



СТРОЕНИЕ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ МОРСКОГО ОГУРЦА *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*¹

© 2023 г. М. И. Билан*, А. С. Дмитренко*, С. П. Никогосова*, Е. А. Цветкова*, Н. Е. Устюжанина*, Cao Thi Thuy Hang**, Pham Duc Thinh**, Dinh Thanh Trung**, Tran Thi Thanh Van**, А. И. Усов*, Н. Э. Нифантьев*.*

*ФГБУН “Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского” РАН,
Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

**NhaTrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
02 Hung Vuong Street, Nhatrang, 650000 Socialist Republic of Vietnam

Поступила в редакцию 20.01.2023 г.

После доработки 05.02.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

Фукозилированный хондроитинсульфат **FCS-Hf** и препараты фукансульфатов **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** выделены из вьетнамской голотурии *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*. Разделение полисахаридов проведено с помощью анионообменной хроматографии на DEAE-сефацелле. Строение полисахаридов установлено по данным количественного определения содержания моносахаридов и сульфата, а также по спектрам ЯМР. Показано, что молекулы **FCS-Hf** построены из повторяющихся трисахаридных фрагментов, причем чередующиеся остатки 3-связанного *N*-ацетил- β -D-галактозамина и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты образуют главную цепь полимера, которая несет боковые ответвления в виде остатков α -L-фукозы, присоединенных к О3 глюкуроновой кислоты. Регулярная структура полимера замаскирована неравномерным распределением сульфатных групп, присоединенных к остаткам фукозы (2,4-дисульфат, 3,4-дисульфат и 4-моносulfат в соотношении 2 : 2 : 1) и остаткам галактозамина (4,6-дисульфат и 4-моносulfат в соотношении 3 : 1). Показано также, что фукансульфат **Hf-Fuc1** содержит преимущественно линейные молекулы, построенные из 4-связанных остатков 3-сульфата α -L-фукозы, тогда как **Hf-Fuc2** представляет собой, по всей видимости, смесь из нескольких родственных фукансульфатов, содержащих линейные и разветвленные цепи из 3-связанных и 4-связанных остатков α -L-Fuc, которые сульфатированы в различных положениях.

Ключевые слова: *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*, голотурия (морской огурец), полисахариды, фукозилированный хондроитинсульфат, фукансульфат

DOI: 10.31857/S0132342323040309, EDN: ODDRCN

ВВЕДЕНИЕ

Голотурии (морские огурцы, *Holothuroidea*) – это класс беспозвоночных, относящийся к типу иглокожих (*Echinodermata*). Животные широко распространены в водах Мирового океана и служат объектом крупномасштабного промысла, который вносит существенный вклад в экономику ряда приморских стран, особенно в Юго-Восточной Азии, где голотурии традиционно употребляются в пищу и могут находить медицинское применение [1]. Биомасса голотурий характеризуется уникальным химическим составом, причем наи-

больший интерес представляют сульфатированные полисахариды и тритерпеновые гликозиды. Эти метаболиты интенсивно исследуются благодаря присущей им разнообразной биологической активности [2].

Массивная стенка тела голотурий содержит два типа сульфатированных полисахаридов. Наиболее известны фукозилированные хондроитинсульфаты (FCS) [3], в основе молекул которых лежит линейная регулярная цепь, построенная из чередующихся остатков 3-связанного *N*-ацетил- β -D-галактозамина и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты и, следовательно, совпадающая по структуре с хондроитином наземных организмов. В отличие от хондроитина, FCS содержат ответвления от главной цепи в виде остатков α -L-фукозы, присоединенной чаще всего в положение 3 остат-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: FCS – фукозилированные хондроитинсульфаты; FS – фукансульфаты; SP – сульфатированные полисахариды.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-87-84, эл. почта: pen@ioc.ac.ru).

ков глюкуроновой кислоты, и многочисленные сульфатные группы.

Регулярная структура углеводной части с трисахаридным повторяющимся звеном некоторое время считалась общей для FCS, выделяемых из разных видов голотурий [3], но более поздние исследования показали [4], что полисахариды разного происхождения могут иметь существенные структурные различия: остатки Fuc могут нести сульфатные группы во всех возможных положениях [5] и могут быть присоединены не только к О3 остатков GlcA, но также к GalNAc в положении О4 или О6 [6, 7].

Ответвления от главной цепи в FCS могут быть представлены не только единичными остатками Fuc, но и дисахаридами различного строения [8–11] и даже более длинными углеводными цепями [12], остатки GlcA не обязательно фукозилированы, но могут быть незамещенными [13] или сульфатированными по О3 [7, 14] и даже одновременно по О2 и О3 [15], тогда как остатки GalNAc обычно сульфатированы по О4 и/или О6 [5]. Таким образом, семейство FCS голотурий представляет собой большой набор полисахаридных структур, и с их структурными особенностями, несомненно, связаны различия в биологической активности [16–18].

Другая группа сульфатированных полисахаридов голотурий – фукансульфаты (FS), во многом подобные аналогичным полисахаридам из другого класса иглокожих, морских ежей Echinoidea, и фукоиданам из бурых водорослей Phaeophyceae [19]. Поскольку водорослевые фукоиданы легко доступны в больших количествах, они изучаются гораздо более интенсивно, чем FS голотурий, однако их более сложное строение (нерегулярные разветвленные молекулы, часто содержащие, кроме фукозы, остатки других моносахаридов) затрудняет установление надежных корреляций между структурой и биологической активностью.

В отличие от водорослевых полимеров, FS голотурий обычно состоят только из остатков фукозы и сульфата. Известны простые регулярные структуры, построенные из повторяющихся одинаковых моноссульфатированных остатков фукозы $[-3)-\alpha\text{-L-Fuc2S-(1-)]_n$, $[-4)-\alpha\text{-L-Fuc3S-(1-)]_n$ и $[-4)-\alpha\text{-L-Fuc2S-(1-)]_n$, выделенные, соответственно, из *Stichopus horrens* [20], *Holothuria fuscopunctata* [21] и *Thelenotia ananas* [21]. Более сложные молекулы могут быть построены из олигосахаридных повторяющихся звеньев, причем FS, выделенные из разных видов голотурий, различаются размером этих звеньев, степенью сульфатирования, положением сульфатных групп, а также наличием или отсутствием разветвлений в каждом звене (подробный перечень известных структур

приведен в работах [22, 23]). Регулярный характер молекул FS позволяет надежно устанавливать их строение и использовать эти данные для выявления структурных особенностей, ответственных за проявление практически важных биологических свойств, таких как антикоагулянтная, противовирусная и многие другие активности [24–26].

Морская акватория Вьетнама – это богатый источник морских объектов, таких как голотурии, для химических исследований. Примером служит работа, в которой описаны выделение, структурный анализ и характеристика противопухоловой активности нового FS из *Stichopus variegatus* [27]. В нашем предыдущем сообщении [22] приведены данные о строении и антикоагулянтной активности полисахаридов, выделенных из двух вьетнамских голотурий *Bohadschia argus* и *Holothuria (Theelothuria) spinifera*. В предлагаемой статье, выполненной в продолжение этих исследований, сообщаются новые данные о сульфатированных полисахаридах голотурии *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* (Jaeger, 1833) (обозначаемой далее *H. (S.) fuscocinerea*). Полисахаридный состав этого вида, довольно широко распространенного в тропических водах Мирового океана [28, 29], ранее не исследовался. Нами выделены и охарактеризованы по структуре препараты **FCS-Hf**, **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**, биологическая активность которых изучается в настоящее время.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*, собранного во Вьетнаме, были получены сульфатированные полисахариды. Смесь водорастворимых полисахаридов **SP** выделяли из стенки тела морских огурцов путем обычной солиubilизации в присутствии папаина, добавляемого для разрушения белков [14], с последующей обработкой экстракта бромидом гексадецилтриметиламмония для осаждения сульфатированных компонентов, которые затем превращали в водорастворимые натриевые соли [22].

Препарат **SP** фракционировали с помощью анионообменной хроматографии. Оказалось, что главная фракция препарата (**FS**) не сорбируется на DEAE-сефацеле и элюируется с колонки водой. Остальной материал элюировали растворами NaCl возрастающей концентрации. Фракцию, которая элюировалась 1.0 M NaCl и по составу соответствовала фукозилированному хондроитинсульфату, обозначали **FCS-Hf** и использовали для структурного анализа.

Невозможность разделения **FS** в условиях как ионообменной, так и гелпроникающей хроматографии можно объяснить тем, что этот биополимерный продукт образует не истинные, а

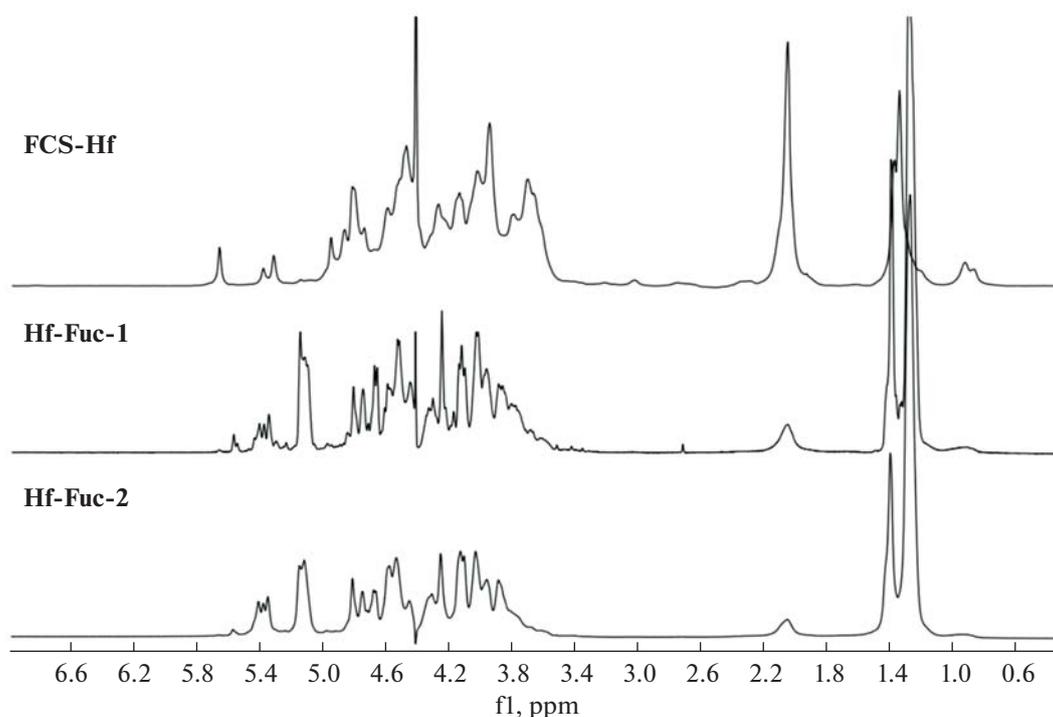


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР сульфатированных полисахаридов, выделенных из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*.

коллоидные растворы, где присутствует в виде высокомолекулярных комплексов с белками и многовалентными катионами. С подобным явлением, когда часть сульфатированных полисахаридов не сорбируется на ионообменных фазах и элюируется в виде фракции, вымываемой водой, уже сталкивались другие авторы, что упомянуто в ряде недавних работ [22, 23, 30, 31]. Интересно отметить, что такие комплексы образуют только FS, но не FCS. Таким образом, это, казалось бы, нежелательное явление позволяет, тем не менее, разделить FS и FCS, которые в отсутствие такого комплексообразования обладали бы одинаковой подвижностью при анионообменной хроматографии. Для разрушения комплекса фракцию FS подвергали кратковременному нагреванию с разбавленной HCl, после чего препарат можно было хроматографировать на колонке с DEAE-сефацелом, как описано выше. Две главные фракции, которые элюировались 1.0 и 1.5 M NaCl, соответствующие по составу фукансульфату, были обозначены **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** и использовались далее для установления их строения.

Детальную характеристику строения полисахаридов проводили с использованием спектроскопических методов ЯМР. Важно отметить, что одномерные спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР полисахаридов оказались малоинформативными (рис. 1 и 2). Характеристические сигналы в них соответствовали присутствию в структуре полисахаридов

определенных моносахаридных остатков. Так, наличие фукозы, галактозамина и уроновой кислоты в качестве основных моносахаридных компонентов в полисахариде **FCS-Hf** подтверждалось характеристическими значениями химических сдвигов C6 для Fuc (δ 17.3 м.д.) и GlcA (δ 176.3 м.д.), а также C2 для GalNAc (δ 52.7 м.д.) в спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 2). Это подтвердило сделанное на основании результатов определения содержания моносахаридов и сульфата предположение о том, что биополимер **FCS-Hf** – это фукозилированный хондроитинсульфат. Полисахариды **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**, согласно анализу моносахаридного состава, были построены в основном из остатков фукозы. Это подтверждалось характеристическими значениями химических сдвигов C6 (δ 16.5–16.9 м.д.) и H6 (δ 1.28–1.40 м.д.) для Fuc в спектрах ^{13}C - и ^1H -ЯМР соответственно (рис. 1 и 2). Таким образом, полисахариды **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** действительно представляли собой две фракции фукансульфата, очевидно, различающиеся степенью сульфатирования.

Только детальная расшифровка двумерных спектров COSY, HSQC, TOCSY и ROESY позволила получить данные о типах гликозидных связей и положении сульфатных групп в исследуемых полисахаридах. На рис. 3 представлен пример расшифровки двумерного спектра ^1H - ^{13}C HSQC, полученного для полисахарида **FCS-Hf**.

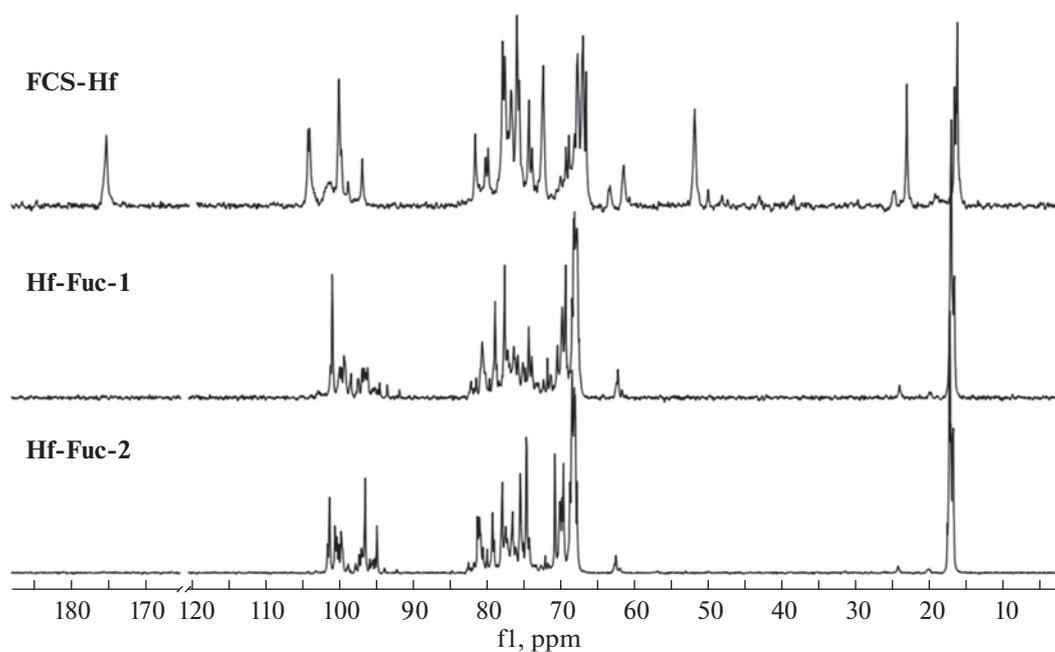


Рис. 2. Спектры ^{13}C -ЯМР сульфатированных полисахаридов, выделенных из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*.

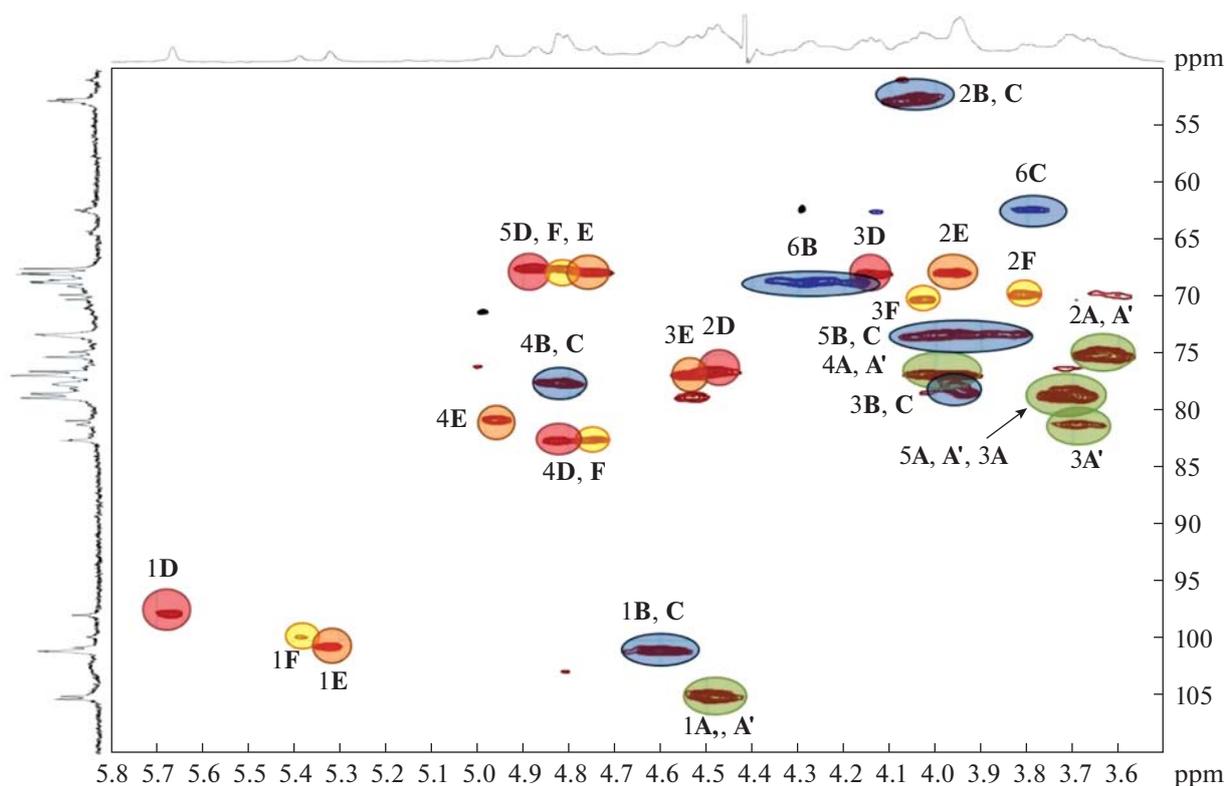


Рис. 3. Спектр ^1H - ^{13}C HSQC полисахарида FCS-Hf.

Таблица 1. Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (химические сдвиги, м.д.) полисахаридов **FCS-Hf** и **Hf-Fuc1**

	Остаток	H1 (C1)	H2 (C2)	H3 (C3)	H4 (C4)	H5 (C5)	H6 (C6)
A	$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow)	4.48 (105.0)	3.64 (75.0)	3.71 (78.2)	3.96 (76.6)	3.71 (78.2)	— (176.0)
A'	$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow)	4.48 (105.0)	3.60 (75.0)	3.68 (80.7)	4.00 (76.6)	3.71 (78.2)	— (176.0)
B	$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow)	4.58 (100.9)	4.07 (52.7)	3.95 (77.9)	4.81 (77.2)	4.00 (73.2)	4.33, 4.20 (68.5)
C	$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow)	4.58 (100.9)	4.07 (52.7)	3.95 (77.9)	4.81 (77.2)	4.02 (76.2)	3.81 (62.3)
D	α -L-Fucp2S4S-(1 \rightarrow)	5.69 (97.7)	4.48 (76.6)	4.17 (67.8)	4.86 (82.5)	4.90 (67.5)	1.37 (16.9)
E	α -L-Fucp3S4S-(1 \rightarrow)	5.34 (100.5)	3.95 (67.6)	4.53 (76.6)	5.01 (80.6)	4.85 (67.6)	1.37 (17.2)
F	α -L-Fucp4S-(1 \rightarrow)	5.41 (99.6)	3.82 (69.7)	4.04 (70.0)	4.77 (82.4)	4.85 (67.6)	1.37 (17.2)
G	$\rightarrow 4$)- α -L-Fucp3S-(1 \rightarrow)	5.15 (101.0)	4.14 (68.3)	4.67 (77.6)	4.26 (78.9)	4.53 (69.3)	1.40 (16.9)

Примечание: полужирным шрифтом выделены сигналы, соответствующие положениям сульфатных групп.

Сигналы GlcA и GalNAc были аналогичны описанным ранее для других фукозилированных хондроитинсульфатов, основная цепь которых построена из звеньев $\rightarrow 3$)- β -D-GalNAc-(1 $\rightarrow 4$)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow [4, 32, 33] (табл. 1).

FCS из разных видов морских огурцов различаются положением сульфатных групп в фукозильных остатках [3, 4, 32, 33]. В случае **FCS-Hf** наблюдали три типа фукозильных ответвлений: **D**, **E** и **F** (рис. 4). По данным спектра HSQC, положения сигналов H1, отвечающих звеньям **D**, **E** и **F**, находятся при 5.69, 5.34 и 5.41 м.д. соответственно (рис. 3).

Дальнейшее отнесение сигналов в спиновых системах остатков **D**, **E** и **F** было выполнено с использованием данных спектра COSY (рис. 5а, табл. 1). Слабопольные сдвиги сигналов H2 (δ 4.48 м.д.) и H4 (δ 4.86 м.д.) свидетельствовали о наличии сульфатных групп при C2 и при C4 в остатке **D**. Для остатка **E** слабопольные сдвиги сигналов H3 (δ 4.53 м.д.) и H4 (δ 5.01 м.д.) свидетельствовали о сульфатировании положений 3 и 4. В остатке **F** содержится только одна сульфатная группа при C4 (δ H4 4.77 м.д.). Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее для многих других FCS, несущих сульфатированные

фукозильные ответвления [4, 34, 35]. Соотношение остатков **D** : **E** : **F** было определено с использованием величин интегральных интенсивностей соответствующих сигналов H1 и составило 2 : 2 : 1. Анализ данных спектра ROESY позволил определить положение фукозильных ответвлений **D**, **E** и **F** (рис. 5б). Кросс-пики, соответствующие взаимодействию H1 (Fuc) – H3 (GlcA), однозначно свидетельствовали о присоединении фукозных заместителей к O3 остатков глюкуроновой кислоты.

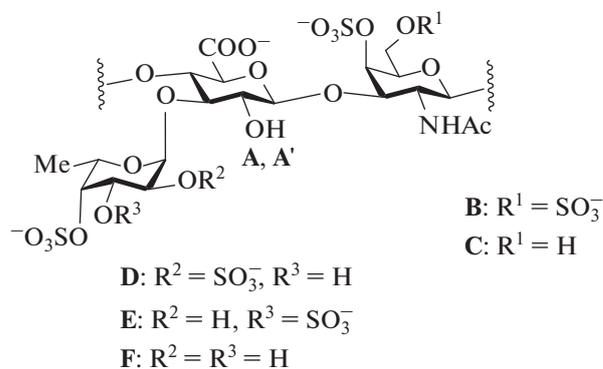


Рис. 4. Строение повторяющегося звена полисахарида **FCS-Hf**.

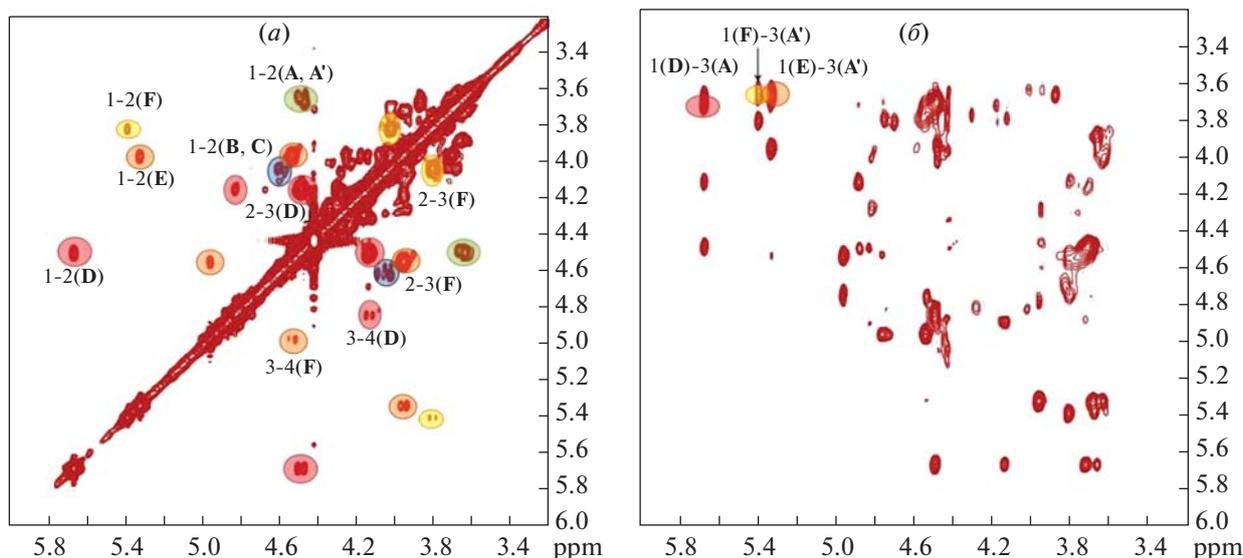


Рис. 5. Спектры ^1H - ^1H COSY (а) и ^1H - ^1H ROESY (б) полисахарида FCS-Hf.

По данным спектра HSQC, в структуре FCS-Hf присутствуют сульфатированные по положениям O4 остатки GalNAc, часть которых дополнительно сульфатирована по положениям O6 (кросс-пики 6B и 6C, рис. 3). Интегрирование интенсивностей соответствующих кросс-пиков позволило определить приблизительное соотношение между остатками B и C (рис. 4), которое составило 3 : 1.

Расшифровка двумерных спектров фукансульфатов Hf-Fuc1 и Hf-Fuc2 показала, что эти биополимеры существенно различаются по строению. Так, главным компонентом образца Hf-Fuc1 оказался регулярный линейный полимер, построенный из повторяющихся 4-связанных фукозных остатков (G), несущих сульфатную группу при C3 (рис. 6a). Аналогичный полисахарид был выделен ранее из морских огурцов *Holothuria fuscopunctata* [21] и *Bohadschia argus* [22]. Спектры полисахарида Hf-Fuc2 были достаточно сложны для детального анализа из-за перекрытия многих важных сигналов (рис. 6б). Эта сложность может быть объяснена наличием разветвлений и случайным

распределением сульфатов вдоль полимерных цепей, т.к. разветвление и сульфатирование в каждом положении вызывают изменение химических сдвигов не только в своем остатке, но и в соседних гликозилированных и гликозилирующих остатках. Тем не менее отнесение многих сигналов и соответствующих им корреляций в аномерной области спектров было предложено (табл. 2), исходя из предположения об одновременном присутствии двух типов полимеров, содержащих случайно сульфатированные повторяющиеся звенья, показанные на рис. 7.

Для предварительной оценки молекулярной массы полисахаридов проводили гель-электрофорез образцов FCS-Hf, Hf-Fuc1 и Hf-Fuc2 с использованием сульфатированных полисахаридов гепарина (Sigma, 15 кДа) и эноксапарина (Слексапек®, Sanofi, 4.5 кДа) с определенной молекулярной массой в качестве стандартов (рис. 8). На основании подвижности образцов был сделан вывод, что молекулярная масса FCS-Hf выше, чем у гепарина, у Hf-Fuc2 сопоставима с эноксапарином, а у Hf-Fuc1 меньше, чем у эноксапарина.

Таблица 2. Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (аномерные сигналы, химические сдвиги, м.д.) отдельных звеньев полисахарида Hf-Fuc2

Остаток	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}4\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{4\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{4\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}}$
C1	94.7	96.3	96.3	96.3	99.5	100.4
H1	5.39	5.41	5.32	5.12	5.12	5.14

Примечание: полужирным шрифтом выделены моносахаридные остатки, для которых приведены химические сдвиги сигналов в ЯМР-спектрах.

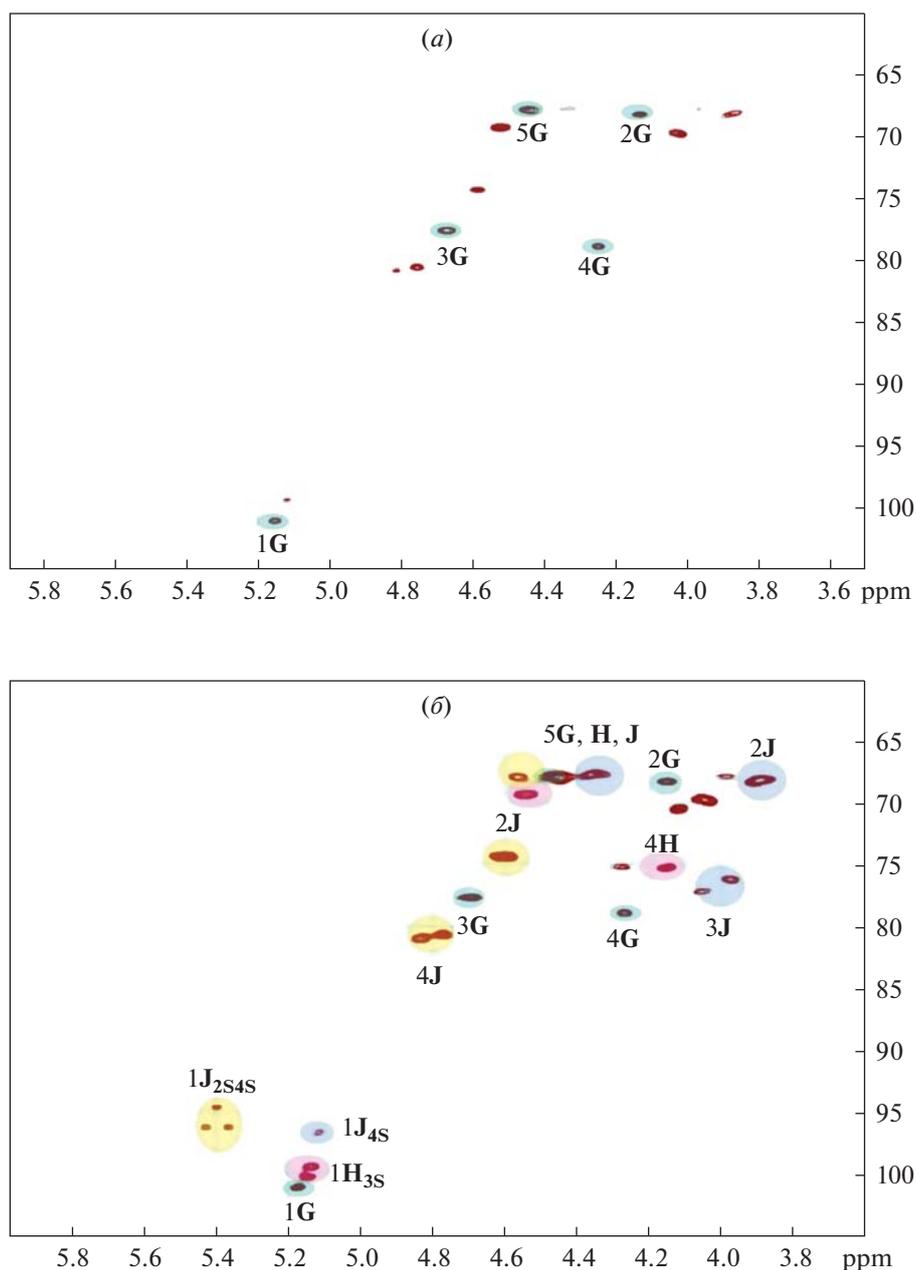


Рис. 6. Спектры ^1H - ^{13}C HSQC полисахаридов Hf-Fuc1 (a) и Hf-Fuc2 (б).

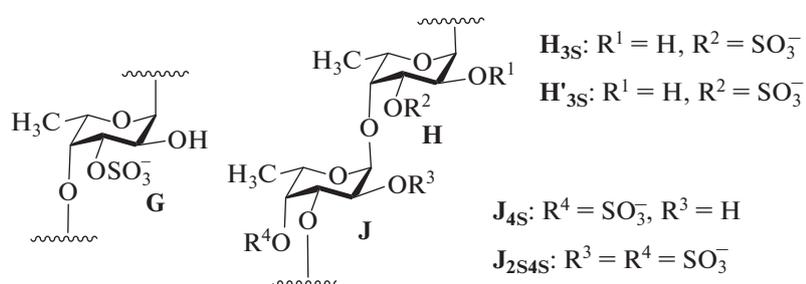


Рис. 7. Основные структурные фрагменты полисахаридов Hf-Fuc1 (G) и Hf-Fuc2 (G, J, H).

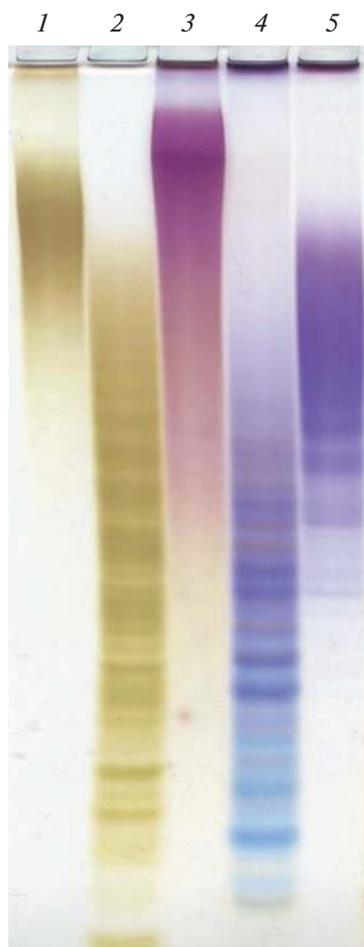


Рис. 8. Электрофорез в 20%-ном ПААГ образцов гепарина (1), эноксапарина (2), FCS-Hf (3), Hf-Fuc1 (4) и Hf-Fuc2 (5).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общие методы. Методики определения содержания в полисахаридах нейтральных моносахаридов и аминокислот с помощью ГЖХ [36, 37], уоновых кислот спектрофотометрическим методом по реакции с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой [38] и сульфата методом турбидиметрии [36] описаны ранее.

Животные. Взрослые особи голотурии *H. (S.) fuscocinerea* были собраны в прибрежной зоне залива Нячанг (Вьетнам), помещены в морскую воду и доставлены в лабораторию в тот же день. После удаления внутренних органов стенки тела морских огурцов погружали в 96%-ный этанол, выдерживали 5 суток, после чего заливали ацетоном и оставляли на ночь. Далее материал измельчали и высушивали на воздухе.

Выделение полисахаридов. Согласно традиционной процедуре экстракции [14], препарат стенок тела морских огурцов (50 г) и папаин (10 г) в

1 л 0.1 М ацетатного буфера (pH 6.0), содержащего 5 мМ ЭДТА и 5 мМ хлоргидрата цистеина, инкубировали 24 ч при 60°C, после чего нагревали 20 мин на кипящей водяной бане для инактивации фермента, охлаждали и небольшой осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту добавляли 10%-ный водный раствор бромид гексадецилтриметиламмония до полного осаждения сульфатированных полисахаридов. Смесь оставляли на ночь при 4°C, осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, растворяли в смеси 2 М NaCl и этанола (4 : 1) и прибавляли 3 объема 96%-ного этанола. Смесь выдерживали 24 ч при 4°C, осадок отделяли, промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали, получали суммарный препарат сульфатированных полисахаридов **SP** (выход 1.7 г), в составе которого обнаружили 20.9% фукозы и 3.6% уоновых кислот. Суспензию 300 мг **SP** в 60 мл воды перемешивали несколько часов при комнатной температуре, осадок (60 мг) отделяли центрифугированием, раствор наносили на колонку (3 × 10 см) с DEAE-сефацелом (Pharmacia, Швеция) в Cl⁻ форме, промывали водой и далее растворами NaCl возрастающей концентрации (0.5, 0.75, 1.0 и 1.5 М), каждый раз до отсутствия положительной реакции на углеводы с фенолом и серной кислотой [39]. Фракции обессоливали диализом или на колонке с сефадексом G-15 и лиофилизировали, выход фракций H₂O (далее обозначается **FS**) составил 100 мг (33.3%), 0.5 М – менее 5 мг, 0.75 М – 11 мг (3.7%), 1.0 М – 47 мг (15.7%) и 1.5 М – 16 мг (5.3%). Фракция 1.0 М по составу была близка к типичным FCS (мольные соотношения фукозы, галактозамина, уоновых кислот и сульфата 14 : 11 : 14 : 61 с небольшой примесью галактозы и глюкозамина) и исследовалась далее под названием **FCS-Hf**.

Кислотная обработка фракции FS. Фракцию (100 мг) растворяли в 30 мл 0.1 М HCl, нагревали 3 ч при 50°C, после охлаждения наносили на колонку с DEAE-сефацелом и хроматографировали, как описано выше. Получили две фракции, которые элюировались, соответственно, 1.0 М NaCl (**Hf-Fuc1**, выход 24 мг, состав: Fuc 48.9%, Gal 4.0%, SO₃Na 33.4%, уоновые кислоты 1.7%, следы аминокислот) и 1.5 М NaCl (**Hf-Fuc2**, выход 20 мг, состав: Fuc 49.0%, Gal 2.6%, SO₃Na 36.9%, уоновые кислоты 0.7%, следы аминокислот).

Спектроскопия ЯМР. Образец полисахарида (30 мг) растворяли в 99.9% D₂O и лиофилизировали, затем снова растворяли в 99.96% D₂O и помещали в ампулу. Спектры ЯМР получали при 60°C на ЯМР-спектрометре Avance II (Bruker, Германия) с частотой 600 МГц, оснащенном зондом Z-градиента с частотами протонов и углерода

600.13 и 150.90 МГц соответственно. В качестве внутреннего стандарта использовали 3-(триметилсилил)-3,3,2-тетрадейтеропропионовую кислоту (δH 0.0, δC 1.6). Одномерные спектры ^{13}C -ЯМР получали с использованием времени релаксации и регистрации 0.1 и 0.54 с соответственно, с накоплением 110 000 сканов. Перед преобразованием Фурье было применено экспоненциальное уширение линии 2 Гц. Двумерные спектры регистрировали и обрабатывали стандартными методами и пакетами Bruker. Спектры ^1H - ^1H корреляционной спектроскопии (COSY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 4 повторения, 512 приращений, с предварительным насыщением для подавления сигнала воды. Спектры полной корреляционной спектроскопии (TOCSY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 8 повторов, 256 приращений. Время спиновой блокировки в экспериментах TOCSY составляло 100 мс. Спектры с использованием эффекта Оверхаузера (ROESY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 32 повторения, 256 приращений, с предварительным насыщением для подавления сигнала воды. Время смещения в экспериментах ROESY составляло 200 мс. Спектры гетероядерной одиночной квантовой когерентности (HSQC) регистрировали с шириной 3000×15000 Гц, задержкой релаксации 1.5 с, 32 повторениями по 256 приращений.

Электрофорез. Растворы полисахаридов **FCS-Hf**, **Hf-Fuc1**, **Hf-Fuc2**, гепарина (Sigma, США) и эноксапарина (Clexane®, Sanofi, Франция) (по 15 мкг) в буфере (10 mM Tris-борат, pH 8.3, с 10% (w/v) глицерина) наносили на слой 20%-ного полиакриламида (ICN Biochemicals) толщиной 0.75 мм, приготовленного в 100 mM Tris-борате, pH 8.3. Электрофорез проводили при 400 В в буфере (100 mM Tris-борат, pH 8.3) в течение 1 ч. Гель окрашивали 0.003%-ным раствором Stains-all (Merck, Германия) в смеси формамид (Sigma, США)—изопропанол—вода (5 : 25 : 70) в течение ночи в темноте и обесцвечивали водой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вьетнамской голотурии *H. (S.) fuscocinerea* выделена смесь сульфатированных полисахаридов, из которой с помощью анионообменной хроматографии был получен препарат фукозилированного хондроитинсульфата **FCS-Hf** и фракция **FS**, содержащая фукансульфат в виде высокомолекулярного комплекса, не способного сорбироваться на ионообменнике. После разложения этого комплекса мягкой кислотной обработкой и анионообменной хроматографии были получены два образца фукансульфата — **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**. Для установления строения полисахаридов использовали данные количественного определе-

ния моносахаридного состава и сульфата, а также спектры ЯМР. Показано, что **FCS-Hf** имеет довольно распространенную для FCS голотурий структуру углеводной части, которая содержит линейную цепь из чередующихся остатков 3-связанного *N*-ацетил- β -D-галактозамина и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты, несущей ответвления в виде остатков α -L-фукозы, присоединенных в положение 3. Полисахариды с такой структурой углеводной части, выделенные из разных видов голотурий, могут различаться способом сульфатирования. В нашем случае сульфатные группы расположены в остатках фукозы (2,4-дисульфат, 3,4-дисульфат и 4-моносульфат в соотношении 2 : 2 : 1) и галактозамина (4,6-дисульфат и 4-моносульфат в соотношении 3 : 1). Число и положение сульфатных групп в FCS голотурий важны для проявления их биологической активности. Показано также, что **Hf-Fuc1** представляет собой в основном регулярный полимер, построенный из 4-связанных остатков 3-сульфата α -L-фукозы, тогда как **Hf-Fuc2** — это, по всей вероятности, смесь из нескольких FS, линейных и разветвленных, с разнообразным положением сульфатных групп. Хотя обычно считается, что именно характер сульфатирования определяет в первую очередь биологические свойства подобных полисахаридов, в нашей предыдущей статье был отмечен и такой неожиданный случай, как отсутствие антикоагулянтной активности у сульфатированного FS из голотурии *Bohadschia argus* [22]. Препараты, полученные в данной работе, предназначены для изучения их биологического действия, и эти результаты будут опубликованы отдельно.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 21-53-54004 Вьет_а) и Вьетнамской академии науки и технологии (грант КНСВVI.01/21-23).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Работа не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade / Eds. Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcelos M. Rome: FAO, 2008. 317 p.
2. Khotimchenko Y. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1342. <https://doi.org/10.3390/ijms19051342>
3. Pomin V.H. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. P. 232–254. <https://doi.org/10.3390/md12010232>
4. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Pure Appl. Chem. 2019. V. 91. P. 1065–1071. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1211>
5. Liu X., Zhang Z., Mao H., Wang P., Zuo Z., Gao L., Shi X., Yin R., Gao N., Zhao J. // Mar. Drugs. 2020. V. 18. P. 286. <https://doi.org/10.3390/md18060286>
6. Yang J., Wang Y., Jiang T., Lv Z. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 72. P. 911–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.010>
7. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Kusaykin M.I., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Glycobiology. 2016. V. 26. P. 449–459. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv119>
8. Mao H., Cai Y., Li S., Sun H., Lin L., Pan Y., Yang W., He Z., Chen R., Zhou L., Wang W., Yin R., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 245. P. 116503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116503>
9. Li S., Zhong W., Pan Y., Lin L., Cai Y., Mao H., Zhang T., Li S., Chen R., Zhou L., Wang W., Cui Q., Yin R., Huang S., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 269. P. 118290. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118290>
10. Yin R., Zhou L., Gao N., Lin L., Sun H., Chen D., Cai Y., Zuo Z., Hu K., Huang S., Liu J., Zhao J. // Biomacromolecules. 2021. V. 22. P. 1244–1255. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01739>
11. Yin R., Pan Y., Cai Y., Yang F., Gao N., Ruzemaimaiti D., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 294. P. 119826. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119826>
12. Qiu P., Wu F., Yi L., Chen L., Jin Y., Ding X., Ouyang Y., Yao Y., Jiang Y., Zhang Z. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 240. P. 116337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116337>
13. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Panina E.G., Sanatmyan N.P., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Ushakova N.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 389. <https://doi.org/10.3390/md16100389>
14. Vieira R.P., Mulloy B., Mourão P.A.S. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 13530–13536. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92730-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92730-4)
15. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 164. P. 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.034>
16. Li H., Yuan Q., Lv K., Ma H., Gao C., Liu Y., Zhang S., Zhao L. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 251. P. 117034. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117034>
17. Ustyuzhanina N.E., Anisimova N.Y., Bilan M.I., Donenko F.V., Morozovich G.E., Yashunskiy D.V., Usov A.I., Siminyan N.G., Kirgisov K.I., Varfolomeeva S.R., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. P. 1074. <https://doi.org/10.3390/ph14111074>
18. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Билан М.И., Усов А.И., Устюжанина Н.Е., Петкевич А.А., Шубина И.Ж., Морозевич Г.Е., Нифантьев Н.Э. // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 633–647. [Kiselevskiy M.V., Anisimova N.Yu., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Petkevich A.A., Shubina I.Zh., Morosevich G.E., Nifantiev N.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 39. P. 1109–1122.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022060152>
19. Pereira M.S., Mulloy B., Mourão P.A.S. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 7656–7667. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7656>
20. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2018. V. 456. P. 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.12.001>
21. Shang S., Mou R., Zhang Z., Gao N., Lin L., Li Z., Wu M., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 195. P. 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.117>
22. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Nikogosova S.P., Cao T.T.H., Pham D.T., Dinh T.T., Tran T.T.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifantiev N.E. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. P. 380. <https://doi.org/10.3390/md20060380>
23. Ning Z., Wang P., Zuo Z., Tao X., Gao L., Xu C., Wang Z., Wu B., Gao N., Zhao J. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. P. 377. <https://doi.org/10.3390/md20060377>
24. Mourão P.A.S. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 2770–2784. <https://doi.org/10.3390/md13052770>
25. Fonseca R.J.C., Mourão P.A.S. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 425. <https://doi.org/10.3390/md19080425>
26. Lu W., Yang Z., Chen J., Wang D., Zhang Y. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 272. P. 118526. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>
27. Pham D.T., Ly B.M., Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Rasin A.V., Anastyuk S.D., Malyarenko O.S., Zvyagintseva T.N., San P.T., Ermakova S.P. // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 117. P. 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.017>
28. Teo S., Ng C.S.L., Loh K.S. // Nat. Singapore. 2010. V. 3. P. 133–137.
29. Maya-Alvarado B., Calva-Benítez L.G., Granja-Fernández R., Pérez-López J., López-Pérez A. // Rev. Biol. Tropical. 2021. V. 69 (S1). P. 66–79. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69isuppl.1.46328>
30. Gao N., Chen R., Mou R., Xiang J., Zhou K., Li Z., Zhao J. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 164. P. 3421–3428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.150>
31. Ma Y., Gao N., Zuo Z., Li S., Zheng W., Shi X., Liu Q., Ma T., Yin R., Li X., Zhao J. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 186. P. 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.049>

32. Pomin V.H. // Carbohydr. Res. 2015. V. 413. P. 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.05.004>
33. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 167. P. 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.101>
34. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2019. V. 476. P. 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.02.008>
35. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Anisimova N.Y., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 281. P. 119072. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119072>
36. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustyuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719–730. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00053-8)
37. Билан М.И., Захарова А.Н., Грачев А.А., Шашков А.С., Нифантьев Н.Э., Усов А.И. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. С. 44–53. [Bilan M.I., Zakharova A.N., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2007. V. 33. P. 38–46.] <https://doi.org/10.1134/S1068162007010049>
38. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.43>
39. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith, F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

The Structure of Sulfated Polysaccharides from the Sea Cucumber *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*

M. I. Bilan*, A. S. Dmitrenok*, S. P. Nikogosova*, E. A. Tsvetkova*, N. E. Ustyuzhanina*,
Cao Thi Thuy Hang**, Pham Duc Thinh**, Dinh Thanh Trung**,
Tran Thi Thanh Van**, A. I. Usov*, and N. E. Nifantiev*,#

Phone: +7 (499) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 47, Moscow, 119991 Russia

**NhaTrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
02 Hung Vuong Street, Nhatrang, 650000 Socialist Republic of Vietnam

Fucosylated chondroitin sulfate **FCS-Hf** and preparations of fucan sulfates **Hf-Fuc1** and **Hf-Fuc2** were isolated from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*. Separation of the polysaccharides was carried out using anion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel. The structure of polysaccharides was established by determinations of the content of monosaccharides and sulfate, as well as by NMR spectra. It was shown that **FCS-Hf** was built of the repeating trisaccharide fragments, with alternating 3-linked *N*-acetyl- β -D-galactosamine and 4-linked β -D-glucuronic acid residues forming the main polymer chain, which carries α -L-fucose residues as side branches attached to O3 of glucuronic acid. The regular structure of polymer is masked by an uneven distribution of sulfate groups attached to fucose residues (2,4-disulfate, 3,4-disulfate and 4-monosulfate in a ratio of 2 : 2 : 1) and galactosamine residues (4,6-disulfate and 4-monosulfate in a ratio of 3 : 1). It was also shown that fucan sulfate **Hf-Fuc1** contained predominantly linear molecules built of 4-linked α -L-fucose 3-sulfate residues, while **Hf-Fuc2** appeared to be a mixture of several related linear and branched fucan sulfates containing 3-linked and 4-linked α -L-Fuc residues sulfated at different positions.

Keywords: *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*, sea cucumber, polysaccharides, fucosylated chondroitin sulfate, fucan sulfate