории химии углеводов ИОХ. Исследования, проведенные на широком круге объектов, показали, что ганглиозиды иглокожих, хотя и построены из тех же структурных элементов, что и ганглиозиды млекопитающих, существенно отличаются от последних по строению углеводных цепей. Соединения этого класса с необычными углеводными цепями представляют значительный интерес для структурно-функциональных исследований сиалогликолипидов и понимания эволюционных связей в мире животных.

Разработанные в школе методы структурного анализа биогликанов были широко использованы при изучении строения сульфатированных полисахаридов морских водорослей. Эти биогликаны, относительно легко доступные в больших количествах из природного сырья, обладают уникальными гелеобразующими свойствами и широко применяются в пищевой промышленности, микробиологии и биотехнологии. Систематическое исследование структуры многочисленных полисахаридов красных и бурых водорослей из морей, омывающих нашу страну, внесло большой вклад в расширение сырьевой базы и усовершенствование технологии получения этих важных биополимеров. В последние годы основные исследования в этой области связаны с изучением строения фукоиданов бурых водорослей – сложных по структуре сульфатированных полисахаридов, обладающих антикоагулянтной, противовоспалительной, противоопухолевой и противовирусной активностью.

Важнейшим направлением работ школы, начатых в 1970-е годы и интенсивно развивающихся в настоящее время, явилось изучение структуры биогликанов микроорганизмов. Основным объектом исследования служат липополисахариды грамотрицательных бактерий – сложные гликоконъюгаты, состоящие из ковалентно связанных липидного фрагмента, олигосахарида «кóра» и полисахаридной цепи (О-антигена), обычно построенной по типу блок-полимеров из повторяющихся олигосахаридных звеньев (от ди- до октасахаридов). Именно О-антигены, отличающиеся большим разнообразием структур, определяют специфичность узнавания многих патогенных бактерий иммунной системой организма-хозяина. С помощью разработанной в школе стратегии определено строение нескольких сотен О-антигенов, в том числе возбудителей опасных инфекционных заболеваний (мелиоидоза, туляремии, воспалений мочеполовых путей, шигеллеза, других кишечных болезней), а также ряда фитопатогенных микробов. Усовершенствование методов структурного анализа в последнее десятилетие позволило установить полную структуру липополисахаридов таких важных патогенов, как синегнойная палочка и возбудитель чумы.

В ходе структурного изучения микробных биогликанов впервые обнаружены в природе и идентифицированы многие моносахаридные компоненты с необычной структурой, такие как новые гликолактиловые кислоты (простые эфиры сахаров с молочной кислотой), диаминоуроновые и диаминононулозоновые кислоты, а также новые неуглеводные компоненты. Их строение подтверждено встречным синтезом с помощью специально разработанных методов. Это значительно расширило класс известных природных моносахаридов и внесло новые представления в общую химию углеводов.

Проведенные исследования бактериальных полисахаридов имеют важное теоретическое и прикладное значение, поскольку они создают химическую основу для серологической классификации микроорганизмов. На основе полученных данных о строении О-антигенов были уточнены, а в ряде случаев предложены новые классификационные схемы многих микроорганизмов, в том числе ряда патогенов человека, связанных с эпидемической опасностью. Эти результаты позволили также по-новому взглянуть на филогенетические связи между отдельными видами микроорганизмов и выяснить пути их эволюции.

С самого начала исследований особое внимание в школе было уделено гликопротеинам, играющим важную биологическую роль. Было исследовано строение так называемых групповых веществ крови – высокомолекулярных гликопротеинов из слизистой оболочки желудка с большим числом О-связанных углеводных цепей, которые несут на себе специфические антигенные детерминанты групп крови человека. Установлены структуры углеводных цепей и положение сайтов гликозилирования, а также составлено общее представление об архитектонике этих сложных биогликанов. Впервые было продемонстрировано присутствие в групповых веществах крови, в частности в

гликопротеинах с O-связанными углеводными цепями, длинных олигосахаридных цепей, содержащих до 11 моносахаридных остатков.

Другим важным гликопротеином, исследованным в школе, был гемагглютинин – главный антиген вируса гриппа. Была установлена его общая архитектура и изучены некоторые свойства, в частности предложено объяснение быстрого изменения иммуноспецифичности вируса (так называемого «дрейфа»), важного для его эпидемического поведения. Эта работа – одно из первых исследований вирусных гликопротеинов. Ее результаты имели существенное значение для рационального поиска методов создания противогриппозных вакцин.

Еще одно главное направление, получившее широкое развитие в школе, – это создание методов синтеза олигосахаридных фрагментов биогликанов (как относительно низкомолекулярных, так и с достаточно большой молекулярной массой (до нескольких тысяч)), что было необходимо для выяснения связи структуры биогликанов с их биологической активностью. Важнейшей задачей при этом явилось обеспечение регио- и стереоселективности образования гликозидных связей. Для ее решения значительное внимание было уделено созданию новых методов стереоспецифического гликозидного синтеза. Было предложено несколько таких методов, в том числе ортоэфирный метод и тритил-цианоэтилиденная конденсация. Их использование позволило синтезировать большое число олигосахаридных фрагментов различных полисахаридов, а также углеводных цепей некоторых гликопротеинов. Работа была увенчана полным синтезом целого ряда полисахаридов со структурой бактериальных антигенов. Крупнейшим общепризнанным достижением школы явился первый химический синтез гетерополисахаридов, что ознаменовало собою важный этап в развитии фундаментальной химии углеводов.

Из других достижений коллектива можно отметить обнаружение возможности повышения стереоселективности образования гликозидной связи под влиянием высокого давления и новый метод синтеза 1,2-*цис*-гликозидных связей с использованием гликозилтиоцианатов в качестве гликозилдоноров. Были развиты эффективные методы синтеза высокоразветвленных олигосахаридов, включая фрагменты олигоманнозидных цепей гликопротеинов, и биологически активных липоолигосахаридов – факторов нодуляции, принимающих участие в установлении симбиоза между азотфиксирующими бактериями и бобовыми растениями. Был предложен эффективный общий метод химического синтеза фрагментов фосфогликанов (так называемый гликозил-N-фосфонатный метод), позволивший впервые получить различные по структуре фрагменты этих интересных гликополимеров с фосфатными группами в основной цепи.

Важное значение имела разработка удобного метода получения гликозиламинов на основе незащищенных моносахаридов, что дало возможность осуществить прямое присоединение олигосахаридных цепей к пептидам с созданием углевод-пептидной связи природного типа. Данный метод получил широкое признание и используется во всем мире для синтеза различных гликоконъюгатов. В настоящее время в коллективе ведутся исследования по введению с помощью этого метода углеводных фрагментов в различные физиологически активные соединения и лекарственные вещества. Это открывает путь к медицинским препаратам нового поколения, способным направленно адресоваться в организме к клеткам определенного типа, в том числе к опухолевым клеткам.

Знание точной структуры O-антигенов бактерий позволило разработать подходы к созданию новых препаратов для диагностики и терапии инфекционных заболеваний. Присоединение к полимерным носителям олигосахаридных фрагментов микробных полисахаридов (большинство из которых синтезировано в школе) привело к неогликоконъюгатам – искусственным антигенам, содержащим иммунодетерминантные участки природных антигенов. Некоторые из них были предложены в качестве

диагностических препаратов и испытаны в медицинских учреждениях. На их основе могут быть созданы и химические вакцины.

Значительное место в многосторонней работе коллектива школы заняли исследования процессов биосинтеза биогликанов. Биосинтетическими предшественниками полисахаридов служат нуклеозиддифосфатсахара, а также полипренилфосфатсахара и полипренилдифосфатсахара. Большое внимание было уделено разработке эффективных методов химического синтеза гликозилфосфатов и их превращения в биосинтетические предшественники, а также изучению связи структуры и биологических функций этих соединений. В результате проведенных исследований выяснен путь биосинтеза ряда бактериальных полисахаридов и значение отдельных функциональных групп в молекулах предшественников для их взаимодействия с биосинтетическими ферментами. Впервые продемонстрирована возможность получения бактериальных O-антигенных полисахаридов и их аналогов с помощью химико-ферментативного подхода, при котором часть связей в молекуле полимера создается с помощью химического синтеза, а часть – в результате ферментативных реакций.

Итогом многолетней целенаправленной работы коллектива школы стало создание аналитических и синтетических методов изучения биогликанов. Это позволило быстро, надежно и с минимальными затратами труднодоступного материала определить строение и изучить свойства большого числа различных природных биогликанов, выяснить пути биосинтеза ряда сложных полисахаридов, синтезировать достаточно длинные фрагменты биогликанов и их аналогов, определить возможные пути их практического использования.

Тематика школы не ограничивалась изучением биогликанов. Так, одно из направлений исследований было связано с использованием углеводов в качестве исходного материала для стереоспецифического синтеза сложных по структуре биорегуляторов (антибиотиков, гормонов и др.), что позволило значительно упростить создание содержащихся в них хиральных центров. Кульминацией стал полный асимметрический синтез эритронолида – агликона важнейшего макролидного антибиотика эритромицина – и некоторых его близких аналогов, осуществленный из легкодоступного производного глюкозы – левоглюкозана. В ходе этих сложных и длительных исследований были разработаны новые методы и подходы к получению сложных систем, существенно развившие синтетическую органическую химию в целом.

В заключение следует отметить, что исследования коллектива по этим направлениям привели к созданию первого в нашей стране единого центра, занимающегося фундаментальными проблемами химии и биохимии углеводов на современном уровне. Отличительными чертами возникшей школы, в значительной степени определившими успех проводимой работы, явились разносторонний характер исследований и тесный контакт различных исследовательских групп в составе коллектива.

Научная школа Н.К. Кочеткова стала одним из крупнейших международных центров углеводной химии. Благодаря большому числу публикаций в ведущих русских и зарубежных журналах, многочисленным докладам и лекциям на отечественных и международных научных форумах, результаты исследований, проводимых коллективом, хорошо известны как в России, так и за ее пределами. Работы школы широко цитируются в мировой литературе, ряд сотрудников входит в число наиболее цитируемых российских ученых. Разработанные методы и полученные результаты широко используются другими учеными, в том числе в ведущих зарубежных лабораториях.

Особенно отрадно, что создание школы по химии и биохимии углеводов вызвало значительный подъем исследований углеводсодержащих соединений в нашей стране и создало фундаментальный задел для их дальнейшего расширения и углубления. Через школу прошло большое число студентов, аспирантов и молодых сотрудников, которые использовали знания и опыт, приобретенные в коллективе, для успешного развития

исследований углеводов и гликоконъюгатов в других лабораториях как в России, так и за рубежом. Некоторые из этих лабораторий сами стали центрами новых научных школ. Пережив кризис в 1990-х годах, связанный с резким ограничением материальных ресурсов и потерей ряда перспективных сотрудников, коллектив научной школы продолжает вести интенсивные исследования в области химического синтеза, установления структуры и изучения биосинтеза различных биогликанов – этого важнейшего класса биополимеров.

2004 г.