

Полисахариды водорослей

Сообщение 68*. Сульфатированные полисахариды камчатской бурой водоросли *Laminaria bongardiana***

М. И. Билан,^a Н. Г. Клочкова,^b Н. Е. Устюжанина,^a
А. О. Чижов,^a А. С. Шашков,^a Н. Э. Нифантьев,^a А. И. Усов^{a*}

^aИнститут органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук,
Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинский просп., 47.

Факс: (499) 135 5328. E-mail: usov@ioc.ac.ru

^bКамчатский государственный технический университет,
Российская Федерация, 683003 Петропавловск-Камчатский, ул. Ключевская, 35.
E-mail: ninakl@mail.ru

Несколько фракций фукоиданов выделены из биомассы камчатской бурой водоросли *Laminaria bongardiana* с помощью экстракции горячей водой и последующей анионообменной хроматографии. В составе фукоиданов в качестве главных компонентов найдены L-фукоза, D-галактоза и сульфат, а в качестве минорных — D-ксилоза, D-манноза, D-глюкуроновая кислота и ацетат. Проведено сольволитическое десульфатирование высокосульфатированных фракций фукоидана F-2 и F-3 нагреванием в диметилсульфоксиде с добавкой пиридина. Строение нативных и десульфатированных полисахаридов изучено методами метилирования и спектроскопии ЯМР. Полученные данные свидетельствуют о том, что F-2 содержит фукансульфат, главная цепь которого построена из 1→3-связанных остатков α-L-фукопиранозы с единичными ответвлениями в виде α-L-Fucp в положениях 2 и сульфатными группами преимущественно в положениях 4. В качестве сопутствующих полисахаридов в F-2 найдены сульфатированные фукоглюкурономаннан, фукоглюкуронозан и фукогалактан. Фукансульфат и сульфатированный фукогалактан являются главными компонентами фракции F-3. Определены антикоагулянтные свойства фракций фукоидана и показано, что активность фракции F-3 сравнима с активностью низкомолекулярного гепарина (эноксапарина), тогда как активность суммарного фукоидана F составляет ~2/3, а фракции F-2 — ~1/2 активности F-3, что соответствует меньшему содержанию сульфата в этих образцах. Десульфатированные препараты F-2deS и F-3deS полностью лишены антикоагулянтной активности.

Ключевые слова: *Laminaria bongardiana*, бурые водоросли, сульфатированные полисахариды, фукоиданы, антикоагулянтные свойства.

Изучение молекулярных основ биологических процессов является главным направлением исследований в биохимии, молекулярной биологии и в других областях науки о живых организмах. Знание точной структуры активных соединений необходимо для разработки на их основе биомолекулярных и гибридных систем², предназначенных для использования в качестве диагностических средств и лекарственных препаратов. Среди биоактивных веществ особое внимание привлекают сложные углеводы (полисахариды и гликоконъюгаты), которые выполняют важнейшую роль в процессах лиганд-рецепторного узнавания, определяющего многие этапы жизненного цикла клетки. В то же время структурный анализ гликополимеров из-за особенностей их химического строения продолжает оставаться одной из наиболее сложных проблем современной биоорганической химии.

Богатейшим источником биологически активных углеводов служат морские водоросли. В частности, бурые водоросли, представители класса Phaeophyceae, используются для получения маннита, ламинарана, альгиновых кислот и альгинатов, а также сульфатированных полисахаридов (фукоиданов)^{3–5}. С точки зрения разнообразной биологической активности наибольший интерес среди указанных соединений представляют фукоиданы^{6–13}, но именно эти полисахариды вызывают особые трудности при изучении их химического строения, поскольку обладают, как правило, разветвленными нерегулярными молекулами, содержащими несколько моносахаридов и многочисленные неуглеводные заместители (сульфатные и ацетильные группы)^{14,15}. В ряде предыдущих работ мы исследовали углеводный состав тихоокеанских бурых водорослей. Наиболее распространенные виды были охарактеризованы по содержанию маннита¹⁶ и перечисленных выше полисахаридов^{17,18}. Согласно этим данным водоросль *Laminaria bongardiana*, один из наиболее доступных в прибрежных водах Камчатки ви-

* Сообщение 67 см. лит.¹

** Посвящается академику Российской академии наук О. М. Нефедову в связи с его 85-летием.

дов, является перспективным источником маннита, ламинарана и альгиновой кислоты. По содержанию фукоидана этот вид уступает ряду других представителей бурых водорослей, однако может служить для получения фукоидана при комплексной переработке сырья. Данная работа посвящена изучению фракционного состава и свойств фукоидана из *L. bongardiana*.

Обсуждение полученных результатов

Образец бурой водоросли *L. bongardiana* был собран в Авачинской бухте в июле 1990 г. Представление об углеводном составе этого образца получено на основании анализа нейтральных моносахаридов в гидролизатах биомассы, а также в результате спектрофотометрического определения фукоидана и альгината в кислом и щелочном экстрактах соответственно¹⁷. Ранее были опубликованы сведения о строении содержащихся в биомассе низкомолекулярных углеводов и ламинарана^{19,20}. Целью данной работы являлось препаративное выделение и характеристика анионных полисахаридов. Методика экстракции водорастворимых полисахаридов подробно описана в одном из наших предыдущих сообщений²¹. Полисахаридный препарат F был получен в результате обработки биомассы водоросли 2%-ным водным раствором хлорида кальция при 85 °С с последующим осаждением анионных полисахаридов хлоридом цетилпиридиния и переводом осадка в водорастворимые Са-соли. Этот препарат, содержащий суммарный фукоидан, был далее разделен анионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефацелле на три фракции F-1—F-3 при элюции растворами 0.5, 1.0 и 1.5 М NaCl. Выходы и аналитические характеристики полученных фракций приведены в таблице 1. Как видно из этой таблицы, фракция F-1 характеризуется разнообразным моносахаридным составом и низкой степенью сульфатирования. Моносахаридный состав фракции F-2 также довольно сложен, хотя преобладающим моносахаридом является фукоза. Наряду с фукозой фракция содержит заметные количества маннозы, галактозы и уроновых кислот, а также умеренное количество сульфатных групп. Как и следовало ожидать исходя

из данных анионообменной хроматографии, фракция F-3 является наиболее сульфатированной. По сравнению с предыдущими фракциями ее моносахаридный состав заметно проще, образец содержит два главных компонента, фукозу и галактозу (последняя преобладает), тогда как содержание прочих нейтральных моносахаридов и уроновых кислот незначительно.

Для предварительной характеристики биологического действия полученных полисахаридных препаратов была определена антикоагулянтная активность препаратов. Гепариноподобные антикоагулянтные свойства отдельных фракций анионных полисахаридов сравнивали с активностью стандартного фармпрепарата эноксапарина (низкомолекулярного гепарина, Енокс). В качестве показателя активности определяли величины активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ). Техника эксперимента неоднократно описана в наших предыдущих работах²². Принято считать, что антикоагулянтные свойства фукоиданов в первую очередь определяются степенью сульфатирования, хотя несомненно зависят и от других структурных факторов^{8,11,13}. В нашем случае оказалось, что наиболее сульфатированная фракция F-3 приблизительно совпадает по активности с эноксапарином, тогда как активность суммарного фукоидана F составляет ~2/3, а фракции F-2 — ~1/2 активности F-3, что соответствует меньшему содержанию сульфата в этих образцах. Десульфатированные препараты F-2deS и F-3deS были полностью лишены антикоагулянтной активности (рис. 1). Представляло несомненный интерес дальнейшее изучение строения фракций F-2 и F-3 для обнаружения дополнительных структурных отличий, которые могли бы влиять на разницу в биологической активности препаратов.

В процессе структурного анализа фракций F-2 и F-3 была проведена химическая модификация этих препаратов для упрощения их строения. Продукты дезацетилирования (F-2deAc и F-3deAc) и десульфатирования-деацетилирования (F-2deS и F-3deS) сравнивали с исходными препаратами по спектрам ЯМР и результатам метилирования. Этот подход подробно описан в одном из наших предыдущих сообще-

Таблица 1. Выходы и состав (в % от навески) полисахаридных препаратов из водоросли *Laminaria bongardiana*

Образец	Выход (%)	Состав						
		Fuc	Xyl	Man	Glc	Gal	GlcA	SO ₃ Na
F	2.9 ^a	20.0	2.2	5.9	1.1	11.2	10.8	23.2
F-1	15 ^b	7.7	5.1	9.2	2.8	2.7	12.0	7.6
F-2	50 ^b	22.6	3.6	6.5	1.4	8.7	11.7	20.1
F-2-deS	62.5 ^c	7.2	3.2	5.9	1.8	8.0	18.9	0.4
F-2-H2	53.3 ^c	18.8	6.4	9.7	1.4	10.9	12.0	12.0
F-3	25 ^b	20.7	2.1	1.2	0.4	28.7	3.2	25.9
F-3deS	47.8 ^d	15.5	1.0	4.6	2.1	46.3	—	1.4

^a Выход от исходной биомассы. ^b Выход от препарата F. ^c Выход от фракции F-2. ^d Выход от фракции F-3.

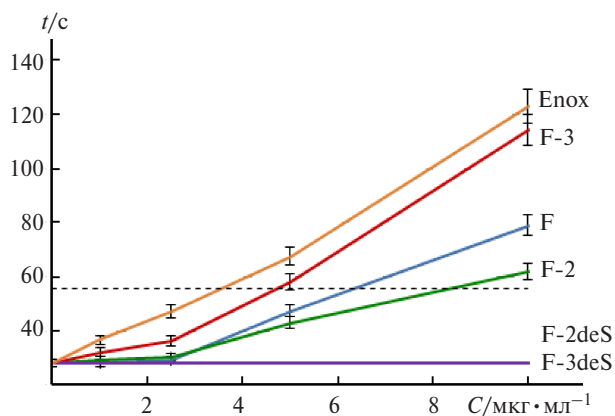


Рис. 1. Антикоагулянтная активность фракций фукоидана из *L. bongardiana* в тесте АЧТВ по сравнению со стандартным фармпрепаратом эноксапарином (Enox).

ний, посвященном установлению строения фукоидана из близкородственного вида бурых водорослей *Saccharina latissima*²³. Кроме того, был проведен частичный кислотный гидролиз F-2 для получения олигосахаридных фрагментов, которые можно было бы идентифицировать методом масс-спектрометрии. Детальный структурный анализ подобных фукоиданов затруднителен по двум причинам. Во-первых, выделяемые препараты часто представляют собой смеси нескольких разнородных полисахаридов, которые не удается полностью разделить с помощью анионообменной хроматографии. Во-вторых, молекулы этих полисахаридов, как правило, не содержат одинаковых повторяющихся олигосахаридных звеньев, т.е. лишены элементов регулярности. Поэтому результатом структурного анализа обычно является обнару-

жение отдельных, иногда достаточно протяженных, участков полисахаридных молекул, но их взаимное расположение в полимерах в основном остается неизвестным.

Данные о строении фукоидановых фракций были получены с помощью спектроскопии ЯМР и подтверждены методом метилирования. В процессе структурного анализа обнаружилось значительное сходство этих фракций с аналогичными препаратами, выделенными ранее из *S. latissima*²³. Для интерпретации спектральных сигналов был использован подход, примененный при установлении строения полисахаридов из *S. latissima*. В статье²³ приведены таблицы химических сдвигов сигналов в спектрах ЯМР для большинства моносахаридных звеньев. Там же подробно изложен ход рассуждений, которые привели к интерпретации спектров и которые мы не повторяем в данной работе, останавливаясь лишь на достигнутых результатах.

Несмотря на то что F-3 содержит всего два главных моносахарида, галактозу и фукозу, спектры ЯМР этой фракции имеют весьма сложный характер (рис. 2) и существенно не упрощаются в результате дезацетилирования и десульфатирования полимера. Спектральные данные свидетельствуют, что молекулы F-3 построены из остатков α -фукопиранозы и β -галактопиранозы, а сложность спектров объясняется высокой разветвленностью и отсутствием элементов регулярности молекул. Действительно, из результатов метилирования F-3deS следует (табл. 2), что в галактановой части молекул имеются приблизительно равные количества трех типов моносахаридных звеньев, а именно: 3-замещенных Galp, 6-замещенных Galp и 4,6-дизамещенных Galp. Первые два типа

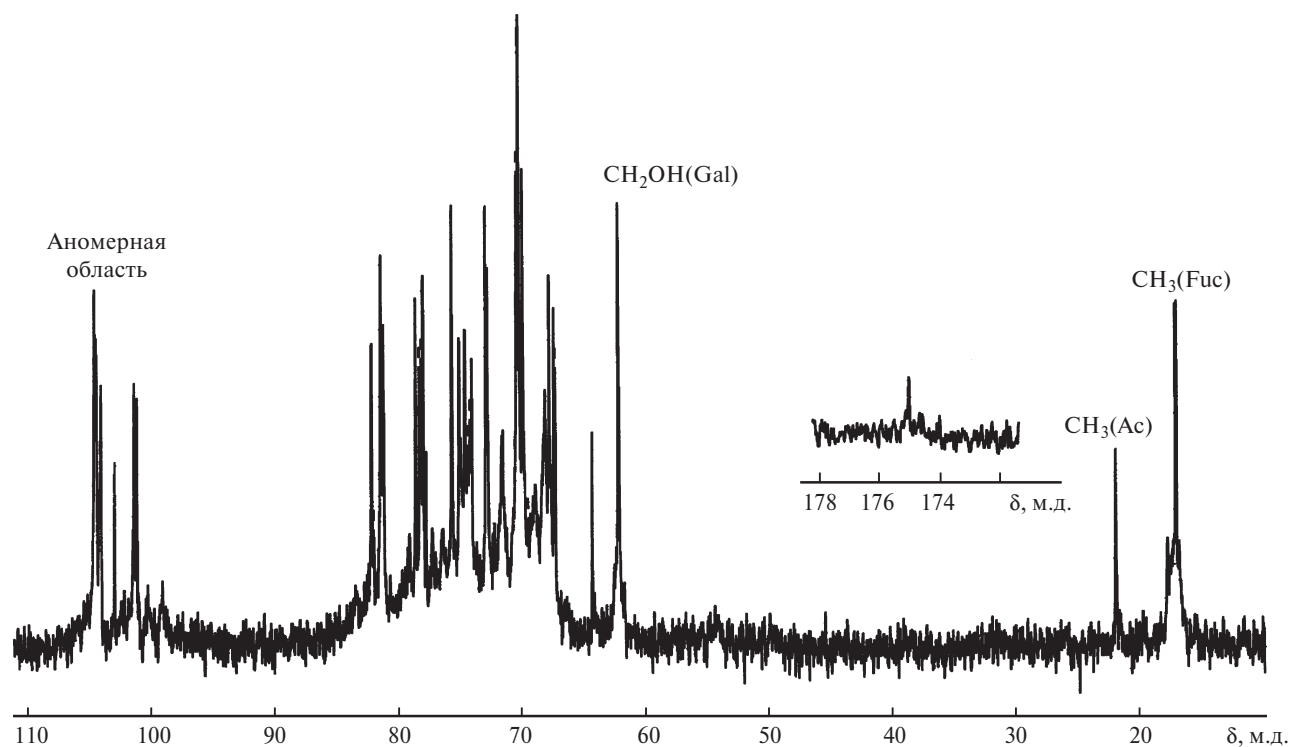


Рис. 2. Спектр ЯМР ^{13}C фракции F-3.

Таблица 2. Результаты метилирования полисахаридных препаратов F-3 и F-3deS из водоросли *Laminaria bongardiana*

Положения O—Me-групп	Положения замещения	F-3	F-3deS
		(мол.%)	
Xyl:			
2,3,4	Xylp→	—	1
2,3*	→4Xylp→	3	4
Fuc:			
2,3,4	Fucp→	—	10
2,3	→4Fucp→	10	2
2,4	→3Fucp→	7	16
2	→3,4Fucp→	12	4
4	→2,3Fucp→	5	2
Fuc	→2,3,4Fuc→	13	—
Gal:			
2,3,4,6	→Galp→	—	7
2,3,6	→4Galp→	—	4
2,4,6	→3Galp→	—	16
2,3,4	→6Galp→	—	18
2,6	→3,4Galp→	14	—
2,3	→4,6Galp→	3	14
2,4	→3,6Galp→	16	2
2	→3,4,6Galp→	17	—

* Содержит незначительное количество 3,4-Me₂-Xyl.

остатков образуют линейные участки молекул, тогда как третий тип — это точки разветвления углеводных цепей. Найденное количество концевых невосстанавливающих Galp соответствует только половине этих точек разветвления. Очевидно, что прочие точки разветвления — это места присоединения концевых не-

восстанавливающих Fucp или коротких цепей из 3-связанных Fucp. Из сравнения этих данных с результатами метилирования нативной фракции F-3 следует, что в галактановой части молекул сульфатные группы занимают положения 4 в 3-связанных остатках или положения 3 в 6-связанных остатках и точках разветвления. В фукановой части молекул сульфатированы положения 4 практически всех концевых и большинства линейных остатков фукозы, а положения 2, по всей вероятности, являются точками разветвления фукановых цепей, хотя можно допустить, что в линейных участках этих цепей изредка встречаются 2-моно- и 2,4-дисульфатированные остатки фукозы. Минорные остатки ксиланов образуют короткие 4-связанные цепи и не несут сульфатных групп. В итоге можно сделать вывод, что главным компонентом фракции F-3 является высокоразветвленный сульфатированный фукогалактан, в котором галактановая часть служит кором, а сульфатированные остатки фукозы расположены на периферии молекулы. Присутствие остатков фукозы и галактозы в одной и той же полимерной молекуле надежно подтверждается спектром ROESY, содержащим корреляционные пики H(1)(Fuc)/H(3)(Gal). Наиболее характерным структурным фрагментом полимера, как следует из спектра HSQC (рис. 3), является концевой дисахарид, в котором сульфатированный в положении 4 остаток α-Fucp присоединен в положение 3 остатка β-Galp, также сульфатированного по O(4) и расположенного на периферии галактанового кора. Таким образом, этот полимер аналогичен по строению фукогалактану из *S. latissima*, десульфатированное производ-

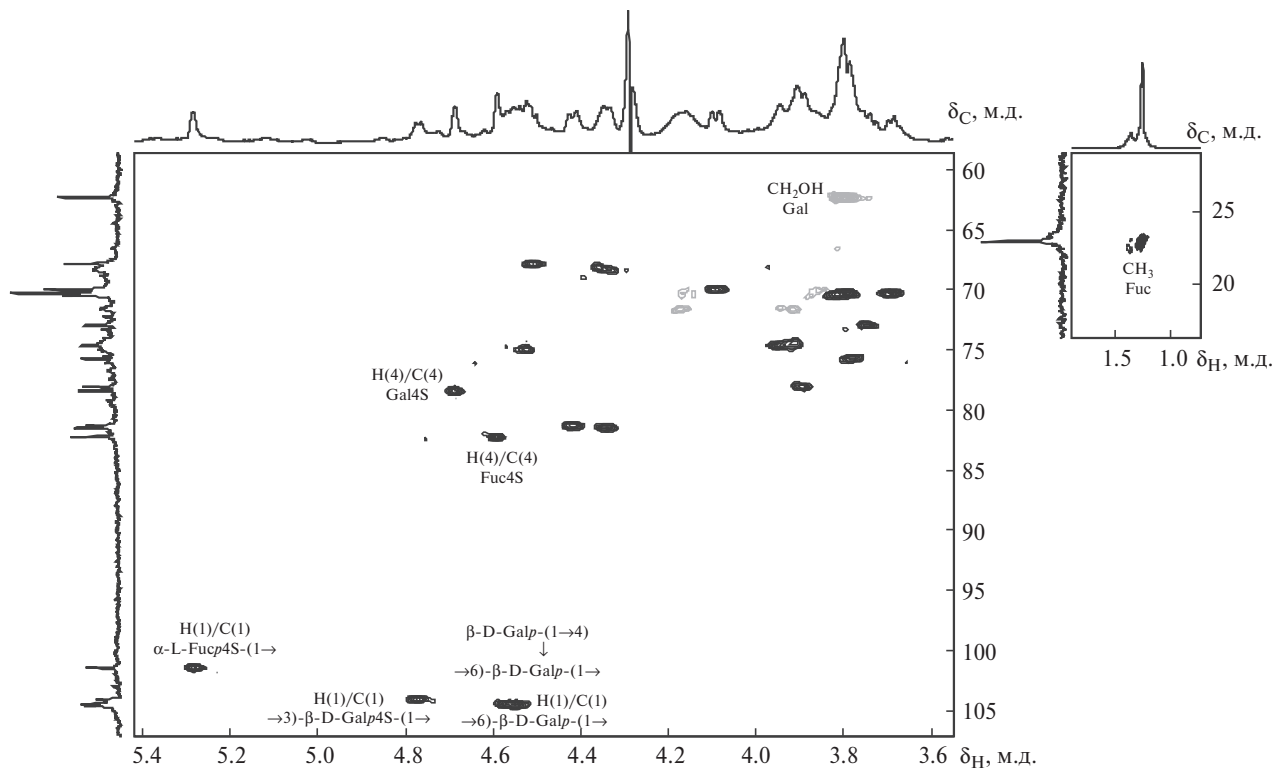


Рис. 3. Спектр HSQC фракции F-3deAc, содержащий сигналы H(4)/C(4) сульфатированных по положениям 4 остатков фукозы и галактозы.

ное которого описано нами как «структура 2» в работе²³, где приведены значения сигналов отдельных моносахаридных остатков в его спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C , а также наиболее важные для структурного анализа корреляционные сигналы в двумерных спектрах ЯМР. Необходимо отметить, что F-3 отличается от «структуры 2» более высоким соотношением фукозы и галактозы. Это позволяет предположить, что фракция содержит в качестве второго компонента фукансульфат, аналогичный главному полисахариду фракции F-2.

Фракция F-2 имеет более сложный состав, чем F-3, поэтому интерпретация спектров ЯМР этой фракции более затруднительна (рис. 4). В результатах метилирования F-2 (табл. 3) обращает на себя внимание набор метилированных производных фукозы, соответствующий фукансульфату, в котором линейные цепи из 3-связанных остатков фукопиранозы в значительной степени сульфатированы по O(4) и несут разветвления в виде единичных остатков фукопиранозы при O(2). Такие фукансульфаты неоднократно были описаны ранее и характерны для ламинариевых водорослей^{21,23,24}. Метилирование F-2deS не противоречит такому заключению, если принять, что небольшое количество сульфатных групп при O(4) сохраняется за счет повышенной устойчивости в условиях сольволитического десульфатирования, а концевые невосстанавливающие остатки фукозы, присутствующие в явном избытке, происходят не только из этого десульфатированного фукана, но и из других полисахаридных компонентов фракции F-2. Из этих сопутствующих полисахаридов главным является фукозилированный глюкурономаннан, также хорошо известный компонент фукоидановых фракций ламинариевых водорослей^{23,25,26}. К сожалению, при метилировании теряется информация о природе остатков

Таблица 3. Результаты метилирования полисахаридных препаратов F-2 и F-2deS из водоросли *Laminaria bongardiana*

Положения O—Me-групп	Положения замещения	F-2	F-2deS
		(мол.%)	
Xyl:			
2,3,4	Xylp→	13	13
2,3*	→4Xylp→	3	3
Fuc:			
2,3,4	Fucp→	10	14
2,3	→4Fucp→	3	3
2,4	→3Fucp→	15	17
2	→3,4Fucp→	12	3
4	→2,3Fucp→	5	2
Hex:			
2,3,4,6	Galp→	3	4
3,4,6	→2Manp→	8	12
2,4,6	→3Galp→	—	2
2,3,4	→6Galp→	5	9
2,6	→3,4Galp→	2	—
4,6	→2,3Manp→	6	7
3,6	→2,4Hexp→	3	4
2,3	→4,6Galp→	3	5
2,4	→3,6Manp→	3	—
2	→3,4,6Galp→	2	—
4**	→2,3,6Manp→	3	—

* Содержит незначительное количество 3,4-Me₂-Xyl. ** Содержит незначительное количество 3-Me-Hex.

уроновой кислоты, но производные маннозы, которые соответствуют 2-связанным остаткам в линейных цепях и 2,3-дизамещенным остаткам, несущим разветвления, идентифицируются вполне надежно. В целом строение фукозилированного глюкурономаннана как полимера, который содержит линейные цепи из чередующихся остатков 2-связанной α -маннозы

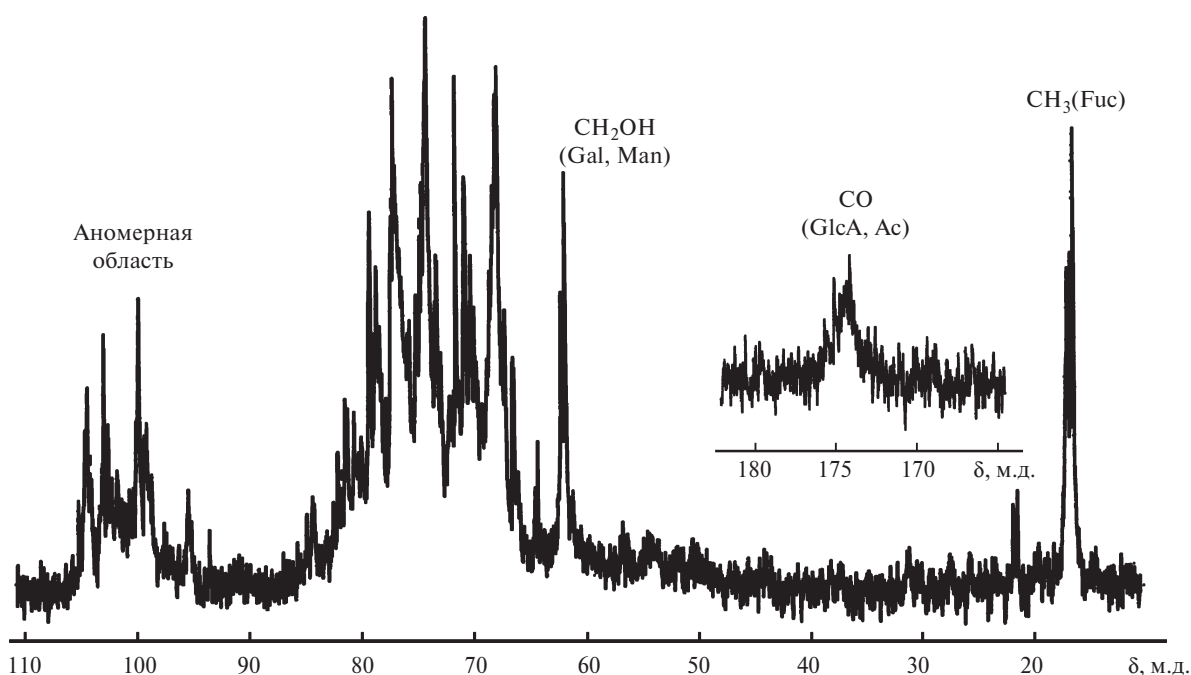


Рис. 4. Спектр ЯМР ^{13}C фракции F-2.

и 4-связанной β -глюкуроновой кислоты с некоторым количеством разветвлений в виде единичных остатков α -фукозы, присоединенных в положения 3 остатков маннозы, подтверждается наличием сигналов в спектрах ЯМР (рис. 5), которые совпадают с соответствующими сигналами в спектрах полисахаридов, описанных как «структура 3» и «структура 6» в работе²³.

Еще один полисахарид, содержащий глюкуроновую кислоту, был также идентифицирован по спектрам ЯМР (см. рис. 5). Он содержит линейные цепи из 3-связанных остатков β -GlcA с небольшим количеством разветвлений в виде единичных α -Fucp, присоединенных в положения 4, как в «структуре 4» из работы²³. Остатки галактозы, имеющиеся в F-2, принадлежат, по всей вероятности, фукогалактану, аналогичному компоненту фракции F-3, который попадает в F-2 из-за несколько меньшей степени сульфатирования. Небольшое количество ксилозы по данным метилирования присутствует главным образом в виде единичных концевых остатков и только в небольшой степени образует короткие 4-связанные цепочки, но места присоединения их к другим полисахаридным молекулам установить не удалось. Количество и соотношение метилированных производных ксилозы не меняется в результате десульфатирования, из чего следует, что остатки ксилозы не несут сульфатных групп.

Частичный гидролиз F-2 в условиях, рекомендованных для преимущественного расщепления гликозидных связей остатков фукозы²⁶, привел к образованию полимерных фракций F-2-N1, F-2-N2 и набора

низкомолекулярных фрагментов. Хотя в составе F-2-N2 сохранились остатки фукозы и сульфатные группы (см. табл. 1), деградация затронула главным образом молекулы фукансульфата. В низкомолекулярных продуктах гидролиза с помощью масс-спектрометрии были идентифицированы ожидаемые фрагменты фукансульфата^{26–28} (сульфат фукозы и несколько фукоолигосахаридов с разной степенью сульфатирования). Следует отметить, что среди сигналов небольшой интенсивности в масс-спектрах имеются пики, отвечающие по составу фрагментам, содержащим одновременно с фукозой также ксилозу или галактозу (см. Экспериментальную часть).

Таким образом, можно сделать вывод, что суммарный препарат фукоидана F, выделенный из *L. bongardiana*, содержит несколько различающихся по строению полисахаридов, которые можно частично разделить с помощью анионообменной хроматографии, и весьма напоминает аналогичный препарат из *S. latissima*²³, хотя и отличается по поведению при фракционировании. Ранее было показано, что биологическая активность таких суммарных фукоиданов определяется в основном присутствием фукансульфата¹⁰, который в случае *S. latissima* при анионообменной хроматографии попадает в наиболее сульфатированную фракцию, соответствующую фракции F-3 данной работы. В случае *L. bongardiana* основная часть фукансульфата элюируется с анионообменника в предыдущей фракции F-2, вероятно, из-за несколько меньшей степени сульфатирования. Тем не менее очевидно, что главным фактором, придаю-

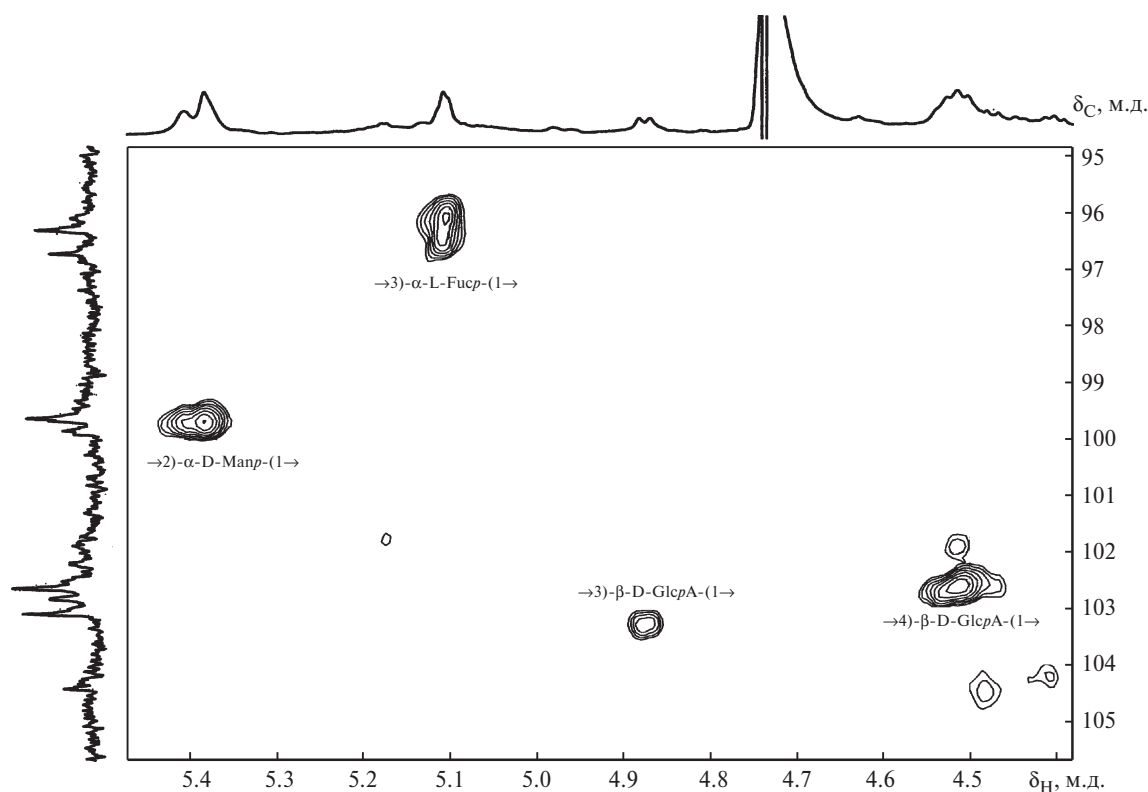


Рис. 5. Аномерная область спектра HSQC фракции F-2deS.

шим фракции F-3 наиболее выраженные антикоагулянтные свойства, является высокое содержание сульфатных групп.

Экспериментальная часть

Общие методы анализа. ГЖХ проводили на хроматографе «Agilent Technologies 7820A», снабженном пламенно-ионизационным детектором, в токе азота при градиенте температуры от 160 до 290 °С со скоростью 7 град·мин⁻¹. Для кислотного гидролиза к навескам полисахаридных препаратов (10–12 мг) приливали 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (1.0 мг·мл⁻¹, внутренний стандарт), нагревали 8 ч при 100 °С, кислоту отгоняли в вакууме с этанолом. Освободившиеся нейтральные моносахариды переводили в ацетаты полиолов²⁹ и определяли методом ГЖХ. Количественную обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы EZ Chrom Elite.

Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрическим методом³⁰ после гидролиза в 2 М трифторуксусной кислоте (8 ч, 100 °С). Содержание урновых кислот определяли спектрофотометрически по реакции с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой³¹. Для количественных измерений использовали спектрофотометр «Ultrospec 4050» («LKB Biochrom»). Абсолютные конфигурации моносахаридов приписаны на основании аналогии препарата F и суммарного фукоидана из *S. latissima*, для которого эти характеристики были определены экспериментально²³. Спектры ЯМР получали на спектрометре «Bruker Avance 600» при 303 К после одно-двухкратной лиофилизации образцов из D₂O и последующего растворения их в 99.96% D₂O (2–3%-ные растворы). Для калибровки спектров использовали Na-соль 3-(триметилсилил)пропионовой-2,2,3,3-d₄ кислоты (внутренний стандарт, δ_H 0.0, δ_C –1.6 м.д.). Достоверность отнесения сигналов контролировали с помощью двумерных корреляционных ¹H–¹H и ¹H–¹³C спектров ЯМР. Спектральные данные обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения фирмы «Bruker». Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации в области отрицательных ионов, напряжение на капилляре 3200 В, диапазон сканирования масс *m/z* 50–3000 Да, калибровка — внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, «Fluka»). Использование шприцевой ввод растворов веществ в смеси ацетонитрил–вода, 50/50 об.%, скорость потока 3 мкл·мин⁻¹, газ-распылитель — азот, 4 л·мин⁻¹, температура интерфейса 180 °С. Хромато-масс-спектрометрический анализ ацетатов частично метилированных полиолов выполнен на приборе «Agilent 7890B — 5977B GC-MSD», снабженном капиллярной колонкой HP-5, программирование температуры: 150 °С (1 мин), далее 10 град·мин⁻¹ до 280 °С.

Экстракция полисахаридов. Для экстракции использовали высушенные и измельченные пластины водоросли *Laminaria bongardiana* (полисахаридный состав биомассы приведен в работе¹⁷, образец № 9). 20 г биомассы заливали 200 мл 2%-ного CaCl₂, перемешивали и оставляли на ночь для набухания. Затем смесь перемешивали 2 ч при 85 °С, центрифугировали и к экстракту прибавляли 100 мл 10%-ного водного раствора хлорида цетилпиридиния. Остаток водоросли еще два раза экстрагировали 200 мл 2%-ного CaCl₂ в тех же условиях. Экстракты прибавляли к смеси, содержащей хлорид цетилпиридиния. Осадок це-

тилпиридиниевых солей отделяли центрифугированием, промывали водой и растворяли в 50 мл 4 М CaCl₂. Для растворения потребовалось перемешивание на магнитной мешалке в течение 3 ч при 60 °С. К слегка опалесцирующему раствору приливали 200 мл этанола, выпавший осадок дважды промывали этанолом, растворяли в 50 мл 2%-ного CaCl₂, диализовали, фильтровали, концентрировали в вакууме и лиофилизовали, получали бесцветный препарат F анионных полисахаридов в виде Ca-солей, выход 0.58 г.

Анионообменная хроматография. Препарат F (400 мг) растворяли в 10 мл 0.1 М NaCl, раствор фильтровали через бумажный фильтр и наносили на колонку 30×2 см с ДЭАЭ-сефацелом, наполненную в 0.1 М NaCl. Колонку промывали 0.1 М NaCl до отсутствия фенольной реакции на углеводы³² в элюате, после чего последовательно промывали 0.5, 1.0 и 1.5 М растворами NaCl, каждый раз до полного отсутствия реакции на углеводы в элюатах. Фракции диализовали и лиофилизовали, получали соответственно препараты F-1, F-2 и F-3. Выходы и состав этих препаратов приведены в таблице 1.

Частичный гидролиз фракции F-2. Препарат F-2 (150 мг) растворяли в 15 мл 0.1 М HCl, нагревали 30 мин при 80 °С, нейтрализовали, прибавляя около 1.5 мл 1 М NaOH, и приливали 20 мл этанола. Мутный раствор оставляли на 12 ч в холодильнике. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали дважды этанолом, затем ацетоном и высушивали в вакууме, получали фракцию F-2-H1, выход 18 мг. Этанольные промывки присоединяли к маточному раствору, доводя соотношение этанол–вода до 4 : 1, и смесь снова оставляли на 12 ч в холодильнике. Выпавший новый осадок обрабатывали, как описано выше, получали фракцию F-2-H2, выход 80 мг. Маточный раствор упаривали для удаления этанола, остаток хроматографировали на колонке с сефадексом G-15 при промывании водой для удаления солей. Элюат, содержащий олигосахариды, концентрировали и лиофилизовали, получали фракцию F-2-H3, выход 40 мг. В масс-спектре отрицательных ионов, полученном из этой фракции, в качестве главных пиков обнаружены ионы с *m/z* 225.0100 [FucS — H₂O]⁻, 243.0197 [FucS]⁻, 389.0789 [2 FucS]⁻, 491.0189 [2 Fuc2S]⁻, 535.1369 [3 FucS]⁻, 592.9574 [2 Fuc3S]⁻, 637.0775 [3 Fuc2S]⁻, 739.0151 [3 Fuc3S]⁻. Кроме них, найдены пики ионов небольшой интенсивности с *m/z* 255.2347 [4 Fuc5S]⁴⁻, 307.0464 [3 Fuc2S]²⁻, 344.9590 [Fuc2S]⁻, 358.0148 [3 Fuc3S]²⁻, 371.0691 [2 FucS — H₂O]⁻, 375.0617 [FucXylS]⁻, 380.0757 [4 Fuc2S]²⁻, 405.0725 [FucGalS]⁻, 421.0671 [2 GalS]⁻, 453.1065 [5 Fuc2S]²⁻, 473.0081 [2 Fuc2S — H₂O]⁻, 521.1221 [2 FucXylS]⁻, 681.1945 [4 FucS]⁻, 783.1378 [4 Fuc2S]⁻.

Сольволитическое десульфатирование²¹ и метилирование фукоиданов. Препараты F-2 или F-3 (70 мг) растворяли в воде, переводили в пиридиниевую соль, пропуская через колонку с катионитом Дауэкс-50х4 (PyH⁺-форма), и лиофилизовали. Полученные препараты растворяли в смеси 4.5 мл ДМСО и 0.5 мл пиридина, нагревали 5 ч при 80 °С, к охлажденным растворам прибавляли 1 М NaOH до pH 10, выдерживали 1 ч при ~20 °С, диализовали и лиофилизовали, получали F-2deS или F-3deS, выходы и состав которых приведены в таблице 1. Для метилирования 5–7 мг этих препаратов или пиридиниевых солей фракции F-2 и F-3 суспендировали в 0.5 мл ДМСО, прибавляли 30–40 мг тонкоизмельченного NaOH и 0.2 мл CH₃I, суспензию перемешивали 1 ч, добавляя через 30 мин еще 0.2 мл CH₃I, после чего приливали 3 мл воды и 3 мл хлороформа. Полученную смесь диализовали, упаривали для удаления хлороформа и лиофилизовали. К метилированному полисахариду прибавляли 1 мл 2 М CF₃COOH, нагревали 8 ч при 100 °С,

кислоту отгоняли с этанолом. Полученные производные моносахаридов восстанавливали NaBH_4 или NaBD_4 и ацетилировали смесью Ac_2O и пиридина (по 0.2 мл). Частично метилированные ацетаты полиолов анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-МС по известным методикам²⁹.

Определение антикоагулянтной активности. Тест АЧТВ проводили по общепринятой методике с использованием анализатора коагуляции «Coatron®M2» («ТЕСО», Германия) и стандартных реагентов НПО «Ренам». Водные растворы (10 мкл) образцов полисахаридов или низкомолекулярного гепарина (эноксапарина, Clethane® фирмы «Sanofi») с концентрациями 0.15, 0.075, 0.037 и 0.015 мг·мл⁻¹ прибавляли к 50 мкл нормальной плазмы. Смеси инкубировали 2 мин при 37 °С, затем прибавляли 50 мкл АЧТВ-реагента и снова инкубировали 5 мин при 37 °С. Далее прибавляли 50 мкл раствора CaCl_2 и определяли время образования сгустка. В качестве контроля использовали очищенную воду.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00126).

Список литературы

1. В. Е. Васильковский, Г. П. Смирнова, А. С. Шашков, А. И. Усов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2015, 1163 [V. E. Vas'kovskii, G. P. Smirnova, A. S. Shashkov, A. I. Usov, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2015, **64**, 1163].
2. V. P. Ananikov, K. I. Galkin, M. P. Egorov, A. M. Sakharov, S. G. Zlotin, E. A. Redina, V. I. Isaeva, L. M. Kustov, M. L. Gening, N. E. Nifantiev, *Mendeleev Commun.*, 2016, **26**, DOI: 10.1016/j.mencom.2016.09.001.
3. Н. Г. Клочкова, В. А. Березовская, *Водоросли камчатского шельфа. Распространение, биология, химический состав*, Дальнаука, Владивосток, 1997, 155 с.
4. М. В. Суховеева, А. В. Подкорытова, *Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: Биология, распространение, запасы, технология переработки*, Владивосток, 2006, 244 с.
5. A. I. Usov, in *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*, Ed. H. Dominguez, Woodhead Publishing, Oxford, 2013, p. 23.
6. O. Berteau, V. Mulloy, *Glycobiology*, 2003, **13**, 29R.
7. M. T. Ale, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Mar. Drugs*, 2011, **9**, 2106.
8. A. Cumashi, N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, G. E. Morozevich, A. E. Berman, M. I. Bilan, A. I. Usov, N. E. Ustuzhanina, A. A. Grachev, C. J. Sanderson, M. Kelly, G. A. Rabinovich, S. Iacobelli, N. E. Nifantiev, *Glycobiology*, 2007, **17**, 541.
9. Н. А. Ушакова, Г. Е. Морозевич, Н. Е. Устюжанина, М. И. Билан, А. И. Усов, Н. Э. Нифантьев, М. Е. Преображенская, *Биомед. химия*, 2008, **54**, 597 [*Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. (Engl. Transl.)*, 2009, **3**, 77].
10. D. O. Croci, A. Cumashi, N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, A. Piccoli, L. Totani, N. E. Ustuzhanina, M. I. Bilan, A. I. Usov, A. A. Grachev, G. E. Morozevich, A. E. Berman, C. J. Sanderson, M. Kelly, P. Di Gregorio, C. Rossi, N. Tinari, S. Iacobelli, G. A. Rabinovich, N. E. Nifantiev, *PLoS ONE*, 2012, **6**, e17283, doi:10.1371/journal.pone.0017283.
11. N. E. Ustuzhanina, N. A. Ushakova, K. A. Zyuzina, M. I. Bilan, A. L. Elizarova, O. V. Somonova, A. V. Madzhuga, V. B. Krylov, M. E. Preobrazhenskaya, A. I. Usov, M. V. Kiselevskiy, N. E. Nifantiev, *Mar. Drugs*, 2013, **11**, 2444.
12. N. E. Ustuzhanina, M. I. Bilan, N. A. Ushakova, A. I. Usov, M. V. Kiselevskiy, N. E. Nifantiev, *Glycobiology*, 2014, **24**, 1265.
13. N. E. Ustuzhanina, N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, M. I. Bilan, E. A. Tsvetkova, V. B. Krylov, N. A. Anisimova, M. V. Kiselevskiy, N. V. Krukovskaya, C. Li, G. Yu, S. Saran, R. K. Saxena, A. I. Usov, N. E. Nifantiev, *Pure Appl. Chem.*, 2014, **86**, 1365.
14. M. I. Bilan, A. I. Usov, *Nat. Prod. Commun.*, 2008, **3**, 1639.
15. А. И. Усов, М. И. Билан, *Успехи химии*, 2009, **78**, 846 [A. I. Usov, M. I. Bilan, *Russ. Chem. Rev. (Int. Ed.)*, 2009, **78**, 785].
16. А. И. Усов, Н. Г. Клочкова, *Биоорган. химия*, 1994, **20**, 1236 [*Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 1994, **20**].
17. А. И. Усов, Г. П. Смирнова, Н. Г. Клочкова, *Биоорган. химия*, 2001, **27**, 444 [*Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 2001, **27**, 450].
18. А. И. Усов, Г. П. Смирнова, Н. Г. Клочкова, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2005, 1245 [*Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2005, **54**, 1282].
19. А. И. Усов, А. О. Чижов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1993, 1660 [A. I. Usov, A. O. Chizhov, *Russ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, 1993, **42**, 1597].
20. А. И. Усов, А. О. Чижов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1993, 1817 [A. I. Usov, A. O. Chizhov, *Russ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, 1993, **42**, 1742].
21. А. И. Усов, Г. П. Смирнова, М. И. Билан, А. С. Шашков, *Биоорган. химия*, 1998, **24**, 437 [*Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 1998, **24**, 382].
22. N. E. Ustuzhanina, M. I. Bilan, A. G. Gerbst, N. A. Ushakova, E. A. Tsvetkova, A. S. Dmitrenok, A. I. Usov, N. E. Nifantiev, *Carbohydr. Polym.*, 2016, **136**, 826.
23. M. I. Bilan, A. A. Grachev, A. S. Shashkov, M. Kelly, C. J. Sanderson, N. E. Nifantiev, A. I. Usov, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 2038.
24. A. O. Chizhov, A. Dell, H. R. Morris, S. M. Haslam, R. A. McDowell, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, E. A. Khatuntseva, A. I. Usov, *Carbohydr. Res.*, 1999, **320**, 108.
25. T. Sakai, H. Kimura, K. Kojima, K. Shimanaka, K. Ikai, I. Kato, *Mar. Biotechnol.*, 2003, **5**, 70.
26. J. Wu, Y. Lv, X. Liu, X. Zhao, G. Jiao, W. Tai, P. Wang, X. Zhao, C. Cai, G. Yu, *J. Carbohydr. Chem.*, 2015, **34**, 303.
27. S. D. Anastyuk, N. M. Shevchenko, E. L. Nazarenko, T. I. Imbs, V. I. Gorbach, P. S. Dmitrenok, T. N. Zvyagintseva, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 2206.
28. S. D. Anastyuk, T. I. Imbs, N. M. Shevchenko, P. S. Dmitrenok, T. N. Zvyagintseva, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **90**, 993.
29. F. A. Pettolino, C. Walsh, G. B. Fincher, A. Bacic, *Nature Protocols*, 2012, **7**, 1590.
30. K. S. Dodgson, R. G. Price, *Biochem. J.*, 1962, **84**, 106.
31. A. I. Usov, M. I. Bilan, N. G. Klochkova, *Bot. Mar.*, 1995, **38**, 43.
32. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 350.

Поступила в редакцию 4 августа 2016;
после доработки — 19 октября 2016